

# Estudo da variabilidade genética e análise de possíveis mutações *kdr* no gene codificador dos canais de sódio relacionados à resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas

Study of genetic variability and analysis of possible *kdr* mutations in the gene encoding sodium channels related to resistance of *Aedes aegypti* to insecticides

Estudio de la variabilidad genética y análisis de posibles mutaciones *kdr* en el gen codificador de los canales de sódio relacionados a la resistencia del *Aedes aegypti* a los insecticidas

Recebido: 07/02/2023 | Revisado: 22/02/2023 | Aceitado: 23/02/2023 | Publicado: 02/03/2023

## Andreina Heineck Chiele

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6015-1041>  
Descomplica UniAmérica Centro Universitário, Brasil  
E-mail: [andreinaheineck@gmail.com](mailto:andreinaheineck@gmail.com)

## Iara Natália Afonso Florentino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3954-3398>  
Descomplica UniAmérica Centro Universitário, Brasil  
E-mail: [iaraflorentino25@gmail.com](mailto:iaraflorentino25@gmail.com)

## Rafael Giordani Schulz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8422-3786>  
Descomplica UniAmérica Centro Universitário, Brasil  
E-mail: [rafaelgschulz@gmail.com](mailto:rafaelgschulz@gmail.com)

## Elisson Furlan Figueiredo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1888-9541>  
Descomplica UniAmérica Centro Universitário, Brasil  
E-mail: [elissonfurlanf@gmail.com](mailto:elissonfurlanf@gmail.com)

## Carina Sperotto Librelotto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7194-4653>  
Descomplica UniAmérica Centro Universitário, Brasil  
E-mail: [clibrelotto@yahoo.com.br](mailto:clibrelotto@yahoo.com.br)

## Jean Colacite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2049-7029>  
Descomplica UniAmérica Centro Universitário, Brasil  
E-mail: [jeancolacite@gmail.com](mailto:jeancolacite@gmail.com)

## Resumo

**Introdução:** Os mosquitos do gênero *Aedes*, em especial o *Aedes aegypti* possuem maior prevalência em países tropicais e por estarem localizados em ambientes urbanos, atualmente são considerados os principais vetores de arbovirose como a Dengue, Zika, Chikungunya, Febre Amarela, entre outras. A Dengue é uma das doenças mais abrangente e preocupante para a saúde pública, por ser característica de uma epidemia sazonal, e pelo fato de muitos inseticidas usados em carros fumacê não apresentarem mais eficácia contra o vetor, o que dificulta o seu controle, este estudo teve como objetivo analisar o perfil genético de larvas do *Aedes aegypti* baseado na detecção do gene mtDNA NADH4, e analisar possíveis mutações *kdr* no gene que codifica os canais de sódio relacionados à resistência a inseticidas. **Materiais e método:** A pesquisa da mutação *kdr* foi analisada baseado na técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP). **Resultados:** Das 52 amostras analisadas, 24 apresentaram polimorfismo de bandas na corrida em agarose, confirmando a mutação. **Conclusão:** Os resultados obtidos no presente estudo indicaram a presença de quase 50% de larvas com mutação para resistência.

**Palavras-chave:** Dengue; Mosquito; Arbovírus; Piretróides.

## Abstract

**Introduction:** Mosquitoes of the genus *Aedes*, especially *Aedes aegypti*, have a higher prevalence in tropical countries and because they are located in urban environments, they are currently considered the main vectors of arboviruses such as Dengue, Zika, Chikungunya, Yellow Fever, among others. Dengue is one of the most widespread and worrying diseases for public health, as it is characteristic of a seasonal epidemic, and because many insecticides used in smokeless cars are no longer effective against the vector, which makes its control difficult, this study aimed to analyze the genetic profile of *Aedes aegypti* larvae based on the detection of the mtDNA NADH4 gene, and to analyze possible *kdr* mutations in the gene that encodes sodium channels related to resistance to insecticides. **Materials and method:** The

*kdr* mutation research was analyzed based on in the restriction fragment length polymorphism technique (PCR-RFLP) Results: Of the 52 samples analyzed, 24 presented showed polymorphism of bands in the agarose run, confirming the mutation Conclusion: The results obtained in the present study indicated the presence of almost 50% of larvae with mutation for resistance.

**Keywords:** Dengue; Mosquito; Arbovirus; Pyrethroids.

### Resumen

Introducción: los mosquitos del género *Aedes aegypti* tienen una mayor predominancia en países tropicales y por estar ubicados en ambientes urbanos, actualmente son considerados los principales vectores de arbovirus como Dengue, Zika, Chikungunya, Fiebre Amarilla, entre otros. El dengue es una de las enfermedades más extendidas y preocupantes para la salud pública, por ser característico de una epidemia estacional, y porque muchos insecticidas utilizados en los automóviles sin humo ya no son efectivos contra el vector, lo que dificulta su control, este estudio tuvo como objetivo analizar el perfil genético de larvas de *Aedes aegypti* a partir de la detección del gen mtDNA NADH4, y analizar posibles mutaciones *kdr* en el gen que codifica los canales de sodio relacionadas con la resistencia a insecticidas. Materiales y método: La investigación de mutaciones de *kdr* se analizó en base a la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Resultados: De las 52 muestras analizadas, 24 mostraron polimorfismo de bandas en la corrida de agarosa, lo que confirma la mutación. Conclusión: Los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron la presencia de casi un 50% de larvas con mutación de resistencia.

**Palabras clave:** Dengue; Mosquito; Arbovirus; Piretroides.

## 1. Introdução

Representantes da família Culicidae, são insetos muito associados a doenças que atingem o ser humano, sendo encontrados em várias regiões do mundo, principalmente em países de climas considerados tropicais e subtropicais. Estes mosquitos são de grande importância médica, pois são vetores de vários vírus que afetam a saúde humana. Os mosquitos do gênero *Aedes*, em especial a espécie *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) são os principais vetores de arbovírus como dengue, zika, chikungunya e febre amarela, a espécie é conhecida principalmente pela transmissão da dengue e a febre hemorrágica da dengue. O mosquito *A. aegypti* é originário do continente africano, da região da Etiópia, prevalecendo em países tropicais e facilmente localizado em ambientes urbanos, no qual atua com picos de atividade diurnos. Como se trata de um mosquito de hábitos diurnos, a sua coloração é mais “viva”, do que os insetos hematófagos, isso mostra o quanto sua evolução está estritamente ligada aos seres humanos e ao ambiente urbano, isso possibilitou que ele sofresse mudanças e diversidade filogenética. A característica morfológica deste inseto é bem distinta e marcante, o *A. aegypti* tem como predominante a sua coloração em café escuro, com o tórax escuro e várias listras brancas no corpo (Akhir et al., 2022; Fonseca, 2016; Taveira, Fontes & Natal, 2001; Natal, 2002; Silva et al., 2021).

As fêmeas do *A. aegypti* são autógenas, ou seja, só produzem seus ovos após ingerirem sangue, para atingir a fase gravídica e realizar a ovoposição. A fêmea do *A. aegypti*, realiza sua ovoposição em meio líquido, qualquer pequeno recipiente serve para a postura dos ovos da fêmea, que se fixam na parede do recipiente. Por este motivo, houve uma boa adaptação com o ambiente de cidades, onde é comum o descarte de embalagens de diversos materiais que são encontrados na forma de entulho (Silva, Zilda & Scopel, 2007). Com os ovos postos, a fêmea continua à procura de hospedeiros para produzir mais ovos. Todo esse processo é conhecido como ciclo gonotrófico (Andrade, 2018). A fêmea pode se alimentar do sangue do hospedeiro já infectado por algum vírus, como a dengue, e então dissemina para outros hospedeiros (Matthews et al., 2016).

O número de casos de dengue cresce a cada ano, e diferentes hipóteses têm surgido para explicar essa ocorrência. Uma delas relata o fato de que a resistência do *A. aegypti* aos produtos químicos pode favorecer o aumento das populações de mosquitos, resultando no aumento dos casos da dengue. Por isso, é importante investigar a sensibilidade das diferentes populações para os agentes químicos, a fim de ter sucesso na eliminação dos mosquitos e diminuir a transmissão da doença (Luna, 2004).

Os principais métodos de combate ao *A. aegypti* são baseadas na utilização de produtos químicos e biológicos que visam à morte dos mosquitos. No Brasil, desde sua reinserção na década de 70, tem sido a utilização de inseticidas piretróides

e organofosforados, porém, os mosquitos já apresentam resistência. Os piretróides também são utilizados em inseticidas domésticos e seu uso pode favorecer a pressão seletiva dessa espécie (Akhir et al. 2022; Macoris et al. 1999).

As mutações nos canais de sódio voltagem dependente ( $Na_v$ ) frequentemente leva a resistência a inseticidas piretróides, o  $Na_v$  são proteínas transmembrana de canal de sódio voltagem dependentes compostas por quatro domínios homólogos (I-IV), destes, com seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) cada, presentes em axônios neuronais. A mutação  $Na_v$  reduz a ligação com os inseticidas piretróides, e ao serem expostos ao inseticida ocasiona a perda imediata da coordenação dos insetos, mas logo em seguida se recuperarem, esse efeito é conhecido como resistência knockdown (*kdr*) (Lopes et al, 2021).

A variabilidade genética resulta da sua habilidade de adaptação de um organismo, sendo necessária no entendimento da sua história evolutiva em populações de mosquitos e a epidemiologia da doença. A tentativa de dizimação desses insetos pode ser um fator que corrobora para o aumento na diversidade genética do *A. aegypti*, por exemplo, devido a sua capacidade de moldar-se ao ambiente. Além de que o convívio com a espécie humana, migrando-se de um local a outro, pode ser uma grande influência nas características genéticas destes dois insetos. O entendimento da estrutura genética de uma população é fundamental para entender a dinâmica das populações, sua resistência e adaptação ecológica. Para o estudo da variabilidade genética dos mosquitos *A. aegypti* utiliza-se técnicas de sequenciamento genético (Guedes, 2006; Lima, 2010; Lopes et al. 2021).

O DNA mitocondrial é utilizado em estudos genéticos e populacionais por ter um genoma pequeno e circular, com aproximadamente 16 kb com 37 genes, apresenta herança materna e ausência de recombinação, possui uma região não codificadora, rica em A e T em invertebrados e se comparado ao DNA nuclear apresenta alta taxa evolutiva (Arias, Francisco, & Silvestre, 2003; Fantinatti, 2009; Marelli, 2011; Souza, 2005). Dentro do mtDNA do *A. aegypti* há locais já utilizados como marcadores para realizar a técnicas de variabilidade genética. Urdaneta-Marquez et al. (2008) utilizaram marcadores genéticos do gene mitocondrial NADH e SNPs de 11 loci nucleares em um estudo com mosquitos originários de seis regiões da Venezuela, seus resultados indicaram que havia isolamento por distância entre as coleções e susceptibilidade dos mosquitos a infecção pelo vírus tipo 2 da dengue. A subunidade do gene codificador da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH) acumula rapidamente mudanças de bases, com a detecção da movimentação do vetor e a presença de haplótipos únicos em resposta à pressão seletiva.

O mosquito *A. aegypti* é o principal transmissor de arboviroses nos centros urbanos, sendo o vírus da dengue o mais abrangente e preocupante para a saúde pública, principalmente por possuir a característica de ser uma epidemia sazonal. Estudos revelam que muitos inseticidas usados em carros de fumacê já perderam a eficácia para a eliminação deste inseto, o que dificulta o seu controle. Desta forma, avaliar as diferenças filogenéticas de populações de diferentes regiões é relevante para aumentar a efetividade no controle populacional do *A. aegypti*, além de auxiliar na análise epidemiológica da região de Foz do Iguaçu.

Sendo necessário analisar o perfil genético dos mosquitos *Aedes aegypti* baseado na técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (PCR-RFLP), genes mtDNA NADH4, e pesquisar possíveis mutações *kdr* no gene que codifica os canais de sódio relacionados à resistência a inseticidas.

## 2. Metodologia

As coletas das amostras foram realizadas pelos profissionais do CCZ (Centro de Controle de Zoonoses) do município de Foz do Iguaçu (PR) por meio de armadilhas posicionadas em locais estratégicos. Foram analisadas 97 larvas não alimentadas capturadas na cidade de Foz do Iguaçu (PR, Brasil).

Inicialmente foi realizada a extração de DNA genômico de um único indivíduo, utilizando a metodologia proposta por Ayres et al. (2003), descrita a seguir.

Em cada *ependorf* foi colocado um mosquito *A. aegypti* e 400µl de Tampão de Lise (Tris 10mM, NaCl 0,4M e EDTA 2mM), 72 µl de SDS 10% e 7 µl de Proteinase K (10 mg/mL), com auxílio de um bastão a larva foi macerada. Em seguida, os *ependorfs* foram incubados a 60°C overnight. Após este procedimento, foram adicionados 420 µl de NaCl 5M e em seguida centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos *ependorfs* contendo 700 µl de isopropanol, para precipitação do DNA e foram resfriados a -20 °C por 1 hora. Após este período, foram centrifugados por 20 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi adicionado 500 µl de etanol 70% para lavar o pellet. Os tubos foram novamente agitados no vórtex e centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos deixados para secar por 20 minutos em temperatura ambiente. Por fim, o pellet foi ressuspensionado com 100 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura. Todas as amostras foram quantificadas e qualificadas quanto ao seu conteúdo DNA/proteínas utilizando espectrofotômetro UV.

Uma região do mtDNA, o NADH4, foi alvo deste trabalho conforme demonstrado na Figura 1. Parte do gene que codifica para a subunidade 4 da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH4) mitocondrial foi amplificada utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). A região NADH4 possui 1344 pares de base e tem um produto amplificado de 376 pb (Figura 1).

**Figura 1** - Sequência completa do gene mtDNA do *Aedes aegypti*.

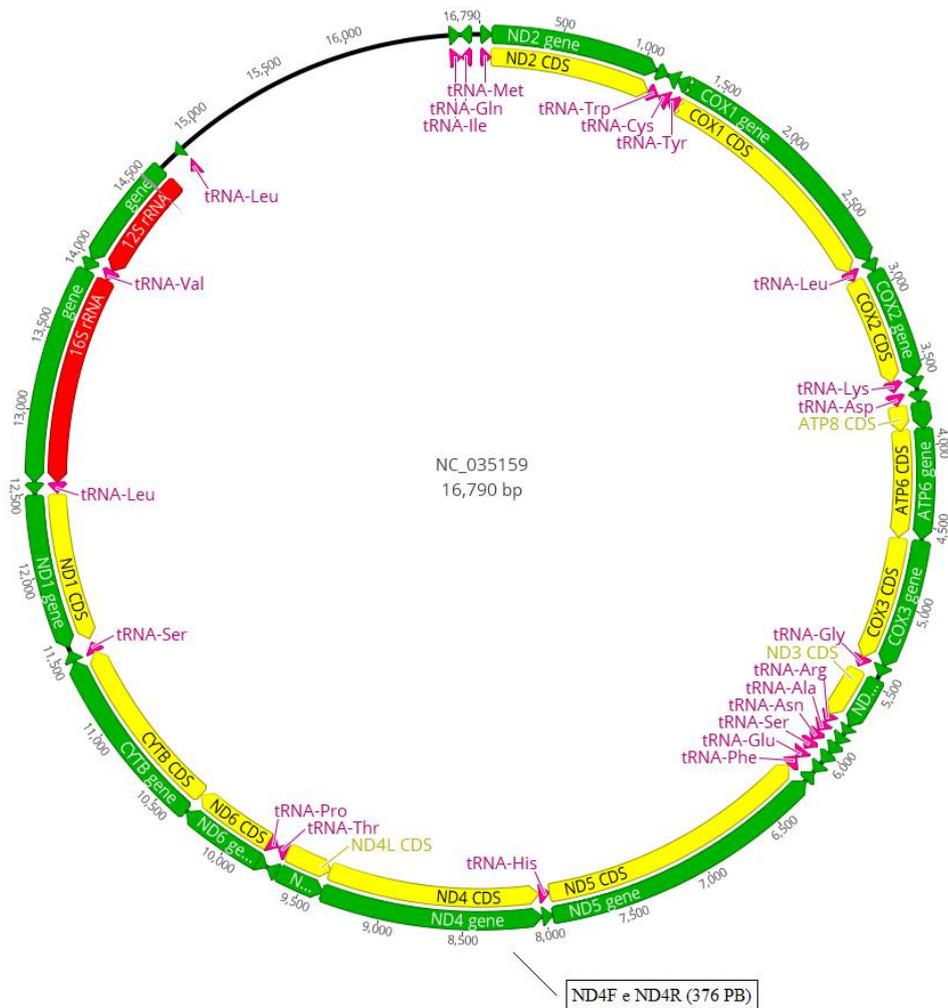


Imagem ilustrativa do gene mNAHD4 em que é possível observar o local e seu número de pares de bases utilizado para as análises da variabilidade genética do *Aedes aegypti*. Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

A reação de PCR para os primers ND4f / ND4r foram realizadas com um volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo 5  $\mu\text{L}$  do tampão de reação, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 mM de cada dNTP, 0.2  $\mu\text{M}$  de cada primer, 1.5 U da *pfu* polimerase e 2  $\mu\text{L}$  do DNA extraído. O programa utilizado no termociclador *Geneamp PCR System 9700 Applied biosystems*<sup>®</sup> com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 5 min.

Os produtos gerados nas reações supracitadas foram visualizados em gel de agarose 1,5% aplicados com o tampão de corrida *Blue Green Loading dye I* (LCG biotecnologia). As sequências dos primers estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos do gene mNADH4.

Primer	Sequência 5'-3'	Produto (pb)	Referência
ND4f	TGATTGCCTAAGGCTCATGT	376	Gorrochoteghi-Escalante et al. (2000)
ND4r	TTCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT		

Lista dos primers (oligonucleotídeos) empregados nas reações de PCR contendo o nome, sequência, número de pares de bases e a referência utilizada. Ambos os primers foram retirados da mesma fonte e possuem o mesmo número de pares de bases em sua composição. Fonte: Autores.

Após a eletroforese, foram medidas as concentrações dos produtos da PCR por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. Segundo esta técnica, o DNA absorve luz no comprimento de onda de 260 nm. Para isso, as amostras de DNA são diluídas com água ultrapura. Foram preparadas diluições 1:100, com alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA misturadas com 980  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Para que seja estimada a concentração de DNA, utiliza-se a relação  $1 \text{ DO}_{260} = 50 \mu\text{g}$  de DNA dupla hélice, tornando possível que a concentração de DNA presente na amostra possa ser obtida.

Para verificar a presença da mutação, foi utilizada a técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), nela as enzimas de restrição cortam o DNA em regiões específicas, através do reconhecimento da sequência genética e fragmentação de moléculas que identificam essa sequência, gerando extremidades coesivas, que podem ser detectadas por meio da digestão do produto da PCR e análise do tamanho dos fragmentos em gel de agarose, por meio da técnica RFLP, no qual foi analisado o corte da dupla fita de DNA, uma vez que é observado a hibridização desses fragmentos com sequências homólogas do DNA sinalizado com radioatividade ou por luminescência. (Ferreira, 2016).

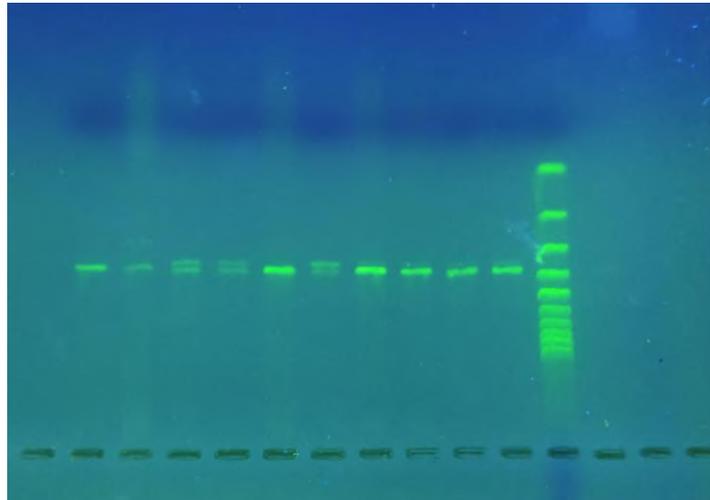
A enzima de restrição *Ssp I* (Jena Bioscience), é derivada do gênero da bactéria *Sphaerotilus*, e tem como sequência específica de corte AAT/ATT, utilizada para pesquisa da mutação Val1016Ile, resultado da substituição de uma valina por uma isoleucina (GTA-ATA).

Para reação de digestão foi seguido as orientações segundo o fabricante das amostras da enzima de restrição utilizada, enzima de restrição *Ssp I* (Jena Bioscience). O volume final de reação utilizado foi de 50  $\mu\text{L}$ , em que foram empregados 5  $\mu\text{L}$  de tampão universal (UB) 10 x (fornecido pelo fabricante), 1  $\mu\text{g}$  de DNA de amostra, 5 unidades de enzima e completado até o volume final com água ultrapura. Como a especificação para o ensaio exige apenas 1  $\mu\text{g}$  de DNA e devido às diferentes concentrações de material genético quantificadas das amostras, separou-se as 52 amostras em 4 grupos, de acordo com os níveis de concentração de DNA medidos, e, a partir disso, realizado um cálculo buscando estimar a quantidade de produto de PCR (em  $\mu\text{L}$ ) que seria necessária para que houvesse 1  $\mu\text{g}$  de DNA na reação de digestão.

Com os grupos organizados, foi calculada a quantidade necessária de produto de PCR para obtenção de 1  $\mu\text{g}$  de DNA para cada grupo. Após a preparação do ensaio com a adição dos respectivos componentes, foi aguardado o período de digestão, à temperatura ambiente, por 20 minutos. Em seguida, para inativação da enzima, os ensaios foram incubados à 70° C por mais 20 minutos, finalizando a reação, e guardados no congelador a -20° C.

Posteriormente, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 2% corado com 7 $\mu$ L Safedye Nucleid Acid Stain (Cellco), conforme mostrado na Figura 2, nela é possível observar a presença da mutação pelo corte da dupla fita de DNA realizado pela enzima de restrição.

**Figura 2** - Corrida de amostras em Gel de agarose submetido à eletroforese 2% e corado com 7 $\mu$ L Safedye Nucleid Acid Stain (Cellco) após reação com a enzima de restrição Ssp I (Jena Bioscience).



Fotografia da corrida em gel de agarose realizada para confirmação da mutação *kdr*. À extrema direita está localizada a curva controle, com o número de pares de base em ordem crescente, de cima para baixo, de 100 a 1000 pares de bases. Nas amostras em que foram confirmadas a mutação *kdr*, o corte realizado pela enzima de restrição na fita de DNA, permite a visualização de duas bandas na corrida das amostras no gel. As amostras negativas para a mutação demonstram apenas uma banda, com o número de 376 pb. Fonte: Autores.

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Mutações *Kdr*

Os piretroides atuam como moduladores dos canais de sódio, pela interferência na voltagem desses canais, a alteração entre sódio e potássio, impede a sinapse nervosa normal, provocando a paralisia no inseto, seguida da morte. O mecanismo *kdr* (knockdown resistance) carrega a mutação no gene do canal de sódio que levam substituição de um aminoácido na proteína, alterando a relação entre a proteína e o inseticida, por isso o efeito “knockdown”, o inseto apresenta mal-estar, mas se recupera em seguida (Lima, 2019; Oliveira, 2019).

Das 52 amostras analisadas, 24 apresentaram polimorfismo de bandas na corrida em agarose, observando duas bandas devido ao corte realizado pela enzima de restrição (Figura 2). Isso significa, que essas 24 larvas de mosquitos *Aedes aegypti* possuem a presença da mutação *kdr*, que pode indicar resistência aos inseticidas piretróides. Observa-se, com esses resultados, que as mutações *kdr* estão realmente presentes nas populações de *Aedes aegypti* na região de Foz do Iguaçu.

Piccoli (2010) registrou maior frequência do alelo mutante para Val1016Ile, um tipo de mutação *kdr*, nas regiões Leste, Sul e Oeste de Foz do Iguaçu. E Aguirre-Obando (2016) frequências  $\geq 55\%$  homogeneamente do alelo *kdr* NaV R2, com exceção do estrato um em Foz do Iguaçu. Este resultado se relaciona com os encontrados neste estudo, em que também foram constatadas mutações *kdr* nas amostras coletadas na cidade de Foz do Iguaçu.

Segundo Fantinatti (2009), a mesorregião Oeste do Paraná tem maior variabilidade genética devido a movimentação da espécie através do fluxo humano e de mercadorias, principalmente da tríplice fronteira, entre Paraguai, Brasil e Argentina, além da contribuição do rio Paraná onde o *Aedes aegypti* pode ser disseminado através do transporte náutico explicando os resultados significativos de *Fst* na cidade de Santa Helena e Foz do Iguaçu.

O estudo realizado por Luna et al., (2004), em que foram avaliados dados da susceptibilidade de uma população de *A. aegypti* na cidade de Curitiba, Paraná. As amostras de Luna foram submetidas a dois inseticidas químicos: temephos (organofosforado) e cipermetrina (piretróide) e foram avaliadas a razão de resistência dos mosquitos. Os resultados demonstraram que os temephos ainda são tratamentos químicos viáveis para a população de *A. aegypti* avaliada, porém, os resultados para cipermetrina indicam que o produto não deve ser mais utilizado no município de Curitiba, pois os mosquitos apresentaram resistência. Infelizmente, em nosso estudo não foi possível submeter as amostras à um tratamento direto com os agentes químicos, e constatar se os mosquitos apresentavam a resistência, o que seria um complemento para nossos achados moleculares da mutação no gene de resistência.

Por fim, de modo geral, esse método de controle com agentes químicos demonstra a grande capacidade de adaptação e variabilidade genética presentes nesta espécie de mosquitos, e pode ser a razão pela qual sua erradicação é tão difícil. Portanto, monitorar a presença e evolução desses polimorfismos é imprescindível para uso adequado dos controles químicos e garantia da sua eficiência.

#### 4. Conclusão

As populações analisadas neste trabalho indicam que o controle do vetor *Aedes aegypti* através do uso de inseticidas na região de Foz do Iguaçu pode estar comprometido devido à presença de mutações *kdr* no gene que codifica os canais de sódio relacionados à resistência aos piretróides presentes em alguns mosquitos. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram a presença de larvas com mutação para resistência.

A presença da mutação em quase 50% das amostras analisadas indica a necessidade de mais estudos e acompanhamento da frequência de mutações relacionadas à resistência, buscando contribuir na eficiência dos programas de controle do vetor, já que a pressão exercida artificialmente com a utilização do controle químico como principal método pode influenciar a variabilidade genética das populações dos mosquitos, assim, favorecendo o surgimento das mutações *kdr*, portanto, recomenda-se a substituição do inseticida por outro método e/ou mecanismo de ação diferente.

A continuidade desta pesquisa, através de comparações de resultados com outros trabalhos similares e pesquisa com novas amostras mais recentes mostra-se importante, considerando que o uso dos inseticidas é o principal método de controle do vetor, no entanto, o uso contínuo destes inseticidas pode favorecer a seleção de populações resistentes, tornando-os ineficientes. Além disso, os resultados deste trabalho podem servir como suporte para novos estudos, que visem avaliar a presença e a frequência da resistência dos mosquitos *A. aegypti* à inseticidas piretróides.

#### Referências

- Aguirre-Obando, O. A. (2016). Variabilidade genética do canal de sódio voltagem-dependente em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* da Colômbia e do Brasil: Importantes mosquitos vetores de arbovírus. (Dissertação de doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Curitiba. <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/46265>
- Akhir, M. A. M., Wajidi, M. F. F., Lavoué, S., Azzam, G., Jaafar, I. S., Awang Besar, N. A. U., & Ishak, I. H. (2022). Knockdown resistance (*kdr*) gene of *Aedes aegypti* in Malaysia with the discovery of a novel regional specific point mutation A1007G. *Parasites & Vectors*, 15 (1).
- Andrade, P. dos S. (2018). Desenvolvimento ovariano e transmissão vertical do vírus dengue em fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) na cidade de São Paulo. Universidade de São Paulo. (Dissertação de mestrado). São Paulo.
- Arias, M. C., Francisco, F. de O., & Silvestre, D. (2003). O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In *Apoidea neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. Criciúma: Editora UNESC.
- Ayres, C. F. J.; Melo-Santos, M. A. V.; Solé-Cava, A. M. & Furtado, A. F. (2003). Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 40 (4), 430–435.
- Fantinatti, E. C. da S. (2009). Relações genéticas de populações de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 do estado do Paraná. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Paraná, Brasil.

- Ferreira, A. D. L. (2016). Variabilidade genética e genotipagem das mutações VAL1016ILE e PHE1534CYS de populações naturais de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) do Paraná, Brasil. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Paraná, Brasil.
- Fonseca, V. de S. (2016). Desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para a genotipagem dos vírus dengue, zika, chikungunya e febre amarela. (Dissertação de mestrado). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz. Salvador.
- Guedes, D. R. D. (2006). Epidemiologia Molecular do *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). (Dissertação de mestrado). FIOCRUZ:Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Departamento de Saúde Coletiva. Brasil.
- Huang, Y. (1979) Medical entomology studies – XI. The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in the Oriental Region with keys to the species (Diptera: Culicidae). *Contributions of the American Entomological Institute*, 15 (6), 9-12.
- Lima, A. C. S. D. (2019). Mecanismos que atenuam o custo de fitness de mutações associadas à resistência a inseticidas em artrópodes: um levantamento bibliográfico. (Dissertação de Trabalho Conclusão do Curso). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- Lima, S. F. D. A. (2010). Variabilidade genética em populações de *Aedes (Stegomyia) Aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) da Amazônia brasileira, por meio de marcadores microssatélites. (Dissertação de mestrado). Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-Inpa. Brasil.
- Lopes, T. B. F., Amaro, T. R., Silva, B. P., Zequi, J. A. C., Vilas-Bôas, G. T., Silva, M. A. N. da, Vilas-Boas, B. T., & da Rosa, R. (2021). Genetic study in *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) from Londrina (Paraná State, Brazil): an approach to population structure and pyrethroid resistance. *Revista Brasileira de Entomologia*, 65.
- Luna, J. E. D., Martins, M. F., Anjos, A. F. D., Kuwabara, E. F., & Navarro-Silva, M. A. (2004). Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 38, 842-843.
- Macoris M. L. G, Andrighetti M. T, Takaku L, Glasser C. M, Garbeloto V. C. & Cirino V. C. B. (1999) Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 33, 521-2.
- Matthews, B. J.; McBride, C. S.; DeGennaro, M.; Despo, O., & Vosshall, L. B. (2016). The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. *BMC Genomics*, 17 (1).
- Marrelli, M. T. (2011). Marcadores moleculares e controle genético de mosquitos vetores. (Dissertação de livre-docência). Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, Brasil.
- Natal, D. (2002). Bioecologia do *Aedes Aegypti*. *Biológico*, 64 (2), 205–207.
- Oliveira, F. S. (2019). Detecção da Mutação *kdr-his* (Knockdown Resistance), associada à resistência a inseticidas piretroides, e prospecção de novos polimorfismos de base única no gene dos canais de sódio de Moscas-dos-Estábulo (*Stomoxys Calcitrans*). (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande.
- Piccoli, C. F. (2010). 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). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Curitiba.
- Silva, M. A. M. da, Silva, G. E. D., Neto, C. J. da S., & Silva, L. V. da. (2021). Wirus - Sistema Especialista para o Diagnóstico de Doenças Transmitidas pelo *Aedes Aegypti*. *Brazilian Journal of Development*, 7 (1), 7048–7067.
- Silva, J. S.; Zilda de, F. M.; Scopel, I. A influência do clima urbano na proliferação do mosquito *Aedes aegypti* em Jataí (GO) na perspectiva da geografia médica. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, 2 (5), 33-49.
- Souza, C. F. M. (2005). Um estudo clínico, bioquímico histoquímico e genético-molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- Taveira, L. A., Fontes, L. R. & Natal, D. (2001). Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Ribeirão Preto: Secretaria de Saúde. Divisão de Controle de Vetores e Animais Peçonhentos.
- Urdaneta-Marquez, L., Bosio, C., Herrera, F., Rubio-Palis, Y., Salasek, M., & Black, W. C. (2008). Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by mitochondrial DNA variation and nuclear single nucleotide polymorphisms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78 (3), 479–491.