



Universidade Nova de Lisboa

***Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas**

Gonçalo Filipe Rocha Seixas

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA**

JANEIRO, 2012



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

***Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas**

Gonçalo Filipe Rocha Seixas

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

Orientador:

Prof. Doutora Carla Sousa (UEIPM/IHMT/UNL)

Co-orientador:

Doutora Patrícia Salgueiro (UEIPM/IHMT/UNL)

*À minha mãe;
Porque mãe há só uma.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível devido ao apoio incondicional de várias pessoas, às quais desejo manifestar a minha gratidão, nomeadamente:

À minha Orientadora, Prof. Doutora Carla Sousa (Grupo de Entomologia Médica da UEIPM/IHMT/UNL), pela confiança depositada em mim, por todo o apoio, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos, pela amizade que partilhámos ao longo destes anos. Agradeço-lhe acima de tudo pela sua enorme paciência para comigo e por me ter introduzido neste mundo fascinante da Entomologia Médica. Mais do que uma “chefinha”, tornou-se uma referência para mim, dando-me a liberdade de cometer os meus próprios erros e de aprender com eles. Graças a ela, estou onde estou.

À minha Co-orientadora, Doutora Patrícia Salgueiro (Grupo de Entomologia Médica da UEIPM/IHMT/UNL), pelos conhecimentos transmitidos, por estar sempre disponível para mim vezes sem conta e acompanhar-me ao longo desta etapa da minha vida. Pela motivação e ânimo para ser um investigador melhor, dia após dia. Ainda por todo o apoio, todas as discussões científicas e pela sua amizade. Não poderia também deixar de agradecer à sua Joaquina, visto ter-me acompanhado desde o princípio deste trabalho, mesmo que dentro da barriga da sua mãe.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento deste trabalho, através do projecto PTDC/SAL-EPI/115853/2009.

Ao Doutor João Piedade (Grupo de Virologia da UPMM/IHMT/UNL) por me ter recebido no seu laboratório e conseqüentemente ter permitido a realização deste trabalho.

À Técnica Teresa Venneno pelo apoio incondicional durante o processo de clonagens, por toda a ajuda prestada e por todos os ensinamentos.

Ao grande “Mestre” do laboratório, Engenheiro José Luís Vicente (Grupo de Entomologia Médica da UEIPM/IHMT/UNL) que desde o primeiro dia contribuiu para a minha formação laboratorial, estando sempre disponível para me ajudar em qualquer situação. Agradeço-lhe ainda pelo companheirismo, momentos de descontração, mesmo que seja a discutir qual é o verdadeiro Glorioso de Portugal. A ele, um muito obrigado.

À Prof. Doutora Teresa Novo (Grupo de Entomologia Médica da UEIPM/IHMT/UNL), pela sua amizade, companheirismo e ensinamentos essenciais nos meus primeiros passos no insectário e durante a estadia na Madeira.

À Sónia Costa, pelas constantes risadas e momentos de descontração, por suportar os meus piores dias e pela sua constante amizade.

E porque todos os outros não significam menos, a todos os meus colegas do Grupo de Entomologia Médica, nomeadamente: Leonor Pinho, Diara Rocha, Sofia Branco, Manuel Roque, Eliane de Carvalho, Bruno Gomes, Arlete Troco, Vasco Gordicho e Teresa Nazareth. A todos vocês, um muito obrigado pela vossa amizade.

À Maria Madalena Martins, por todo o apoio a rever esta dissertação, por estar sempre presente durante este tempo e por tudo aquilo que significa para mim.

Ao meu “maninho” e cunhada, por serem um exemplo para mim de perseverança e amor.

À Jéssica, uma lufada de ar fresco na nossa família, pela amizade e companhia durante a escrita deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer aos grandes obreiros deste trabalho: os meus pais. Sem o seu constante apoio, estímulo, amor e ensinamentos, este trabalho não se teria realizado. Sendo eu um fruto do amor nutrido entre ambos, não poderia deixar de lhes agradecer pelo seu eterno apoio, por acreditarem em mim e nas minhas capacidades, e por me tornarem uma pessoa melhor todos os dias.

RESUMO

Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas

Gonçalo Filipe Rocha Seixas

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) é o principal vector da febre amarela e da dengue assim como um agente de incomodidade. Esta espécie invasora está actualmente presente na ilha da Madeira (Portugal). Foi detectada pela primeira vez em Outubro de 2005, mas a origem geográfica da população de mosquitos é desconhecida. Apesar das medidas de controlo vectorial implementadas na região, *Ae. aegypti* continua a expandir-se. Isto pode ser devido à presença de resistência aos insecticidas aplicados no controlo vectorial desta espécie. Assim, os objectivos deste estudo foram: (i) avaliar o nível de sensibilidade da população de *Ae. aegypti* aos insecticidas; (ii) caracterizar possíveis mecanismos de resistência envolvidos e; (iii) estabelecer a sua origem geográfica através do uso de marcadores de ADN mitocondrial (COI e ND4).

De acordo com os resultados dos bioensaios da OMS, *Ae. aegypti* da ilha da Madeira apresenta alta susceptibilidade ao malatião, com taxas de mortalidade das fêmeas expostas de 99.0%. No entanto, a população mostrou um alto nível de resistência ao DDT e permetrina, com valores de mortalidade de 29.4% e 33.3%, respectivamente. Observou-se também uma marcada resistência à deltametrina, com uma taxa de mortalidade de 65.2%. Os ensaios de garrafa do CDC com alfacipermetrina e ciflutrina mostraram uma alta susceptibilidade de *Ae. aegypti* a estes insecticidas, com taxas de mortalidade de 100%.

A sequenciação do gene do canal de sódio de *Ae. aegypti*, local alvo dos piretróides e DDT, revelou a presença de apenas uma mutação associada à resistência, V1016I (mutação *kdr*). A baixa frequência alélica (6%) desta mutação sugere que outros mecanismos podem estar presentes na resistência a estes insecticidas.

Ambos os genes COI e ND4 apresentaram níveis baixos de variabilidade genética consistente com a recente introdução de *Ae. aegypti* na ilha. Observou-se dois haplótipos mitocondriais. A rede de haplótipos de ambos os genes sugere dois cenários para o estabelecimento de *Ae. aegypti* na região: i) ocorreram pelo menos duas introduções independentes correspondendo a cada haplótipo; ii) o estabelecimento de ambos os haplótipos ocorreu simultaneamente, no mesmo evento de colonização. Baseado na distribuição geográfica dos haplótipos e da mutação *kdr* observada na ilha, assim como a população humana migrante da Madeira, o Brasil e a Venezuela são os locais mais prováveis de origem da população de *Ae. aegypti* local.

A frequência dos alelos *kdr* e análise filogeográfica suportam a hipótese de que a resistência a insecticidas detectada na população da ilha da Madeira já existia na população de *Ae. aegypti* que colonizou a região.

PALAVRAS-CHAVE: *Aedes aegypti*, resistência a insecticidas, marcadores mitocondriais, origem geográfica.

ABSTRACT

Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera, Culicidae) from Madeira Island: geographical origin and insecticide resistance

Gonçalo Filipe Rocha Seixas

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) is the primary vector of urban yellow fever and dengue viruses as well as a nuisance agent. This invasive species is currently present in Madeira Island (Portugal). It was first detected in October 2005 but the geographic origin of this mosquito population is unknown. Despite the vector control measures implemented in the region, *Ae. aegypti*, seems to be spreading. This may be due to the presence of resistance to insecticides.

The aims of this study were: (i) to measure the susceptibility level of *Ae. aegypti* population to insecticides; (ii) to characterize possible resistance mechanisms involved and; (iii) to establish the geographical origin of *Ae. aegypti* present in Madeira Island through the use of mitochondrial DNA markers (COI and ND4)..

According to WHO bioassay results, *Ae. aegypti* from Madeira island presents high susceptibility to malathion, with mortality rates of exposed females of 99.0%. However, the population showed a high resistance level to DDT and permethrin, with mortality values of 29.4% and 33.3%, respectively. There was also a marked resistance to deltamethrin, with a mortality rate of 65.2%. The CDC bottle assays with alpha-cypermethrin and cyfluthrin showed a high susceptibility of *Ae. aegypti* to these insecticides, with mortality rates of 100%.

Sequencing of the DDT/pyrethroid insecticide target site at the voltage-gated sodium channel gene of *Ae. aegypti* identified the presence of only one resistance-associated mutation, V1016I (*kdr*-mutation). This mutation showed a reduced allele frequency (6%), which suggests the presence of other insecticide resistance mechanisms rather than *kdr*.

Both COI and ND4 presented low levels of nucleotidic variability, consistent with a recent introduction of *Ae. aegypti* in the island. Two mitochondrial haplotypes were found. The haplotype network of the COI and ND4 genes suggest two scenarios for the establishment of *Ae. aegypti* in the region: i) two independent introductions corresponding to each haplotype; ii) the establishment of both haplotypes simultaneously at the same colonization event. Based on the geographic distribution of the haplotypes and the *kdr*-mutation detected in the island, and the origin of the migrant human population of Madeira, Brazil and Venezuela are the most likely source-places of the local *Ae. aegypti*.

The frequency of the *kdr* alleles and the phylogeographic analysis support the assumption that the resistance to insecticides detected in the population of Madeira Island already exist in the individuals that colonized the region.

KEYWORDS: *Aedes aegypti*, insecticide resistance, mitochondrial markers, geographical origin.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE GERAL.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	2
1.1.1. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i>	5
1.1.2. Origem e distribuição actual.....	7
1.1.2.1. <i>Aedes aegypti</i> na ilha da Madeira.....	8
1.1.3. Importância médica de <i>Aedes aegypti</i>	9
1.1.3.1. Dengue.....	9
1.1.3.2. Febre amarela.....	10
1.1.3.3. Chikungunya.....	11
1.2. Estudos genéticos populacionais.....	12
1.2.1. ADN mitocondrial.....	14
1.3. Controlo vectorial de <i>Aedes aegypti</i>	16
1.3.1. Controlo ecológico.....	17
1.3.2. Controlo biológico.....	18
1.3.3. Controlo genético.....	18
1.3.4. Controlo químico.....	19
1.3.4.1. Reguladores do crescimento.....	20
1.3.4.2. Insecticidas.....	20
1.4. Resistências a insecticidas em mosquitos e seus mecanismos.....	22
1.4.1. Resistência metabólica.....	24
1.4.2. Resistência por alteração do local alvo.....	26
1.4.2.1. Resistência "knock-down".....	26
1.4.2.2. Acetilcolinesterase.....	30
1.4.2.3. Receptores do ácido gama-aminobutírico.....	30
1.4.3. Métodos de detecção de resistências a insecticidas.....	30
2. OBJECTIVOS.....	35

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1. Caracterização da ilha da Madeira.....	40
3.2. Material biológico.....	41
3.3. Testes de sensibilidade a insecticidas.....	42
3.3.1. Ensaio padronizado da OMS a tempo/concentração diagnóstico	43
3.3.2. Ensaio de garrafa do CDC	44
3.4. Conservação dos mosquitos.....	45
3.5. Análises moleculares.....	46
3.5.1. Extração de ADN genómico.....	46
3.5.2. Detecção de mutações <i>kdr</i> em <i>Aedes aegypti</i>	47
3.5.2.1. Amplificação do exão 20, intrão e exão 21	48
3.5.2.2. Detecção de fragmentos por gel de agarose.....	48
3.5.3. Análise de genes mitocondriais.....	49
3.5.3.1. Amplificação do gene mitocondrial COI.....	49
3.5.3.2. Amplificação do gene mitocondrial ND4.....	50
3.5.4. Detecção de fragmentos por gel de agarose	51
3.5.5. Purificação e sequenciação dos produtos de PCR.....	51
3.5.6. Alinhamento de sequências.....	52
3.5.7. Clonagem para determinação de sequências problemáticas de <i>kdr</i> e COI.....	52
3.6. Análise e tratamento dos resultados.....	55
3.6.1. Bioensaios	55
3.6.2. Análises moleculares.....	56
4. RESULTADOS.....	58
4.1. Bioensaios da OMS e ensaios de garrafa CDC.....	59
4.2. Análise genética.....	65
4.2.1. Detecção de mutações <i>kdr</i>	65
4.2.2. Análise de genes mitocondriais.....	67
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	79
5.1. Bioensaios para determinação dos níveis de sensibilidade de <i>Aedes aegypti</i> a insecticidas.....	80
5.2. Detecção de mutações <i>kdr</i> associadas a resistências a insecticidas.....	83

5.3. Origem geográfica da população de <i>Aedes aegypti</i> da ilha da Madeira.....	86
5.4. Conclusões finais.....	90
5.5. Perspectivas futuras.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ÍNDICE DE FIGURAS.....	114
ÍNDICE DE TABELAS.....	116
ANEXOS.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Adenina

AChE – Acetilcolinesterase

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Bti – *Bacillus thuringiensis israelensis*

C - Citosina

CDC - “Centers for Disease Control and Prevention”

COI - Subunidade 1 do citocromo c oxidase

CHIKV – “Chikungunya virus”

ddH₂O – Água bidestilada

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DENV – “Dengue virus”

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DRADR – Direcção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural

e.g. – *exempli gratia* – por exemplo

EDTA –Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA – Estados Unidos da América

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

G - Guanina

GABA – Receptor do ácido gama-aminobutírico

GSTs – Glutatião S-Transferases

HCL – Ácido clorídrico

H₂O – Água

i.e. – *id est* – isto é

IASAUDE – Instituto de Administração da Saúde e Assuntos Sociais da Região Autónoma da Madeira

IGOT – Instituto de Geografia e Ordenamento do Território

IGRs – “Insect Growth Regulators”

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IPTG – “Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside”

Kdr – “Knockdown resistance”

LB – “Luria-Bertrani”

LC – “Lethal Concentration”

LT – “Lethal Time”

min – Minutos

M – Molar

mM – Milimolar

ml – Mililitro

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

NaCl – Cloreto de sódio

Numts – “Nuclear mitochondrial pseudogenes ”

ND4 - Subunidade 4 do enzima dinucleótido de nicotinamida e adenina desidrogenase

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de bases

PCR – “Polymerase Chain Reaction ”

pH – Potencial hidrogeniónico

RAM – Região Autónoma da Madeira

RAPD – “Random Amplified Polymorphic DNA ”

RIDL – “Release of Insects Carrying a Dominant Lethal ”

rpm – Rotações por minuto

seg - Segundos

SIT – “Sterile Insect Technique”

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SPSS – “Statistical Package for the Social Sciences”

UNL - Universidade Nova de Lisboa

T - Timina

TBE – Tris/Borato/EDTA (solução tampão constituída por base Tris, ácido bórico e EDTA)

TSS – “Transforming & Storing solution”

X-Gal – “5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside”

YFV – “Yellow fever virus”

μ l – Microlitro

$^{\circ}$ C – Graus centígrados

1.INTRODUÇÃO

1.1. O mosquito *Aedes aegypti*

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linneaus, 1762) pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera e família Culicidae (Tabela 1), esta última um dos grupos de artrópodes com maior importância médica e veterinária. Esta família inclui cerca de 3500 espécies e subespécies distribuídas por todos os continentes, excepto na Antártica e em algumas ilhas, podendo ser encontradas abaixo do nível do mar até altitudes superiores a 3000 metros (Marquardt, 2010). A família dos culicídeos subdivide-se em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. Os géneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* são aqueles que apresentam maior número de espécies e subespécies com relevância para a saúde humana.

Tabela 1. Posição sistemática do género *Aedes* de acordo com a classificação de Richards e Davies (1977).

Taxonomia	
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Diptera
Família	Culicidae
Subfamília	Culicinae

As formas adultas de *Ae. aegypti*, tal como os restantes membros da Família Culicidae, apresentam um par único de asas, característica partilhada pela maior parte dos Diptera. Tal como em qualquer outra espécie de culicídeo, machos e fêmeas distinguem-se pelas antenas plumosas, no caso dos machos, e pilosas no caso das fêmeas (Figura 1). Os machos alimentam-se apenas de néctares. As fêmeas, para além de néctar, necessitam também de refeições sanguíneas periódicas para o desenvolvimento dos seus ovos. Apenas as espécies da subfamília Toxorhynchitinae e escassas espécies das restantes subfamílias não partilham esta característica. Espécies cujas fêmeas são capazes de efectuar, pelo menos, uma postura de ovos sem necessitar de ingerir uma refeição sanguínea são denominadas de autogénicas. Todo o mosquito adulto fêmea utiliza o seu proboscis (Figura 3), uma estrutura composta por vários

estiletos, para efectuar a sua refeição sanguínea (Figura 2). Os mosquitos são designados de solenofágicos (“capillary feeders”) por se alimentarem directamente a partir dos capilares sanguíneos. No processo de procura do capilar e durante a ingestão de sangue, o mosquito injecta saliva no hospedeiro. Esta saliva contém substâncias anestésicas e anticoagulantes. É também durante a inoculação de saliva que ocorre a transmissão de vírus e outros agentes patogénicos para um novo hospedeiro. O facto de os mosquitos adultos fêmeas serem hematófagos é que os torna importantes vectores de doenças e agentes de incomodidade (Capinera, 2008). Entre as doenças transmitidas por mosquitos destacam-se a malária, febre amarela, dengue, filarioses, entre outras.



Figura 1. – Representação em mosquitos das antenas plumosas dos machos e antenas pilosas das fêmeas. Adaptado de WHO (1992).

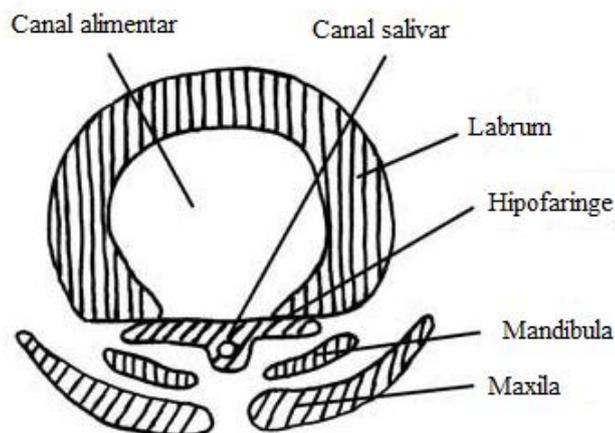


Figura 2. – Representação de um corte transversal do proboscis de um mosquito fêmea. Adaptado de Marquardt (2010). O lábio representa a bainha que envolve estas estruturas (não apresentado na figura).

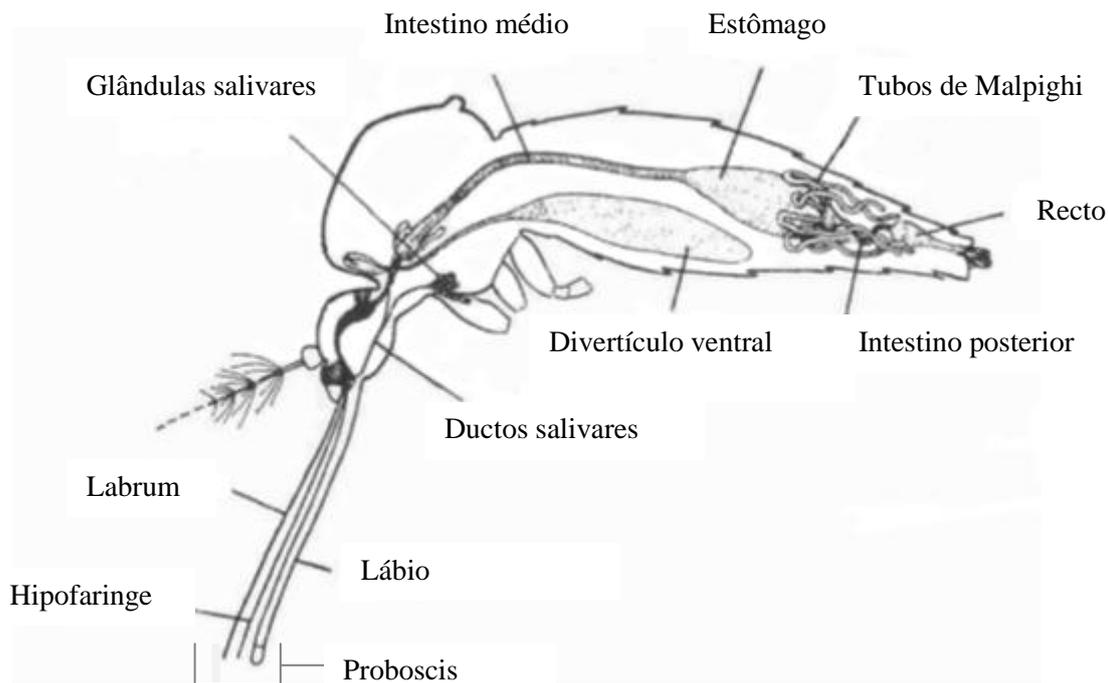


Figura 3. - Anatomia interna geral de um mosquito fêmea. Adaptado de Service & Townson (2002).

Aedes aegypti é considerado o principal vector de três importantes doenças virais – dengue (vírus da família *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, DENV), febre amarela (vírus da família *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, YFV) e chikungunya (vírus da família *Togaviridae*, género *Alphavirus*, CHIKV). Trata-se de um mosquito de cor escura de fácil identificação, visto que apresenta no seu tórax, nomeadamente no escudo, escamas brancas dispostas em linhas laterais longitudinais formando um desenho que lembra uma lira (Figura 4).



Figura 4.- Imagem do mosquito *Aedes aegypti*. Retirado de www.britannica.com/EBchecked/media/116888/Aedes-aegypti-mosquito-a-carrier-of-yellow-fever-and-dengue; Acedido em 7 de setembro de 2011.

Aedes aegypti caracteriza-se por ser uma espécie com hábitos sinantrópicos (vivem próximos de habitações humanas), endofílicos (repousam no interior de habitações/instalações animais) e antropofílicos (apresentam preferência por se alimentarem em humanos) (Jansen e Beebe, 2010). Assim, as fêmeas alimentam-se preferencialmente em humanos, sendo que, se necessário, também se poderão alimentar noutros vertebrados. Estas apresentam actividade de picada diurna e podem alimentar-se, fora ou dentro das habitações, num ou em vários hospedeiros durante o mesmo ciclo gonotrófico (tempo que decorre desde o início da procura de um hospedeiro para efectuar a refeição sanguínea até à postura dos ovos) (Jansen e Beebe, 2010). O padrão de picada apresenta em regra dois picos de actividade: um a meio da manhã e outro ao final da tarde (Halstead, 2008). Os locais preferidos para o repouso dos adultos são, geralmente, abrigados e escuros. A esperança média de vida das fêmeas é aproximadamente de 8-15 dias e para os machos de 3-6 dias, dependendo de vários factores como a humidade, nutrição e temperatura ambiente (Donalísio e Glasser, 2002). A dispersão dos adultos é habitualmente limitada, aproximadamente 30-50 metros por dia para as fêmeas, o que significa que uma fêmea raramente visita mais do que duas ou três casas na sua vida (Reiter *et al.*, 1995). A distância percorrida pelas fêmeas pode estar relacionada com a disponibilidade de criadouros e por isso esta pode ser muito mais longa (Halstead, 2008).

1.1.1. Ciclo biológico de *Aedes aegypti*

Como todos os mosquitos, *Ae. aegypti* apresenta uma fase imatura aquática e uma fase adulta aérea (Figura 5). O ciclo inicia-se com a oviposição, durante a qual a fêmea deposita os seus ovos individualmente em águas paradas e limpas, preferencialmente em criadouros feitos pelo Homem. Nestes incluem-se, frequentemente, vasos de plantas, pneus, baldes ou qualquer recipiente que se encontre dentro ou na periferia do domicílio. Os ovos são colocados na superfície da água ou perto dela, demorando dois a três dias a eclodir (Wong *et al.*, 2011). Estes ovos têm uma particularidade importante: resistem à dessecação durante longos períodos de tempo e eclodem quando submergidos em água. Destes ovos eclodem larvas de primeiro estado, que se alimentam da matéria orgânica presente no criadouro, e sofrem

três mudas até atingirem o quarto estado de desenvolvimento. A larva em último estado sofre uma metamorfose transformando-se em pupa. À temperatura de 25°C o período larvar dura, em média, sete a nove dias. O mosquito permanece na fase de pupa cerca de dois dias. Nesta fase, considerada de quiescente, os culicídeos não se alimentam mas movimentam-se, geralmente, em resposta a estímulos. Das pupas emergem os mosquitos adultos, que vão copular e alimentar-se de néctares açucarados (machos e fêmeas) e, no caso das fêmeas, de refeições sanguíneas.

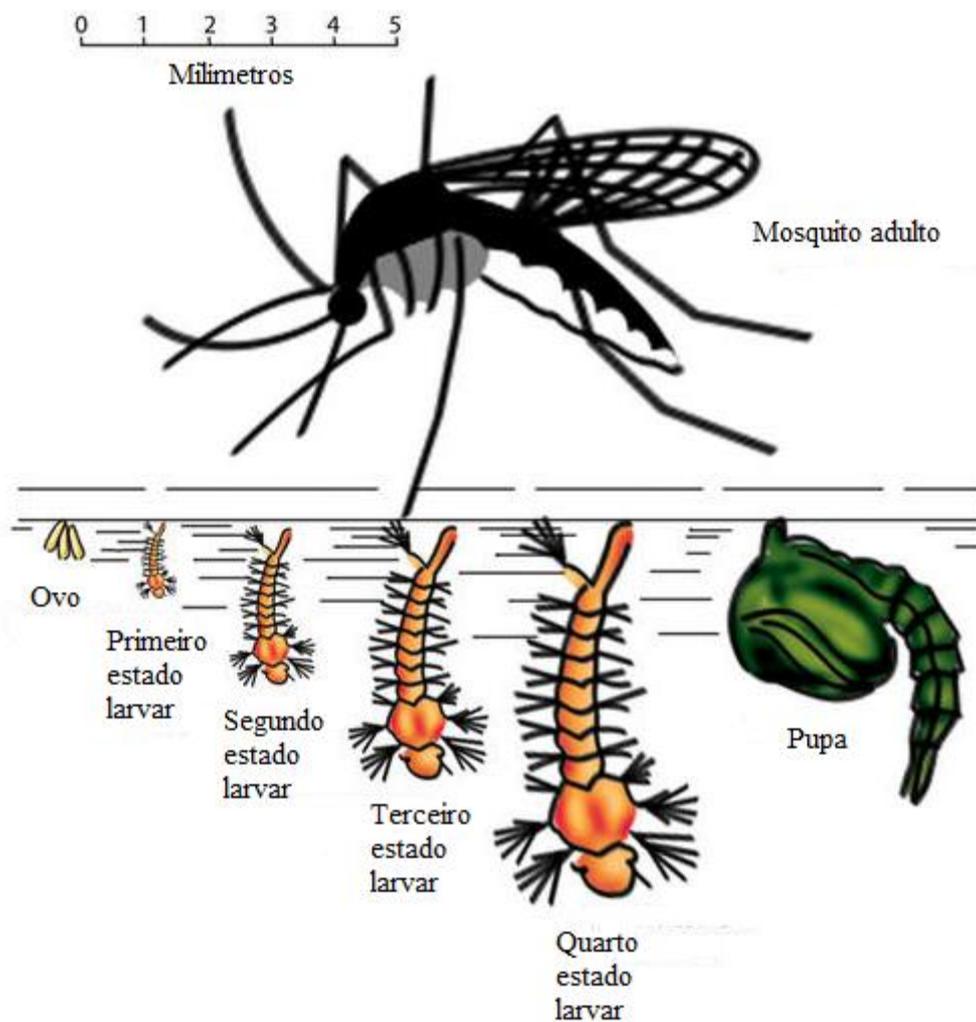


Figura 5. - Representação do ciclo biológico de *Ae. aegypti*. Adaptado de www.trbunadonorte.com.br/noticia/dengue-transmissao-facil-combate-dificil/176665; acessado em 7 de setembro de 2011.

1.1.2. Origem e distribuição actual

A espécie *Ae. aegypti* é originária de África, onde a sua forma silvática e ancestral, *Aedes aegypti formosus*, é enzoótica nas regiões Central e Oriental. Esta forma silvática é considerada um mosquito não antropofílico e apresenta reduzida importância médica. Uma forma mais clara de *Ae. aegypti* tornou-se doméstica e mais adaptada ao habitat humano, sendo abundante em aldeias e cidades na África Ocidental, onde é conhecida como *Ae. aegypti aegypti*, o vector de epidemias urbanas de febre amarela. Devido à sua capacidade de procriar em águas armazenadas para consumo ou para higiene pessoal, e aos ovos resistentes à dessecação, *Ae. aegypti aegypti* é capaz de sobreviver às longas viagens marítimas, o que terá facilitado a sua introdução nos continentes Asiático e Americano. É provável que esta introdução tenha começado depois das viagens feitas pelos portugueses, na época dos Descobrimentos. O estabelecimento de rotas comerciais ao largo do Cabo da Boa Esperança entre a Europa, a Índia e o Extremo Oriente, a expansão colonial Europeia pelas Américas durante o século XVI e o início do tráfico de escravos (Halstead, 2008), contribuíram decididamente para a expansão geográfica desta espécie. Assim, durante os séculos XV-XVII a espécie deverá ter invadido o Novo Mundo distribuindo-se não só pelas zonas costeiras como também pelo interior do continente. Colonizou toda a América do Sul e existem registos que a colocam em áreas tão a Norte como Filadélfia ou Nova Iorque (Lounibos, 2002). Pensa-se que durante o mesmo período tenha atingido a Península Ibérica onde permaneceu até aos meados do século passado (Costa *et al.*, 1956; Ribeiro e Ramos, 1999; Eritja *et al.*, 2000; Almeida, *et al.*, 2008). Presume-se que *Ae. aegypti* tenha chegado à Austrália com a primeira frota em 1787, atingindo a Ásia apenas no século XIX (Lounibos, 2002).

Assim, a partir da sua origem afro-tropical *Ae. aegypti* apresenta, actualmente, uma distribuição cosmotropical. No presente, tal como no passado, esta expansão está relacionada com a actividade humana. O Homem favorece esta dispersão e estabelecimento de populações destes mosquitos através da disponibilidade de criadouros larvares (baldes, pneus, contentores artificiais), através de transporte marítimo ou aéreo de ovos para outros lugares do mundo, e através do aumento da urbanização sem condições sanitárias, gerando as situações ideais para a criação destes

mosquitos (Jansen e Beebe, 2010). A actividade humana é portanto determinante para a proliferação e disseminação das populações de *Ae. aegypti* (Williams *et al.*, 2010).

Embora *Ae. aegypti* fosse comum na região da bacia do Mediterrâneo antes da Segunda Guerra Mundial, desapareceu do sul da Europa e do norte de África no período de pós-guerra. A explicação para tal não é muito clara, embora este desaparecimento esteja provavelmente relacionado com os esforços para erradicação da malária e com o uso generalizado de DDT (Jansen e Beebe, 2010).

Nos últimos 25 anos, tem havido um aumento da área de distribuição de *Ae. aegypti* e da actividade epidémica do vírus da dengue. A emergência e reemergência da actividade epidémica destas doenças causaram muito debate em relação ao potencial papel do clima e das alterações climáticas na mudança da epidemiologia da doença. Vários estudos retratam o papel do clima (condições padrão das condições meteorológicas ao longo do tempo) e das condições meteorológicas (eventos locais diários na atmosfera) na determinação da distribuição geográfica futura de *Ae. aegypti* (Beebe *et al.*, 2009). No entanto, a natureza doméstica desta espécie exerce, provavelmente, mais influência na sua distribuição do que o clima ou as suas variáveis (Jansen e Beebe, 2010).

1.1.2.1. *Aedes aegypti* na ilha da Madeira

A espécie *Ae. aegypti* foi identificada pela primeira vez na ilha da Madeira em 2005 (Margarita *et al.*, 2006), não existindo algum registo anterior em estudos realizados entre 1977-1979 (Capela, 1981). No decurso de queixas efectuadas pela população humana da freguesia Santa Luzia da cidade do Funchal, e após a identificação de um elevado número de pacientes que recorriam aos serviços de saúde com sobre lesões dermatológicas devidas a picadas de insectos, a presença de *Ae. aegypti* foi pela primeira vez assinalada na região.

O controlo vectorial que foi implementado na ilha da Madeira, após o registo da presença desta espécie, baseia-se fundamentalmente na redução dos criadouros larvares, utilização de insecticidas para formas imaturas e adultas, e educação para a saúde com o objectivo de elucidar a população sobre métodos de protecção pessoal e de estratégias

para a limitação da proliferação do mosquito. No entanto, a população de *Ae. aegypti* continua em expansão (Almeida *et al.*, 2007). Durante três anos (2006-2008), a população de *Ae. aegypti* espalhou-se na cidade do Funchal e, em 2008, foi detectada em dois municípios vizinhos: Câmara de Lobos (Oeste) e Caniço (este) (Gonçalves *et al.*, 2008).

Até aos dias de hoje não há registo, na região autónoma da Madeira, de casos autóctones de arboviroses transmitidas por esta espécie de mosquito. No entanto, à semelhança do que aconteceu, em 2009, em Cabo Verde, a possibilidade de ocorrência de um surto arboviral parece plausível (WHO, 2009b). De igual modo, o risco de reintrodução desta espécie no sul da Europa onde as condições climáticas são favoráveis para o seu estabelecimento, é um cenário possível. Isto é devido ao tráfico marítimo e aéreo que ocorre entre a ilha, Portugal continental e outros países Europeus, fruto do turismo, principal fonte de receitas da região (Almeida *et al.*, 2007).

1.1.3. Importância médica de *Aedes aegypti*

Como referido anteriormente, *Ae. aegypti* é o principal responsável pela transmissão de várias doenças, entre elas a febre amarela e a dengue, sendo também um importante agente de incomodidade provocando reacções alérgicas aquando da sua picada.

1.1.3.1. Dengue

O vírus da dengue é um grande problema de saúde pública em regiões tropicais (Figura 6) causando anualmente 50 a 100 milhões de casos de febre de dengue e 500,000 casos de febre hemorrágica de dengue (FHD) (Gubler, 1998, Sylla *et al.*, 2009). Nos trópicos é a segunda mais importante doença transmitida por vectores (a seguir à malária) e globalmente, a FHD é também uma das principais causas de hospitalização e morte. Durante o século XX, a área geográfica afectada pela dengue aumentou, sendo na actualidade o arbovírus mais distribuído pelo mundo. A expansão da dengue desde a Segunda Guerra Mundial está ligada ao ressurgimento de *Ae. aegypti* como resultado da redução dos programas de controlo, do crescimento da população de refugiados e

urbanizações, e do aumento do tráfego comercial (Halstead, 1992). Paralelamente, o transporte internacional de pneus usados, contendo ovos de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), e a introdução desta espécie em novos territórios, terá igualmente contribuído para expansão da doença.

Até ao momento não existe uma vacina disponível nem tratamento curativo, e a única forma de impedir a morte, em casos severos, é a detecção precoce da doença. Assim, a única forma de prevenir a doença baseia-se no controlo vectorial (Vanlerberghe *et al.*, 2011).



Figura 6. – Representação dos países ou áreas em risco de transmissão de dengue (regiões situadas entre as linhas negras). Laranja – países ou áreas onde já ocorreram surtos de dengue. Retirado de <http://www.who.int/ith/en/>. Acedido em 7 de setembro de 2011.

1.1.3.2. Febre amarela

A febre amarela foi, durante muitos anos, a infecção arboviral humana mais importante. Desde o Século XV que têm sido descritas epidemias com sintomatologia semelhante à febre amarela em regiões da América Central e do Sul, e na África Ocidental (Figura 7) (Solomon e Mallewa, 2001). Em meados de 1960, havia 150 casos reportados globalmente por ano. Em 1990, o número de casos já rondava os 2500, sendo que 90% dos casos ocorriam em África (Monath *et al.*, 1997a). Na Ásia, apesar da ampla distribuição de *Ae. aegypti*, não existem registos de surtos desta arbovirose. Para tal facto têm surgido várias explicações, entre elas a existência de diferenças entre as

é transmitido por mosquitos que pertencem ao género *Aedes*: *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Esta última espécie é abundante e amplamente distribuída em áreas urbanas da Europa e dos Estados Unidos da América (EUA) tendo sido o vector responsável pelo recente surto de doença ocorrido em Itália (Cavrini *et al.*, 2009).

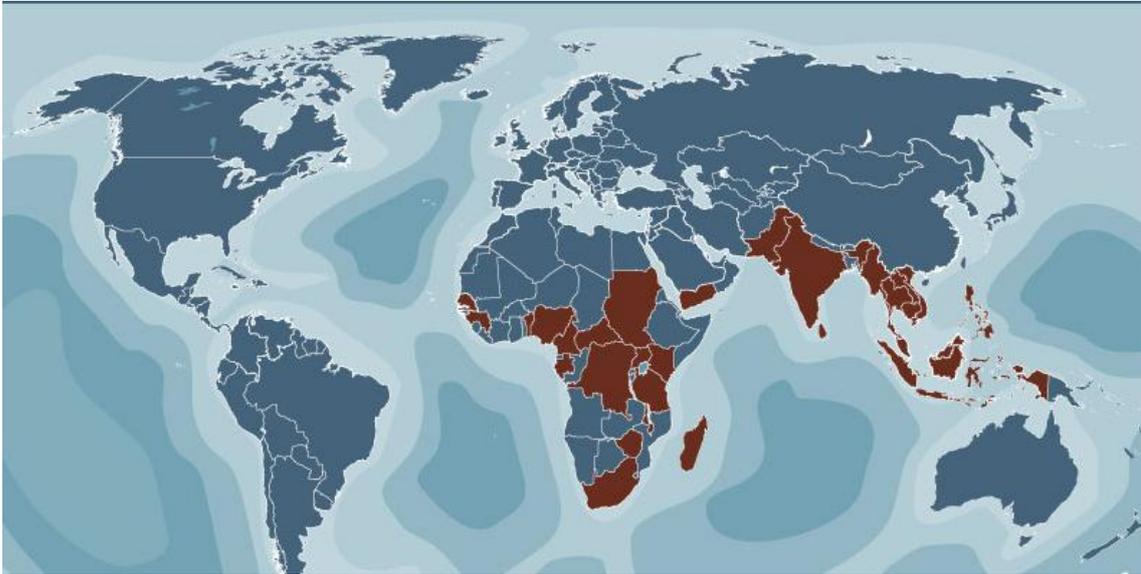


Figura 8. – Representação da distribuição geográfica do vírus chikungunya. Países com actividade endémica do vírus a vermelho. Retirado de <http://www.mosquitaire.it/cms/website.php?id=/en/tigermosquitos/chikungunya.htm>. Acedido em 7 de setembro de 2011.

1.2. Estudos genéticos populacionais

A capacidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética. A informação acerca da variação genética dentro e entre as populações é importante para compreender a história evolutiva de populações de mosquitos e a epidemiologia das doenças por estes transmitidas (Yan *et al.*, 1998). O estudo da estrutura genética de populações é essencial para o entendimento da dinâmica das populações de *Ae. aegypti* e para a análise de factores responsáveis pela sua adaptação ecológica (Hiragi *et al.*, 2009).

No seu sentido mais amplo, a genética populacional é o estudo das diferenças genéticas que ocorrem naturalmente entre os organismos. As diferenças genéticas entre os organismos da mesma espécie designam-se de polimorfismos genéticos, enquanto que as diferenças genéticas que se acumulam entre espécies constituem a divergência

genética. Assim, a genética populacional engloba o estudo destes dois tipos de variabilidade, levando especialistas a desenvolver métodos para a quantificar e a explicar a sua origem, a sua manutenção e importância para a evolução. É sobre a variabilidade genética de uma população que irão actuar diversos fenómenos biológicos: mutação, deriva genética, migração, e selecção natural, fenómenos estes responsáveis pela adaptação, especiação e evolução das espécies (Hartl, 2000). Para o estudo destes fenómenos utiliza-se uma variedade de marcadores moleculares, cada um com as suas vantagens e desvantagens. Um marcador molecular é uma porção de ácido nucleico (*e.g.* ADN), ou o produto de uma porção de ácido nucleico (proteínas) do organismo em estudo. Um marcador para ser considerado bom e informativo deve ser variável, abundante, e de comportamento previsível em relação à sua taxa de mutação, padrão de herança e localização cromossómica, e de fácil análise (de Meeûs *et al.*, 2007). Entre estes marcadores encontramos marcadores citoplasmáticos (*e.g.* ADN mitocondrial), marcadores nucleares dominantes (*e.g.* RAPD), marcadores nucleares co-dominantes (*e.g.* isoenzimas e microsatélites) (de Meeûs *et al.*, 2007). A escolha do marcador depende do objectivo do estudo, do nível de observação desejada e da espécie estudada (Roderick, 1996).

É com base em estudos de genética populacional que se tem avaliado a estrutura populacional de *Ae. aegypti* ao longo da sua área de distribuição, estimando taxas de dispersão a níveis micro e macrogeográficos e analisado os padrões de expansão desta espécie (Wallis *et al.*, 1984; Huber *et al.*, 2002). Estudos similares mostraram que os factores sociais, ambientais e as intervenções humanas (urbanização, medidas de controlo) afectam a estrutura populacional deste vector (Scarpassa *et al.*, 2008), fornecendo novas ferramentas para melhorar a vigilância e controlo vectorial desta espécie. Este tipo de estudos permitem ainda elucidar como características genéticas de populações de mosquitos podem estar relacionadas com a competência vectorial e/ou a resistência a insecticidas (Paduan *et al.*, 2006). Similarmente, estudos comparativos entre características comportamentais e moleculares são efectuados com o objectivo de desenvolver estratégias inovadoras de controlo. No âmbito de todos estes tipos de abordagem, *Ae. aegypti* é uma das espécies mais estudadas (Paduan *et al.*, 2006; Paupy *et al.*, 2010).

De entre os marcadores moleculares utilizados em estudos de genética populacional de *Ae. aegypti*, dar-se-á particular relevância ao ADN mitocondrial.

1.2.1. ADN mitocondrial

O ADN mitocondrial animal tem uma estrutura circular, aproximadamente de 16000 pb (Figura 9), codificando, geralmente, genes envolvidos na tradução mitocondrial, transporte de electrões e fosforilação oxidativa (Ballard e Rand 2005). A sua elevada taxa de evolução e o seu tamanho efectivo permite a recuperação do padrão da história evolutiva da espécie sem grandes esforços de sequenciação (Hurst e Jiggins 2005).

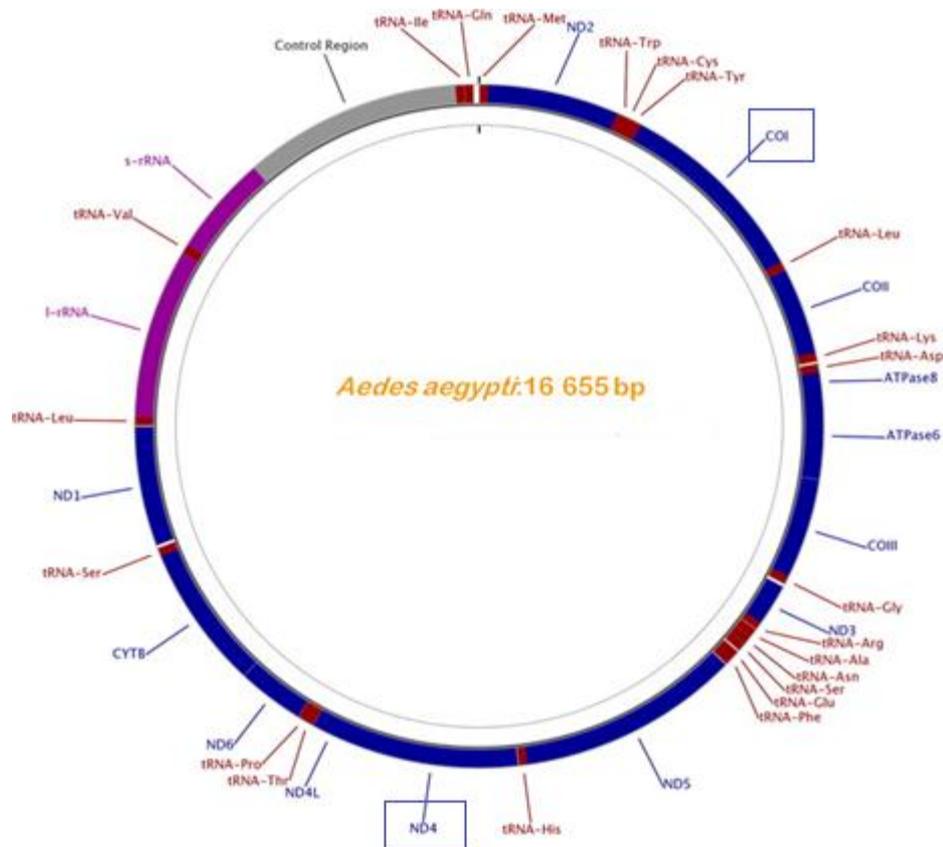


Figura 9. – Representação esquemática do ADN mitocondrial de *Ae. aegypti* com referência à localização dos genes COI e ND4 (dentro das caixas). Adaptado de Behura, 2006.

O ADN mitocondrial é útil para inferir relações filogenéticas, para determinar padrões de genética populacional e de evolução molecular, tendo sido utilizado como marcador molecular em estudos de ecologia de insectos (Behura, 2006). O ADN mitocondrial tem uma estrutura haplóide, é herdado maternalmente, não apresenta recombinação e replica-se independentemente do genoma nuclear. Mais ainda, tem uma diferente taxa de evolução, dez vezes mais rápida do que o ADN nuclear, facilitando a determinação de filogenia entre organismos relacionados, independentemente de efeitos de adaptação e/ou selecção (Krzywinski *et al.*, 2006). Os padrões de variação nas frequências de haplótipos de ADN mitocondrial podem ser usados para estimar taxas de fluxo genético entre populações, tamanho efectivo da população e sua história evolutiva (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000; Avise, 2009).

O facto do ADN mitocondrial ser herdado maternalmente leva a que a diferenciação desta molécula equivalha a estudar uma população de fêmeas. Isto, combinado com o facto de o ADN mitocondrial ser haplóide, faz com que o tamanho efectivo da população estudada seja quatro vezes menor do que quando se utiliza um marcador nuclear diplóide (Haavie *et al.*, 2000).

O complexo do enzima dinucleótido de nicotinamida e adenina desidrogenase (NADH) é composto por um número vasto de subunidades, muitas das quais codificadas pelo ADN mitocondrial (Paduan e Ribolla, 2008). Entre os genes mitocondriais, o gene da subunidade quatro do enzima dinucleótido de nicotinamida e adenina desidrogenase (ND4) já mostrou ser um excelente marcador para analisar a variabilidade genética e inferir eventos de colonização em várias populações de *Ae. aegypti* (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002; Bosio *et al.*, 2005; Costa-da-Silva *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2006; Bracco *et al.* 2007; Paduan e Ribolla, 2008; Urdaneta-Marquez, *et al.*, 2008).

A subunidade um do citocromo c oxidase (COI) é a catalisadora terminal na cadeia respiratória mitocondrial e está envolvida no transporte de electrões e na translocação de protões através da membrana. O gene COI é um dos marcadores mitocondriais utilizados, habitualmente, para estudos genéticos evolutivos porque é o maior dos genes que codifica as subunidades das citocromo oxidase mitocondriais (Clary e Wolstenholme, 1985; Beard *et al.*, 1993). Para além disso, a correspondente

sequência proteica contém, não só, domínios funcionais muito conservados como regiões variáveis.

O gene COI tem sido utilizado em estudos intra- e interespecíficos de mosquitos *Aedes* (Walton *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2005). Beebe e colaboradores (2005) sugerem que o gene COI é uma ferramenta viável para o estudo da diversidade genética e da expansão de *Ae. aegypti* assim como para a delimitação do seu percurso expansionário e monitorização de incursões para novas regiões geográficas.

Embora o ADN mitocondrial seja um excelente marcador, o seu uso não é totalmente isento de dificuldades. A demonstração recente da presença de pseudogenes mitocondriais no genoma nuclear de vários organismos é, para estudos populacionais, uma realidade indesejada. Os pseudogenes nucleares mitocondriais (Numts – “nuclear mitochondrial pseudogenes”) são uma fonte potencial de contaminação durante a amplificação de ADN. Esta possibilidade exige uma interpretação cuidadosa dos resultados que apresentem heteroplasmia (Parr *et al.*, 2006). Os Numts resultam de translocações de sequências do genoma mitocondrial para o genoma nuclear e que, uma vez integradas, constituem sequências não funcionais que acumulam mutações livremente. O perigo de amplificar o Numt além de, ou em vez de, a sequência alvo de ADN mitocondrial pode confundir seriamente as análises filogenéticas e de genética populacional (Sorenson e Quinn, 1998; Bensasson *et al.*, 2001). A sua presença pode-se manifestar de várias maneiras incluindo: bandas fantasma na PCR, bandas extra nos perfis de restrição, sequências ambíguas e localização filogenética inesperada (Hlaing *et al.*, 2009). No entanto, é possível resolver este problema através da clonagem das sequências com ambiguidades, certificando assim a fidedignidade do resultado.

1.3. Controlo vectorial de *Aedes aegypti*

No geral, as doenças transmitidas por mosquitos reemergiram como um problema significativo de saúde pública devido a vários factores: a falta de progressos no desenvolvimento de vacinas, a emergência de resistências aos fármacos por parte dos agentes patogénicos, o aumento da resistência dos mosquitos aos insecticidas e o declínio das condições socioeconómicas em vários países que limita a monitorização destas doenças e os esforços para o controlo vectorial (Gubler, 1998).

Ao longo da história, o controlo de populações de *Ae. aegypti* é rico em insucessos e sucessos como por exemplo, no caso do Vietname (Kay e Nam, 2005) em que a utilização de mesociclopes predadores de larvas de mosquito está a reduzir efectivamente a transmissão de dengue naquele país. Os esforços para erradicar os vectores de dengue nas Américas resultaram na eliminação de populações de *Ae. aegypti* da maioria dos neotrópicos em 1970. No entanto, após a interrupção destes programas seguiram-se várias reintroduções que levaram ao restabelecimento das populações vectoras (Morrison *et al.*, 2008). Actualmente, o principal objectivo da maioria dos programas de controlo é reduzir o mais possível a densidade das populações de vectores e mantê-las a níveis baixos. Também podem ser feitos esforços, onde exequíveis, para reduzir a longevidade dos mosquitos fêmeas adultos através do uso de insecticidas, com o objectivo de reduzir o risco de transmissão de doenças. Ao escolher o método, ou a combinação de métodos, de controlo, deve-se considerar a ecologia e o comportamento da espécie alvo, os recursos disponíveis para a sua implementação, o contexto cultural/social e económico no qual as medidas de controlo vão ser aplicadas, assim como a viabilidade de aplicá-las em tempo útil e sustentá-las pelo período necessário. Os métodos de controlo vectorial recomendados para *Ae. aegypti* incluem a eliminação ou gestão de criadouros larvares, aplicação de larvicidas químicos, uso de agentes biológicos e a aplicação de adulticidas (WHO, 2009a).

1.3.1. Controlo ecológico

O controlo ecológico procura mudar as condições do meio físico e/ou biótico da espécie alvo, a fim de torná-lo adverso ao seu desenvolvimento ou proliferação. Este tipo de controlo pode ainda ter como objectivo diminuir o contacto entre humanos e o vector, o que, por consequência, irá diminuir a exposição do Homem ao agente patogénico, contribuindo assim para a diminuição das taxas de transmissão da doença em causa (WHO, 2009a).

Um dos mais eficientes métodos de controlo de *Ae. aegypti* é feito através da eliminação de criadouros que são favoráveis à oviposição e que permitem o desenvolvimento das fases imaturas. Embora esta estratégia seja usada com sucesso, está limitada ao nível do compromisso da comunidade e ao facto de que por vezes os

contentores mais produtivos são, frequentemente, os que não podem ser inutilizados ou esvaziados (e.g. poços de reserva de água). Nestes casos, o tratamento com larvicidas é permitido e aprovado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), podendo ser utilizados compostos como o temefos, permetrina, piriproxifeno assim como o biocida *Bacillus thurigiensis israelensis* (*Bti*) (Goldberg, 1979) (McCall e Kittayapong, 2007).

1.3.2. Controlo biológico

O controlo biológico envolve a redução de uma população por acção de predadores, patogénicos, parasitas, competidores, ou toxinas produzidas por um organismo. Este controlo, normalmente, tem a vantagem, sobre os insecticidas convencionais, de ser específico para o seu alvo e de causar poucas alterações noutros organismos. Além disso, é possível que os agentes biológicos possam fornecer um controlo a longo prazo depois de uma única introdução. O controlo biológico tornou-se popular em 1900 quando foi introduzido em vários países um peixe predador de larvas de mosquito, *Gambusia affinis* (Baird e Girard, 1853). Entre 1940 e 1950, com a descoberta e uso do DDT, os insecticidas tóxicos vieram a substituir este controlo biológico. O interesse em usar controlo biológico reemergiu em 1960 quando começaram a surgir preocupações sobre a utilização de insecticidas em larga escala (Marquardt, 2010). Na actualidade, *Bacillus thurigiensis* (*Bti*) e o *Bacillus sphaericus* (Fathy, 2002), são os agentes patogénicos mais utilizados no controlo biológico de *Ae. aegypti* e outros mosquitos vectores de doenças. Na última década a potencialidade de copépodes predadores (*Mesocyclops spp.*, Brown *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 2002) e de fungos entomopatogénicos (*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, Lord, 2005; Thomas e Read, 2007) como agentes patogénicos de mosquitos tem sido largamente explorada (Scholte *et al.*, 2003; Scholte *et al.*, 2004), especialmente no que se refere ao controlo de populações com elevado nível de resistência aos insecticidas químicos (Farenhorst *et al.*, 2009; Kikankie *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2010).

1.3.3. Controlo genético

O controlo genético tem como objectivo provocar ou induzir na espécie-alvo alterações genéticas desvantajosas para esta ou para o agente etiológico que transmite. Em 1955, Knippling propôs o conceito de introduzir insectos estéreis na população

como forma de controlar pragas com importância agrícola, tendo-se chamado a esta técnica SIT (“sterile insect technique”) (Knippling, 1955). É uma técnica baseada na criação em massa, esterilização através de irradiação e libertação de um grande número de machos numa determinada área. Estes machos, ao acasalar com fêmeas selvagens reduzem a capacidade reprodutiva da população selvagem e por consequência o tamanho da população. A erradicação da população selvagem pode ser conseguida com a libertação de um número suficiente de machos estéreis por um determinado período de tempo. Esta técnica é específica para a espécie e não danifica o ambiente. A resistência aos insecticidas da população alvo torna-se irrelevante para o sucesso deste tipo de controlo. Outra técnica, também de controlo genético, é a RIDL (“Release of Insects Carrying a Dominant Lethal”), criada no ano 2000 por Thomas *et al.*, (2000), que incorpora um novo sistema de separação de sexos para a criação mosquitos machos, em elevado número. Este método baseia-se na produção de mosquitos transgénicos em que as fêmeas apresentam um gene letal, passível de ser reprimido em criação laboratorial (para a manutenção da colónia) mas que quando expresso permite apenas a sobrevivência dos machos (Jansen e Beebe, 2010). Esta técnica está particularmente avançada no desenvolvimento de colónias de *Ae. aegypti* em que as fêmeas produzidas apresentam um fenótipo incapaz de voar devido ao uso de um transgene no promotor do músculo que interfere no voo (Fu *et al.*, 2010).

Uma outra estratégia de controlo está a ser desenvolvida baseada no uso de uma bactéria intracelular, endosimbionte, *Wolbachia*. Estudos laboratoriais recentes mostram que certas estirpes de *Wolbachia* podem reduzir a capacidade do mosquito para transmitir doenças, inibindo directamente a transmissão do patógeno ou encurtando o seu tempo de vida (Hancock *et al.*, 2011). No entanto, a libertação de mosquitos infectados com *Wolbachia* requer um conhecimento detalhado da dinâmica populacional de *Ae. aegypti* nos possíveis locais de acção (Jeffrey *et al.*, 2009).

1.3.4. Controlo químico

Os químicos permanecem como o mais importante elemento numa abordagem integrada ao controlo vectorial. No entanto, o arsenal de insecticidas seguros e rentáveis decresceu muito, principalmente devido ao aparecimento de resistências a estes compostos e ao abandono do uso de certos produtos por razões de segurança. Os

factores económicos também limitaram o investimento na pesquisa e desenvolvimento de novos compostos para o controlo de vectores com importância médica (Zaim e Guillet, 2002).

1.3.4.1. Reguladores do crescimento

Os Reguladores do Crescimento de Insectos (“IGR – Insect Growth Regulator”) são compostos químicos que inibem a formação de quitina nos estados imaturos, e conseqüentemente, o seu desenvolvimento. Um destes compostos químicos é o pireproxifeno, uma hormona juvenil, análoga à dos insectos, que é activa contra muitos artrópodes. Esta técnica tem sido usada para o controlo de pragas na agricultura nos últimos 15 anos e é extremamente eficaz contra mosquitos. Utilizada em baixas concentrações previne a emergência de *Ae. aegypti*. Doses muito baixas desta hormona podem também afectar os adultos reduzindo a fecundidade e a fertilidade. Tem ainda a vantagem adicional de a fêmea adulta contaminada poder transferir doses efectivas do referido composto para qualquer criadouro que ela visite (McCall e Kittayapong, 2007). Novas fórmulas deste produto têm sido desenvolvidas para prolongar a sua eficácia por mais tempo e deste modo reduzir a necessidade da sua reaplicação (Sihuincha *et al.*, 2005).

1.3.4.2. Insecticidas

Os insecticidas têm um importante papel no controlo vectorial de mosquitos, permanecendo o principal, e por vezes o único meio de controlar vectores e reduzir a transmissão de doenças. Podem ser utilizados na agricultura, indústria e nas habitações humanas e é devido à sua utilização que se deve o grande aumento da produção agrícola no século XX. Segundo a sua natureza química, origem e modo de actuação, os insecticidas podem ser classificados como:

- Organoclorados – Possuem um efeito neurotóxico exercendo a sua acção por contacto e foram os mais utilizados em saúde pública. O organoclorado mais paradigmático é o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano). Este insecticida foi amplamente utilizado no século passado. Nos finais da década de 70, a OMS proibiu a utilização de organoclorados devido aos seus nefastos efeitos ambientais e às resistências existentes

nos mosquitos. Estes insecticidas são utilizados em pulverizações intradomiciliárias podendo permanecer activos durante um ano após a sua aplicação. Actuam nos canais de sódio das células das membranas nervosas alterando o impulso nervoso, provocando paralisia e, subsequentemente, a morte do insecto;

- Organofosfatos – Em regra, os insecticidas desta categoria apresentam uma elevada toxicidade tanto para os insectos como para os mamíferos, até que, em 1950 foi descoberto o malatião, insecticida de largo espectro e baixa toxicidade. Os organofosfatos têm como modo de actuação a inibição do enzima acetilcolinesterase (AChE) e o bloqueio dos impulsos nervosos. Devido ao aparecimento de resistências aos organoclorados, têm sido utilizados como alternativa. No entanto, como a maior parte dos insecticidas, os organofosfatos não são específicos de uma espécie, acabando por eliminar outras inofensivas;

- Carbamatos – São insecticidas que também vão inibir a actividade da AChE tal como os organofosfatos. Têm sido particularmente utilizados em pulverizações intradomiciliárias no controlo da malária em áreas da América Central;

- Piretróides – Os piretróides constituem a nova geração de insecticidas com uma alta toxicidade para insectos e baixa toxicidade para os humanos. São de fácil degradação no ambiente, não se acumulam nos ecossistemas e são uma ferramenta importante para a luta contra os insectos com importância médica. A descoberta, por volta de 1970, da permetrina e da deltametrina, insecticidas com qualidades sem precedentes, incluindo larga margem de segurança, levou ao estabelecimento dos piretróides como uma classe dominante no mundo dos insecticidas. Em 1995, o uso de piretróides representava 23% do mercado internacional de insecticidas (Soderlund, 2008). O local alvo dos piretróides é, tal como o DDT, o canal de sódio das membranas das células nervosas (Figura 10). São utilizados em pulverizações intradomiciliárias e constituem o único grupo de insecticidas licenciados pela OMS para impregnar redes mosquiteiras. Infelizmente, existem vários mecanismos descritos de resistência a estes insecticidas, o que torna a sua utilização cada vez mais ameaçada.

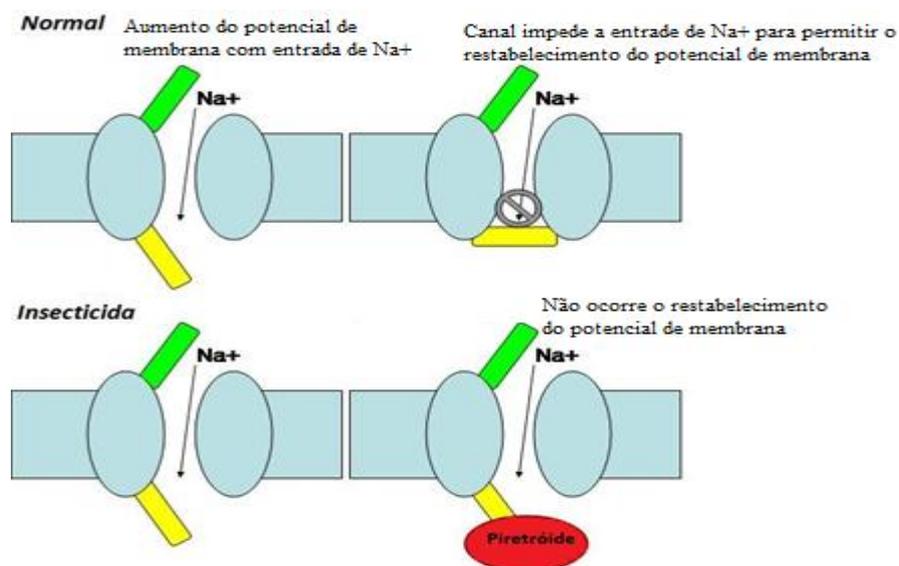


Figura 10. – Representação do modo de acção dos piretróides nas células nervosas. Adaptado de <http://www.entomology.umn.edu/cues/em/MOA.html>. Acedido em 7 de setembro de 2011. Legenda: Na⁺ - Sódio.

O uso de vários insecticidas em modo rotacional é uma estratégia que poderá ser utilizada no futuro de modo a prevenir/atrasar o desenvolvimento e/ou a dispersão de resistências (Hemingway *et al.*, 2004).

1.4. Resistências a insecticidas em mosquitos e seus mecanismos

A necessidade de estratégias efectivas na gestão de resistências aos insecticidas é cada vez mais premente visto que o número de populações de mosquitos resistentes continua a aumentar em todo o mundo, enquanto os recursos referentes a insecticidas eficazes estão a diminuir. O desenvolvimento de tais estratégias tem sido apoiado, entre outros aspectos, pelos recentes avanços no conhecimento da bioquímica e genética molecular dos mecanismos de resistência, assim como, no estudo da ecologia, fisiologia e dinâmica populacional das espécies culicídicidas. Assim, é geralmente recomendada uma estratégia baseada num conhecimento profundo das implicações das resistências aos insecticidas candidatos e da biologia e ecologia da espécie vectora em causa. Nesta

estratégia deve utilizar-se todos os meios disponíveis não químicos de controle (Georghiou, 1994).

A resistência é definida como “a habilidade adquirida de uma estirpe de organismo para sobreviver a doses de um tóxico que mataria a maioria dos indivíduos numa população normal da mesma espécie” (Braga e Valle, 2007).

A resistência a insecticidas é tipicamente caracterizada por uma variedade de alterações moleculares, tais como mudanças transcricionais, amplificação de genes e mutações em regiões codificantes, que resultam no aumento da taxa de desintoxicação de insecticidas (resistência metabólica) ou na perda de sensibilidade dos seus locais alvo (resistência local-alvo) (Vontas *et al.*, 2010) (Figura 11).

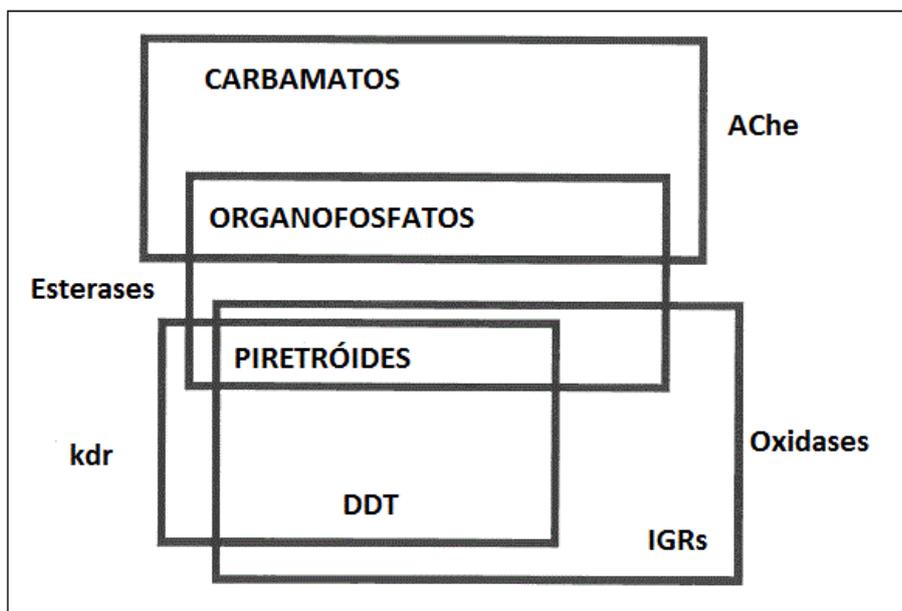


Figura 11. - Representação esquemática dos principais mecanismos envolvidos na resistência às várias classes de insecticidas. Adaptado de Brogdon e McAllister, 1998. Legenda: **AChE** – acetilcolinesterase; **kdr** – “knock-down resistance”; **IGRs** – “Insect Growth Regulators”; **DDT** - Dicloro-Difenil-Tricloroetano.

Estes são os dois principais mecanismos, em populações de mosquitos, que conferem resistência aos insecticidas. Casos pontuais de resistência aos insecticidas baseados em alterações comportamentais também têm sido descritos (Hayes e Wolf, 1997) mas a sua existência é de difícil comprovação e normalmente surge em combinação com outro mecanismo de resistência (Taylor e Headley, 1975).

1.4.1. Resistência metabólica

Os mecanismos mais comuns de resistência metabólica envolvem esterases, glutatíon S-transferases (GSTs) e monooxigenases. A maioria dos casos de resistência metabólica, mas não todos, pode ser detectada através da comparação do nível da actividade destes enzimas entre a população em estudo e uma colónia da mesma espécie tipificada como sensível. Na última década, o conhecimento cada vez mais aprofundado da base molecular destes mecanismos de resistência tem perspectivado a possibilidade de, num futuro próximo, através da manipulação dos padrões de expressão destes sistemas enzimáticos, poder-se restaurar a susceptibilidade aos insecticidas em populações actualmente resistentes (Hemingway, 2000).

A resistência mediada por esterases é comum em vários insectos. As esterases tanto produzem uma resistência de amplo espectro aos insecticidas, através de uma rápida ligação e conseqüente sequestração do composto, como produzem uma resistência de curto espectro, através do metabolismo de uma restrita classe de insecticidas contendo uma ligação éster. Fenómenos de amplificação génica estão, frequentemente, na base da resistência mediada por esterases através de mecanismos de sequestração do composto insecticida. Por outro lado, a presença de resistência como resultado de um aumento da taxa metabólica destes enzimas pode estar associada a mutações em genes estruturais. Este mecanismo envolve principalmente a resistência aos organofosfatos, nomeadamente, o malatião (Hemingway, 2000).

As GSTs são membros de uma grande família de enzimas intracelulares multifuncionais envolvidas na desintoxicação de compostos endógenos e xenobióticos via conjugação do glutatíon, desidrocloração, ou pela actividade do glutatíon peroxidase. As GSTs podem também servir como proteínas de ligação não-enzimáticas (conhecidas como ligandinas), participando no transporte intracelular e processos de sinalização. Esta diversidade de funções enzimáticas e não-enzimáticas está relacionada com a capacidade genética da maioria dos organismos para codificar várias isoformas de GST (Che-Mendoza *et al.*, 2009).

Foram encontrados elevados níveis de actividade de GSTs associados à resistência aos insecticidas em vários insectos. Em mosquitos, a resistência metabólica mediada por GSTs é o maior mecanismo de resistência ao DDT (Hemingway, 2000).

As monooxigenases citocromo P450-dependente formam um importante sistema metabólico envolvido na regulação de títulos de compostos endógenos tais como hormonas (*e.g.* esteróides), ácidos gordos. Estão ainda envolvidas no catabolismo e anabolismo de xenobióticos tais como drogas, pesticidas e toxinas de plantas. Em eucariotas, as P450s encontram-se no retículo endoplasmático e na mitocôndria (Scott, 1999).

Nos insectos, as monooxigenases actuam de modo semelhante participando em mecanismos associados ao crescimento, desenvolvimento, alimentação, resistência e tolerância a insecticidas e toxinas. Além disso, as monooxigenases estão intimamente ligadas à síntese e degradação de hormonas de insecto e feromonas. Por exemplo, indutores (ou inibidores) das P450s podem produzir mudanças no desenvolvimento, morfologia e/ou sobrevivência de insectos holometabólicos, muito provavelmente devido à alteração dos títulos de hormonas via indução ou inibição de uma ou mais P450s (Scott, 1999).

A resistência a insecticidas mediada por monooxigenases é possivelmente o mais frequente tipo de metabolismo encontrado. A importância das monooxigenases na resistência a insecticidas ficou evidente em 1960, quando foi mostrado que a resistência ao carbaril podia ser anulada por um inibidor das P450s (Scott, 1999). A desintoxicação metabólica é frequentemente associada com a actividade das monooxigenases, nomeadamente nos casos de resistência específica aos piretróides. No entanto, esterases não específicas e GSTs elevadas também já demonstraram conferir resistência aos piretróides (Bregues *et al.*, 2003).

1.4.2. Resistência por alteração do local alvo

1.4.2.1. Resistência “knock-down”

Os canais de sódio são proteínas transmembranares responsáveis pelo rápido aumento da fase de potenciais de acção, e são essenciais para a sinalização eléctrica na maioria das células. Em resposta à despolarização da membrana, os canais de sódio abrem (ou ficam activos) e permitem que os iões de sódio entrem na célula, alterando o potencial de membrana. Milissegundos após a activação do canal ocorre a oclusão do canal, um processo conhecido como inactivação rápida que é parcialmente responsável pela última fase do potencial de acção (Figura 10) (Dong, 2007).

Devido a este papel importantíssimo na excitabilidade da membrana, os canais de sódio são o local alvo de várias neurotoxinas, tais como a tetrodoxina, toxinas de escorpião, e batracotoxina, que é produzida por animais e plantas para defesa e predação. Piretrinas insecticidas, encontradas em extractos de flores do género *Chrysanthemum*, também actuam nos canais de sódio. De facto, estes são os principais alvos do DDT e dos piretróides sintéticos modernos, estes últimos derivados estruturais das piretrinas naturais (Dong, 2007).

O uso intensivo de piretróides no controlo de artrópodes levou ao desenvolvimento de resistências a estes compostos. Um importante mecanismo de resistência é conhecido como “knock-down resistance” (*kdr*). Os insectos que exibem *kdr* apresentam uma sensibilidade reduzida do local alvo dos piretróides e DDT, resultado de uma ou mais mutações na proteína do canal de sódio do insecto. O importante papel dos canais de sódio na resistência a insecticidas levou muitos investigadores a estudar a sua estrutura e funcionamento nos insectos (Dong, 2007).

Os piretróides e o DDT têm como alvo o canal de sódio das membranas das células nervosas, que compreende quatro domínios (I-IV), cada um constituído por seis hélices transmembranares (S1-S6) (Figura 12). Os piretróides modificam a cinética dos canais de sódio, atrasando a activação ou a inactivação do canal (Figura 10). A classe de insecticidas piretróides pode ser subdividida em dois grupos: piretróides Tipo I (*e.g.* permetrina) sem grupo alfa-ciano e piretróides tipo II (*e.g.* deltametrina) que apresentam este grupo ciano. Ambos actuam na abertura do canal no potencial de repouso, com consequente despolarização da membrana nervosa e o início de descargas repetitivas

nos motores e sensores dos axónios. Estas descargas continuadas acabam por causar a paralisia e morte do insecto. No entanto, os piretróides classe II prolongam a corrente no canal durante o potencial de acção por um maior período de tempo do que os piretróides tipo I (Hemingway *et al.*, 2004).

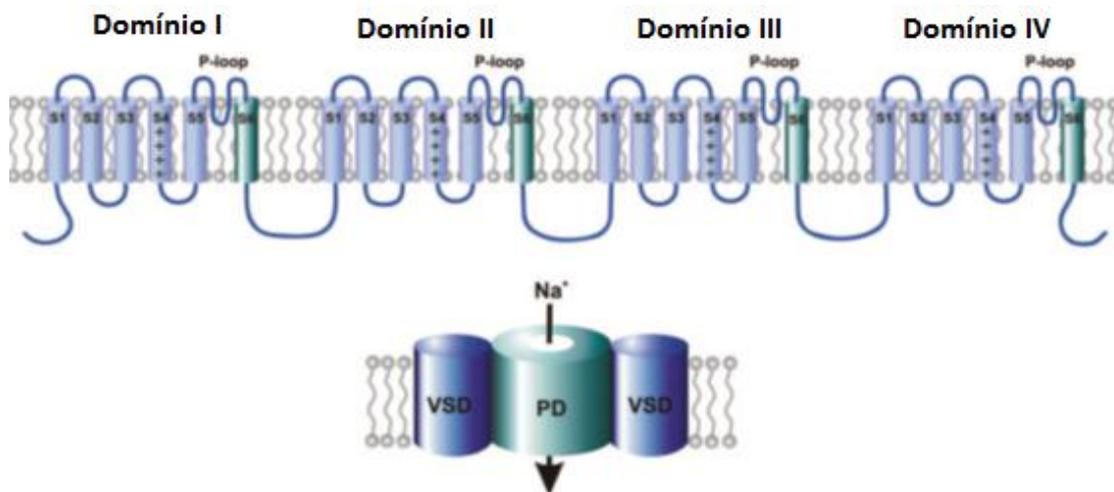


Figura 12. – Representação do canal de sódio, local alvo dos piretróides e DDT. Adaptado de Davies *et al.*, 2007. Legenda: **P-loop** – “phosphate-binding loop”; **VSD** – “voltage sensing domains” constituído pelos S1-S4; **PD** – “central aqueous pore”, estrutura formada pela S5, S6 e P-loop.

A *kdr* ocorre devido à mudança de afinidade entre o insecticida e o seu local alvo no canal de sódio. É possível que um número limitado de mutações no local alvo possa levar à insensibilidade do nervo. No total, cerca de 20 polimorfismos nas sequências de aminoácidos do canal de sódio foram identificados e associados à resistência aos piretróides (Hemingway *et al.*, 2004).

Recentemente, têm sido feitos vários estudos que mostram a associação entre as mutações no canal de sódio e a resistência aos piretróides em várias espécies de mosquitos (Martinez-Torres *et al.*, 1999; Ranson *et al.*, 2000; Diabate *et al.*, 2004; Lynd *et al.*, 2005; Etang *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 2010). Em *Ae. aegypti*, têm sido associadas à resistência por *kdr* várias mutações no gene do canal de sódio (ver Tabela 2), no segmento 6 do domínio II, tais como a G923V, L982W, I1011M, I1011V, V1016I e V1016G (Martins *et al.*, 2009a; Rajatileka *et al.*, 2008; Brengues *et al.*, 2003; Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007), D1794Y entre os segmentos 5 e 6 do domínio IV (Chang *et al.*, 2009), e mais recentemente, F1552C e F1534C no segmento 6 do

domínio III (Yanola *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2010). No entanto, para a maioria destas mutações (G923V, L982W, I1011M, V1016G e D1794Y) ainda existem poucas evidências da sua associação com o fenómeno de resistência aos insecticidas (Harris *et al.*, 2010).

Tabela 2. Representação das mutações *kdr* identificadas em *Ae. aegypti* até ao momento e sua distribuição.

Codão	Exão	Posição	Wyld Type	Mutante		País	Referência	
923	19	IIS5	Gly (G)	GGA	Val (V)	GTA	BR; GF; MR	Bregues <i>et al.</i> , (2003)
982	20	P Loop	Leu (L)	TTA	Trp (W)	TGG	VT	Bregues <i>et al.</i> , (2003)
1011	20	IIS6	Ile (I)	ATA	Met (M)	ATG	BR; GF; MR	Bregues <i>et al.</i> , (2003)
1011	20	IIS6	Ile (I)	ATA	Val (V)	GTA	TAI; AL	Saavedra-Rodriguez <i>et al.</i> , (2007); Rajatileka <i>et al.</i> , (2008)
1016	21	IIS6	Val (V)	GTA	Gly (G)	GGA	TAI; IND	Bregues <i>et al.</i> , (2003)
1016	21	IIS6	Val (V)	GTA	Ile (I)	ATA	AL, MX, MR	Bregues <i>et al.</i> , (2003); Garcia <i>et al.</i> , (2009); Marcombe <i>et al.</i> , (2009)
1534	31	IIIS6	Phe (F)	TTC	Cys ©	TGC	CAI	Harris <i>et al.</i> , (2010)
1794	IV entre a S5 e S6	Asp (D)	GAC	Tyr (Y)	TAC	TW		Chang <i>et al.</i> , (2009)
1552		IIIS6	Phe (F)	TTC	Cys ©	TGC	TAI	Yanola <i>et al.</i> , (2010)

Legenda: Gly – glicina; Val – valina; Leu – leucina; Trp – triptofano; Ile – isoleucina; Met – metionina; Phe – fenilamina; Cys – cisteína; Asp – ácido aspártico; Tyr – tirosina; BR- Brasil; GF – Guiana Francesa; MR – Martinica; VT – Vietname; TAI – Tailândia; AL – América Latina; IND – Indonésia; MX – México; CAI – Ilhas Caimão; TW – Taiwan.

1.4.2.2. Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é o local alvo dos organofosfatos e carbamatos. Esta enzima é a responsável pela degradação da acetilcolina, neurotransmissor que, quando presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso, uma vez que provoca a abertura de canais de sódio na célula pós-sináptica. Numa situação normal, após o fim do estímulo, a acetilcolina é removida por recaptção ou por degradação enzimática, efectuada pela AChE. Os organofosfatos e carbamatos actuam inibindo a AChE e, em consequência, a acetilcolina permanece na fenda sináptica e o impulso não termina, levando à morte do insecto (Braga e Valle, 2007). Nestes casos, a resistência está relacionada com afinidade reduzida da AChE pelo insecticida, o que permite a interrupção normal – ou quase – do estímulo nervoso (Brogdon e McAllister, 1998; Ffrench-Constant *et al.*, 1998; Hemingway, 2000).

1.4.2.3. Receptores do ácido gama-aminobutírico

Os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) são o local alvo dos ciclodienos e organoclorados. Pertencem a uma superfamília de receptores presentes nas junções sinápticas do sistema nervoso central e das sinapses neuromusculares dos insectos (Hemingway, 2000). Os insecticidas actuam sobre os receptores GABA, impedindo a entrada de iões cloro para o meio intracelular e, com isso, provocando a emissão de impulsos espontâneos que levam à contracção muscular, convulsões, paralisia e morte (Braga e Valle, 2007). A resistência conferida por insensibilidade do receptor GABA aos insecticidas já foi associada com uma mutação num único par de bases do receptor que resulta na substituição de um aminoácido (alanina por uma serina) (Hemingway, 2000).

1.4.3. Métodos de detecção de resistências a insecticidas

Existem vários métodos para detectar a existência de resistências a insecticidas numa população de mosquitos, tais como os testes padronizados da OMS, os ensaios de garrafa do CDC (“Centers for Disease Control and Prevention”), ensaios de aplicação tópica, ensaios bioquímicos e técnicas de biologia molecular que identificam a presença

de alterações genéticas que conferem resistência. A nível operacional, na monitorização de resistências a efectuar no âmbito de programas de controlo vectorial, os testes padronizados da OMS e os ensaios de garrafa do CDC são os métodos de eleição. No entanto, estes testes não permitem quantificar com exactidão a dose necessária de insecticida que induz a morte do insecto (determinada no caso dos ensaios de aplicação tópica). Apresentam ainda a desvantagem de estimarem apenas a proporção de resistência fenotípica existente na população vectora, não esclarecendo sobre o tipo de mecanismo envolvido na resistência, tal como ocorre nos ensaios bioquímicos e técnicas de biologia molecular.

Os princípios básicos pelos quais se regem os testes da OMS e do CDC são idênticos. Ambos são uma ferramenta de vigilância para detectar mudanças na sensibilidade aos insecticidas em populações de vectores, determinando a concentração do composto e o tempo necessário a que o insecto tem de estar exposto para que ocorra a sua morte. No entanto, os testes padronizados da OMS são aplicáveis a formas imaturas (larvas) e adultas, enquanto os ensaios com garrafa do CDC são aplicáveis apenas a insectos alados. Em ambos os tipos de ensaio, os mosquitos adultos são colocados em contacto com o insecticida através da sua introdução em tubos (testes OMS) ou garrafas (testes CDC) cujas paredes internas estão cobertas com um papel impregnado com o composto a testar (papeis fornecidos pela própria OMS) ou que foram revestidas por uma solução insecticida (testes de garrafa do CDC). A absorção do insecticida por parte do mosquito é efectuada através do contacto tarsal com as superfícies tratadas.

Os testes da OMS podem ser divididos em dois tipos de ensaio: aqueles em que se determina a linha de base de resposta ao insecticida (“baseline test”) e aqueles designados de testes diagnóstico. Nos primeiros, grupos de 15 a 25 mosquitos são expostos a concentrações crescentes de um determinado insecticida por um período fixo de tempo ou, alternativamente, expostos a uma concentração fixa de um composto por períodos crescentes de tempo, até um total mínimo de 100 insectos por concentração/tempo de exposição. A taxa de mortalidade a cada concentração/tempo é determinada e transposta para um papel de probabilidade logaritmica. É através de uma análise de regressão “probit” entre estes dois parâmetros (concentração/tempo de

exposição e mortalidade) que se determina a existência ou não, na população vectora em estudo, de resistência ao insecticida testado (Figura 13). Em populações susceptíveis, é de igual modo através da análise das rectas de regressão entre estas duas variáveis que se efectua a estimativa da concentração/tempo de exposição correspondente a 50% e 99,9% de mortalidade, ou seja à LC/LT₅₀ e LC/LT_{99,9}.

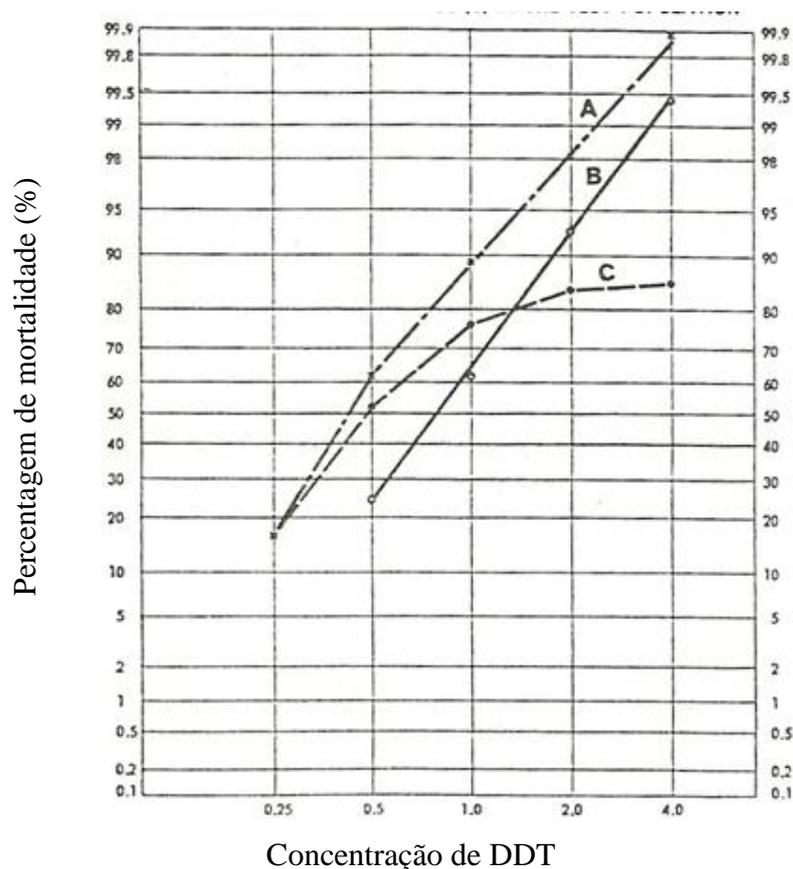


Figura 13. Gráfico representativo de uma análise de regressão para susceptibilidade (A), para variações sazonais ou tolerância (B) e para resistência parcial (C) na população em estudo. Adaptado de WHO (1970).

Nos testes de diagnóstico, os mosquitos a serem ensaiados são expostos a papéis impregnados com insecticida, a uma concentração diagnóstico e durante um período de tempo definidos pela OMS. Considera-se que a população culicídicida em estudo é susceptível quando a percentagem de mortalidade em 100 ou mais mosquitos testados for superior a 98%, e resistente quando esta percentagem é inferior a 80%. Quando a taxa de mortalidade se situa entre estes dois valores (*i.e.* desde 80 até 97%) existe a

possibilidade da população ser resistente ao insecticida em estudo, sendo neste caso necessário efectuar um teste “baseline”, nos moldes acima mencionados.

Os ensaios de garrafa do CDC permitem estabelecer os níveis de resistência a insecticidas em populações naturais ou colonizadas em insectário, podendo-se testar qualquer insecticida a qualquer concentração, de uma forma simples e rápida. Esta versatilidade é uma vantagem sobre os testes OMS, para os quais apenas existe disponível uma gama limitada de insecticidas às concentrações diagnóstico, sendo a aquisição de papéis impregnados com outros compostos ou a concentrações diferentes, efectuada apenas através de pedidos excepcionais. Os ensaios de garrafa consistem na medição do tempo que leva à morte de um insecto pelo efeito do insecticida. A mortalidade obtida nestes ensaios é uma medida do tempo necessário para que o insecticida penetre o mosquito, atravesse os tecidos intervenientes, chegue ao local alvo e actue. Qualquer mecanismo que previna ou atrase o insecticida de atingir o seu objectivo, está a contribuir para a resistência ao insecticida em análise. Nestes testes, que apresentam algum paralelismo com os ensaios “diagnóstico” da OMS, grupos de 25 fêmeas de mosquito são introduzidas em garrafas de 250 ml, cada uma delas previamente revestida com uma solução insecticida. Esta solução insecticida deve ser efectuada à concentração diagnóstico para a espécie em causa. A concentração diagnóstico é a concentração mínima necessária para matar 100% dos mosquitos de uma colónia susceptível, no tempo de saturação. O tempo de saturação e a concentração diagnóstico correspondem ao “ponto de saturação” a partir do qual, teoricamente, maiores concentrações de insecticida não influenciam o tempo requerido para matar 100% dos indivíduos de uma colónia susceptível. (Figura 14). Após a introdução dos mosquitos nas garrafas impregnadas determina-se a cada 10 minutos a taxa de mosquitos mortos. Tal como nos testes “baseline” da OMS, a determinação de existência de resistência ou susceptibilidade será definida de acordo com a curva da taxa de mortalidade observada ao longo do tempo (Figura 15). A percentagem de indivíduos resistentes na população em estudo é estimada através da diferença observada entre a taxa de mortalidade determinada em ensaios com espécimes dessa população e aquela obtida com exemplares de uma colónia susceptível da mesma espécie.

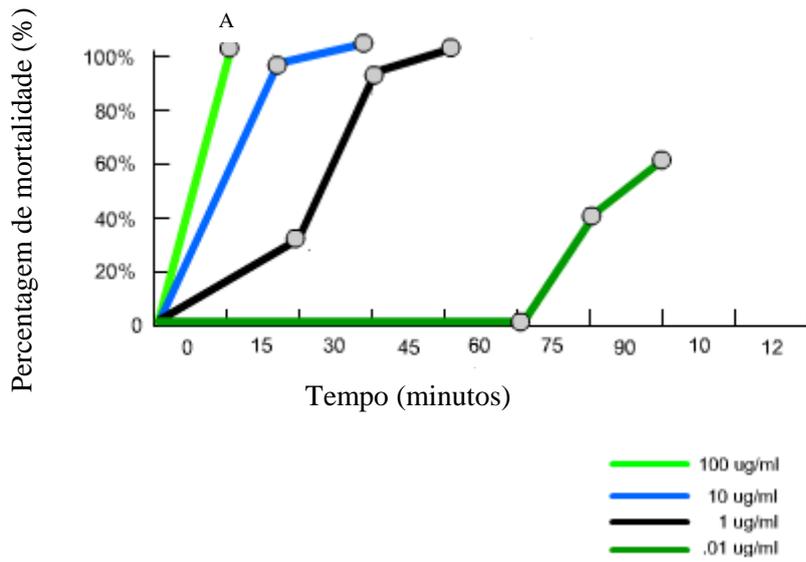


Figura 14. – Determinação do “ponto de saturação” de um ensaio de garrafa do CDC. Cada cor representa uma concentração diferente de inseticida. A – “ponto de saturação”. Adaptado de http://www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/interpretation/interp_1.htm. Acedido em 8 de setembro de 2011.

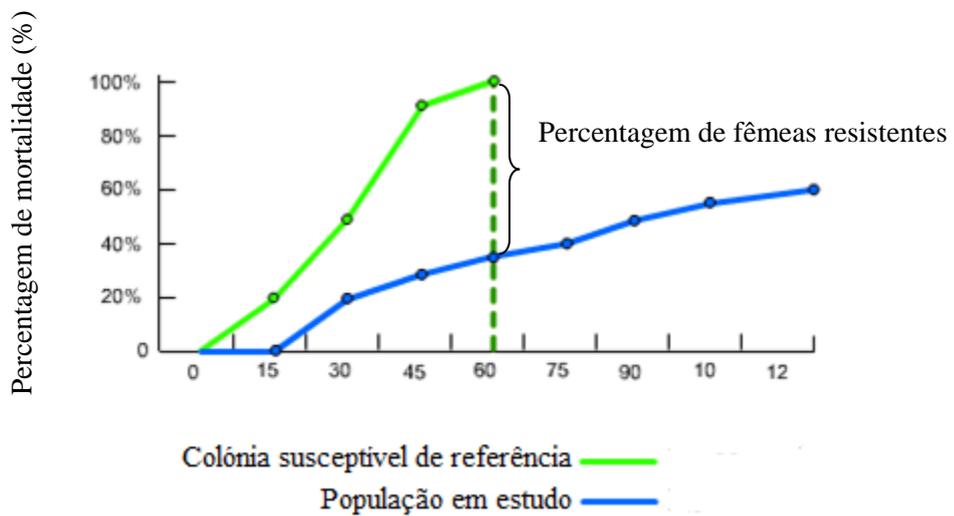


Figura 15. – Determinação da porcentagem de indivíduos resistentes na população culicídicida em estudo através da aplicação de um teste de garrafa do CDC. Adaptado de http://www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/interpretation/interp_2.htm. Acedido em 8 de setembro de 2011.

2. OBJETIVOS

Os agentes patogénicos transmitidos por vectores continuam a ser responsáveis por doenças em todo o Mundo. A OMS estima que existam, por ano, 300 milhões de casos de malária, 50-100 milhões de casos de dengue e 120 milhões de casos de filarioses (Tabachnick, 2010).

Um dos vectores e agentes de incomodidade mais conhecido e distribuído mundialmente é o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), o mais importante transmissor do vírus da febre amarela e da dengue. É considerada uma espécie muito invasiva, possuindo portanto uma elevada plasticidade ecológica que lhe permite a adaptação com facilidade a vários ambientes.

A sua história de colonização fala por si só. Originário de África, *Ae. aegypti* invadiu outros continentes através das trocas comerciais e navios de escravos (Jansen e Beebe, 2010). Nas últimas décadas, a rápida expansão de populações urbanas, a proliferação de criadouros de *Ae. aegypti*, e o insucesso das medidas de controlo aumentaram o risco de transmissão de doenças por esta espécie (Reiter, 2001).

Aedes aegypti invadiu recentemente a ilha da Madeira, instalando-se inequivocamente em território português após mais de 5 décadas sem registo da sua presença. As características ambientais e climáticas da ilha da Madeira tornaram possível a colonização e o estabelecimento da espécie na região, apesar das severas medidas de controlo vectorial imediatamente implementadas pelas autoridades madeirenses após o primeiro registo da sua presença, em 2005. Tal acontecimento é considerado um perigo para a saúde pública, não só devido ao aumento do risco de surgir um surto epidémico de uma arbovirose, como devido ao nível de incomodidade causada pela picada deste insecto e ao facto de, frequentemente, actuar como promotor de doença. As alterações climáticas, como o aumento das temperaturas e das chuvas, são frequentemente associadas à expansão geográfica das áreas de distribuição dos vectores e vírus por estes transmitidos. No caso de *Ae. aegypti* este factor pode potenciar a sua já elevada capacidade de dispersão mediada pelo Homem. Assim, o volume de trocas comerciais e tráfego de passageiros entre a Madeira, Portugal Continental e outros países do Sul da Europa pode aumentar o risco de reintrodução deste mosquito na Europa Ocidental. As relações estreitas entre Portugal e países onde ocorrem frequentemente surtos de dengue, como o Brasil, poderão também contribuir

para a importação de um vírus transmitido por esta espécie, tornando plausível a possibilidade de ocorrer um surto arboviral, à semelhança daquele que afectou recentemente Cabo Verde (WHO, 2009b). Face a este possível cenário é fundamental avaliar quais as ferramentas de controlo vectorial de que se dispõe para, em caso de necessidade, se implementarem estratégias para a rápida redução das densidades do vector.

A maioria dos programas de controlo de *Ae. aegypti* apoia-se essencialmente no uso de insecticidas (WHO, 2009a). No entanto, o desenvolvimento de resistência aos insecticidas em mosquitos vectores é comum e a evolução e o modo de dispersão destas resistências é motivo de preocupação para o controlo de todas as infecções transmitidas por culicídeos (Ranson *et al.*, 2010). Foi neste âmbito que se iniciou o estudo da sensibilidade da população de *Ae. aegypti* a uma gama variada de insecticidas. Colocou-se então duas questões: (i) qual o mecanismo subjacente à resistência fenotípica possivelmente detectada e; (ii) terá esta resistência resultado das medidas de controlo baseadas em insecticidas implementadas logo após a detecção do mosquito, ou constituirá uma assinatura genética da população originária de onde provieram os exemplares de *Ae. aegypti* que colonizaram a ilha?

Assim, este trabalho teve como objectivos gerais (i) analisar os níveis de sensibilidade da população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira a vários insecticidas, determinando quais os possíveis mecanismos e origens de resistência a estes associados, e; (ii) determinar a origem geográfica da população de *Ae. aegypti* que colonizou a ilha da Madeira . Cada um destes objectivos gerais foi desenvolvido de acordo com os seguintes objectivos específicos:

- 1) Avaliação dos níveis de sensibilidade e mecanismos de resistência da população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira:
 - a. Análise da sensibilidade de insectos adultos aos insecticidas DDT, malatión, permetrina, deltametrina, cipermetrina e ciflutrina;
 - b. Determinação da presença de polimorfismos *kdr*, responsáveis por mecanismo de resistência do tipo local-alvo.
- 2) Estabelecimento da origem geográfica da população *Ae. aegypti* da ilha da Madeira:
 - a. Amplificação e análise de parte de ADN mitocondrial referente ao gene

codificante da subunidade quatro do enzima dinucleótido de nicotinamida e adenina desidrogenase (ND4);

- b. Amplificação e análise de parte de ADN mitocondrial referente ao gene que codifica a subunidade um do citocromo c oxidase (COI).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da ilha da Madeira

A ilha da Madeira, situada no Oceano Atlântico a oeste da costa africana, constitui a principal ilha (740,7 Km²) da Região Autónoma da Madeira (RAM), à qual pertencem ainda a ilha de Porto Santo, as ilhas Desertas e as ilhas Selvagens (Figura 16).



Figura 16. – Representação da localização da ilha da Madeira (identificada pela seta). Adaptado de www.quinta-das-colmeias.com/en/local/travel.html; Acedido em 11 de janeiro de 2012.

A ilha da Madeira é de origem vulcânica, caracterizada por apresentar, segundo o sistema de Köppen¹, com um clima temperado a subtropical atlântico. Apresenta temperaturas médias a rondar os 23°C de máxima e os 16°C de mínima, humidade relativa média do ar de cerca de 67% e pode ser considerada de moderadamente chuvosa. As suas paisagens únicas possibilitam-lhe ser um destino turístico muito apreciado por vários motivos, como o exotismo da flora, as condições de acolhimento e a autenticidade do folclore e cultura madeirense².

¹ www.physicalgeography.net/fundamentals/7v.html; koeppen-geiger.vu-wien.ac.at/; acedido em 13 de janeiro de 2012.

² <http://www.visitmadeira.pt>; acedido em 13 de janeiro de 2012

A ilha é uma das maiores da Macaronésia com uma população residente de 246689 pessoas e uma densidade populacional de 300 habitantes por km² (superior à média do país e mesmo da União Europeia), sendo que 75% da população habita em apenas 35% do território. A capital da ilha da Madeira e da região Autónoma é a cidade do Funchal. É o principal centro urbano e porto da ilha, situa-se na costa sul (32°38'N, e 16°55'W) e dista cerca 980 Km de Lisboa, 400 Km da ilha Gran Canaria, e 880 Km da ilha de Santa Maria, a mais próxima do arquipélago dos Açores. A cidade do Funchal concentra 45% da população (99214 habitantes), numa área com 76,15 Km², com uma densidade populacional de 1306,4 habitantes/Km² (Melim, 2009).

3.2. Material biológico

O material biológico utilizado nos ensaios de sensibilidade aos insecticidas e nos estudos moleculares proveio de prospecções larvares efectuadas na ilha da Madeira que decorreram entre 20 a 31 de Julho e 6 a 23 de Outubro de 2009 e de colheitas de ovos com “ovitrap” (armadilhas que mimetizam criadouros artificiais e que permitem a colheita de posturas de ovos de culicídeos) efectuadas entre Novembro e Dezembro do mesmo ano. As colheitas foram efectuadas por uma equipa mista de colectores do Instituto de Administração da Saúde e Assuntos Sociais da Região Autónoma da Madeira (IASAUDE-RAM) e do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT).

Os exemplares foram capturados em duas áreas:

- Câmara de Lobos
- Funchal

Pesquisou-se a presença de formas imaturas de mosquitos através da utilização de caços e pipetas, em potenciais criadouros larvares nas duas áreas mencionadas. A colheita de ovos com armadilhas foi efectuada apenas na zona do Funchal.

As formas imaturas de culicídeos, colhidas na prospecção activa dos potenciais biótopos larvares, foram transportadas vivas para o laboratório da Direcção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DRADR), onde se procedeu à sua criação em insectário até à fase adulta. Os ovos colhidos nas “ovitrap” foram transportados para Lisboa (para o IHMT) e, tal como as larvas capturadas na prospecção activa de

criadouros, foram criadas em insectários até à emergência dos adultos. Na forma alada todos os exemplares foram então morfológicamente identificados ao estereomicroscópio de acordo com a chave de Ribeiro e Ramos (1999). Os exemplares identificados como pertencentes à espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1972), independentemente do seu local de origem, foram isolados e mantidos em gaiolas separadas de acordo com o dia de emergência. Como alimento para estes espécimes apenas foi disponibilizada uma solução açucarada a 10%. As condições ambientais durante a fase de criação e bioensaios de sensibilidade foram constantes, sendo caracterizadas por $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $70\pm 5\%$ de humidade relativa e um fotoperíodo de 12horas noite/12horas dia.

3.3. Testes de sensibilidade a insecticidas

O objectivo dos testes de sensibilidade a insecticidas, no âmbito da implementação ou monitorização de um programa de controlo, é a detecção da presença de resistências numa população vectora o mais cedo possível para que possam ser tomadas medidas alternativas de controlo (WHO, 1998). Para analisar os níveis de sensibilidade da população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira foram efectuados dois tipos de testes: os ensaios padronizados da OMS a tempo/concentração diagnóstico e os testes de garrafa do CDC. Os primeiros foram executados nos laboratórios da DRADR, durante os meses de Julho e Outubro de 2009, e os segundos nos insectários do IHMT, em Fevereiro e Março de 2010. Os ensaios foram executados em colaboração com os técnicos e investigadores do IASAUDE e do IHMT. Todos os ensaios decorreram de acordo com os respectivos protocolos e em ambiente climatizado. Em ambos os testes foram seleccionadas para exposição aos insecticidas apenas fêmeas, não alimentadas, com 2 a 5 dias de vida. A exposição foi efectuada a concentrações e por períodos de tempo designados de diagnosticantes (WHO, 1998; CDC³). Nos testes OMS utilizaram-se como controlo machos com a mesma idade e proveniência das fêmeas testadas, enquanto nos testes de garrafa foi utilizada uma mistura de machos e fêmeas, também de idade e proveniência idênticas às das fêmeas expostas aos insecticidas.

³ <http://www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/assay/>

3.3.1. Ensaios padronizados da OMS a tempo/concentração diagnóstico

Com este tipo de testes avaliou-se os níveis de sensibilidade da população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira aos seguintes insecticidas, nas concentrações designadas como diagnosticantes pela OMS (WHO, 1998): DDT 4% (organoclorado); malatião 5.0% (organofosfato); permetrina 0.75%, (piretroide de classe I) e deltametrina 0.05% (piretroide de classe II). O tempo de exposição das fêmeas a cada um dos insecticidas foi o recomendado pela OMS para os insecticidas mencionados, ou seja, 1 hora.

Os ensaios foram executados de acordo com os protocolos da OMS (WHO, 1998). Assim, foram expostos a papéis impregnados com insecticida, grupos de 18 a 25 mosquitos, perfazendo um mínimo de 100 fêmeas para cada insecticida testado. Verificaram-se duas excepções às recomendações da OMS: nem sempre o número máximo de 25 insectos por tubo foi respeitado e o número de fêmeas testadas para o insecticida malatião (97) não cumpre com exactidão o número mínimo de insectos a testar. A fim de determinar as curvas de “knock-down”, foi registado o número de mosquitos tombados na base dos tubos de exposição aos 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de exposição. No final do tempo de exposição transferiram-se os mosquitos para os tubos de repouso e aí foram mantidos durante 24 horas. No fim destas 24 horas contabilizou-se o número de fêmeas mortas, tendo a análise dos resultados sido efectuada da seguinte maneira, para a totalidade de fêmeas expostos a um insecticida:

- 1) Primeiramente, efectua-se o cálculo da percentagem de mortalidade para o tubo-controlo através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de mosquitos mortos no tubo controlo}}{\text{n}^\circ \text{ de mosquitos ensaiados no tubo controlo}} \times 100$$

- 2) Se a percentagem de mortalidade nos tubos controlo for inferior a 5% então, a percentagem de mortalidade das fêmeas expostas ao insecticida é calculada com base na fórmula:

$$\frac{\text{Soma do n}^\circ \text{ de fêmeas mortas nos tubos teste}}{\text{Soma do n}^\circ \text{ de fêmeas ensaiadas nos tubos teste}} \times 100$$

- 3) Se a percentagem de mortalidade no tubo controlo variar entre 5-20%, então o cálculo da mortalidade nos tubos-teste deverá ser corrigida de acordo com a fórmula de Abbott. Para esta ser aplicada calcula-se a percentagem da mortalidade nos tubos-controlo e nos tubos-teste, tal como acima se encontram mencionadas, e o cálculo corrigido é efectuado segundo a seguinte fórmula:

$$\frac{\% \text{ mortalidade tubos teste} - \% \text{ mortalidade tubo controlo}}{100 - \% \text{ mortalidade tubo controlo}} \times 100$$

Nos casos em que a percentagem de mortalidade nos tubos controlo for superior a 20%, o ensaio deve ser eliminado, não entrando para os cálculos acima mencionados.

De acordo com as recomendações da OMS, a definição da existência de resistência aos insecticidas testados depende do valor da percentagem de mortalidade obtida para o conjunto dos tubos teste. Assim, quando este valor varia entre:

- 98-100% mortalidade – a população é designada de susceptível;
- 80-97% mortalidade – existe a possibilidade de ocorrência de resistência ou presença de tolerância;
- < 80% mortalidade - a população é designada de resistente.

Para além da estimativa das percentagens de mortalidade, efectuou-se também o estudo do comportamento das taxas de “knock-down” ao longo do tempo de exposição e determinou-se as estimativas do LT₅₀ e LT_{99,9} através da análise de regressão “probit”.

3.3.2. Ensaio de garrafa do CDC

Os ensaios de garrafa do CDC são uma ferramenta de vigilância para detectar mudanças na sensibilidade aos insecticidas em populações de vectores. É um teste desenhado para verificar se o insecticida a testar controla, naquele local e naquele

momento, o vector. Os testes de garrafa foram efectuados, de acordo com os protocolos do CDC³, para testar a sensibilidade da população de *Ae. aegypti* da cidade do Funchal aos insecticidas alfa-cipermetrina e ciflutrina. Devido à inexistência de uma colónia reconhecida como sensível (*e.g.* *Ae. aegypti*, estirpe Rockefeller) que pudesse ser utilizada como padrão, optou-se por estabelecer, como “ponto de saturação”, as concentrações e os tempos de exposição referidos nos protocolos do CDC para anofelíneos. Assim, para ambos os insecticidas a concentração utilizada foi de 12,5 µg de insecticida por garrafa, (*i.e.* por 1 ml de acetona) para um período de exposição de 30 minutos. O número de fêmeas introduzidas em cada garrafa variou entre 15 e 24 exemplares. A contagem dos mosquitos tombados e activos não foi efectuada de 10 em 10 minutos como recomendado pelo protocolo do CDC. Ao final do tempo de exposição diagnóstico, e apesar de tal procedimento não estar contemplado nos protocolos do CDC, os mosquitos foram transferidos para gaiolas e mantidos durante 24 horas. Ao final deste período procedeu-se a nova contagem do número de mosquitos, mortos e vivos, o que permitiu discriminar entre taxa de mortalidade real e o efeito “knock-down” vulgarmente induzido por insecticidas piretróides.

3.4. Conservação dos mosquitos

Depois de efectuados os bioensaios, os mosquitos foram conservados em tubos de 0,5 ml onde foi colocada previamente sílica gel em cristais com indicador de níveis de humidade, e um pedaço de algodão para impedir o contacto entre a sílica e o mosquito. Estes tubos foram marcados como resistente ou sensível a um determinado insecticida, colocados em sacos de plástico à temperatura ambiente, para posteriores testes moleculares.

3.5. Análises moleculares

3.5.1. Extração de ADN genómico

O ADN de cada mosquito adulto foi extraído segundo o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por Ballinger-Crabtree *et al.*, (1992) e ligeiramente modificado de acordo com Donnelly *et al.*, (1999). Cada mosquito foi homogeneizado em 305 µl de tampão de lise (100 mM Tris-HCL, pH 8.0, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8.0, 0.15 mM Espermina, 0.5 mM Espermidina, 10% SDS, 20 mg/ml Proteinase K). Após a maceração do mosquito neste tampão, incubou-se o macerado a 65°C, durante uma hora. De seguida, adicionou-se 305 µl de fenol-clorofórmio e misturou-se cuidadosamente no agitador horizontal durante dez minutos. Procedeu-se então a uma centrifugação durante 12 minutos a 12500 rpm, para separação da fase orgânica da aquosa. A fase superior (aquosa) foi removida com cuidado e transferida para um tubo novo previamente identificado com o número da amostra. A esta adicionou-se 300 µl de clorofórmio:isoamil e submeteu-se a nova agitação, no agitador horizontal, durante dez minutos. Os tubos foram novamente sujeitos a uma centrifugação a 12500 rpm durante dez minutos, e transferiu-se a fase aquosa (superior) para um tubo novo, identificado com o mesmo número da amostra. Para precipitar o ADN, adicionou-se 600 µl de etanol absoluto e 60 µl de acetato de amónio e homogeneizou-se a mistura num vórtex. Incubou-se a -20°C, durante toda a noite. No dia seguinte, centrifugou-se a amostra durante 15 minutos e removeu-se o sobrenadante. De seguida, adicionou-se 600 µl de etanol 70% e procedeu-se a nova agitação no vórtex. Centrifugou-se durante dez minutos a 12500 rpm e removeu-se o sobrenadante, secando depois as amostras no liofilizador. Por fim, eluiu-se o sedimento em 200 µl de ddH₂O. Para verificar a qualidade da extração, procedeu-se à determinação da concentração de ADN e de valores de pureza através de espectrofotometria (Nanodrop® 1000, ThermoScientific). Finalmente, as amostras foram conservadas a -20°C. Antes da sua congelação, foram preparadas alíquotas de 30 µl em tubos de 0,5 ml de cada amostra de ADN, que foram armazenadas a 4°C e usadas nas análises subseqüentes. Cada extração de ADN incluiu dois controlos negativos ou brancos, sem material de mosquito.

3.5.2. Detecção de mutações *kdr* em *Aedes aegypti*

Neste trabalho amplificou-se e sequenciou-se directamente os exões 20 e 21 do gene do canal de sódio que codificam o segmento 6 do domínio II, para identificar os polimorfismos genéticos associados à resistência “knock-down” a insecticidas, no mosquito vector *Ae. aegypti*. A detecção de mutações *kdr* foi efectuada em mosquitos fenotipados de acordo com os testes diagnóstico da OMS como resistentes ao DDT, à permetrina ou à deltametrina. A Figura 17 representa a região sequenciada com o exão 20, o intrão e o exão 21.

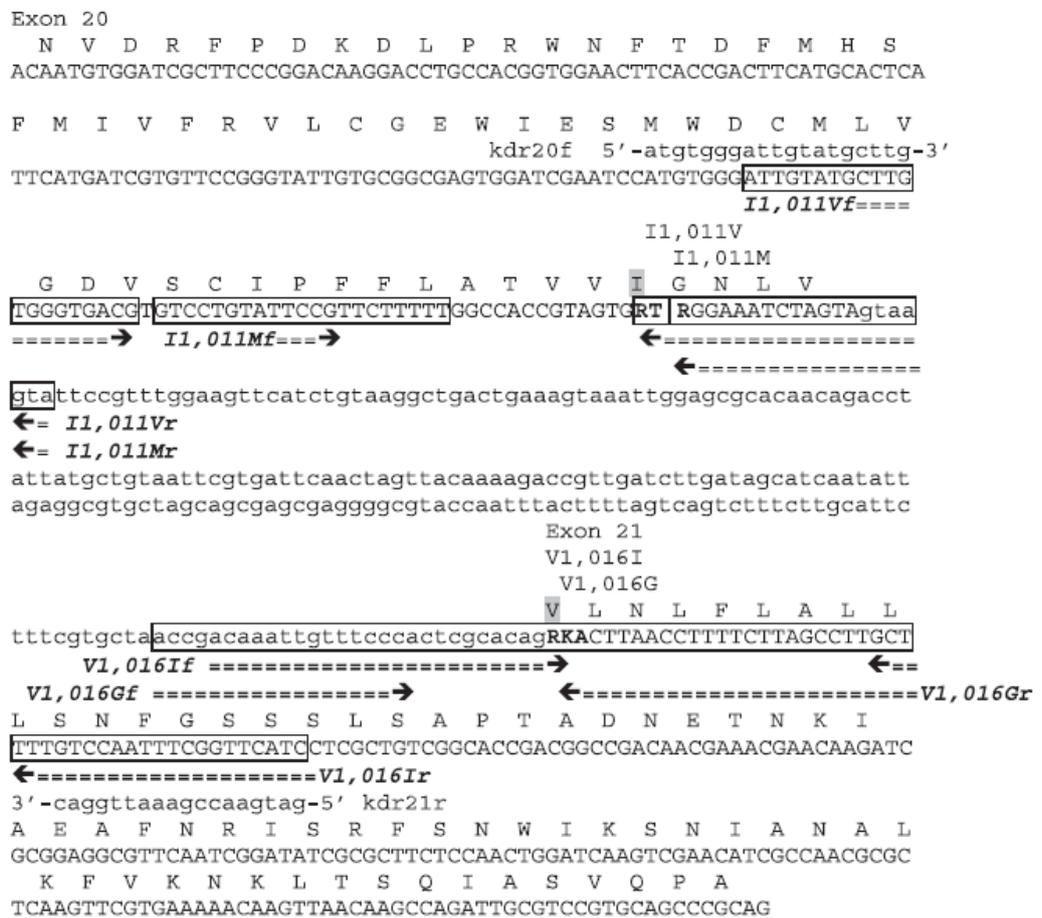


Figura 17. – Representação do exão 20 (letras maiúsculas), intrão (letras minúsculas) e exão 21 do canal de sódio de *Aedes aegypti*. Esta sequência está publicada em VECTORBASE Transcript ID AAEL006019 e surge no supercont1.186 entre os nucleótidos 18685-163945. O exão 20 corresponde aos nucleótidos 115258 – 115445 enquanto o exão 21 corresponde aos nucleótidos 115680 – 115887. Os primers utilizados estão identificados na figura como: Kdr20f e Kdr21r. Retirado de Saavedra *et al.* (2007).

3.5.2.1. Amplificação do exão 20, intrão e exão 21

Os protocolos utilizados na amplificação do exão 20, intrão e exão 21, foram adaptados dos descritos por Saavedra-Rodriguez *et al.*, (2007) (ver Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3. Primers utilizados na amplificação do exão 20, intrão e exão 21 do gene do canal de sódio.

Kdr20f	5' - ATGTGGGATTGTATGCTTG-3'
Kdr21r	5' - GATGAACCGAAATTGGAC-3'

Tabela 4. Composição da mistura de PCR para amplificação do exão 20, intrão e exão 21 do gene do canal de sódio.

Reagentes	Concentração Final
dNTP's	0,4 mM
“Taq DNA polymerase”	0,05 U/ μ l
MgCL ₂	2 mM
Primers	1 μ M
ADN “template”	2 μ l
ddH ₂ O	Até perfazer 50 μ l
Volume total	50 μ l

Tabela 5. Condições de amplificação do exão 20, intrão e exão 21 do gene do canal de sódio.

Passo de amplificação	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	95 °C	12 min
39 Ciclos	Desnaturação	95 °C
	“Annealing”	60 °C
	Extensão	72 °C
Extensão final	72 °C	5 min

3.5.2.2. Detecção de fragmentos por gel de agarose

Com o objectivo de monitorizar os resultados das reacções de PCR, o produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 2% (Lonza, Agarose LE, Seakem ®) em TBE 1x (Appllichem – TBE buffer 10x) contendo brometo de etídio na concentração de 10 mg/ml (Sigma). Antes da colocação nos poços do gel, foi adicionado a cada amostra de ADN 2 μ l de tampão de aplicação, vulgo “loading buffer” (Promega – Blue/Orange

6x). Desta mistura foram aplicados 5 µl no gel. Paralelamente às amostras, aplicou-se também 5 µl de marcador molecular de 100 pb (Promega). O gel foi submetido a uma corrente eléctrica de 90V durante 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas foi efectuada num transiluminador de luz ultravioleta e fotografada num sistema Uvidoc (Uvitec).

3.5.3. Análise de genes mitocondriais

Para a análise de fragmentos mitocondriais dos genes ND4 e COI, foram usados oito indivíduos com fenótipo resistente à permetrina, quatro à deltametrina e três ao DDT, os mesmos para os dois genes, e sequenciados em ambas as direcções. A região de ADN mitocondrial que corresponde ao gene ND4 tem 1343 pares de bases, entre as posições 8027-9370 do genoma mitocondrial de *Ae. aegypti* (NC_010241, GenBank). No caso do COI, a região de ADN mitocondrial que corresponde, encontra-se entre as posições 1298-2834 do genoma mitocondrial de *Ae. aegypti* (NC_010241, GenBank).

3.5.3.1. Amplificação do gene mitocondrial COI

Os protocolos utilizados na PCR para a amplificação do gene mitocondrial COI foram adaptados dos descritos por Paduan e Ribolla (2008) (ver Tabela 6, 7 e 8).

Tabela 6. Primers utilizados na amplificação do gene
COI.

Fly5IP	5'-GGATTATTAGGATTTATTGT-3'
Fly10IP	5'-GCCAAATAATGAAATTGTTCT-3'

Tabela 7. Composição da mistura de PCR para amplificação do gene COI.

Reagentes	Concentração Final
dNTP's	0,4 mM
“Taq DNA polymerase”	0,05 U/μl
MgCL ₂	2 mM
Primers	1 μM
ADN “template”	1 μl (diluição 1/10)
ddH ₂ O	Até perfazer 25 μl
Volume total	25 μl

Tabela 8. Condições de amplificação do gene COI.

Passo de amplificação	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94 °C	2 min
35 Ciclos	Desnaturação	94 °C
	<i>Annealing</i>	50 °C
	Extensão	72 °C
Extensão final	72 °C	5 min

3.5.3.2. Amplificação do gene mitocondrial ND4

Os protocolos utilizados na PCR para a amplificação do gene mitocondrial ND4 foram adaptados dos descritos por Paduan e Ribolla (2008) (ver Tabela 9, 10 e 11).

Tabela 9. Primers utilizados na amplificação do gene ND4.

ND4F	5'-TGATTGCCTAAGGCTCATGT-3'
ND4R	5'-TTCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT-3'

Tabela 10. Composição da mistura de PCR para a amplificação do gene ND4.

Reagentes	Concentração Final
dNTP's	0,4 mM
“Taq DNA polymerase”	0,05 U/ μ l
MgCL ₂	2 mM
Primers	1 μ M
ADN “template”	2 μ l
ddH ₂ O	Até perfazer 50 μ l
Volume total	50 μ l

Tabela 11. Condições de amplificação do gene ND4.

Passo de amplificação	Temperatura	Tempo
3 ciclos	94 °C	2 min
	37°C	2 min
	72°C	1 min
35 Ciclos	Desnaturação	94 °C
	Annealing	50 °C
	Extensão	72 °C
Extensão final	72 °C	5 min

3.5.4. Detecção de fragmentos por gel de agarose

Com o objectivo de monitorizar os resultados das reacções de amplificação dos genes COI e ND4, o produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 2% (Lonza, Agarose LE, Seakem ®) corado com brometo de etídio 10 mg/ml (Sigma) em TBE 1x (Applichem – TBE buffer 10x). Foram colocados 5 μ l de amostra no gel. Aplicou-se também 5 μ l de marcador molecular de 100 pb (Promega) e o gel foi submetido a uma corrente eléctrica de 120V, durante uma hora. A visualização das bandas foi efectuada num transiluminador de luz ultravioleta e fotografada num sistema Uvidoc (Uvitec).

3.5.5. Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

A purificação de produto amplificado foi feita com o “QIAquick PCR Purification kit (Qiagen)”. Os fragmentos de PCR foram sequenciados em ambas as

direcções (*forward* e *reverse*). Os reagentes utilizados foram provenientes da Applied Biosystems, utilizando BigDye Terminator 3. A reacção de sequenciação foi purificada por filtração em gel e corrida num sequenciador ABI3730XL.

3.5.6. Alinhamento de sequências

As sequências de ADN foram editadas e alinhadas utilizando BioEdit version 7.0.0 (Tom Hall Copyright© 1997-2007, Ibis Biosciences). Nestas foram analisadas as similaridades existentes com sequências disponíveis usando a base de dados do GenBank.

3.5.7. Clonagem para determinação de sequências problemáticas de *kdr* e COI

A presença de ambiguidades nas sequências de *kdr* e COI analisadas fizeram com que se optasse por verificar a sua fidedignidade através da clonagem dos produtos de PCR. As condições para a obtenção destes produtos foram as mesmas mencionadas acima. O processo de ligação do ADN ao plasmídeo foi realizado de acordo com o protocolo da Promega, utilizando como vector o “pGem[®]-T Easy Vector”. Cada mistura de ligação era composta por 4 µl de tampão, 1 µl de “pGem[®]-T Easy Vector”, 1 µl de ligase e 4 µl de solução do ADN a clonar. Para a obtenção máxima de transformantes, as ligações decorreram durante toda a noite a 4°C.

Para a preparação e transformação de células competentes, uma cultura de *Escherichia coli* (*E. coli*) foi colocada a crescer durante a noite, a 37°C. Na manhã seguinte, fez-se uma diluição 1:1000 desta cultura saturada de células, em meio LB líquido. Esta foi incubada a 37°C e o processo de crescimento celular foi monitorizado através da leitura da densidade óptica a 650 nm. Quando a densidade óptica atingiu valores entre 0,3-0,5, todo o volume da cultura foi transferido para um tubo de centrífuga, centrifugado a 6000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. Finda a centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de TSS, tendo-se tido o cuidado de agitar suavemente o tubo para não danificar as células. Desta

suspensão retirou-se 100 µl para cada um dos tubos que continham o ADN transformante e que já se encontravam no gelo. Esta mistura manteve-se no gelo durante 45 minutos, tendo sido agitada ocasionalmente. Neste período de tempo, o ADN transformante foi aderindo à parede celular. Terminado o período de incubação, fez-se um choque térmico. As amostras que estavam no gelo foram transferidas durante 90 segundos para um banho-maria a 42°C, ocorrendo a penetração do ADN para o interior das células competentes. Após este curto período de tempo, as amostras retornaram ao gelo. Para permitir a expressão da resistência ao antibiótico (ampicilina), começou-se por adicionar 900 µl de meio líquido LB a cada tubo, sendo estes colocados no agitador horizontal, durante uma hora, a 37°C. Terminada esta incubação, procedeu-se ao espalhamento de 100 µl desta suspensão de células sobre placas de meio sólido LB contendo X-Gal, IPTG e ampicilina. Estas placas foram guardadas a 37°C, durante toda a noite. Nesta fase foi confirmada a transformação das células com o plasmídeo desejado, isto é, com o plasmídeo que possui o fragmento desejado ou inserto. Este plasmídeo possui, entre outros, o gene que codifica para a β-galactosidase. Quando a reacção de clonagem é bem sucedida, o gene da β-galactosidase fica interrompido passando a codificar uma enzima com um maior número de aminoácidos e não funcional. Quando a reacção de clonagem é mal sucedida, isto é, quando não há inserção do fragmento, o plasmídeo volta a circularizar com a composição original do gene, que vai então codificar uma enzima funcional. A β-galactosidase vai actuar sobre o X-Gal (substrato cromogénico), já adicionado ao meio, degradando-o. A degradação é detectada pela mudança de cor das células, que passam de incolor a azul. Assim, as células transformadas com vector+inserto dão origem a colónias brancas, enquanto as células transformadas apenas com o vector dão origem a colónias azuis.

No dia seguinte, observou-se as placas e repicou-se as colónias brancas para meio LB líquido (3 ml) com ampicilina. Após 12 horas, a 37°C, estas suspensões bacterianas foram centrifugadas, durante 2 minutos, a 13500 rpm. Os sobrenadantes foram decantados para novos tubos e agitados no vórtex. A cada amostra adicionou-se 100 µl de solução I composta por 4 ml de glucose 50%, 5 ml Tris HCL, 1 M, pH 8.0, 4 ml EDTA 0.5 M e 187 ml ddH₂O. De seguida, adicionou-se 200 µl de SDS alcalino (preparado no momento; para 10 amostras: 1806 µl ddH₂O + 84 µl NaOH, 5 M + 210 µl SDS 10%) e 200 µl de acetato de potássio (3 M, pH 4.8). Procedeu-se a uma

centrifugação de 15 minutos, à temperatura ambiente, e transferiu-se o sobrenadante de cada amostra para novos tubos contendo 600 µl de isopropanol. Estes foram mantidos, à temperatura ambiente, durante 10 minutos, após os quais foram sujeitos a nova centrifugação a 13500 rpm, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Finda a centrifugação, decantou-se, cuidadosamente, o sobrenadante, tendo o cuidado de não descartar o sedimento, que nesta fase é quase imperceptível. Adicionou-se 250 µl de etanol 70% a cada tubo e procedeu-se a uma agitação suave. Efectuou-se outra centrifugação (13500 rpm, à temperatura ambiente, com duração de 5 minutos), descartando-se de igual modo os sobrenadantes. De seguida, as amostras foram sujeitas a um período de secagem, no excicador, até à evaporação total do etanol. Terminada esta, as amostras foram ressuspendidas em 30 µl de TE (tampão) ao qual foi adicionado RNase a uma concentração final de 50 µg/ml. De seguida, efectuou-se uma digestão enzimática, onde os plasmídeos extraídos foram clivados com enzimas de restrição específicas para determinar se contêm o inserto desejado. Para tal, utilizou-se 1 µl de enzima EcoRI; 1,5 µl de tampão EcoRI; 5,5 µl de água e 7 µl de amostra. Colocou-se no banho-maria durante 3 horas e procedeu-se à detecção do ADN digerido em gel de agarose a 1,5%.

Após a visualização das bandas e verificação de que a clonagem foi bem sucedida, procedeu-se à amplificação destes fragmentos por PCR, para posterior sequenciação. A composição da mistura de PCR e as suas condições de amplificação foram as seguintes (ver Tabela 12, 13 e 14):

Tabela 12. Primers utilizados na amplificação dos fragmentos clonados.

M13F	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT – 3'
M13R	5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC – 3'

Tabela 13. Composição das misturas de PCR para amplificação dos fragmentos clonados.

Reagentes	Concentração Final
Tampão	1X PCR Buffer
dNTP's	0,2 mM
Taq DNA polymerase	1 U/ μ l
MgCL ₂	2 mM
Primers	0,1 μ M
DNA template	1 μ l
ddH ₂ O	Até perfazer 15 μ l
Volume total	15 μ l

Tabela 14. Condições de amplificação dos fragmentos clonados.

Passo de amplificação	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94 °C	3 min
35 Ciclos	Desnaturação	94 °C
	Annealing	50 °C
	Extensão	72 °C
Extensão final	72 °C	10 min

A detecção do produto amplificado foi feita por electroforese em gel de agarose a 2% a 120V durante uma hora. Após a amplificação bem sucedida, procedeu-se à purificação dos produtos de PCR. Os fragmentos de PCR foram sequenciados com os mesmos “primers” da amplificação.

3.6. Análise e tratamento dos resultados

3.6.1. Bioensaios

Os resultados dos bioensaios para determinação do nível de sensibilidade aos insecticidas foram analisados estatisticamente com recurso aos programas Microsoft Excel[®] 2007 e SPSS[®] para Windows, versão 19.

3.6.2. Análises moleculares

Depois de editadas, as sequências nucleotídicas foram reunidas num único ficheiro e lidas no MEGA versão 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) para se obter a composição nucleotídica, e no DnaSP versão 5.10 (Rozas *et al.*, 2003), para determinar o número de locais polimórficos, o número médio de diferenças nucleotídicas (κ), a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade de haplótipos (Hd).

A frequência alélica consiste na proporção de um dado alelo (A) numa população de N indivíduos, para um determinado *locus*. Se a $f(AA)$ e $f(Aa)$ forem, respectivamente, as frequências do genótipo homocigótico do alelo (A) e do genótipo heterocigótico com os alelos (A) e (a), num determinado locus com dois alelos, a frequência p é obtida pela seguinte fórmula:

$$p = f(AA) + \frac{1}{2}f(Aa) = \text{Frequência de A}$$

As sequências dos haplótipos do gene COI encontradas neste trabalho foram alinhadas com os haplótipos depositados no GenBank provenientes de estudos feitos no Brasil (Paduan e Ribolla, 2008; Scarpassa *et al.*, 2008) e estirpes submetidas por Morlais e Severson (2002) denominadas de Liverpool, Moyo-R e Formosus (Brasil: GenBank # AY851649 – AY851654, EU625624 – EU625273; Liverpool: GenBank # AY056596; Moyo-R: GenBank # AF380835; Formosus: GenBank # AY056597).

Do mesmo modo, as sequências dos haplótipos do gene ND4 encontradas neste trabalho foram alinhadas com as sequências de haplótipos depositadas no GenBank, provenientes de estudos feitos no México (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002), Perú (Costa-da-Silva *et al.*, 2005), Camarões (Paupy *et al.*, 2008), Brasil (Paduan e Ribolla, 2008; Júnior e Scarpassa, 2009; Américas, África, Ásia (Bracco *et al.*, 2007) (México: GenBank # AF334841-AF334865; Perú: GenBank # DQ177153 – DQ177155; Camarões: GenBank # EF562501 – EF562504; Brasil: GenBank # AY906835 – AY906853, # EU650405 – EU650416, # DQ176828 – DQ176849). As sequências da Venezuela (Urdaneta-Marquez *et al.*, 2008) foram gentilmente cedidas por William Black IV.

As relações entre os vários haplótipos de *Ae. aegypti* foram inferidas por meio da construção de uma rede de haplótipos, que foi elaborada com o auxílio do programa Network versão 4.6.1.0 (Fluxus Technology Ltd. em www.fluxus-engineering.com) utilizando o método de “median joining” (Bandelt *et al.*, 1999).

4. RESULTADOS

4.1. Bioensaios da OMS e ensaios de garrafa CDC

A população de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) da ilha da Madeira foi avaliada quanto à sua susceptibilidade aos insecticidas usando bioensaios de diagnóstico da OMS e ensaios de garrafa do CDC. Os resultados dos testes de sensibilidade das formas adultas de *Ae. aegypti* aos vários insecticidas testados encontram-se nas seguintes tabelas (ver Tabela 15, 16, 17, 18, 19 e 20).

Tabela 15. Resultados dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de *Ae. aegypti* ao DDT.

		DDT 4%		Controlo	
		Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes
Réplica 1	Machos	0	0		
	Fêmeas	8	18		
Réplica 2	Machos	0	0		
	Fêmeas	7	18		
Réplica 3	Machos	0	1	0	25
	Fêmeas	8	16		
Réplica 4	Machos	1	0		
	Fêmeas	7	20		
Total	Machos	1	1	0	25
	Fêmeas	30	72	-	-
% Mortalidade	Machos		-		0
	Fêmeas		29,4		-

Tabela 16. Resultados dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de *Ae.aegypti* ao malatião.

		Malatião 5%		Controlo	
		Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes
Réplica 1	Machos	1	0	0	25
	Fêmeas	20	0		
Réplica 2	Machos	3	0		
	Fêmeas	23	1		
Réplica 3	Machos	3	0	0	25
	Fêmeas	15	0		
Réplica 4	Machos	1	0		
	Fêmeas	17	0		
Réplica 5	Machos	3	0	0	22
	Fêmeas	21	0		
Total	Machos	11	0	0	72
	Fêmeas	96	1	-	-
% Mortalidade	Machos		-		0
	Fêmeas		99,0		-

Tabela 17. Resultados dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de *Ae. aegypti* à permetrina.

		Permetrina 0.75%		Controlo	
		Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes
Réplica 1	Machos	4	0	0	21
	Fêmeas	10	6		
Réplica 2	Machos	0	1	0	25
	Fêmeas	12	12		
Réplica 3	Machos	2	0	0	25
	Fêmeas	17	8		
Réplica 4	Machos	0	0	0	25
	Fêmeas	3	22		
Réplica 5	Machos	0	1	0	25
	Fêmeas	0	23		
Réplica 6	Machos	0	1	0	25
	Fêmeas	3	19		
Total	Machos	6	3	0	71
	Fêmeas	45	90	-	-
% Mortalidade	Machos		-	0	
	Fêmeas		33,3	-	

Tabela 18. Resultados dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de *Ae. aegypti* à deltametrina.

		Deltametrina 0.05%		Controlo	
		Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes
Réplica 1	Machos	0	0	0	21
	Fêmeas	14	7		
Réplica 2	Machos	3	0	0	25
	Fêmeas	24	1		
Réplica 3	Machos	1	0	0	25
	Fêmeas	21	0		
Réplica 4	Machos	0	0	0	25
	Fêmeas	18	6		
Réplica 5	Machos	0	0	0	25
	Fêmeas	12	13		
Réplica 6	Machos	0	0	0	25
	Fêmeas	7	15		
Réplica 7	Machos	0	0	0	25
	Fêmeas	7	13		
Total	Machos	4	0	0	71
	Fêmeas	103	55	-	-
% Mortalidade	Machos		-	0	
	Fêmeas		65,2	-	

Tabela 19. Resultados dos testes de garrafa do CDC de sensibilidade de *Ae. aegypti* à alfa-cipermetrina.

	Alfa-cipermetrina 12,5 ug/garrafa		Controlo	
	Machos	Fêmeas	Mortos	Sobreviventes
Réplica 1	Machos	3	0	
	Fêmeas	24	0	
Réplica 2	Machos	1	0	
	Fêmeas	23	0	
Réplica 3	Machos	2	0	0
	Fêmeas	23	0	19
Réplica 4	Machos	4	0	
	Fêmeas	20	0	
Total	Machos	10	0	0
	Fêmeas	90	0	3
%Mortalidade	Machos	-	-	0
	Fêmeas	-	100,0	0

Tabela 20. Resultados dos testes de garrafa do CDC de sensibilidade de *Ae. aegypti* à ciflutrina.

	Ciflutrina 12,5 ug/garrafa		Controlo	
	Machos	Fêmeas	Mortos	Sobreviventes
Réplica 1	Machos	10	0	
	Fêmeas	20	0	
Réplica 2	Machos	4	0	
	Fêmeas	19	0	
Réplica 3	Machos	4	0	0
	Fêmeas	24	0	23
Réplica 4	Machos	7	0	
	Fêmeas	15	0	
Total	Machos	25	0	0
	Fêmeas	78	0	18
%Mortalidade	Machos	-	-	0
	Fêmeas	-	100,0	0

De acordo com o protocolo da OMS foram, ao todo, expostos 102 fêmeas e 2 machos ao insecticida DDT 4.0% e 25 machos ao excipiente controlo; 97 fêmeas e 11 machos ao malatião 5.0% e 72 machos ao controlo; 135 fêmeas e 9 machos à permetrina 0.75% e 158 fêmeas e 4 machos à deltametrina 0.05% tendo-se usado 71 machos que serviram de controlo a estes dois últimos insecticidas.

Em ensaios de garrafa foram testados 90 fêmeas e 10 machos a 12,5 µg/garrafa de alfa-cipermetrina e 78 fêmeas e 25 machos a 12,5 µg/garrafa de ciflutrina. Os

insectos foram expostos aos insecticidas durante 30 minutos. Como controlo para os testes de sensibilidade à alfa-cipermetrina foram processados 16 fêmeas e 3 machos. Nos testes de sensibilidade à ciflutrina utilizaram-se 5 fêmeas e 18 machos controlo.

Com base nos resultados apresentados foram calculadas as taxas de mortalidade, ao fim de 24 horas, dos insectos (machos e fêmeas) utilizados em cada controlo e para a totalidade dos insectos processados em todos os ensaios-controlo efectuados para cada insecticida. Visto que as estimativas obtidas para as referidas taxas de mortalidade foram sempre nulas, procedeu-se, então, ao cálculo das taxas de mortalidade (ao final de 24 horas), para a totalidade das fêmeas expostas a cada um dos insecticidas, de acordo com a fórmula 2 (Capítulo 3, secção 3.3.1.). Assim, e com base nos critérios da OMS, foi encontrada uma elevada susceptibilidade da população de *Ae. aegypti* ao malatão, com 99.0% de mortalidade de fêmeas expostas ao insecticida na concentração/tempo diagnóstico. No entanto, a população em estudo demonstrou uma elevada resistência ao DDT e à permetrina, apresentando valores de mortalidade de 29.4% e 33.3%, respectivamente e ainda uma marcada resistência à deltametrina com uma taxa de mortalidade de 65.2%. Os ensaios de garrafa do CDC com alfa-cipermetrina e ciflutrina mostraram uma elevada susceptibilidade de *Ae. aegypti* a estes insecticidas, com taxas de mortalidade de 100%.

Nos gráficos seguintes (ver Figura 18, 19, 20, 21 e 22) apresenta-se a evolução da percentagem de mosquitos tombados (“knock-down”) ao longo da duração dos testes diagnóstico da OMS e dos ensaios de garrafa do CDC, assim como os gráficos referentes à análise “probit” dos resultados dos testes da OMS.

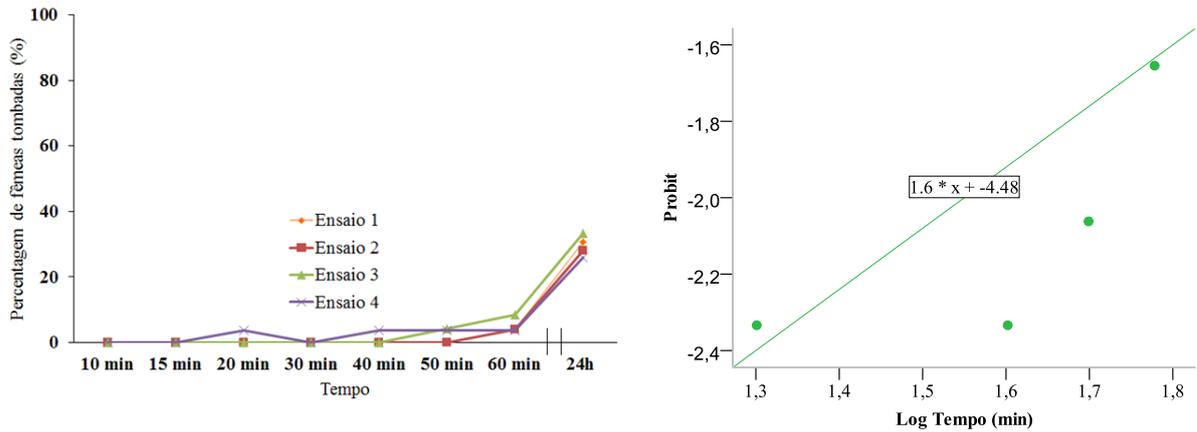


Figura 18. – Gráfico representativo da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de *Ae. aegypti* ao DDT e respectivo gráfico “probit”.

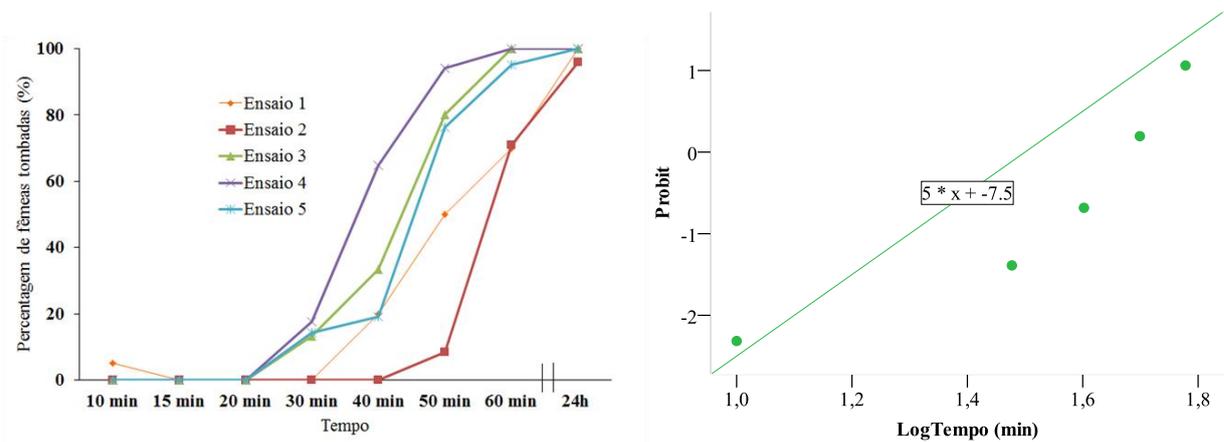


Figura 19. – Gráfico representativo da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de *Ae. aegypti* ao malatião e respectivo gráfico “probit”.

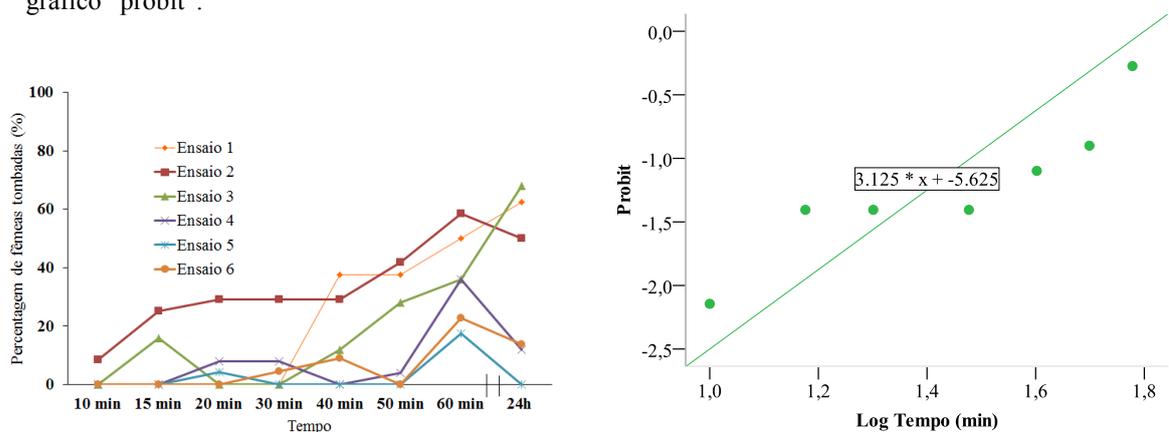


Figura 20. - Gráfico representativo da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de *Ae. aegypti* à permetrina e respectivo gráfico “probit”.

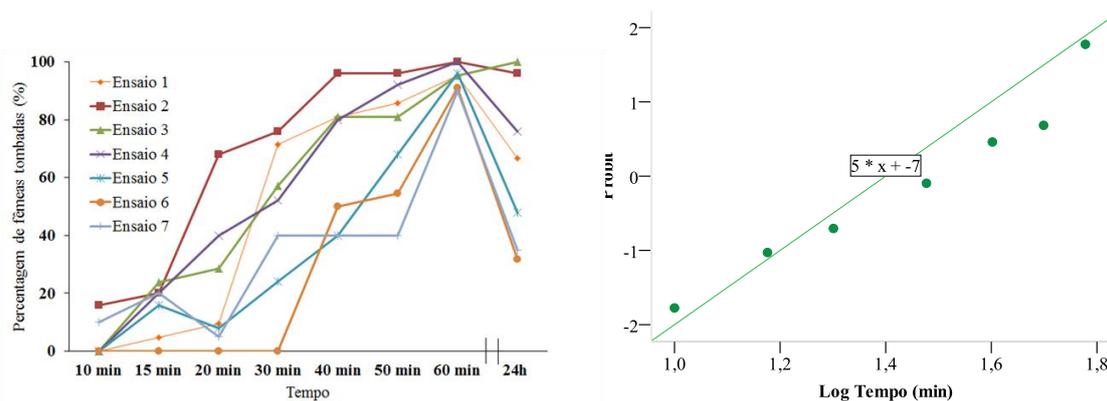


Figura 21. Gráfico representativo da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de *Ae. aegypti* à deltametrina e respectivo gráfico “probit”.

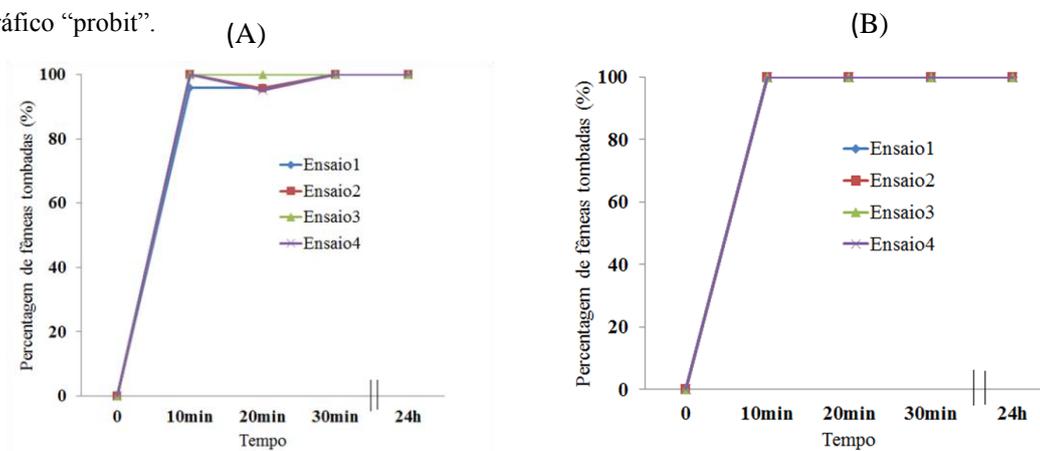


Figura 22. Gráficos representativos da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes de garrafa do CDC de sensibilidade de *Ae. aegypti* à alfa-cipermetrina (A) e ciflutrina (B).

Pela análise visual dos gráficos resultantes da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes de sensibilidade aos insecticidas, o efeito “knock-down” dos insecticidas piretróides é particularmente evidente nos testes diagnóstico da OMS. Nestes, o número de mosquitos tombados 24 horas após à interrupção da exposição dos insectos à permetrina e deltametrina é claramente inferior aquele registado no final do período de exposição de 60 minutos. Tal já não acontece com os testes de garrafa do CDC.

Em relação à análise das rectas de regressão “probit”, os testes de Pearson associados a estas (“Pearson goodness-of-fit chi-square”) indicam que apenas no caso do DDT (ver Anexo I) não se rejeita a hipótese nula em que o modelo se ajusta adequadamente aos dados (nível de confiança de 99%). Assim, os valores determinados com base no modelo “probit” para a estimativa do tempo de exposição correspondente a

50% e 99,9% de mortalidade, ou seja, o tempo de exposição correspondente a LT_{50} e $LT_{99,9}$ são, para o caso do DDT, de 362 e 3738 minutos, respectivamente. Quanto aos restantes insecticidas, visto que a hipótese nula foi rejeitada, os valores indicados pelo modelo referentes às estimativas de LT_{50} e $LT_{99,9}$ não podem ser levados em consideração.

4.2. Análise genética

4.2.1. Detecção de mutações *kdr*

Neste trabalho sequenciou-se o segmento 6 do domínio II do canal de sódio de 35 mosquitos da espécie *Ae. aegypti* da população da ilha da Madeira, resistentes ao DDT, permetrina e deltametrina. A análise, feita com sequências compostas por 275 nucleótidos, revelou a presença de seis haplótipos, uma diversidade nucleotídica de $\pi = 0,03310$ e um número médio de diferenças nucleotídicas de $k = 8,47312$. Foram detectados dois tipos de intrões, tal como em Martins *et al.*, (2009a), com diferenças nítidas tanto no tamanho como na composição de nucleótidos das sequências. De modo a solucionar este problema, o alinhamento das sequências foi feito de acordo com o alinhamento obtido por Martins *et al.*, (2009a).

A sequenciação directa revelou sequências com picos duplos nos locais de mutação tornando impossível verificar a sua presença ou ausência. Assim, procedeu-se à clonagem destas sequências e consequente sequenciação dos produtos de PCR. Este procedimento permitiu confirmar a existência da mutação V1016I em heterozigotia (Figura 23 e 24).

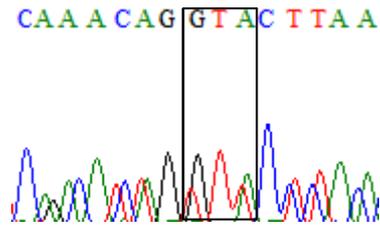


Figura 23. – Representação de parte de uma sequência do segmento 6 do domínio II do canal de sódio de *Ae. aegypti* com picos duplos. No rectângulo é assinalado o alelo sensível GTA no codão 1016.

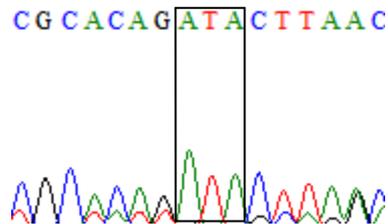


Figura 24. – Representação de parte de uma sequência do segmento 6 do domínio II do canal de sódio de *Ae. aegypti* com a mutação no codão 1016 ATA em evidência, confirmada após clonagem.

A sequenciação directa revelou a presença da mutação V1016I (Tabela 21), que está envolvida na resistência *kdr*, em três indivíduos, dois deles heterozigóticos (confirmados após clonagem) e com fenótipo resistente à permetrina, e outro indivíduo homozigótico com fenótipo resistente ao DDT.

As mutações no codão 1011 não foram encontradas neste estudo.

Tabela 21. Número de indivíduos e respectivas frequências de cada genótipo e frequências alélicas da mutação *kdr* 1016 em populações resistentes de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira.

	Genótipo			Total	Frequência alélica	
	Número de indivíduos (frequência)				Val	Ile
	Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile			
DDT	10 (0.91)	0 (0.0)	1 (0.09)	11	0.91	0.09
Permetrina	12 (0.86)	2 (0.14)	0 (0.0)	14	0.93	0.07
Deltametrina	10 (1)	0 (0.0)	0 (0.0)	10	1	0
Total	32 (0.91)	2 (0.06)	1 (0.03)	35	0.94	0.06

Legenda: Val/Val – alelo sensível homocigótico; Val/Ile – alelo heterocigótico para a mutação V1016I; Ile/Ile – alelo homocigótico resistente para a mutação V1016I.

4.2.2. Análise de genes mitocondriais

A análise do gene COI revelou um fragmento com 450 nucleótidos. No entanto, foi utilizada nas análises subsequentes uma sequência de 421 pb de modo a corresponder às sequências obtidas por Paduan e Ribolla (2008) publicadas no GenBank. O alinhamento dos 15 indivíduos permitiu a identificação de cinco locais polimórficos, representados por quatro transições C-T e uma transição A-G (Tabela 22). Este alinhamento revelou a existência de dois haplótipos. O número médio de diferenças nucleotídicas foi $k = 0,64368$, com índice de diversidade nucleotídica $\pi = 0,00153$ e diversidade haplotípica $Hd = 0,129$.

A composição média de nucleótidos foi de 40.4% para a timina, 15.2% para a citosina, 29.7% para a adenina e 14.7% para a guanina.

Tabela 22. Locais variáveis observados nos dois haplótipos do gene COI do ADN mitocondrial de *Ae. aegypti*.

Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas em pb					N
	0	2	2	3	4	
	0	2	4	9	0	
	5	7	8	2	7	
HC1	C	T	T	C	A	14
HC2	T	C	C	T	G	1

Legenda: N indica o número de indivíduos que partilham cada haplótipo. As letras são as iniciais das bases nucleotídicas correspondentes: C- Citosina, T- Timina, A-Adenina, G- Guanina.

A sequenciação directa revelou uma sequência com picos duplos nos locais de polimorfismo (Figura 25) tornando impossível verificar qual a base fosfatada presente. Assim, procedeu-se à clonagem desta sequência e consequente sequenciação dos produtos de PCR. Este procedimento permitiu garantir a fidedignidade dos resultados (Figura 26).

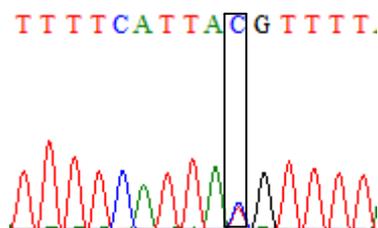


Figura 25. – Exemplo de parte de um electroferograma de sequenciação directa do gene COI com o pico duplo evidenciado (C ou T).

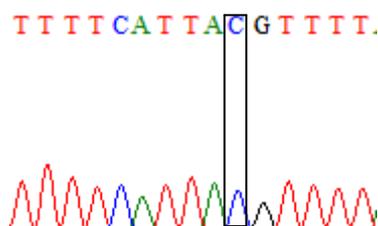


Figura 26. – Exemplo de parte de um electroferograma de sequenciação directa do gene COI após clonagem. Confirmação da presença do nucleótido citosina.

Depois de efectuarmos o alinhamento de todas as sequências do gene COI verificou-se que o haplótipo HC1 é igual ao Padhc2 encontrado por Paduan e Ribolla (2008) em Porto Velho no estado da Rondônia (ver Tabela 23), sendo um haplótipo único neste estudo brasileiro. Quanto ao HC2, verificou-se que também alinhava com um haplótipo do mesmo estudo, nomeadamente o Padhc1, presente em Santos, cidade com um dos maiores portos do Brasil, sendo também um haplótipo único.

Tabela 23. Distribuição geográfica dos haplótipos do gene COI encontrados neste estudo

Haplótipo	Locais	Referência
HC1	Funchal (Madeira);	Presente estudo;
	Porto Velho (Brasil)	Paduan e Ribolla, 2008
HC2	Funchal (Madeira);	Presente estudo;
	Santos (Brasil)	Paduan e Ribolla, 2008

O fragmento ND4 amplificado apresentou o tamanho de 390 nucleótidos. No entanto, restringiu-se a sequência a 376 pb de modo a corresponder às sequências obtidas por Paduan e Ribolla (2008) publicadas no GenBank. O alinhamento dos 15 indivíduos mostrou que 12 locais são polimórficos e todos são informativos, representados por oito transições C-T, uma transição A-G e uma transversão A-T (Tabela 24). Este alinhamento revelou a existência de dois haplótipos. O número médio de diferenças nucleotídicas foi $\kappa = 2,05977$, com índice de diversidade nucleotídica $\pi = 0,00548$ e diversidade haplotípica $Hd = 0,129$.

A composição média de nucleótidos foi de 41.6% para a timina, 9.7% para a citosina, 28.2% para a adenina e 20.5% para a guanina.

Tabela 24. Locais variáveis observados nos dois haplótipos do gene ND4 do ADN mitocondrial de *Ae. aegypti*.

Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas em pb											N	
	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	3	
	2	3	8	4	5	0	2	4	7	8	8	2	
	7	3	4	4	3	1	8	6	9	2	8	4	
HN1	T	T	T	C	T	T	A	T	A	T	T	C	14
HN2	C	C	C	T	C	C	G	C	G	A	C	T	1

Legenda: N indica o número de indivíduos que partilham cada haplótipo. As letras são as iniciais das bases nucleotídicas correspondentes: C- Citosina, T- Timina, A-Adenina, G- Guanina.

O alinhamento dos haplótipos do gene ND4 permitiu verificar a similaridade das nossas sequências com outras publicadas noutros estudos (Tabela 25). Assim, o HN1 foi também encontrado no Brasil (Manaus, Belém, Santos, São Sebastião, Porto Velho) por Júnior e Scarpassa, (2009) como H5, por Bracco *et al.*, (2007) como H16 e por Paduan e Ribolla (2008) como H17; no México por Gorrochotegui-Escalante *et al.*, (2002) como H3; no Perú (Lima e Iquitos) por Costa-da-Silva *et al.*, (2005) como H1 e por Bracco *et al.*, (2007) como H16; na Venezuela por Urdaneta-Marquez *et al.*, (2008) como HMex3; e por fim na Guatemala (Guatemala City) e EUA (Fort Lauderdale) por Bracco *et al.*, (2007) como H16.

O HN2 foi também encontrado no Brasil (Manaus, Santos, Boa Vista e Potim) por Júnior e Scarpassa, (2009) como H11, Paduan e Ribolla (2008) como H8 e Bracco *et al.*, (2007) como H7; no México por Gorrochotegui-Escalante *et al.*, (2002) como H6; no Senegal (Dakar) e EUA (Fort Lauderdale) por Bracco *et al.*, (2007) como H7; e por fim na Venezuela por Urdaneta-Marquez *et al.*, (2008) como HMex6.

Tabela 25. Distribuição geográfica dos haplótipos do gene ND4 encontrados neste estudo.

Haplótipo	Locais	Referência
HN1	Funchal (Madeira)	Presente estudo
	Brasil (Belém, Santos, São Sebastião)	Bracco <i>et al.</i> , (2007)
	Brasil (Compensa)	Júnior e Scarpassa, 2009
	Brasil (Porto Velho)	Paduan e Ribolla, 2008
	EUA (Fort Lauderdale)	Bracco <i>et al.</i> , (2007)
	Guatemala (Cidade de Guatemala)	Bracco <i>et al.</i> , (2007)
	México	Gorrochotegui-Escalante <i>et al.</i> , (2002)
	Perú (Lima)	Costa-da-Silva <i>et al.</i> , (2005)
	Venezuela (Sucre, Lara, Zulia, Tachira, Portuguesa, Miranda, Bolivar)	Urdaneta-Marquez <i>et al.</i> , (2008)
	Venezuela (Maracay)	Bracco <i>et al.</i> , (2007)
	Funchal (Madeira)	Presente estudo
HN2	Brasil (Manaus, Boa Vista)	Júnior e Scarpassa, 2009
	Brasil (Boa Vista, Potim)	Bracco <i>et al.</i> , (2007)
	Brasil (Santos)	Paduan e Ribolla, 2008
	EUA (Fort Lauderdale)	Bracco <i>et al.</i> , (2007)
	México	Gorrochotegui-Escalante <i>et al.</i> , (2002)
	Senegal (Dakar)	Bracco <i>et al.</i> , (2007)
	Venezuela (Sucre, Lara, Zulia, Tachira, Portuguesa, Miranda, Bolivar)	Urdaneta-Marquez <i>et al.</i> , (2008)

Com base no método “median joining”, foi gerada uma rede de haplótipos para cada gene com base nas Tabelas 26 e 27, conforme mostram as figuras 27 e 28. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados para cada haplótipo. Os pontos vermelhos, que ligam os haplótipos identificados, correspondem a haplótipos não amostrados (m.h. – “missing haplotypes”).

Tabela 26. Locais variáveis observados no alinhamento do gene COI do ADN mitocondrial de *Ae. aegypti* do presente estudo em comparação com outras sequências do mesmo gene já publicadas.

Hap	Posições das mudanças nucleotídicas em pb										Hap. O.	Referências
	0	0	2	2	2	3	3	3	4	4		
	0	3	0	2	4	0	6	9	0	1		
	5	7	3	7	8	5	5	2	7	1		
HC1	C	C	T	T	T	T	T	C	A	G	-	Presente estudo
HC2	T	.	.	C	C	.	.	T	G	.	-	Presente estudo
Scarh3	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	H3	
Scarh5	.	.	.	C	.	C	H5	Scarpassa <i>et al.</i> , 2008
Scarh6	T	T	H6	
Padhc5	.	.	.	C	C	.	.	.	G	.	H5	Paduan e Ribolla, 2008
Padhc6	.	.	.	C	C	.	.	T	G	A	H6	
Moyo-R	.	.	.	C	Moyo-R	
Liverpool I	.	.	.	C	C	.	.	T	G	.	Liverpool	Morlais e Severson, 2002
Formosus	.	.	C	C	Formosus	

Legenda: Estas posições variáveis definem os vários haplótipos de COI em *Ae. aegypti* publicados na bibliografia referida comparados com os haplótipos obtidos no presente estudo; **Hap** – Haplótipos com a designação atribuída no presente estudo; **Hap.O.** – Haplótipo com a designação original atribuída na referência bibliográfica em que foi descrito; **Referências** - referências bibliográfica em que foram descritos os haplótipos referidos. Os pontos (.) indicam que o mesmo nucleótido está presente no haplótipo HC1. As letras são as iniciais das bases nucleotídicas correspondentes: C- Citosina, T- Timina, A-Adenina, G- Guanina

Para o gene COI (ver Figura 27), a rede de haplótipos obtida permitiu verificar a presença do haplótipo mais frequente (93.3%), HC1, agrupado com haplótipos do Brasil e da África Oriental no denominado grupo II, enquanto o haplótipo menos frequente (6.66%), HC2, se agrupou com haplótipos do Brasil e da África Ocidental no denominado grupo I.

Na análise da rede de haplótipos para o gene ND4 (ver Figura 28), o haplótipo mais frequente neste estudo (93.3%), HN1, ficou inserido num grupo, denominado grupo II, com haplótipos das Américas, África Ocidental e Oriental, e Ásia. O haplótipo menos frequente, (6.66%) HN2, ficou inserido num grupo denominado grupo I, onde se agruparam haplótipos das Américas e África Ocidental.

Tabela 27. Locais variáveis observados no alinhamento do gene ND4 do ADN mitocondrial de *Ae. aegypti* do presente estudo em comparação com outras sequências do mesmo gene já publicadas.

		Posições das mudanças nucleotídicas em pb																												Hap. O	Referência				
Hap		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3			3	3	3	3
		0	2	2	2	3	3	3	3	7	7	7	8	9	0	2	4	5	6	0	2	4	7	8	8	8	9	0	2	2	3	4	4		
		8	5	7	9	0	2	3	5	4	5	8	4	6	8	3	4	3	2	1	8	6	9	2	3	8	4	0	0	4	5	3	8		
HN1		C	G	T	C	T	T	T	C	G	A	G	T	A	G	A	C	T	A	T	A	T	A	T	T	T	A	T	T	C	T	T	C	-	Presente estudo
HN2		.	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	T	C	.	C	G	C	G	A	T	-	Presente estudo
brch1		N	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	T	.	.	.	H1	Bracco <i>et al.</i> , 2007	
brch2		N	A	C	.	.	.	C	C	.	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	T	.	.	.	H2		
brch3		N	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	T	.	.	.	H3		
brch5		N	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	T	C	.	C	G	C	G	A	.	.	G	H5		
brch8		N	.	C	C	.	.	.	T	C	.	C	G	C	G	A	.	C	.	.	.	T	.	.	.		H8
brch9		N	C	C	.	.	.	T	C	.	C	G	.	G	A	.	.	.	C	.	T	.	.	.		H9
brch10		N	C	T	C	.	C	G	.	G	A	T	.	.	.	H10		
brch11		N	G	.	.	A		H11
brch12		N	A	G	.	.	A		H12
brch14		N	.	.	.	C	G	.	.	A		H14
brch19		N	G		H19
brch20		N	.	.	.	C		H20
brch21		N	C	G	G		H21
brch22		N	.	C	.	.	.	C		H22
brch23		N	.	C	T	C	.	C	T	G	.	.	A	T	.	.	.	H23		
Limah1		C	G	.	.	A	T	.	.	.	H1		
Limah2		C	G	T	H2		

Tabela 27. Locais variáveis observados no alinhamento do gene ND4 do ADN mitocondrial de *Ae. aegypti* do presente estudo em comparação com outras sequências do mesmo gene já publicadas (continuação).

Hap	Posições das mudanças nucleotídicas em pb																												Hap. O	Referência				
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3			3	3	3	3
Limah3	8	5	7	9	0	2	3	5	4	5	8	4	6	8	3	4	3	2	1	8	6	9	2	3	8	4	0	0	4	5	3	8	H3	Júnior e Scarpassa, 2009
Limah4	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	G	.	.	A	T	.	.	.	H4		
Limah6	G	G	H6		
Limah7	C	C	.	.	.	T	.	.	.	G	C	G	A	T	.	.	.	H7		
Limah8	C	C	.	.	.	T	C	.	C	G	C	G	A	T	.	.	.	H8		
Limah9	C	C	.	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	T	.	.	.	H9		
Limah10	C	C	.	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	C	.	.	.	T	.	.	.	H10		
Limah12	.	.	.	C	.	C	C	.	.	.	T	C	.	C	G	C	.	A	.	C	.	.	.	T	.	.	.	H12		
Padh2	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	H2		
Padh3	.	.	C	C	.	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	.	T	.	.	.	H3		
Padh4	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	.	T	.	.	.	H4		
Padh5	C	.	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	.	T	.	.	.	H5		
Padh6	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	T	C	.	C	G	C	G	A	.	.	G	.	.	T	.	.	.	H6		
Padh7	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	T	C	.	C	G	C	G	A	T	.	.	.	H7		
Padh9	.	.	C	C	.	.	.	T	C	.	C	G	C	G	A	T	.	.	.	H9		
Padh10	C	C	H10		
Padh11	.	.	C	G	.	.	A	T	.	.	.	H11		
Padh12	.	.	C	.	.	.	C	H12		
Padh14	.	.	C	.	.	.	C	G	G	H14		
Padh15	.	.	C	G	G	H15		
Padh18	G	H18		

Tabela 27. Locais variáveis observados no alinhamento do gene ND4 do ADN mitocondrial de *Ae. aegypti* do presente estudo em comparação com outras sequências do mesmo gene já publicadas (continuação).

		Posições das mudanças nucleotídicas em pb																												Hap. O	Referência			
Hap.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3			3	3	3
		8	5	7	9	0	2	3	5	4	5	8	4	6	8	3	4	3	2	1	8	6	9	2	3	8	4	0	0			4	5	3
Gorroh2	.	.	C	.	.	.	C	C	.	.	.	T	.	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	.	T	.	.	.	H2	Gorochote gui- Escalante <i>et al.</i> , 2002
Gorroh4	T	H4	
Gorroh7	A	H7	
Gorroh8	T	A	H8	
Gorroh9	A	G	H9	
Gorroh10	T	A	.	.	H10	
Gorroh11	T	G	.	.	H11		
Gorroh12	A	H12	
Gorroh13	.	.	.	A	G	.	.	A	H13	
Gorroh14	A	C	.	G	.	G	.	C	H14	
Gorroh15	.	.	C	A	H15	
Gorroh16	T	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	.	T	H16		
Gorroh17	T	.	C	.	.	.	C	.	A	.	.	C	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	.	T	.	.	.	H17		
Gorroh18	T	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	T	.	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	.	T	H18		
Gorroh19	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	T	.	G	C	G	C	G	G	.	.	G	.	.	T	H19		
Gorroh20	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	H20		
Gorroh21	.	.	C	C	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	C	T	A	.	A	.	H21		
Gorroh22	.	.	C	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	A	.	H22		
Gorroh23	.	.	C	C	.	.	T	C	G	C	G	C	G	A	.	.	G	.	.	T	H23		
Gorroh24	.	.	C	.	.	.	C	.	.	G	.	C	.	.	T	C	.	C	G	C	G	A	.	C	.	.	.	T	.	.	.	H24		
Gorroh25	T	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	T	C	.	C	G	C	G	G	A	C	.	.	.	T	.	.	.	H25			

Tabela 27. Locais variáveis observados no alinhamento do gene ND4 do ADN mitocondrial de *Ae. aegypti* do presente estudo em comparação com outras sequências do mesmo gene já publicadas (continuação).

		Posições das mudanças nucleotídicas em pb																												Hap. O	Referência					
Hap.		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3			3	3	3	3	
		0	2	2	2	3	3	3	3	7	7	7	8	9	0	2	4	5	6	0	2	4	7	8	8	8	9	0	2	2	3	4	4			
		8	5	7	9	0	2	3	5	4	5	8	4	6	8	3	4	3	2	1	8	6	9	2	3	8	4	0	0	4	5	3	8			
Pauph2		N	N	N	N	N	N	N	N	G	G	.	.	A	H2	Paupy <i>et al.</i> , 2005
Pauph3		N	N	N	N	N	N	N	N	T	.	.	.	G	.	.	A	H3	
Pauph4		N	N	N	N	N	N	N	N	.	.	.	C	.	A	.	T	C	.	C	G	.	G	A	.	.	.	C	.	T	H4	

Legenda: **Hap** – Haplótipos com a designação atribuída no presente estudo; **Hap.O.** – Haplótipo com a designação original atribuída na referência bibliográfica em que foi descrito; **Referência** - referência bibliográfica em que foram descritos os haplótipos designados. Os pontos (.) indicam que o mesmo nucleótido está presente no haplótipo HN1. As letras são as iniciais das bases nucleotídicas correspondentes: C- Citosina, T- Timina, A-Adenina, G- Guanina.

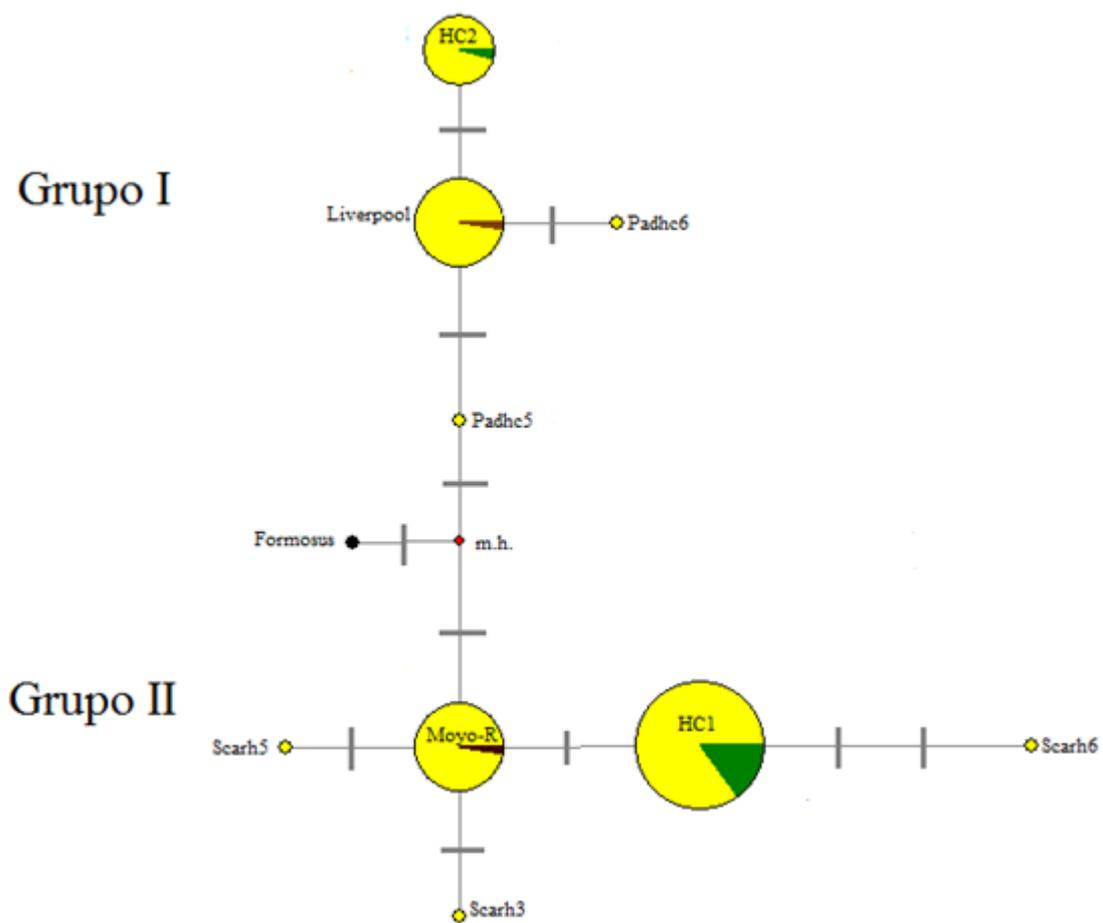


Figura 27. – Rede de haplótipos obtida para o gene COI, através do método “median joining”, baseada nos haplótipos representados na Tabela 26. Cada barra cinzenta, entre as linhas que ligam os haplótipos, representam uma mutação. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos para cada haplótipo. m.h. representa a abreviação de “missing haplotypes”. **Legenda:** Verde – Madeira; Amarelo – Brasil; Castanho-claro – África Ocidental (estirpe de Liverpool); Castanho-escuro – África Oriental (estirpe Moyo-R); Preto – estirpe formosus.

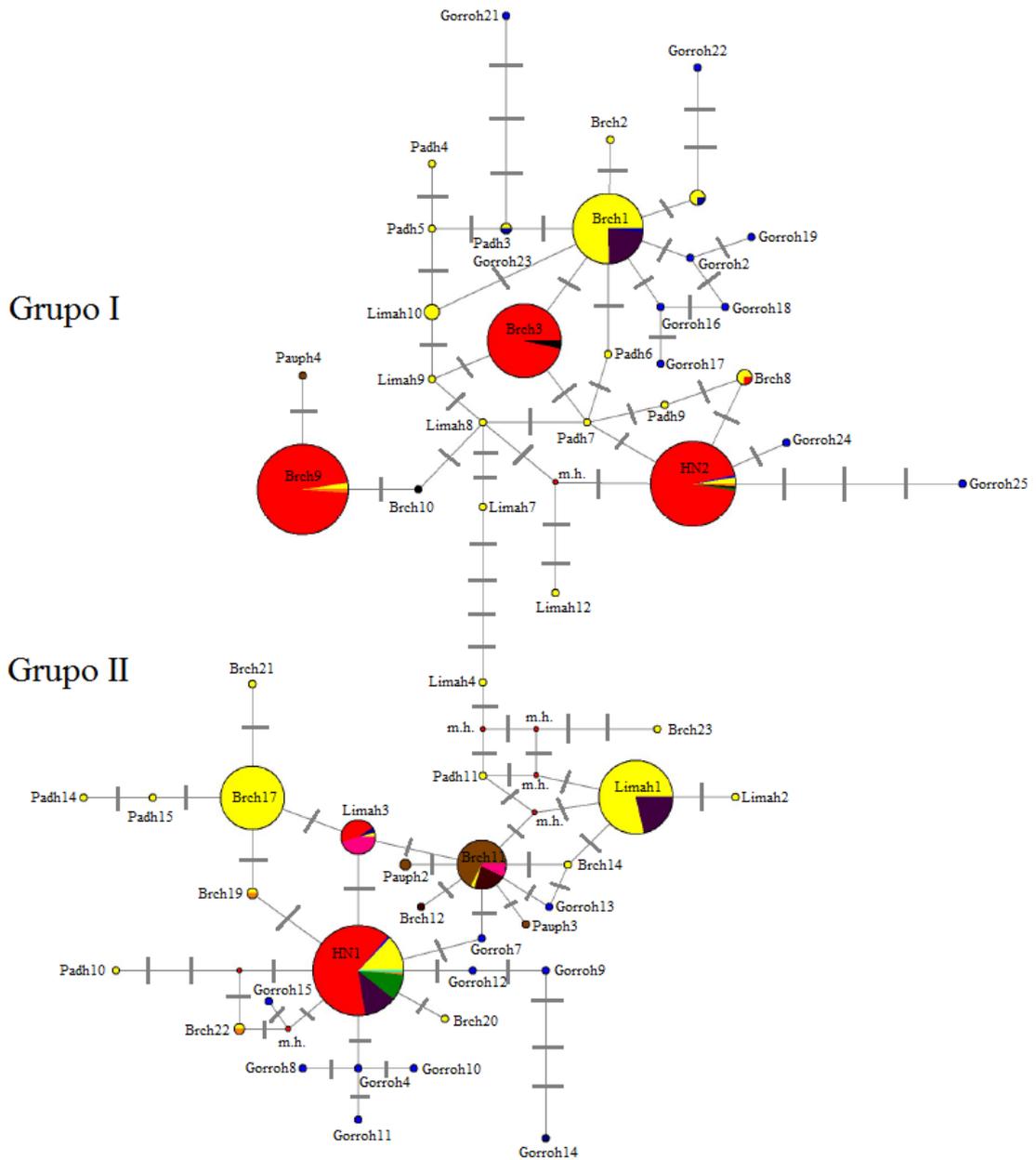


Figura 28. – Rede de haplótipos obtida para o gene ND4 através do método “median joining”, baseada nos haplótipos representados na Tabela 27. Cada barra cinzenta, entre as linhas que ligam os haplótipos, representam uma mutação. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos para cada haplótipo. m.h. representa a abreviação de “missing haplotypes”. **Legenda:** Verde – Madeira; Vermelho – Venezuela; Azul-escuro – México; Azul claro – Guatemala; Roxo – Perú; Amarelo – Brasil; Laranja – EUA; Rosa – Ásia; Castanho-claro – Camarões; Castanho-escuro – Uganda e Guiné Conacri; Preto – Senegal.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) invadiu recentemente a ilha da Madeira (Margarita *et al.*, 2006). Desde então surge como um dos principais motivos de preocupação das autoridades de saúde do arquipélago devido ao seu papel como agente de incomodidade e potencial vector de várias arboviroses. Uma vez que a aplicação de insecticidas é uma das estratégias mais utilizadas no controlo de *Ae. aegypti*, pretendeu-se, neste estudo, caracterizar fenotipicamente esta população culicídica quanto aos seus níveis de sensibilidade a vários insecticidas. Face aos resultados reveladores de uma população de *Ae. aegypti* resistente ao DDT e a dois dos piretróides testados (permetrina e deltametrina), prosseguiu-se com estudos genéticos para a identificação da presença de mutações que conferem resistência do tipo local-alvo aos três insecticidas mencionados. De modo a inferir também sobre a origem das resistências observadas, verificou-se a possível proveniência geográfica da população deste mosquito invasor.

5.1. Bioensaios para determinação dos níveis de sensibilidade de *Aedes aegypti* a insecticidas.

Os insecticidas químicos são, por todo o mundo, a estratégia mais usada de controlo vectorial. Assim, é crucial uma monitorização regular da resistência aos insecticidas para a manutenção desta ferramenta estratégica (Ffrench-Constant, 2005). No caso de *Ae. aegypti*, já surgiram resistências às quatro classes de insecticidas (carbamatos, organoclorados, organofosfatos e piretróides) mais utilizados no controlo de mosquitos (Ranson *et al.*, 2010).

Até à data, nenhum estudo tinha sido feito para avaliar a sensibilidade de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira aos insecticidas. Assim, procedeu-se à utilização de testes diagnóstico da OMS e de ensaios garrafas do CDC para caracterizar esta população no que respeita a este parâmetro. O estudo da sensibilidade de *Ae. aegypti* aos insecticidas testados revelaram elevada susceptibilidade destes mosquitos ao malatião, com uma taxa de mortalidade de 99.0%, mas uma reduzida mortalidade sob acção dos piretróides de síntese, permetrina (33.3%) e deltametrina (65.2%). Foi também detectada uma forte

resistência ao DDT, com uma taxa de mortalidade de 29.4%, e uma elevada susceptibilidade à alfa-cipermetrina (100%) e ciflutrina (100%).

Nos ensaios da OMS, o número de mosquitos mortos 24 horas após a interrupção da exposição à permetrina e deltametrina, é claramente inferior àquele registado no final do período de exposição de 60 minutos. No entanto, este efeito “knock-down”, seguido da recuperação dos mosquitos expostos a piretróides, não foi observado nos testes de garrafa do CDC. Esta ausência de recuperação de mosquitos “knock-down” está de acordo com o que é expectável deste teste, já que o protocolo do mesmo não menciona a necessidade de uma estimativa de mortalidade 24 horas após a interrupção da exposição dos insectos ao insecticida. No entanto, autores que, na execução de ensaios CDC, efectuaram a determinação da taxa de mortalidade após 24 horas (Lima *et al.*, 2011), registaram um processo de recuperação de mosquitos tombados, em tudo semelhante ao que acontece em mosquitos testados nos ensaios da OMS. Assim, e para o caso particular deste estudo, a quantidade de insecticida utilizada no revestimento das garrafas poderá explicar a ausência deste fenómeno. Devido à inexistência, à data dos testes, de uma colónia reconhecida como sensível, optou-se por estabelecer, como “ponto de saturação”, as concentrações e os tempos de exposição referidos nos protocolos do CDC para anofelíneos vectores de malária (WHO, 1998). No entanto, com base nos gráficos A e B da Figura 22, observa-se que ao final de 10 minutos de exposição todos os mosquitos já se encontravam tombados. Tal facto pode ser indicativo de que o “ponto de saturação” utilizado nestes testes foi excessivo para a espécie em causa. Tal parece ser corroborado por Da-Cunha *et al.*, (2005) que utilizaram, como concentração diagnóstico, 8 µg de cipermetrina por garrafa na avaliação da sensibilidade, a este insecticida, da população brasileira de *Ae. aegypti*. Assim, os resultados aqui apresentados deverão ser considerados como preliminares, recomendando-se a repetição destes testes, com prévia determinação do tempo de saturação e concentração diagnosticante, efectuada com base numa colónia reconhecidamente sensível (*e.g. Ae. aegypti*, estirpe Rockfeller).

No que se refere à estimativa dos tempos de exposição correspondentes a 50% e 99.9% de mortalidade, ou seja, os tempos de exposição correspondente a LT_{50} e $LT_{99,9}$, estes só foram estimados para o caso do DDT. Tal deveu-se ao facto de, para os

insecticidas malatião, permetrina e deltametrina, o modelo “probit” não se ajustar adequadamente aos dados observados, sugerindo a existência de uma relação curvilínea entre as variáveis (*i.e.* tempo de exposição e mortalidade) (Finney, 1971). Tal relação curvilínea pode resultar, no caso da permetrina e deltametrina, da acção de mecanismos de resistência a insecticidas.

No controlo vectorial efectuado na ilha da Madeira têm sido aplicados insecticidas comerciais que apresentam na sua composição alfa-cipermetrina (Fendona), fenotrina, tetrametrina (KILLIGERM ULV 500) e malatião (Mastro). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que estes produtos deverão ser efectivos no controlo para a população culicídea alvo, principalmente quando associados com um sinergista (butóxido de piperonilo, KILLIGERM ULV 500) que anulará os efeitos dos mecanismos de desintoxicação associados a uma eventual resistência metabólica.

A ausência de estratégias de controlo baseadas na aplicação de DDT, permetrina ou deltametrina sugere que as resistências detectadas a estes insecticidas já existiriam nos indivíduos que colonizaram a região e não são uma consequência de pressões selectivas resultantes do controlo vectorial efectuado na ilha. Conclusão semelhante foi reportada por Kamgang e os seus colaboradores, em relação à recente introdução de *Ae. albopictus* nos Camarões, cuja população invasora já apresentaria resistência ao DDT e à deltametrina (Kamgang *et al.*, 2011b). Já Harris e os colaboradores desconhecem se a elevada resistência aos piretróides verificada nas populações das ilhas Caimão foi introduzida com a estirpe de *Ae. aegypti* que invadiu este território em 2002 ou se foi resultado do uso intensivo de piretróides (Harris *et al.*, 2010). De realçar que o aparecimento de resistências a insecticidas em mosquitos vectores de doenças humanas nem sempre está associado à aplicação destes compostos no controlo vectorial, mas podem ser resultado de estratégias de gestão de pragas agrícolas (Braga e Valle, 2007) ou da utilização intensiva de insecticidas de uso doméstico (Morrison *et al.*, 2008).

5.2. Detecção de mutações *kdr* associadas a resistências a insecticidas

Os mecanismos que normalmente conferem resistência ao DDT e aos piretróides são as mutações *kdr* no canal de sódio e a actuação de enzimas de desintoxicação, como as GSTs e as monooxigenases P450 (Hemingway *et al.*, 2004). Um dos objectivos deste estudo foi avaliar a frequência de mutações *kdr* no canal de sódio na população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira. A detecção precoce de mutações *kdr* é essencial para a monitorização de resistências numa população de mosquitos. Neste estudo, recorreu-se à sequenciação dos exões 20 e 21 para a pesquisa de mutações nos codões 1011 e 1016. Estas mutações estão claramente associadas a resistência a insecticidas de populações de *Ae. aegypti* da América Latina e Caraíbas (Bregues *et al.*, 2003; Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2010).

Como resultado da sequenciação dos produtos de PCR do gene do canal de sódio, verificou-se a presença de sequências com picos duplos nos electroferogramas, tornando assim impossível concluir sobre a presença das referidas mutações. Assim, optou-se por clonar as sequências que apresentassem estes picos, assim como já tinha sido feito noutros trabalhos (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009a; Martins *et al.*, 2009b). Tal processo permitiu, sem qualquer dúvida, verificar a presença em dois indivíduos da mutação V1016I em heterozigotia e assim solucionar este problema. Assim, os nossos resultados mostraram uma frequência alélica da mutação V1016I de 0.06, enquanto a mutação V1016G descrita por Bregues *et al.*, (2003) não foi detectada. No entanto, esta mutação foi apenas identificada em populações de *Ae. aegypti* da Tailândia (Rajatileka *et al.*, 2008). No codão 1011 não foi detectada nenhuma das mutações descritas por Bregues *et al.*, (2003) e Saavedra-Rodriguez *et al.*, (2007), observando-se apenas o alelo sensível (Tabela 2).

A frequência alélica da mutação V1016I, determinada para a população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira, é claramente inferior à estimada para a população da ilha francesa de Martinica, que revelou uma frequência alélica desta mutação de 0.71 (Marcombe *et al.*, 2009), e às estimadas para as populações da Venezuela, em que as frequências deste alelo variam entre 0.20 e 0.51 (Urdaneta-Marquez *et al.*, 2008). No entanto, o aumento das frequências de alelos *kdr* pode ocorrer de um modo

relativamente célere. Em 2003, a mutação V1016I não foi detectada na população de *Ae. aegypti* da Foz do Iguaçu (Brasil). Já em 2009, nesta área, a frequência deste alelo atingia o valor mais elevado para as regiões Centro-Oeste e Este do Brasil atingindo 0.74 em Foz do Iguaçu, continuando ausente no Nordeste e Sudeste do país (Martins *et al.*, 2009b). Em 2011, a mutação V1016I foi finalmente encontrada no Nordeste do Brasil, nas cidades de Crato e Juazeiro do Norte, com frequências alélicas de 0.28 e 0.08 respectivamente (Lima *et al.*, 2011). Os resultados destes estudos vêm reforçar a necessidade de monitorizar periodicamente as resistências *kdr* na população de *Ae. aegypti* presente na ilha da Madeira visto que a mutação detectada, V1016I, tem sido claramente associada à resistência a insecticidas piretróides (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007). Esta associação tem implicações nos programas de controlo, pois o uso contínuo de piretróides pode promover um aumento drástico na frequência alélica desta mutação conduzindo, rapidamente, à sua fixação, tal como aconteceu com populações de *Ae. aegypti* do México (García *et al.*, 2009).

Os níveis de resistência ao DDT e aos piretróides detectados na população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira não parecem poder ser totalmente justificados pela frequência de mutações *kdr* estimadas neste estudo. Assim, seria interessante efectuar estudos bioquímicos para identificar a presença de outros mecanismos de resistência que possam estar associados aos níveis de resistência observados na população em causa. Esta necessidade parece particularmente premente quando se analisa o historial da resistência de *Ae. aegypti* aos insecticidas, reportado por todo o mundo. Na América Latina e nas Caraíbas já foram registadas populações de *Ae. aegypti* resistentes aos piretróides, carbamatos e organofosfatos, sendo que esta resistência estava relacionada com actividades elevadas de pelo menos uma família de enzimas de desintoxicação (Marcombe *et al.*, 2009) e/ou genes *kdr* (Harris *et al.*, 2010). Na Colômbia, a situação actual indica que a resistência encontrada em *Ae. aegypti* locais é devida aos elevados níveis metabólicos de actividade das P450s e GSTs detectadas nessas populações (Fonseca-González *et al.*, 2010).

O nível de resistências apresentadas por variadas populações de *Ae. aegypti* e a sua constante rápida progressão, reforçam a necessidade de vigilância constante da susceptibilidade aos insecticidas usados nos programas de controlo vectorial (Lima *et*

al., 2011). Esta vigilância deve acontecer antes, ou assim que o insecticida começar a ser utilizado, de modo a poder-se determinar o nível inicial de resistência, de modo a facilitar a sua monitorização. Deste modo, este estudo fornece dados sobre os níveis iniciais de resistência aos insecticidas testados, sugerindo que ainda há insecticidas aplicáveis. Os resultados aqui apresentados serão ainda úteis para comparações com os níveis de resistência a serem obtidos em anos vindouros ajudando a traçar o perfil de evolução deste fenómeno num ambiente muito particular, ou seja, numa população em expansão, recentemente introduzida numa ilha e deste modo isolada de grandes movimentos migratórios.

Normalmente, as estratégias de monitorização de resistências a insecticidas recomendam o uso rotativo de químicos, com diferentes modos de actuação, e o uso do controlo biológico. Existe o pressuposto de que a resistência a um insecticida desaparecerá de uma população a partir do momento em que a pressão de selecção, ou seja, a utilização do insecticida em questão, seja removida (Ranson *et al.*, 2010). Em contrapartida, existem estudos que referem que a interrupção do uso do insecticida, por si só, não é suficiente para reverter a resistência sendo necessário introduzir indivíduos susceptíveis na população (Melo-Santos *et al.*, 2010). No entanto, a espécie *Ae. aegypti* possui uma capacidade de dispersão activa baixa em ambientes com densidades populacionais elevadas (Harrington *et al.*, 2005). Tal implica que, mesmo entre populações geograficamente próximas, o fluxo genético entre diferentes populações de *Ae. aegypti* é baixo (Ayres *et al.*, 2004). Assim, a introdução por migração activa de indivíduos susceptíveis em populações resistentes é pouco provável. Tal facto reforça o pressuposto que, em particular para *Ae. aegypti*, o mais recomendável é alternar entre classe de insecticidas com a frequência suficiente para impedir a emergência de qualquer resistência (Ranson *et al.*, 2010) e utilizar insecticidas biológicos devido ao seu menor impacto ecológico e à sua baixa tendência para induzir resistências.

5.3. Origem geográfica da população de *Aedes aegypti* da ilha da Madeira

Os marcadores do ADN mitocondrial têm sido muito utilizados por todo o mundo para caracterizar a diversidade genética e a filogeografia de populações de *Ae. aegypti* (Gorochotegui-Escalante *et al.*, 2002; Bracco *et al.*, 2007; Paduan e Ribolla, 2008; Urdaneta-Marquez *et al.*, 2008; Júnior e Scarpassa, 2009; Delatte *et al.*, 2011).

Os genes analisados neste estudo (ND4 e COI) foram seleccionados devido ao conhecimento dos seus polimorfismos obtido em estudos anteriores efectuados na mesma espécie (Gorochotegui-Escalante *et al.*, 2002; Costa-da-Silva *et al.*, 2005; Beebe *et al.*, 2005; Mousson *et al.*, 2005; Bracco *et al.*, 2007; Paupy *et al.*, 2008; Urdaneta-Marquez *et al.*, 2008; Paduan e Ribolla, 2008; Scarpassa *et al.*, 2008; Júnior e Scarpassa, 2009; Delatte *et al.*, 2011). Neste tipo de estudos é normal o uso de amostras pequenas (10 ou 15 indivíduos) e está demonstrado que a baixa diversidade, quando encontrada, não está relacionada com o tamanho da amostra (Kamgang *et al.*, 2011a).

Relativamente ao gene COI, no presente estudo foram encontrados apenas dois haplótipos: o HC1 com maior frequência (93.3%) e o HC2 com uma frequência muito baixa (6.66%). Neste último, verificou-se a ocorrência de heteroplasmia, sendo uma situação já documentada em ADN mitocondrial de *Ae. aegypti* (Black IV e Bernhardt, 2009; Paduan e Ribolla, 2008). Assim, de modo a solucionar este problema, recorreremos à clonagem do fragmento amplicado. Este é o melhor método para detectar a presença de “Numts” que possam estar a causar a heteroplasmia observada (Hlaing *et al.*, 2009). Este processo permitiu observar a verdadeira sequência do fragmento de ADN mitocondrial em estudo.

Para o gene ND4, foram encontrados também dois haplótipos: o HN1 com maior frequência (93.3%) e o HN2 com uma frequência muito baixa (6.66%).

Para o gene COI, os valores de diversidade nucleotídica encontrados no Brasil, $\pi = 0,00651 \pm 0,0003$ por Scarpassa *et al.*, (2008) e $\pi=0.00485$, por Paduan e Ribolla (2008) foram superiores à encontrada neste estudo ($\pi_{COI} = 0,00153$).

Do mesmo modo, os valores de diversidade nucleotídica deste presente estudo, para o gene ND4 ($\pi_{ND4} = 0,00548$), foram inferiores aos encontrados no México ($\pi = 0,0143$) por Gorrochotegui-Escalante *et al.*, (2002), na Venezuela ($\pi = 0,0187$) por Urdaneta-Marquez *et al.*, (2008) e no Brasil ($\pi = 0,01997$; $\pi=0.01740$) por Bracco *et al.*, (2007) e Paduan e Ribolla (2008). No entanto, verificaram-se valores semelhantes de diversidade nucleotídica em populações do Perú e da Tailândia ($\pi = 0,0079$) (Costa-da-Silva *et al.*, 2005; Bosio *et al.*, 2005).

A baixa diversidade nucleotídica ($\pi_{ND4} = 0,00548$; $\pi_{COI} = 0,00153$) encontrada na população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira é consistente com a recente introdução desta espécie na região. Tal pode ser devido a um possível efeito fundador, inerente à perda de variabilidade genética, que ocorre quando uma nova população é estabelecida a partir de um número pequeno de indivíduos oriundos de uma população maior (Hartl, 2000).

Neste estudo, e tal como noutros efectuados anteriormente com ND4, os valores de diversidade nucleotídica estimados para este gene, $\pi_{ND4} = 0,00548$, foram mais elevados do que os obtidos com o gene COI ($\pi_{COI} = 0,00153$) (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2002; Herrera *et al.* 2006; Bracco *et al.* 2007; Scarpassa *et al.* 2008). Tal é explicado pelo facto de, em *Ae. aegypti*, o gene COI ser considerado mais conservado que o ND4 (Scarpassa *et al.* 2008).

Ao alinharmos estes haplótipos encontrados na ilha da Madeira com outros detectados em estudos anteriores, verificámos que eram haplótipos já existentes noutros locais do globo (ver Tabela 23 e 25).

A análise da rede de haplótipos feita neste estudo para o gene COI teve muito menos haplótipos para comparação do que o gene ND4. Mesmo assim, foi possível obter uma rede que corrobora os resultados obtidos na árvore desenhada com os haplótipos do gene ND4. Assim sendo, verificámos a presença, na ilha da Madeira, das duas linhagens mitocondriais designadas para este gene (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002; Costa-da-Silva *et al.*, 2005; Bosio *et al.*, 2005; Bracco *et al.*, 2007; Scarpassa *et al.*, 2008; Júnior e Scarpassa, 2009). O haplótipo HC1 enquadrou-se no denominado grupo II que apresenta haplótipos do Brasil e da África Oriental, enquanto que HC2

enquadrou-se num grupo I com haplótipos do Brasil e com um haplótipo oriundo da África Ocidental (Scarpassa *et al.*, 2008 e Paduan e Ribolla, 2008).

A análise mais completa da rede de haplótipos do gene ND4 evidenciou a presença na Madeira, tal como na rede do gene COI, de duas linhagens mitocondriais distintas identificadas para este gene em *Ae. aegypti*: a linhagem denominada de grupo II, onde se insere o haplótipo HN1 associado a outros oriundos das Américas (norte, central e sul), Ásia e África (oriental e ocidental) e uma segunda linhagem (grupo I) em que HN2 agrupa com haplótipos da África Ocidental (Senegal) e Américas (norte, central e sul).

A presença destas duas linhagens distintas nas populações de *Ae. aegypti* é explicada por Bracco *et al.*, (2007) do seguinte modo: *Aedes aegypti* terá atingido as Américas durante o século XVII e XVIII. A partir dos locais de introdução, as populações expandiram-se até à implementação das medidas de controlo adoptadas entre 1950 e 1960. Estas populações sofreram, como consequência da forte pressão de insecticidas, um *bottleneck* (efeitos de gargalo de garrafa). Em 1970, o controlo vectorial faliu e *Ae. aegypti* re-invasiu a maioria dos países americanos. Bracco e seus colaboradores sugerem dois cenários evolutivos possíveis que explicam esta re-invasão: (i) é possível que alguns indivíduos tenham sobrevivido ao programa intensivo de controlo vectorial adoptado pelos países americanos, recolonizando-os após a interrupção das medidas de controlo; (ii) ocorreu uma dispersão de *Ae. aegypti* a partir de países onde a erradicação nunca foi conseguida. De qualquer modo, uma linhagem antiga de *Ae. aegypti aegypti*, geneticamente mais próxima da subespécie silvática *Ae. aegypti formosus*, persistiu e dispersou-se pelas Américas. Os haplótipos dos grupos I (dos genes COI e ND4) podem ser representativos desta linhagem (Bracco *et al.*, 2007; Júnior e Scarpassa, 2009). Quanto aos haplótipos dos grupos II (COI e ND4), estes devem ter sido introduzidos nas Américas durante os anos 80, como consequência das intensas trocas comerciais com países Asiáticos. Posteriormente, os haplótipos dos grupos II foram transportados para várias regiões, dentro dos próprios países, através das rotas comerciais (Bracco *et al.*, 2007).

Na ilha da Madeira os haplótipos mais frequentes de ambos os genes (HC1 e HN1) pertencem a estes grupos II. Estes haplótipos estão presentes em cidades com

grandes portos comerciais e grandes densidades demográficas do norte e sudeste do Brasil (Manaus, Belém, Santos, São Sebastião e Porto Velho), e, a partir destas localizações, poderão ter-se dispersado para outros locais do Mundo por via marítima. A ocorrência das duas linhagens de *Ae. aegypti* na ilha da Madeira poderá ter relevância epidemiológica, uma vez que vários estudos têm vindo a revelar que mosquitos de diferentes linhagens genéticas podem apresentar susceptibilidade desigual (*i.e.* competência vectorial) à infecção com arbovirus (Beerntsen *et al.*, 2000; Failloux *et al.*, 2002; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004; Urdaneta-Marquez *et al.* 2008) e respostas distintas aos programas de controlo vectorial (Júnior e Scarpassa, 2009).

A análise da rede de haplótipos do gene COI e do gene ND4 permitem-nos sugerir dois cenários para o estabelecimento da população de *Ae. aegypti* na ilha da Madeira (i) ocorreram pelo menos duas introduções independentes de *Ae. aegypti*, ou; (ii) ocorreu a introdução simultânea de mosquitos com os dois haplótipos identificados. Esta última hipótese é possivelmente a mais provável, pois a população em causa apresenta baixa variabilidade genética, pouco compatível com a existência de vários fenómenos de introdução (Kamgang *et al.*, 2011a). No entanto, a possibilidade de terem ocorrido múltiplas introduções não deverá ser descurada, já que tal poderá ter um impacte epidemiológico importante na transmissão de doenças mediadas por *Ae. aegypti*. A existência de fluxo genético entre diferentes populações pode facilitar a dispersão de genes relacionados com a transmissão e, assim, aumentar a competência vectorial para a transmissão do vírus da dengue e da febre amarela (Scarpassa *et al.*, 2008). Além disso, estudos recentes demonstraram o importante papel das múltiplas introduções numa colonização bem sucedida por parte de espécies invasivas (Kolbe, 2004; Zalewski *et al.*, 2010). Exemplo disso foi evidenciado por Fonseca *et al.*, (2001) quanto ao estabelecimento de *Ae. (Finlaya) japonicus* (Theobald, 1901) nos EUA. A fase de introdução de uma população numa nova região está normalmente sujeita a vários “*bottlenecks*”. Estes podem reduzir a variabilidade genética das populações fundadoras a níveis por vezes incompatíveis com uma fase subsequente de expansão. Múltiplas introduções terão como resultado um aumento da variabilidade genética da população invasora, permitindo a sua expansão eficiente e melhor adaptação a novos ambientes (Kamgang *et al.*, 2011a). No caso da população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira ter resultado de um único evento de introdução, os haplótipos identificados

neste estudo deverão estar bem adaptados às condições ambientais da região já que a espécie continua a expandir-se, tanto para oeste como para este do concelho do Funchal, local presumível da sua introdução.

5.4. Conclusões finais

Com base na análise molecular do ADN mitocondrial não é possível fazer uma inferência precisa sobre a origem geográfica de *Ae. aegypti* que invadiu a ilha da Madeira. No entanto, e com base na informação disponível, os haplótipos identificados para a Madeira, encontram-se apenas referenciados em simpatria (para o país), no Brasil, Venezuela, EUA e México (Figura 29). No que se refere à análise dos alelos *kdr*, a mutação V1016I, conferente de resistência aos piretróides, já foi assinalada em populações do Brasil, Venezuela, México, Martinica e ilhas Caimão (Figura 32). No entanto, as frequências alélicas desta mutação obtidas nestes países foram superiores à estimada para a ilha da Madeira. Do mesmo modo, V1016I ocorre em diversas regiões do Brasil com frequências claramente superiores à da ilha da Madeira (Martins *et al.*, 2009a; Martins *et al.*, 2009b). Exceptua-se a área de Boa Vista (Martins *et al.*, 2009b) onde a frequência alélica desta mutação (0.05) é semelhante aos valores estimados para a Madeira.

Com base nos dados genéticos obtidos e face ao elevado número de imigrantes brasileiros na Madeira e à grande comunidade de madeirenses (aproximadamente 300 mil) emigrados na Venezuela, e ao conseqüente elevado tráfego entre a Madeira e estes dois países, a hipótese mais provável é que *Ae. aegypti* seja oriundo destas regiões da América Latina.

Os elevados níveis de resistência ao DDT e aos piretróides, detectados na população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira, não parecem poder ser totalmente justificados pela frequência de mutações *kdr* estimadas neste estudo. Do mesmo modo, a pressão selectiva exercida pelas medidas de controlo vectorial implementadas pelas autoridades de saúde da RAM, não parecem explicar a existência de tais resistências. Assim, os resultados referentes ao estudo da sensibilidade da população de *Ae. aegypti* aos insecticidas, associados à estimativa da frequência dos alelos *kdr* e à análise

filogeográfica baseada no ADN mitocondrial, reforçam a ideia de que as resistências aos insecticidas detectadas na população da Madeira já deveriam existir nos indivíduos que colonizaram a região.

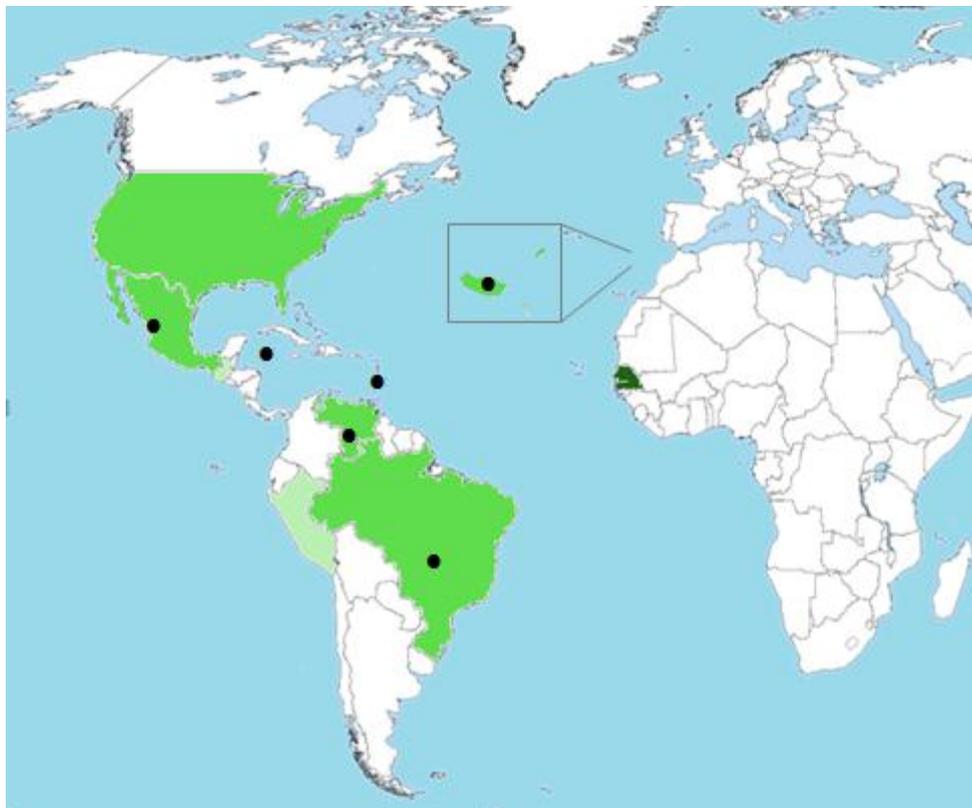


Figura 29. – Representação da distribuição dos haplótipos do gene ND4 e mutações *kdr* encontrados neste estudo. **Legenda:** Verde-escuro – apenas HN2 (Senegal); Verde-intermédio – onde HN1 e HN2 se encontram em simpatria (Madeira, EUA, México, Venezuela e Brasil); Verde-claro - apenas HN1 (Perú e Guatemala); **Círculos pretos** – locais com a mutação *kdr* V1016I já descrita.

5.5. Perspectivas futuras

O aumento de espécies invasivas na Europa poderá servir de catalisador ao desenvolvimento de doenças até aqui presentes na Europa apenas quando algum viajante infectado regressava de um país endémico. A introdução e a rápida expansão de *Ae. albopictus* pela Europa é um exemplo do risco actual no que se refere à (re)-emergência de doenças transmitidas por vectores (Reiter, 2010). O estabelecimento de *Ae. albopictus* permitiu a ocorrência de casos autóctones de febre da dengue e chikungunya em França (Gould *et al.*, 2010) e de um surto de chikungunya no norte de

Itália (Rezza *et al.*, 2007). A possível reintrodução de *Ae. aegypti* na Europa aumenta mais ainda a possibilidade de transmissão de arbovírus ao Homem. O risco de reintrodução desta espécie no sul da Europa é mais elevado, pois aí o clima, mais quente e húmido, permite a manutenção de populações do mosquito durante todo o ano (Reiter, 2010). No norte da Europa, onde o clima é mais temperado, o risco de introdução será mais elevado nos meses mais quentes do ano, pois suspeita-se que as populações de *Ae. aegypti* não sobrevivam ao inverno da região. No entanto, *Ae. aegypti* foi recentemente detectado na Holanda em depósitos de pneus (Brown *et al.*, 2010). Após a verificação de que a introdução da espécie ocorreu a partir de um carregamento de pneus vindo de Miami, foi implementado um controlo rigoroso sobre a importação de pneus vindos dos EUA, de modo a evitar futuros incidentes (Brown *et al.*, 2010). Este estudo realça a necessidade de se determinar inexoravelmente a origem geográfica do mosquito da ilha da Madeira recorrendo a outros marcadores moleculares, tais como microssatélites, e esclarecer o seu modo de introdução de modo a possibilitar a aplicação de medidas preventivas de futuras introduções de *Ae. aegypti* na região.

A possibilidade de se determinar com precisão a origem geográfica da população da ilha da Madeira, possibilitaria ainda inferências sobre a sua competência vectora para a transmissão de arbovírus patogénicos para o Homem. Embora, se assuma, através de vários estudos laboratoriais de infecção artificial de *Ae. aegypti* com vírus da dengue (Failloux *et al.*, 2002), e através da história de ocorrências de epidemias desta doença na América Latina, que *Ae. aegypti* é competente para a transmissão deste arbovírus, sabe-se que este parâmetro epidemiológico pode variar de acordo com o vírus transmitido e a sua estirpe, assim como, com a população do mosquito que o transmite. As populações de *Ae. aegypti* da Venezuela são muito susceptíveis à dengue, tal como demonstrou Urdaneta-Marquez *et al.*, (2008) quando investigou a competência vectora para o serotipo 2, embora, actualmente, já circulem todos os quatro serotipos da dengue no país. Já para o Brasil, Lourenço-de-Oliveira *et al.*, (2004) verificou que a competência vectora para o serotipo 2 da dengue era muito variável, apresentando valores de 21.6% (região Nordeste) a 99% (Norte da Amazónia).

Como perspectiva futura, seria igualmente interessante continuar a monitorizar geneticamente a população madeirense de *Ae. aegypti*. Tal permitiria descartar a

ocorrência de novos haplótipos, fruto de outras introduções, e seguir a evolução desta população insular.

Seria também desejável obtermos informação sobre a estrutura genética de *Ae. aegypti* nesta ilha. O conhecimento da variação genética e o grau de diferenciação genética entre populações pode ser muito importante para modelar a disseminação de infecções arbovíricas num cenário de introdução local do agente infeccioso. Este conhecimento é também importante para a implementação de programas de controlo vectorial visto que pode prever o modo de dispersão de genes de interesse, como aqueles que conferem resistência a insecticidas, e monitorizar o impacto das estratégias de controlo (Sousa *et al.*, 2008).

A ocorrência de um surto arbovílico transmitido por *Ae. aegypti* na ilha da Madeira, parece ser uma possibilidade a considerar. A ilha da Madeira é uma região turística visitada por milhares de turistas todos os anos. Apresenta também elevado número de imigrantes oriundos do Brasil, país onde emergiram surtos recentes da dengue nas suas maiores cidades (Coelho *et al.*, 2008), e um clima tropical húmido, propício ao desenvolvimento do vector e proliferação de arbovírus. De salientar também que 45% (99214 habitantes) da população da ilha reside no concelho do Funchal, (Melim, 2009), local onde foi reportado pela primeira vez a espécie *Ae. aegypti*. Esta elevada densidade demográfica, combinada com o clima da região e uma população não imune, põe em evidência a vulnerabilidade da região para a emergência da dengue ou outras doenças transmitidas por *Ae. aegypti*. Actualmente já está em curso um projecto que visa a avaliação da capacidade vectorial e o risco de introdução de arboviroses nesta região. O projecto está a ser desenvolvido através de uma parceria do IHMT com o IASAÚDE e o IGOT apresentando como objectivos a definição do nível de risco, a delimitação de zonas de maior vulnerabilidade e a modelação da propagação de uma epidemia arbovímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, A.P.G., Gonçalves, Y.M., Novo, M.T., Sousa, C.A., Melim, M., Gracio, A.J., 2007. Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous Region of Madeira, Portugal. *Euro Surveill*, 12(46), pp.3311.

Almeida, A.P.G., Galão, R.P., Sousa, C.A., Novo, M.T., Parreira, R., Pinto, J., Piedade, J., Esteves, A., 2008. Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(8), pp.823-32.

Avise, J.C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36 (1), pp.3-15.

Ayres, C.E., Melo-Santos, M.A., Prota, J.R., Solé-Cava, A.M., Regis, L., Furtado A.E., 2004. Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro and macrogeographic levels in Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20, pp.350-356.

Ballard, J.W.O. e Rand, D.M., 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36, pp.621-642.

Ballinger-Crabtree, M.E., Black IV, W.C., Miller, B.R., 1992. Use of genetic polymorphisms by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47, pp.893-901.

Bandelt, H-J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), pp.37-48.

Barrett, A.D.T. e Higgs, S., 2007. Yellow Fever: a disease that has yet to be conquered. *Annual Review of Entomology*, 52(1), pp.209-229.

Beard, C.B., Hamm, D.M., Collins, F.H., 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, 2(2), pp.103-124.

Beebe, N.W., Whelan, P.L., van den Hurk, A., Ritchie, S., 2005. Genetic diversity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Australia and implications for future surveillance and mainland incursion monitoring. *Communicable Diseases Intelligence*, 29(3), pp.299-304.

Beebe, N. W., Cooper R. D., Mottram P., Sweeney A.W., 2009. Australia's dengue risk driven by human adaptation to climate change. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(5): e429.

Berntsen, B.T., James, A.A., Christensen, B.M., 2000. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), pp.115-137.

Behura, S. K., 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, 15(11), pp.3087-3113.

Bensasson, D., Zhang, D., Hartl, D.L., Hewitt, G.M., 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(6), pp.314-321.

Black IV, W. C. e Bernhardt S. A., 2009. Abundant nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in the *Aedes aegypti* genome. *Insect Molecular Biology*, 18(6), pp.705-713.

Bosio, C.F., Harrington, L.C., Jones, J.W., Sithiprasasna, R., Norris, D.E., Scott, T.W., 2005. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4), pp.434-442.

- Bracco, J.E., Capurro, M.L., Lourenço-de-Oliveira, R., Sallum, M.A., 2007. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 102(5), pp.573-580.
- Braga, I. e Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), pp.295-302.
- Brengues, C., Hawkes, N.J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Manguin, S., Morgan, J.C., Hemingway, J., 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(1), pp.87-94.
- Brogdon, W.G. e McAllister, J.C., 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), pp.605-613.
- Brown, M.D., Kay, B.H., Hendrikz, J.K., 1991. Evaluation of australian mesocyclops (Cyclopoida: Cyclopidae) for mosquito control. *Journal of Medical Entomology*, 28(5), pp.618-623.
- Brown, J.E, Scholte, E-J, Dik, M., Den Hartog, W., Beeuwkes, J., Powell, J.R., 2010. *Aedes aegypti* mosquitoes imported into the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, disponível em <http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.110992>.
- Capela, R., 1981. Contribution to the study of mosquitoes (Diptera, Culicidae) from the Archipelagos of Madeira and the Salvages. I – Madeira. *Arquivos do Museu Bocage (Série A)*, vol. I, pp.45-66.
- Capinera, J.L., 2008. Encyclopedia of Entomology, Second Edition, Volume 4, Springer, pp.2476-2480.

Cavrini, F., Gaibani, P., Pierro, A.M., Rossini, G., Landini, M.P., Sambri, V., 2009. Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. *Journal of Infection in Developing Countries*, 3(10), pp.744-752.

Chang, C., Shen, W.K., Wang, T.T., Lin, Y.H., Hsu, E.L., Dai, S.M., 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(4), pp.272-278.

Che-Mendoza, A., Penilla, R.P., Rodríguez, D.A., 2009. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. *Journal of Biotechnology*. 8(8), pp.1386-1397.

Clary, D.O. e Wolstenholme, D.R., 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 22(3), pp.252-271.

Coelho, G.E, Burattini M.N., Teixeira, M.G., Coutinho, F.A., Massad, E., 2008. Dynamics of the 2006/2007 dengue outbreak in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, pp.535-539.

Cook, S., Diallo, M., Sall, A.A., Cooper, A., Holmes, E.C., 2005. Mitochondrial markers for molecular identification of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae) involved in transmission of arboviral disease in West Africa. *Journal of Medical Entomology*, 42(1), pp.19-28.

Costa, L., Queiroz, J.S., Rês, J.F., 1956. Notes on an entomological survey conducted in the city of Lisbon and outskirts. (Portuguese). *Boletim dos Serviços de Saúde Pública*, 3, pp.7-40.

Costa-da-Silva, A.L., Capurro, M.L., Bracco, J.E., 2005. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 100(6), pp.639-644.

Da-Cunha, M.P., Lima, J.B.P., Brogdon, W.G., Moya, G.E., Valle, D., 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, pp.441-444.

Delatte, H., Bagny, L., Brengue, C., Bouetard, A., Paupy, C., Fontenille, D., 2011. The invaders: Phylogeography of dengue and chikungunya viruses *Aedes* vectors, on the South West islands of the Indian Ocean. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), pp.1769-1781.

de Meeûs, T., McCoy, K.D., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S., Renaud, F., 2007. Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête". *Infection, Genetics and Evolution*, 7(2), pp.308-332.

Diabate, A., Brengues, C., Baldet, T., Dabiré, K.R., Hougard, J.M., Akogbeto, M., Kengne, P., Simard, F., Guillet, P., Hemingway, J., Chandre, F., 2004. The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Tropical Medicine and International Health*, 9(12), pp.1267-1273.

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

Dong, K., 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1), pp.17-30.

Donnelly, M.J., Cuamba, N., Charlwood, J.D., Collins, F.H., Townson, H. 1999. Population structure in the malaria vector, *Anopheles arabiensis* Patton, in East Africa. *Heredity* 83, pp.408-417.

Eritja, R., Aranda, C., Padrós, J., Goula, M., Lucientes, J., Escosa, R., Marquès, E., Cáceres, F., 2000. An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Spain (Diptera: Culicidae). *European Mosquito Bulletin*, 8, pp.10-18.

Etang, J., Vicente, J.L., Nwane, P, Chouaibou, M., Morlais, I., Do Rosario, V.E., Simard, F., Awono-Ambene, P., Toto, J.C., Pinto, J., 2009. Polymorphism of intron-1 in the voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cameroon with emphasis on insecticide knockdown resistance mutations. *Journal of Molecular Evolution*, 18(14), pp.3076-3086.

Failloux, A.B., Vazeille, M., Rodhain, F., 2002. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution*, 55(6), pp.653-663.

Farenhorst, M., Mouatcho, J.C., Kikankie, C.K., Brooke, B.D., Hunt, R.H., Thomas, M.B., Koekemoer, L.L., Knols, B.G.J., Coetzee, M., 2009. Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *PNAS*, 106(41), pp.17443-17447.

Ffrench-Constant, R.H., Pittendrigh, B., Vaughan, A., Anthony, N., 1998. Why there so few resistance-associated mutation target genes? *Philosophical Transactions of the Royal Society London*, 353(1376), pp.1685-1693.

Ffrench-Constant, R. H., 2005. Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control? *Trends in Ecology & Evolution*, 20(11), pp.577-579.

Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (Third edition). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Fonseca, D.M., Campbell, S., Crans, W.J., Mogi, M., Miyagi, I., Toma, T., Bullians, M., Andreadis, T.G., Berry, R.L., Pagac, B., Sardelis, M.R., Wilkerson, R.C., 2001. *Aedes (Finlaya) japonicus* (Diptera: Culicidae), a newly recognized mosquito in the United States: analyses of genetic variation in the United States and putative source populations. *Journal of Medical Entomology*, 38(2), pp.135-146.

Fonseca-González, I., Quiñones, M. L., Lenhart, A., Brogdon, W.G., 2010. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science*, 67(4), pp.430-437.

Fu, G., Lees, R.S., Nimmo, D., Aw, D., Jin, L., Gray, P., Berendonk, T., Cooper, H.W., Scaife, S., Phuc, H.K., Marinotti, O., Jasinskiene, N., James, A.A., Alphey, L., 2010. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), pp.4550-4554.

Garcia, G., Flores, A., Fernandez-Salas, I., Saavedra-Rodriguez, K., Reyes-Solis, G., Lozano-Fuentes, S., Guillermo Bond, J., Casas-Martinez, M., Ramsey, J., Garcia-Rejon, J., Dominguez-Galera, M., Ranson, H., Hemingway, J., Eisen, L., Black IV, W., 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3: e531.

Georghiou, G.P., 1994. Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection*, 75(4), pp.51-59.

Gonçalves, Y., Silva, J., Biscoito, M., 2008. On the presence of *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus 1762 (Insecta, Diptera, Culicidae) in the island of Madeira (Portugal). *Boletim Museu Municipal do Funchal*, 58(322), pp.53-59.

Gorrochotegui-Escalante, N., Munoz, M.L., Fernandez-Salas, I., Beaty, B.J., Black, W.C. 4th, 2000. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2), pp.200-209.

Gorrochotegui-Escalante, N., Gomez-Machorro, C., Lozano-Fuentes, S., Fernandez-Salas, L., De Lourdes Munoz, M., Farfan-Ale, J.A., Garcia-Rejon, J., Beaty, B.J., Black, W.C. 4th, 2002. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(2), pp.213-222.

Gould, E. A., Gallian P., Lamballerle X., Charrel R.N., 2010. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clinical Microbiology and Infection*, 16(12), pp.1702-1704.

Gubler, D.J., 1998. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging Infectious Diseases*, 4(3), pp.1-9.

Haavie, J., Saetre, G.P., Mount, T., 2000. Discrepancies in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage color in the pied flycatcher – inferring evolutionary processes. *Molecular Ecology*, 9(8), pp.1137-1148.

Halstead, S.B., 1992. The XXth Century Dengue Pandemic. *World Health Statistics*, 45(2-3), pp.292-298.

Halstead, S.B., 2008. Dengue, tropical medicine: science and practice, Volume 5, *Imperial College Press*, pp.75-84.

Hancock, P.A., Sinkins, S.P., Godfray, H.C., 2011. Strategies for introducing *Wolbachia* to reduce transmission of mosquito-borne diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4): e1024.

Harrington, L.C., Scott, T.W., Lerdthusnee, K., Coleman, R.C., Costero, A., Clark, G.G., Jones, J.J., Kitthawee, S., Kittayapong, P., Sithiprasasna, R., Edman, J.D., 2005. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, pp.209-220.

Harris, A.F., Rajatileka, S., Ranson, H., 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), pp.277-284.

Hartl, D.L., 2000. A primer of population genetics. 3rd Edition. Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.

Hayes e Wolf, 1997. Molecular genetics of drug resistance. Modern genetics, Series Editor: H.J. Evans, Harwood academic publishers, Amsterdam The Netherlands, pp.412.

Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(11), pp.1009-1015.

Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7), pp.653-665.

Herrera, F., Urdaneta, L., Rivero, J., Zoghbi, N., Carrasquel, G., Martínez, J.A., Pernalete, M., Villegas, P., Montoya, A., Rubio-Palis, Y., Rojas, E., 2006. Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 101(6), pp.625-633.

Hiragi, C., Simões, K., Martins, E., Queiroz, P., Lima, L., Monnerat, R., 2009. Variabilidade Genética em populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de RAPD. *Neotropical Entomology*, 38(4), pp.542-547.

Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, D., Seta, T., Min, S., Chang, M.S., Walton, C., 2009. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genetics*, 10(1), pp.11.

Howard, A.F., Koenraadt, C.J.M., Farenhorst, M., Knols, B.G.J., Takken, W., 2010. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malaria Journal*, 9, pp.168.

Huber, K., Le Loan, L., Hoang, T.H., Ravel, S., Rodhain, F., Failloux, A.B., 2002. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11(9), pp.1629-1635.

Hurst, G. e Jiggins, F., 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *PLoS Biology*, 272(1572), pp.1525-1534.

Jansen, C. C. e Beebe, N. W., 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and Infection*, 12(4), pp.272-279.

Jeffrey, J.A., Thi Yen, N., Nam, V.S., Nghia, le T., Hoffmann, A.A., Kay, B.H., Ryan, P.A., 2009. Characterizing the *Aedes aegypti* population in a Vietnamese village in preparation for a *Wolbachia*-based mosquito control strategy to eliminate dengue. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(11): e552.

Júnior, R. S. L. e Scarpassa, V.M., 2009. Evidence of tow lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 32(2), pp.414-422.

Kamgang, B., Brengues, C., Fontenille, D., Nijokou, F., Simard, F., Paupy, C., 2011a. Genetic Structure of the Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). *PLoS One*, 6(5): e20257.

Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Nchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., Corbel, V., Paupy, C., 2011b. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites & Vectors*, 4(1): 79.

Kay, B., Nam, V.S., Tien, T.V., Yen, N.T., Phong, T.V., Diep, V.T., Ninh, T.U., Bektas, A., Aaskov, J.G., 2002. Control of *Aedes* vectors of dengue in three provinces of Vietnam by use of Mesocyclops (Copepoda) and community-based methods validated by entomologic, clinical, and serological surveillance. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(1), pp.40-48.

Kay, B. e Nam, V.S., 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *The Lancet*, 365(9459), pp.613-617.

Kikankie, C.K., Brooke, B.D., Knols, B.G.J., Koekemoer, L.L., Farenhorst, M., Hunt, R.H., Thomas, M.B., Coetzee, M., 2010. The infectivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to insecticide-resistant and susceptible *Anopheles arabiensis* mosquitoes at two different temperatures. *Malaria Journal*, 9: 71.

Knipling, E.F., 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), pp.459-462.

Kolbe, J.J., 2004. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, 431(7005): 177.

Krzywinski, J., Grushko, O.G., Besansky, N.J., 2006. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: an improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(2), pp.417-423.

Lima, E., Paiva, M., de Araujo, A., da Silva, E., da Silva, U., de Oliveira, L., Santana, A.E., Barbosa, C., de Paiva Neto, C., Goulart, M., Wilding, C., Ayres, C., de Melo Santos, M.A., 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*, 4: 5.

Lounibos, L.P., 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 47, pp.233-266.

Lord, J.C., 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89(1), pp.19-29.

Lourenço-de-Oliveira, R., Vazeille, M., de Fillippis, A.M., Failloux, A.B., 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(1), pp.43-54.

Lynd, A., Ranson, H., McCall, P.J., Randle, N.P., Black, W.C. 4th, Walker E.D., Donnelly, M.J., 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 4(1): 16.

Mackenzie, J.S., Chua, K.B., Daniels, P.W., Eaton, B.T., Field, H.E., Hall, R.A., Halpin, K., Johansen, C.A., Kirkland, P.D., Lam, S.K., McMinn, P., Nisbet, D.J., Paru, R., Pyke, A.T., Ritchie, S.A., Siba, P., Smith, D.W., Smith, G.A., van den Hurk, A.F., Wang, L.F., Williams, D.T., 2001. Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. *Emerging Infectious Diseases*, 7(3 Suppl), pp.497-504.

Marcombe S., Poupardin R., Darriet F., Reynaud S., Bonnet J., Strode C., Brengues C., Yébakima, Ranson H., Corbel V., David J.P., 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*, 10(1): 494.

Margarita, Y., Santos Grácio, A.J., Lencastre, I., Silva, A.C., Novo, T., Sousa, C., 2006. First record of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) in Madeira Island – Portugal (Portuguese, English abstract). *Acta Parasitológica Portuguesa*, 13, pp.59-61.

Marquardt, W.C., 2010. *Biology of disease vectors (Second Edition)*. Academic Press, Amsterdam, pp.785.

Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L., Williamson, M.S., 1999. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 8(3), pp.339-346.

Martins, A.J., Lins, R.M., Linss, J.G., Peixoto, A.A., Valle, D., 2009a. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), pp.108-115.

Martins, A. J., Lima J. B. P., Peixoto A.A., Valle D., 2009b. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Tropical Medicine and International Health*, 14(11), pp.1351-1355.

McCall, P.J. e Kittayapong, P., 2007. Control of dengue vectors: tools and strategies. In report of the scientific working group on dengue. *Meeting report. 1–5 October 2006, Geneva, Switzerland*, pp.110-119.

Melim, M., 2009. *Aedes aegypti* em Portugal; a presença de *Aedes aegypti* na Região Autónoma da Madeira. Comunicação Oral, Reunião do Projecto Revive, Fevereiro de 2009.

Melo-Santos M.A.V., Varjal-Melo J.J.M., Araújo A.P., Gomes T.C.S., Paiva M.H.S., Regis L.N., Furtado A.F., Magalhaes T., Macoris M.L.G., Andrighetti M.T.M., Ayres C.F.J., 2010. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica*, 113, pp.180-189.

Monath, T.P., 1997a. Yellow fever: a medically neglected disease. Report on a seminar. *Reviews of Infectious Diseases*, 9(1), pp.165-175.

Monath, T.P., 1997b. Epidemiology of yellow fever: current status and speculations on future trends. *Factors in the Emergence of Arbovirus Diseases*, Elsevier, Paris, pp.143-158.

Morgan, J.C., Irving, H., Okedi, L.M., Steven, A., Wondji, C.S., 2010. Pyrethroid Resistance in an *Anopheles funestus* Population from Uganda. *PLoS One*, 5(7): e11872.

Morlais, I. e Severson, D.W., 2002. Complete mitochondrial DNA sequence and amino acid analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) from *Aedes aegypti*. *Mitochondrial DNA*, 13, pp.123-127.

Morrison, A. C., Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T.W., Rosenberg, R., 2008. Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector. *PLoS Medicine*, 5(3): e68.

Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T., Schaffner, F., Vazeille, M., Failloux, A.B., 2005. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genetics Research*, 86(1), pp.1-11.

Paduan, K.S., Araújo-Júnior, J.P., Ribolla, P., 2006. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), pp.391-395.

Paduan, K.S. e Ribolla, P., 2008. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 45(1), pp.59-67.

Parr, R.L., Maki, J., Reguly, B., Dakubo, G.D., Aguirre, A., Wittcock, R., Robinson, K., Jakupciak, J.P., Thayer, R.E., 2006. The pseudo-mitochondrial genome influences mistakes in heteroplasmy interpretation. *BMC Genomics*, 7(1): 185.

- Paupy, C., Brengues, C., Kamgang, B., Hervé, J.P., Fontenille, D., Simard, F., 2008. Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, 45(3), pp.391-400.
- Paupy, C., Brengues, C., Ndiath, O., Toty, C., Hervé, J-P., Simard, F., 2010. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, pp.473-480.
- Rajatileka, S., Black IV, W.C., Saavedra-Rodriguez, K., Trongtokit, Y., Apiwathnasorn, C., McCall, P.J., Ranson, H., 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(1), pp.54-57.
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H., 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(5), pp.491-497.
- Ranson, H., Burhani, J. Lumjuan, N., Black IV, W.C., 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. Disponível em TropIKA.net.
- Reiter, P., Amador, M.A., Anderson, R.A., Clark, G.G., 1995. Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(2), pp.177-179.
- Reiter, P., 2001. Climate change and mosquito-borne disease. *Environmental Health Perspective*, 109(Suppl 1), pp.141-161.
- Reiter, P., 2010. Yellow fever and dengue: a threat to Europe? *Euro Surveillace*, 15(10): 19509.

Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A.C., Panning M., Cordioli P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M.G., Majori, G.C., Cassone, A., 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*, 370, pp.1840-1846.

Ribeiro, H. e Ramos, H.C., 1999. Identification keys of the mosquitoes (Diptera:Culicidae) of Continental Portugal, Açores and Madeira. *European Mosquito Bulletin*, 3, pp.1-11.

Richards, O.W. e Davies, R.G., 1977. Imm's general book of entomology II: general classification and biology. Chapman and Hall, New York, 1354 pp.

Robinson, M.C., 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-1953. I. Clinical features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(1), pp.28-32.

Roderick, G.K., 1996. Geographic structure of insect population: gene flow, phylogeography and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41, pp.325-352.

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), pp.2496-2497.

Saavedra-Rodriguez, K., Urdaneta-Marquez, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A.E., Fernandez-Salas, I., Bisset, J., Rodriguez, M., McCall, P.J., Donnelly, M.J., Ranson, H., Hemingway, J., Black IV, WC., 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 16(6), pp.785-798.

Scarpassa, V.M., Cardoza, T.B., Cardoso Júnior, R.P., 2008. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(6), pp.895-903.

Scholte, E-J., Takken, W., Knols, B.G.J., 2003. Pathogenicity of five East African entomopathogenic fungi against adult *Anopheles gambiae* s.s mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV)*, 14, pp.25-29.

Scholte, E-J., Knols, B.G.J., Samson, R.A., Takken, W., 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*, 4: 19.

Scott, J. G., 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(9), pp.757-777.

Service M.W. e Townson H., 2002. The Anopheles vector, pp. 59-84, Essential Malariology, Oxford University Press Inc., Oxford.

Sihuincha, M., Zamora-Perea, E., Orellana-rios, W., Stancil, J.D., López-Sifuentes, V., Vidal-Oré, C., Devine, G.J., 2005. Potencial use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. *Journal of Medical Entomology*, 42(4), pp.620-630.

Soderlund, D. M., 2008. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science*, 64(6), pp.610-616.

Solomon, T. e Mallewa, M., 2001. Dengue and other emerging flaviviruses. *Journal of Infection*, 42(2), pp.104-115.

Sorenson, M. e Quinn, T., 1998. Numts: a challenge for avian systematics and population biology. *The Auk*, 115(1), pp.214-221.

Sousa, C., 2008. Malaria vectorial capacity and competence of *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927 (Diptera, Culicidae): Implications for the potencial re-emergence of malaria in Portugal. Tese de Doutorado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

- Sylla, M., Bosio, C., Urdaneta-Marquez, L., Ndiaye, M., Black IV, W.C., 2009. Gene flow, subspecies composition, and dengue virus-2 susceptibility among *Aedes aegypti* collections in Senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(4): e408.
- Tabachnick, W. J., 2010. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), pp.946-954.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), pp.2731-2739.
- Taylor, C.R. e Headley J.C., 1975. Insecticide resistance and the evaluation of control strategies for an insect population. *The Canadian Entomologist*, 107(3), pp.237-242.
- Thomas, D.D., Donnelly, C.A., Wood, R.J., Alphey, L., 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287(5462), pp.2474-2476.
- Thomas, M.B. e Read, A.F., 2007. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), pp.377-383.
- Urdaneta-Marquez, L., Bosio, C., Herrera, F., Rubio-Palis, Y., Slasek, M., Black IV, 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), pp.479-491.
- Vanlerberghe, V., Villegas, E., Oviedo, M., Baly, A., Lenhart, A., CcCall, P.J., Van der Stuyft, P., 2011. Evaluation of the effectiveness of insecticide treated materials for household level dengue vector control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(3): e994.
- Vontas, J., Ranson, H., Alphey, L., 2010. Transcriptomics and disease vector control. *BMC Biology*, 8(1), pp.52.

Wallis, G.P., Tabachnick, W.J., Powell, J.R., 1984. Genetic heterogeneity among Caribbean populations of *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(3), pp.492-498.

Walton, C., Handley, J.M., Tun-Lin, W., Collins, F.H., Harbach, R.E., Baimai, V., Butlin, R.K., 2000. Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. *Molecular Biology and Evolution*, 17(6), pp.962-974.

WHO, 1970. Criterios e interpretacion de las pruebas para determinar la susceptibilidad o la resistencia de los insectos a los insecticidas. Serie de Informes Técnicos, n° 443. WHO, Geneva.

WHO, 1992. Entomological field techniques for malaria control. Part 1. Learner's guide. WHO Cataloguing in Publication data, Geneva. 76 pp.

WHO, 1998. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO, Geneva, Switzerland (28-30 September).

WHO, 2009a. Dengue, guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 3, pp.59-86.

WHO, 2009b. Dengue fever, Cape Verde. *Weekly Epidemiological Records*, 84(45): 469.

Williams, C.R., Bader, C.A., Kearney, M.R., Ritchie, S.A., Russel, R.C., 2010. The extinction of dengue through natural vulnerability of its vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12): e922.

Wong, J., Stoddard, S.T., Astete, H., Morrison, A.C., Scott, T.W., 2011. Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4): e1015.

Yan, G., Chadee, D.D., Severson, D.W., 1998. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics*, 148(2), pp.793-800.

Yanola, J., Somboon, P., Walton, c., Nachaiwieng, W., Prapanthadara, L., 2010. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3), pp.127-131.

Zaim, M. e Guillet, P., 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology*, 18(4), pp.161-163.

Zalewski, A., Michalska-Parda, A., Bartoszewicz, M., Kozakiewicz, M., Brzezinski, M., 2010. Multiple introductions determine the genetic structure of an invasive species population: American mink neovison vison in Poland. *Biological Conservation*, 143(6), pp.1355-1363.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação em mosquitos das antenas plumosas dos machos antenas pilosas das fêmeas.....	3
Figura 2. Representação de um corte transversal do probóscis de um mosquito fêmea.....	3
Figura 3. Anatomia interna geral de um mosquito fêmea.....	4
Figura 4. Imagem do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	4
Figura 5. Representação do ciclo biológico de <i>Ae. aegypti</i>	6
Figura 6. Representação dos países ou áreas em risco de transmissão de dengue.....	10
Figura 7. Representação dos países ou áreas em risco de transmissão da febre amarela.....	11
Figura 8. Representação da distribuição geográfica do vírus chikungunya.....	12
Figura 9. Representação esquemática do ADN mitocondrial de <i>Ae. aegypti</i> com referência à localização dos genes COI e ND4.....	14
Figura 10. Representação do modo de acção dos piretróides nas células nervosas.....	22
Figura 11. Representação esquemática dos principais mecanismos envolvidos na resistência às várias classes de insecticidas.....	23
Figura 12. Representação do canal de sódio, local alvo dos piretróides e DDT.....	27
Figura 13. Gráfico representativo de uma análise de regressão para susceptibilidade (A), para variações sazonais ou tolerância (B) e para resistência parcial (C) na população em estudo.....	32
Figura 14. Determinação do “ponto de saturação” de um ensaio de garrafa do CDC...34	34
Figura 15. Determinação da percentagem de indivíduos resistentes na população culicídica em estudo através da aplicação de um teste de garrafa do CDC.....	34
Figura 16. Representação da localização da ilha da Madeira.....	40
Figura 17. Representação do exão 20, intrão e exão 21 do canal de sódio de <i>Aedes aegypti</i>	47

Figura 18. Gráfico representativo da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> ao DDT e respectivo gráfico “probit”.....	63
Figura 19. Gráfico representativo da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> ao malatão e respectivo gráfico “probit”.....	63
Figura 20. Gráfico representativo da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> à permetrina e respectivo gráfico “probit”.....	63
Figura 21. Gráfico representativo da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> à deltametrina e respectivo gráfico “probit”.....	64
Figura 22. Gráficos representativos da evolução da percentagem de mosquitos tombados ao longo da duração dos testes de garrafa do CDC de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> à alfa-cipermetrina (A) e ciflutrina (B).....	64
Figura 23. Representação de uma sequência do segmento 6 do domínio II do canal de sódio de <i>Ae. aegypti</i> com picos duplos.....	66
Figura 24. Representação de uma sequência do segmento 6 do domínio II do canal de sódio de <i>Ae. aegypti</i> com a mutação no codão 1016 ATA em evidência, confirmada após clonagem.....	66
Figura 25. Exemplo de parte de um electroferograma de sequenciação directa do gene COI com o pico duplo evidenciado (C ou T).	68
Figura 26. Exemplo de parte de um electroferograma de sequenciação directa do gene COI após clonagem.....	68
Figura 27. Rede de haplótipos obtida para o gene COI.....	77
Figura 28. Rede de haplótipos obtida para o gene ND4.....	78
Figura 29. Representação da distribuição dos haplótipos do gene ND4 e mutações <i>kdr</i> encontrados neste estudo.....	91

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Posição sistemática do género <i>Aedes</i> de acordo com a classificação de Richards e Davies (1977).....	2
Tabela 2. Representação das mutações <i>kdr</i> identificadas em <i>Ae. aegypti</i> até ao momento e sua distribuição.....	29
Tabela 3. Primers utilizados na amplificação do exão 20, intrão e exão 21 do gene do canal de sódio.....	48
Tabela 4. Composição da mistura de PCR para sequenciação do exão 20, intrão e exão 21 do gene do canal de sódio.....	48
Tabela 5. Condições de amplificação do exão 20, intrão e exão 21 do gene do canal de sódio.....	48
Tabela 6. Primers utilizados na amplificação do gene COI.....	49
Tabela 7. Composição da mistura de PCR para amplificação do gene COI.....	50
Tabela 8. Condições de amplificação do gene COI.....	50
Tabela 9. Primers utilizados na amplificação do gene ND4.....	50
Tabela 10. Composição da mistura de PCR para a amplificação do gene ND4.....	51
Tabela 11. Condições de amplificação do gene ND4.....	51
Tabela 12. Primers utilizados na amplificação dos fragmentos clonados.....	54
Tabela 13. Composição das misturas de PCR para amplificação dos fragmentos clonados.....	55
Tabela 14. Condições de amplificação dos fragmentos clonados.....	55
Tabela 15. Resultados dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> ao DDT.....	59
Tabela 16. Resultados dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> ao malatião.....	59

Tabela 17. Resultados dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> à permetrina.....	60
Tabela 18. Resultados dos testes diagnóstico da OMS de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> à deltametrina.....	60
Tabela 19. Resultados dos testes de garrafa do CDC de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> à alfa-cipermetrina.....	61
Tabela 20. Resultados dos testes de garrafa do CDC de sensibilidade de <i>Ae. aegypti</i> à cilfutrina.....	61
Tabela 21. Número de indivíduos e respectivas frequências de cada genótipo e frequências alélicas da mutação <i>kdr</i> 1016 em populações resistentes de <i>Ae. aegypti</i> da ilha da Madeira.....	67
Tabela 22. Locais variáveis observados nos dois haplótipos do gene COI do ADN mitocondrial de <i>Ae. aegypti</i>	68
Tabela 23. Distribuição geográfica dos haplótipos do gene COI encontrados neste estudo.....	69
Tabela 24. Locais variáveis observados nos dois haplótipos do gene ND4 do ADN mitocondrial de <i>Ae. aegypti</i>	70
Tabela 25. Distribuição geográfica dos haplótipos do gene ND4 encontrados neste estudo.....	71
Tabela 26. Locais variáveis observados no alinhamento do gene COI do ADN mitocondrial de <i>Ae. aegypti</i> no presente estudo em comparação com outras sequências do mesmo gene já publicadas.....	72
Tabela 27. Locais variáveis observados no alinhamento do gene ND4 do ADN mitocondrial de <i>Ae. aegypti</i> no presente estudo em comparação com outras sequências do mesmo gene já publicadas.....	73

ANEXOS

ANEXO I

Resultado da análise de Pearson (“Pearson goodness-of-fit chi-square”) ao modelo “probit” para as rectas de regressão estimadas referentes ao número de mosquitos tombados (knock-down”) durante os ensaios diagnóstico da OMS, ao longo do tempo de exposição aos insecticidas: DDT, malatião, permetrina e deltametrina. Nestes casos testou-se a seguinte hipótese nula - H_0 = o modelo “probit” ajusta-se adequadamente aos dados dos ensaios. O nível de significância seleccionado para rejeitar a H_0 foi de 99%.

DDT

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	4,639	5	,461 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than ,150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

MALATIÃO

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	5536,812	5	,000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than ,150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

PERMETRINA

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	17,549	5	,004 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than ,150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

DELTAMETRINA

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	15,857	5	,007 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than ,150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Abaixo, indicam-se os valores, estimados com base no modelo “probit”, para os tempos de exposição referentes a cada um dos insecticidas testados pelos ensaios diagnóstico da OMS, capazes de produzir percentagens de mortalidade entre 1% e 99,9%.

DDT
Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Tempo			95% Confidence Limits for log(Tempo) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	35,012	10,479	46,145	1,544	1,020	1,664
,020	46,032	29,671	74,537	1,663	1,472	1,872
,030	54,760	41,070	141,285	1,738	1,614	2,150
,040	62,400	47,274	253,580	1,795	1,675	2,404
,050	69,395	51,702	418,375	1,841	1,714	2,622
,060	75,962	55,314	646,269	1,881	1,743	2,810
,070	82,230	58,458	949,955	1,915	1,767	2,978
,080	88,280	61,295	1344,023	1,946	1,787	3,128
,090	94,168	63,914	1845,076	1,974	1,806	3,266
,100	99,934	66,369	2471,942	2,000	1,822	3,393
,150	127,814	77,151	8343,476	2,107	1,887	3,921
,200	155,421	86,622	22024,288	2,192	1,938	4,343
,250	183,812	95,519	50726,855	2,264	1,980	4,705
,300	213,702	104,198	107395,940	2,330	2,018	5,031
,350	245,722	112,886	215311,509	2,390	2,053	5,333
,400	280,531	121,755	416739,178	2,448	2,085	5,620
,450	318,895	130,964	789690,789	2,504	2,117	5,897
LT 50 ,500	361,770	140,679	1481621,808	2,558	2,148	6,171
,550	410,409	151,089	2780292,901	2,613	2,179	6,444
,600	466,534	162,432	5271206,653	2,669	2,211	6,722
,650	532,623	175,029	1,021E7	2,726	2,243	7,009
,700	612,428	189,341	2,050E7	2,787	2,277	7,312
,750	712,015	206,078	4,351E7	2,852	2,314	7,639
,800	842,080	226,434	1,006E8	2,925	2,355	8,002
,850	1023,966	252,679	2,671E8	3,010	2,403	8,427
,900	1309,633	290,016	9,131E8	3,117	2,462	8,961
,910	1389,826	299,825	1,229E9	3,143	2,477	9,089
,920	1482,520	310,855	1,696E9	3,171	2,493	9,230
,930	1591,594	323,448	2,419E9	3,202	2,510	9,384
,940	1722,924	338,112	3,594E9	3,236	2,529	9,556
,950	1885,985	355,645	5,647E9	3,276	2,551	9,752
,960	2097,385	377,401	9,603E9	3,322	2,577	9,982
,970	2390,017	405,969	1,844E10	3,378	2,608	10,266
,980	2843,180	447,304	4,392E10	3,454	2,651	10,643
LT 99.9 ,990	3738,085	521,119	1,724E11	3,573	2,717	11,237

a. Logarithm base = 10.

MALATIÃO

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Tempo			95% Confidence Limits for log(Tempo) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a ,010	21,466	.	.	1,332	.	.
,020	23,500	.	.	1,371	.	.
,030	24,890	.	.	1,396	.	.
,040	25,989	.	.	1,415	.	.
,050	26,919	.	.	1,430	.	.
,060	27,737	.	.	1,443	.	.
,070	28,474	.	.	1,454	.	.
,080	29,151	.	.	1,465	.	.
,090	29,780	.	.	1,474	.	.
,100	30,372	.	.	1,482	.	.
,150	32,948	.	.	1,518	.	.
,200	35,151	.	.	1,546	.	.
,250	37,157	.	.	1,570	.	.
,300	39,057	.	.	1,592	.	.
,350	40,904	.	.	1,612	.	.
,400	42,736	.	.	1,631	.	.
,450	44,588	.	.	1,649	.	.
,500	46,489	.	.	1,667	.	.
,550	48,470	.	.	1,685	.	.
,600	50,570	.	.	1,704	.	.
,650	52,836	.	.	1,723	.	.
,700	55,334	.	.	1,743	.	.
,750	58,163	.	.	1,765	.	.
,800	61,483	.	.	1,789	.	.
,850	65,593	.	.	1,817	.	.
,900	71,158	.	.	1,852	.	.
,910	72,571	.	.	1,861	.	.
,920	74,138	.	.	1,870	.	.
,930	75,900	.	.	1,880	.	.
,940	77,918	.	.	1,892	.	.
,950	80,284	.	.	1,905	.	.
,960	83,157	.	.	1,920	.	.
,970	86,829	.	.	1,939	.	.
,980	91,964	.	.	1,964	.	.
,990	100,680	.	.	2,003	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

PERMETRINA

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Tempo			95% Confidence Limits for log(Tempo) ^b			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT ^a	,010	7,102	,462	13,843	,851	-,335	1,141
	,020	9,882	1,105	17,182	,995	,043	1,235
	,030	12,186	1,914	19,785	1,086	,282	1,296
	,040	14,266	2,884	22,072	1,154	,460	1,344
	,050	16,218	4,012	24,204	1,210	,603	1,384
	,060	18,089	5,295	26,267	1,257	,724	1,419
	,070	19,905	6,731	28,321	1,299	,828	1,452
	,080	21,686	8,312	30,414	1,336	,920	1,483
	,090	23,443	10,025	32,594	1,370	1,001	1,513
	,100	25,187	11,855	34,908	1,401	1,074	1,543
	,150	33,897	21,793	50,504	1,530	1,338	1,703
	,200	42,921	30,640	78,158	1,633	1,486	1,893
	,250	52,555	37,791	123,461	1,721	1,577	2,092
	,300	63,036	44,117	192,499	1,800	1,645	2,284
	,350	74,606	50,187	294,770	1,873	1,701	2,469
	,400	87,543	56,302	444,904	1,942	1,751	2,648
	,450	102,190	62,662	665,387	2,009	1,797	2,823
	,500	118,996	69,436	991,472	2,076	1,842	2,996
	,550	138,566	76,797	1480,121	2,142	1,885	3,170
	,600	161,751	84,960	2226,988	2,209	1,929	3,348
	,650	189,798	94,208	3400,693	2,278	1,974	3,532
	,700	224,634	104,950	5317,507	2,351	2,021	3,726
	,750	269,435	117,828	8621,020	2,430	2,071	3,936
	,800	329,913	133,938	14775,973	2,518	2,127	4,170
	,850	417,744	155,402	27709,568	2,621	2,191	4,443
	,900	562,202	187,203	61176,259	2,750	2,272	4,787
	,910	604,012	195,791	74080,897	2,781	2,292	4,870
	,920	652,964	205,560	91206,647	2,815	2,313	4,960
	,930	711,381	216,855	114645,897	2,852	2,336	5,059
	,940	782,823	230,193	148019,736	2,894	2,362	5,170
	,950	873,100	246,393	198106,218	2,941	2,392	5,297
	,960	992,553	266,869	279025,814	2,997	2,426	5,446
	,970	1162,029	294,359	425159,857	3,065	2,469	5,629
	,980	1432,936	335,286	744321,359	3,156	2,525	5,872
	,990	1993,746	411,530	1799740,562	3,300	2,614	6,255

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

DELTAMETRINA

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Tempo			95% Confidence Limits for log(Tempo) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	,010	7,533	4,818	10,011	,877	,683	1,000
	,020	8,848	5,932	11,432	,947	,773	1,058
	,030	9,798	6,766	12,441	,991	,830	1,095
	,040	10,580	7,468	13,261	1,024	,873	1,123
	,050	11,261	8,091	13,971	1,052	,908	1,145
	,060	11,876	8,661	14,606	1,075	,938	1,165
	,070	12,442	9,193	15,190	1,095	,963	1,182
	,080	12,972	9,695	15,733	1,113	,987	1,197
	,090	13,474	10,175	16,246	1,129	1,008	1,211
	,100	13,953	10,636	16,735	1,145	1,027	1,224
	,150	16,123	12,765	18,942	1,207	1,106	1,277
	,200	18,087	14,729	20,941	1,257	1,168	1,321
	,250	19,961	16,622	22,866	1,300	1,221	1,359
	,300	21,809	18,493	24,793	1,339	1,267	1,394
	,350	23,674	20,369	26,782	1,374	1,309	1,428
	,400	25,590	22,274	28,883	1,408	1,348	1,461
	,450	27,592	24,224	31,153	1,441	1,384	1,493
	,500	29,715	26,239	33,650	1,473	1,419	1,527
	,550	32,002	28,344	36,448	1,505	1,452	1,562
	,600	34,505	30,572	39,638	1,538	1,485	1,598
	,650	37,299	32,972	43,343	1,572	1,518	1,637
	,700	40,488	35,617	47,740	1,607	1,552	1,679
	,750	44,236	38,620	53,111	1,646	1,587	1,725
	,800	48,820	42,170	59,938	1,689	1,625	1,778
	,850	54,766	46,621	69,160	1,739	1,669	1,840
	,900	63,286	52,771	82,999	1,801	1,722	1,919
	,910	65,535	54,358	86,763	1,816	1,735	1,938
	,920	68,069	56,131	91,055	1,833	1,749	1,959
	,930	70,969	58,140	96,031	1,851	1,764	1,982
	,940	74,354	60,461	101,924	1,871	1,781	2,008
	,950	78,412	63,213	109,102	1,894	1,801	2,038
	,960	83,463	66,596	118,205	1,921	1,823	2,073
	,970	90,121	70,987	130,471	1,955	1,851	2,116
	,980	99,801	77,253	148,815	1,999	1,888	2,173
	,990	117,213	88,220	183,206	2,069	1,946	2,263

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.