

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

OSCAR ALEXANDER AGUIRRE OBANDO

**Análise da resistência a inseticidas e variabilidade genética de
populações naturais de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)
(Diptera: Culicidae) da Colômbia e do Brasil.**

CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

OSCAR ALEXANDER AGUIRRE OBANDO

Análise da resistência a inseticidas e variabilidade genética de populações naturais de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) da Colômbia e do Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva.

Co-orientador: Prof. Dr. Jonny Edward Duque Luna.

CURITIBA

2013

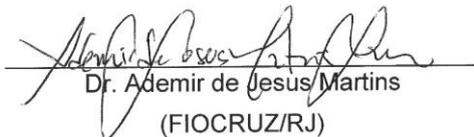
OSCAR ALEXANDER AGUIRRE OBANDO

“Análise da resistência a inseticidas e variabilidade genética de populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:Culicidae) da Colômbia e Brasil”

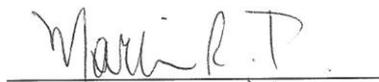
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



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



Dr. Ademir de Jesus Martins
(FIOCRUZ/RJ)



Prof. Dr. Márcio Roberto Pie
(UFPR)

Curitiba, 19 de fevereiro de 2013.

Dedico este trabalho a toda minha família e amigos, em especial aos meus pais, irmãos, e namorada por todo carinho e apoio apesar de estar fora do meu país.

I want to live my life on my own, I want to lift the unturned stone, I want to walk right into the fire, I want to live out all my desires, I want to go and see the fire burn, I want to see and feel my world turn, I want to know what more there's to learn, I want to pass the point of no return, I want to feel what life's like respond, I want to meet my father beyond, I want to walk right into the light, I want to feel no fear but delight, I want to live my life on my own, I want to lift the unturned stone, I want to walk right into the fire, I want to live out all my desires

Iron Maiden - The Educated Fool

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Mário Antônio Navarro da Silva, por todo o seu apoio, conversas e encorajamento; e ao meu co-orientador Professor Doutor Jonny Edward Duque Luna, pelas ideias no projeto e apoio moral para vir ao Brasil.

Aos meus pais, Octavio Aguirre Cáceres e Ilduara Maria Obando Ladino, irmãos Jhon Sebastian Aguirre Obando e Diego Mauricio Aguirre Obando e namorada Paula Andrea Cárdenas Rojas por todo o apoio e incentivo para continuar com meus sonhos fora do meu país. Aos avôs paternos, Magola Cáceres e Octavio Aguirre e avó materna que em paz descanse Rosa Arabia Obando Ladino, tios, primos e demais familiares, por sempre acreditarem no que eu faço.

A todos os membros do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, pelos conselhos e ajuda prestada, em especial a Ana Caroline Dalla Bona, Débora Rebecchi e Vinicius Richardi. A Ana por todo seu apoio moral e intelectual neste projeto. Débora, Vinicius e Rodrigo por as diversas conversas sobre qualquer coisa, incluindo a aprendizagem da Língua Portuguesa.

À turma de mestrado por permitir-me compartilhar e conhecer um pouco mais sua cultura, em especial a Diego Souza "*El maestro*".

Aos colegas e amigos hispanos Angélico, Bolivar, Larry, Mariana, Diana e Tatiana. É sempre grato trocar algumas palavras em nossa língua natal "Espanhol".

À nova família que tenho no Brasil, Alexsander e Vinicius, e claro a André que me ajudou muito quando cheguei ao Brasil.

Às diferentes Secretarias Estaduais de Saúde pela coleta do material que fizeram parte de meu trabalho, sem eles "já era" a dissertação.

Aos professores do programa de pós-graduação em entomologia da UFPR.

Ao CNPq, cuja bolsa possibilitou a realização deste projeto.

Aos membros da banca, que gentilmente cederam seu tempo e conhecimento para correções e aprimoramento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Países/Áreas com risco de transmissão de dengue (em vermelho) no ano de 2013, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Fonte: WHO 2013.....	22
Figura 2.	Porcentagem de casos de dengue e dengue grave por Estado 2010-2012. Fonte: SIVIGILA (2010-2012).....	24
Figura 3.	Porcentagem dos sorotipos do vírus dengue que ocorrem atualmente na Colômbia. Fonte: SIVIGILA (2012).	25
Figura 4.	Porcentagem de casos de dengue entre os anos 2008 e 2012. Fonte: Boletim Informativo dengue 2008-2012.....	26
Figura 5.	Ciclo de vida de <i>A. aegypti</i> . Fonte: Picoli et al. (2010).	29
Figura 6.	Estrutura química do larvicida organofosforado temephos, de nome químico O,O-(ditio-4,1fenileno) bis (O,O-dimetilfosforotioato); O,O'-(ditio-4,4-fenileno)O,O,O',O',tetrametil bis fosfotioato.	31
Figura 7.	Estruturas químicas dos adulticidas A. Malation (1,2-di(etoxycarbonil) etil o,o- dimetil fosforoditioato) e B. Fenitrotion (Dimetoxi-(3-metil-4-nitrofenoxi) tiofosforane).	32
Figura 8.	Estruturas químicas de a) Cipermetrina (C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃) e b) Delametrina (C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃).	32
Figura 9.	Representação de uma sinapse nervosa. 1. Mudanças na estrutura do canal do Na ⁺ . 2. Modificação no sítio químico de ação, a AChE por sua mudança não consegue unir-se ao inseticida e continua disponível para decompor as moléculas de acetilcolina após a neurotransmissão na sinapse. 3. Destoxificação de enzimas que degradam ou sequestram o inseticida antes de alcançar seu sítio de ação no sistema nervoso. Fonte: Encyclopedia of Insects (2009).....	46
Figura 10.	A. Status de suscetibilidade de populações de <i>A. aegypti</i> ao temephos usando teste da OMS. B. Mapa político da Colômbia	47
Figura 11.	Esquema do canal de sódio voltagem dependente, seus quatro domínios homólogos, suas seis subunidades hidrofóbicas e as mutações presentes em <i>A. aegypti</i>	51
Figura 12.	Esquema simplificado do DNAm com especial atenção ao ND4. Fonte: http://romavema.wikispaces.com/Eva+mitochondrial	55
Figura 13.	Área de estudo para as populações de <i>A. aegypti</i> coletadas na Colômbia com destaque no estado de Quindío e as áreas de coleta.....	69
Figura 14.	Áreas de coleta das populações de <i>A. aegypti</i> no Brasil com destaque nas regiões e estados coletados. N região Norte	

	(Estado Rondônia); CW região Centro-Oeste (Estado Mato Grosso); SE região Sudeste (Estado Minas Gerais) e S região Sul (Estado de Paraná).	71
Figura 15.	Processo de criação para obtenção de colônias das localidades coletadas em campo para realização dos bioensaios: a) larvas e pupas, b) recipiente com pupas e adultos, c) identificação de adultos, d) diferenças morfológicas entre <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> (Fonte: Florida Medical Entomology Laboratory, 1999), e) gaiolas para criação de adultos, f) oviposição. Fonte: Picoli et al. 2010.	77
Figura 16.	Esquema do procedimento do bioensaio de temephos com concentrações múltiplas (C1 a C9) e concentração diagnóstica (C6: 0.0162 ppm), totalizando quatro réplicas (R1 a R4), em quatro dias diferentes, mantido em câmara BOD a 26°C. Fonte: Bona et al. 2012.	79
Figura 17.	Esquema do procedimento de controle de estabilidade do temephos com a população suscetível Rockefeller, com duas concentrações de temephos e um controle com etanol, mantido em câmara BOD a 26°C. Fonte: Bona et al. 2012.	80
Figura 18.	Verificação da amplificação do fragmento do gene envolvido com a resistência aos piretróides. A. Somente banda de 78bp indica individuo homozigoto recessivo (Ile/Ile); B. Bandas entre 98 e 78 bp indica individuo heterozigoto (Val/Ile) e C. Somente banda de 98 pb indica individuo homozigoto dominante (Val/ Val).	82
Figura 19.	Produtos de amplificação do fragmento do gene ND4 de 15 indivíduos de <i>A. aegypti</i> (1, 3, 7, 8 e 10) com tamanho aproximado de 336 pb. 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14 e 15: Amostras não amplificadas. M: Marcador molecular de 100 pb (Amresco, Sólón, Ohio).	85
Figura 20.	Linhas de mortalidade Log-dose para a geração F1 de três populações de <i>A. aegypti</i> da Colômbia resistentes ao temephos. A cepa Rockefeller foi incluída como controle de suscetibilidade.	90
Figura 21.	Linhas de mortalidade Log-dose para a F1 de oito populações de <i>A. aegypti</i> do Brasil resistentes ao temephos. A cepa Rockefeller foi incluída como controle de suscetibilidade.	92
Figura 22.	Frequência alélica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente de quatro populações de <i>A. aegypti</i> da Colômbia.	94
Figura 23.	Frequência alélica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente de <i>A. aegypti</i> de nove populações do Brasil.	95

Figura 24.	Frequência relativa geral dos três haplótipos de <i>A. aegypti</i> na Colômbia.	99
Figura 25.	Rede de haplótipos do gene ND4 de <i>A. aegypti</i> para as populações da Colômbia. O retângulo representa o haplótipo ancestral. 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.	99
Figura 26.	Rede de haplótipos do gene ND4 de <i>A. aegypti</i> para as populações das Américas baseadas nos haplótipos do trabalho de Gonçalves et al. (2012).	100
Figura 27.	Rede de haplótipos do gene ND4 de <i>A. aegypti</i> para as populações das Américas Gonçalves et al. (2012) incluindo os haplótipos da Colômbia H1(H31), H2 (H32) e H3 (H33) dentro da rede de haplótipos).....	101
Figura 28.	Frequência relativa geral dos três haplótipos de <i>A. aegypti</i> no Brasil.	102
Figura 29.	Rede de haplótipos do gene ND4 de <i>A. aegypti</i> para as populações do Brasil.	102
Figura 30.	Rede de haplótipos do gene ND4 de <i>A. aegypti</i> para as populações das Américas Gonçalves et al. (2012) incluindo os haplótipos do Brasil H4 (H31), H5 (H32) e H6 (H33).....	103
Figura 31.	Rede de haplótipos do gene ND4 de <i>A. aegypti</i> para as populações das Américas Gonçalves et al. (2012) incluindo os haplótipos da Colômbia H1 (H31), H2 (H32) e H3 (H33) e do Brasil H4 (H34), H5 (H35) e H6 (H36).....	104
Figura 32.	Correlação entre as distâncias genética e geográfica utilizando o teste de Mantel das quatro populações da Colômbia.	109
Figura 33.	Dendrograma observado entre os três haplótipos de <i>A. aegypti</i> para as populações da Colômbia utilizando o método de Neighbor-Joining, seguindo o modelo de Jukes-Cantor. Os valores de bootstrap encontram-se nos ramos.....	109
Figura 34.	Dendrograma baseado nos valores par-a-par de FST das quatro populações de <i>A. aegypti</i> da Colômbia usando o método Neighbor-Joining seguindo o modelo de Jukes-Cantor. Os valores de bootstrap encontram-se nos ramos.	110
Figura 35.	Correlação entre as distâncias genética e geográfica utilizando o teste de Mantel das nove populações do Brasil.	112
Figura 36.	Dendrograma observado entre os três haplótipos de <i>A. aegypti</i> para as populações do Brasil utilizando o método de Neighbor-Joining, seguindo o modelo de Jukes-Cantor. Os valores de bootstrap encontram-se nos ramos.	112

Figura 37. Dendrograma baseado nos valores par-a-par de FST das nove populações de *A. aegypti* do Brasil usando o método Neighbor-Joining seguindo o modelo de Jukes-Cantor. Os valores de bootstrap encontram-se nos ramos. 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de casos de dengue notificados por 100 mil habitantes entre os anos 2008 até 2012 por regiões.	26
Tabela 2.	Produtos químicos utilizados para o controle do vetor <i>A. aegypti</i> na Colômbia e no Brasil.....	30
Tabela 3.	Medidas alternativas aos inseticidas químicos utilizados para o controle do vetor <i>A. aegypti</i> na Colômbia e no Brasil.....	31
Tabela 4.	Status de suscetibilidade ao organofosforado temephos de algumas populações colombianas e brasileiras de <i>A. aegypti</i>	40
Tabela 5.	Status de suscetibilidade ao organofosforado Malation em populações de <i>A. aegypti</i> colombianas e brasileiras.....	43
Tabela 6.	Diversidade genética observada em populações de <i>A. aegypti</i> utilizando o marcador mitocondrial ND4.....	56
Tabela 7.	Informações gerais dos municípios do estado de Quindío.....	70
Tabela 8.	Populações de <i>Aedes aegypti</i> coletadas na Colômbia.....	75
Tabela 9.	Populações de <i>Aedes aegypti</i> coletadas no Brasil no período de 2009 a 2012.	76
Tabela 10.	Primers utilizados para a mutação Val1016Ile.	81
Tabela 11.	Regiões e municípios do Brasil e seus respectivos números de ovitrampas instaladas, ovitrampas positivas, número total de ovos, porcentagem de eclosão de ovos e número de adultos de <i>Aedes spp</i>	87
Tabela 12.	Regiões do Brasil e respectivos números e adultos, espécies, sexagem e razão sexual de <i>Aedes spp</i>	88
Tabela 13.	Status de suscetibilidade de três municípios do estado de Quindío, Colômbia baseados na concentração diagnóstica 0,0162 ppm (calibrada com a cepa Rockefeller) no ano 2011.	89
Tabela 14.	Status de suscetibilidade das populações de <i>A. aegypti</i> de nove municípios do Brasil baseados na concentração diagnóstica 0,0162 ppm (calibrada com a cepa Rockefeller) no ano 2011.	89
Tabela 15.	Perfil de suscetibilidade ao temephos em populações colombianas de <i>A. aegypti</i>	90
Tabela 16.	Perfil de suscetibilidade ao temephos em populações brasileiras de <i>A. aegypti</i>	91
Tabela 17.	Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente de quatro populações de <i>A. aegypti</i> do Estado do Quindio, Colômbia.	93
Tabela 18.	Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente de <i>A. aegypti</i> de 10 populações do Brasil.	93

Tabela 19.	Número de indivíduos observados para cada haplótipo nas amostras de <i>A. aegypti</i> das quatro populações da Colômbia.....	97
Tabela 20.	Sítios variáveis observados nos três haplótipos da Colômbia do gene mitocondrial ND4 em <i>A. aegypti</i> . N indica o número de indivíduos que compartilham cada haplótipo.....	98
Tabela 21.	Número de indivíduos observados para cada haplótipo nas amostras de <i>A. aegypti</i> nas nove populações do Brasil.....	98
Tabela 22.	Sítios variáveis observados nos três haplótipos das populações do Brasil do gene mitocondrial ND4 em <i>A. aegypti</i> . N indica o número de indivíduos que compartilham cada haplótipo.....	98
Tabela 23.	Diversidade genética e testes de neutralidade calculados para as quatro populações de <i>A. aegypti</i> da Colômbia.....	105
Tabela 24.	Diversidade genética e testes de neutralidade calculados para as nove populações de <i>A. aegypti</i> do Brasil.....	106
Tabela 25.	Análise da variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de <i>A. aegypti</i> da Colômbia.....	108
Tabela 26.	Valores de FST par-a-par (acima da diagonal) e número efetivo de migrantes (Nm) (abaixo da diagonal) em populações de <i>A. aegypti</i> da Colômbia. Os valores de p que estão com asterisco apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0083$), após correção de Bonferroni.....	108
Tabela 27.	Análise da variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de <i>A. aegypti</i> do Brasil.....	110
Tabela 28.	Valores de FST par-a-par (acima da diagonal) e número efetivo de migrantes (Nm) (abaixo da diagonal) em populações de <i>A. aegypti</i> do Brasil. Os valores de p que estão com asterisco apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0014$), após correção de Bonferroni.....	111

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL-microlitros

AChE - Acetilcolinesterase

bp - pares de base

CL - Concentração Letal

dNTP - Desorribonucleotídeos Trifosfatados

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

FHD - febre Hemorrágica do Dengue

GABA - ácido gama-aminobutírico

Ile - isoleucina

kdr - *knockdown resistance*

Leu - Leucina

M - Molar

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

mg/L - miligramas por litro

mL - mililitros

Na_v - Canal de Sódio voltagem-dependente

OP - Organofosforados

PCR - Reação de Polimerização em Cadeira

PEAa - Plano de Erradicação do *Aedes aegypti*

Phe - Fenilalanina

ppm - partes por milhão

rpm - rotações por minuto

RR - razão de resistência

SCD - Síndrome do Choque do Dengue

SDS - Dodecilo Sulfato de Sódio

SIVIGILA - Sistema de Vigilancia Salud Pública

TBE - Tris Hidrocloro + Borato + EDTA

TE - Tris Hidrocloro + EDTA

Val - valina

X² - Chi quadrado

SUMÁRIO

RESUMO.....	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. A Dengue	20
1.2. Dengue na Colômbia	22
1.3. Dengue no Brasil	25
1.4. Família Culicidae.....	26
1.5. <i>Aedes aegypti</i>	27
1.6. Estratégias para o controle do vetor da dengue na Colômbia e no Brasil	29
1.7. Mecanismos de resistência.....	32
1.8. Resistência múltipla e cruzada	33
1.9. Detecção da resistência (Bioensaios).....	34
1.10. Resistência aos organofosforados.....	36
1.11. Resistência a piretróides – Alterações do sítio-alvo.....	48
1.12. Diversidade Genética.....	51
2. JUSTIFICATIVA	64
3. OBJETIVOS	66
3.1. Objetivo Geral	66
3.2. Objetivos específicos	66
4. MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1. Área de estudo.....	67
4.1.1. Colômbia	67
4.1.2. Brasil	70
4.1.2.1. Região Norte – Estado de Rondônia.....	72

4.1.2.2. Região Centro-Oeste – Estado de Mato Grosso.....	73
4.1.2.3. Região Sudeste – Estado de Minas Gerais	74
4.1.2.4. Região Sul – Estado de Paraná.....	74
4.2. Procedimentos de coleta.....	75
4.2.1. Colômbia	75
4.2.2. Brasil	75
4.3. Procedimentos em laboratório	76
4.3.1. Bioensaios da suscetibilidade com larvas de terceiro instar final e quarto instar inicial de <i>Aedes aegypti</i> ao temephos	78
4.3.1.1. Concentração diagnóstica.....	78
4.3.1.2. Concentrações múltiplas	78
4.3.2. Extração de DNA para análise dos fragmentos dos genes canal de sódio voltagem-dependente e ND4.	80
4.3.2.1. PCR alelo-específica para a mutação Val1016Ile.....	81
4.3.2.2. Amplificação, sequenciamento e análises do fragmento do gene ND4	83
5. RESULTADOS	86
5.1. Bioensaios da suscetibilidade de <i>Aedes aegypti</i> ao temephos.....	86
5.1.1. Dados bioecológicos	86
5.1.2. Concentração diagnóstica.....	88
5.1.3. Concentrações múltiplas	89
5.2. Genotipagem do códon 1016 do fragmento do gene canal de sódio voltagem-dependente	92
5.3. Diversidade genética - Fragmento do gene mitocondrial ND4.....	96
5.3.1. Distribuição e frequência dos haplótipos	96
5.3.2. Diversidade genética e testes de neutralidade.....	105
5.3.3. Análise da variância molecular (AMOVA) e estimativa de fluxo gênico	106

6. DISCUSSÃO	114
7. CONCLUSÕES	120
REFERÊNCIAS.....	122

RESUMO

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) é o principal vetor do vírus dengue e febre amarela urbana nas Américas. O controle do vetor é até hoje a única opção para evitar ou reduzir a transmissão do vírus dengue. Por isso, são utilizados continuamente inseticidas químicos que ocasionam intensa pressão de seleção, acarretando problemas para os programas de controle de vetores. O monitoramento da resistência herdada por esta espécie frente aos inseticidas organofosforados e piretróides frequentemente usados, tanto na Colômbia como no Brasil, assim como o conhecimento da diversidade genética, podem servir como guia para o plano de manejo de inseticidas e controle deste vetor. Este trabalho teve como objetivo avaliar o *status* de suscetibilidade de larvas frente a inseticidas organofosforados, a frequência da mutação Val1016Ile relacionada à resistência a piretróides e a variabilidade genética do fragmento do gene mitocondrial *ND4* em populações de *A. aegypti* da Colômbia e do Brasil. Foram realizados bioensaios com concentrações múltiplas e diagnósticas de temephos em três populações da Colômbia (Armenia, Calarcá, Montenegro) e oito do Brasil (Jarú, Cacoal, Guajará-Mirim e Porto Velho do Estado de Rondônia, Rondonópolis, Sinop e Várzea Grande do Estado Mato Grosso e Maringá do Estado de Paraná) para verificar a suscetibilidade ao temephos. Para avaliar a presença da mutação no códon 1016 e a diversidade genética foram amostrados em média 30 adultos de *A. aegypti* de cada população para a mutação *kdr* e 10 para a análise da variabilidade genética. Os resultados dos bioensaios a partir da dose diagnóstica 0.0162 ppm de temephos indicaram resistência nas populações de Armenia (77%) e Calarcá (62%) e alteração da suscetibilidade em Montenegro (88%). Na população avaliada de Calarcá foi detectada RR_{95} de 6,0, Armenia de 4,9 e Montenegro 3,7 quando comparadas com a cepa suscetível Rockefeller. No caso das populações brasileiras, das oito testadas, seis apresentaram resistência ao organofosforado (Jarú-RO, Guajará-Mirim-RO, Porto Velho-RO, Rondonópolis-MT, Sinop-MT e Várzea Grande-MT) e duas (Cacoal-RO e Maringá-PR) apenas alteração no status de suscetibilidade. Apresentando maior razão de resistência a população de Várzea Grande (14,0) e a menor na população de Maringá (3,08). Dos 107 exemplares de *A. aegypti* genotipadas para a mutação Val1016Ile nas quatro populações colombianas, 94% eram homocigotos para o alelo selvagem (Val/Val); 6% heterocigotos (Val/Ile) e 0% homocigotos para o alelo mutante (Ile/Ile). Para o Brasil, 251 exemplares foram genotipados. Destes, 66% (165) eram Val/Val; 11% (27) Val/Ile e 23% (59) Ile/Ile. As populações de Barcelona, na Colômbia e Maringá, no Brasil não apresentaram o alelo mutante. O estudo da diversidade genética usando *ND4* mostrou uma estruturação genética entre algumas populações, tanto na Colômbia quanto no Brasil, foram detectadas três linhagens mitocondriais para cada, com baixa diversidade genética e baixo fluxo gênico. Os haplótipos obtidos para as populações da Colômbia quando comparados com os disponíveis para América indicam uma relação com as populações presentes no México e América do Norte. No caso dos haplótipos brasileiros, relação com as populações presentes no Peru, México e América do Norte. No entanto, a análises em conjunto de todos os haplótipos sugerem uma relação com as populações do Peru, México e América do Norte. As ações de controle do vetor utilizando organofosforados e piretróides podem ser comprometidas devido à perda de suscetibilidade do vetor a estes inseticidas.

Palavras-chave: Bioensaios, temephos, piretróides, resistência *Knockdown*, DNA mitocondrial.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the main dengue virus vector and yellow fever in the Americas. The vector control is the only option to prevent or reduce the virus transmission so far; however, the constant use of chemical insecticides causes intense selection pressure, causing problems for vector control programs. The monitoring of acquired resistance for this species compared to organophosphate and pyrethroid insecticides commonly used both in Colombia and in Brazil as well as knowledge of genetic diversity can serve as a guide to the management plan and control of this vector. Thus, this study aimed to assess the susceptibility status of larvae against organophosphate insecticides, the frequency of the mutation Val1016Ile related to resistance to pyrethroids and genetic variability of mitochondrial ND4 gene fragment in populations of *A. aegypti* from Colombia and Brazil. Bioassays were conducted with multiple concentrations and diagnosis of temephos in three populations from Colombia (Armenia, Calarcá, Montenegro) and eight from Brazil Jaru, Cacoal, Guajará-Mirim e Porto Velho do Estado de Rondônia, Rondonópolis, Sinop e Várzea Grande do Estado Mato Grosso e Maringá do Estado de Paraná) to verify the susceptibility to temephos. To assess the mutation presence at codon 1016 were used on average 30 adults of *A. aegypti* from each population for kdr mutation and 10 for the genetic variability. Bioassays outcomes from the diagnostic dose of temephos 0.0162 ppm indicated resistant to the larvicide temephos in Armenia (77%) and Calarcá (62%) and changed at the susceptibility status in Montenegro (88%). In Calarcá's population was detected RR_{95} of 6.0, Armenia de 4.9 e Montenegro 3.7 when compared to susceptible Rockefeller strain. In the case of Brazilian populations, form eight population tested, six showed resistance to this larvicide (Jarú-RO, Guajará-Mirim-RO, Porto Velho-RO, Rondonópolis-MT, Sinop-MT e Várzea Grande-MT) and two (Cacoal-RO e Maringá-PR) only changed at the susceptibility status. Presenting the higher ratio of resistance in the population of Várzea Grande (14.0) and lowest in the population of Maringá (3.1). From those 107 specimens of *A. aegypti* genotyped for mutation Val1016Ile for the four Colombian populations, 94% were homozygous for allele (Val / Val); 6% heterozygous (Val/Ile) and 0% homizogotos for mutant allele (Ile/Ile). For Brazil, 251 specimens were genotyped. Of these, 66% (165) were Val/Val, 11% (27) Val/Ile and 23% (59) Ile/Ile. The populations Barcelona in Colombia and Maringa in Brazil did not show the mutant allele. The genetic diversity study using ND4 showed a genetic structure among some populations in Colombia and Brazil being detected for each three mitochondrial lineages with low genetic diversity and low gene flow. Haplotypes obtained for the populations of Colombia compared to those available to America indicate a relationship with the people present in Mexico and North America. In the case of the Brazilian haplotypes, a relationship with populations present in Peru, Mexico and North America. However, the analyzes set of all haplotypes suggest a relationship with the population of Peru, Mexico and North America. The control vector actions using organophosphates and pyrethroids can be compromised due to the loss of susceptibility to these insecticides.

Keywords: Bioassays, Temephos, knockdown resistance, DNA mitochondrial.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *A Dengue*

Entre as doenças virais de transmissão vetorial, a dengue possui ampla distribuição no mundo (Gubler 2002, Tauil 2002, Moncayo 2004). Estimativas da Organização Mundial da Saúde - OMS indicam que aproximadamente 66% da população mundial (2,5 bilhões de pessoas) que habitam as regiões tropicais e subtropicais estão em risco de contraí-la (WHO 2013) (Figura 1). Anualmente são registrados entre 50 a 100 milhões casos da doença (WHO 1997, Gibbons & Vaughn 2002, Wilder-Smith & Schwartz 2005). Apesar de ser conhecida há mais de dois séculos, a dengue continua sendo um dos principais problemas e uma das prioridades da Saúde Pública do século atual, exigindo esforços e investimentos cada vez mais intensos (Periago & Gúzman 2007).

O agente etiológico da dengue é um retrovírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, que inclui os organismos causadores da febre amarela, febre do oeste do Nilo e encefalite japonesa (Tauil 2001, Carroll *et al.* 2007) sendo transmitida ao homem através da picada das fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), principal vetor do vírus nas Américas (OPS 1993, Shankar *et al.* 2011) e de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894), considerado o vetor primário no Japão, Indonésia, Seychelles, Tailândia, Malásia (Hawley 1988) e no Havaí (Effler *et al.* 2005).

Com respeito ao vírus, são conhecidos quatro sorotipos geneticamente distintos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Sabin 1952, Schlesinger & Frenkel 1956, Hammon & Sather 1960). Todos os sorotipos podem infectar diversos tipos de células no homem e em outros primatas, mas somente o homem apresenta manifestações clínicas da doença (Borges 2001, Seneviratne 2006).

A transmissão viral ocorre quando a fêmea do vetor é infectada com o vírus ao se alimentar do sangue de um indivíduo infectado, durante a fase virêmica. Após um período de incubação extrínseca, que dura de oito a dez dias, o mosquito infectado está apto a transmitir o vírus por toda sua vida (Donalísio & Glasser 2002), seja para o homem, através do repasto sanguíneo ou para

outros mosquitos, através da cópula ou verticalmente (Singhi *et al.* 2007). Após a picada pelo mosquito infectado, o período de incubação do vírus no homem dura, em média, de quatro a sete dias, durante os quais a doença pode variar de formas assintomática e clinicamente inespecíficas até quadros fatais (Ferreira *et al.* 2005, Singhi *et al.* 2007).

Clinicamente, a doença pode manifestar-se como uma forma benigna autolimitada de febre indiferenciada chamada febre por dengue ou dengue clássico (FD), ou como formas mais graves denominadas Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e Síndrome do Choque do Dengue (SCD), as quais podem ser fatais para o indivíduo. A dengue clássica é sintomática, apresentando febre alta, dor de cabeça, dor nas articulações, músculos e olhos e fenômenos hemorrágicos leves. Já nas formas mais graves, FHD e SCD, os sintomas iniciais são semelhantes aos da dengue clássica, porém, após o terceiro dia o quadro se agrava com manifestações hemorrágicas, trombocitopenia, derrames cavitários, instabilidade hemodinâmica, debilidade profunda, agitação ou letargia, palidez, cianose e diminuição brusca de temperatura (Toledo *et al.* 2006).

A incidência de casos de dengue varia conforme as condições climáticas, sociais e estruturais das regiões urbanas e está associada a fatores ambientais, como aumento de temperatura, pluviosidade e umidade do ar, condições que favorecem o aumento do número de criadouros disponíveis para o desenvolvimento do vetor (Ribeiro *et al.* 2006).



Figura 1. Países/Áreas com risco de transmissão de dengue (em vermelho) no ano de 2013, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Fonte: WHO (2013).

1.2. Dengue na Colômbia

Na Colômbia a dengue é endêmica, apresentando vários ciclos epidêmicos em quase todas as regiões habitadas por humanos localizada abaixo dos 2200 m (Rodríguez, Velandia & Boshell 2003), o que equivale a 900.000 Km² dos 1.138.000 Km² de extensão do país onde vivem aproximadamente 20 milhões de pessoas (Ministerio de Salud 2001). Os primeiros registros da dengue ocorreram na década de 1970 e estiveram associados aos sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 (Boshell *et al.* 1986, Ardila *et al.* 2005), mas na atualidade tem-se registro da circulação dos quatro sorotipos (SIVIGILA 2012).

Durante as últimas décadas, através de diferentes campanhas tem-se tentado controlar e prevenir a dengue, assim como conscientizar a população sobre a doença, mas a descentralização dos programas de controle da dengue tem dificultado o monitoramento do vetor (Fonseca & Quiñones 2005). A prevalência da doença continua aumentando em todas as camadas sociais e os esforços parecem ter pouco ou nenhum impacto na sociedade (Moncayo 2004, Suarez *et al.* 2005).

Historicamente, os estados que apresentam alta incidência da dengue são Santander, Norte de Santander, Valle del Cauca, Antioquia, Tolima, Huila, Casanare, Atlántico e Cundinamarca, com mais de 60% dos casos confirmados anualmente nos últimos 10 anos encontram-se distribuídos nestes locais (Sistema de Vigilancia Salud Pública – SIVIGILA 2010).

No lapso compreendido entre 1978 a 2009, foi registrado oficialmente no país um total de 952.226 casos confirmados da dengue, estima-se que ocorra anualmente uma média de 29.757 casos, o que corresponde a 119,8 casos por cada 100.000 habitantes. Em 2010, foi registrada a maior epidemia de dengue na história do país, com 152.872 casos, ocorrendo na maior parte do território e com circulação dos quatro sorotipos (Ministerio de Protección Social, Instituto Nacional & Organización Panamericana de la Salud 2011, SIVIGILA 2010), os quais atualmente continuam a circular no país (Figura 3).

Na figura 2 apresenta-se um histórico dos casos de dengue ocorridos no país de 2010 a 2012. A distribuição desses casos no país mostra que os estados de Huila, Meta, Santander, Tolima, Norte de Santander, Valle, Cesar, Antioquia e Sucre (Figura 10B) são os que apresentam maior porcentagem de casos da dengue. No entanto, o Estado do Quindío, entre os anos 2010 e 2011, mostrou um importante número de casos, com 6% em 2010 e 4% em 2011 (SIVIGILA 2010-2012).

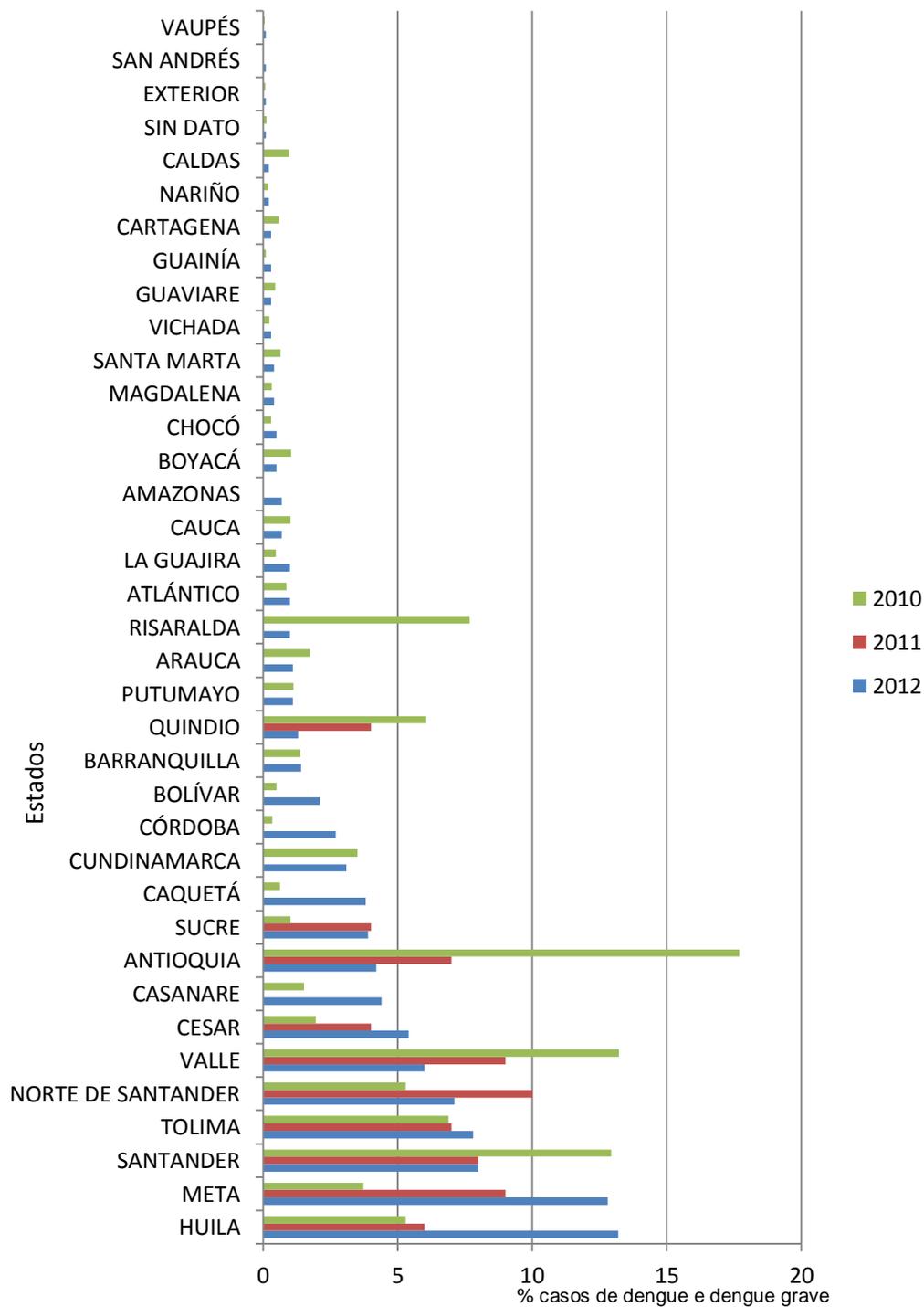


Figura 2. Porcentagem de casos de dengue e dengue grave por Estado 2010-2012. Fonte: SIVIGILA (2010-2012).

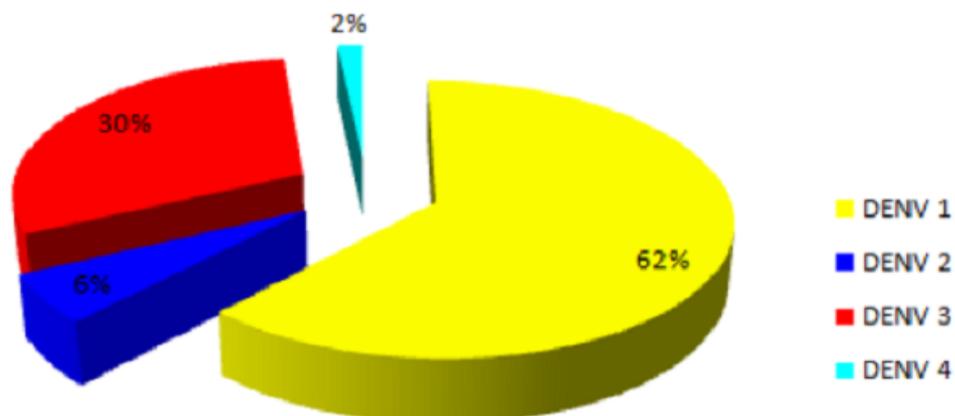


Figura 3. Porcentagem dos sorotipos do vírus dengue que ocorrem atualmente na Colômbia. Fonte: SIVIGILA (2012).

1.3. *Dengue no Brasil*

Faz-se referência à dengue no Brasil desde 1846 (Teixeira & Barreto 1996). No entanto, foi a partir de 1986 que a dengue adquiriu importância epidemiológica, quando houve uma epidemia no Estado do Rio de Janeiro e a circulação do sorotipo 1, que logo alcançou a Região Nordeste. Dessa forma, a dengue tornou-se endêmica no Brasil, intercalando-se com epidemias, geralmente, associadas à introdução de sorotipos em áreas anteriormente indenes (Braga & Valle 2007).

A dengue no Brasil apresenta um padrão sazonal com maior incidência no primeiro semestre do ano, período mais quente e úmido, típico dos climas tropicais (Braga & Valle 2007). Em aproximadamente duas décadas, o número de casos no país aumentou de 46.000 em 1986 para 790.000 em 2002 (Martins *et al.* 2008). Em 2008, o Brasil contava com aproximadamente 80% dos mais de 908.000 casos notificados de dengue nas Américas (PAHO 2009).

Historicamente, desde 2008 até 2012 observa-se que a Região Sudeste tem o maior número de casos, seguida da Região Nordeste, Centro-Oeste, Norte e, por último, da Região Sul (Tabela 1, Figura 4) (Boletim Informativo Dengue 2008-2012).

Tabela 1. Número de casos de dengue notificados por 100 mil habitantes entre os anos 2008 e 2012 por regiões.

Região	Casos				
	2008	2009	2010	2011	2012
Norte	48.946	55.611	98.632	97.146	30.145
Nordeste	207.808	125.296	176.854	115.257	103.687
Sudeste	325.403	113.259	478.003	233.943	119.396
Sul	2.166	2.641	42.008	29.665	3.306
Centro-Oeste	48.357	110.462	216.051	31.787	29.477
TOTAL	634.688	409.278	1.013.558	507.798	286.011

Fonte: Boletim Informativo dengue 2008-2012.

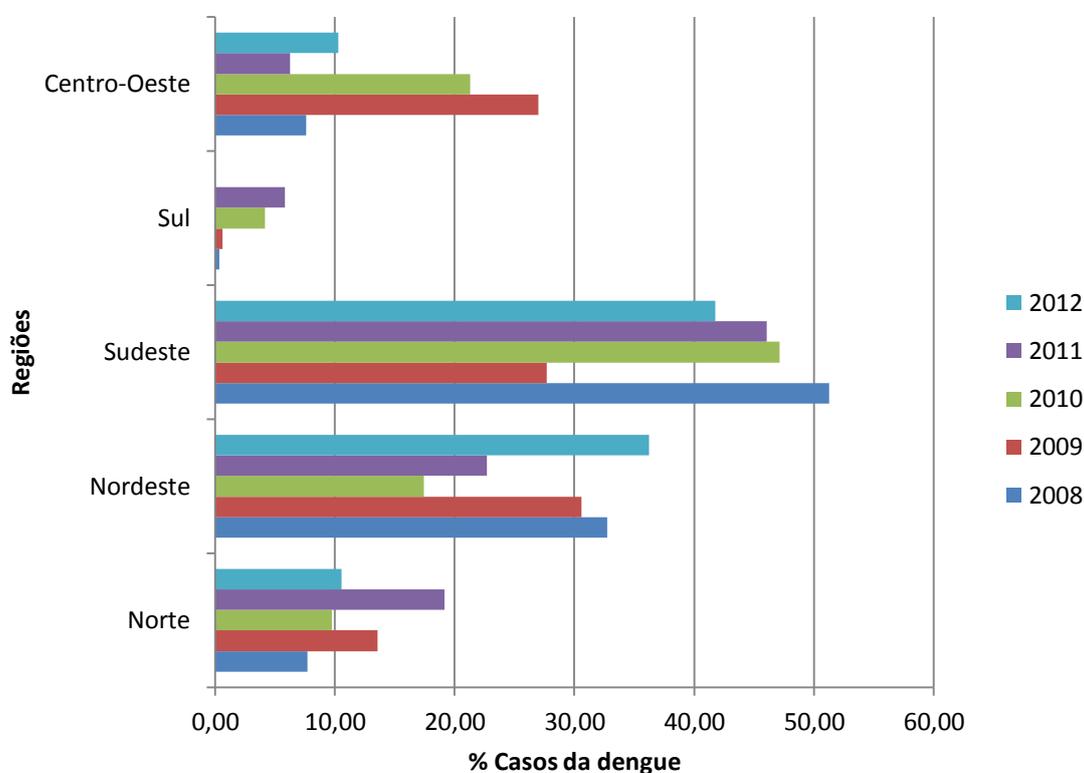


Figura 4. Porcentagem de casos de dengue entre os anos 2008 e 2012. Fonte: Boletim Informativo dengue 2008-2012.

1.4. *Família Culicidae*

A família Culicidae é um grupo monofilético (Wood & Borkent 1989, Miller *et al.* 1997, Harbach & Kitching 1998, Harbach 2007) pertencente à ordem Diptera. Encontra-se distribuída em todos os ecossistemas do mundo, com exceção daqueles ambientes que são permanentemente congelados (Clements

1992, Harbach & Howard 2007). Aproximadamente 75% das espécies desta família vivem nas regiões tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas e diversidade de habitats são favoráveis para o desenvolvimento e sobrevivência das suas espécies (Harbach 2009).

Atualmente, Culicidae possui 3610 espécies distribuídas em 175 gêneros e duas subfamílias são reconhecidas dentro da família: Anophelinae e Culicinae. (Harbach 2007, Navarro *et al.* 2010, Rueda 2008, Rafael *et al.* 2012). Esta diversidade está distribuída nas seis regiões biogeográficas, sendo a Região Neotropical a que detém a maior riqueza, com registro de 23 gêneros e 31% das espécies conhecidas (Forattini 2002, Harbach 2007), sendo os ambientes de floresta tropical os mais diversos e menos conhecidos (Rueda 2008).

No Brasil, são encontradas aproximadamente 470 espécies (Pessoa 2012). Dentre a totalidade dos membros de Culicidae, cerca de 150 espécies, principalmente dos gêneros *Anopheles*, *Aedes*, *Haemagogus* e *Culex*, estão envolvidas indiretamente com a morbidez e mortalidade de humanos devido à veiculação de diversos agentes etiológicos como arbovírus, protozoários e nematódeos causadores de variadas doenças de importância médica e veterinária (Reinert 2001, Navarro *et al.* 2010).

1.5. *Aedes aegypti*

O gênero *Aedes*, particularmente o subgênero *Stegomyia* constitui um amplo, compacto e característico grupo de aedíno cuja biogeografia encontrava-se restrita às regiões do Velho Mundo (África e Ásia). Não obstante e graças ao desenvolvimento das comunicações comerciais, até agora duas espécies foram introduzidas na Região Neotropical: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895), sendo a primeira a espécie o alvo deste trabalho. Nas Américas estas espécies tornaram-se populações com características urbanas (Forattini 2002).

Aedes aegypti, espécie de origem africana (Mousson *et al.* 2005), é encontrada entre as latitudes 45°N e 35°S, nas regiões tropicais e subtropicais (WHO 2013). Esta espécie desenvolveu em sua trajetória evolutiva um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico, sendo considerado o

principal vetor do vírus dengue no Hemisfério Ocidental (OPS 1992, Shankar *et al.* 2011).

Além dos quatro sorotipos virais da dengue (DEN-1, 2, 3 e 4), o *A. aegypti* é vetor do vírus da febre amarela urbana e da encefalite equina venezuelana (Morales & Suarez 2003, Hawley 1988, Reinert *et al.* 1994, Gratz 2004, Benedict *et al.* 2007, Shankar *et al.* 2011). O vetor apresenta um período geracional curto, fecundidade e potencial de dispersão altos e é um eficiente colonizador devido a resistência de seus ovos à dessecação por meses (Beebe *et al.* 2005). O mosquito caracteriza-se principalmente por apresentar um desenho de escamas branco-prateadas ao longo do escudo em formato de lira. O ciclo de vida compreende ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Cabezas 2005) (Figura 5).

Com respeito à fase adulta, unicamente as fêmeas são hematofágas e desenvolvem seu ciclo biológico nas imediações e interior das habitações humanas. Os imaturos desenvolvem-se em criadouros naturais e artificiais, preferencialmente de água limpa (Varejão *et al.* 2005), mas também pode suportar ambientes com elevado grau de matéria orgânica e baixos níveis de oxigênio dissolvido, como esgoto doméstico e efluentes de tratamento (Beserra *et al.* 2009). Por outro lado, os machos alimentam-se de néctar das plantas que se encontram próximo às fontes de alimentação das fêmeas, propiciando o acasalamento. A atividade de alimentação das fêmeas ocorre durante períodos de baixa intensidade de luz solar. Em geral, inicia de manhã ou antes de anoitecer. Contudo, a alimentação pode estar condicionada à possibilidade de obter sangue, conseguindo mudar sua atividade e alimentar-se a qualquer hora do dia (Rios 2004).

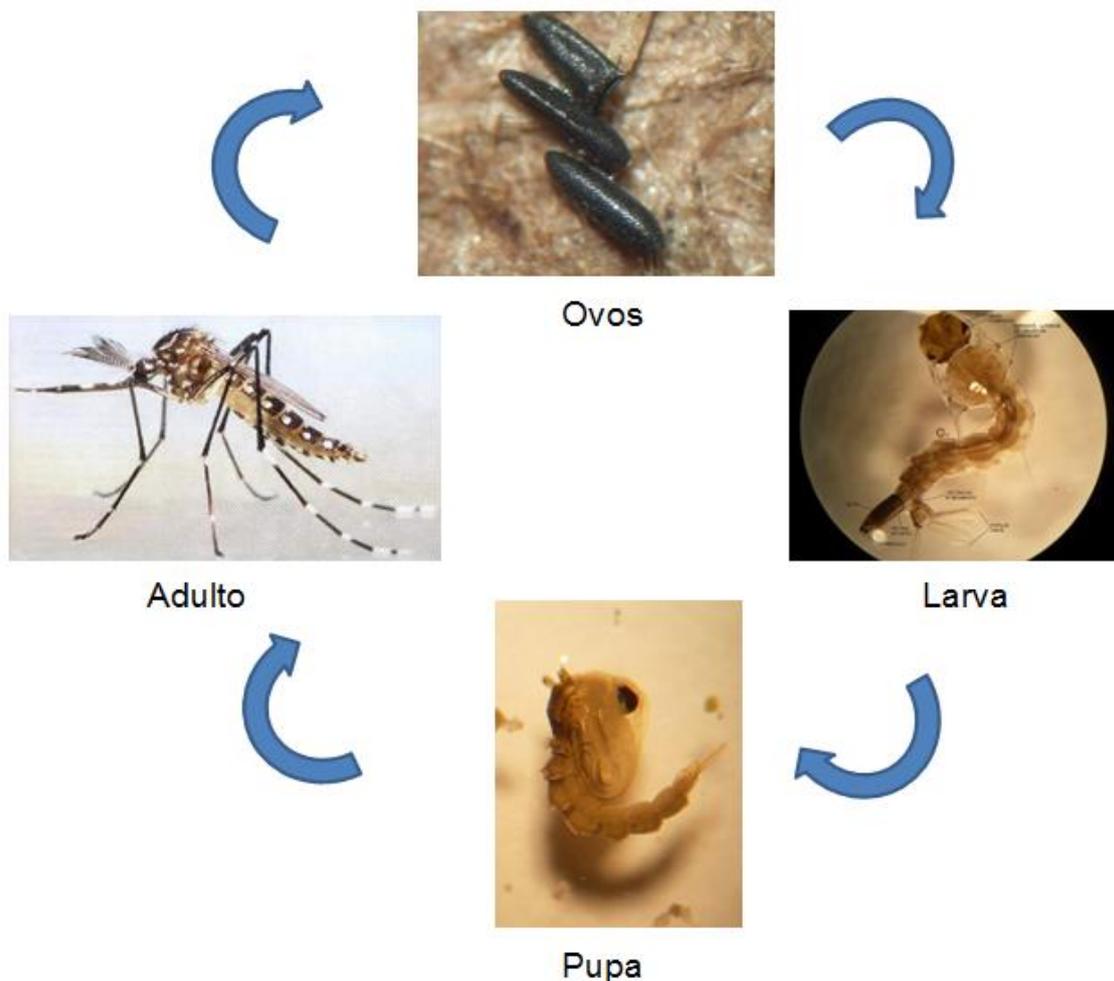


Figura 5. Ciclo de vida de *A. aegypti*. Fonte: Picoli *et al.* (2010).

1.6. **Estratégias para o controle do vetor da dengue na Colômbia e no Brasil**

Atualmente, tanto na Colômbia quanto no Brasil, as estratégias para o controle do *A. aegypti* são dirigidas essencialmente à participação da comunidade para reduzir os criadouros do vetor (Castro, Quintana, Quiñones 2007). No entanto, em situações de epidemia, o controle químico é utilizado em grande escala (Camargo *et al.* 1998; Pinheiro & Tadei 2002). Embora tenham ocorrido importantes avanços no desenvolvimento de medidas alternativas, como o uso de inseticidas biológicos (Beserra *et al.* 2007), botânicos (Murray 2006) ou inibidores de crescimento (Martins & Silva 2004, Junqueira & Mendes 2007), o uso de inseticidas químicos continua sendo essencial aos programas de controle integrado (Braga & Valle 2007, Ministerio de Protección Social *et al.* 2011).

No controle químico, os principais grupos de inseticidas utilizados são organoclorados, ciclodienos, organofosforados, carbamatos, piretróides (Rodriguez *et al.* 2003, Kroeger *et al.* 2006) e inibidores da síntese da quitina (IGRs) (Graf 1993). Todos esses, com exceção dos IGRs, agem no sistema nervoso, ocasionando a morte do inseto (Rodriguez *et al.* 2003, Kroeger *et al.* 2006). Os IGRs afetam a biossíntese de quitina, a formação de cutícula e o processo de muda, dificultando a sobrevivência para a próxima muda (Farnesi *et al.* 2012). Nas tabelas 2 e 3 apresentam-se as classes de inseticidas químicos e as medidas alternativas aos inseticidas químicos utilizados para o controle do vetor em ambos os países. Nas figuras 6-7 são mostradas algumas estruturas químicas dos inseticidas utilizados.

Tabela 2. Produtos químicos utilizados para o controle do vetor *A. aegypti* na Colômbia e no Brasil.

País	Classe de inseticida	Nome comercial do inseticida	Alvo	Referência
Colômbia	Organofosforados	Temephos	Larvas	Ocampo & Wesson 2004, Castro, Quintana & Quiñones 2007, Maestre <i>et al.</i> 2009.
		Malation e Fenitrothion	Adultos	Castro, Quintana & Quiñones 2007.
	Benzoilurea	Diflubenzuron e Pyriproxyfen	Larvas	Ministerio de Educación Nacional 2007, Ministerio de Protección Social <i>et al.</i> 2011.
				Ocampo & Wesson 2004, Ministerio de Salud 1995.
Brasil	Organofosforados	Highcis-permetrina (Depe®), β -cipermetrina e deltametrina	Temephos	Beserra <i>et al.</i> 2007.

Benzoilurea	Diflubenzuron, Novaluron.	Larvas	Martins & Silva 2004, Junqueira & Mendes 2007.
Piretróides	Deltametrina, permetrina e cipermetrina	Adultos	Santos <i>et al.</i> 2007, SUCEN 2010.

Tabela 3. Medidas alternativas aos inseticidas químicos utilizados para o controle do vetor *A. aegypti* na Colômbia e no Brasil.

País	Agente biológico	Alvo	Referência
Colômbia	<i>Mesocyclops</i> <i>spp.</i> (Copepoda: Cyclopoida)		Ocampo & Wesson 2004.
	<i>Poecilia reticulata</i> (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), <i>Gambusia affinis</i> (Cyprinodontiformes: Poeciliidae)	Larvas	Ministerio de Educación Nacional 2007, Ministerio de Protección Social <i>et al.</i> 2011.
	<i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> <i>Israeliensis</i>		
Brasil	<i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> var. <i>Israeliensis</i>		Beserra <i>et al.</i> 2007

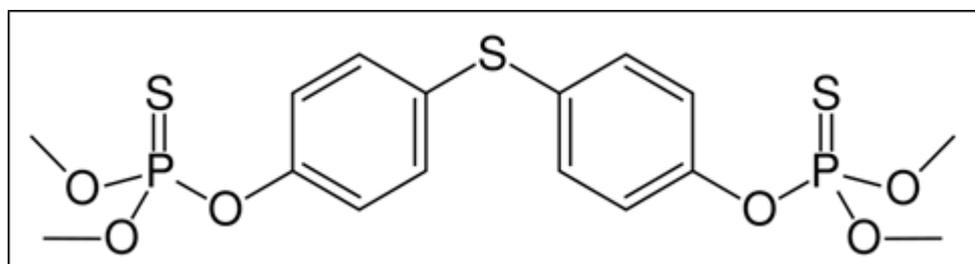


Figura 6. Estrutura química do larvicida organofosforado temephos, de nome químico *O,O*-(ditio-4,1fenileno) bis (*O,O*-dimetilfosforotioato); *O,O'*(ditio-4,4-fenileno)*O,O',O'*,tetrametil bis fosfotioato.

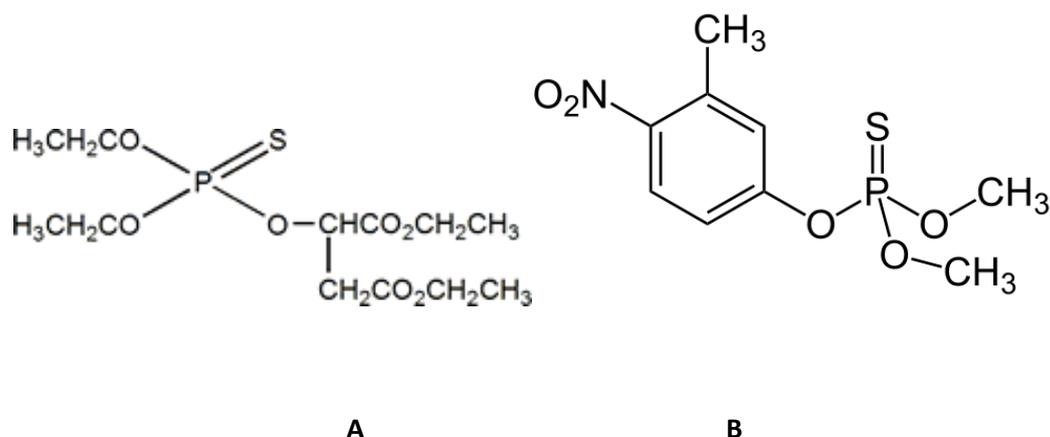


Figura 7. Estruturas químicas dos adulticidas A. Malation (1,2-di(etoxy-carbonil) etil o,o- dimetil fosforoditioato) e B. Fenitrothion (Dimetoxi-(3-metil-4-nitrofenoxi) tiofosforane).

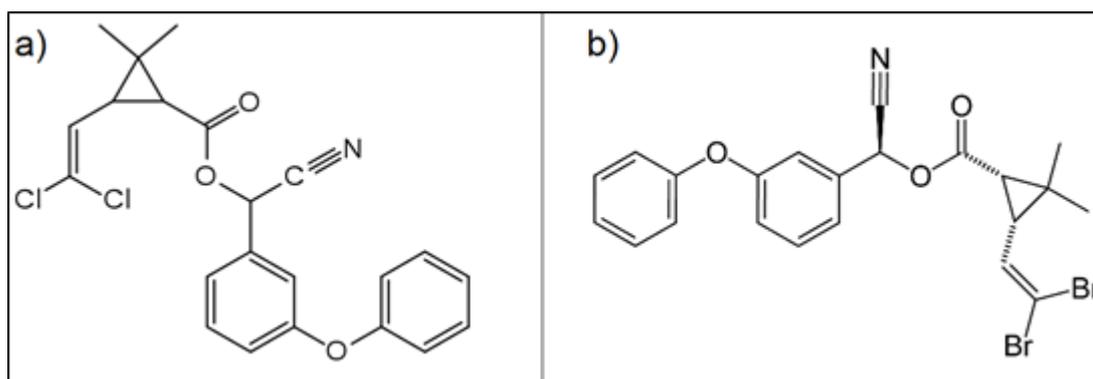


Figura 8. Estruturas químicas de a) Cipermetrina (C₂₂H₁₉Cl₂NO₃) e b) Delametrina (C₂₂H₁₉Br₂NO₃).

1.7. Mecanismos de resistência

O conhecimento de como age um inseticida é útil para se entender os mecanismos de resistência, embora estes não estejam sempre relacionados (Badii & Garza 2007). Acredita-se que existem dois mecanismos principais que conferem resistência aos inseticidas: alterações estruturais no sítio-alvo e atividade metabólica intensificada. As alterações no sítio-alvo relacionam-se às mutações em genes que codificam proteínas para os canais de Na⁺, acetilcolinesterase e receptores GABA. A atividade metabólica intensificada inclui alteração nos níveis ou atividades de detoxificação do inseticida (WHO 1981). No entanto, são propostos outros mecanismos de resistência, por

exemplo, resposta ao estresse térmico (Patil *et al.* 1996), penetração reduzida, aumento nas taxas de excreção, trocas comportamentais (Brogdon & McAllister 1998) e modificações no sítio químico de ação (Hemingway *et al.* 2000).

A resistência no sítio-alvo ocorre quando o inseticida não se junta ao sítio-alvo onde deve agir. Isto ocorre porque há diminuição na sensibilidade do sítio-alvo ou uma modificação no mesmo (Hemingway & Ranson 2000). A causa mais comum é a presença de mutações pontuais em genes estruturais. Para que estas mutações sejam selecionadas favoravelmente, a mudança no aminoácido deve diminuir a união ao inseticida sem causar perda da função primária do sítio-alvo. Portanto, o número possível de substituições de aminoácidos é limitado e geralmente encontram-se mutações idênticas associadas à resistência através de taxas altamente divergentes. O grau de diminuição da função causado pela mutação confere resistência, que se reflete na vantagem biológica dos indivíduos resistentes na seleção pelo inseticida. Este custo na eficácia biológica tem importantes implicações para a persistência da resistência e/ou a reversão na suscetibilidade em populações de campo (Berticat *et al.* 2002, Montella *et al.* 2007).

Por sua parte, a resistência metabólica ocorre quando a atividade modificada de três famílias enzimáticas (carboxilesterasas, glutathione S-transferasas (GST) e monooxigenasas) contribuem à diminuição da dose efetiva de um inseticida, evitando que haja no seu sítio de ação. A identificação de enzimas envolvidas na resistência aos inseticidas é ainda mais complicada pela complexidade de tais famílias enzimáticas e as dificuldades para identificar genes ortólogos entre diferentes espécies de insetos (Ranson *et al.* 2002).

1.8. Resistência múltipla e cruzada

A resistência múltipla acontece quando dois ou mais mecanismos de resistência estão em funcionamento no mesmo inseto. Quando dois mecanismos de resistência atuam sobre o mesmo inseticida, o nível de resistência é frequentemente maior que a adição simples dos níveis de resistência conferida por ambos os mecanismos de forma independente. Esse mecanismo não necessariamente envolve a resistência cruzada, pois um inseto

pode ser resistente a dois ou mais inseticidas e cada resistência pode ser atribuída a diferentes mecanismos (Bisset 2002, IRAC 2011).

Por outro lado, a resistência cruzada acontece quando um simples gene confere resistência a diversos produtos químicos do mesmo grupo ou a diferentes grupos. No primeiro caso, um exemplo seriam as fosfotriesterasas que conferem resistência a vários organofosforados. No segundo caso, um exemplo seria o gene *kdr* que confere resistência tanto ao DDT quanto aos piretróides (Bisset 2002, IRAC 2011).

1.9. Detecção da resistência (Bioensaios)

Existem vários métodos para detectar o *status* de suscetibilidade aos inseticidas, por exemplo: a caracterização molecular das mutações associadas à resistência (Bregues *et al.* 2003; Saavedra-Rodriguez *et al.* 2007, Martins *et al.* 2009b, Lima *et al.* 2011, Bona *et al.* 2012), ensaios bioquímicos para quantificar as enzimas detoxificantes (Rodríguez *et al.* 2007, Bisset *et al.* 2009, Rodríguez *et al.* 2012), e o uso de ensaios biológicos ou bioensaios (Fonseca-Gonzalez *et al.* 2011, Santacoloma *et al.* 2012).

Os bioensaios têm o objetivo de detectar a presença de indivíduos resistentes, para permitir o controle da população através dos métodos alternativos disponíveis. A metodologia padrão consiste em expor os indivíduos de uma população proveniente do campo, que possivelmente seja resistente ao inseticida. Para tal finalidade, é utilizado um método padrão que permite a comparação dos resultados da população do campo com a cepa suscetível ou de referência. A cepa suscetível geralmente deriva do laboratório, onde é mantida sob condições controladas (Bisset *et al.* 2005). Em *Aedes aegypti*, a cepa suscetível é conhecida como cepa Rockefeller (Centro de Controle de Doenças, CDC).

Para avaliar o status de suscetibilidade aos inseticidas em *A. aegypti* são utilizados bioensaios com larvas (WHO 1981, 1998) e bioensaios com adultos (WHO 1981, 1992, 1998, Brogdon & McAllister 1998). Este último é realizado através de duas metodologias, garrafas impregnadas (metodologia

CDC (Brogdon & McAllister 1998)) e papéis impregnados (metodologia da OMS (WHO 1981, 1992, 1998)). O bioensaio com larvas é utilizado para avaliar o *status* de suscetibilidade aos organofosforados e reguladores da síntese de quitina nas formas imaturas (Beserra *et al.* 2007, Junqueira & Mendes 2007, Maestre *et al.* 2009). O bioensaio com adultos é utilizado para avaliar o *status* de suscetibilidade aos organofosforados e piretróides nas formas adultas (Castro, Quintana & Quiñones 2007, Ocampo & Wesson 2004, SUCEN 2010).

De maneira geral, num bioensaio é testada a concentração diagnóstica ou dose-diagnóstica (WHO 1998) e concentrações múltiplas ou dose-resposta (WHO 1981). A concentração diagnóstica surgiu como resposta à necessidade de avaliar populações do campo, onde usualmente não se tem um número alto de espécimes. Para este objetivo a Organização Mundial da Saúde (WHO), estimou esta concentração em várias espécies de insetos vetores, inclusive o *A. aegypti*. Em *A. aegypti* a dose-diagnóstica corresponde ao dobro da concentração letal (CL_{99}) que mata 99% das larvas da cepa suscetível. A dose-diagnóstica fornece uma medida aproximada da quantidade de resistência em uma população. No entanto, a transposição das linhas de mortalidade dos insetos suscetíveis e resistentes leva a uma resistência subestimada (WHO 1998).

A dose-resposta permite estabelecer a dose necessária para matar uma porcentagem determinada de indivíduos. Uma amostra de insetos é exposta a um intervalo de concentrações para delimitar a mortalidade entre 5% e 95%. Ao pôr os dados de mortalidade e dose num gráfico, uma curva sigmoide é obtida. Esta curva é transformada numa linha reta, ao converter o logaritmo da dose e a mortalidade, na escala probit (Hemingway & Ranson 2005), através da equação da reta obtida, será possível estimar as concentrações letais que matam 50% (CL_{50}) ou 95% (CL_{95}) da população (Finney 1971).

A tangente do ângulo da linha da mortalidade ou *slope* é utilizada como uma medida da variabilidade da população. Valores maiores ou iguais ao *slope*, quando comparados com a cepa suscetível, indicam a presença de

uma população homogênea suscetível, ou seja, uma resposta homogênea da população ao inseticida. Valores menores que o *slope* quando comparados com a cepa suscetível, indicam a presença de uma população heterogênea resistente, ou seja, uma resposta heterogênea ao inseticida, já que os insetos são cada vez mais homogêneos nos níveis de resistência (Saavedra-Rodriguez 2007).

Os níveis de resistência de diversas populações podem ser comparados através dos cálculos das razões de resistência ou *Resistance ratio* (RR). A RR pode ser calculada com qualquer uma das CLs e são obtidas dividindo-se a CL_x da população analisada pela CL_x da população Rockefeller (Saavedra-Rodriguez 2007).

1.10. Resistência aos organofosforados.

Os organofosforados são ésteres do ácido fosfórico, geralmente lipossolúveis, característica que facilita sua penetração nos organismos. Os inseticidas deste grupo são classificados em três categorias de acordo com sua natureza química: os alifáticos (malathion, vapon, vidrin, etc.), os aromáticos (etil e metil parathion, fenitrothion, temephos, etc.) e os heterocíclicos (clorpirifos, clorpirifos-metil, etc.) (Whitacre 2004). Esses organofosforados são empregados na agricultura para o controle de pragas e nos programas de controle de vetor do vírus dengue e do protozoário causador da malária. O temephos, malathion e fenitrothion são os inseticidas comumente empregados no controle do vetor do vírus da dengue (Ocampo & Wesson 2004, Beserra *et al.* 2007, Melo *et al.* 2008, Castro, Quintana & Quiñones 2007, Maestre *et al.* 2009, Ministerio de Protección Social *et al.* 2011).

O temephos ($C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$) (Figura 6) é usado extensivamente em várias partes do mundo no controle de vetores biológicos de diversos agentes etiológicos. Este composto é o larvicida do grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquito aprovado pela Organização Mundial da Saúde para uso em água de consumo humano (WHO 2007). É utilizado em água estagnada e reservatórios de água potável para uso doméstico por ser biodegradável, porém, devido à instabilidade química, requer aplicações

periódicas, em ciclos bimestrais (Melo *et al.* 2008). Por outro lado, o temephos pode causar intoxicações graves quando absorvido pelos pulmões ou ingerido em altas doses, sendo ainda discretamente irritante em contato com a pele e com os olhos (FISPQ 2010).

Na Colômbia, o temephos composto, juntamente com o fenitrothion, tem sido utilizado desde a década de 1970 (Motta-Sanchez *et al.* 1976), sendo atualmente usado apenas o temephos (Ministerio de Protección Social, Instituto Nacional & Organización Panamericana de la Salud 2011). Esse composto é aplicado segundo o Ministerio de Protección *et al.* (2011) quando ocorrem os primeiros casos de dengue ou sob a confirmação de casos graves da doença.

No Brasil, esse composto é utilizado desde 1967 (Ministério da Saúde 1968), sendo aplicado em ciclos bimestrais. Após a epidemia de 1986 o uso de organofosforados se intensificou (Braga *et al.* 2004), sendo incluído seu uso desde a implantação do Plano para Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) em 1996, continuando no Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD) em 2001 e mantendo-se atualmente no Plano Nacional do Controle da dengue (PNCD) desde 2002 (Braga & Valle 2007).

O malathion e fenitrothion são empregados na agricultura para o controle de pragas e nos programas para o controle de vetores do vírus da dengue e do protozoário causador da malária. Na Colômbia, foram introduzidos na década de 1980 (Ocampo *et al.* 2011), sendo utilizados como adulticidas após a ocorrência dos primeiros casos de dengue ou sob a confirmação de casos graves de dengue, com ciclos de aplicação com intervalos curtos de um, quatro e sete dias (Ministerio de Protección Social *et al.* 2011).

O modo primário de ação dos organofosforados e carbamatos é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) nas uniões sinápticas do sistema nervoso por fosforilação ou carbamilação do resíduo serina situado no sitio-alvo da enzima. Esta classe de inseticidas age por contato e ingestão, ligando-se ao centro esterásico da AChE e impossibilitando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético. A presença continuada da acetilcolina nas terminações nervosas interfere no mecanismo de transmissão neuronal. Deste modo, na presença do organofosforado, o estímulo do sistema

nervoso central é contínuo, ocasionando paralisia e morte do inseto (Figura 9) (Walsh *et al.* 2001, Bisset 2002, Braga & Valle 2007). Além disso, outro mecanismo associado a este tipo de inseticidas é a resistência metabólica conferida pela ação de enzimas da família monooxigenasas, a atividade destas enzimas é frequentemente presente em populações de insetos resistentes. A identificação de enzimas envolvidas na resistência aos inseticidas é ainda mais complicada pela complexidade das famílias enzimáticas envolvidas e as dificuldades para identificar genes ortólogos entre diferentes espécies de insetos (Ranson *et al.* 2002).

Devido à intensa utilização de inseticidas, as populações resistentes de insetos são selecionadas. O conceito de resistência tem sido definido por vários autores: Crow (1960), *Food and Agriculture Organization of the United Nation* –FAO (1970), *World Health Organization* - WHO (1979). No entanto, entre os conceitos existentes, talvez o mais adequado para a gestão de um programa de controle de vetores seja o proposto pelo *Insecticide Resistance Action Committee* – IRAC (2011): resistência é a seleção de uma característica hereditária numa população de insetos que se traduz no fracasso repetitivo de um produto inseticida para proporcionar o nível desejado de controle quando se utiliza da maneira recomendada. Estes insetos selecionados apresentam mecanismos de resistência capazes de desestabilizar a ação do inseticida sobre seu organismo.

Vários trabalhos demonstram o status de suscetibilidade ao temephos e Malation em diversas populações de *A. aegypti* colombianas (Figura 10) e brasileiras (Tabela 4-5) assim como o *status* de resistência em algumas populações brasileiras (Tabela 5). A confirmação da resistência destes inseticidas nos dois países motivou a adoção de métodos alternativos no controle destas populações (Tabela 3).

Na Colômbia, o monitoramento da suscetibilidade do vetor é feito desde a década de 1970 (Motta-Sanchez *et al.* 1976), mas apenas no período entre 2005 e 2007 tem sido executado de forma estruturada. Esta iniciativa de estruturação do monitoramento foi realizada através do *Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales* (PECET) da universidade de Antioquia

(UDEA), o *Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas* (CIDEIM), o *Instituto Nacional de Salud* (INS) da universidade Nacional da Colômbia (UNAL) e 12 estados (Fonseca-González *et al.* 2010, Ministerio de Protección Social *et al.* 2011, Maestre 2012), com o financiamento do *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación* (Colciencias).

Apesar deste programa de monitoramento, ainda não estão definidos os critérios para a troca de inseticida dentro do programa de controle de vetores colombiano. Porém, o Ministério de Proteção Social e os diferentes departamentos de saúde tem seguido a seguinte interpretação: porcentagem de mortalidade entre 98 a 100% indicam que a espécie é suscetível; e mortalidades menores que 98% indicam que se tem perdido a suscetibilidade. Portanto recomenda-se vigiar e realizar testes continuados para indicar se há necessidade da troca ou não do inseticida (Ministerio de Protección Social *et al.* 2011, Maestres 2012). Esta interpretação baseia-se na utilização da concentração diagnóstica de 0,012 ppm de temephos, estabelecida pelo PECET no âmbito do projeto nacional de resistência a inseticidas, que corresponde ao dobro da concentração letal que mata 99 % (LC₉₉) das larvas da cepa suscetível (cepa Rockefeller) (Santacoloma, Chaves & Brochero 2012).

No Brasil o monitoramento da suscetibilidade do vetor tem sido realizado de forma sistemática desde 1999, com apoio da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* (MoReNAa) (Braga & Valle 2007). Esta rede esta formada por um conjunto de laboratórios que utiliza, procedimentos similares na avaliação da suscetibilidade, mantendo desta forma o histórico das populações avaliadas. Esse tipo de monitoramento permite levar um registro do *status* de resistência ao temephos das diversas populações ocasionalmente avaliadas pela rede MoReNAa, assim populações que apresentam razão de resistência maior que três vezes ao temephos, seria recomendada a troca do inseticida por outro de diferente mecanismo de ação (Ministerio de Saúde Brasileiro, 2006), já que quando a utilização de temephos é interrompida em locais onde a razão de resistência é superior a 10, a resistência diminui apenas

gradualmente, atrasando a possibilidade de uma utilização eficiente do temephos durante vários anos (Montella *et al.* 2007).

Esse tipo de avaliação é feita utilizando a concentração diagnóstica de 0,0162 ppm de temephos (WHO 1998) e concentrações múltiplas (WHO 1981). No caso da concentração diagnóstica, populações com porcentagem de mortalidade acima de 98 % serão consideradas suscetíveis, entre 80 % e 98 % com alteração da suscetibilidade e abaixo de 80 % resistentes (WHO, 1998). Já a utilização de concentrações múltiplas permitirá determinar as concentrações letais (LC₅₀, LC₉₀ e LC₉₉) e as razões de resistência (RR₅₀ e RR₉₅) (WHO 1981), esta ultima, permitindo a tomada de decisão para recomendar a troca do temephos por outro mecanismo de ação diferente.

Tabela 4. Status de suscetibilidade ao organofosforado temephos de algumas populações colombianas e brasileiras de *A. aegypti*.

País	Estado	Localidade	Ano	Status	Referência
	Valle del Cauca	Cali*	1996	Resistente	Suárez <i>et al.</i> (1996).
	Sincelejo	Sucre	2007	Resistente	Anaya <i>et al.</i> (2007).
	Antioquia	Medellin, Turbo, Puerto Berrio	2007	Resistente	Fonseca <i>et al.</i> (2007).
	Huila, Valle, Cauca e Nariño	---	2007	Resistente	Salazar <i>et al.</i> (2007).
Colômbia	Cundinamarca, Santander, Caquetá, Meta, e Guaviare	---	2007	Resistente	Santacoloma <i>et al.</i> (2007).
	Atlantico	Barranquilla, Soledad, Malambo, Puerto Colombia e Baranoa	2009	Resistente	Maestres (2009).
	Valle del Cauca	Cartago e Palmira			

Cauca	Puerto Tejada e Santander de Quilichao	2011	Resistente	
Nariño	Olaya Herrera e Tumaco			
Huila	Nieva, Campoalegre, Guadalupe, e la Plata			Ocampo <i>et al.</i> (2011).
Caquetá	Florencia		Resistente	
Cundinamarca	Girardot e La Mesa			
Guaviare	San José del Guaviare			
Meta	Villavicencio Puerto López	2012	Suscetível	Santacoloma, Chaves e Brochero (2012).
Santander	Bucaramanga Sabana de Torres		Suscetível Resistente	
Goiás	Goiânia*	1995	Alteração da suscetibilidade	Macoris <i>et al.</i> (1995).
São Paulo	Marília*			
Tocantins	Taguatinga		Resistente	
Brasília	Guará Gama, Sobradinho e Planaltina Ceilândia	2001	Alteração da suscetibilidade Suscetível	Carvalho <i>et al.</i> (2001).
	Santos Araçatuba, Barretos,		Resistente	

Brasil	São Paulo	Campinas, Pirituba, Riberão Preto e São José do Rio Preto Bauru, Marília e Presidente Prudente	2003	Alteração da suscetibilidade Suscetível	Macoris <i>et al.</i> (2003).
		Vila Velha		Resistente	
	Espírito Santo	Cariacica e Vitória	2003	Alteração da suscetibilidade	Lima <i>et al.</i> (2003).
	Alagoas	Maceió e Arapiraca			
	Sergipe	Aracaju, Barra dos Coqueiros e Itabaiana			
	Rio de Janeiro	Campos dos Goytacazes, Duque de Caxias, Niterói, Nova Iguaçu, São Gonçalo e São João de Meriti	2004	Resistente	Braga <i>et al.</i> (2004).
	Paraíba	Boqueirão, Brejo dos Santos, Campina Grande,			
		Sítios, Piabas, Capim de Cheiro e Lagoa do mato	2006	Resistente	Lima <i>et al.</i> (2006).
	Ceará	Fortaleza, Barbalha, Crato e Juazeiro do Norte	2007	Resistente	Beserra <i>et al.</i> (2007).

Paraná	Ubiratã, Santa Helena e Foz do Iguaçu	2011	Suscetível	Prophiro <i>et al.</i> (2011).
--------	--	------	------------	--------------------------------

*Primeiro registro de resistência

Tabela 5. Status de suscetibilidade ao organofosforado Malation em populações de *A. aegypti* colombianas e brasileiras.

País	Estado	Localidade	Ano	Status	Referência
Colômbia	Cundinamarca, Santander, Caquetá, Meta, e Guaviare	---	2007	Suscetível	Santacoloma <i>et al.</i> (2007).
	Sincelejo	Sucre	2007	Suscetível	Anaya <i>et al.</i> (2007).
	Caldas	Chinchiná e La Dorada	2007	Suscetível	Orjuela <i>et al.</i> (2007).
	Antioquia	Medellin, Turbo, Puerto Berrio	2007	Suscetível	Fonseca <i>et al.</i> (2007).
	Huila, Valle, Cauca e Nariño	---	2007	Suscetível	Salazar <i>et al.</i> (2007).
Colômbia	Valle del Cauca	Cali (Sameco, Universidad del Valle e Floralia)	2008	Suscetível	Valderrama, González & Jaramillo (2008)
	Atlántico	Barranquilla, Soledad, Malambo, Puerto Colombia e Baranoa	2010	Suscetível	Maestres <i>et al.</i> (2010).

	Valle del Cauca	Cartago e Palmira			
	Nariño	Olaya Herrera e Tumaco	2011		
	Huila	Nieva, Campoalegre, Guadalupe, e la Plata		Suscetível	Ocampo <i>et al.</i> (2011).
	Caquetá	Florencia			
	Cundinamarca	Girardot e La Mesa			
	Guaviare	San José del Guaviare			
	Meta	Villavicencio e Puerto López	2012		
	Santander	Bucaramanga e Sabana de Torres		Suscetível	Santacoloma, Chaves e Brochero (2012).
	Rio de Janeiro	Campos dos Goytacazes Duque de Caxias Niterói Nova Iguaçu Rio de Janeiro São Gonçalo São João de Meriti			Lima <i>et al.</i> (2003).
Brasil	Espírito Santo	Cariacica Vila Velha Vitória	2003	Suscetível	

São Paulo	Bauru Barretos Marília Presidente Prudente Campinas Ribeirão Preto		
	São Jose Rio Preto	2007	Macoris <i>et al.</i> 2007.
Sergipe	Barra dos Coqueiros		
Alagoas	Arapiraca Maceió		
Pernambuco	Jaboatão		
São Paulo	Araçatuba		Suscetível
SergipePernambuco	Santos Aracaju		
	Itabaiana Recife		Resistente

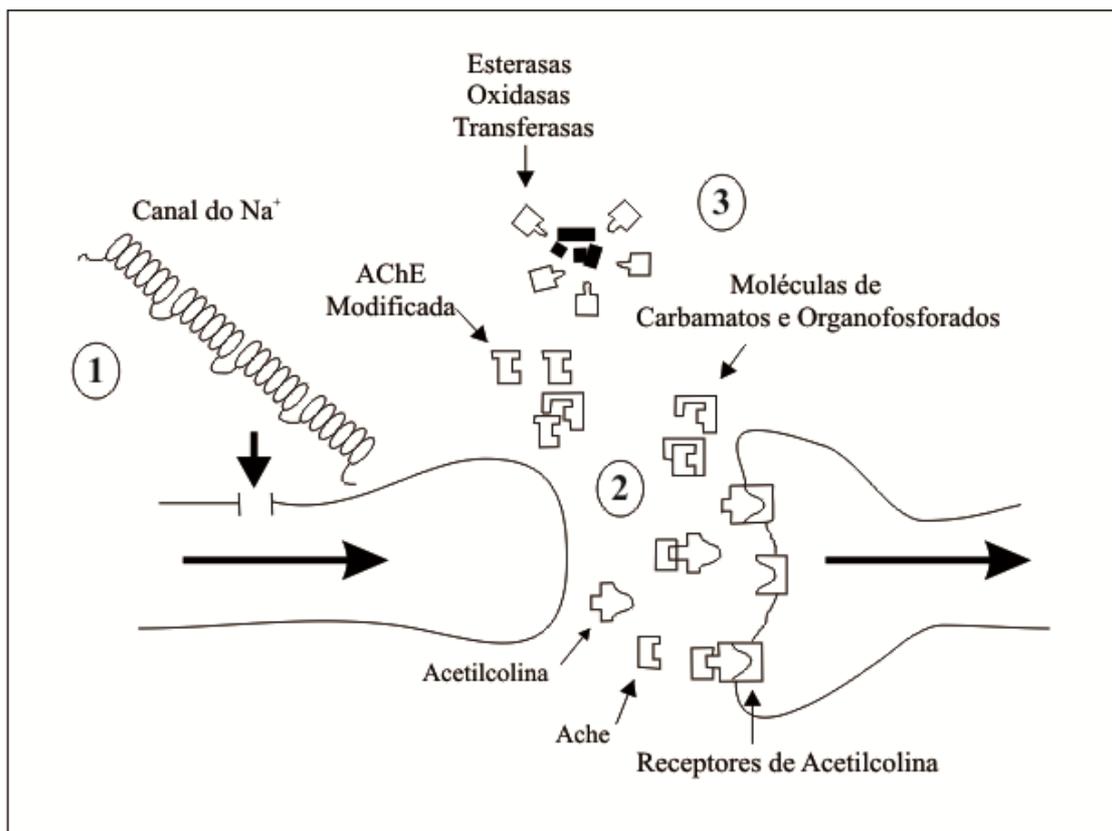


Figura 9. Representação de uma sinapse nervosa. **1.** Mudanças na estrutura do canal do Na^+ . **2.** Modificação no sítio químico de ação, a AChE por sua mudança não consegue unir-se ao inseticida e continua disponível para decompor as moléculas de acetilcolina após a neurotransmissão na sinapse. **3.** Destoxificação de enzimas que degradam ou sequestram o inseticida antes de alcançar seu sítio de ação no sistema nervoso. Fonte: Encyclopedia of Insects (2009).

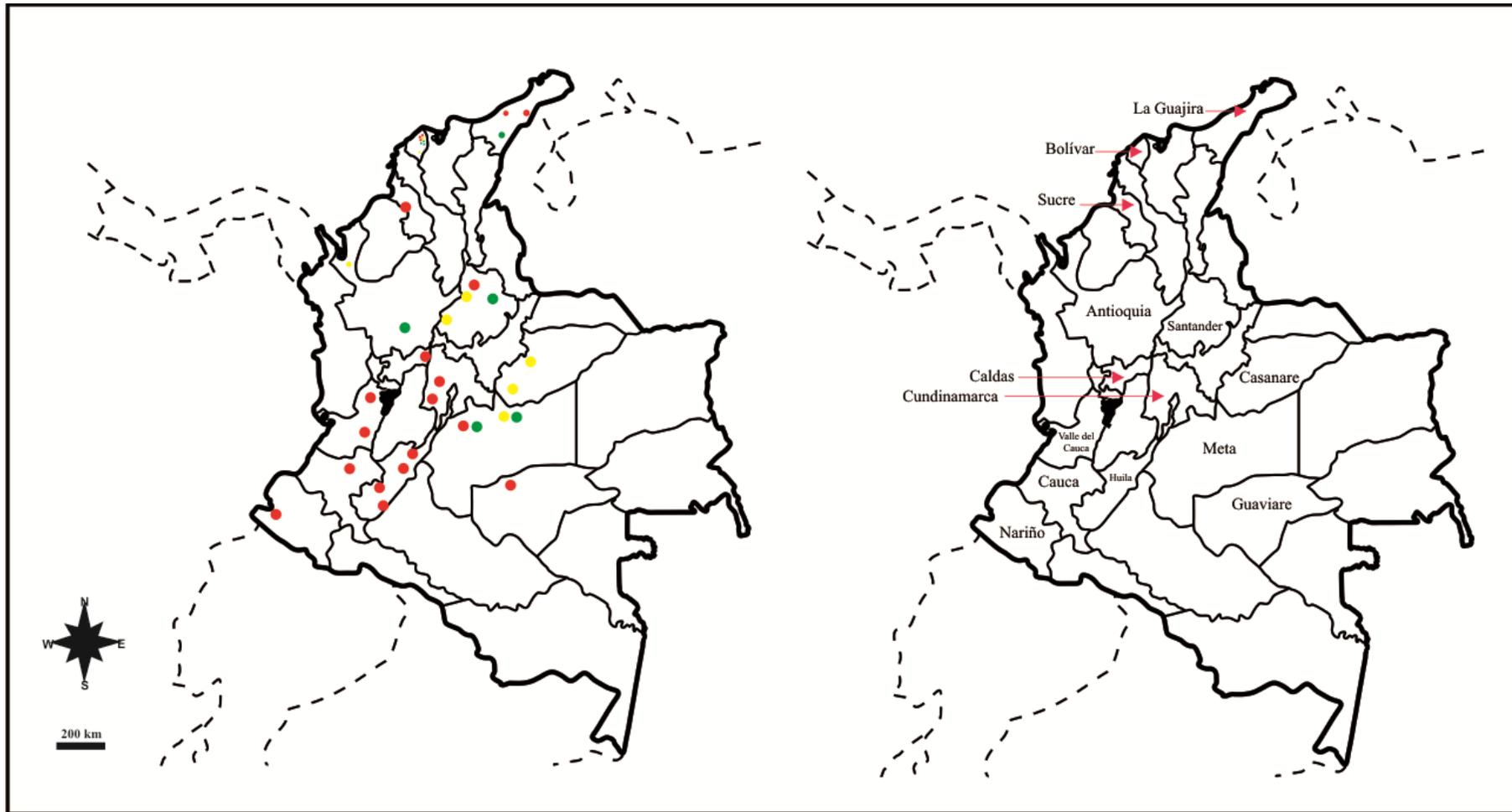


Figura 10. A. Status de suscetibilidade de populações de *A. aegypti* da Colômbia ao organofosforados temephos usando o teste da OMS. Pontos em vermelho indicam populações resistentes, pontos em verde, populações que requerem vigilância e pontos em amarelo, populações que apresentam suscetibilidade. Fonte: Maestre (2012) **B.** Mapa político da Colômbia com destaque nos Estados que têm sido avaliados. Fonte: Modificado de Maestre (2012).

1.11. Resistência a piretróides – Alterações do sítio-alvo

Os piretróides são derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (crisântemo) e de espécies relacionadas. Surgiram como uma alternativa àqueles inseticidas de maior potencial tóxico (DDT). São utilizados no Brasil desde a década de 1970 (Braga *et al.* 2004) e na Colômbia desde o início de 1990 (Maestres 2012) em programas de saúde pública no combate de insetos vetores de agentes etiológicos e na agricultura, ainda que sejam mais caros por unidade de peso em relação aos outros praguicidas. Isto ocorre devido a sua alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo nas aplicações (SUCEN 2010).

A confirmação do *status* de resistência ao DDT foi detectada pela primeira vez na Colômbia em 1961 na cidade de Cúcuta, Norte de Santander, cidade que faz fronteira com a Venezuela (Fonseca-González *et al.* 2010). Apesar de já serem utilizados inseticidas diferentes do DDT no país, como os piretróides, ainda são poucos os trabalhos publicados sobre o monitoramento do vetor com os inseticidas usados atualmente. Os trabalhos publicados indicam a existência de suscetibilidade a piretróides nas populações de Puerto Leguízamo no Estado de Putumayo (Castro, Quintana & Quiñones 2007), Sameco, Universidad del Valle e Floralia na cidade de Cali no Estado de Valle del Cauca (Valderrama, González & Jaramillo 2008), Antioquia, Chocó, Putumayo (Fonseca-González *et al.* 2010), Barranquilla (Maestres *et al.* 2010), Cauca, Valle del Cauca, Nariño e Huila (Ocampo *et al.* 2011) e resistência nos Estados de Santander, Cundinamarca, Meta, Caqueta e Guaviare (Santacoloma, Chaves & Brochero 2010).

No Brasil, a alteração na suscetibilidade aos piretróides foi detectada em 2001 em populações de *A. aegypti*, pouco tempo após este aduicida ter sido utilizado nos programas de controle do vetor (Pereira-da-Cunha *et al.* 2005), com a resistência já sendo detectada para populações do vetor de diferentes municípios brasileiros (Duque *et al.* 2004, Martins *et al.* 2009; Lima *et al.*, 2011).

O sítio-alvo dos inseticidas organoclorados e piretróides é o canal sódio voltagem-dependente (Na_v) no sistema nervoso (Scott *et al.* 1990, Liu *et al.* 2000). O canal de sódio é uma proteína transmembranaral de aproximadamente 2108 aminoácidos constituída por quatro domínios homólogos (I-IV), cada qual com seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) (Figura 11) (Martins *et al.* 2009a). O funcionamento correto do canal de sódio é essencial para a transmissão normal dos impulsos nervosos e, quando em contato com o inseticida, ocasiona a morte do inseto (García *et al.* 2009).

Em condições normais, uma célula nervosa restabelece o equilíbrio através do canal de sódio mediante processos físico-químicos que regulam a relação sódio/potássio. Porém, quando organoclorados ou piretróides ligam-se ao canal de sódio, prolongam a abertura do canal, causando hiperexcitabilidade e em alguns casos, bloqueio nervoso (Herve 1983, Castella *et al.* 1997, Bisset 2002, IRAC 2011), ocasionando à morte do individuo exposto (Braga & Valle 2007).

A resistência a este tipo de inseticidas é conhecida como resistência *Knockdown* ou kdr. Esta ocorre devido a uma alteração na afinidade do inseticida e seu sítio-alvo no Na_v , causado por uma simples ou múltiplas substituições nos nucleotídeos que codificam as proteínas do canal (Severson *et al.* 1997). O resultado final é que o inseto cai quando entra em contato com o inseticida, mas logo depois ele se recupera (efeito *knockdown*). A detecção de mutações no Na_v pode ser feita por uma ampla gama de técnicas, por exemplo, PCR alelo-específica, *Heated Oligonucleotide Ligation Assay* - HOLA, *Sequence Specific Oligonucleotide Probe – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* - SSOP-ELISA, PCR-Dot, TaqMan probes e *high resolution melt* - HRM (Bass *et al.* 2007).

Várias mutações associadas ou não à resistência a piretróides no Na_v são encontradas em diversos insetos, por exemplo, *Anopheles gambiae* (Martinez-Torres *et al.* 1997), *Blattella germanica* (Liu *et al.* 2000) e *Drosophila melanogaster* (Williamson *et al.* 1996). Nesses trabalhos, foi encontrada a mutação mais comum associada à resistência a piretróides, que é o resultado

da substituição de uma leucina por uma fenilalanina (Ile1014Phe) no domínio dois, segmento seis (IIS6) do canal de sódio.

Em *A. aegypti*, a primeira investigação dos fatores genéticos associados à resistência *kdr* foi observado na Tailândia, em 1975, logo depois de uma falha na campanha de controle do vetor ao utilizar bioresmetrina. Os estudos genéticos de uma cepa desta população mostraram a presença de um fator único de resistência aos piretróides (Rpy) presentes no cromossomo III (Soderlund & Bloomquist 1990).

Várias são as mutações no Na_v entre as regiões IIS5, IIS6, IIS6 e IVS5 encontradas em populações de *A. aegypti* da América Latina e no sudeste da Ásia, por exemplo: Gly923Val, Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Val1016Ile e Val1016Gly (Bregues *et al.* 2003; Saavedra-Rodriguez *et al.* 2007), Phe1534Cys (Bregues *et al.* 2003, Harris *et al.* 2010, Martins *et al.* 2009ab, Saavedra-Rodriguez *et al.* 2007), e Asp1794Tyr (Chang *et al.* 2009), com exceção da clássica mutação Ile1014Phe relatada em outros insetos (Martins *et al.* 2009a). Em populações brasileiras apenas a substituição Ile1011Met foi previamente encontrada no Na_v, sendo detectada em maior frequência em indivíduos resistentes de uma população de campo (Martins *et al.* 2009b) (Figura 11).

Entre estas mutações, as mutações Val1016Ile, Val1016Gly, Phe1534Cys e Asp1794Tyr estão relacionadas à resistência aos piretróides e organoclorados (Bregues *et al.* 2003; Chang *et al.* 2009; Harris *et al.* 2010; Martins *et al.* 2009; Saavedra-Rodriguez *et al.* 2007) (Figura 11), sendo a mutação Val1016Ile a mais estudada (Brito *et al.* 2013). Em esta mutação, a substituição de uma adenina por guanina no códon 1016 substitui o aminoácido valina com isoleucina (Val1016Ile). Os genes que estão associados ao *kdr* são recessivos, ou seja, a resistência só é detectada quando em homozigose (Davies *et al.* 2008). Deste modo, através de bioensaios moleculares, Martins *et al.* (2009b) perceberam que a frequência do alelo 1016Ile em homozigose (Ile/Ile) era maior nos casos de indivíduos resistentes. Esses dados corroboram a associação desta mutação com a resistência de populações brasileiras de *A. aegypti* a piretróides.

Lima *et al.* (2011) encontraram as mutações Ile1011Met e Val1016Ile em três populações do Ceará: Juazeiro do Norte, Barbalha e Crato, sendo que neste último município a Ile1011Met foi associada com resistência a cipermetrina.

Bona *et al.* (2012) trabalhando com o perfil genético e molecular de populações naturais de *A. aegypti* de Foz do Iguaçu, no Brasil, encontrou resistência aos piretróides (72.2% para cypermethrina (CD: 146 mg i.a./m²) e 57% para deltamethrina (CD: 18 mg i.a./m²)), e a presença do alelo 1016Ile. Dos 234 *A. aegypti* genotipados para mutação Val1016Ile: 15% eram Val/Val; 62% Val/Ile e 23% Ile/Ile.

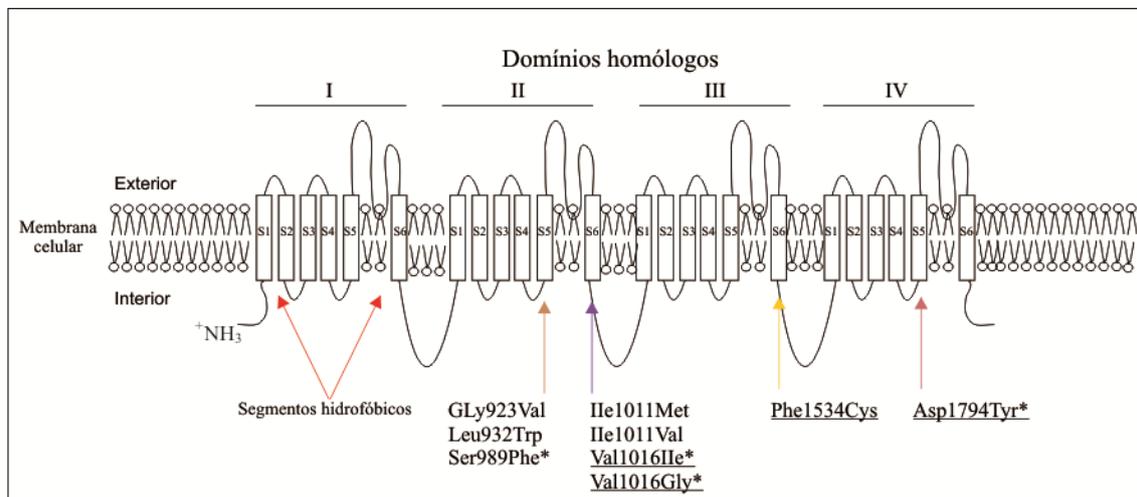


Figura 11. Esquema do canal de sódio-voltagem dependente, seus quatro domínios homólogos, suas seis subunidades hidrofóbicas e as mutações presentes em *A. aegypti*. As mutações sublinhadas e em negrito estão relacionadas com a resistência aos piretróides e organoclorados. As mutações com asterisco indicam à presença exclusiva em *A. aegypti*. Modificado de Martins & Valle (2012).

1.12. Diversidade Genética

O conhecimento da biodiversidade necessita considerar os diferentes níveis hierárquicos de organização da vida (genes, espécies, populações, comunidades e ecossistemas) junto com seus atributos de composição, estrutura e função. Seu estudo pode ter uma abordagem a partir de três grandes perguntas em cada um dos níveis: Que elementos a compõem? Como estão organizados? E como interagem? (Noss 1990, Moreno 2001, Villareal *et al.* 2006).

Dentro destes níveis hierárquicos, a diversidade genética é importante por ser a base e origem de toda a biodiversidade (Solbrig 1991). A variação genética determina a forma de interação de uma espécie com seu ambiente e com outras espécies. Toda a diversidade genética se origina no âmbito molecular e encontra-se relacionada com as características físico-químicas dos ácidos nucleicos. A este nível, a biodiversidade surge a partir de mutações no DNA, embora algumas dessas mutações sejam eliminadas por seleção natural ou por processos estocásticos (Moreno 2001).

A variação genética pode ser detectada a nível molecular analisando-se diretamente mudanças na estrutura do DNA, ou indiretamente nas proteínas que codificam genes específicos. Para quantificar a variação genética dentro das populações, os dados moleculares são utilizados para determinar a média de heterozigosidade (H), a proporção de loci polimórficos (P) e o total (n) ou a média (ne) do número de alelos por locus. É importante salientar que diferentes métodos utilizados para detectar variação genética provêm distintos tipos de informação dependendo da unidade de variação em que se baseiam, por exemplo, o DNA, as proteínas, a forma dos cromossomos, ou a morfologia externa. Isso também faz com que cada método tenha certas limitações e vantagens e que os protocolos de amostragem para cada método sejam diferentes (Mallet 1996, Martínez 1997).

Para a elaboração de programas de controle, é necessário o conhecimento dos padrões de dispersão e da diversidade genética do inseto, uma vez que a habilidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética (Yan *et al.* 1998, Hiragi *et al.* 2009). Para compreender a evolução histórica das populações de mosquitos e da epidemiologia da doença é necessário analisar a variação genética dentro e entre as populações (Yan *et al.* 1998). O estudo da população é essencial para a identificação de possíveis fatores responsáveis pela resistência e adaptação ecológica (Hiragi *et al.* 2009). Uma aproximação molecular é medir o polimorfismo do DNA entre os indivíduos de uma espécie (Mallet 1996). Este polimorfismo pode ser detectado por uma ampla variedade de técnicas que mostram mudanças sequenciais em pequenas regiões específicas do DNA, como o Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), o polimorfismo do DNA amplificado ao

acaso (RAPD) (Solbrig 1991, Hunter & Sulzer 1996), isoenzimas (Martínez 1997), genes de RNA ribossomal (RNAr), sequenciamento, microssatélites (Mitchell-Olds 1995), Polimorfismo de nucleotídeo único (SNIP) e o DNA mitocondrial (DNAMt).

O DNA mitocondrial (DNAMt) como marcador molecular tem sido amplamente utilizado nas últimas três décadas para inferir a variabilidade genética, fluxo gênico e história evolutiva em diversos grupos de organismos (Spanos *et al.* 2000) incluindo os insetos (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2002, Bracco *et al.* 2007, Paduan & Ribolla 2008, Lima-Junior & Scarpassa 2009, Paupy *et al.* 2012). Em invertebrados, o DNAMt é muito parecido com o dos vertebrados, estando as diferenças principalmente relacionadas com o rearranjo dos genes na fita circular (Snustad & Simmons 2001).

O DNAMt é uma molécula haploide circular presente nas mitocôndrias, com tamanho estimado em metazoários de 15 a 17 qb, apresenta 13 genes que codificam proteínas, dois genes de RNA ribossômico, 22 de RNA transportador e uma região não codificadora (Figura 12). É de herança materna (uniparental) com ausência de recombinação e apresenta altas taxas evolutivas, quando comparada com DNA nuclear (cerca de 10 vezes maior), e por esses motivos mostra-se como uma importante ferramenta para estudo de relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações. As altas taxas de mutação no DNAMt estão relacionadas com a eficiência das enzimas envolvidas no reparo na replicação, enzimas que são codificadas por genes nucleares (Matioli 2001, Martins & Domingues 2011).

Um das desvantagens da utilização do DNAMt em estudos populacionais e filogenéticos é a presença de pseudogenes, resultado da translocação de sequências mitocondriais do genoma mitocondrial para o genoma nuclear. Uma vez integrado, essas sequências não funcionais podem acumular mutações livremente, fontes de variação utilizadas em análises filogenéticas (Hlaing *et al.* 2009).

Dos genes que constituem o DNAMt, o *ND4* (codificante da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4) (Figura 12), é a unidade que apresenta um papel importante nas reações que produzem energia para a célula. Supõe-se que a subunidade 4 faz parte da maquinaria

de translocação de prótons nas reações de oxirredução (Ferreira *et al.* 2008).

A variabilidade genética em populações naturais de *A. aegypti* tem sido investigada utilizando marcadores moleculares tais como RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (Julio *et al.* 2009), microsatélites (Paupy *et al.* 2010,), SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único) (Paduan & Ribolla 2009, Heme *et al.* 2010) e DNAmT em especial utilizando *ND4* (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2002, Bosio *et al.* 2005, Herrera *et al.* 2006, Bracco *et al.* 2007, Paduan & Ribolla 2008, Urdaneta-Marquez *et al.* 2008, Rondan *et al.* 2009, Lima-Junior & Scarpassa 2009, Bona *et al.* 2012, Twerdochlib *et al.* 2012, Paupy *et al.* 2012, Da Silva *et al.* 2012). Na tabela 6 estão relacionados os países, cidades, número de haplótipos e localização no GenBank e autores que tem trabalhado com DNA mitocondrial.

Tabela 6. Diversidade genética observada em populações de *A. aegyti* utilizando o marcador mitocondrial ND4.

País	Localidade	Hd; π	Estruturação genética (F_{ST} e $\alpha=0,05$)	Haplotipos	GenBank	Referência
Brasil (Amazônia e Sudeste), Perú, Venezuela, México		0,90; 0,020	NC	30	AF334858.1 AF334858.1 AF334851.1 AF334852.1 AF334854.1 EU650409.1 EU650414.1 AF334864.1 AF334850.1 AF334859.1 EU650415.1 AY906852.1 EU650407.1 EU650412.1 EU650413.1 DQ176835.2 DQ176840.2 EU650416.1 AF334865.1 DQ176831.2 EU446272.1 AF334848.1 AF334849.1 AF334857.1 AF334861.1 AF334847.1 JQ303017 AF334862.1 EU650417.1 JQ303018 AY906840.1	Gonçalves <i>et al.</i> 2012

País	Localidade	Hd; n	Estruturação genética (F_{ST} e $\alpha=0,05$)	Haplotipos	GenBank	Referência
Brasil	Andirá Bandeirantes Barra do Jacaré Floraí Jacarezinho Londrina Maringá Nova Londrina Palotina Paranava	0,702; 0,01556	0,30; $p < 0,05$	8	JN089749- JN089755	Twerdochlib <i>et al.</i> 2012
Brasil	Foz do Iguaçu	0,131; 0,00475	0,00217; $p > 0,05$	2	JN190355-56	Bona <i>et al.</i> 2012
Bolívia	Cobija Trinidad Puerto Balivianian Puerto Almacen Alcoche Caranavi Santa Fe Villa Tunari Chipiriri Santa Cruz de la Sierra Robore Santiago de Chiquitos Puerto Suarez Camiri Yacuiba Puente Barria Caiza El Palmar	NC; 0,00159	0,06; $p < 0,0001^*$	4	JQ926705 - JQ926708	Paupy <i>et al.</i> 2012

País	Localidade	Hd; n	Estruturação genética (F_{ST} e $\alpha=0,05$)	Haplotipos	GenBank	Referência
Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil	Argentina (Estación Pocitos Orán Tartagal Salta Tucumán Catamarca Santiago del Estero La Rioja Córdoba Villa Maria Buenos Aires La Plata Parana Corrientes Machagai Clorinda Ingeniero G. Juárez Posadas); Bolívia (Santa Cruz de La Sierra Yacuiba); Paraguai (Asunción Encarnación); Uruguai (Mercedes); Brasil (Foz do Iguaçu)	NC	0,32; $p < 0,001^{**}$	20	Sem dados no GenBank	Rondan <i>et al.</i> 2009.

País	Localidade	<i>Hd</i> ; π	Estruturação genética (<i>F_{ST}</i> $\alpha=0,05$)	Haplotipos	<i>GenBank</i>	Referência
Brasil	Coroado Praça 14 de Janeiro Compensa Tancredo Neves Coari Santarém Belém Boa Vista Pacaraima Rio Branco	0,666; 0,0115	0,27; $p<0,00001$	13	EU650405- EU650417	Lima-Júnior & Scarpassa 2009
Venezuela	Tachira Zulia Lara Portuguesa Apure Mirnada Sucre Anzoategui Bolivar	NC	0,227; $p<0,001$	6	Sem dados no GenBank	Urdaneta- Marquez <i>et al.</i> 2008
Brasil, Guatemala, Estados Unidos, Perú, Venezuela	Brasil (Ananindeua (PA) Araçatuba (SP) Bauru (SP) Belém (PA) Belo Horizonte (MG) Boa Vista (RR) Campinas (SP) Campo Grande (MS)	0,82; 0,01997	NC; $p<0,05$	20	DQ176828 – DQ176831; DQ176833- DQ176843; DQ176845- DQ176849	Bracco <i>et al.</i> 2007

Cariacica (ES)
Feira de
Santana (BA)
Foz do Iguaçu
(PR) João
Pessoa (PB)
Leandro
Ferreira (MG)
Manaus (AM)
Marília (SP)
Maringá (PR)
Milhã (CE)
Nova Iguaçu
(RJ)
Pacujá (CE)
Porto Velho
(RO)
Potim (SP)
Pres. Prudente
(SP)
Quixeramobim
(CE)
Rio Branco
(AC)
Rio de Janeiro
(RJ)
Salvador (BA)
Santos (SP)
São Luiz (MA)
São Sebastião
(SP)
Várzea Grande
(MT));

	Guatemala (Ciudad de Guatemala); Estados Unidos (Fort Lauderdale); Perú (Piura Lima Iquitos); Venezuela (Maracay)					
Venezuela	Mecocal La Esperanza Los Pedros Nueva Bolivia Palmarito Santa María Las Américas San Carlos Calabozo San Juan Maracay El Limón La Victoria Cagua Villa de Cura Puerto Cabello Catia La Mar Naiguatá Puerto Píritu Barcelona Sucre Tumeremo El Dorado El Callao	NC; 0.01877	0,22; p<0,00001	7	Sem dados no GenBank	Herrera <i>et al.</i> 2006

Thailandia	Pai Lom Lao Bao Mae Dow Mae Kas Chiang Mai 1-4 Kamphaeng Phet 1-3 Bangkok 1-3 Hat Yai 1-3 Sadao Phang-nga	NC	0,24; p<0,00001	7	Sem dados no GenBank	Bosio <i>et al.</i> 2005
Perú	Piura Lima Iquitos	NC; 0,00790	0,64; p<0,001	3	DQ177153- DQ177155	Costa-da-Silva <i>et al.</i> 2005
México, Estados Unidos	México (Monterrey Ciudad Victoria Miguel Aleman Matamoros Nuevo Laredo Reynosa Tampico Moloacan Minatitlan Tuxpan Villahermosa Campeche Ciudad del Carmen Merida Cancun Chetumal Tapachula I Tapachula II Puerto Escondido	NC; 0,01636 e 0,02161	0,283; p<0,05	25	AF334841- AF334865	Gorochotegui- Escalante <i>et al.</i> 2002

Coyuca de
Benitez
Ixtapa-
Zihuatanejo
Lazaro Cardenas
Manzanillo
Puerto Vallarta
Mazatlan
Culiacan);
Estados Unidos
(Tucson
Houston)

Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica, **NC**= não calculado; *estruturação genética usando microssatélites; **
estruturação genética usando 12S rRNA, COI II e III, ND5 e ND4.

2. JUSTIFICATIVA

A dengue é uma doença viral com transmissão vetorial com maior potencial epidêmico no mundo (WHO 2013). Como não existe vacina, o combate da dengue baseia-se no controle do vetor (Urdaneta-Marquez & Anna-Bella, 2011). Embora ocorram importantes avanços no desenvolvimento de medidas alternativas, o uso de inseticidas químicos continua sendo essencial nos programas de controle integrado (Castro, Quintana, Quiñones 2007).

Duas classes de inseticidas são utilizadas para o controle do vetor, organofosforados desde 1970 na Colômbia (Motta-Sanchez *et al.* 1976) e 1967 no Brasil (Braga *et al.* 2004) e piretróides desde 1990 na Colômbia (Maestre 2012) e 1999 no Brasil (Braga *et al.* 2004). E mais recentemente IGRs (Junqueira & Mendes 2007, Ministerio de Protección Social *et al.* 2011).

Em ambos os países são utilizados o organofosforado temephos para o controle das formas imaturas (Ocampo & Wesson 2004, Beserra *et al.* 2007, Castro, Quintana & Quiñones 2007, Maestre *et al.* 2009) e piretróides para o controle das formas adultas (Ocampo & Wesson 2004, Castro, Quintana & Quiñones 2007, Santos *et al.* 2007, SUCEN 2010), com a exceção da Colômbia, onde são usados tanto piretróides como organofosforados, sendo o malathion o adulticida utilizado (Ministerio de Protección Social *et al.* 2011).

O uso contínuo de inseticidas químicos tem favorecido a seleção de populações resistentes (Álvarez *et al.* 2006, Beserra *et al.* 2007, Bisset *et al.* 2009), alterando a estrutura genética e capacidade vetorial (Yan *et al.* 1998; Hiragi *et al.* 2009), prejudicando as ações de controle do vetor (Brogdon & McAllister 1998, Macoris *et al.* 1999, Bisset *et al.* 2004, Rodriguez *et al.* 2004, Braga *et al.* 2004). O fenômeno da resistência a inseticidas nos vetores converte-se em elemento limitante para o manejo dos programas de controle, levando à necessidade de utilização de produtos que apresentem diferentes mecanismos de ação, os quais são escassos, de alto custo e podem apresentar um grau de toxicidade mais elevado e efeitos adversos à biota que os produtos utilizados tradicionalmente (Giraldo *et al.* 2008).

Por isso, é importante investigar em termos de regiões como a pressão de seleção de inseticidas utilizada em ambos os países, pode afetar o status de suscetibilidade e a estrutura genética destas populações. Estes resultados podem ser úteis para adoção de medidas mais eficazes de controle do vetor, apesar de investigar só um dos mecanismos de resistência aos piretróides, como é o caso da mutação Val1016Ile (Liu *et al.* 2000; Scott *et al.* 1990). Os resultados permitirão verificar alterações na frequência desta mutação, ou seja, darão uma ideia se as populações devem ser continuamente monitoradas para manter ou restaurar a suscetibilidade a piretróides.

3. OBJETIVOS

3.1. **Objetivo Geral**

- ✓ Avaliar resistência a inseticidas organofosforados e piretróides e a variabilidade genética de algumas populações naturais de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da Colômbia e do Brasil.

3.2. **Objetivos específicos**

- ✓ Determinar os níveis de suscetibilidade ao organofosforado Temephos em larvas de *Aedes aegypti*;
- ✓ Verificar alterações na frequência da mutação Val1016Ile do gene associado à resistência *Knockdown* (Kdr) como possível mecanismo associado à resistência ao piretróide;
- ✓ Avaliar a variabilidade genética de diferentes populações de *Aedes aegypti*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

4.1.1. Colômbia

Colômbia é um país da América localizado na zona noroeste de América do Sul com uma superfície de 1.141.748 km² e 45.239.079 habitantes (Figura 13), sendo o quarto país em área da América do Sul, precedido do Brasil, Argentina e Peru. Colômbia é formada por 32 estados e um distrito capital (Bogotá) (Departamento Administrativo Nacional de Estadística-DANE 2012, Gobierno Nacional de la Nación 2012), entre estes estados o Quindío (Figura 13) está localizado na região centro-oeste do país, sendo sua capital a cidade de Armenia. O Estado de Quindío é o menor em área km² e está composto por 12 municípios (Tabela 7), todos localizados na Cordilheira Central dos Andes (Gobernación del Quindío 2012). Foram realizadas coletas de larvas de *A. aegypti* em três Estados de Quindío: Armenia, Calarcá (incluindo Barcelona) e Montenegro.

O Estado de Armenia (Figura 13, Tabela 7) está localizado no centro geográfico do país e tornou-se o ponto de partida de todas as estradas intermunicipais e no centro do departamento de serviços, sendo uma cidade de tamanho médio localizada entre Bogotá, Medellín e Cali, as três maiores cidades da Colômbia. Encontra-se localizada às coordenadas geográficas a 04°32' latitude Norte e 75°40' longitude Oeste, a altitude de 1.483 m, área de 121.33 Km², temperatura média de 20°C e população de 287.306 habitantes (Gobernación del Quindío 2012).

O Estado de Calarcá (Figura 13, Tabela 7) está localizado nas encostas ocidentais da cordilheira central para o centro do Estado de Quindío. Encontra-se localizada às coordenadas geográficas 04°32' latitude Norte e 75°39'20" longitude Oeste, a altitude de 1.573 m, área de 219.23 Km², temperatura média de 20°C e população de 75.235 habitantes. A topografia deste município é variável, já que apresenta altitudes que vão desde os 1000 m na confluência dos rios do Quindío e Barragan até 3667 m na parte mais alta do El Campanario (Gobernación del Quindío 2012). Este município está formado por

40 *veredas* (centro de assentamento associado ao *corregimiento*) e três *corregimientos* (populações que não atingem o caráter de estado, sendo sua jurisdição ligada a um estado), dos quais o *corregimiento* de Barcelona se encontra localizado a 18 km de Calarcá e tem 8.136 habitantes (Calarcá 2012).

O Estado de Montenegro (Figura 13 & Tabela 7) está localizado ao oeste do município de Armenia. Encontra-se localizado às coordenadas geográficas 04°34' 23" latitude Norte e 75°45'20" longitude Oeste, a altitude de 1.292 m, área de 148,92 Km², temperatura média de 21⁰C e população de 40.441 habitantes (Gobernación del Quindío 2012).

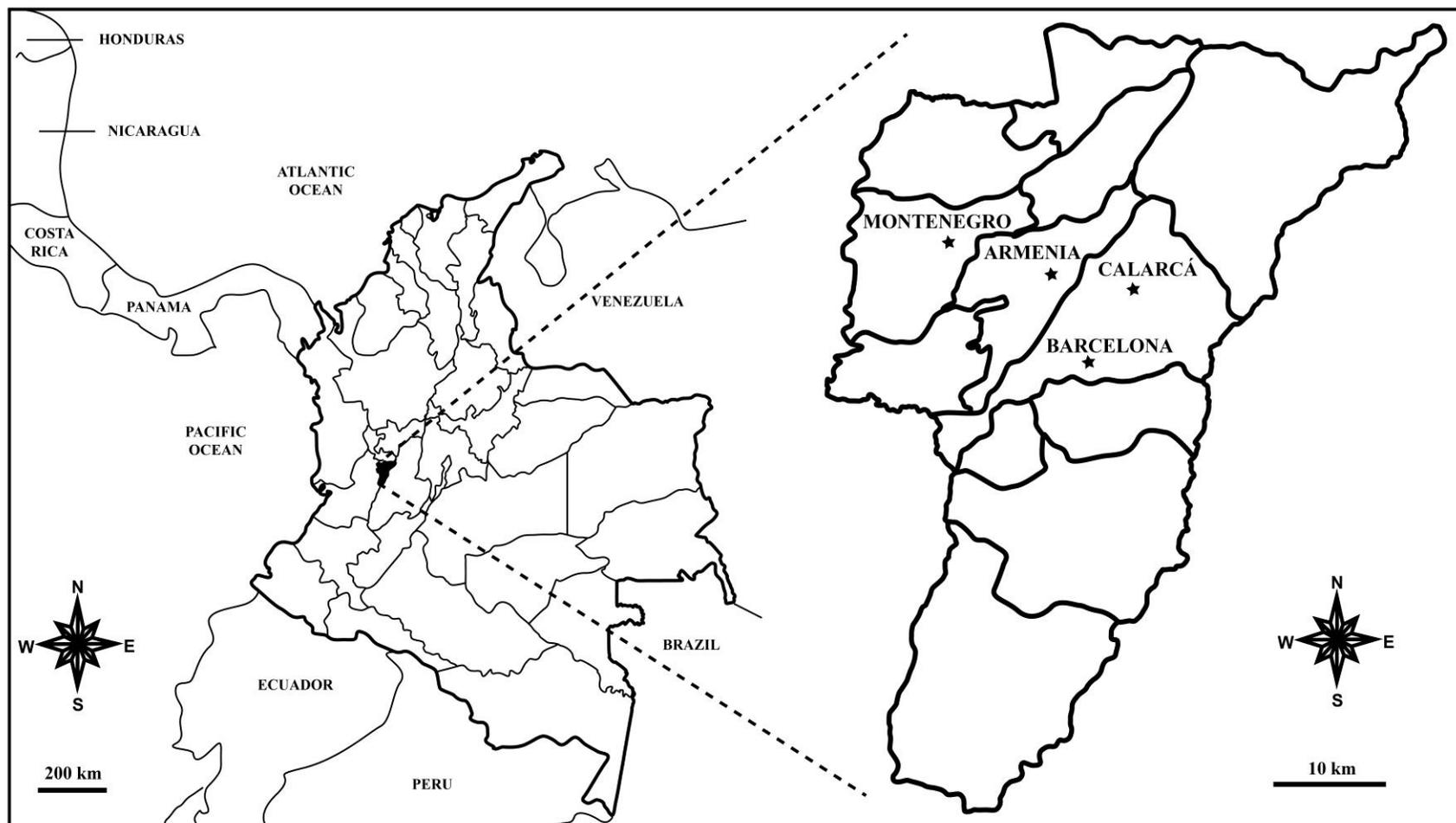


Figura 13. Área de estudo para as populações de *A. aegypti* coletadas na Colômbia com destaque no estado de Quindío e as áreas de coleta.

Tabela 7. Informações gerais dos municípios do Estado de Quindío.

Município	Área Km ²		Distância até Armenia (Km)	Densidade populacional (hab/km ²)
	Urbana	Rural		
*Armenia	22,53	98,80	-	2.368,0
Buenavista	0,14	40,98	33	72,7
*Calarcá	2,44	216,79	6	343,2
Circasia	1,70	89,67	12	311,0
Córdoba	0,29	97,66	24	18.534,5
Filandia	0,80	108,60	26	119,8
Génova	0,55	297,34	52	29,8
La Tebaida	1,50	87,68	17	411,8
*Montenegro	1,80	147,12	10	271,6
Pijao	0,58	242,54	31	26,6
Quimbaya	2,21	124,48	20	271,8
Salento	0,60	375,03	24	19,2
Total	35,14	1.926,69	-	293,2

*Municípios nos quais foram coletadas as populações de *A. aegypti*.

Fonte: *Gobernación del Quindío* 2012.

4.1.2. *Brasil*

Foram realizadas coletas de *A. aegypti* em nove municípios brasileiros que contemplam as Regiões Norte, Centro-Oeste, Sul e Sudeste (Figura 14).



Figura 14. Áreas de coleta das populações de *A. aegypti* no Brasil com destaque nas regiões e estados coletados. N região Norte (Estado Rondônia); CW região Centro-Oeste (Estado Mato Grosso); SE região Sudeste (Estado Minas Gerais) e S região Sul (Estado de Paraná).

4.1.2.1. Região Norte – Estado de Rondônia

O Estado de Rondônia ($11^{\circ}30'20,64''$ S e $63^{\circ}34'50,20''$ O) é uma das 27 unidades federativas do Brasil. Está localizado na região Norte e tem como limites os estados do Mato Grosso (a leste), Amazonas (ao norte), Acre (a oeste) e a República da Bolívia (a oeste e sul). Com 1.590.011 habitantes (IBGE 2012) e densidade demográfica de 6,58 hab/km², Rondônia é o terceiro estado mais populoso e o mais denso da região Norte, sendo o 23º mais populoso do Brasil. O estado possui 52 municípios e ocupa uma área de 237.576,167 km². Sua capital é também o maior município, Porto Velho. Outras cidades importantes são: Ariquemes, Cacoal, Espigão do Oeste, Guajará-Mirim, Jaru, Ji-Paraná, Rolim de Moura e Vilhena (IBGE 2012). Os municípios dos quais foi coletado o material foram Porto Velho, Jaru, Guajará-Mirim e Cacoal.

Porto Velho (Figura 14) encontra-se localizado às coordenadas geográficas $8^{\circ}46'43,87''$ Sul e $63^{\circ}53'42,58''$ Oeste, a uma altitude de 85 m, área de 34.082,366 Km², clima tropical super-úmido, e população de 442.701 habitantes. É a maior cidade do estado, 3ª maior capital e quarta maior cidade da região Norte. É também a 46ª maior cidade e 21ª maior capital do país (IBGE 2012).

Jaru (Figura 14) encontra-se localizado às coordenadas geográficas $10^{\circ}27'03,21''$ Sul e $62^{\circ}27'52,50''$ Oeste, a uma altitude de 124 m, área de 2.944,025 Km², clima tropical super-úmido, e população de 52.005 habitantes. É a 6ª maior cidade do estado. (IBGE 2012).

Guajará-Mirim (Figura 14) encontra-se localizado às coordenadas geográficas $10^{\circ}49'23,65''$ Sul e $65^{\circ}19'47,23''$ Oeste, a uma altitude de 128 m, área de 24.856 km², clima tropical super-úmido, e população de 41.656 habitantes (IBGE 2012).

Cacoal (Figura 14) encontra-se localizado às coordenadas geográficas $11^{\circ}26'54,76''$ Sul e $61^{\circ}26'27,84''$ Oeste, a uma altitude de 200 m com 79.330

habitantes (IBGE/2012), é a quinta maior cidade do estado, 34ª maior da região Norte e a 383ª mais populosa do Brasil.

4.1.2.2. Região Centro-Oeste – Estado de Mato Grosso

O Estado de Mato Grosso (12°40'54,74" S e 56°55'15,95" O) é uma das 27 unidades federativas do Brasil. Está localizado na região Centro-Oeste. Tem a porção norte de seu território ocupada pela Amazônia Legal, sendo o sul do estado pertencente ao Centro-Sul do Brasil. Tem como limites: Amazonas, Pará (N); Tocantins, Goiás (L); Mato Grosso do Sul (S); Rondônia e Bolívia (O). Possui uma população de 3.035.122 habitantes e uma densidade demográfica de 3,36 hab/km². Ocupa uma área de 903.357 km². Sua capital é Cuiabá. As cidades mais importantes do Mato Grosso são Cuiabá, Várzea Grande, Rondonópolis, Barra do Garças, Sinop, Tangará da Serra, Cáceres, Pontes e Lacerda, Juína, Primavera do Leste, Campo Verde, Alta Floresta, Sorriso e Barra do Bugres. Os municípios dos quais foi coletado o material foram Rondonópolis, Sinop e Várzea Grande.

Rondonópolis (Figura 14) encontra-se localizado às coordenadas geográficas 11°26'54,76" Sul e 61°26'27,84" Oeste, a uma altitude de 227 m área de 4.165,232 km², clima tropical quente e sub-úmido e uma população de 195.476 habitantes (IBGE 2012), o que coloca Rondonópolis em 135º lugar no Brasil, 54º lugar entre os municípios interioranos brasileiros e 3º lugar no estado.

Sinop (Figura 14) encontra-se localizado às coordenadas geográficas 11°50'59,09" Sul e 55°29'47,92" Oeste, a uma altitude de 384 m possui uma área de 3.942 km², um clima tropical quente e sub-úmido e uma população de 113.099 habitantes (IBGE 2012), o que coloca Sinop em 229º lugar no Brasil, 114º lugar entre os municípios interioranos e 4º lugar no estado.

Várzea Grande (Figura 14) encontra-se localizado às coordenadas geográficas 15°39'06,10" Sul e 56°02'34,26" Oeste, a uma altitude de 198 m área de 1.048 km², clima tropical quente e úmido e população de 252.596 habitantes (IBGE 2012).

4.1.2.3. Região Sudeste – Estado de Minas Gerais

O Estado de Minas Gerais ($17^{\circ}55'48,64''$ S e $43^{\circ}47'27,04''$ O) é uma das 27 unidades federativas do Brasil, sendo a quarta maior em extensão territorial. Localizado na Região Sudeste do Brasil e limitado ao sul e sudoeste com São Paulo, a oeste com o Mato Grosso do Sul e a noroeste com Goiás, incluindo pequena divisa com o Distrito Federal, a leste com o Espírito Santo, a sudeste com o Rio de Janeiro e a norte e nordeste com a Bahia. Minas Gerais é o segundo estado mais populoso do país, com quase 20 milhões habitantes, que se distribuem por 853 municípios, sendo a unidade da federação brasileira com o maior número de municípios. As coletas foram feitas em Governador Valadares.

Governador Valadares (Figura 14) encontra-se localizado às coordenadas geográficas $18^{\circ}44'39,23''$ Sul e $41^{\circ}51'31,22''$ Oeste, a uma altitude de 667 m área de 2.342 km², clima tropical e população de 263.689 habitantes (IBGE 2012).

4.1.2.4. Região Sul – Estado de Paraná

Paraná ($25^{\circ}15'07,52''$ S e $52^{\circ}01'17,55''$ O) é uma das 27 unidades federativas do Brasil. Faz fronteira com os estados do Mato Grosso do Sul a noroeste, São Paulo ao norte e leste e de Santa Catarina ao sul, além da Argentina a sudoeste, do Paraguai a oeste e do oceano Atlântico a leste. Está localizado na região Sul do país. Abrange área de 199 880 km². Curitiba é a capital e cidade mais populosa. O Paraná está dividido em 39 microrregiões e 10 mesorregiões, subdivididos em 399 municípios. Londrina, Maringá, Ponta Grossa, Cascavel, São José dos Pinhais, Foz do Iguaçu, Toledo, Apucarana, Araçongas e Umuarama são as outras maiores cidades em população do Paraná. As coletas foram realizadas em Maringá.

Maringá (Figura 14) encontra-se localizado às coordenadas geográficas $23^{\circ}26'25,98''$ Sul e $51^{\circ}56'31,09''$ Oeste, a uma altitude de 515 m área de 487km², clima subtropical e população de 357.077 habitantes (IBGE 2012).

4.2. Procedimentos de coleta

4.2.1. Colômbia

No ano 2011 foram coletadas larvas de *A. aegypti* (Tabela 8) em tanques de uso doméstico utilizando a metodologia proposta pelo Ministerio de Protección Social da Colômbia, Instituto Nacional & Organización Panamericana de la Salud (2011) para o levantamento de índices de infestação aédica. Após a coleta, as larvas foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia Médica da Universidade Industrial de Santander, Santander Colômbia.

Tabela 8. Populações de *Aedes aegypti* coletadas na Colômbia.

Município	Coleta
Armenia	2011
Calarcá	2011
Montenegro	2011
Barcelona	2011

4.2.2. Brasil

Entre 2009 a 2012 foram coletados ovos de *Aedes* spp, no âmbito da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* (MoReNAa) (Braga & Valle 2007b) pelos respectivos Núcleos de Entomologia das Secretarias de Estado da Saúde de Rondônia, Mato Grosso e Paraná. Ovitampas, contendo paletas de eucatex de 2 cm de largura por 12 cm de comprimento, presas em suporte plástico e submersas em 500 ml de solução de feno a 10% (Reiter *et al.* 1991), ficaram em campo durante cinco dias. A distribuição das armadilhas ocorreu de forma aleatória nos peridomicílios das residências em vários pontos dos municípios, seguindo o padrão da Fundação Nacional de Saúde. A exceção do material do Estado de Minas Gerais, no qual foram coletados apenas adultos pelo professor doutor Gabriel Augusto Rodrigues de Melo (UFPR/PR) utilizando isca humana (Tabela 9). Em seguida, as paletas com ovos foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia

Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná (Departamento de Zoologia).

Tabela 9. Populações de *Aedes aegypti* coletadas no Brasil no período de 2009 a 2012.

Região	Município	Ano de coleta
Norte	Jaru (RO)	2011
	Cacoal (RO)	2010
	Guajará-Mirim (RO)	2010
	Porto Velho (RO)	2009
Centro-Oeste	Rondonópolis (MT)	2011
	Sinop (MT)	2011
	Várzea Grande (MT)	2011
Sudeste	Governador Valadares (MG)	2011
Sul	Maringá (PR)	2012
	Foz do Iguaçu (PR)	2010

4.3. Procedimentos em laboratório

Em laboratório, as larvas provenientes das populações da Colômbia eram triadas quando adulto sendo todo o material criado no insetário do Laboratório do Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP) do Departamento de Ciências Básicas na Universidade Industrial de Santander. Os ovos provenientes das populações do Brasil foram quantificados sob microscópio estereoscópico e todo procedimento de criação foi realizado no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

Todo processo de criação (Figura 15) foi realizado em condições similares de temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($80\pm 10\%$) e fotoperíodo (12h: 12h), ideais para a espécie. Para induzir a eclosão, as paletas com ovos foram submersas em copos plásticos de 770 ml contendo água desclorada e ração para gatos triturada (Purina® Cat Chow®), por 48 horas. Em seguida, foram retiradas as larvas e descartada a água. As paletas foram novamente submersas em água com alimento por mais 48 horas para maximizar a eclosão das larvas. As

larvas foram transferidas e mantidas em copos com tampa até a emergência do adulto.

Para a realização dos bioensaios com temephos, os adultos emergidos das ovitrampas foram alimentados com mel a 10%. Três dias após a emergência das últimas pupas, foram fornecidos camundongos Swiss, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Paraná (Número do comitê de ética em pesquisa: 227 – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná), para a realização do repasto sanguíneo. Recipientes de vidro com água e papel filtro umedecido foram colocados dentro de vasos pretos como substrato de oviposição das fêmeas. Os ovos foram colocados para eclosão em copos de 770 ml, após 24 h, as larvas foram transferidas para bandejas com água e alimento, onde permaneciam por quatro dias. Quando as larvas alcançavam terceiro instar final e quarto instar inicial, eram separadas para realização dos bioensaios. Para as análises da mutação Val1016Ile, em média 30 indivíduos de *A. aegypti* recém-emergidos foram amostrados para cada um dos municípios avaliados.

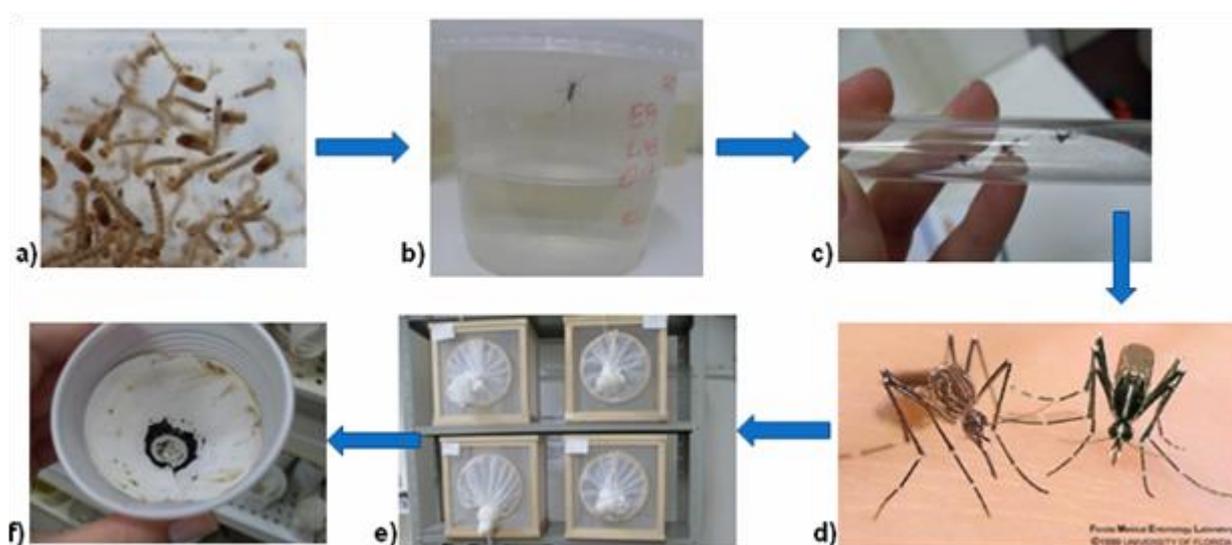


Figura 15. Processo de criação para obtenção de colônias das localidades coletadas em campo para realização dos bioensaios: a) larvas e pupas, b) recipiente com pupas e adultos, c) identificação de adultos, d) diferenças morfológicas entre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Fonte: Florida Medical Entomology Laboratory, 1999), e) gaiolas para criação de adultos, f) oviposição. Fonte: Picoli *et al.* (2010).

4.3.1. Bioensaios da suscetibilidade com larvas de terceiro instar final e quarto instar inicial de *Aedes aegypti* ao temephos

4.3.1.1. Concentração diagnóstica

Foram realizados bioensaios utilizando larvas da geração F1 e o inseticida Temephos pestanal 250 mg 97,5 % (Sigma-Aldrich). A calibração e controle dos bioensaios foram realizados utilizando a cepa suscetível de *A. aegypti* Rockefeller (Centro de Controle de Doenças, CDC), utilizando a concentração diagnóstica de 0.0162 ppm de temephos, que corresponde ao dobro da concentração letal (CL₉₉) que mata 99 % das larvas da cepa suscetível. A leitura da concentração diagnóstica foi realizada após 24 horas calculando-se a taxa de mortalidade das larvas. Populações com porcentagem de mortalidade acima de 98 % foram consideradas suscetíveis, entre 80 % e 98 % com alteração da suscetibilidade e abaixo de 80 % resistentes (WHO 1998).

4.3.1.2. Concentrações múltiplas

Bioensaios com concentrações múltiplas seguiram o procedimento proposto pela Organização Mundial da Saúde para avaliar a suscetibilidade das larvas ao temephos (WHO 1981). Em cada experimento, nove concentrações foram testadas em quatro réplicas para delimitar a mortalidade das larvas entre 5 % e 95 %. Cada concentração continha 20 larvas de terceiro instar final e quarto instar inicial, totalizando 720 larvas por experimento. Em todos os copos com capacidade para 200 ml foram adicionados 80 ml de água filtrada, o temephos e 20 ml de água que continha as larvas. Como controle da população, quatro réplicas usando etanol absoluto (99,5%) foram testadas. Os experimentos foram feitos quatro vezes (Figura 16). A leitura dos testes foi realizada após 24 horas, calculando-se a taxa de mortalidade das larvas.

Para testar a estabilidade do temephos, foi realizado um bioensaio com a cepa Rockefeller. Foram preparados dez copos: quatro réplicas com a CL₉₉ (0,00814 ppm), quatro réplicas com metade dessa concentração (0,00407 ppm) e duas réplicas com o solvente etanol 99,5% (Figura 17).

As concentrações letais (LC_{50} , LC_{90} e LC_{99}) foram determinadas no programa Probit (Finney 1971). As razões de resistência (RR_{50} e RR_{95}) foram obtidas dividindo-se a concentração letal da população avaliada pela concentração letal equivalente da população Rockefeller.

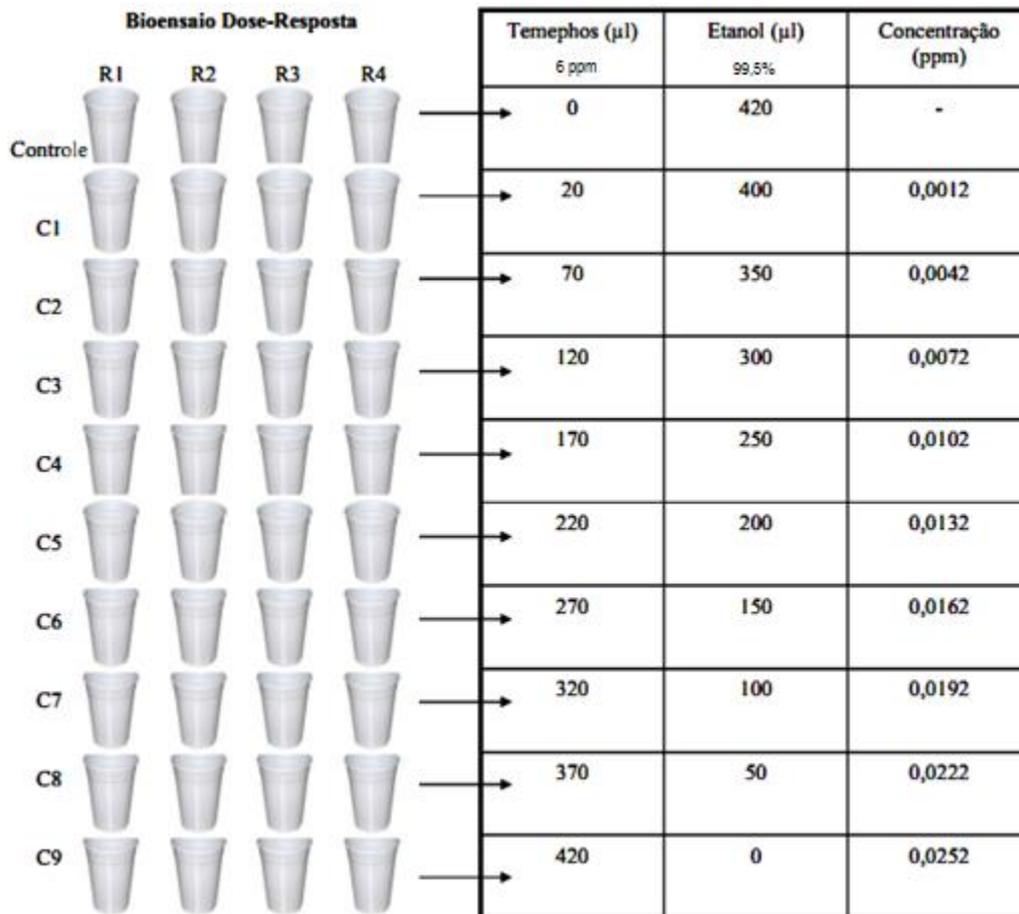


Figura 16. Esquema do procedimento do bioensaio de temephos com concentrações múltiplas (C1 a C9) e concentração diagnóstica (C6: 0.0162 ppm), totalizando quatro réplicas (R1 a R4), em quatro dias diferentes, mantido em câmara BOD a 26°C. Fonte: Bona *et al.* (2012).

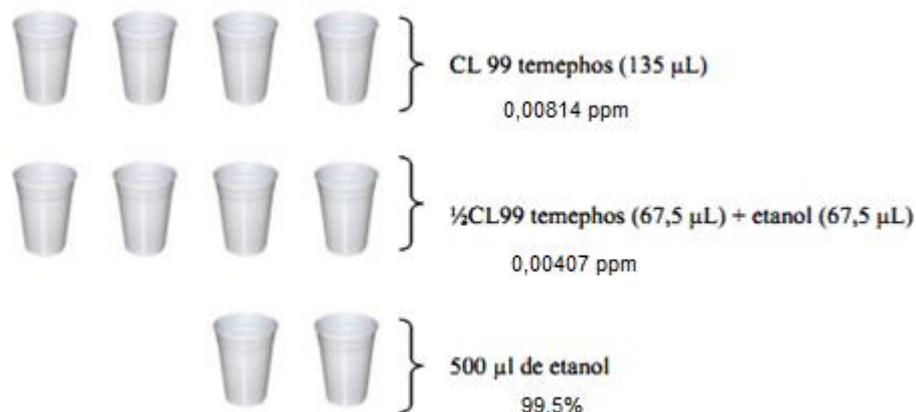


Figura 17. Esquema do procedimento de controle de estabilidade do temephos com a população suscetível Rockefeller, com duas concentrações de temephos e um controle com etanol, mantido em câmara BOD a 26°C. Fonte: Bona *et al.* 2012.

4.3.2. **Extração de DNA para análise dos fragmentos dos genes canal de sódio voltagem-dependente e ND4.**

Para a extração do DNA total foi utilizado o protocolo de Cheung *et al.* (1993) modificado. Cada mosquito adulto previamente congelado a -20°C em álcool absoluto (99,5%) foi individualizado em tubo tipo *ependorf* de 1,5 ml. Em cada tubo foram adicionados 160 µL de tampão de lise (TrisHCl 0,5 M pH 8,0, NaCl 4M, EDTA 0,5 M pH 8,0). Os mosquitos foram macerados em homogeneizador. Após isto, foi adicionado 20 µL de SDS 10% para rompimento das células. Os tubos foram incubados em banho sorológico 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 centrifuga 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 50 µL de TE 1X (TrisHCl 0,5 M, EDTA 0,05 M pH 8.0 e Água MilliQ) e armazenado a -20°C. A quantificação do DNA foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop®.

4.3.2.1. PCR alelo-específica para a mutação Val1016Ile

Para avaliar a presença da mutação Val1016Ile foi realizada uma PCR alelo-específico. Os *primers* que foram utilizados encontram-se na tabela 10.

Tabela 10. *Primers* utilizados para a mutação Val1016Ile.

Primer (5´-3´)	Referência
Val (GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC CAC CCG CAC CGG);	Saavedra-Rodriguez <i>et al.</i> (2007), Martins <i>et al.</i> (2009).
Ile (GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A);	
Val/Ile (GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA AAG C)	

As reações de PCR foram conduzidas contendo 2,5 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 12,5 pMoles de cada iniciador, dNTP 200 µM (Amresco, Solon, OH), 100 ng de DNA, 2U de Taq DNA Polimerase (Sigma-Aldrich), completando para o volume final de 25 µL com água MilliQ. As reações foram seguidas de acordo com Saavedra Rodriguez *et al.* (2007) e Martins *et al.* (2009), utilizando os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C por 12 minutos, 39 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos; seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos e um incremento de 65°C para 95°C a uma taxa de 0,3°C/s.

Para verificação dos alelos amplificados, foi preparado um gel de poliacrilamida a 10%, contendo 4 µl de amostra da PCR, 4 ng do Ladder 25bp (Invitrogen) além de 1 µl de corante safer dye (KASVI). Após a eletroforese, o gel foi transferido para o transiluminador para visualização de bandas, onde bandas de 78 e 98 pb correspondem, respectivamente aos

alelos mutante (1016Ile) e selvagem (1016Val) (Figura 18). Com os resultados dos géis obtidos, foram calculadas as frequências genotípicas, alélicas (Salman 2007) e o equilíbrio de Hardy-Weiber (HWE) (Harth 2008).

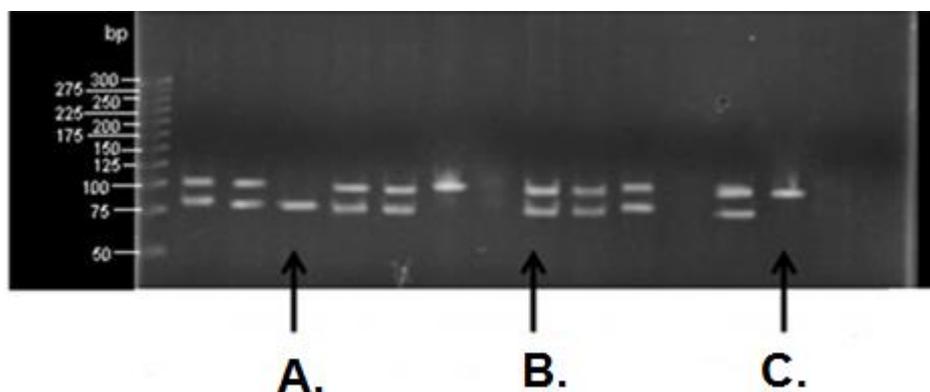


Figura 18. Verificação da amplificação do fragmento do gene envolvido com a resistência aos piretróides. **A.** Somente banda de 78bp indica indivíduo homocigoto recessivo (Ile/Ile); **B.** Bandas entre 98 e 78 bp indica indivíduo heterocigoto (Val/Ile) e **C.** Somente banda de 98 pb indica indivíduo homocigoto dominante (Val/ Val).

A frequência genotípica $f(x)$ representa a porcentagem de ocorrência de um determinado genótipo, por exemplo, $x = \text{Val/Val}$, Val/Ile ou Ile/Ile , em relação ao número total de indivíduos observados dentro de uma população. O cálculo 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 alelo recessivo (Ile), em relação ao número total de alelos observados dentro de uma população. Para o cálculo, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$F(\text{Val}) = \frac{2 \times \text{Número de indivíduos com o genótipo Val/Val} + \text{Número de indivíduos com o genótipo Val/Ile}}{2 \times \text{Número total indivíduos}}$$

$$F(\text{Ile}) = \frac{2 \times \text{Número de indivíduos com o genótipo Ile/Ile} + \text{Número de indivíduos com o genótipo Val/Ile}}{2 \times \text{Número total indivíduos}}$$

O equilíbrio de HWB descreve a influencia da reprodução ao acaso nas frequências alélicas e genotípicas numa população infinitamente grande. O calculo foi feito utilizando o teste qui-quadrado (χ^2), e sob a hipótese de HWE, o χ^2 tem aproximadamente uma distribuição chi-quadrada. Os cálculos foram feitos utilizando o software Minitab versão 14.1 (1972 - 2003 Minitab Inc.).

4.3.2.2. Amplificação, sequenciamento e análises do fragmento do gene ND4

A amplificação do segmento de 336 pb do gene que expressa a subunidade 4 da enzima mitocondrial NADH desidrogenase foi realizada utilizando 20 ng de DNA, 12,5 pMoles de cada iniciador (IDT, Coralville, IA, USA), dNTP 200 μ M (Amresco, Solon, OH), 2,5 μ L de Tampão 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂), 1 U Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich), e água Milli-Q para um volume final de 25 μ L.

Os iniciadores utilizados na amplificação foram: iniciador universal: 5'-ATT GCC TAA GGC TCA TGT AG-3' e iniciador reverso: 5'-TCG GCT TCC TAG TCG TTC AT-3'. As amostras foram amplificadas com os seguintes parâmetros: desnaturação, um ciclo de 94°C por dois minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e um ciclo de alongação final de 72°C por 7 minutos (Costa-da-Silva *et al.* 2005). O sucesso da amplificação foi verificado submetendo alíquotas de 6 μ L da amostra a eletroforese em gel de agarose 1,5%. O amplificado corresponde a 336 pb localizados nas posições 8405 a 8741 no genoma mitocondrial de *A. aegypti* (Figura 19).

A reação de purificação do produto amplificado foi feita com o kit Qiaquick® PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), segundo instruções do fabricante. Foram sequenciadas duas sequências de cada indivíduo, as amostras foram encaminhadas para Centro de Estudos do Genoma Humano

(Universidade de São Paulo) para sequenciamento utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).

As sequências de consenso foram obtidas no Staden Package versão 1.5 e o alinhamento foi realizado no BioEdit version 7.0 (Hall 2004), ferramenta ClustalW (Thompson *et al.* 1994). As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta tblastx para confirmação do fragmento amplificado. 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 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). 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 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Uma vez detectada diferença significativa, 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 duas árvores. Uma árvore com o método de *Neighbor-Joining*, seguindo o modelo de distância genética de Tamura-Nei, com o emprego de 1,000 réplicas. Os valores Bootstrap foram estimados com 1000 réplicas. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (GenBank # EF153761) foi usado como grupo externo. O segundo árvore, com o método de *Neighbor-Joining*, baseado nos valores par-a-par de F_{ST} obtivos através do Alequin, versão 3.5.

Os haplótipos deste estudo foram depositados no GenBank e comparados com os haplótipos para América relatados por Gonçalves *et al.* (2012). Para minimizar a ocorrência de pseudogenes mitocondriais nucleares (NUMTs) nas amostras, os haplótipos obtidos foram comparados com a lista de NUMTs verificados por Hlaing *et al.* (2009) e Black & Bernhardt (2009). Os NUMTs encontrados foram removidos da análise.

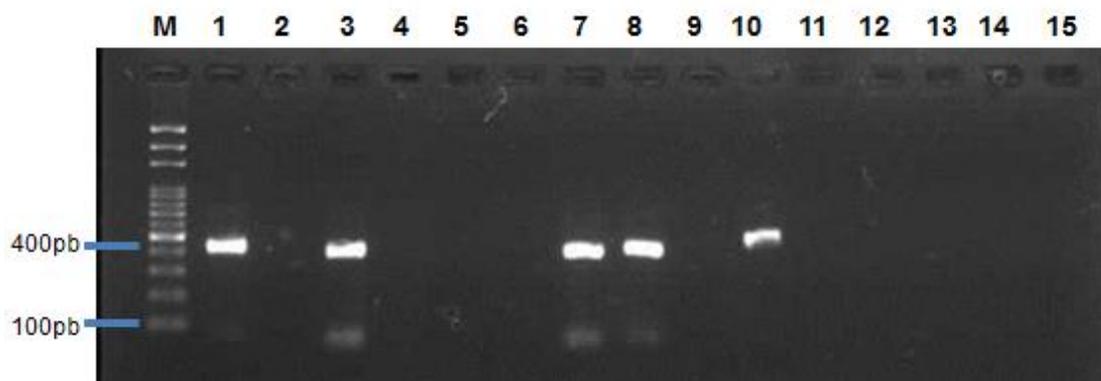


Figura 19. Produtos de amplificação do fragmento do gene *ND4* de 15 indivíduos de *A. aegypti* (1, 3, 7, 8 e 10) com tamanho aproximado de 336 pb. 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14 e 15: Amostras não amplificadas. **M:** Marcador molecular de 100 pb (Amresco, Sólón, Ohio).

5. RESULTADOS

5.1. *Bioensaios da suscetibilidade de Aedes aegypti ao temephos*

5.1.1. Dados bioecológicos

Não foram obtidos dados bioecológicos para as populações da Colômbia. Os resultados para as populações do Brasil são apresentados a seguir:

Das 3.486 armadilhas de oviposição instaladas, 49,6% foram positivas, resultando em 89.886 ovos que originaram 31.877 adultos, sendo o 96,9% (30897) *A. aegypti* e o 1,7% (557) *A. albopictus* (Tabelas 12 e 13).

Dos nove municípios cuja criação resultou em espécimes adultos, apenas Jaru, Cacoal, Guajará-Mirim, Sinop e Várzea Grande não apresentaram coexistência de espécies, sendo exclusiva a presença de *A. aegypti*. O Estado de Maringá foi o que apresentou a maior quantidade de *A. albopictus* (2,76%) seguido por Porto Velho (1,73%) e Rondonópolis (0,14%). A razão sexual observada resultou esperada (aproximadamente 1:1) para ambas as espécies em todas as localidades.

A positividade das paletas oscilou entre 8,6% e 75,8% respectivamente para os Estados de Jaru e Maringá (Tabela 12). A porcentagem de eclosão das larvas foi superior que 50% em Várzea Grande, Cacoal, Sinop, Guajará-Mirim e Jaru (ordem crescente) e menor que 50% em Porto Velho, Maringá e Rondonópolis (Tabela 12).

Tabela 11. Regiões e municípios do Brasil e seus respectivos números de ovitrampas instaladas, ovitrampas positivas, número total de ovos, porcentagem de eclosão de ovos e número de adultos de *Aedes* spp.

Região	Município	Coleta	Ovitrampas Instaladas	Ovitrampas positivas (%)	Número de Ovos	% Eclosão	Número de Adultos
Norte	Jaru	2011	384	8,6	848	67,2	570
	Cacoal	2010	400	24,7	3894	56,1	2185
	Guajará-Mirim	2010	395	25,1	4871	59,8	2913
	Porto Velho	2009	539	54,5	20789	45,0	9365
Centro-Oeste	Rondonópolis	2011	660	19,4	6681	20,7	1385
	Sinop	2011	310	19,0	1123	59,8	672
	Várzea Grande	2011	194	16,0	987	54,2	535
Sudeste	Governador Valadares	2011	---	---	---	---	30
Sul	Maringá	2012	604	75,8	50.693	27,3	14.222
TOTAL			3486	49,6	89.886	35,0	31.877

Tabela 12. Regiões do Brasil e respectivos números e adultos, espécies, sexagem e razão sexual de *Aedes* spp.

Região	Município	Ano	<i>Ae. aegypti</i>		Razão sexual*	<i>Ae. albopictus</i>		Razão sexual*	Total
			♂	♀		♂	♀		
Norte	Jaru	2011	271	299	0,52	---	---	---	570
	Cacoal	2010	1001	1184	0,54	---	---	---	2185
	Guajará-Mirim	2010	1373	1540	0,53	---	---	---	2913
	Porto Velho	2009	5142	4061	0,44	92	70	0,43	9365
Centro-Oeste	Rondonópolis	2011	626	757	0,55	---	2	1	1385
	Sinop	2011	364	308	0,46	---	---	---	672
	Várzea Grande	2011	263	272	0,51	---	---	---	535
Sul	Maringá	2012	6844	6592	0,49	103	290	0,74	14.222
TOTAL		---	15.884	15.013	0,49	195	362	0,64	---

* Razão sexual: número de fêmeas / número total

5.1.2. Concentração diagnóstica

Das quatro populações coletadas na Colômbia, não foi possível fazer o bioensaio na população de Barcelona. Baseado na concentração diagnóstica (0,0162 ppm), as populações de *A. aegypti* de Armenia e Calarcá foram consideradas resistentes e Montenegro com alteração da suscetibilidade ao temephos (Tabela 14).

No Brasil, as populações consideradas resistentes ao temephos foram Jaru, Guajará-Mirim, Porto Velho, Rondonópolis, Sinop e Várzea Grande. As populações Cacoal e Maringá apresentaram alteração no *status* de suscetibilidade (Tabela 15).

Tabela 13. Status de suscetibilidade de três municípios do estado de Quindío, Colômbia baseados na concentração diagnóstica 0,0162 ppm (calibrada com a cepa Rockefeller) no ano 2011.

Município	% Mortalidade	Status de suscetibilidade
Rockefeller	100,0	Suscetível
Armenia	77,1	Resistente
Calarcá	62,1	Resistente
Montenegro	87,9	Resistente

Tabela 14. Status de suscetibilidade das populações de *A. aegypti* de nove municípios do Brasil baseados na concentração diagnóstica 0,0162 ppm (calibrada com a cepa Rockefeller) no ano 2011.

Região	Localidade	Coleta	% Mortalidade	Status de suscetibilidade
Norte	Jaru	2011	78,0	Resistente
	Cacoal	2010	85,2	Alteração da suscetibilidade
	Guajará-Mirim	2010	77,9	Resistente
	Porto Velho	2009	79,7	Resistente
Centro-Oeste	Rondonópolis	2011	27,8	Resistente
	Sinop	2011	49,6	Resistente
	Várzea Grande	2011	15,4	Resistente
Sul	Maringá	2012	90,41	Alteração da suscetibilidade

5.1.3. Concentrações múltiplas

As populações de *A. aegypti* da Colômbia apresentaram razões de resistência 95 (RR_{95}) maior que três, sendo que a população de Calarcá foi a que apresentou a maior RR_{95} (6,0175) (Tabela 16). Na figura 20, a tangente do ângulo da linha de mortalidade: *slope*, indica que a heterogeneidade das populações foi superior à cepa Rockefeller.

Nas populações brasileiras foram detectadas RR_{95} superior a três, sendo as populações de Várzea Grande e Rondonópolis, com RR_{95} de 14,0 e 10,2 respectivamente, as mais elevadas entre as populações avaliadas (Tabela 17). Os *slopes* das retas indicam que a resposta das populações frente ao temephos foi mais heterogênea com respeito à resposta homogênea da cepa Rockefeller (Figura 21).

Tabela 15. Perfil de suscetibilidade ao temephos em populações colombianas de *A. aegypti*.

Município	G	X^2 , df, $p(\alpha=0.05)$	Slope $\pm SD$	CL ₅₀	CL ₉₅	CL ₉₉	RR ₅₀	RR ₉₅
				(ppm) $\pm SD$	(ppm) $\pm SD$	(ppm) $\pm SD$		
Rockefeller	Fn	4.2	5.0 ± 0.2	0.0027 ± 0.0002	0.0049 ± 0.0004	0.0080 ± 0.001	---	---
Armenia	F1	9.0, 6, 0.82	3.9 ± 0.2	0.0116 ± 0.0011	0.0308 ± 0.0048	0.0463 ± 0.010	3.4	4.9
Calarcá	F1	9.5, 7, 0.78	3.3 ± 0.1	0.0121 ± 0.0011	0.0379 ± 0.0070	0.0609 ± 0.016	3.5	6.0
Montenegro	F1	9.2, 5, 0.90	4,9 ± 0.2	0.0109 ± 0.0010	0.0235 ± 0.0028	0.0323 ± 0.005	3.2	3.7

G= Geração, X^2 = Chi-quadrado, SD = Desvio padrão.

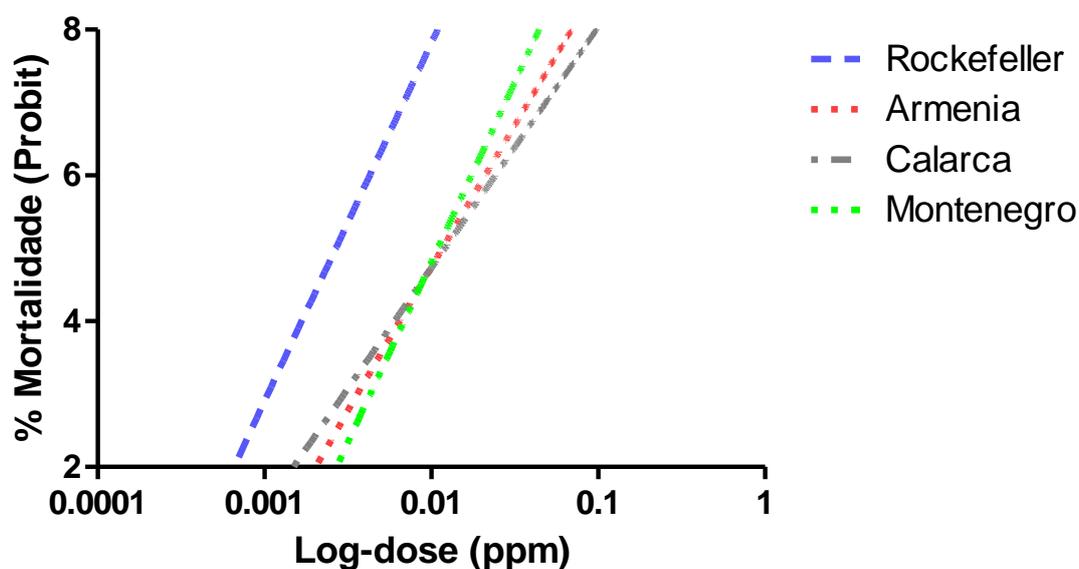


Figura 20. Linhas de mortalidade Log-dose para a geração F1 de três populações de *A. aegypti* da Colômbia resistentes ao temephos. A cepa Rockefeller foi incluída como controle de suscetibilidade.

Tabela 16. Perfil de suscetibilidade ao temephos em populações brasileiras de *A. aegypti*

Região	Município	Ano	G	X ² , df, p(α=0.05)	Slope ±SD	CL ₅₀ (ppm) ±SD	CL ₉₅ (ppm) ±SD	CL ₉₉ (ppm) ±SD	RR ₅₀	RR ₉₅
	Rockefeller		Fn	4.2	5.0 ± 0.2	0.0027 ±0.0002	0.0049 ±0.0004	0.0080 ±0.001	---	---
	Jaru	2011	F1	8.4, 7, 0.70	4.9 ± 0.2	0.0116 ± 0.0007	0.0254 ± 0.0024	0,0351 ± 0.0046	3.3	4.0
	Cacoal	2010	F1	4.3, 8, 0.17	3.3 ± 0.1	0,0082 ± 0.0007	0.0261 ± 0.0031	0,0422 ± 0.0072	2.4	4.1
Norte	Guajará-Mirim	2010	F1	6.6, 7, 0.52	4.9 ± 0.1	0.0118 ± 0.0008	0.0254 ± 0.0023	0.0349 ± 0.0043	3.5	4.0
	Porto Velho	2009	F1	9.3, 8, 0.68	3.1 ± 0.001	0.0085 ± 0.0008	0.0285 ± 0.0031	0.0471 ± 0.0076	2.5	4.5
	Rondonópolis	2011	F1	3.4, 6, 0.24	3.7 ±0.2	0.0230 ± 0.0018	0.0643 ± 0.0170	0.0984 ± 0.0354	6.8	10.2
Centro- Oeste	Sinop	2011	F1	9.3, 6, 0.84	3.7 ± 0.1	0.0133 ± 0.0012	0.0369 ± 0.0057	0,0565 ± 0.0117	3.9	5.9
	Várzea Grande	2011	F1	7.4, 8, 0.50	3.5 ± 0.2	0.0297 ± 0.0026	0.0882 ± 0.0234	0.1384 ± 0.0487	8.7	14.0
Sul	Maringá	2012	F1	8.2, 7, 0.68	3.0 ±0.1	0.0054 ± 0.0009	0.0194 ± 0.0034	0.0331 ± 0.0085	1.6	3.1

G= Geração, X² = Chi-quadrado, SD = Desvio padrão.

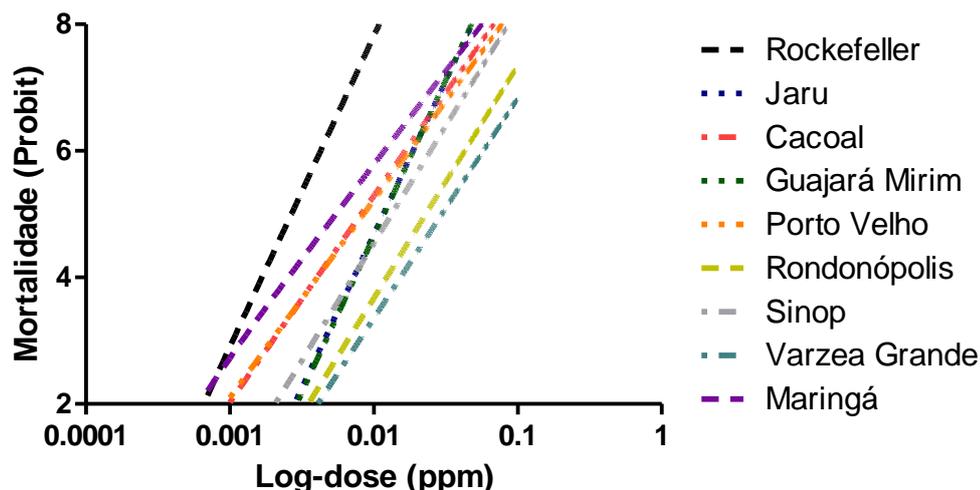


Figura 21. Linhas de mortalidade Log-dose para a F1 de oito populações de *A. aegypti* do Brasil resistentes ao temephos. A cepa Rockefeller foi incluída como controle de suscetibilidade.

5.2. Genotipagem do códon 1016 do fragmento do gene canal de sódio voltagem-dependente

Foram genotipadas 107 indivíduos para as quatro populações colombianas de *A. aegypti* para a mutação Val1016Ile. Destes, 94 % eram homozigotos dominantes (Val/Val); 6 % heterozigotos (Val/Ile) e nenhum genótipo homizogoto recessivo. As frequências genotípicas de Val/Val em todas as populações foram superiores a Val/Ile e Ile/Ile (Tabela 18). As frequências alélicas do alelo 1016Val foram maiores em todas as populações com relação às frequências do alelo 1016Ile (Figura 22). As populações de Armenia, Calarcá e Montenegro estão em equilíbrio de Hardy–Weinberg (Tabela 18).

Para as populações brasileiras foram genotipadas 251 exemplares de *A. aegypti*. Destes, 66% eram homozigotos dominantes (Val/Val); 11% heterozigotos (Val/Ile) e 23% homizogotos recessivos (Ile/Ile) (Tabela 19). As frequências alélicas do alelo 1016Val foram maiores na maioria das populações com relação às frequências do alelo 1016Ile. Exceto nas populações de Jarú e Cacoal (Figura 23). As populações de Jarú, Sinop e Várzea Grande estão em equilíbrio de Hardy–Weinberg (Tabela 19).

Tabela 17. Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente de quatro populações de *A. aegypti* do Estado do Quindío, Colômbia.

Município	n	Frequência Genotípica			χ^2 , df, p($\alpha=0.05$)
		Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile	
Armenia	30	0.97	0.03	0.00	0.009, 1, 0.93
Calarcá	30	0.90	0.10	0.00	0.083, 1, 0.77
Montenegro	30	0.93	0.07	0.00	0.036, 1, 0.85
Barcelona	17	1.00	0.00	0.00	---

χ^2 = Chi-quadrado, df = graus de liberdade.

Tabela 18. Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente de *A. aegypti* de 10 populações do Brasil.

Região	Município	n	Frequência Genotípica			χ^2 , df, p($\alpha=0.05$)
			Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile	
Norte	Jaru	30	0.00	0.17	0.83	0.248, 1, 0.62
	Cacoal	30	0.37	0.27	0.37	6.533, 1, 0.01*
	Guajará-Mirim	30	0.83	0.03	0.13	22.67, 1, 0.001*
	Porto Velho	30	0.60	0.20	0.20	9.025, 1, 0.002*
Centro-Oeste	Rondonópolis	28	0.71	0.04	0.25	23.13, 1, 0.001*
	Sinop	30	0.97	0.03	0.00	0.009, 1, 0.93
	Várzea Grande	30	0.97	0.03	0.00	0.009, 1, 0.93
Sudeste	Governador Valadares	30	0.67	0.13	0.20	13.032, 1, 0.001*
Sul	Maringá	13	1.00	0.00	0.00	---

* p<0.05

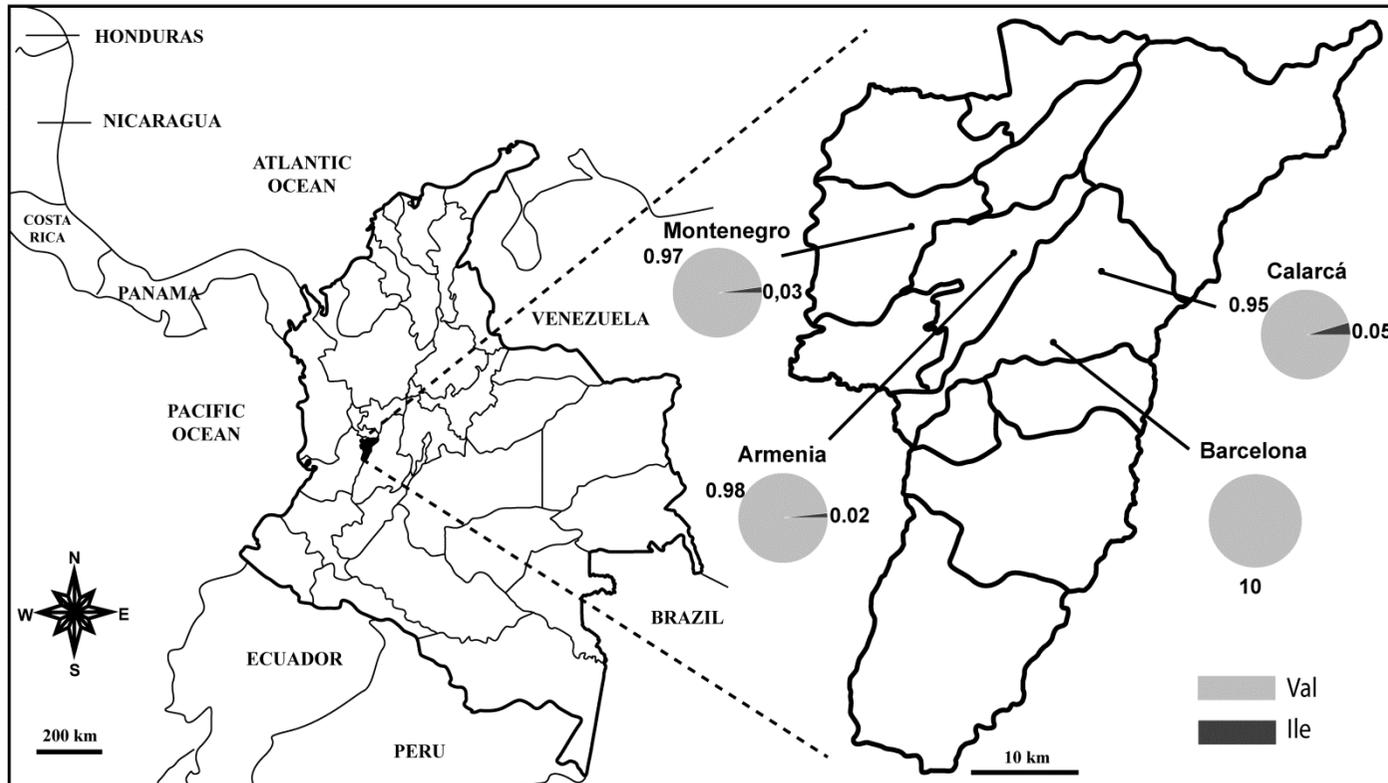


Figura 22. Frequência alélica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente de quatro populações de *A. aegypti* da Colômbia.

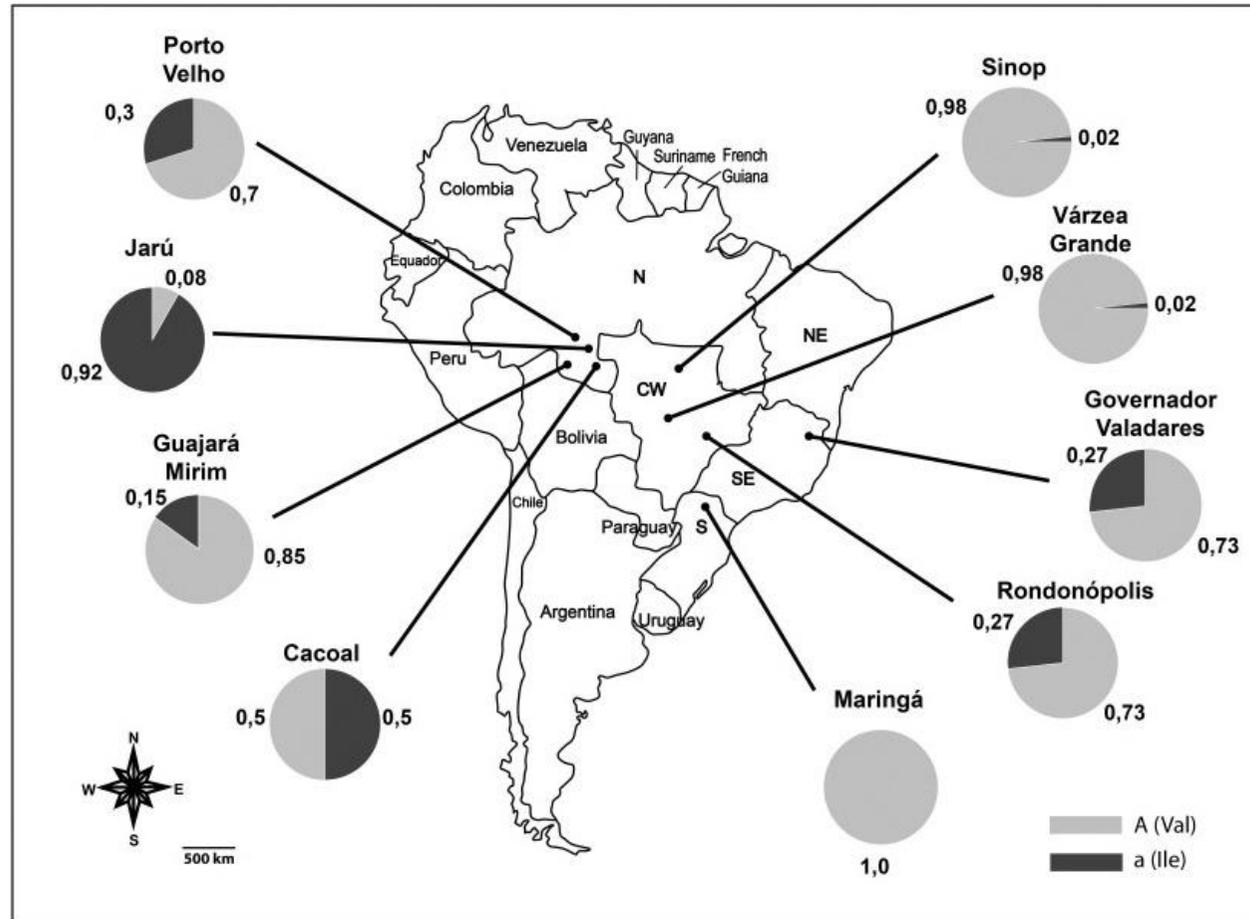


Figura 23. Frequência alélica da mutação Val1016Ile do canal de sódio voltagem-dependente de *A. aegypti* de nove populações do Brasil.

5.3. Diversidade genética - Fragmento do gene mitocondrial ND4

5.3.1. Distribuição e frequência dos haplótipos

Para as populações da Colômbia, a análise do fragmento amplificado do gene *ND4* de 42 indivíduos resultou em 311 pb com a existência de quatro sítios polimórficos e 307 sítios monomórficos. A composição média de nucleotídeos foi de 19,6% para Citosina; 29,4% para Timina; 43,4% para Adenina e 7,6% para Guanina. Foram encontrados três haplótipos denominados H1 (GenBank: KF241755), H2 (GenBank: KF241756) e H3 (GenBank: KF241757) (Tabela 20). Destes haplótipos, o mais frequente foi o haplótipo H2 (48%), seguido pelo H3 (28%) e H1 (24%) (Figura 24). O haplótipo H3 foi exclusivo do município de Montenegro; os haplótipos H1, H2 e H3 estiveram presentes em Barcelona e os haplótipos H1 e H2 nos municípios de Armenia e Calarcá (Tabela 20). Os haplótipos foram distinguidos por três transições: G↔A (sítio 48); T↔C (sítios 144, 249) e uma transversão: A↔T (sítio 90) (Tabela 21). Os haplótipos, quando comparados com os disponíveis para América (Tabela 6, Figura 26), indicaram semelhança com o haplótipo H2, o qual é encontrado no México e na América do Norte (Figura 27).

Com base no método da parcimônia, foi gerada uma rede de três haplótipos, conforme Figura 25. 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. O haplótipo H2, representado por um retângulo, é provavelmente o haplótipo ancestral entre os indivíduos estudados.

Para as populações do Brasil, a análise do fragmento amplificado do gene *ND4* de 77 indivíduos resultou em 353 pb com a existência de 14 sítios polimórficos e 339 sítios monomórficos. A composição média de nucleotídeos foi de 20,6% para Citosina; 27,7% para Timina; 42,6% para Adenina e 9,1% para Guanina. Foram encontrados três haplótipos denominados H4 (GenBank:), H5 (GenBank:) e H6 (GenBank:) (Tabela 22). Destes haplótipos, o mais frequente foi o haplótipo H4 (63%), seguido pelo H6 (32%) e H5 (5%)

(Figura 28). O haplótipo H4 foi exclusivo dos municípios de Jarú, Cacoal, Guajará-Mirim e Porto Velho; o haplótipo H6 exclusivo de Governador Valadares; os haplótipos H4, H5 e H6 estiveram presentes em Maringá e os haplótipos H4 e H6 nos municípios de Rondonópolis, Sinop e Várzea Grande (Tabela 22). Os haplótipos foram distinguidos por 13 transições: G↔A (sítios 44, 122, 167, 215, 224, 284, 335, 338 e 341); T↔C (sítios 74, 89, 206 e 245) e uma transversão: A↔T (sítio 86) (Tabela 23). Os haplótipos quando comparados com os disponíveis para América (Tabela 6, Figura 26) indicaram semelhança com o haplótipo H6, o qual é encontrado no Sudeste do Brasil, Peru, México e na América do Norte (Figura 30).

Com base no método da parcimônia, foi gerada uma rede de três haplótipos, sendo os haplótipos H4 e H6, representados por retângulos, são provavelmente os haplótipos ancestrais entre os indivíduos analisados. Desta forma H4 originou o H5 e, sucessivamente H6 (Figura 29).

Os haplótipos H1, H2 e H3 (H31-33 respectivamente dentro da análise) da Colômbia e H4, H5 e H6 (H34-36 respectivamente dentro da análise) do Brasil, quando comparados com os disponíveis para América (Tabela 6, Figura 26) indicaram semelhança com o haplótipo H6, o qual é encontrado no Sudeste do Brasil, Peru, México e na América do Norte (Figura 31). Tanto os haplótipos colombianos, quanto os brasileiros fazem parte da origem dos demais haplótipos (Figura 31).

Tabela 19. Número de indivíduos observados para cada haplótipo nas amostras de *A. aegypti* das quatro populações da Colômbia.

Município	H1	H2	H3
Armenia	2	10	0
Calarcá	1	9	0
Montenegro	0	0	10
Barcelona	7	1	2
TOTAL	10	20	12

Tabela 20. Sítios variáveis observados nos três haplótipos da Colômbia do gene mitocondrial *ND4* em *A. aegypti*. N indica o número de indivíduos que compartilham cada haplótipo.

Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas				N
	48	90	144	249	
H1	G	A	T	T	10
H2	A	T	C	T	20
H3	A	T	C	C	12

Tabela 21. Número de indivíduos observados para cada haplótipo nas amostras de *A. aegypti* em nove populações do Brasil.

Região	Município	H4	H5	H6
Norte	Jaru	10	0	0
	Cacoal	8	0	0
	Guajará-Mirim	9	0	0
	Porto Velho	10	0	0
Centro-Oeste	Rondonópolis	5	0	5
	Sinop	1	0	8
	Várzea Grande	4	0	3
Sudeste	Governador Valadares	0	0	7
Sul	Maringá	2	4	1
TOTAL		49	4	24

Tabela 22. Sítios variáveis observados nos três haplótipos das populações do Brasil do gene mitocondrial *ND4* em *A. aegypti*. N indica o número de indivíduos que compartilham cada haplótipo.

Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas														N
	44	74	86	89	122	167	206	215	224	245	284	335	338	341	
H4	G	T	A	T	A	A	T	A	G	C	A	A	A	A	49
H5	A	T	T	T	A	A	T	A	G	T	A	A	G	A	4
H6	A	C	T	C	G	G	C	G	A	T	G	G	A	G	24

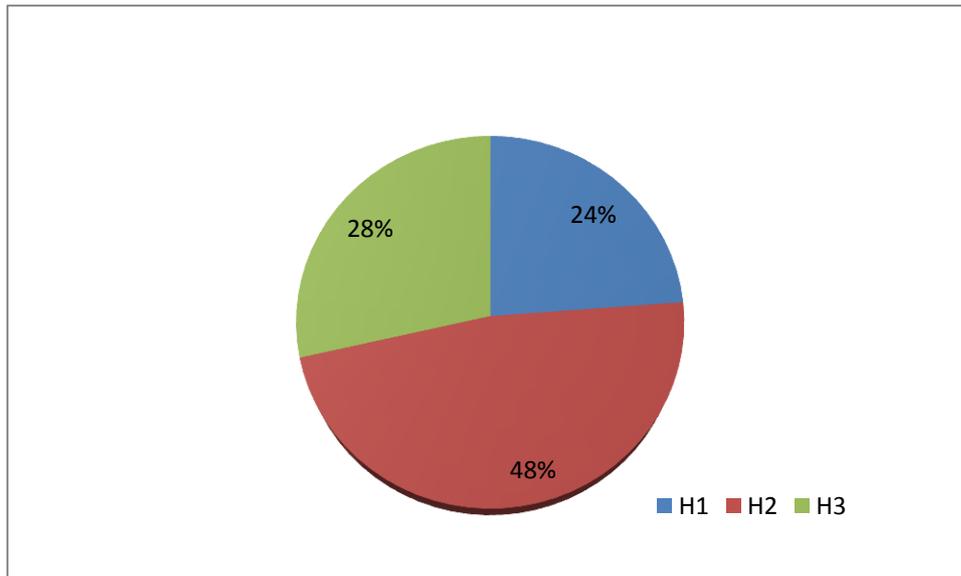


Figura 24. Frequência relativa geral dos três haplótipos de *A. aegypti* na Colômbia.

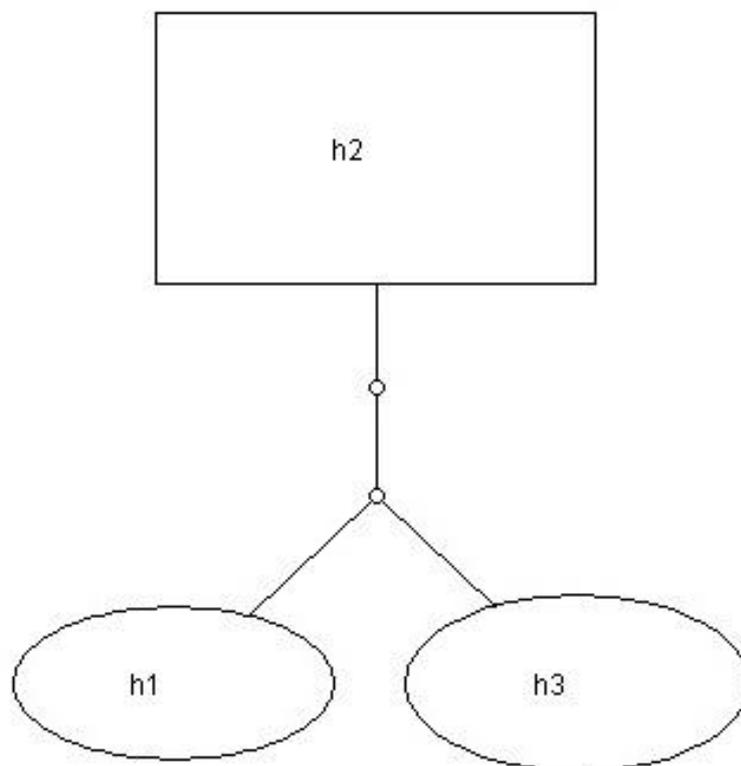


Figura 25. Rede de haplótipos do gene *ND4* de *A. aegypti* para as populações da Colômbia. O retângulo representa o haplótipo ancestral. O tamanho das elipses é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo. Os círculos menores, que ligam os haplótipos identificados, correspondem aos haplótipos não amostrados (*missing haplotypes*) e classificados como intermediários.

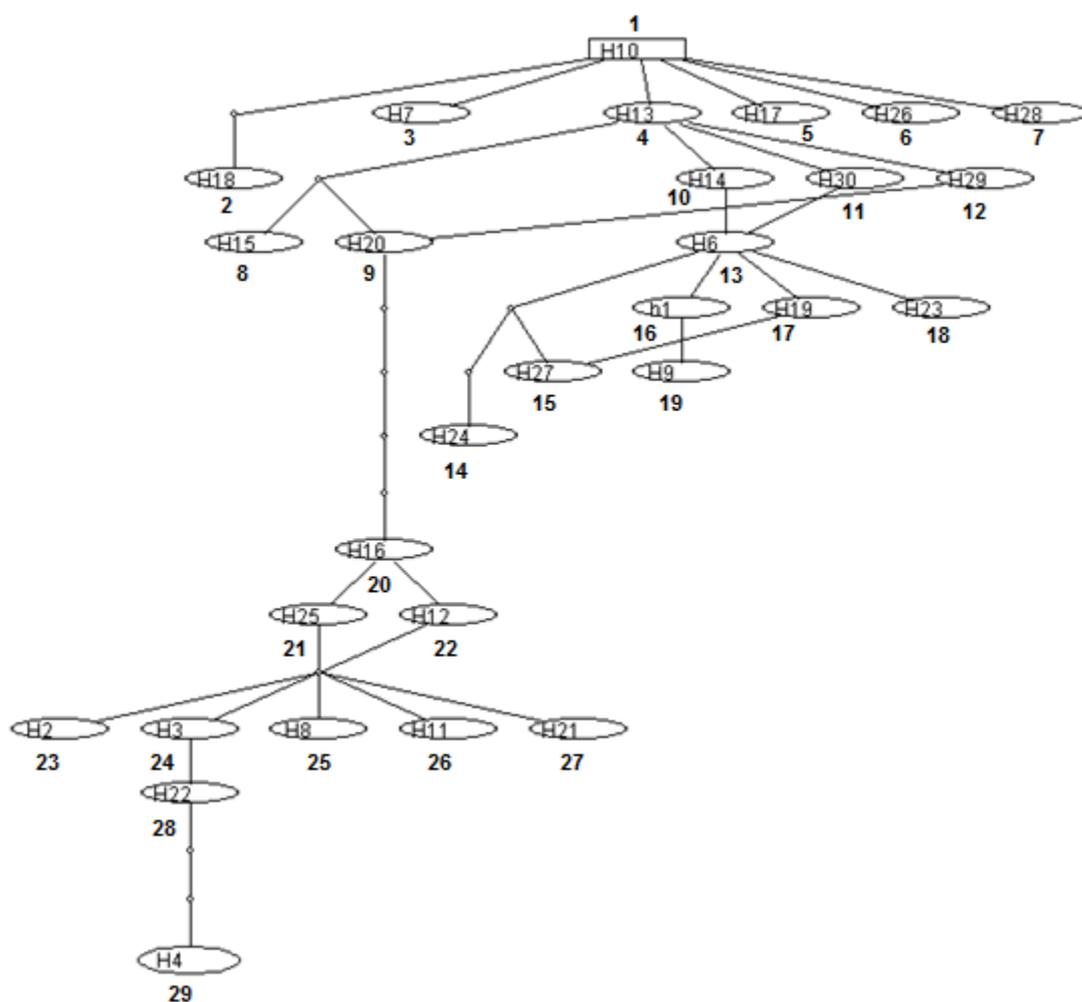


Figura 26. Rede de haplótipos do gene *ND4* de *A. aegypti* para as populações das Américas baseadas nos haplótipos do trabalho de Gonçalves *et al.* (2012). **Para a construção da rede de haplótipos utilizou-se um haplótipo de cada.** O retângulo representa o haplótipo ancestral. O tamanho das elipses 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. **1.** H10 (Amazônia Brasileira (Manaus, Belém, Boa Vista), Sudeste do Brasil, Venezuela, México e América do Norte); **2.** H18 (México e Norte América); **3.** H7 (México e América do Norte); **4.** H13 (Amazônia Brasileira (Belém), Sudeste do Brasil); **5.** H17 (Amazônia Brasileira (Manaus)); **6.** H26 (Amazônia Brasileira (Boa Vista)); **7.** H28 (Amazônia Brasileira (Manaus)); **8.** H15 (Amazônia Brasileira (Boa Vista), Sudeste do Brasil, Venezuela, México e América do Norte); **9.** H20 (Venezuela); **10.** H14 (Amazônia Brasileira (Belém), Venezuela); **11.** H30 (Sudeste do Brasil); **12.** H29 (Sudeste do Brasil); **13.** H6 (Amazônia Brasileira (Belém, Boa Vista e Rio Branco-Porto Velho), Sudeste do Brasil, Peru, México e América do Norte); **14.** H24 (México e América do Norte); **15.** H27 (México e América do Norte); **16.** H1 (México e América do Norte); **17.** H19 (Sudeste do Brasil, México e América do Norte); **18.** H23 (México e América do Norte); **19.** H9 (México e América do Norte); **20.** H16 (Amazônia Brasileira (Manaus), Sudeste do Brasil, México e América do Norte); **21.** H25 (México e América do Norte); **22.** H12 (Amazônia Brasileira (Manaus, Belém e Rio Branco-Porto Velho), Venezuela); **23.** H2 (México e América do Norte); **24.** H3 (México e América do Norte); **25.** H8 (México e América do Norte); **26.** H11 (Amazônia Brasileira (Belém e Rio Branco-Porto Velho); **27.** H21 (México e América do Norte); **28.** H22 (México e América do Norte); **29.** H4 (México e América do Norte).

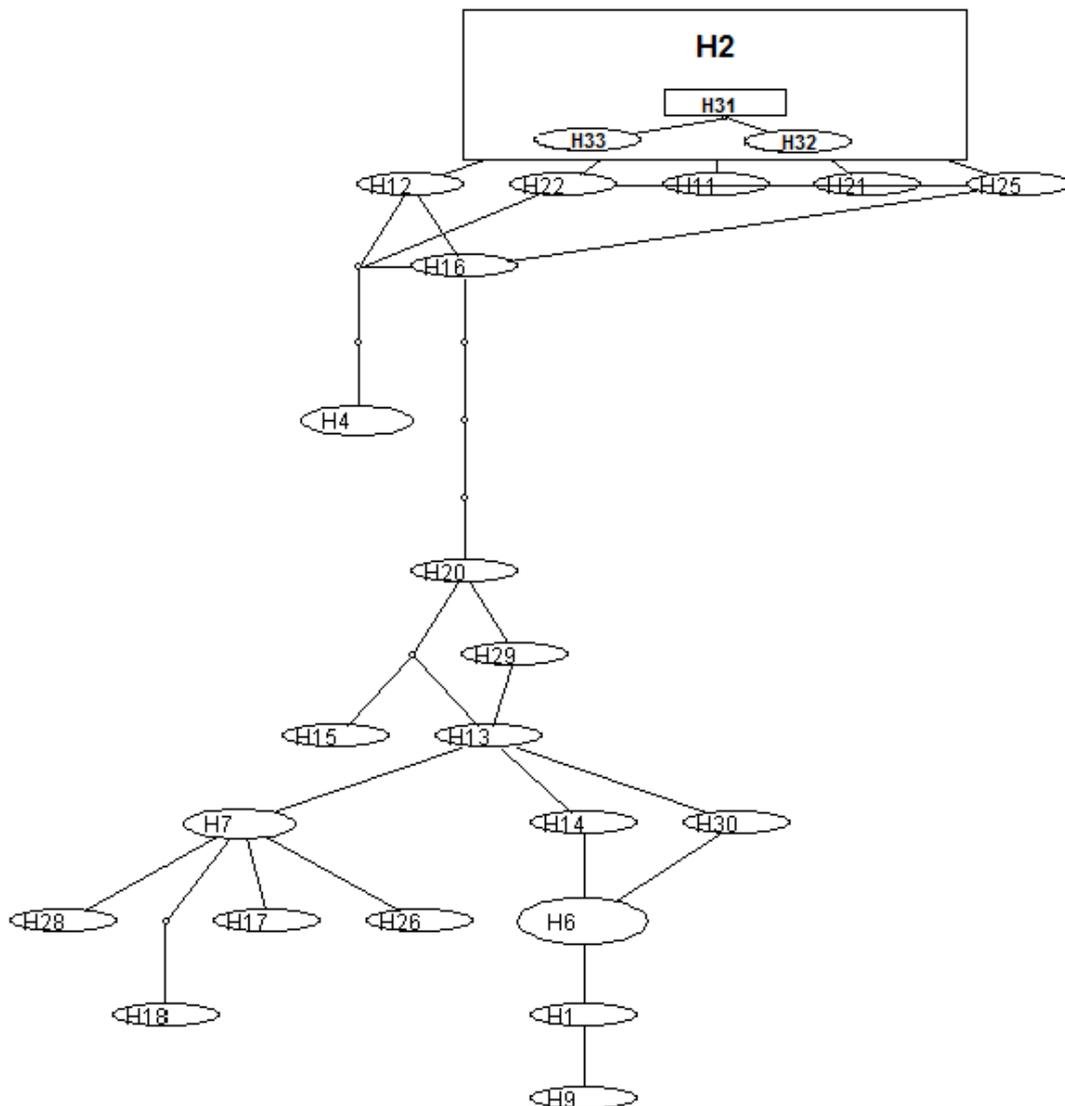


Figura 27. Rede de haplótipos do gene *ND4* de *A. aegypti* para as populações das Américas Gonçalves *et al.* (2012) incluindo os haplótipos da Colômbia H1(H31), H2 (H32) e H3 (H33) dentro da rede de haplótipos). O retângulo representa o haplótipo ancestral. O tamanho das elipses é proporcional ao número 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. **H1** (México e América do Norte); **H2** (México e América do Norte); **H3** (México e América do Norte); **H4** (México e América do Norte); **H6** (Amazônia Brasileira (Belém, Boa Vista e Rio Branco-Porto Velho), Sudeste do Brasil, Peru, México e América do Norte); **H7** (México e América do Norte); **H8** (México e América do Norte); **H9** (México e América do Norte); **H10** (Amazônia Brasileira (Manaus, Belém, Boa Vista), Sudeste do Brasil, Venezuela, México e América do Norte); **H11** (Amazônia Brasileira (Belém e Rio Branco-Porto Velho)); **H12** (Amazônia Brasileira (Manaus, Belém e Rio Branco-Porto Velho), Venezuela); **H13** (Amazônia Brasileira (Belém), Sudeste do Brasil); **H14** (Amazônia Brasileira (Belém), Venezuela); **H15** (Amazônia Brasileira (Boa Vista), Sudeste do Brasil, Venezuela, México e América do Norte); **H16** (Amazônia Brasileira (Manaus), Sudeste do Brasil, México e América do Norte); **H17** (Amazônia Brasileira (Manaus)); **H18** (México e América do Norte); **H19** (Sudeste do Brasil, México e América do Norte); **H20** (Venezuela); **H21** (México e América do Norte); **H22** (México e América do Norte); **H23** (México e América do Norte); **H24** (México e América do Norte); **H25** (México e América do Norte); **H26** (Amazônia Brasileira (Boa Vista)); **H27** (México e América do Norte); **H28** (Amazônia Brasileira (Manaus)); **H29** (Sudeste do Brasil); **H30** (Sudeste do Brasil); **H31-33** presente estudo.

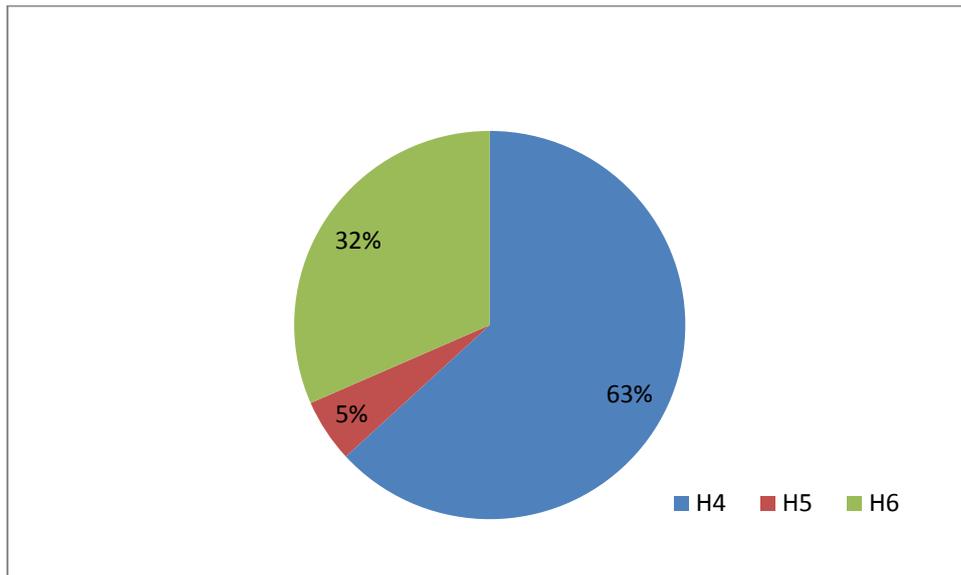


Figura 28. Frequência relativa geral dos três haplótipos de *A. aegypti* no Brasil.

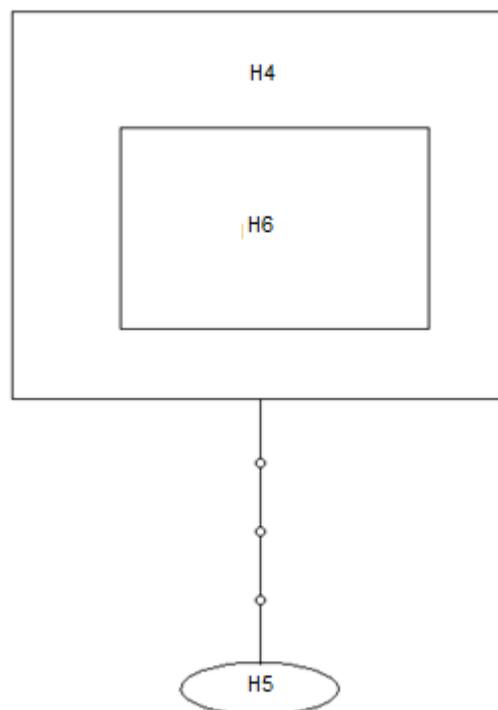


Figura 29. Rede de haplótipos do gene *ND4* de *A. aegypti* para as populações do Brasil. Os retângulos representam os haplótipos ancestrais. O tamanho das elipses é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo. Os círculos menores, que ligam os haplótipos identificados, correspondem aos haplótipos não amostrados (*missing haplotypes*) e classificados como intermediários.

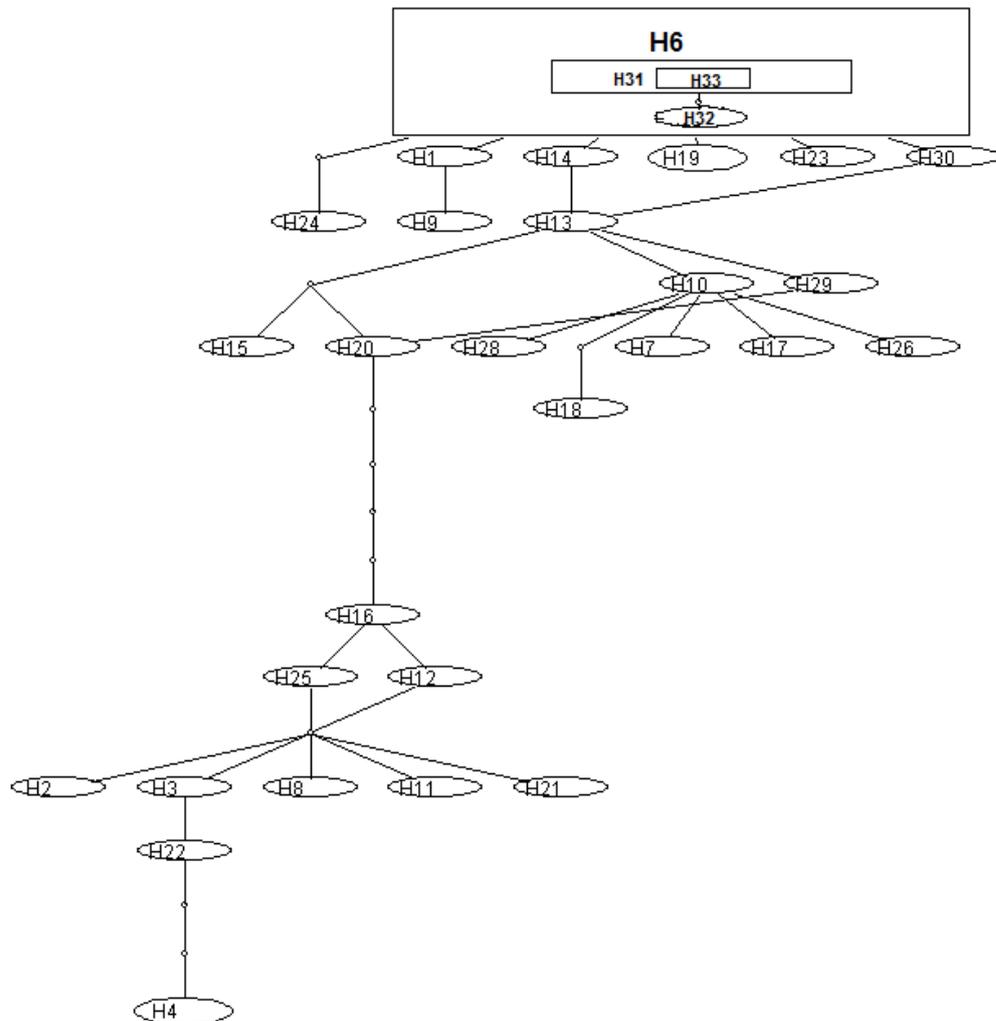


Figura 30. Rede de haplótipos do gene *ND4* de *A. aegypti* para as populações das Américas Gonçalves *et al.* (2012) incluindo os haplótipos do Brasil H4 (H31), H5 (H32) e H6 (H33). O retângulo representa o haplótipo ancestral. O tamanho das elipses é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo. Os círculos menores, que ligam os haplótipos identificados, correspondem aos haplótipos não amostrados (*missing haplotypes*) e classificados como intermediários. **H1** (México e América do Norte); **H2** (México e América do Norte); **H3** (México e América do Norte); **H4** (México e América do Norte); **H6** (Amazônia Brasileira (Belém, Boa Vista e Rio Branco-Porto Velho), Sudeste do Brasil, Peru, México e América do Norte); **H7** (México e América do Norte); **H8** (México e América do Norte); **H9** (México e América do Norte); **H10** (Amazônia Brasileira (Manaus, Belém, Boa Vista), Sudeste do Brasil, Venezuela, México e América do Norte); **H11** (Amazônia Brasileira (Belém e Rio Branco-Porto Velho)); **H12** (Amazônia Brasileira (Manaus, Belém e Rio Branco-Porto Velho), Venezuela); **H13** (Amazônia Brasileira (Belém), Sudeste do Brasil); **H14** (Amazônia Brasileira (Belém), Venezuela); **H15** (Amazônia Brasileira (Boa Vista), Sudeste do Brasil, Venezuela, México e América do Norte); **H16** (Amazônia Brasileira (Manaus), Sudeste do Brasil, México e América do Norte); **H17** (Amazônia Brasileira (Manaus)); **H18** (México e América do Norte); **H19** (Sudeste do Brasil, México e América do Norte); **H20** (Venezuela); **H21** (México e América do Norte); **H22** (México e América do Norte); **H23** (México e América do Norte); **H24** (México e América do Norte); **H25** (México e América do Norte); **H26** (Amazônia Brasileira (Boa Vista)); **H27** (México e América do Norte); **H28** (Amazônia Brasileira (Manaus)); **H29** (Sudeste do Brasil); **H30** (Sudeste do Brasil); **H31-33** presente estudo.

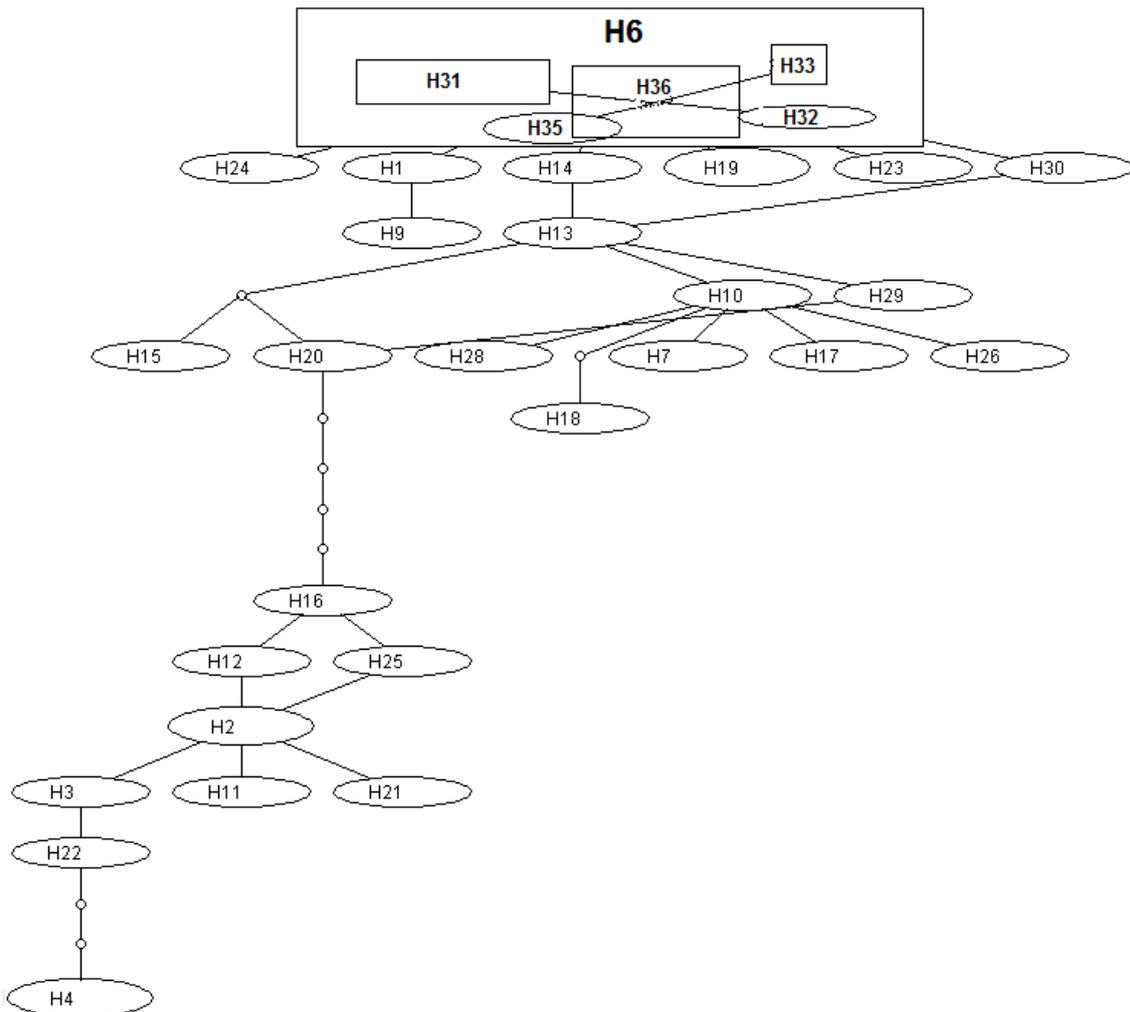


Figura 31. Rede de haplótipos do gene *ND4* de *A. aegypti* para as populações das Américas Gonçalves *et al.* (2012) incluindo os haplótipos da Colômbia H1 (H31), H2 (H32) e H3 (H33) e do Brasil H4 (H34), H5 (H35) e H6 (H36). O retângulo representa o haplótipo ancestral. O tamanho das elipses é proporcional 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. **H1** (México e América do Norte); **H2** (México e América do Norte); **H3** (México e América do Norte); **H4** (México e América do Norte); **H6** (Amazônia Brasileira (Belém, Boa Vista e Rio Branco-Porto Velho), Sudeste do Brasil, Peru, México e América do Norte); **H7** (México e América do Norte); **H8** (México e América do Norte); **H9** (México e América do Norte); **H10** (Amazônia Brasileira (Manaus, Belém, Boa Vista), Sudeste do Brasil, Venezuela, México e América do Norte); **H11** (Amazônia Brasileira (Belém e Rio Branco-Porto Velho)); **H12** (Amazônia Brasileira (Manaus, Belém e Rio Branco-Porto Velho), Venezuela); **H13** (Amazônia Brasileira (Belém), Sudeste do Brasil); **H14** (Amazônia Brasileira (Belém), Venezuela); **H15** (Amazônia Brasileira (Boa Vista), Sudeste do Brasil, Venezuela, México e América do Norte); **H16** (Amazônia Brasileira (Manaus), Sudeste do Brasil, México e América do Norte); **H17** (Amazônia Brasileira (Manaus)); **H18** (México e América do Norte); **H19** (Sudeste do Brasil, México e América do Norte); **H20** (Venezuela); **H21** (México e América do Norte); **H22** (México e América do Norte); **H23** (México e América do Norte); **H24** (México e América do Norte); **H25** (México e América do Norte); **H26** (Amazônia Brasileira (Boa Vista)); **H27** (México e América do Norte); **H28** (Amazônia Brasileira (Manaus)); **H29** (Sudeste do Brasil); **H30** (Sudeste do Brasil); **H31-36** presente estudo.

5.3.2. Diversidade genética e testes de neutralidade

A diversidade haplotípica (Hd) encontrada para as populações da Colômbia foi de $Hd = 0,67 \pm 0,036$, diversidade nucleotídica de $\pi = 0,0058 \pm 0,00022$ e o número médio de diferenças nucleotídicas de $k = 1,81$ (Tabela 24). Os resultados das análises para cada população encontram-se na Tabela 24. Os testes de seletividade neutra aplicados não foram significativos quando reunidas e analisadas as populações, nem quando analisadas separadamente ($p > 0,05$), as populações estão de acordo com as premissas do modelo neutro de seleção (Tabela 24).

As populações do Brasil apresentaram uma diversidade haplotípica de $Hd = 0,53 \pm 0,045$, uma diversidade nucleotídica de $\pi = 0,017 \pm 0,00138, 00022$ e o número médio de diferenças nucleotídicas de $k = 5,85$. Os resultados das análises para cada população encontram-se na Tabela 25. Os testes de seletividade neutra aplicados não foram significativos quando reunidas e analisadas as populações, nem quando analisadas separadamente ($p > 0,05$), as populações estão de acordo com as premissas do modelo neutro de seleção (Tabela 25).

Tabela 23. Diversidade genética e testes de neutralidade calculados para quatro populações de *A. aegypti* da Colômbia.

Município	K	Hd	π	Testes de seletividade neutra		p-valor
				Teste D de Tajima	Teste F_s de Fu	
Total	1,81	0,67 $\pm 0,036$	0,0058 \pm 0,00022	2,24	2,58	
Armênia	0,91	0,91 \pm 0,147	0,00292 \pm 0,00142	0,91	0,91	
Barcelona	1,22	0,51 \pm 0,164	0,00393 \pm 0,00140	-0,52	0,87	$P > 0,05$
Calarcá	0,60	0,20 \pm 0,154	0,00193 \pm 0,00149		1,22	
Montenegro	0,00	0,00 \pm 0,000	0,0000 \pm 0,00000	NC	NC	

K = número médio de diferenças nucleotídicas; Hd = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica, NC = não calculado.

Tabela 24. Diversidade genética e testes de neutralidade calculados para nove populações de *A. aegypti* do Brasil.

Município	K	Hd	π	Testes de seletividade neutra		p-valor
				Teste D de Tajima	Teste Fs de Fu	
Total	5,85	0,53 ± 0,045	0,017 ± 0,00138	2,98	11,09	
Jaru	0,00	0,00±0,000	0,0000±0,00000	NC	NC	
Cacoal	0,00	0,00±0,000	0,0000±0,00000	NC	NC	
Guajará-Mirim	0,00	0,00±0,000	0,0000±0,00000	NC	NC	
Porto Velho	0,20	0,20±0,154	0,0006±0,00044	-1,11	-0,34	P
Rondonópolis	7,22	0,56±0,075	0,0205±0,00274	2,60	9.52	>0,05
Sinop	2,89	0,22±0,166	0,0006±0,00044	-1,89	4,97	
Várzea Grande	7.33	0,67±0,160	0,0006±0,00044	2,10	4,69	
Governador Valadares	0,00	0,00±0,000	0,0000±0,00000	NC	NC	
Maringá	4.86	0,67±0,160	0,0138±0,00560	-0,82	3,44	

K = número médio de diferenças nucleotídicas; **Hd** = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica, NC= não calculado.

5.3.3. Análise da variância molecular (AMOVA) e estimativa de fluxo gênico

A análise da variância molecular (AMOVA) para as populações da Colômbia indicaram maior variação (58,39%) entre as populações, enquanto 41,61% da variação ocorreram dentro das populações sendo a análise significativa ($F_{st} = 0,58$, $P < 0,05$) demonstrando estruturação genética (Tabela 26). A diferenciação genética, representada pelos valores par-a-par de F_{ST} e os valores de Nm (número de migrantes por geração), referentes às quatro populações de *A. aegypti* são apresentados na Tabela 27.

Após a correção de Bonferroni, valores significativos de F_{ST} ($P < 0,0083$) foram verificados para todas as comparações, indicando que as populações geneticamente estruturadas são Armênia–Montenegro, Barcelona–Montenegro, Barcelona–Calarcá e Calarcá–Montenegro, populações que apresentaram distâncias geográficas maiores a 11 km (Tabela 27). O coeficiente de correlação do teste de Mantel para a hipótese de isolamento por distância revelou a existência de correlação entre a distância genética (F_{ST}) e distância geográfica (Km) ($R^2 = 0,7671$; $P < 0,05$) (Figura 32). O dendrograma

baseado no método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-Joining*) para demonstrar a relação genética existente entre os três haplótipos encontrados (Figura 33) evidenciou dois agrupamentos, o grupo I com os haplótipos H2 e H3 os mais frequentes, 48% e 28% respectivamente (Figura 24), e o grupo II o haplótipo H1, o menos frequente 24% (Figura 24).

O dendrograma que envolveu as quatro populações usando os valores de F_{ST} e o método de *Neighbor-Joining* (Figura 34) evidenciou três agrupamentos: o grupo I incluiu os municípios que apresentavam o haplótipo H1 (Armenia, Calarcá e Barcelona); o grupo II, os municípios que tinham o H3 (Barcelona e Montenegro); e o grupo III, os municípios que apresentaram o haplótipo H2 (Armenia, Barcelona e Calarcá).

A análise da variância molecular (AMOVA) feito para as populações do Brasil mostraram que a maior variação (61,51%) ocorreu entre as populações, enquanto 38,49% da variação ocorreram dentro das populações, sendo a análise significativa ($F_{st} = 0,61$, $P < 0,05$) indicando estruturação genética (Tabela 28). A diferenciação genética, representada pelos valores par-a-par de F_{ST} e os valores de Nm (número de migrantes por geração), referentes às nove populações de *A. aegypti* são elencados na Tabela 29. Após a correção de Bonferroni, valores significativos de F_{ST} ($P < 0,0014$) foram verificados para todas as comparações, indicando que as populações geneticamente estruturadas são Cacoal–Maringá, Cacoal–Governador Valadares, Cacoal–Sinop, Guajará-Mirim–Governador Valadares, Guajará-Mirim–Sinop, Jaru–Governador Valadares, Jaru–Sinop, Maringá–Governador Valadares, Maringá–Porto Velho, Governador Valadares–Porto Velho e Porto Velho–Sinop populações que apresentaram distâncias geográficas superiores a 649 km (Tabela 29).

O coeficiente de correlação do teste de Mantel para a hipótese de isolamento por distância revelou a existência de correlação entre a distância genética (F_{ST}) e distância geográfica (Km) ($R^2 = 0,4406$; $P < 0,05$) (Figura 35). O dendrograma baseado no método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-Joining*) para demonstrar a relação genética existente entre os três haplótipos encontrados (Figura 36) mostrou dois agrupamentos, sendo que o grupo I

incluiu os haplótipos H1 e H2 onde esteve presente o haplótipo mais frequente (H1=63%) (Figura 28), e o grupo II somente o haplótipo H3 (Figura 28). O dendrograma que envolveu as nove populações usando os valores de F_{ST} e o método de *Neighbor-Joining* (Figura 37) indicou três agrupamentos, o grupo I incluiu os locais que apresentavam o haplótipo H1 (Jaru, Maringá, Porto Velho, Rondonópolis, Cacoal, Sinop, Várzea Grande e Guajará-Mirim), o grupo II os estados que tinham o H2 (Maringá) e o grupo III os estados que apresentaram o haplótipo H3 (Rondonópolis, Várzea Grande, Sinop, Maringá e Governador Valadares).

Tabela 25. Análise da variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de *A. aegypti* da Colômbia.

Tipo de variação	GL	Varição (%)	Índice de fixação	p-valor
Entre populações	3	58,39	$F_{ST} = 0,58$	$P < 0,05$
Dentro das populações	38	41,61		
Total	41			

Tabela 26. Valores de F_{ST} par-a-par (acima da diagonal) e número efetivo de migrantes (Nm) (abaixo da diagonal) em populações de *A. aegypti* da Colômbia. Os valores de p que estão com asterisco apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0083$), após correção de Bonferroni.

População	Armenia	Barcelona	Calarcá	Montenegro
Armenia	-	0.320	-0.068	0.809*
Barcelona	1.064 (10,37)	-	0.459*	0.542*
Calarcá	Inf (6,10)	0.590 (11,12)	-	0.896*
Montenegro	0.118 (11,09)	0.422 (11,33)	0.058 (16,99)	-

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

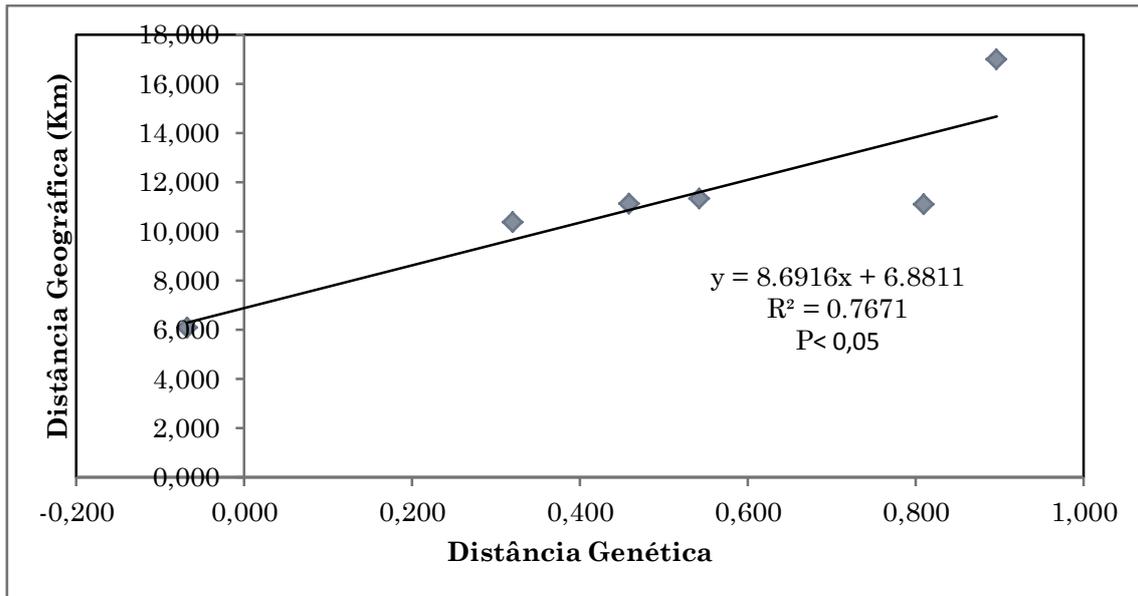


Figura 32. Correlação entre as distancias genética e geográfica utilizando o teste de Mantel das quatro populações da Colômbia.

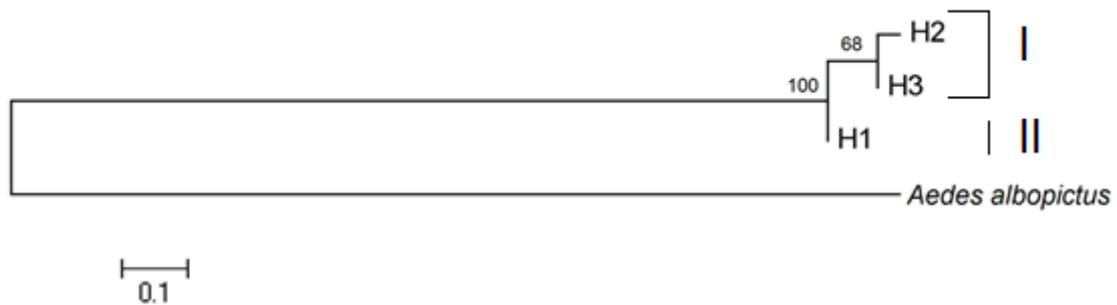


Figura 33. Dendrograma observado entre os três haplótipos de *A. aegypti* para as populações da Colômbia utilizando o método de *Neighbor-Joining*, seguindo o modelo de *Jukes-Cantor*. Os valores de *bootstrap* encontram-se nos ramos.

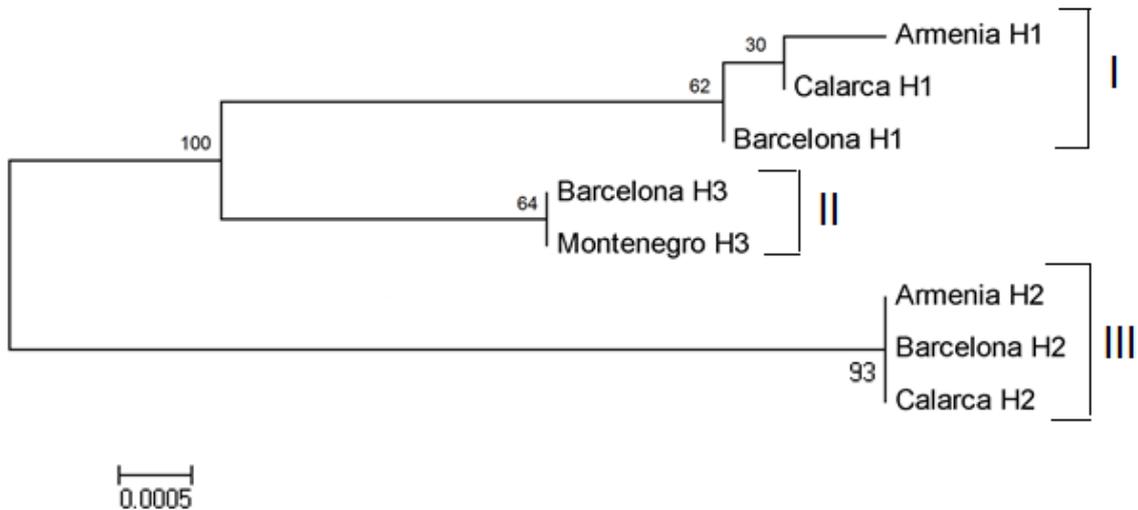


Figura 34. Dendrograma baseado nos valores par-a-par de F_{ST} das quatro populações de *A. aegypti* da Colômbia usando o método *Neighbor-Joining* seguindo o modelo de *Jukes-Cantor*. Os valores de *bootstrap* encontram-se nos ramos.

Tabela 27. Análise da variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de *A. aegypti* do Brasil.

Tipo de variação	GL	Varição (%)	Índice de fixação	p-valor
Entre populações	8	61,51	$F_{ST} = 0,61$	$P < 0,05$
Dentro das populações	68	38,49		
Total	76			

Tabela 28. Valores de F_{ST} par-a-par (acima da diagonal) e número efetivo de migrantes (Nm) (abaixo da diagonal) em populações de *A. aegypti* do Brasil. Os valores de p que estão com asterisco apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0014$), após correção de Bonferroni.

População	CL	GM	JAR	MAR	GV	PV	RON	SIN	VG
CL	-	0.000	0.000	0.440*	1.000*	-0.024	0.407	0.867*	0.360
GM	Inf (429,61)	-	0.000	0.463	1.000*	-0.011	0.427	0.875*	0.384
JAR	Inf (155.34)	Inf (317.54)	-	0.484	1.000*	-0.000	0.444	0.882*	0.405
MAR	0.636 (1703.00)	0.579 (1978.21)	0.532 (1819.10)	-	0.757*	0.448*	0.135	0.596	0.077
GV	0.000 (2247.78)	0.000 (2658.85)	0.000 (2400.28)	0.160 (1151.01)	-	0.991*	0.386	-0.031	0.500
PV	Inf (394.12)	Inf (294.3)	Inf (244.85)	0.615 (2063.31)	0.005 (2615.21)	-	0.429	0.872*	0.385
RON	0.727 (946.37)	0.672 (1295.27)	0.625 (1080.73)	3.210 (822.43)	0.795 (1394.6)	0.665 (1308.76)	-	0.215	-0.126
SIN	0.076 (649.94)	0.071 (1070.21)	0.067 (784.20)	0.339 (1332.45)	Inf (1653.56)	0.074 (977.84)	1.826 (516.72)	-	0.307
VG	0.889 (749.47)	0.802 (1112.99)	0.733 (901.92)	6.020 (966.08)	0.500 (1558.53)	0.798 (1140.09)	Inf (191.27)	1.129 (425.64)	-

Inf. = infinito, distância geográfica em parêntesis (Km). CL= Cacoal; GM= Guajará-Mirim; JAR= Jaru; MAR= Maringá; GV= Governador Valadares; PV= Porto Velho; RON= Rondonópolis; SIN= Sinop; VG= Várzea Grande.

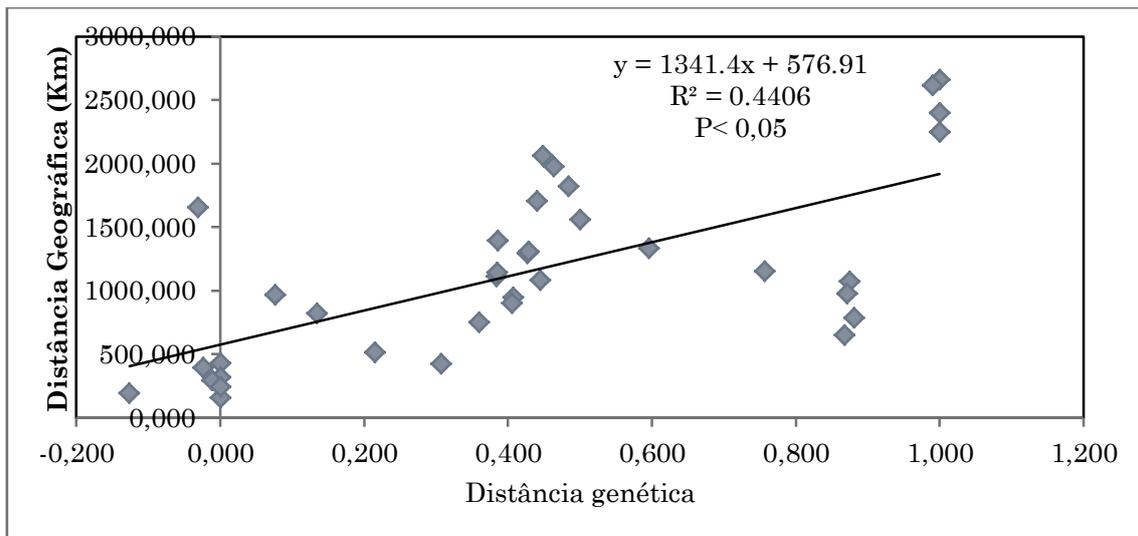


Figura 35. Correlação entre as distâncias genética e geográfica utilizando o teste de Mantel de nove populações do Brasil.

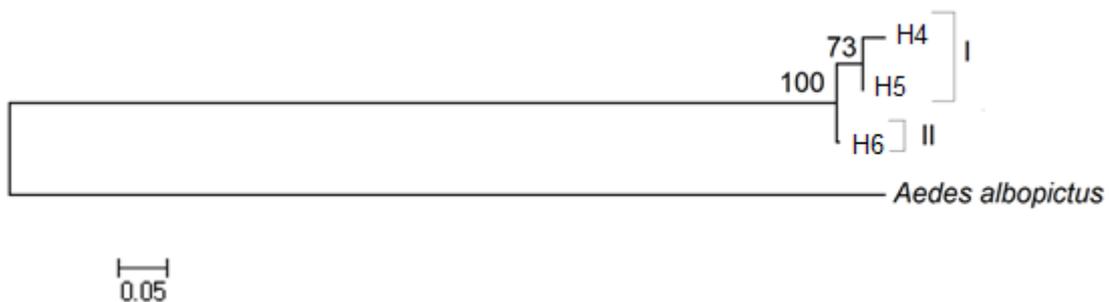


Figura 36. Dendrograma observado entre os três haplótipos de *A. aegypti* para as populações do Brasil utilizando o método de *Neighbor-Joining*, seguindo o modelo de *Jukes-Cantor*. Os valores de *bootstrap* encontram-se nos ramos.

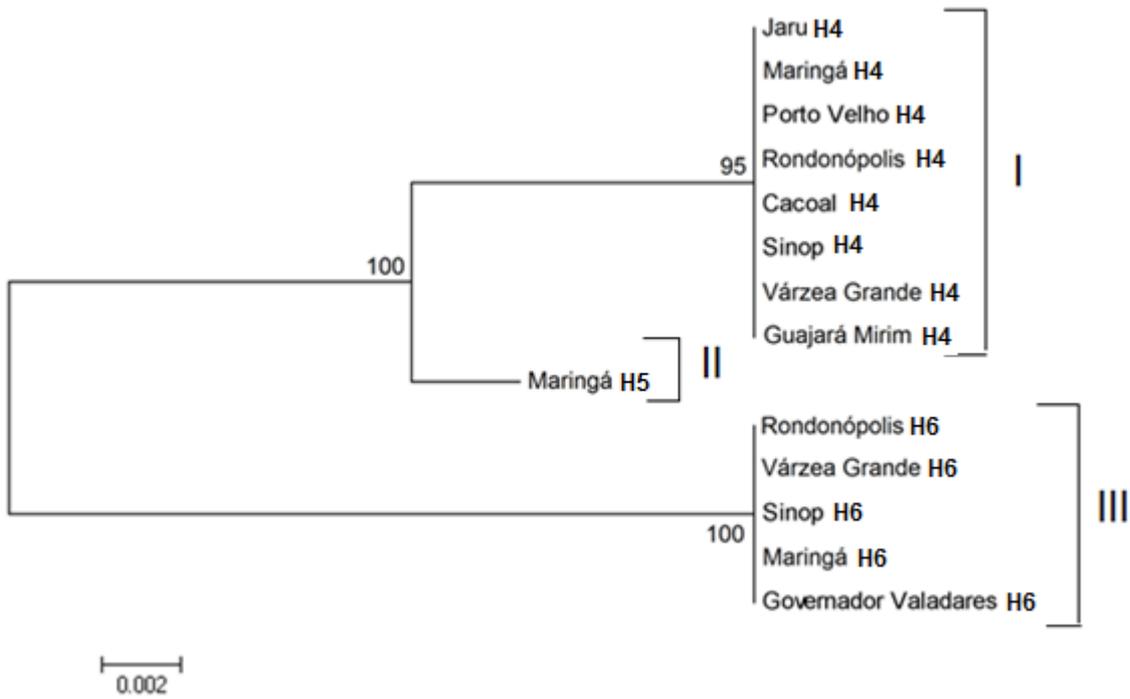


Figura 37. Dendrograma baseado nos valores par-a-par de F_{ST} de nove populações de *A. aegypti* do Brasil usando o método *Neighbor-Joining* seguindo o modelo de *Jukes-Cantor*. Os valores de *bootstrap* encontram-se nos ramos.

6. DISCUSSÃO

Os inseticidas apresentam papel relevante nos programas de controle do vetor *A. aegypti*. No entanto, o uso continuado destes inseticidas tem favorecido a seleção de populações resistentes, tal como é relatado para o Brasil (Beserra *et al.* 2007), Cuba (Rodríguez *et al.* 2012), Venezuela (Álvarez *et al.* 2006), Caribe (Rawlins & Ragoonansingh 1990), Peru (Vargas *et al.* 2006), Bolívia (Schofield *et al.* 1984) e El Salvador (Bisset *et al.* 2009), os quais têm desenvolvido diferentes níveis de resistência aos inseticidas (Mazzarri & Georghiou 1995, Rawlins 1998).

Os resultados obtidos baseados na concentração diagnóstica indicou resistência ao organofosforado na maioria das populações avaliadas da Colômbia. Apesar de ser o primeiro registro para o Estado de Quindío, já se tem relatos de resistência ao inseticida em outras localidades da Colômbia, por exemplo, nos Estados de Valle del Cauca, Antioquia, Atlántico, Cundinamarca, Santander, Caquetá, Meta, Guaviare, Sucre, Huila, Cauca e Nariño (Anaya *et al.* 2007, Fonseca *et al.* 2007, Maestres *et al.* 2009, Ocampo *et al.* 2011, Salazar *et al.* 2007, Santacoloma *et al.* 2007, Santacoloma *et al.* 2012, Suárez *et al.* 1996).

No programa de controle de vetores colombiano, apesar de não estarem definidos os critérios para a troca de inseticida, as populações avaliadas teriam o *status* de perda da suscetibilidade, sugerindo criação de um monitoramento continuado (Ministerio de Protección Social *et al.* 2011). Uma alternativa para reduzir a pressão de seleção das populações e definir a troca de inseticidas seria utilizar o critério proposto pelo ministério de saúde brasileiro, que recomenda a troca do inseticida temephos por outro de diferente mecanismo de ação para populações que apresentem $RR_{95} \geq 3$ (Ministerio de Saúde Brasileiro 2006). No Brasil, quando a utilização de temephos é interrompida em locais onde a razão de resistência é superior a 10, a resistência diminui apenas gradualmente, atrasando a possibilidade de uma utilização eficiente do temephos durante vários anos (Montella *et al.* 2007).

Os resultados de resistência aos organofosforados na Colômbia estão relacionados a diversos fatores: ao uso do inseticida desde 1970 (Motta-Sanchez *et al.* 1976); às diversas campanhas de controle contra o vetor, como a participação da Colômbia na campanha de erradicação continental do vetor liderada pela OPS (Santacoloma *et al.* 2010); e às diversas epidemias da dengue, como as que aconteceram em 1970 (Boshell *et al.* 1986) e 1980 em quase toda Colômbia (Gonzales *et al.* 2007). Estes fatores têm levado o uso intensivo de inseticidas para diminuir os casos da dengue, porém, selecionado as populações resistentes do vetor.

Nos resultados obtidos para as populações brasileiras baseadas na concentração diagnóstica, indicam resistência em Jarú, Guajará-Mirim, Porto Velho, Rondonópolis, Sinop e Várzea Grande e apenas alteração no *status* de suscetibilidade nas populações Cacoal e Maringá. São vários os trabalhos que mostram o *status* de resistência ao temephos em diferentes estados brasileiros, por exemplo: Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Brasília, Paraíba e Paraná (Macoris *et al.* 1995, 2003, Bento *et al.* 2003, Carvalho *et al.* 2004, Beserra *et al.* 2007, Bona *et al.* 2012).

Das populações brasileiras avaliadas, de acordo com critério proposto pelo Ministério de Saúde Brasileiro (2006) todas as populações avaliadas deveriam trocar o temephos por outro diferente mecanismo de ação já que apresentaram $RR_{95} \geq 3$. Quando a utilização de temephos é interrompida em locais onde a razão de resistência é superior a 10, a resistência diminui apenas gradualmente, atrasando a possibilidade de uma utilização eficiente do temephos durante vários anos (Montella *et al.* 2007).

O sítio-alvo dos inseticidas piretróides e organoclorado (DDT) é o canal sódio voltagem-dependente no sistema nervoso (Liu *et al.* 2000, Scott *et al.* 1990). A resistência a este tipo de inseticidas é conhecida como resistência *Knockdown* ou *kdr* (Braga & Valle 2007). Na Colômbia, resistência ao organoclorado DDT foi detectada pela primeira vez em 1961 (Fonseca-González *et al.* 2010). O uso do DDT para controle de vetores na Colômbia foi interrompida em meados de 1970, e não tem sido utilizado para qualquer inseto no programa de controle de vetores desde 1993 (Ocampo *et al.* 2011).

Apesar do uso de piretróides na Colômbia ser relativamente recente, desde 1990 (Maestre 2012) já existem registros de resistência (Santacoloma *et al.* 2010). Ocampo *et al.* (2011), analisando o *status* de suscetibilidade em 10 populações colombianas encontrou resistência em todas as populações ao DDT, que apresenta o mesmo mecanismo de ação dos piretróides. Embora não tenha sido verificada resistência nas populações colombianas avaliadas neste trabalho, através de bioensaios com adultos, foi encontrada a presença do alelo mutante 1016Ile na maioria das populações, sugerindo que o uso continuado de piretróides está expondo as populações a pressão de seleção, ou indicando que provavelmente a presença do alelo mutante também possa estar associada ao organoclorado DDT utilizado no início da década de 1950 e finais de 1960 (Brown 1986).

No caso do Brasil, já foram detectados casos de resistência aos piretróides em vários municípios (Duque *et al.* 2004, 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). Embora não tenha sido verificada resistência nas populações brasileiras avaliadas neste trabalho, através de bioensaios com adultos, foi encontrada a presença do alelo mutante 1016Ile na maioria das populações, sugerindo que o uso continuado de piretróides está expondo as populações a pressão de seleção.

A detecção da mutação Val1016Ile em populações de campo tem consequências graves para o uso sustentado de piretróides no controle do vetor. Certamente, as populações de *A. aegypti* no campo devem ser continuamente monitoradas para manter ou restaurar a suscetibilidade a piretróides, considerando que existem poucas opções para o controle químico.

Para a elaboração de programas de controle, é necessário o conhecimento dos padrões de dispersão e da diversidade genética do inseto, uma vez que a habilidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética (Hiragi *et al.* 2009). Para compreender a evolução histórica das populações de mosquitos e da epidemiologia da doença é necessário analisar a variação genética dentro e entre as populações (Yan *et al.* 1998). O estudo

da população é essencial para a identificação de possíveis fatores responsáveis pela resistência e adaptação ecológica (Hiragi et al., 2009). Uma aproximação molecular é utilizar o mtDNA, o qual tem sido amplamente utilizado nas últimas três décadas para inferir a variabilidade genética, fluxo gênico e história evolutiva de *A. aegypti* (Bona et al. 2012, Gonçalves et al. 2012, Paupy et al. 2012, Twerdochlib et al. 2012)

As populações do vetor avaliadas tanto da Colômbia apresentaram estruturação genética. Estes resultados são similares aos encontrados no Brasil (Bracco et al. 2007, Lima-Júnior & Scarpassa 2009, Twerdochlib et al. 2012), Bolívia (Paupy et al. 2012), Peru (Costa-da-Silva et al. 2005), Venezuela (Herrera et al. 2006; Urdaneta-Marquez et al. 2008) e México (Gorrochotegui-Escalante et al. 2002). Na Colômbia, a estruturação genética de populações do vetor tem sido avaliada utilizando RAPD (Mejia et al. 2011, Ocampo & Wesson 2004), sendo este o primeiro estudo para o país utilizando mtDNA como marcador molecular.

A estruturação genética das populações colombianas ocorreu entre populações de municípios com distâncias geográficas inferiores a 17 km. Estes resultados são similares aos encontrados por Herrera et al. (2006), onde várias das populações venezuelanas do vetor encontravam-se estruturadas ainda em distâncias geográficas ≤ 15 km, o que sugere um restrito fluxo gênico. Provavelmente as barreiras geográficas relacionadas à localização do Estado do Quindío na cordilheira central têm impedido o fluxo gênico. No entanto, entre as populações avaliadas, existe um fluxo rodoviário intenso devido às atrações turísticas naturais, culturais e científicas oferecidas pelo Estado do Quindío (Gobernación del Quindío 2013, INVIAS 2013), já que o fluxo rodoviário intenso possui correlação entre o fluxo genético em populações de *A. aegypti* e o transporte humano (Costa-da-Silva et al. 2005, Huber et al. 2004).

No caso das populações brasileiras, a estruturação genética ocorreu entre populações de municípios com distâncias geográficas ≥ 649 km. A causa provável da estruturação genética seria as grandes distâncias entre populações. No entanto, entre as populações avaliadas existe um fluxo

rodoviário intenso que esta significativamente correlacionada entre fluxo genético em populações de *A. aegypti* e transporte humano (Huber *et al.* 2004, Costa-da-Silva *et al.* 2005).

Os valores de diversidade genética para as populações da Colômbia ($Hd = 0.67$ e $\pi = 0.036$) e do Brasil ($Hd = 0,53$ e $\pi = 0,017$) foram considerados baixos em relação a outros estudos utilizando *ND4* em *A. aegypti*. Por exemplo, Bracco *et al.* (2007) analisando 36 localidades das Américas, Ásia e África encontraram $Hd = 0.82$ e $\pi = 0.012$; Paduan & Ribolla (2008), analisando cinco estados brasileiros ($Hd = 0.80$ e $\pi = 0.011$). Os valores baixos de diversidade genética sugerem uma redução no tamanho da população que pode ter sofrido um “efeito gargalo de garrafa” recente. Esse efeito na população traduz-se na redução da diversidade genética no nível do *pool* genético original, que pode ter sido provocado pelas campanhas de controle químico de inseticidas que tem como objetivo reduzir o tamanho efetivo da população.

O gene *ND4* apresenta geralmente um alto número de haplótipos (N) e uma diversidade nucleotídica (Π) alta, como encontrado na América Central, no México (N = 25, $\Pi = 0.016$ e 0.022) ou na América do sul, no Brasil (N = 14, $\Pi = 0.020$) (Bracco *et al.* 2007) ou na Venezuela (N = 7, $\Pi = 0.020$) (Herrera *et al.* 2006), enquanto neste estudo foi baixo tanto para as populações da Colômbia (N = 3, $\Pi = 0.006$) como do Brasil (N = 3, $\Pi = 0.017$). Provavelmente estes resultados estejam relacionados a uma forte redução no tamanho populacional causado pelo uso de inseticidas (Herrera *et al.* 2006). No entanto, existem estudos que mostram alta diversidade genética em áreas frequentemente tratadas com inseticidas químicos (Ayres *et al.* 2004, Paupy *et al.* 2000).

Em geral, as populações da Colômbia e do Brasil apresentaram duas linhagens mitocondriais nos quais os haplótipos mais frequentes estiveram no grupo I, que está em concordância com os estudos prévios de Bosio *et al.* (2005), Bracco *et al.* (2007), Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2002), Herrera *et al.* (2006) e Paduan & Ribola (2008).

Os haplótipos obtidos para as populações da Colômbia e do Brasil, quando comparados com os disponíveis para a América indicam relação com as

populações presentes no Sudeste do Brasil, Peru, México e na América do Norte. No entanto, quando analisados independentemente, os resultados indicam para a Colômbia relação com as populações presentes no México e na América do Norte; enquanto para o Brasil, uma relação com as populações presentes no Sudeste do Brasil, Peru, México e na América do Norte. Estas conexões estariam relacionadas à dispersão passiva de *A. aegypti* entre os países, a qual é a causa mais provável de dispersão do vetor no mundo (Bossio *et al.* 2005, Gorrochotegui-Escalante 2002, Gonçalves *et al.* 2012, Huber 2004). No entanto, são necessários mais estudos para corroborar a hipóteses da entrada do vetor na Colômbia, já que os dados correspondem às populações obtidas da região Centro-Oeste do país.

7. CONCLUSÕES

O uso continuado de inseticidas com o mesmo mecanismo de ação como o organofosforado tipo temephos desde 1970 na Colômbia e 1967 no Brasil para o controle das formas imaturas de *A. aegypti* pelos respectivos órgãos de controle de vetores de ambos os países têm favorecido a seleção de populações resistentes. Todas as populações colombianas testadas apresentaram resistência ao larvicida temephos. No caso das populações brasileiras, das oito testadas, seis apresentaram resistência a este larvicida (Jaru, Guajará-Mirim, Porto Velho, Rondonópolis, Sinop e Várzea Grande) e duas, Cacaol e Maringá apenas alteração no status de suscetibilidade. Isto indica a necessidade de um monitoramento constante destas populações e recomenda-se a troca do temephos por um inseticida de diferente mecanismo de ação.

O alelo mutante 1016lle está distribuído nas populações de Armenia, Calarcá e Montenegro na Colômbia e nas populações de Jaru, Cacaol, Guajará-Mirim, Porto Velho, Rondonópolis, Sinop, Várzea Grande e Governador Valadares no Brasil. Na população de Barcelona na Colômbia e Maringá no Brasil não foi verificado o alelo mutante. A presença do alelo mutante indica a necessidade de acompanhamento da frequência de mutações no gene do canal de sódio paralelamente à realização de bioensaios para detecção de suscetibilidade aos piretróides. Estas informações podem auxiliar na eficiência dos programas de controle do vetor. As ações de controle do vetor utilizando piretróides podem ser comprometidas devido à perda de suscetibilidade do vetor a estes inseticidas.

O estudo de diversidade genética usando *ND4* mostrou uma estruturação genética entre algumas populações tanto da Colômbia quanto do Brasil, sendo detectadas três linhagens mitocondriais para cada uma delas, com baixa diversidade genética e baixo fluxo gênico. O baixo fluxo gênico é um provável resultante das medidas de controle do vetor, que estão interrompendo o fluxo gênico entre populações. A comparação com haplótipos de outros estudos

sugerem que a introdução do vetor na Colômbia provavelmente foi através de populações provenientes do México e na América do Norte. No caso das populações do Brasil, a introdução provavelmente foi através da Amazônia brasileira ou Sudeste do Brasil por populações provenientes do Peru, México e/ou América do Norte. No entanto, a análises em conjunto de todos os haplótipos sugerem a introdução para ambos os países pela Amazônia brasileira ou Sudeste do Brasil por populações provenientes do Peru, México e/ou América do Norte.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, L.; A. BRICEÑO & M. OVIEDO.** 2006. Resistencia al Temephos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. *Revista Colombiana de Entomología* 32(2): 172-175.
- ANAYA, Y.; S. COCHERO; G. REY & L. SANTACOLOMA.** 2007. Evaluación de la susceptibilidad a insecticidas en *Aedes aegypti* capturados en Sincelejo. Memorias XIII Congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. *Biomédica* 27 (2): 257.
- ARDILA, A.; J. ESCOBAR & F. BELLO.** 2005. Características de nuevos cultivos celulares derivados de tejidos embrionarios de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biomédica* 25: 66-75.
- AYRES C.; M. MELO-SANTOS; J. PROTA; A. SOLÉ-CAVA & A. FURTADO.** 2004. Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. *Journal American Mosquito Control Association* 20: 350-356.
- BANCO DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA.** Sem ano de publicação. Los puertos marítimos de Colombia en la década de los noventa. Consultado 20 de dezembro de 2012. Disponível em: <http://www.banrep.gov.co/documentos/publicaciones/pdf/puertos-maritimos.pdf>
- BADII, M. H. & V. G. GARZA.** 2007. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. *CULCYT* 4 (18): 9-25.
- BARRETO, M.L. & M.G. Teixeira.** 2008. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Cadernos de Estudos Avançados* 22: 53-72.
- BERTICAT, C; G. BOQUIEN; M. RAYMOND & C. CHEVILLON.** 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* 79:41-47.
- BENTO, J.; M. PEREIRA; R. CARNEIRO, A. KARDEC; S. DA SILVA; I. BRAGA; R. PIMENTEL RAMOS & D. VALLE.** 2003 RESISTANCE OF *AEDES AEGYPTI* TO ORGANOPHOSPHATES IN SEVERAL MUNICIPALITIES IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO AND ESPÍRITO SANTO, BRAZIL. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68(3): 329-333.
- BASS, CH; D. NIKOU; M. DONNELLY; M WILLIAMSON; H. RANSON; A. BALL; J. VONTAS & L. FIELD.** 2007. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malaria Journal* 6:111: 1-11.
- 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.
- BESERRA, E.B.; E.M FREITAS; J.T. SOUZA; C. FERNANDES & K. SANTOS.** 2009. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. *Iheringia, Série Zoológica* 99: 281-285.
- BISSET, JÁ.** 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 54 (3): 202-219.
- BISSET JA, MM RODRÍGUEZ, D FERNÁNDEZ & O. PÉREZ.** 2004. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, 2001-2002. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56(1): 61-66.

- BISSET, J.; S. BLANCO; I. BRAGA; H. COTO; H. MASSUH; A. MONCAYO; M. NATHAN; P. ORELLANO; J. VÁZQUEZ & E. ZERBA.** 2005. Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. Mundo Sano y Red Latinoamericana de control de vectores. 14p.
- BISSET, J.; M. RODRÍGUEZ; J. SAN MARTÍN; J. ROMERO & R. MONTOYA.** 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Revista Panamericana de la Salud Pública* 26(3): 229-234.
- BLACK WC; CF BAER; MF ANTOLIN & NM DUTEAU.** 2001. Population genomics: genome-wide sampling of insect populations. *Annual Review Entomologia* 46:441-469.
- BOLETIM INFORMATIVO DA DENGUE N° 1/2012.** Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/BoletimDengue1_2012.pdf. Acessado em 20 de outubro de 2012.
- BONA, A., PICCOLI, C., LEANDRO, A., KAFKA, R., TWERDOCHILIB, A., NAVARRO-SILVA, M.** 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.
- BORGES, S.** 2001. Importância Epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 99p.
- BOSIO, CH.; L. HARRINGTON; J. JONES; R. SITHIPRASASNA; 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.
- BOSHELL, J.; H. GROOT; M. GACHARNÁ; G. MÁRQUEZ; M. GONZÁLEZ; M. GAITÁN & C. BERLIE.** 1986. Dengue en Colombia. *Biomédica* 6: 101-106.
- 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.; J. LIMA; S. SOARES & D. VALLE.** 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the state of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99:199-203.
- BRAGA IA, JB LIMA, SDA S SOARES & D. VALLE.** 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(2): 199-203.
- BRAGA, I. A. & D. VALLE.** 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia Serviço e Saúde* 16: 279-293.
- BRENGUES, C.; N. HAWKES & F. CHANDRE.** 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 87-94.
- BRITO, L.; G. LINS, T. LIMA-CAMARA, T. BELINATO, A. PEIXOTO, J. BENTO, D. VALLE & A. MARTINS.** 2013. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PLOS one* 8(4).
- BROOKES, A.J.** 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234:177-186.
- BROGDON, W. G & J.C. McALLISTER.** 1998. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases* 4: 605-613.

- BROGDON W.G. & J.C. MCALLISTER.** 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time–mortality determinations in glass bottles. *Journal American Mosquito Control Association* 14:159–164.
- CABEZAS, C.** 2005. Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 22 (3): 212-228.
- CALARCÁ.** 2012. Sitio oficial de Calarcá en Quindío, Colombia. Disponível em: <http://Calarcá-quindio.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mmxx-1-&x=3107923> Consultado dezembro 4 de 2012.
- CARROLL, D; S. TOOVEY & A. GOMPEL.** 2007. Dengue fever and pregnancy – A review and comment. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 5: 183-188.
- CAMARGO MF, AH SANTOS, AW OLIVEIRA, N ABRÃO, RB ALVES & W ISAC.** 1998. Avaliação da ação residual do larvicida Temephós sobre o *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. *Revista De Patologia Tropical* 27(1): 65-70.
- CARVALHO, M.; E. CALDAS; M. YOSHIZAWA; N. DEGALLIER; C. OLIVEIRA & M. KNOX.** 2001. Susceptibilidade do *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal, em 2000. *Informe Epidemiológico do SUS* 10: 41-43.
- CARVALHO, M.; E. CALDAS; N. DEGALLIER; P. RIBEIRO; L. KENUPP; M. YOSHIZAWA; M. KNOX & C. DE OLIVEIRA.** 2004. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephós no Distrito Federal. *Revista de Saúde Pública* 38(5):623-9.
- CASTELLA C, N. CASTELLS-BROOKE, J.B. BERGÉ Y D. PAURON.** 1997. Expression and distribution of voltage-sensitive sodium channels in pyrethroid-resistant *Musca domestica*. *Invertebrate Neuroscience* 3: 41-47.
- CASTRO M; N. QUINTANA & M. QUIÑONES.** 2007. Evaluación de dos Piretroides en el Control del Vector del Dengue en Putumayo, Colombia. *Revista de Salud Pública* 9 (1): 106-116.
- CATÃO, R. C. & R.B. GUIMARÃES.** 2011. Mapeamento da reemergência do dengue no Brasil – 1981/82-2008. *HYGEIA, Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde* 7: 173-185.
- CHEUNG, W. Y.; N.HUBERT & B.S. LAUNDRY.** 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. *PCR Methods and Applications* 3:69-70.
- CLEMENTS, A. N.** 1992. The biology of mosquitoes. Chapman and Hall. London. 509 p.
- CLEMENT, M.; D. POSADA & K. CRANDALL.** 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660.
- 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.
- CROW, J. F.** 1960. Genetics of insecticide resistance: general considerations. *Miscellaneous Publication of the Entomological Society of America* 2: 69-74.
- DA SILVA, A.; I. CUNHA; W. SANTOS; S. LUZ; P. RIBOLLA & F. ABAD-FRANCH.** 2012. Gene flow networks among American *Aedes aegypti* populations. *Evolutionary Application* 5(7): 664-676.
- DAVIES, T.; A. O'REILLY; L. FIELD; B. WALLACE & M. WILLIAMSON.** 2008. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modeling. *Pest Management Science* 64: 1126-1130.
- DAVIDSON, G & A. ZAHAR.** 1973. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. *Bull WHO* 49: 475-483.

DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA-DANE. 2012. Censo general de la nación. Disponível em: http://www.dane.gov.co/#twoj_fragment1-4. Consultado dezembro 4 de 2012.

DONALÍSIO, M. R., GLASSER, C. M. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 5 (3): 259-279.

DUQUE, J.; M. MARTINS; A. ANJOS; E. KUWABARA & M. NAVARRO-SILVA. 2004. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temefos e cipermetrina, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 38: 842-843.

EFFLER, PW; L. PANG; P. KITSUTANI; V. VORNDAM; M. NAKATA; T. AYERS; J. ELM; T. TOM; P. REITER; J. RIGAU-PEREZ; J. HAYES; K. MILLS; M. NAPIER; G. CLARK & D. GUBLER. 2005. for the Hawaii Dengue Outbreak Investigation Team. Dengue Fever, Hawaii, 2001–2002. *Emerging Infectious Diseases* 11:742–749.

EXCOFFIER, L.; G. LAVAL & S. SCHNEIDER. 2009. Arlequin ver. 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*

FAO. 1979. Recommended methods for the detection and measurement of the resistance of agricultural pests to pesticides. *FAO Plant Protection Bull.* 27:29-32.

FARNESI, L.; J. BRITO; J. LINSS; M. PELAO-MACHADO; D. VALLE & G. REZENDE. 2012. Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. *PLOS One* 7(1): 1-9.

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

FERREIRA, M.; C. CAVALCANTI; C. COELHO & S. MESQUITA. 2005. Manifestações neurológicas de dengue. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 63 (2-b): 488-493.

FERREIRA, M.; T. AGUIAR & L. VILARINHO. 2008. Cadeia respiratória mitocondrial. Aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. *Arquivos de Medicina* 22: 49-56.

FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico. Temefós Fersol 1g. Disponível em: <<http://www.fersolna.com.br/fersol/fichas/fispq/temefos1g.pdf>>. Acessado em 21 de junho de 2010.

FONSECA, I. & M. QUINOÑES. 2005. Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. *Revista Colombiana de Entomología*. 31(2): 107-115.

FONSECA, I.; D. BOLAÑOS; W. GÓMEZ & M. QUIÑONES. 2007. Evaluación de la susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti* a insecticidas en el departamento de Antioquia. Memorias XIII Congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. *Biomédica* 27 (2): 176.

FONSECA-GONZÁLEZ I.; M. QUIÑONES; A. LENHART & W. BROGDON. 2010. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Manag Sci* 67: 430–437.

FORATTINI, O.P. 2002. *Culicidologia Médica*. EDUSP, São Paulo, SP. 864p.

GARCÍA GP; AE. FLORES; I. FERNÁNDEZ-SALAS; K. SAAVEDRA-RODRÍGUEZ & 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): e531.

GAST, G.A. 1980. Historia de la fiebre amarilla en Colombia .Historia de los vectores, Instituto nacional de salud, Santafé de Bogotá. 95p.

GEORHIOU, GP. 1986. The magnitude of the resistance problem in pesticide resistance: strategies and tactics for management. Washington, D.C.: National Academy Press. p.14-43.

..... 1990. Overview of insecticide resistance. Pages 18-41. In: M. B. Green, H.M. LeBaron and W. K. Moberg (eds.). Managing resistance to agrochemical from fundamental research to practical strategies. American Chemical Society Series. 421, Washington. DC. 421 p.

GIBBONS, RV & DW VAUGHN. 2002. Dengue: an escalating problema. Clinical review. *BMJ* 321:1563-1566.

GIRALDO, G.; M. PÉREZ; C. MORALES & C. OCAMPO. 2008. Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros de Cali, Colombia. *Biomédica* 28(2):224-33.

GLUBER, D. J. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11 (3): 489-498.

GRAF JF. 1993. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol Today* 9(12): 471–474.

GRATZ, N.G. 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology* 18: 215-227.

GROOTH, H. 1980. The reinvasion of Colombia by *aedes aegypti* aspects to remember. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29: 330-338.

GOBERNACION DEL QUINDIO. Página oficial del departamento del Quindío. Disponible em: <http://www.quindio.gov.co/>. Consultado dezembro 4 de 2012.

GOBIERNO NACIONAL DE LA NACIÓN. 2012. Página oficial de Colombia. Disponible em: www.gobiernoenlinea.gov.co/. Consultado dezembro 4 de 2012.

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.

GONZÁLEZ, R.; F. OBANDO; O. PERAFÁN; M. FIDEL & J. MONTOYA. 2007. Experiencia de un análisis entomológico de criaderos de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en Cali, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 33 (2): 148-156.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N.; C. GOMEZ-MACHORRO; S. LOZANO-FUENTES; I. FERNANDEZ-SALAS; M. MUNOZ; J. FARFAN-ALE; J. GARCIA-REJON; B. BEATY & W. BLACK. 2002. BREEDING STRUCTURE OF *AEDES AEGYPTI* POPULATIONS IN MEXICO VARIES BY REGION. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66(2): 213–222.

GUBLER, DJ. 1989. *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.

HARTHL D. L. 2008. Princípios de genética de populações. 3ª edição. Ribeirão Preto: FUNPEC, 217 pp.

HAMMER, M.F. 1995. A recent common ancestry for human Y chromosomes. *Nature* 378(6555): 376-378.

HAMMON, W. & G. SATHER. 1960. Virological findings in the 1960 hemorrhagic fever epidemic (dengue) in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 13: 629-641.

- HARBACH, R.E & I.J. KITCHING.** 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology* 23: 327–370.
- 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*, 1668: 591-638.
- **& T.M. Howard.** 2007. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae). *European Mosquito Bulletin* 23: 1–66.
- 2009. Mosquito Taxonomic Inventory. <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/users/ralph-harbach>>. (Acesso em 10/2012)
- HARTHL D. L.** 2008. Princípios de genética de populações. 3ª edição. Ribeirão Preto: FUNPEC, 217 pp., 2008.
- HARRIS, A.; S. RAJATILEKA & H. RANSON.** 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83(2): 277–284.
- HAWLEY, W.A.** 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association* (Suppl) 1: 1-39.
- 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* 4: 634-643.
- HEMINGWAY, J. & H. RANSON.** 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology* 45: 371-391.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H.; JENSEN, B.; VULULE, J.; WANG, X.; COLLINS, F.** 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology* 9:491-497.
- HERVE J.** 1983. El modo de acción de los piretroides y el problema de la resistencia a estos compuestos. En: Deltametrina (monografía), ed. Roussel Uclaf; Cap 3, pp67- 107.
- HERRERA, F.; L. URDANETA; 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. SIMÕES; 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.
- HUBER K; LL. LOAN; N. CHANTHA & AB FAILLOUX AB.** 2004. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. *Acta Tropica* 90: 23-29.
- HUNTER JR., M. L. & A. SULZER.** 1996. Genetic diversity. In: Fundamentals of conservation biology, M. L. Hunter Jr. y A. Sulzer (Eds). Blackwell Science, Cambridge, MA. pp.79-103.
- IBGE.** 2012. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/> Consultado dezembro 4 de 2012.
- INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (IRAC).** 2011. Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance. 70 p.

- JAKUBOWSKI, J. & K. KORNFELD.** 1999. A local, high-density, single-nucleotide polymorphism map used to clone *Caenorhabditiselegans* cdf-1. *Genetics* 153: 743–752.
- JUNQUEIRA DA SILVA, J. & J. MENDES.** 2007. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(6): 612-616.
- JULIO, N. B.; M.B. CHIAPPERO; H. J. ROSSI; J.C. DUEÑAS & C.N. GARDENAL.** 2009. Genetic structure of *Aedes aegypti* in the city of Córdoba (Argentina), a recently reinfested área. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 626-631.
- KROEGER, A., LENHART, A., OCHOA, M., VILLEGAS, E., LEVY, M., & N. ALEXANDER.** 2006. Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomized trials. *BMJ* 332:1247-1250.
- KUMAR, S.; K. TAMURA & M. NEI.** 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-16
- LIMA, J; C. PEREIRA; R. SILVA-JR; A. GALARDO; S. SOARES; I. BRAGA; R. RAMOS & D. VALLE.** 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brasil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 329-333.
- LIMA, E; M. OLIVEIRA-FILHO; J. LIMA; A. RAMOS-JÚNIOR; L. CAVALCANTI & R. PONTES.** 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 259-263.
- 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.
- LIMA, E; M. SANTOS; A. DE ARAÚJO; É. GOMES DA SILVA; U. MARIANO DA SILVA; L. NOGUEIRA DE OLIVEIRA; A. SANTANA; C. NOGUEIRA; C. DE PAIVA NETO; M. GOULART, C. WILDING; C. JUNQUEIRA; M. DE MELO SANTOS.** 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors* 4(5): 1-12.
- LIU, Z.; M. VALLES & K. DONG.** 2000. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 991-997.
- LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R.; M. VAZEILLE; A. FILIPPIS & A. FAILLOUX.** 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98 :43–54.
- MACORIS, MLG; M. ANDRIGHETTI; L. TAKAKU; C.M. GLASSER; V.C. GARBELOTO & V.C.B. CIRINO.** 1999. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 33(5): 521-22.
- MACORÍS, M.; M. ANDRIGHETTI; L. TAKAKU; C. GLASSER; V. GARBELOTO & J. BRACCO.** 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil to organophosphates insecticides. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (5): 703-708.
- MACORIS, M.; M. ANDRIGHETTI; V. GARBELOTO; L. DE CARVALHO; A. JÚNIOR & W. BROGDON.** 2007. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 102(8): 895-900.
- MAESTRE, R.; R. GABRIELA; J. SALAS; C. VERGARA; L. SANTACOLOMA; S. GOENAGA & M. CARRASQUILLA.** 2010. Estado de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* a insecticidas en Atlántico (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología* 36(2): 242-248.

- MAESTRE, R.; G. REY; J. SALAS; C. VERGARA; L. SANTACOLOMA & O. GOENAGA.** 2009. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temephos en Atlántico – Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 35(2):54-7.
- MAESTRE, R.** 2012. Susceptibility Status of *Aedes aegypti* to Insecticides in Colombia. Em: Farzana P. (ed.), *Insecticides - Pest Engineering*, InTech Press, Croatia , pp 163-200.
- MALLET, J.** 1996. The genetics of biological diversity: from varieties to species. In: *Biodiversity: a biology of numbers and difference*, K. J. Gaston (Ed) Oxford University Press, Oxford. pp. 41-57.
- MANTEL, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- MARTÍN-PIERA, F.** 1997. Apuntes sobre biodiversidad y conservación de insectos: dilemas, ficciones y ¿soluciones? *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 20: 25-55.
- MARTINEZ-TORRES, D.; F. CHANDRE; M.S. WILLIAMSON & F. DARRIET.** 1997. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 7 (2): 179-184
- MARTINS, F. & IG SILVA.** 2004. Avaliação da atividade inibidora do Diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37: 135-138.
- MARTINS, A.; T. BELINATO; J. LIMA & D. VALLE.** 2008. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Management Science* 64: 676-680.
- MARTINS, A. J.; J. LIMA; A. PEIXOTO & D. VALLE.** 2009a. Frequency of Val1016Ile mutations in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Tropical Medicine and International Health* 14 (2): 1351-1355.
- MARTINS, A. J.; R. LINS; J. LINS; A. PEIXOTO & D. VALLE.** 2009b. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81 (1): 108-115.
- MARTINS, F. M. de; DOMINGUES, M. V.** 2011. Filogeografia. In: CARVALHO, C. J. B. de; ALMEIDA, E. A. B. *Biogeografia da América do Sul: padrões & processos*. São Paulo, Editora Roca, v. 1, p. 137-150.
- MATIOLLI, S.** 2001. *Biologia Molecular e Evolução*. 1ª edição. Editora Holos. Ribeirão Preto – SP, 202p.
- MAZZARI, M.B & G.P. GEORGHIO.** 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal of the American Mosquito Control Association* 11: 315-322.
- MELO, M. E. B.; K.C. MERLO & R.R. FERNANDES.** 2008. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temephos em células de medula óssea de camundongos. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz* 67 (3): 196-201.
- MILLER, B.R; M.B. CRABTREE & H.M. SAVAGE.** 1997. Phylogenetic relationships of the Culicomorpha inferred from 18S and 5.8S ribosomal DNA sequences (Diptera: Nematocera). *Insect Molecular Biology* 6: 105–114.
- MINISTERIO DE SALUD (COLOMBIA).** 2001. Boletín Epidemiológico: Prevención y Control del Dengue.
- MINISTERIO DE EDUCACIÓN NACIONAL (COLOMBIA).** 2007. Utilizan peces larvicidas para controlar biológicamente la larva del mosquito *Aedes aegypti* portador del dengue. Disponível: <http://www.mineducacion.gov.co/cvn/1665/w3-article-141380.html> Consultado: Novembro 27 de 2012.

MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL (COLOMBIA), INSTITUTO NACIONAL & ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 2011. Guía de Vigilancia Entomológica y Control de Dengue. Disponible em: http://www.google.com.co/url?q=http://new.paho.org/col/index.php%3Foption%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26gid%3D1215%26Itemid%3D&sa=U&ei=Ft20UM_kGYje8ASA4lC4AQ&ved=0CBQQFjAA&usg=AFQjCNFUpPW9SPe2QGr6q_eHlbPd1DhdtA

MITCHELL-OLDS, T. 1995. The molecular basis of quantitative genetic variation in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution* 10(8): 324-8.

MONCAYO, A. 2004. Pobreza y enfermedades reemergentes en América Latina. Crisis sanitaria continental. *Revista Latinoamericana Salud y Saneamiento Ambiental* 3:33-8.

MORALES CA y SUÁREZ MF. 2003. Evaluación del efecto y residualidad de *Bacillus thuringiensis*, formulado en pastillas, en el control de *Aedes aegypti* (Dip: Culicidae) en Cali (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología* 29(1) 77 – 82.

MORENO, C.E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, vol.1. Zaragoza, 84 pp.

MOUSSON L; C. DAUGA; T. GARRIGUES; F. SCHAFNER; M. VAZEILLE & F. ANNA-BELL A. 2005. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genetics research (Cambridge)* 86: 1-11.

MORRISON, A.; M. SIHUINCHA; J. STANCIL; E. ZAMORA; H. ASTETE; J. OLSON; C. VIDAL-ORE & T. SCOT. 2006. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) production from non-residential sites in the Amazonian city of Iquitos, Peru. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 100 :73-86.

MOTTA-SANCHEZ, A.; R. TONN; L. URIBE & L. CALHEIROS. 1976. A comparison of methods of application of several insecticides for the control of *Aedes aegypti* in villages in Colombia. WHO/VBC/ 76 (623):1-33.

MULLA, MS, U. TABARRA, A. TAWATSIN, y J. CHOMPOOSRI. 2004. Procedures for the evaluation of field efficacy of slow-release formulations of larvicides against *Aedes aegypti* in water-storage containers. *Journal of the American Mosquito Control Association* 20(1): 64-73.

MURRAY, B. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, And Repellents. *Annual Review of Entomology* 51: 45-66.

NAVARRO J.C; F. VENTURA; A. ZORRILLA & J. LIRIA. 2010. Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 58(1): 245-254.

NOSS, R. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical model. *Conservation Biology* 4: 355-364.

OCAMPO, C. & D. WESSON. 2004. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71 (6): 506-513.

OCAMPO, C.; M. SALAZAR-TERREROS; N. MINA; J. McALLISTER & W. BROGDON. 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica* 118: 37-44.

OPS. 1992. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Editor Abram Bcnenson. Washington, D.C.

..... 1993. Boletín epidemiológico de la Organización Panamericana de la salud. 14(4).

..... 1995. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington DC: OPS.

PADUAN, K. & P. RIBOLLA. 2008. Mitochondrial DNA Polymorphism and Heteroplasmy in Populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *Journal of Medical Entomology* 45(1): 59-67.

PADUAN, KS & P. RIBOLLA. 2009. Characterization of eight single nucleotide polymorphism markers in *Aedes aegypti*. *Molecular Ecology Resources* 9: 114–116.

PAHO – Pan American Health Organization. 2009. Number of reported cases of dengue & dengue hemorrhagic fever (DHF), region of the Americas (by country and subregion. Disponível em <<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2008.htm>>. Acessado em 20 de Junho de 2012.

PAROONAGIAN, D. 1994. Managing insect resistance. *Memorias XXI congreso sociedad Colombiana de Entomología*. Medellín-Colombia: 20-62.

PATIL, N. S.; K.S. LOLE Y D.N. DEOBAGKAR. 1996. Adaptive larval thermo-tolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticide in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology* 10: 277-82.

PAUPY C.; M. VAZEILLE-FALCOZ; L. MOUSSON; F. RODHAIN F & A. FAILLOUX. 2000. *Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population density. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 217-224.

PAUPY, C.; C. BRENGUES; O. NDIATHC; C. TOTYB; J.P. HERVÉB & F. SIMARD. 2010. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 473-480.

PAUPY, CH; G. Le GOFF; C. BRENGUES; M. GUERRA; J. REVOLLO; Z. BARJA; H. JEAN-PIERRE & 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. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

PERIAGO, M. & M. GUZMÁN. 2007. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública* 21: 187-191.

PENNA, G. O.; DOMINGUES, C. M. A. S.; SIQUEIRA JR, J. B.; ELKHOURY, A. N. S. M.; CECHINEL, M. P.; GROSSI, M. A. F.; GOMES, M. L. S.; SENA, J. M.; PEREIRA, G. F. M.; LIMA JÚNIOR, D. E. F.; SEGATTO, T. C. S.; MELO, F. C.; ROSA, F. M.; SILVA, M. M.; NICOLAU, R. A. 2011. Doenças dermatológicas de notificação compulsória no Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 86: 865-877.

PESSÔA, M.R. 2012. Culicidae (Diptera) No Brasil: Relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. *Oecologia Australis* 16 (2): 283-296.

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.

PICOLI, C.F. Inéd. Análise de mutações no fragmento do gene que expressa a proteína transmembrana de canal de sódio (*kdr*) e da suscetibilidade a inseticidas em populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2010, 87 p.

PINHEIRO VC & WP. TADEI. 2002. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus Amazonas State, Brazil. *Cadernos de Saude Publica*. 18(6): 1529-36.

- PRIETO, A. V.; M. F. SUÁREZ & R. GONZALEZ.** 2002. Susceptibilidad de dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Cali (Valle, Colombia) a Temefos (Abate®) y Triflumuron (Starycide®). *Revista Colombiana de Entomología* 28 (2): 175-178.
- PROPHIRO, J.; O. SILVA; J. LUNA; C. PICCOLI; L. KANIS & M. NAVARRO-SILVA.** 2011. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temefos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44: 300-305.
- RAFAEL, J.A.; G.A.R MELO; C.J.B CARVALHO; S.A. CASARI & R. CONSTATINO.** 2012. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. Holos Editora, Ribeirão Preto, SP. 810p.
- RAJATILEKA, S.; W. BLACK; K. SAAVEDRA-RODRIGUEZ; Y. TRONGTOKIT; CH APIWATHNASORN; P.J. McCall & H. RANSON.** 2008. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta Tropica* 108: 54–57.
- RANSON, H.; C. CLAUDIANOS; F. ORTELLI; C. ABGRALL; J. HEMINGWAY; M.V. SHARAKHOVA; M.E. UNGER; F.H. COLLINS & R. FEYEREISEN.** 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179-181.
- 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.
- REITER, P.; M.A. AMADOR & N. COLON.** 1991. Enhancement on the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7:52-55, 1991.
- RIBEIRO, A.; G. MARQUES; J. VOLTOLINI & M. CONDINO.** 2006. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. *Revista de Saúde Pública* 40 (4): 671-676.
- RODRÍGUEZ G. M. VELANDIA & J. BOSHELL.** 2003. Fiebre amarilla, la enfermedad y su control. Bogotá:Instituto Nacional de Salud. 60 pp.
- REINERT, J.K.** 2001. Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 17(1): 51-55.
- REINERT, J.F; R.E., HARBACH & I.J. KITCHING.** 1994. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of Linnaean Society* 142: 289-386.
- RÍOS J. F.** 2004. Aspectos entomológicos del dengue. *Infection* 8 – 3.
- RODRIGUEZ, M. M; J. A. BISSET; D. FERNÁNDEZ & O. PÉREZ.** 2004. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: Prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56(1):54-60.
- RODRÍGUEZ G, M. VELANDIA & J. BOSHELL.** 2003. Fiebre amarilla, la enfermedad y su control. Bogotá:Instituto Nacional de Salud. 60 pp.
- 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.
- RODRIGUEZ, M.; J. BISSET; Y. DE ARMAS & F. RAMOS.** 2005 Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21: 437–445.

RODRÍGUEZ, M.; J. BISSET; D. FERNÁNDEZ. 2007. Determinación *in vivo* del papel de las enzimas esterasas y glutatión transferasa en la resistencia a piretroides en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical* 59(3):209-212.

RODRÍGUEZ, M & J. BISSET. 2008. Estudio de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). Tese de doutorado, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Cuba. 114p.

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.

RONDAN, J.; G. ALBRIEU; G. M. PANZETTA-DUTARI & C. N. GARDENAL. 2009. Two Different Routes of Colonization of *Aedes aegypti* in Argentina from Neighboring Countries. *Journal of Medical Entomology* 46(6):1344-1354.

ROSE, R. I. 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases* 7 (1): 17-23.

RUEDA, L.M. 2008. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 477-487.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K.; L. URDANETA-MARQUEZ; S. RAJATILEKA; M. MOULTON; A.E. FLORES; I. FERNANDEZ-SALAS; J. BISSET; M. RODRIGUEZ; P. MCCALL; M.J. DONNELLY; H. RANSON; J. HEMINGWAY & W.C. BLACK. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16:785–798.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. 2007. Mapeo cuantitativo de loci que controlan la resistencia a la pirimetrina en el mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Tese de doutorado, Universidade Autonoma de Nueva León, México. 146p.

SABIN, A. 1952. Research on dengue during World War II. *American J. Trop. Med. Hyg.* 1: 30-50.

SACHIDANANDAM, R.; D. WEISSMAN; S.C. SCHMIDT; J.M. KAKOL; L.D. STEIN; G. MARTH; S. SHERRY; J.C. MULLIKIN; B.J. MORTIMORE; D.L. WILLEY; S.E. HUNT; C.G. COLE; P.C. COGGILL; C.M. RICE; Z. NING; J. ROGERS; D.R. BENTLEY; P.Y. KWOK; E.R. MARDIS; R.T. YEH; B. SCHULTZ; L. COOK; R. DAVENPORT; M. DANTE; L. FULTON; L. HILLIER; R.H. WATERSTON; J.D. MCPHERSON; B. GILMAN; S. SCHAFFNER; W.J. VAN ETEN; D. REICH; J. HIGGINS; M.J. DALY; B. BLUMENSTIEL; J. BALDWIN; N. STANGE-THOMANN; M.C. ZODY; L. LINTON; E.S. LANDER & D. ATSHULER. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928 –933.

SALAZAR, M.; A. CARVAJAL; M. CUELLAR; A. OLAYA; J. QUIÑONES; O. VELÁSQUEZ; A. VIVEROS & C. OCAMPO. 2007. Resistencia a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* y *Anopheles* spp. en los departamentos de Huila, Valle, Cauca y Nariño. Memorias XIII Congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. *Biomédica* 27 (2): 177.

SALMAN, A. 2007. Conceitos básicos de genética de populações. Documentos 118/ Embrapa, Rondônia. Porto Velho – RO, 27, p.

SANTACOLOMA, L.; H. BROCHERO & B. CHÁVEZ. 2007. Estado de la susceptibilidad a insecticidas de *Aedes aegypti* en cinco departamentos de Colombia. Memorias XIII Congreso colombiano de parasitología y medicina tropical. *Biomédica* 27 (2): 175.

SANTACOLOMA, L.; B. CHAVES & H. BROCHERO. 2010. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública* 27(1): 66-73.

- SANTACOLOMA, L.; B. CHAVES & H. BROCHERO.** 2012. Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales del vector del dengue a insecticidas en trece localidades de Colombia. *Biomédica* 32: 333-43.
- SANTOS, M. A. T.; M.A. AREAS & F.G. REYES.** 2007. Piretróides – uma visão geral. *Alimentos e Nutrição* 18: 339-349.
- SCHLESINGER, R. & J. FRANKEL.** 1956. Adaptation of the New Guinea B strains of dengue virus to suckling mice and to adults Swiss mice. *The Journal of Immunology* 77: 351-363.
- SCHOFIELD, C.; J. HEMINGWAY & S. BALDERRAMA.** 1984. Insecticide resistance in Bolivian *Aedes aegypti*. *Boletín Informativo del CENETROP*, 10: 22-28.
- SENEVIRATNE, S.; G. MALAVIGE & H. DE SILVA.** 2006. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical of Medical Health* 100: 608-614.
- SHANKAR, D; A.R SHRIVASTAVA; S.C PANT & B. DUTTA.** 2011. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. *Arthropod Structure & Development* 40: 479-483.
- SEVERSON DW, ANTHONY NM, ANDREW O, FFRENCH-CONSTANT RH.** 1997. Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *The Journal of Heredity* 88: 520-24.
- SCOTT, J.; D.COCHRAM & B. SIEGFRIED.** 1990. Insecticidetoxicity, synergism and resistance in germma cockroach (Dicoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* 83: 1698-1703.
- SINGHI, S.; N. KISSOON & A. BANSA.** 2007. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intense care unit. *Journal of Pediatrics* 83 (2 Suppl): 22-35.
- SISTEMA DE VIGILANCIA SALUD PÚBLICA – SIVIGILA.** 2012. Boletín epidemiológico semanal. Instituto Nacional de Salud. Consultado: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Paginas/default.aspx>
- SODERLUND, D. & J. BLOOMQUIST.** 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistnace. Pp 58-96. Em: Pesticide Resistance in Arthropods editada por Roush R. T. and Tabashnik B.E. Routledge Chapman & Hall Inc. Great Britain.
- SODERLUND, D.M.** 1997. Molecular mechanisms of insecticide resistance. *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals*. 21–56.
- SOLBRIG, O. T.** 1991. From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity. IUBS-SCOPE-UNESCO, Cambridge, 124 pp.
- SNUSTAD, D. & M. SIMMONS.** 2001. Fundamentos de Genética. Guanabara Koogan, 2 ed. Rio de Janeiro.
- SPANOS, L.; G. KOUTROUMAS; M. KOTSYFAKIS & C. LOUIS.** 2000. The mitochondrial genome of the miditerranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Molecular Biology* 9 (2): 139-144.
- SUÁREZ, M. F.; R. GONZÁLEZ & C. MORALES.** 1996. Temefos resistance to *Aedes aegypti* in Cali, Colombia. 45^a Annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, Maryland. *Supplement to the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55 (2): 257.
- SUAREZ, M.; M. OLARTE; M. ANA & C. GONZÁLEZ.** 2005. Is what I have just a cold or is it dengue? Addressing the gap between the politics of dengue control and daily life in Villavicencio-Colombia. *Social Science & Medicine* 61: 495–502.

- SUCEN** – Superintendência de controle de endemias. 2010. Classificação de inseticidas. Disponível em: < <http://www.sucen.sp.gov.br/down/segtrb/sequi2.pdf> >. Acessado em 20 de Junho de 2010.
- SUPERINTENDENCIA DE PUERTOS Y TRANSPORTE DE COLOMBIA.** 2012. Página oficial. Consultado 20 de dezembro de 2012. Disponível em: <http://www.supertransporte.gov.co/super/>
- TAILLON-MILLER, P.; Z. GU; Q. LI; L. HILLIER & P.Y. KWOK.** 1998. Overlapping genomic sequences: a treasure trove of single-nucleotide polymorphisms. *Genome Research* 8: 748 – 754.
- TAUIL P.** 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 18: 867-871.
- TAUIL, P.** 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cadernos de Saúde Pública* 17 (suplemento): 99-102.
- TEIXEIRA M. G. & M. BARRETO.** 1996. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. *Ciência & Saúde Coletiva* 1: 122-35.
- TOLEDO, A.; C. ESCOSTEGUY; R. MEDRONHO & F. ANDRADE.** 2006. Confiabilidade do diagnóstico final de dengue na epidemia de 2001-1002 no Município do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 22(5): 933-940.
- THOMPSON, J; D. HIGGINS & T. GIBSON.** 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 11: 4673-4680.
- TWERDOCHLIB, A.; A. DALLA; S. LEITE; R. CHITOLINAI; B. WESTPHALI & MARIO A. NAVARRO-SILVA.** 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.
- VAREJÃO, J.B.M.; C.B. SANTOS; H.R. REZENDE; L.C. BEVILACQUA & A. FALQUETO.** 2005. Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade de Vitória, ES. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 238-240.
- VALDERRAMA, E.; R. GONZÁLEZ & G. JARAMILLO.** 2008. Evaluación de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:Culicidae) insecticida órganofosforado y un pirertroide en cuatro poblaciones del Valle del Cauca, mediante dos tipos de bioensayos. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle* 9(2): 1-11.
- VARGAS, F.; O. CÓRDOVA & A. ALVARADO.** 2006. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* Y *Lutzomyia peruensis* PROCEDENTES DEL NORTE PERUANO. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 23(4): 259-264.
- VILLARREAL H., M. ÁLVAREZ, S. CÓRDOBA, F. ESCOBAR, G. FAGUA, F. GAST, H. MENDOZA, M. OSPINA & A.M. UMAÑA.** Segunda edición. 2006. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Programa de Inventarios de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 236 p.
- WALSH, S.; T. DOLDEN; G. MOORES; M. KRISTENSEN; T. LEWIS; A. DEVONSHIRE & M. WILLIAMSON.** 2001. Identification and characterization of mutations in house fly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *The Biochemical Journal* 359: 175-181.

WANG DG; J.B. FAN; C.J. SIAO; A. BERNO; P. YOUNG; R. SAPOLSKY; G. GHANDOUR; N. PERKIN; E. WINCHESTER; J. SPENCER; L. KRUGLYAK; L. STEIN; L. HSIE; T. TOPALOGLOU; E. HUBBELL; E. ROBINSON; M. MITTMANN; M.S. MORRIS; N. SHEN; D. KILBURN; J. RIOUX; C. NUSBAUM; S. ROZEN; T.J. HUDSON; R. LIPSHUTZ; M. CHEE & E.S. LANDER. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280(5366):1077-1082

WARD, R.A. 1982. Culicidae. In: HULBERT & VILLALOBOS-FIGUEROA (eds.), *Aquatic biota of Mexico, Central America and West Indies*. San Diego, California, San Diego State University.

WILDER-SMITH, A. & E. SCHWARTZ. 2005. Dengue in travelers. *The New England Journal of Medicine* 353 (9): 924-32.

WILLIAMSON, M. S.; D. MARTINEZ-TORRES; C.A. HICK & A.L. DEVONSHIRE. 1996. Identification of mutation in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticide. *Molecular Genetics and Genomics* 252: 51-60.

WHO– World Health Organization 1981. Instruction for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphare and carbamate insecticide diagnostic test. WHO/VBA/81.806, Geneva, Switzerland.

..... 1997. Dengue haemorrhagic fever diagnosis treatment, prevention and control. 2nd edition, Geneva.

..... 1998. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO/CDS/CPC/ MAL/98.12, Geneva: 43 pp.

..... 2007. WHO Specifications and evaluations for public health pesticides: temephos. Disponível em <http://www.who.int/whopes/quality/Temephos_eval_June_2007_corr_aug160807.pdf> Acessado em 15 de Junho de 2010.

..... 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em <www.who.int/iris/.../9789241564540_eng.pdf> Acessado em 26 de fevereiro de 2013

WONDJI, CH.S.; J. HEMINGWAY & H. RANSON. 2007. Identification and analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the mosquito *Anopheles funestus*, malaria vector. *BMC Genomics* 8(5): 1-13.

WOOD, D.M & A. BORKENT. 1989. Phylogeny and classification of the Nematocera. In: McAlpine, J.F. & Wood, D.M. (eds.), *Manual of Nearctic Diptera. Vol.3*. Research Branch Agriculture Canada Monograph No. 32, Canadian Government Publishing Centre, Hull, Quebec. pp. 1333–1370

YAN, G.; D. CHADEE & D. SEVERSON. 1998. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics* 148(2): 793-800.