



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Mecanismos moleculares da resistência a inseticidas químicos na  
população de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) da cidade do  
Funchal, Ilha da Madeira.

**Camila da Silva Marques**

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS.**

**ABRIL 2020**



INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
DESDE 1902



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Mecanismos moleculares da resistência a inseticidas químicos na  
população de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) da cidade do  
Funchal, Ilha da Madeira.

**Autor:** Camila da Silva Marques

**Orientadora:** Prof. Dra. Carla Alexandra Sousa

**Coorientadora:** Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Tese apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

**Este estudo recebeu o apoio financeiro de:** European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under ZIKAlliance Grant Agreement no. 734548; e da Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT) através do financiamento ao GHTM-UID/Multi/04413/2019.

## Elementos bibliográficos resultantes da dissertação

- ✓ Artigos publicados, submetidos e/ou aceites para publicação:

Ayres CFJ, Seixas G, Borrego S, Marques CS, Monteiro I, Marques C, Gouveia B, Leal SV, Troco AD, Fortes F, Parreira R, Pinto J, Sousa CA. The V410L knockdown resistance mutation occurs in island and continental populations of *Aedes aegypti* in West and Central Africa. PLOS Neglected Tropical Diseases submitted article, 2019

- ✓ Comunicações em congressos:

Marques C, Ayres CFJ, Gouveia B, Araújo AP, Viveiros B, Seixas G, Cattel J, David JP, Pinto J, Sousa CA. Gene amplification and a novel *kdr* mutation mediate insecticide resistance in the mosquito vector *Aedes aegypti* from Madeira Island. 3º GHTM Antimicrobial Resistance Awareness Day, IHMT, Lisbon, Portugal, November 2019.  
Oral presentation

Marques C, Ayres CFJ, Gouveia B, Araújo AP, Viveiros B, Seixas G, Cattel J, David JP, Pinto J, Sousa CA. Gene amplification and a novel *kdr* mutation mediate insecticide resistance in the mosquito vector *Aedes aegypti* from Madeira Island. ICEH, Lisbon, Portugal, September 2019. Oral presentation

Marques C, Ayres CFJ, Araújo AP, Seixas G, Gouveia B, Cani PJ, Fortes F, David JP, Pinto J, Sousa CA. Gene amplification in insecticide resistant populations of *Aedes aegypti* from Angola, Madeira and Brazil. MEDTROP, Belo Horizonte, Brazil, July 2019. Poster presentation

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora Carla Sousa e co-orientadora Constância Ayres. Sem elas seria impossível a realização deste trabalho, obrigada do fundo do coração por todos os ensinamentos, pela partilha de conhecimento, pelos conselhos sábios e pelo acompanhamento próximo ao longo deste percurso.

Gostaria igualmente de agradecer ao IHMT por me proporcionar este mestrado incrível, com cadeiras bastante relevantes e com professores de excelência, que tanto me ensinaram e incentivaram ao longo destes dois anos. Ainda neste seguimento, gostaria de agradecer ao Professor Dr. João Pinto Coordenador do departamento de Entomologia, bem como aos restantes elementos do departamento, Gonçalo Seixas, Sandra Alves, Professora Tereza Novo, Teresa Nazaré, que me receberam de braços abertos e se demonstraram sempre disponíveis para me ajudar.

Ao IASaúde, em especial à Professora Doutora Bruna Gouveia, Mestre Bela Viveiros e Dr.<sup>a</sup> Fátima Barreto Camacho, assim como a todos os técnicos que me receberam e ajudaram na realização do meu trabalho na Ilha da Madeira. Esta experiência, foi de facto bastante enriquecedora pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e ainda de poder contribuir para um bem maior que é o controlo do vetor.

Finalmente, mas não menos importante quero agradecer às pessoas que fazem parte da minha vida diariamente! São eles que me apoiam em todas as batalhas, que celebram comigo as vitórias e, principalmente, são eles que me erguem e apoiam nas alturas mais difíceis. Em especial à minha Mãe por estar sempre ao meu lado, assim como as minhas irmãs. Apoiam-me incondicionalmente, nunca deixando de me dizer o que é preciso e quando é preciso. Acho que têm um dom!

Ao meu namorado, que me acalmou e apoiou durante todos os momentos e, claro, aos meus amigos.

Obrigada por todo o apoio nesta fase tão importante para mim que é a entrega e defesa da tese de Mestrado. Estou eternamente grata!

## RESUMO

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é uma espécie de mosquito com elevada importância médica devido ao facto de ser transmissora de agentes patogénicos de doenças como a dengue, febre amarela, chikungunya e Zika. Uma das principais medidas de controlo destas doenças é o controlo do vetor através da eliminação de criadouros. Outrora, o controlo feito principalmente com compostos químicos, conduziu ao aparecimento de culicídeos resistentes às principais classes de inseticidas passíveis de ser utilizadas em Saúde Pública. Diversos mecanismos de resistência podem ser responsáveis por este fenómeno como a resistência metabólica, resistência local-alvo, resistência comportamental e resistência por penetração reduzida do inseticida, para citar os mais conhecidos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o *status* de suscetibilidade de *Aedes aegypti* do Funchal a vários inseticidas e, adicionalmente, investigar os possíveis mecanismos moleculares que possam estar associados ao fenótipo da resistência. Foram feitos bioensaios de sensibilidade com larvas e adultos seguindo os protocolos descritos pela OMS. Adicionalmente, a presença de alelos de resistência do tipo *kdr* foi investigada, assim como a associação da variação no número de cópias (CNV) de genes de interesse com o fenótipo da resistência. Os resultados dos testes de suscetibilidade mostraram resistência a todos os inseticidas testados (*temephos*, deltametrina, permetrina, ciflutrina, *bendiocarb* e DDT), assim como para a dieldrina após testes laboratoriais complementares. As frequências alélicas para os diferentes alelos da mutação *kdr* foram as seguintes: 100% para a mutação F1534C; 31% para a mutação V1016I; e o alelo de resistência V410L foi encontrado pela primeira vez na Madeira, com uma frequência de 33%. Foi observado um aumento significativo ( $p < 0,006$ ) na frequência da mutação V1016I na Ilha da Madeira entre os anos de 2013 e 2019. A variação no número de cópias foi observada apenas em alguns genes e sem diferenças significativas para mosquitos suscetíveis e resistentes, o que é compatível com a existência de outros mecanismos de resistência, nomeadamente, as mutações *kdr* encontradas neste estudo.

**Palavras-chaves:** *Aedes aegypti*; Bioensaios de suscetibilidade aos inseticidas; Resistência a inseticidas, *kdr*; CNV.

## ABSTRAT

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) is a species of mosquito with high medical importance since it transmits pathogens of diseases such as dengue, yellow fever, chikungunya and Zika. One of the main control measures for these diseases is vector control through the elimination of breeding sites. In the past, control was based, mainly, in the use of chemical compounds. This led to the emergence mosquitos' populations resistant to the main classes of insecticides that can be used in Public Health. Several mechanisms may be involved in insecticide resistance, such as metabolic resistance, target-site resistance, behavioral resistance and reduced penetration resistance of the insecticide. The present study aimed to evaluate the susceptibility status of *Aedes aegypti* from Funchal to various insecticides, and to further investigate possible molecular mechanisms that may be associated with the resistance phenotype. Susceptibility bioassays were performed with larvae and adults, following the protocols described by WHO. Additionally, the presence of *kdr* resistance alleles was investigated, as well as the association of copy number variation (CNV) of genes of interest with the resistance phenotype. Results of the susceptibility bioassays showed resistance of *Aedes aegypti* of Funchal to all insecticides tested (temephos, deltamethrin, permethrin, cyfluthrin, *bendiocarb* and DDT), as well as to dieldrin, after complementary molecular tests. The allelic frequencies for the different alleles of the *kdr* mutations were as follows: 100% for the F1534C mutation; 31% for mutation V1016I; and the V410L resistance allele was first found in Madeira with a frequency of 33%. A significant increase ( $p < 0.006$ ) was observed in the frequency of the V1016I mutation in Madeira Island between 2013 and 2019. The variation in copy number was observed only in some genes and without significant differences for susceptible and resistant mosquitoes. which is compatible with the existence of another resistance mechanisms, namely, the *kdr* mutations found in this study.

**Key words:** *Aedes aegypti*; Insecticide Susceptibility Bioassays; Insecticide Resistance; *kdr*; CNV.

## ÍNDICE GERAL

ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DA DISSERTAÇÃO .....	i
AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE GERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
LISTA DE SIMBOLOS E SIGLAS .....	xi
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS .....</b>	<b>5</b>
1.1.1 RESISTÊNCIA POR ALTERAÇÃO DO LOCAL-ALVO .....	6
1.1.2 PENETRAÇÃO REDUZIDA .....	9
1.1.3 RESISTÊNCIA COMPORTAMENTAL .....	10
1.1.4 RESISTÊNCIA METABÓLICA.....	10
<b>1.2 DETEÇÃO DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 BIOENSAIOS.....	12
<b>1.3 DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIAS LOCAL-ALVO .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 PCR ALELO-ESPECÍFICO .....	16
<b>1.4 DETEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIAS METABÓLICAS .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 BIOENSAIOS COM SINERGISTAS.....	17
1.4.2 RT-PCR .....	17
1.4.3 MICROARRAYS.....	18
1.4.4 CNV.....	19

1.4.5	QPCR.....	19
1.5	RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM <i>Aedes Aegypti</i> .....	20
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	GERAIS.....	24
2.2	ESPECÍFICOS.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	27
3.2	POPULAÇÕES E COLÓNIAS DE MOSQUITO.....	28
3.3	COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	28
3.4	BIOENSAIOS.....	30
3.4.1	MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO.....	30
3.4.2	INSETICIDAS UTILIZADOS.....	30
3.4.3	BIOENSAIOS COM LARVAS.....	31
3.4.4	BIOENSAIOS COM ADULTOS.....	32
3.4.5	CÁLCULO DA MORTALIDADE.....	33
3.4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS BIOENSAIOS.....	34
3.5	ANÁLISE MOLECULAR.....	34
3.5.1	EXTRAÇÃO DE DNA.....	34
3.5.2	SCREENING DE MUTAÇÕES <i>KDR</i> .....	35
3.5.3	VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS CNV.....	37
4	RESULTADOS.....	43
4.1	BIOENSAIOS.....	44
4.2	MUTAÇÕES <i>KDR</i> .....	49
4.2.1	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS.....	49
4.3	CNV.....	51
4.3.1	QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	51



4.3.2	EFICIÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> .....	51
4.3.3	ESPECIFICIDADE DOS <i>PRIMERS</i> .....	53
4.3.4	AMPLIFICAÇÃO GÊNICA .....	55
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	62
6	BIBLIOGRAFIA .....	68
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS:

Pág:

<b>Figura 1:</b>	Ciclo de vida do mosquito.	3
<b>Figura 2:</b>	Percurso do vírus no mosquito.	4
<b>Figura 3:</b>	Mapa de distribuição do <i>Aedes aegypti</i> .	5
<b>Figura 4:</b>	Localização das três mutações <i>kdr</i> .	7
<b>Figura 5:</b>	Mutações no gene que codifica para a acetilcolinesterase em diversas espécies de artrópodes.	8
<b>Figura 6:</b>	Esquema de realização de bioensaios com tubos OMS.	15
<b>Figura 7:</b>	Esquema de bioensaio com garrafas desenvolvido pelo CDC.	15
<b>Figura 8:</b>	Fluxograma do trabalho experimental.	26
<b>Figura 9:</b>	Mapa da Região Autónoma da Madeira.	27
<b>Figura 10:</b>	Balde utilizado como armadilha de ovos de mosquito.	29
<b>Figura 11:</b>	Imagem capturada através do microscópio ótico para fazer a contagem dos ovos nas fitas.	30
<b>Figura 12:</b>	Bioensaio das larvas, exposição ao <i>temephos</i> .	31
<b>Figura 13:</b>	Tubos para os bioensaios com adultos.	32
<b>Figura 14:</b>	Fotografia tirada de baixo para cima, onde vemos a base do tubo de exposição com mosquitos moribundos durante o bioensaio.	33
<b>Figura 15:</b>	Gráfico das mortalidades dos bioensaios da Madeira e respetiva Tabela com % de Mortalidade de cada controlo e respetivo bioensaio.	44
<b>Figura 16:</b>	Gráficos dos <i>knockdown</i> dos bioensaios com adulticidas e respetivos <i>Probits</i> .	46
<b>Figura 17</b>	Gráfico comparativo dos bioensaios na Madeira entre 2009 e 2019.	49
<b>Figura 18</b>	Gráfico comparativo da frequência das mutações <i>kdr</i> na Madeira entre os anos 2009-2019.	50
<b>Figura 19:</b>	Curvas padrão de todos os genes testados.	51
<b>Figura 20:</b>	Curva de dissociação para todos os genes testados.	53
<b>Figura 21:</b>	Padrão de CNVs dos genes-alvo dos 10 <i>pools</i> analisados relação à Bora Bora de <i>Aedes aegypti</i> da Ilha da Madeira, expostos a ciflutrina.	55

<b>Figura 22:</b>	Padrão de CNVs dos genes-alvo dos 10 <i>pools</i> analisados relação à Bora Bora de <i>Aedes aegypti</i> da Ilha da Madeira, expostos a deltametrina.	55
<b>Figura 23:</b>	Padrão de CNVs dos genes-alvo dos 10 <i>pools</i> analisados relação à Bora Bora de <i>Aedes aegypti</i> da Ilha da Madeira, expostos a <i>temephos</i> .	56
<b>Figura 24</b>	Padrão de CNVs dos genes-alvo de <i>Aedes aegypti</i> da Ilha da Madeira em relação à colônia de referência Bora Bora.	56
<b>Figura 25:</b>	Padrão de CNVs dos genes-alvo da colônia RecR em relação à Bora Bora.	57
<b>Figura 26:</b>	Padrão de CNVs dos genes-alvo da colônia Rockefeller em relação à Bora Bora.	57
<b>Figura 27:</b>	Padrão de CNVs dos genes-alvo de <i>Aedes aegypti</i> da Ilha da Madeira expostos à ciflutrina em relação à Bora Bora.	58
<b>Figura 28:</b>	Padrão de CNVs dos genes-alvo de <i>Aedes aegypti</i> da Ilha da Madeira expostos à deltametrina em relação à Bora Bora.	59
<b>Figura 29:</b>	Padrão de CNVs dos genes-alvo de <i>Aedes aegypti</i> da Ilha da Madeira expostos ao <i>temephos</i> em relação à Bora Bora.	60

## ÍNDICE DE TABELAS:

	Pág:
<b>Tabela 1:</b> Taxonomia do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	2
<b>Tabela 2:</b> Vantagens e desvantagens dos testes com garrafas CDC e testes com tubos OMS.	14
<b>Tabela 3:</b> Genes investigados na qPCR para pesquisa de CNV.	40
<b>Tabela 4:</b> Número de mosquitos por genótipo das três mutações <i>kdr</i> .	50
<b>Tabela 5:</b> Genes que apresentaram alteração no número de cópias.	58
<b>Tabela 6:</b> Valores de p do teste <i>chi</i> -quadrado para a associação da variação do número de cópias de genes de interesse e o respectivo fenótipo de resistência aos inseticidas	61

## LISTA DE SIMBOLOS E SIGLAS

<b>Ace</b>	Acetilcolinesterase (do inglês Acetylcholinesterase)
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>CB</b>	Carbamatos
<b>CDC</b>	Centre for Disease Prevention and Control
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloro
<b>Cl prot x</b>	Gene para a proteína 2 do canal de cloreto
<b>CNV</b>	Varição do número de cópias (do inglês Copy number variation)
<b>Ct</b>	Cycle threshold
<b>CTAB</b>	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
<b>D39</b>	Gene do citocromo P450
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Água bidestilada
<b>DDT</b>	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
<b>DREM</b>	Direção Regional de Estatísticas da Madeira
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GABA-R</b>	Recetores do ácido gama-aminobutírico
<b>GSTE2</b>	Glutathione S-Transferase Epsilon 2
<b>GSTs</b>	Glutathione-S-Transferase
<b>GWAS</b>	Genome-wide association study
<b>H</b>	horas
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>IASaúde</b>	Instituto da Administração da Saúde e Assuntos Sociais
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio
<b><i>kdr</i></b>	Resistência <i>knockdown</i>
<b>Km<sup>2</sup></b>	Quilómetro quadrado
<b>L3</b>	Estado larvar 3
<b>LC<sub>50</sub></b>	Concentração letal 50%
<b>LC<sub>90</sub></b>	Concentração letal 90%
<b>M</b>	Molar

<b>mg/L</b>	Miligrama por litro
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>Min</b>	Minuto
<b>Seg</b>	segundos
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>ml</b>	Mililitro
<b>ng/μl</b>	Nanograma por microlitro
<b>°C</b>	Graus Celcius
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>P450</b>	Citocromo P450
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
<b>qPCR</b>	PCR quantitativo (do inglês <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>QTL</b>	Quantitative trait locus
<b>R</b>	Coeficiente de Correlação Linear
<b>RAM</b>	Região Autónoma da Madeira
<b>RecR</b>	Recife resistente
<b>Rock</b>	Rockefeller
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RR</b>	Homozigótico para o alelo mutante
<b>RS</b>	Heterozigótico
<b>SNPs</b>	Single nucleotide polymorphisms
<b>Spss</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>SS</b>	Homozigótico para o alelo selvagem
<b>V</b>	Voltes
<b>Vgsc</b>	Canal de sódio operado por voltagem
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>%</b>	Porcentagem
<b>μl</b>	Microlitro

# 1- Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é uma espécie de mosquito pertencente à família Culicidae (Tabela 1). Tem uma elevada importância médica devido ao facto de ser transmissor de agentes patogénicos de doenças como a dengue, febre-amarela, chikungunya e Zika.

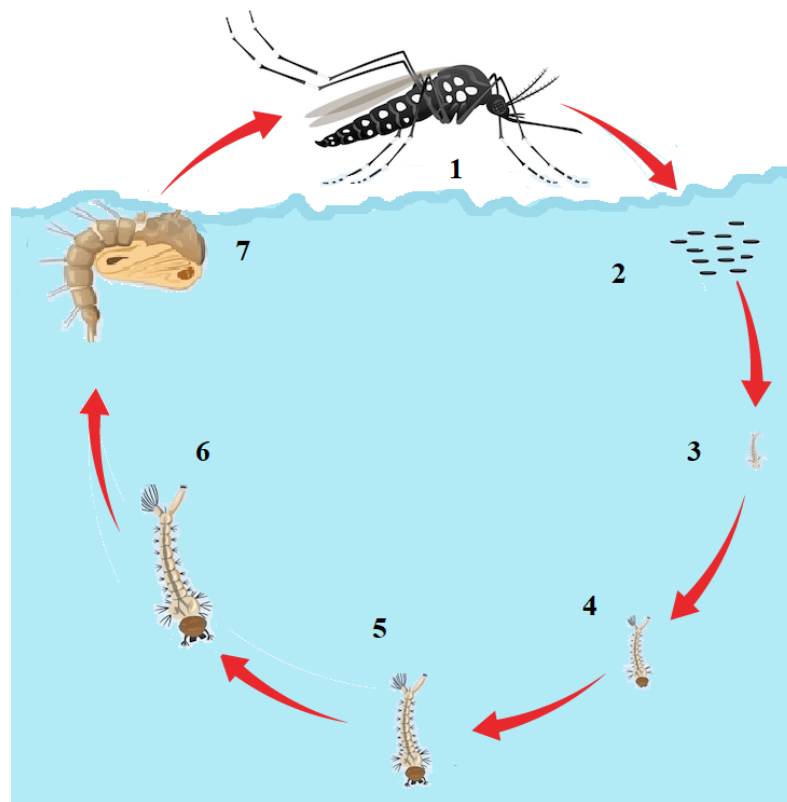
Tabela 1: Taxonomia do mosquito *Aedes aegypti*.

Taxonomia	
<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo:</b>	Arthropoda
<b>Classe:</b>	Insecta
<b>Ordem:</b>	Diptera
<b>Família:</b>	Culicidae
<b>Género:</b>	<i>Aedes</i>
<b>Espécie:</b>	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)

O mosquito tem hábitos comportamentais muito marcados, alimenta-se e repousa no interior das habitações e a refeição sanguínea é efetuada, preferencialmente, em humanos. Assim, designam-se estas populações respetivamente de endofágicas, endofílicas e antropofílicas (1).

Durante o ciclo de vida desta espécie, as formas imaturas (ovo, larva e pupa) exploram o meio aquático, enquanto que as formas adultas ocorrem em meio aéreo (Figura 1) (2). Os mosquitos adultos emergem das pupas. Os machos alimentam-se apenas de néctares, enquanto as fêmeas alimentam-se, também, de sangue. As fêmeas após a cópula, necessitam de efetuar pelo menos uma refeição sanguínea para a maturação dos ovos e posterior oviposição, originando um novo ciclo de vida (3).

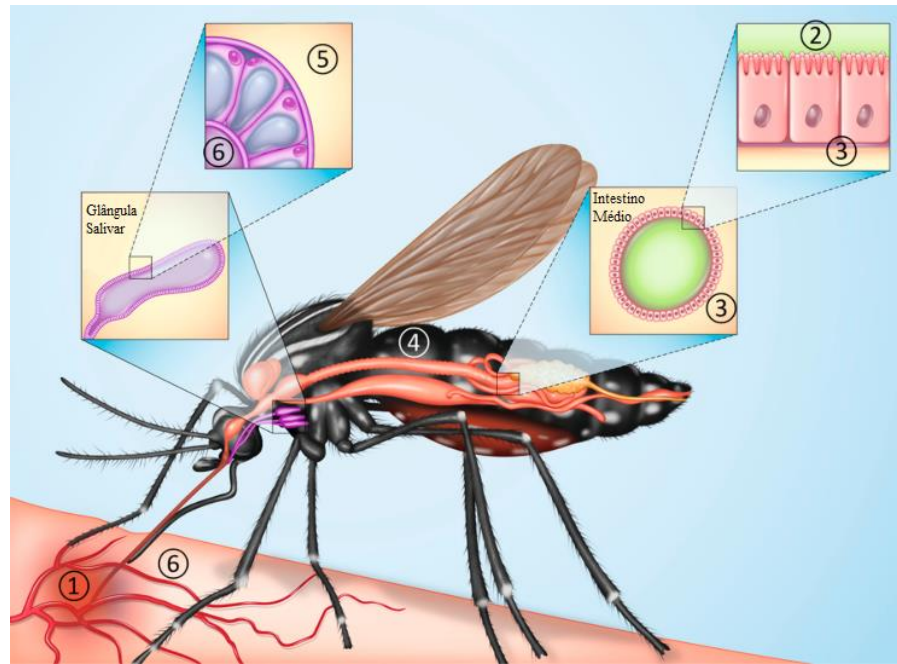




**Fonte:** Imagem adaptada de Muktar Y & Tamerat N & Shewafera A, 2016.

**Figura 1:** Ciclo de vida do mosquito (1-Mosquito adulto; 2-Ovos, 3-Larva L1; 4-Larva L2; 5-Larva L3; 6-Larva L4; 7-Pupa).

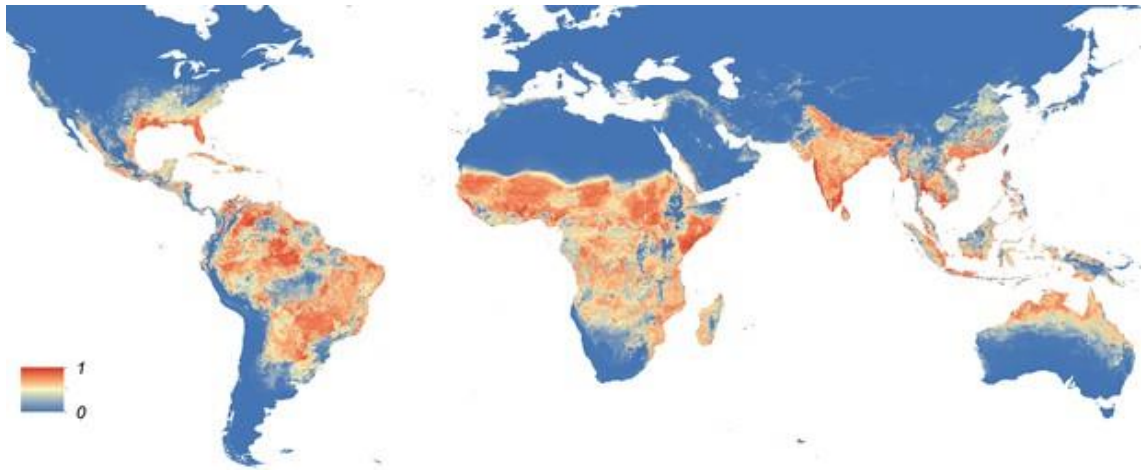
Durante a refeição sanguínea, caso seja efetuada num indivíduo com virémia (com vírus circulante no sangue periférico), o mosquito ingere o vírus e, em conjunto com o sangue são encaminhados para o intestino médio. O vírus atravessa a membrana peritrófica e replica-se nas células epiteliais do intestino médio. As partículas virais são disseminadas pelos diferentes tecidos e órgãos até chegar às glândulas salivares. Após um período de 7-18 dias (período extrínseco de incubação) o vírus acumula-se nas glândulas salivares do mosquito, sendo inoculado juntamente com a saliva durante uma refeição sanguínea subsequente (4) (Figura 2).



**Fonte:** Imagem adaptada de Azar SR & Weaver SC, 2019 (6)

**Figura 2:** Etapas necessárias para a transmissão do vírus. O vírus é ingerido pelo mosquito durante a alimentação sanguínea num hospedeiro infectado (1), o vírus infecta e replica-se nas células epiteliais do intestino médio do mosquito (2), o vírus sai das células epiteliais do intestino, provocando uma infecção disseminada (3), pelos tecidos / órgãos periféricos (4), infecção das glândulas salivares (5) e inoculação nos hospedeiros na alimentação sanguínea seguinte (6).

*Aedes aegypti* tem uma distribuição geográfica que se situa entre as isotérmicas de inverno acima dos 10°C (Figura 3). Nos últimos tempos, o número de casos relatados e mortes causadas por arbovírus, transmitidos por *Aedes aegypti*, aumentou em todo o mundo. A prevenção destas doenças é feita através do controlo vetorial que se baseia, principalmente, no uso de inseticidas e na eliminação de criadouros (5). O artrópode utiliza como principais criadouros larvares biótopos domésticos e peridomésticos como pratos de vasos de plantas, latas, pneus abandonados, ou qualquer outro contentor de média-pequena dimensão que acumule água.



**Fonte:** Kraemer *et al*, 2015

**Figura 3:** Distribuição geográfica do mosquito *Aedes aegypti*.

Durante um surto, as intervenções de controlo são geralmente intensificadas, passando quase sempre por um aumento na aplicação de inseticidas, para reduzir a abundância de mosquitos adultos e interromper o contacto entre o vetor e o humano.

No entanto, o aumento do uso de inseticidas pode resultar na seleção de mosquitos com características genéticas associadas à resistência a inseticidas o que afeta a eficácia das estratégias de controlo químico de vetores. Os insetos podem desenvolver, por ação desta pressão seletiva artificial, diferentes mecanismos de resistência. Deste modo, diferentes metodologias foram desenvolvidas (e estão em desenvolvimento) para detetar e, ou caracterizar os mecanismos de resistência a inseticidas

### 1.1. RESISTÊNCIA A INSETICIDAS

A definição de resistência, de acordo com a OMS é “a capacidade de um organismo sobreviver a uma determinada dose de inseticida, a qual em condições normais, seria letal para a maioria dos indivíduos da população”(7). Nos últimos anos, tem havido um aumento de registos de populações de culicídeos resistentes a inseticidas, muito provavelmente devido ao uso excessivo destes compostos. O fenómeno de resistência agrava o problema de incómodo por parte dos mosquitos em relação à população humana, além de comprometer o sucesso das ações dos programas de controlo.

Foram identificados vários tipos de mecanismos de resistência aos inseticidas nos insetos. Os mais comuns detetados em culicídeos são a alteração do local-alvo, penetração reduzida do inseticida, alterações comportamentais e resistência metabólica (8). Os mecanismos mais estudados são associados à resistência metabólica e à resistência por alteração do local-alvo.

### **1.1.1. RESISTÊNCIA POR ALTERAÇÃO DO LOCAL-ALVO**

Como o próprio nome indica, este tipo de mecanismo de resistência é causada por mutações pontuais nos genes que codificam as proteínas. Estas são alvo de ligação das moléculas inseticidas sofrendo modificações estruturais que impede ou dificultam a ação do inseticida (9).

Os inseticidas, pertencentes às principais classes passíveis de ser usadas em Saúde Pública, têm como local de ligação moléculas no sistema nervoso (9) como a enzima acetilcolinesterase, o recetor do ácido gama-aminobutírico (GABA) e o canal de sódio operado por voltagem.

#### **Canal de sódio operado por voltagem (Vgsc: Voltage-gate sodium channel)**

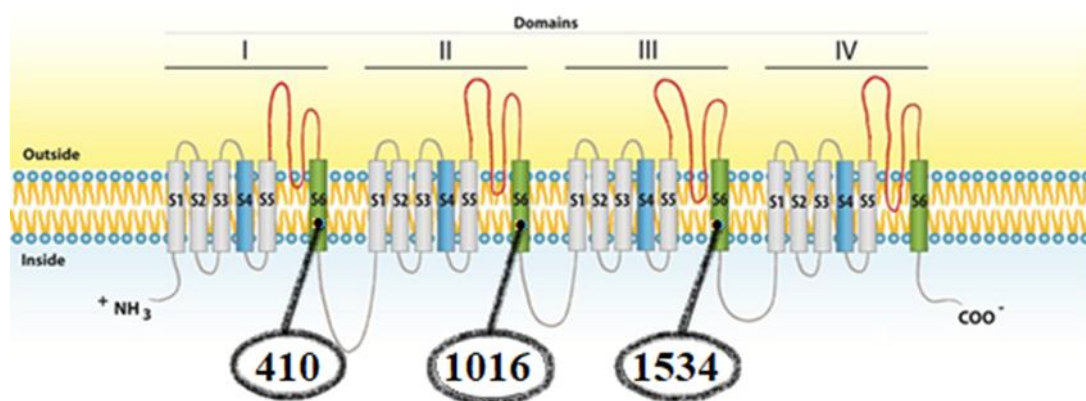
Os canais de sódio operados por voltagem, são responsáveis pela despolarização da membrana das células neuronais para gerar um potencial de ação (10). São proteínas transmembranares compostas por quatro domínios (I-IV), cada um composto por seis subunidades ou segmentos (S1-S6). Quando a membrana é despolarizada, os canais de sódio abrem e permitem o rápido influxo de sódio. De seguida, os canais de sódio fecham-se e abrem-se os canais de potássio, para equilibrar a carga elétrica do neurónio. Antes de se estabelecer, novamente, o potencial de repouso, existe dois períodos de refração: absoluto e relativo. Durante o primeiro, é impossível existir outro potencial de ação pois os canais de sódio estão inativos. No entanto, no período de refração relativo, se existir um estímulo superior ao normal, pode ser gerado outro potencial de ação. Ou seja, os canais de sódio já se encontram ativos, mas, como a membrana está hiperpolarizada devido à saída de potássio, é necessário um estímulo mais elevado para desencadear outro potencial de ação (10)(11).

Os inseticidas das classes piretróides e organoclorados, ligam-se aos canais de sódio impedindo-o de fechar. Isto leva a um influxo de sódio descontrolado, que origina

uma despolarização permanente na membrana e propagação constante do impulso nervoso, que culmina na morte do mosquito por convulsões. Este tipo de efeito é conhecido como *knockdown* (12). As mutações que ocorrem no canal de sódio são conhecidas como mutações *kdr*, do inglês *knockdown resistance*. Essas mutações provocam uma baixa afinidade do inseticida com o canal de sódio, o que faz com que o potencial de ação ocorra de forma normal e o mosquito sobreviva na presença do inseticida.

Até ao corrente ano, as mutações *kdr* descritas para *Aedes aegypti* são: G923V, L928W, I1011M e V1016G (Bregues et al. 2003), I1011V e V1016I (Saavedra-Rodriguez et al. 2007), D1763Y (Chang et al. 2009), S989P e F1534C (Srisawat et al. 2010, Yanola et al. 2011), T1520I (Kushwah et al. 2015) e por fim, a mutação mais recente V410L (Haddi et al. 2017) (13) (14) (15).

As mutações mais reportadas em *Aedes aegypti* são: (i) a mutação F1534C, onde ocorre a troca de uma fenilalaina por uma cisteína, localizada no segmento seis do domínio III (16) e (ii) a mutação V1016I, onde uma valina é substituída por uma isoleucina e, está localizada no segmento seis do domínio II (17). A nova mutação V410L, encontra-se localizada no segmento seis do domínio I e consiste na substituição de uma valina por uma leucina (15) (Figura 4).



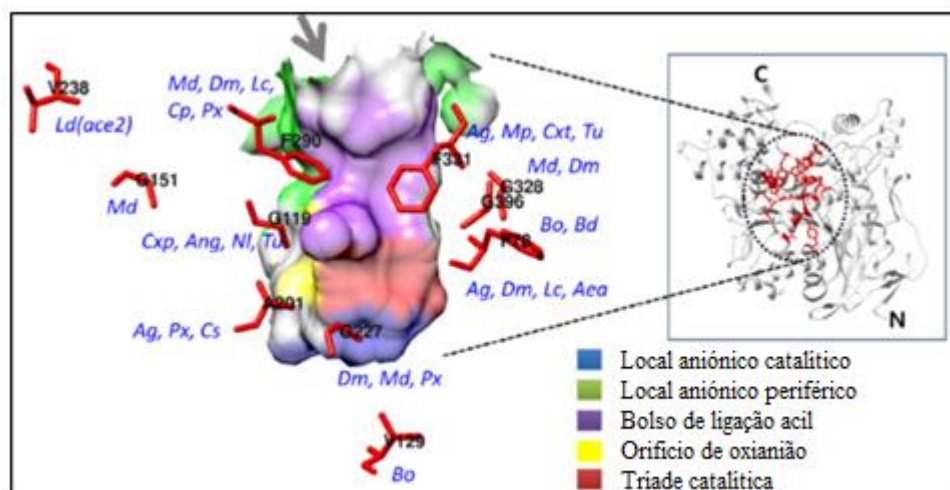
**Fonte:** Imagem adaptada de Linss, J et al, 2014 (17)

**Figura 4:** Esquema ilustrativo da localização das três mutações no canal de sódio.

## Acetilcolinesterase (ACh)

A acetilcolina é um neurotransmissor que se encontra na fenda sináptica colinérgica e facilita a propagação do impulso nervoso (12)(18). A enzima acetilcolinesterase por sua vez, degrada a acetilcolina em ácido acético e em colina. A colina é transportada e reutilizada no terminal do axônio, produzindo acetilcolina, novamente. Assim, o papel da acetilcolinesterase é interromper a transmissão sináptica, através da hidrólise da acetilcolina. Os inseticidas das classes carbamatos e organofosfatos inibem as funções da acetilcolinesterase, o seu alvo de ação, impedindo a enzima de degradar a acetilcolina (10). Como consequência, o impulso nervoso não é finalizado, provocando paralisia e morte do mosquito.

Várias mutações no gene que codifica a acetilcolinesterase (Ace) já foram descritas em diversos artrópodes como estando relacionadas com a capacidade de resistência destes aos inseticidas. No que diz respeito à espécie *Aedes aegypti* foram descritas mutações (F350Y, F105S + F350Y) que também conferem resistência aos inseticidas (19)(20). A Figura 5, ilustra a localização das mutações pontuais na estrutura tridimensional da AChE em diferentes grupos de artrópodes (21).



**Fonte:** Lee et al (2015). (21)

**Figura 5:** Mutações na acetilcolinesterase em diversas espécies de artrópodes. Ag, *Aphis gossypii*; Aea, *Aedes aegypti*; Ang, *Anopheles gambiae*; Bd, *Bactrocera dorsalis*; Bo, *Bactrocera oleae*; Cp, *Cydia pomonella*; Cs, *Chilo suppressalis*; Cxt, *Cx. tritaeniorhynchus*; Cxp, *Culex pipiens*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Lc, *Lucilia*

*cuprina*; Ld, *Leptinotarsa decemlineata*; Md, *Musca domestica*; Mp, *Myzus persicae*; Ng, *Nilaparvata lugens*; Px, *Plutella xylostella*; Tu, *Tetranychus urticae*.

### **Ácido Gama-aminobutírico (GABA)**

O GABA é um neurotransmissor inibitório cuja ligação com o recetor atua de modo a impedir o potencial de ação (12). Existem pelo menos três tipos de recetores: GABA-A, GABA-B e GABA-C. Os recetores GABA-A e GABA-C, após a ligação do neurotransmissor, permitem a entrada de cloro ( $\text{Cl}^-$ ), tornando o neurónio mais negativo, que, por sua vez, impede o potencial de ação. O recetor GABA-B atua com um intermediário, a proteína-G, que gera a abertura de um canal permitindo assim a saída de potássio ( $\text{K}^+$ ) do neurónio tornando-o mais negativo, inibindo o potencial de ação.

Os inseticidas das classes piretróides e organoclorados ligam-se aos recetores do neurotransmissor GABA, impedindo a entrada de iões cloro para o meio intracelular e cessando as capacidades inibitórias do neurotransmissor (7). Não ocorrendo inibição do potencial de ação, os impulsos nervosos ocorrem continuamente, o que provoca contração muscular, convulsões e paralisia fatais para o mosquito (10).

O mecanismo de resistência do tipo local-alvo, está associado a mutações que geram alterações na estrutura do recetor e diminuem a afinidade ou impedem a ligação do inseticida aos recetores GABA. Neste caso, a função do recetor GABA não é afetada e o mosquito sobrevive, mesmo na presença do inseticida.

Relativamente à espécie *Aedes aegypti*, basta a substituição de uma alanina (GCA) por uma serina (TCA), no segundo domínio transmembranar do recetor GABA para conferir resistência (A296S) (22)(23).

#### **1.1.2 PENETRAÇÃO REDUZIDA DO INSETICIDA**

A capacidade de penetração cuticular pode ser alterada devido ao espessamento ou a uma mudança na composição química da cutícula do mosquito. Uma diminuição na taxa de penetração do inseticida, para além de uma possível diminuição na quantidade total de inseticida absorvido, pode também facilitar a ação das enzimas metabólicas, aumentando o tempo para a degradação dos inseticidas em produtos não tóxicos (7).

A resistência a piretroides está associada ao espessamento cuticular, devido à elevada expressão de genes que codificam para enzimas P450s. Esta elevada expressão, está associado à alteração de espessamento, uma vez que aumenta os hidrocarbonetos na epicutícula dos insetos resistentes (23). O aumento da expressão de genes como CYP4G16 e CYP4G17 resulta na modificação epicuticular falada anteriormente, e como consequência existe uma diminuição na penetração do inseticida (23).

A elevada expressão de proteínas cuticulares está associada à diminuição da penetração do inseticida (24).

A redução na capacidade de penetração do inseticida pode também ser devido à rápida sequestração do inseticida em determinados tecidos como o tecido adiposo.

### **1.1.3 RESISTÊNCIA COMPORTAMENTAL**

A resistência comportamental, como o nome indica, consiste na alteração de comportamento do mosquito perante a exposição ao inseticida, evitando a área pulverizada (25)(8). Alterações comportamentais, após a aplicação de programas de controlo continuado, apoiam a hipótese de resistência comportamental, em *Anopheles* nas ilhas de Salomão e na Papua Nova Guiné assim como na Tanzânia e no Quênia (26).

### **1.1.4 RESISTÊNCIA METABÓLICA**

A resistência metabólica está associada ao aumento da atividade de enzimas de desintoxicação que degradam compostos exógenos ao organismo (incluindo os inseticidas). Existem três fases no processo de desintoxicação. As enzimas desintoxicantes associadas à resistência aos inseticidas atuam principalmente nas fase I e II. Na primeira fase, as esterases e as enzimas citocromo P450, têm a função de reconhecer e atuar diretamente no inseticida, ou qualquer outra molécula tóxica, modificando estes compostos através de reações como oxidação, hidrólise e redução. As enzimas de fase II, utilizam o produto gerado na fase I para conjugar compostos ao xenobiótico modificado, o que o torna mais solúvel em água e mais facilmente excretado na fase III. Como exemplo de enzimas de segunda fase temos as Glutathione s-transferases, ou GSTs.

#### **Esterases**



As esterases são enzimas com capacidade de hidrolisar compostos exógenos, como os inseticidas e, também compostos endógenos resultantes do processo metabólico do próprio organismo (27). A expressão elevada destas enzimas está associada a resistência aos piretróides, carbamatos e organofosfatos. Os inseticidas pertencentes a estas classes contêm um grupo éster, que serve de substrato para as esterases, que por sua vez hidrolisam essas ligações. Assim, em artrópodes em que as esterases apresentam níveis de atividade elevada, o inseticida é transformado, conjugado na fase II e excretado da célula e do organismo, o que faz com que o mosquito sobreviva (28).

Na espécie *Aedes aegypti*, por exemplo, um aumento na expressão, do gene AAEL005112 leva ao aumento da atividade das esterases o que provoca resistência aos inseticidas, pela rápida decomposição e eliminação do inseticida (28). A expressão diferencial de genes para a mesma espécie foi avaliada e os autores verificaram um aumento na expressão de quatro esterases (CCEae3A, CCEae1A, CCEae4A e AAEL015578) que, mais uma vez, está relacionado com a resistência a inseticidas (24).

### **Citocromo P450 (CYP)**

Os genes que codificam as enzimas do citocromo P450 constituem a maior família de genes de desintoxicação (12). Em *Aedes aegypti* estão descritos 160 genes para esta família enzimática (29). Estas enzimas, também conhecidas como monoxigenases, regulam ou fazem a biotransformação de compostos endógenos, como hormonas, e estão envolvidas no catabolismo e anabolismo de inseticidas, drogas e toxinas. Vários estudos demonstram que elevados níveis de CYPs estão associados à resistência aos inseticidas químicos (27). Por exemplo, a elevada expressão de genes da família CYP foi observada numa colónia de *Aedes aegypti* altamente resistente à permetrina. Contudo, após a sequênciãção apenas um gene mostrou associação com a resistência (30). A sobreexpressão dos outros genes estudados, ocorreu devido à ação de proteínas regulatórias, por mecanismos de trans-regulação e não estava associada à resistência (30). Num outro estudo, a expressão diferencial de vários genes foi avaliada através de um *detox chip*. Neste trabalho os autores verificaram um aumento na expressão de 22 genes P450s que estão relacionados com a resistência a inseticida, sendo que os mais sobreexpressos foram os seguintes: CYP9J32, CYP9J28, CYP6BB2, CYP9J27, CYP6AG7, CYP9M5, CYP9J26, CYP6N12, CYP9M6 e CYP6M11 (24).

## **Glutathione S-transferases (GSTs)**

As GSTs fazem parte de uma grande família de enzimas intracelulares, responsáveis pela desintoxicação (31) de compostos endógenos e exógenos, transporte intracelular e sinalização celular (32). São divididas em dois grupos de acordo com a sua localização na célula: GSTs microsômicas (enzimas associadas às membranas) e GSTs citosólicas (enzimas solúveis) (33). Relativamente à classificação das GSTs baseada na sequência de aminoácidos e características bioquímicas, existem nove grandes classes: Alfa, Mu, Pi e Teta em mamíferos, Kappa e Zeta em humanos; Sigma em cefalópodes e artrópodes; Fi em plantas e Delta em artrópodes (34).

O aumento na expressão de alguns genes que codificam GSTs, está envolvido na resistência a inseticidas das classes piretroides e organofosfatos, mais especificamente ao DDT (31)(35).

Através de *microarrays* foi possível detetar a sobreexpressão de três GSTs (GSTd4, GSTs1 e GSTd1), associadas à resistência a inseticidas (24). Vários estudos, incluindo em *Aedes aegypti* (36), demonstram que o gene GSTE2 está envolvido no metabolismo do DDT (37)(38).

## **1.2 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS**

A suscetibilidade aos inseticidas de uma população de mosquitos pode ser avaliada através de bioensaios laboratoriais de larvas ou de adultos. Existem dois tipos de ensaios padronizados, comumente utilizados para a avaliação da suscetibilidade de populações de mosquitos a inseticidas: os testes da OMS (Organização Mundial de Saúde ou *WHO-World Health Organization*), aplicáveis a larvas e adultos; e testes do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) padronizados apenas para culicídeos adultos.

### **1.2.1 BIOENSAIOS**

#### **Testes baseline**

Os bioensaios são padronizados pela OMS (39). Na realização de um bioensaio para testar a suscetibilidade de um inseticida, é necessário determinar a taxa de mortalidade dos mosquitos quando expostos a concentrações ou tempos crescentes do

composto a testar. Com base nos resultados efetua-se uma análise de regressão *Probit* e determina-se a  $LC_{50}/LC_{90}$  ou  $LT_{50}/LT_{90}$  que são as concentrações/tempos letais, onde se observa 50% ou 90% de mortalidade, respetivamente. Caso se encontre uma regressão linear entre a transformação *Probit* da taxa de mortalidade e o logaritmo da concentração/tempo utilizado, a população é considerada suscetível, quando atinge 100% de mortalidade.

Para avaliar a aplicabilidade de um inseticida (40), três fases terão de ser cumpridas:

- A 1ª fase consiste em estudos laboratoriais, onde se estabelece as taxas de mortalidade de colónias suscetíveis da espécie vetor a diferentes concentrações do inseticida em causa. Assim, determina-se a concentração letal  $LC_{50}$  e  $LC_{90}$  sendo também determinada a concentração diagnóstico para monitorizar a suscetibilidade das populações naturais nos ensaios de campo.
- A 2ª fase consiste em ensaios de campo em pequena escala, onde o principal objetivo é avaliar a ação do larvicida em populações naturais. Durante esta fase avalia-se a atividade residual e o impacto do inseticida no ecossistema, nomeadamente, o impacto em organismos não-alvo.
- A 3ª fase baseia-se em ensaios de campo de larga escala, que apresentam como principal objetivo, verificar se o inseticida pode ser utilizado para controlar o vetor numa região/país. Assim, durante esta fase deverá ser efetuada: (i) a monitorização da aplicação do inseticida, (ii) a avaliação da atividade residual, e (iii) a descrição de qualquer efeito colateral nos técnicos que estão a fazer a aplicação, ou, no ecossistema. São ainda objetivos desta fase educar a população e promover a aceitação da metodologia controlo a aplicar.

### **Testes diagnóstico**

Estes testes como o nome indica são realizados com uma dose/tempo diagnóstico, determinado no teste *baseline*, anteriormente descrito. Os testes diagnóstico são utilizados em situações de monitorização da resistência de populações que estão a ser sujeitas a controlo vetorial baseado na aplicação de inseticida. Estes permitem a utilização de menos mosquitos comparativamente aos testes *baseline* (125 vs 500 mosquitos).

De acordo com os protocolos da OMS (41), têm de ser testados no mínimo 100 mosquitos. Os parâmetros para avaliar a suscetibilidade de uma população são efetuados através do cálculo da taxa de mortalidade, após a realização dos bioensaios. Valores de mortalidade até 90% sugerem a presença de resistência ao inseticida testado; uma taxa de mortalidade entre 90-97% sugere uma alteração na suscetibilidade que necessita de ser confirmada laboratorialmente com a repetição do bioensaio ou com análises bioquímicas ou moleculares, como por exemplo pesquisa de mutações *kdr*; finalmente valores de mortalidade entre 98-100% a população é considerada suscetível.

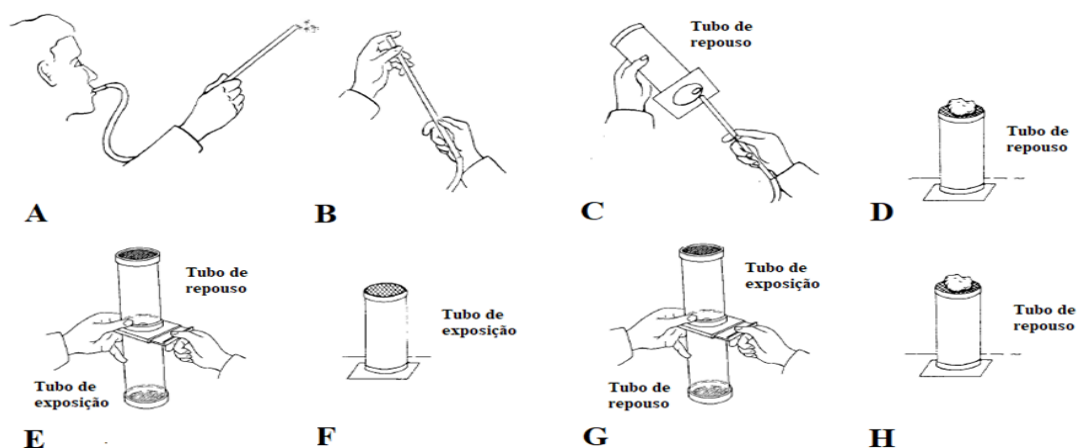
Tal como referido anteriormente, existem dois métodos para a realização dos bioensaios de avaliação da suscetibilidade de culicídeos adultos. Os tubos da OMS (Figura 6) e os ensaios com garrafas do CDC (Figura 7). Podemos observar as vantagens e desvantagens de cada método na Tabela 2 (40)(42).

**Tabela 2:** Vantagens e desvantagens dos testes OMS e CDC.

**Fonte:** Tabela adaptada de Aïzoun, N., et al (2013) (40).

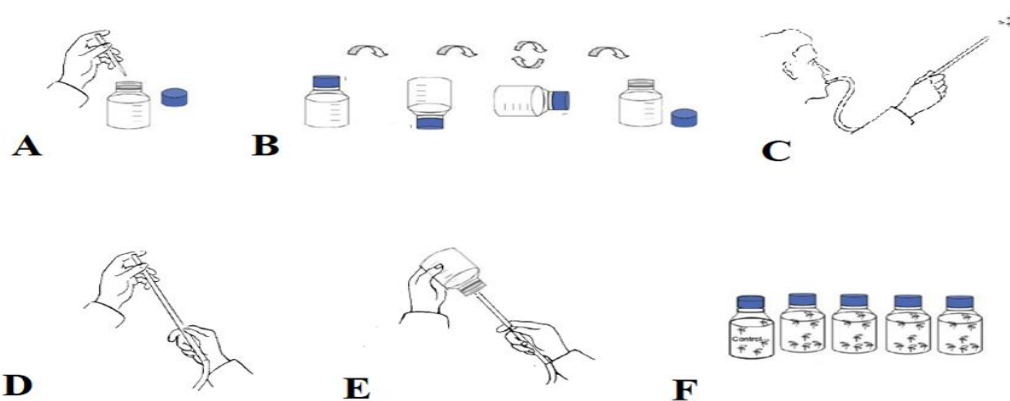
	Vantagens	Desvantagens
<b>OMS</b>	<p>Os papéis com inseticida para o bioensaio, assim como todo o material necessário para a execução dos testes, são padronizados e podem ser adquiridos ou doados.</p> <p>Os mosquitos mortos são facilmente removidos do tubo.</p> <p>As doses diagnóstico para cada inseticida estão estabelecidas e padronizadas pela OMS.</p> <p>Permite a avaliação do efeito <i>Knockdown</i></p> <p>O método tem uma elevada reprodutibilidade.</p>	<p>A transferência dos mosquitos de um tubo para o outro requer prática.</p> <p>Temperatura (25-28°C) e humidades (65-75%) controladas.</p> <p>O bioensaio demora obrigatoriamente 24h para o registo da mortalidade.</p> <p>Método mais caro e complexo.</p>
<b>CDC</b>	<p>Utiliza menos mosquitos.</p> <p>Não necessita transferência de mosquitos entre garrafas.</p>	<p>As garrafas têm de ser impregnadas com o inseticida antes da realização do bioensaio, em condições laboratoriais controladas.</p>

<p>O bioensaio é simples e de rápida execução (máximo duas horas).</p> <p>Alguns componentes são mais baratos e encontram-se mais facilmente no mercado.</p> <p>Pode ser utilizada qualquer concentração do inseticida.</p> <p>Permite a avaliação do efeito <i>knockdown</i></p>	<p>A impregnação da garrafa não é padronizada e acarreta muitos cuidados.</p> <p>A reutilização das garrafas e a manutenção de garrafas pré-preparadas no laboratório ainda não foram suficientemente estudadas.</p> <p>Não tem doses diagnóstico padronizadas.</p>
---	---



**Fonte:** Imagem adaptada do 30º relatório de inseticidas da OMS (43)

**Figura 6:** Esquema de realização de bioensaio com tubos OMS



**Fonte:** Imagem adaptada de Aizoun, N et al, 2013 (40) e do 30º relatório OMS (43)

**Figura 7:** Esquema de bioensaio com garrafas desenvolvido pelo CDC

Após a realização dos testes de suscetibilidade e, caso a população em estudo se tenha revelado resistente, é necessário perceber o mecanismo de resistência que leva à expressão deste fenótipo. Em regra, no passo seguinte tenta-se averiguar se existem mutações *kdr* na população, pela técnica de RT-PCR (44) ou pela PCR alelo-específico (45)(46)(47)(48). Para a análise do perfil de expressão de genes, são várias as técnicas passíveis de ser utilizadas como, por exemplo, RT-qPCR (49)(50) ou a utilização de *microarrays*.

### **1.3 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA LOCAL-ALVO**

#### **1.3.1 PCR ALELO-ESPECÍFICO**

A PCR é uma técnica de rápida execução e baixo custo, muito utilizada em laboratórios de biologia molecular, pois, permite gerar milhares de cópias a partir de um único fragmento de DNA. Esta técnica tem sido utilizada para detetar resistência do tipo local-alvo dado que com *primers* específicos é possível amplificar e identificar a mutação que causa a resistência (12)(45).

A técnica consiste na repetição de vários ciclos de temperatura, incluindo três fases: (i) desnaturação, onde ocorre a separação da dupla cadeia de DNA; (ii) adesão, onde os *primers* específicos se ligam ao DNA molde; (iii) extensão, onde a DNA polimerase sintetiza a nova cadeia de DNA. Quando ocorre amplificação, o produto da PCR é observado através de uma eletroforese em gel de agarose.

Atualmente, esta é a técnica mais utilizada para a identificação e caracterização de resistências metabólicas local-alvo, como, *kdr*, Ace (51)(52) e GABA (22).

### **1.4 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RESISTÊNCIA METABÓLICA**

A resistência a inseticidas é um tema que preocupa as populações e, em particular, os gestores dos programas de controlo de vetores, em locais de risco para a ocorrência de surtos ou em áreas endémicas de doenças de transmissão vetorial.

Os estudos com base nos mecanismos de resistência são extremamente importantes para o desenvolvimento de novas técnicas para o controlo do vetor. Assim, após a

realização dos bioensaios, existem algumas técnicas para caracterizar os mecanismos moleculares associados à resistência metabólica.

#### 1.4.1 BIOENSAIOS COM SINERGISTAS

A utilização de sinergistas é o primeiro passo a efetuar para perceber se a resistência observada é de origem metabólica. A utilização destes compostos leva a uma diminuição na quantidade de inseticida necessário para provocar 100% de mortalidade, uma vez que este atua como substrato alternativo das enzimas desintoxicantes e evita a degradação do inseticida (14). Os sinergistas são utilizados para bloquear a ação das enzimas P450s, esterases e GSTs, com o objetivo de avaliar a presença de resistência metabólica. Quando na presença de mecanismos de resistência metabólica, a pré-exposição a sinergistas resulta num aumento significativo da mortalidade (25). O sinergista PBO (Butóxido de Piperonilo) aumenta a taxa de mortalidade para permetrina, fenitrotião, ciflutrina e *bendiocarb*. Por outro lado, o sinergista DEM (Diethyl Maleato) aumenta a taxa de mortalidade apenas para a permetrina e fenitrotião (24).

A realização do bioensaio com sinergistas é bastante simples: no caso dos testes CDC basta fazer a impregnação da garrafa com o sinergista, no caso dos testes OMS basta colocar o papel impregnado com o sinergista. Em ambos os casos, os mosquitos devem ser expostos aos sinergistas antes da realização dos bioensaios de suscetibilidade aos inseticidas selecionados. De seguida, basta seguir as regras dos bioensaios e, por fim, calcular a taxa de mortalidade.

Comprovada a existência de resistência metabólica através dos bioensaios com sinergistas é necessário perceber se a resistência é causada por: (i) alteração da afinidade do inseticida com as moléculas alvo; (ii) mutações no promotor que levem à sobreexpressão do respetivo gene; (iii) amplificação génica, ou seja, há que perceber qual o mecanismo genético que está na base da sobreatividade das enzimas desintoxicantes que levam à resistência a inseticidas.

#### 1.4.2 RT-PCR (TRANSCRIPTASE REVERSA DA PCR)

A RT-PCR (Transcriptase reversa PCR do inglês *reverse transcriptase PCR*), é uma variação da reação em cadeia da polimerase que mede os níveis de expressão de RNA. Nesta técnica, o DNA complementar (cDNA) é produzido pela transcrição reversa

do RNA molde, com a enzima transcriptase reversa. Esta é uma técnica *standard*, frequentemente utilizada para o diagnóstico de vírus em humanos e em mosquitos (53). É também usada para estudar qualitativamente a expressão gênica, podendo ser combinada com a PCR em tempo real para quantificar os níveis de RNA (54) e, assim avaliar o nível de expressão de diferentes genes, nomeadamente, daqueles que já foram associados a mecanismos de resistência metabólica.

### 1.4.3 MICROARRAYS

*Microarrays*, ou *chips* de DNA, contêm sondas que por sua vez contêm milhões de segmentos específicos de DNA de cadeia simples. O princípio da técnica, baseia-se na hibridação por complementaridade dos ácidos nucleicos marcados com um fluoróforo das amostras à sequência similar ao gene de interesse que se encontram imobilizados no *chip*. Através de um *software* específico é possível quantificar o sinal emitido e fazer uma comparação exaustiva de genes (29). Assim, primeiramente, é necessário extrair, isolar e amplificar o RNAm. De seguida, utilizando a transcriptase reversa obtém-se o cDNA. Este é marcado com o fluoróforo e adicionado ao *chip*, onde ocorre a hibridação. Por fim, a fluorescência é detetada e os resultados são analisados com recurso a programas informáticos específicos. Comparando amostras de RNA de populações ou colónias resistentes com colónias suscetíveis, é possível verificar quais os genes que apresentam alterações na sua expressão.

Esta técnica tem sido aplicada na identificação de genes de desintoxicação, para conhecer melhor as bases genéticas da resistência em diversas espécies de mosquito, incluindo *Aedes aegypti* (29) (55) (56).

Esta é uma ferramenta muito útil, específica, sensível e flexível para avaliar as diferenças de expressão gênica entre diferentes populações. Uma vez que o *chip* é desenhado pela própria pessoa e, deste modo, pode-se selecionar quais os genes de interesse. Um bom *chip* para a deteção de genes de resistência metabólica tem de incluir sequências específicas de genes de diferentes famílias de modo a abranger o maior número de possibilidades. Assim, deverá conter sequências específicas de genes codificantes de enzimas da família das esterases ou GSTs, (57) (58) ou outras, como por exemplo, sequência de genes de proteínas cuticulares associadas à resistência por diminuição da capacidade de penetração do inseticida.



#### 1.4.4 VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS (DO INGLÊS COPY NUMBER VARIATION - CNV)

A variação do número de cópias de genes nos genomas demonstra uma enorme variedade de polimorfismos, possivelmente adaptativos (59), que pode influenciar a expressão de genes (60) e alterar o fenótipo do indivíduo devido à deleção ou duplicação de regiões no genoma (61).

Apesar de existirem poucos estudos sobre o assunto, pensa-se que a amplificação de genes associados a enzimas de desintoxicação pode explicar a presença de resistência metabólica em diversos insetos (62). É uma técnica que embora seja pouco estudada, mostra-se muito promissora.

A duplicação do gene do canal de sódio operado por voltagem foi detetada em *Aedes aegypti* no Brasil e em *Culex* na Tanzânia. Também em *An. gambiae* e *An. coluzzii* foi detetada a duplicação do gene da acetilcolinesterase (59). A alteração no número de cópias no gene Ace é considerado um componente crítico da evolução adaptativa dos insetos e por sua vez, pode também estar associada, à resistência aos inseticidas (63). Em África, populações de mosquitos *Anopheles* apresentam duplicação nos genes associados a resistência metabólica (60).

Em 2015, com esta técnica (CNV) vários genes foram associados à resistência a inseticidas (CYP9J24, CYP9J28, CYP9J32, CYP6BB2, CYP6P3, CYP6P7, CYP6P9, CYP6M2 e CYP6AA5) da classe dos piretróides e outros foram associados à resistência a *temephos* da classe dos organofosfatos (CCEae3A, CCEae4A e CCEae6A), na espécie *Aedes aegypti* (62).

#### 1.4.5 QPCR (PCR QUANTITATIVO)

Esta técnica, baseada na reação em cadeia da polimerase, é semelhante a uma técnica de PCR alelo-específica no que diz respeito aos ciclos de temperatura. No entanto, relativamente aos componentes é necessário adicionar um fluoróforo que se ligará às cadeias de DNA formadas durante a reação em cadeia. Este fluoróforo, após a sua incorporação nas cadeias de DNA é passível de ser detetado e quantificado por fluorescência.

A técnica de qPCR é extremamente precisa e rápida, mas, apresenta um custo mais elevado do que a PCR alelo-específica. A quantificação de DNA pode ser realizada de modo relativo (análise da alteração de expressão de um gene, comparativamente a uma amostra de referência) ou absoluto (determinar o número exato de moléculas, nanogramas de DNA). São gerados valores de Ct (*cycle threshold* ou ciclo de quantificação) que correspondem ao número de ciclos concluídos até à detecção do fluoróforo. Este fluoróforo liga-se às novas cadeias de DNA durante a amplificação, formando uma curva de qPCR com quatro fases: (i) *baseline*, onde ocorre amplificação mas o sinal de fluorescência não é suficientemente forte para ser detetado, (ii) exponencial, utilizada para a quantificação, pois a fluorescência já é detetada e a quantidade de DNA duplica a cada ciclo, (iii) linear é a fase onde os reagentes são consumidos e existe uma diminuição na velocidade de amplificação e, por fim, (iv) a fase *plateau* onde não existe praticamente amplificação, devido à falta de reagentes.

A especificidade de cada par de *primer* para amplificação dos genes selecionados é nos dada através do pico da curva de dissociação, cujo pico, corresponde à temperatura de *melting*, temperatura na qual metade do DNA está dissociado e a outra metade ainda está em dupla cadeia. O pico é específico para cada par de *primer* utilizado.

Esta técnica é utilizada para a deteção de CNV de genes específicos previamente associados a enzimas desintoxicantes, utilizando pelo menos um gene endógeno e uma colónia de referência. É possível determinar a alteração do número de cópias de um gene através do método  $\Delta\Delta Ct$  (64). Esta fórmula consiste na diferença entre o  $\Delta Ct$  da população de referência e o  $\Delta Ct$  da população em estudo, onde o valor de  $\Delta Ct$  é obtido com a diferença dos valores de Ct do gene alvo e do Ct do gene de referência. Para obter o valor de expressão génica, é necessário fazer um último passo que corresponde à fórmula  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ .

## 1.5 RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM *Aedes aegypti*

A resistência a inseticidas é comum no mosquito *Aedes aegypti* em todo o mundo. Na América, estudos revelam resistência nas populações do Caribe aos organofosfatos e ao DDT (organoclorado). Por outro lado, as populações de Porto Rico, República Dominicana, Ilhas Virgens Britânicas, Cuba, Jamaica, Martinica e Equador apresentam resistência aos piretroides (65)(66)(67)(68). A resistência ao larvicida *temephos*

(organofosfato) é relatada em vários locais, como, Brasil, Costa Rica, Cuba, Bolívia, Colômbia, Argentina e El Salvador (69).

Do outro lado do mundo, também foi descrita em *Aedes aegypti* a resistência ao *temephos* na Índia, na Malásia, e na Tailândia (69). Na Papua Nova Guiné foi detetada resistência a deltametrina (33%), lambda-cialotrina (32%) *bendiocarb* (89%) e DDT(0% de taxa de mortalidade) (70).

Em África, apesar dos poucos estudos existentes, estão descritas resistências com as seguintes taxas de mortalidade: deltametrina (72%), cipermetrina (75%) (71), a DDT (33,3%) e *propoxur* (87,2%) em Cabo Verde (72). Em Dakar, no Senegal também existe resistência ao DDT (24,4%), *propoxur* (87,2%) e lambda-cialotrina (81,6%). Em Abidjã, na Costa do Marfim, a população de *Aedes aegypti*, é resistente ao carbamato *propoxur* (90,8%) (73). Referente a África Central foi confirmada resistência a DDT numa população, enquanto noutras são precisos mais testes laboratoriais para confirmar a resistência (70,7% e 96,8%) (74).

Na Europa existiram registos pontuais da presença de *Aedes aegypti* em países como a Grã-Bretanha, França, Itália, Malta, Croácia, Ucrânia, Rússia e Turquia. Em Portugal continental, não existem registos do mosquito desde 1956 e em Espanha desde 1953 (75). Por outro lado, na ilha da Madeira, o mosquito foi identificado pela primeira vez em 2005 (76) e encontra-se presente na ilha até aos dias de hoje.

Na ilha da Madeira, a espécie *Aedes aegypti* tem sido alvo de diversos estudos. Têm sido feitos bioensaios, testes bioquímicos e moleculares, com o objetivo de (i) avaliar a suscetibilidade aos inseticidas, (ii) avaliar a atividade enzimática de P450, esterases e GSTs, (iii) estudar a expressão diferencial dos genes associados a resistência e (iv) caracterizar a presença de mutações *kdr*.

Em 2009, a população de mosquitos *Aedes aegypti* da Ilha da Madeira, apresentava as seguintes taxas de mortalidade: DDT (29%), permetrina (33%) e deltametrina (65%), ou seja, a população era resistente aos três inseticidas (77). Por outro lado, a população revelou ser sensível ao inseticida malatião (99%), alfa-cipermetrina (100%) e ciflutrina (100%). No entanto os dois últimos inseticidas foram testados com bioensaios realizados com os testes de garrafa CDC, enquanto todos os outros foram realizados com tubos teste

da OMS (77). Relativamente às mutações *kdr* foi encontrada uma frequência de 8% para o alelo mutante V1016I e uma frequência 98% para a mutação F1534C (76).

No ano de 2013, foram feitos bioensaios novamente e a população apresentava-se resistente a todos os inseticidas testados, com as seguintes taxas de mortalidade: permetrina (11%), ciflutrina (52%), *bendiocarb* (73%) e fenitroteão (78%). Relativamente à frequência alélica das mutações *kdr* para a V1016I foi de 17% e a mutação 1534 foi de 100% (24).

Os ensaios bioquímicos para a população de *Aedes aegypti* da Ilha da Madeira revelaram uma maior atividade das esterases ( $\alpha$  e  $\beta$ ) comparativamente com a colónia Rockefeller, enquanto as enzimas P450 e GST não apresentaram diferente atividade quando comparadas com a colónia de referência (24).

Relativamente à análise com *microarray* para a expressão diferencial de genes, Seixas et al, encontraram vários genes sobreexpressos. Através do *Detox chip*, 22 genes P450s (onde os 10 mais sobreexpressos CYP9J32, CYP9J28, CYP6BB2, CYP9J27, CYP6AG7, CYP9M5, CYP9J26, CYP6N12, CYP9M6 e CYP6M11), quatro genes CCEs (CCEae3A, CCEae1A, CCEae4A e AAEL015578), três GSTs (GSTd4, GSTs1 e GSTd1) e 29 proteínas cuticulares (24), foram encontrados sobreexpressos na população de *Aedes aegypti* do Funchal e Paul do Mar, em comparação com a colónia de referência.

Pensa-se que a população de *Aedes aegypti* da Madeira é proveniente da Venezuela ou do Brasil. Com base na variação genética (16 microssatélites e dois genes de DNA mitocondrial) os autores perceberam que existiram dois momentos de colonização da ilha, ambos por uma população de origem Sul Americana. A Venezuela ou o Brasil foram relatados como a origem mais provável de ambos os casos (78).

# 2-Objetivos

## 2 OBJETIVOS

A resistência aos inseticidas é um tema que preocupa não só as populações, mas também, os gestores dos programas de controlo de vetores, em locais de risco de ocorrência de surto ou em áreas endémicas de doenças de transmissão vetorial. Nesse sentido, a identificação de novas mutações e novos genes que contribuem para este fenótipo multifatorial, é necessária para direcionar os estudos que contribuam para a vigilância e manejo da resistência. Existem várias abordagens que atualmente estão a ser aplicadas para a identificação de genes/mutações associadas à resistência aos inseticidas.

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar a população de *Aedes aegypti* do Funchal, Ilha da Madeira relativamente ao seu *status* de suscetibilidade aos inseticidas químicos e melhor caracterizar os mecanismos de resistência aos inseticidas existentes nesta população.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

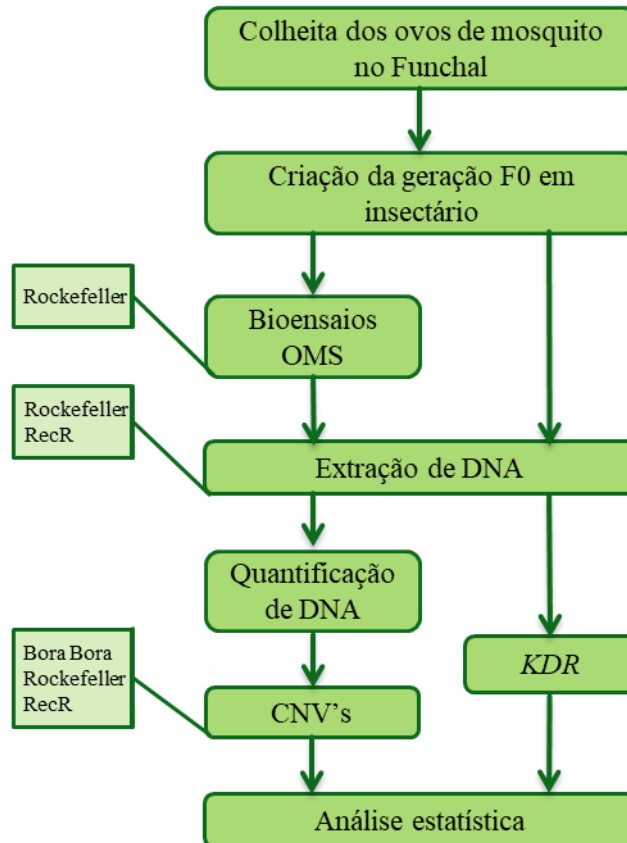
Neste trabalho pretendemos:

1. Avaliar o *status* de suscetibilidade do mosquito *Ae. aegypti* do Funchal a vários inseticidas pertencentes às classes: piretróides, carbamatos, organoclorados e organofosfatos.
2. Investigar o número de cópias de genes associados a resistência aos inseticidas químicos.
3. Detetar a presença de uma recentemente descrita mutação *kdr* na população de *Aedes aegypti* do Funchal, e
4. Comparar as frequências alélicas das mutações *kdr* e as taxas de mortalidades para alguns dos inseticidas testados, ao longo do tempo.

# **3-Materiais e Métodos**

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental efetuado encontra-se sintetizado no fluxograma apresentado na Figura 8.



**Figura 8:** Fluxograma do trabalho experimental.

Iniciou-se o trabalho experimental com a colheita dos ovos do mosquito com o objetivo de se obter formas imaturas (larvas L4) e adultos para os subsequentes bioensaios OMS de sensibilidade a inseticidas. Estes foram efetuados com espécimes colhidos no Funchal e com exemplares de uma colónia suscetível (Rockefeller). Esta colónia de referência foi utilizada para avaliar a qualidade dos papéis impregnados com inseticidas utilizados nos referidos bioensaios. Assim, adultos e larvas da população do Funchal classificados como “resistentes” ou “suscetíveis” com base nos resultados destes bioensaios, foram posteriormente analisados para determinação do número de cópias (Copy Number Variation- CNV) de genes de interesse associados a mecanismos de resistência metabólica. Um segundo grupo de exemplares adultos, provenientes do mesmo conjunto de colheitas, mas cuja sensibilidade aos inseticidas não foi testada, foi



utilizado para a pesquisa de mutações *kdr*, mutações essas associadas a mecanismos de resistência local-alvo. Um terceiro e quarto grupos de amostras, provenientes de duas colónias referência, um da colónia sensível Bora-Bora e outro de uma colónia resistente ao *temephos*, RecR, foram também analisados quanto à variação do número de cópias de genes de interesse. A respetiva análise estatística encontra-se no final de cada tópico.

### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

#### Ilha da Madeira, Portugal

A Região Autónoma da Madeira (RAM) situa-se no oceano Atlântico e é constituída por duas ilhas habitadas: a Madeira, com cerca de 740,7 Km<sup>2</sup> e Porto Santo, com cerca de 42,5 Km<sup>2</sup>. Existem também dois conjuntos de ilhas desabitadas: as Desertas, constituídas por três pequenas ilhas com 14,2 Km<sup>2</sup> e as Selvagens compostas por duas ilhas com 3,6 Km<sup>2</sup>. Assim, a RAM totaliza uma área de 801 Km<sup>2</sup>, com cerca de 254.368 habitantes de acordo com a Direção Regional de Estatísticas da Madeira (DREM) (Figura 9).



**Figura 9:** Mapa da Região Autónoma da Madeira.

A origem vulcânica da ilha transparece no próprio relevo, com vales profundos e picos montanhosos com mais de 1.800 metros de altura. Existem microclimas associados, e podemos sentir as quatro estações num único dia, durante um passeio pela ilha. Segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, o clima é Mediterrânico, predominantemente do tipo Csb, temperado com Verão quente e suave (Santo António, São Martinho, Ribeira

Brava, Caniço e Estreito de câmara de Lobos) mas também do tipo Csa, temperado com verão quente e seco (Funchal, Santa Cruz, Vila Baleira e São Vicente) (79).

Uma parte da vegetação endémica existente é chamada vegetação Laurissilva e foi considerada património mundial pela UNESCO. Funchal é a capital da Ilha da Madeira e é um dos poucos locais na Europa onde *Aedes aegypti* estabeleceu uma população desde 2005.

### 3.2 POPULAÇÕES E COLÓNIAS DE MOSQUITO

Neste trabalho foram analisados exemplares da população de *Aedes aegypti* da cidade do Funchal (Madeira) e três colónias de referência (Rockefeller, RecR e Bora Bora). Ovos das colónias Rockefeller e RecR foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, no Brasil. As amostras de DNA já extraído e quantificado da colónia Bora Bora foram cedidas pelo Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), CNRS, France as quais foram usadas como controlo na pesquisa de CNV de genes de interesse.

As colónias Rockefeller e Bora Bora são colónias de referência, ou seja, estão caracterizadas como suscetíveis aos diversos inseticidas químicos. A colónia Rockefeller, foi fundada entre 1881-1915 no Instituto Finlay em Havana, Cuba, e foi posteriormente cedida a várias instituições do mundo. A colónia Bora Bora foi criada por Gaston Pichon em França com mosquitos colhidos em Bora Bora, Polinésia Francesa, em 1960. Esta é frequentemente utilizada como padrão em estudos de suscetibilidade recomendados pela OMS (2).

A colónia RecR (Recife-Resistente) é uma colónia de referência de resistência a *temephos*. Esta colónia foi formada a partir de espécimes de campo colhidos a 690 Km do Recife e foi estabelecida, e atualmente mantida, através de seleção artificial por exposição periódicas a este composto, desde 2004 (3)(4).

### 3.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS

A colheita de ovos foi realizada na Madeira, mais especificamente na cidade do Funchal. Os ovos de *Aedes aegypti* foram colhidos no terreno usando armadilhas de ovos, mais conhecidas como *ovitrap*s, do termo em inglês. Toda a coleta foi feita pelos técnicos do IASaúde, no período de agosto a dezembro de 2018. Na região do Funchal foram

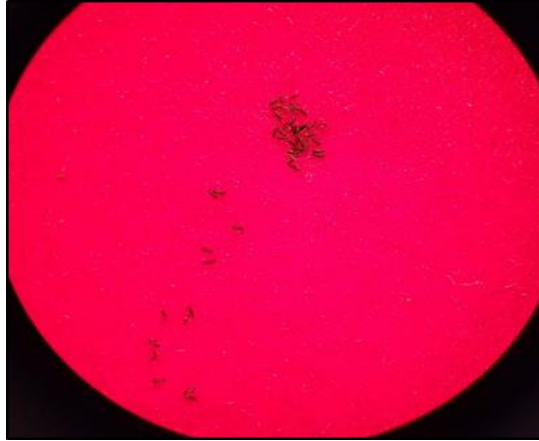
usadas no total 41 armadilhas. Os ovos foram recolhidos e contabilizados de oito em oito dias.

As armadilhas são compostas por um balde de 10 litros (Figura 10), contendo cerca de dois litros de água e uma régua. Esta régua, encostada à parede do balde, é coberta com uma fita vermelha, presa por um elástico, que é usada como substrato pelas fêmeas do mosquito para a oviposição.



**Figura 10:** Balde utilizado como armadilha de ovos de mosquito.

As fitas foram recolhidas e foi contabilizado o número de ovos em cada uma (Figura 11). Em janeiro de 2019, as fitas com mais de 100 ovos foram selecionadas pelos técnicos do IASAÚDE e colocadas em água para a eclosão das larvas. As larvas foram mantidas em cubas plásticas e foram alimentadas com ração para peixe (Tetra Goldfish) *ad libitum*. Quando estas atingiram a fase final do 3º estado larvar ou o 4º estado inicial, os exemplares necessários aos testes de suscetibilidade ao *temephos* foram retirados e, imediatamente, processados. Os restantes espécimes continuaram o seu desenvolvimento. Quando atingiram a fase de pupa, estas foram transferidas para gaiolas de adultos e posteriormente os mosquitos que emergiram foram usados nos bioensaios com os adulticidas.



**Figura 11:** Ovos de *Aedes aegypti*, imagem capturada através da ocular do microscópio ótico durante a contagem dos ovos nas fitas.

### 3.4 BIOENSAIOS

#### 3.4.1 MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO

Na realização dos bioensaios com aduíticas foram utilizadas fêmeas adultas com dois a três dias pós-emergência, não alimentadas com sangue, provenientes da geração F0 criada em insectário a partir dos ovos colhidos na cidade do Funchal. Como controlo foram utilizados, nos mesmos bioensaios, machos da mesma proveniência e idade. Os machos são mais sensíveis aos inseticidas e com escassez das fêmeas os machos são uma boa alternativa para o controlo.

Nos testes com *temephos* utilizaram-se larvas no 3<sup>o</sup>/4<sup>o</sup> estado de desenvolvimento da espécie *Aedes aegypti* da ilha da Madeira.

#### 3.4.2 INSETICIDAS UTILIZADOS

Os inseticidas testados neste trabalho são de diferentes classes. Para o teste de sensibilidade foram utilizados: piretróides (deltametrina, permetrina, ciflutrina e *etofenprox*); organoclorados (dieldrina e DDT); carbamatos (*bendiocarb*), e organofosfatos (fenitrotião e o larvicida *temephos*) (5)(6). Os aduíticas utilizados foram adquiridos à OMS na forma de papéis impregnados. A concentração, o lote e a validade podem ser consultados na Tabela S1 (em material suplementar). O larvicida foi cedido pelo Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), CNRS, France.

Para garantir a integridade dos papéis impregnados, foram realizados bioensaios com a colónia de referência de suscetibilidade Rockefeller. Nos bioensaios em que a colónia de referência de suscetibilidade, não demonstrou ser suscetível, ou seja, não apresentou 100% de mortalidade, os resultados dos bioensaios, assim como os papéis impregnados foram descartados.

### 3.4.3 BIOENSAIO COM LARVAS

Nos bioensaios com larvicidas utilizaram-se larvas no final do 3º estado ou início do 4º estado de desenvolvimento da espécie *Aedes aegypti* da cidade do Funchal e da colónia de referência Rockefeller. Ambas as colónias foram obtidas a partir de ovos, no Laboratório de Entomologia do IASAUDE, em condições controladas de temperatura entre 25-28°C, a humidade entre 65-75%, com fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro.

As larvas de ambas as colónias foram expostas ao larvicida *temephos* na dose diagnóstico de 0,04 mg/L em recipientes de vidro, durante 24h, de acordo com o protocolo descrito em (83) (Figura 12). Foram feitas cinco réplicas para o teste de sensibilidade e dois controlos com 25 larvas em cada recipiente.



**Figura12:** Bioensaio das larvas, exposição ao *temephos*.

No total, foram usadas 175 larvas (125 para as tinas teste e 50 para as tinas controlo) para ambas as colónias, com um volume final de 200 ml por tina.

Após 24 horas, procedeu-se à contabilização do número de larvas mortas, vivas e moribundas de cada tina. Para a categorização de cada larva, aquelas que sobreviveram foram classificadas como resistentes, as moribundas e mortas foram classificadas como suscetíveis. As larvas foram conservadas em grupos de cinco, em microtubos de 1,5 ml contendo 1 ml de etanol 75%. Foram também conservadas, do mesmo modo, larvas não expostas. Assim, no final, foram armazenadas 90 larvas em 18 tubos: seis tubos com

larvas não expostas ao inseticida, seis tubos com larvas suscetíveis ao inseticida e seis tubos com larvas resistentes ao inseticida.

#### 3.4.4 BIOENSAIOS OMS COM ADULTOS

Assim como as larvas, os adultos foram mantidos no Laboratório de Entomologia do IASAUDE, em condições controladas de temperatura, humidade e fotoperíodo.

Na realização dos bioensaios foram utilizadas fêmeas com dois a três dias pós-emergência, não alimentadas com sangue, provenientes da geração F0 criada em insectário a partir de ovos colhidos na cidade do Funchal. Como controlo foram utilizados, nos mesmos bioensaios, machos da mesma proveniência e idade.

Os ensaios com os mosquitos adultos seguiram os protocolos descritos pela OMS (42). Os bioensaios foram realizados com 25 mosquitos por tubo, e foram utilizadas cinco réplicas e dois tubos controlo (25 machos por tubo), para cada inseticida. No total, 125 fêmeas foram expostas a cada inseticida e 50 machos foram utilizados como controlo (Figura 13).

As fêmeas foram expostas ao inseticida durante 60 min, através do contacto com os papéis impregnados com o inseticida em teste. Simultaneamente, e durante o mesmo período, os machos foram expostos a papéis controlo.



**Figura 13:** Tubos teste da OMS para os bioensaios com adulticidas.

O número de mosquitos tombados foi contabilizado antes da exposição e durante a exposição aos min 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60. De seguida, os mosquitos foram

transferidos novamente para os tubos de repouso (revestidos com um papel branco), onde permaneceram 24h. As taxas de mortalidade foram calculadas para os tubos de exposição (teste) e tubos controlo, passado 24h da exposição (Figura. 14).

Após o bioensaio, para cada inseticida, os mosquitos foram separados conforme o fenótipo (resistentes, os sobreviventes após a exposição, e suscetíveis, os que morreram após exposição). Estes mosquitos foram conservados de acordo com a sua categorização, em grupos de cinco, em microtubos de 1,5 ml com sílica gel e algodão.



**Figura 14:** Fotografia tirada de baixo para cima, onde vemos na base do tubo de exposição mosquitos moribundos.

### 3.4.5 CÁLCULO DA MORTALIDADE

A mortalidade foi calculada para cada bioensaio (larvas ou adultos) e respetivos controlos. Quando a taxa de mortalidade nos controlos foi inferior a 5% utilizou-se o cálculo direto da percentagem, tal como referido abaixo (Equação 1). Quando a taxa de mortalidade no controlo variou entre 5-20% foi necessário proceder à correção deste parâmetro através da aplicação da fórmula de Abbott (Equação 2). Nos casos em que a taxa de mortalidade do controlo é superior a 20%, o bioensaio tem de ser descartado. Caso alguma tina contenha pupas estas são retiradas e não são contabilizadas.

$$\text{Equação 1: Mortalidade observada} = \frac{\text{mosquitos mortos}}{\text{total mosquitos}} \times 100$$

Equação 2: Mortalidade corrigida

$$= \frac{(\% \text{ mortalidade observada} - \% \text{ mortalidade do controlo})}{(100 - \% \text{ mortalidade do controlo})} \times 100$$

### 3.4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS BIOENSAIOS

A análise dos resultados dos bioensaios foi realizada através do cálculo das taxas de mortalidade e dos gráficos de taxa de mortalidade/tempo de exposição. Foi também efetuada uma análise de regressão *Probit* (os detalhes desta análise podem ser observados na Tabela S2 em material suplementar).

## 3.5 ANÁLISES MOLECULARES

### 3.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O material biológico foi enviado para os laboratórios do IHMT, em Lisboa, de modo a ser processado para posteriores estudos moleculares. Estes iniciaram-se com a extração de DNA dos exemplares preservados de acordo com os procedimentos do método CTAB (84).

Para análise da alteração do número de cópias (CNV) de genes de interesse, grupos de cinco mosquitos, categorizados como suscetíveis ou resistentes, foram homogeneizados em 200  $\mu$ l de CTAB com o auxílio de um pistilo. No total foram utilizados seis *pools* de mosquitos resistentes e seis *pools* de mosquitos suscetíveis, por inseticida testado. O DNA de mosquito das colónias Rockefeller e da RecR também foi extraído com o mesmo método em *pools* de cinco indivíduos.

Para a deteção de mutações *kdr* procedeu-se à extração individual de DNA, pelo mesmo método acima referido, de 30 mosquitos adultos e 30 larvas, não fenotipados relativamente à sensibilidade aos inseticidas.

Os mosquitos foram macerados em microtubos com 200  $\mu$ l de CTAB com o auxílio de um pistilo e de seguida os tubos foram colocados em banho-maria a 65°C durante 5 min. Foram adicionados 200  $\mu$ l de clorofórmio em cada tubo e estes foram centrifugados por 5 min a 12000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com igual volume de isopropanol e foi homogeneizado por inversão. Os



tubos foram centrifugados novamente nas mesmas condições, durante 15 min. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e foram adicionados 200 µl de etanol 70% ao precipitado (*pellet*). Para finalizar, a amostra foi centrifugada, por 5 min a 12000 rpm e foi descartado novamente o sobrenadante. O *pellet* foi seco no aparelho *Speed-vac* durante 20 min e ressuspendido em 50 µl de água estéril. Todos os microtubos com DNA foram armazenados a -20 °C.

### 3.5.2 SCREENING DE MUTAÇÕES *KDR*

A detecção de três mutações no gene responsável pela codificação dos canais de sódio e anteriormente associadas à resistência do tipo local-alvo foi feita com recurso as técnicas de PCR alelo-específicas. As mutações pesquisadas ocorrem nos codões 1534, 1016 e 410 e a identificação dos alelos presentes foi efetuada de acordo com protocolos previamente estabelecidos (65) (17) (15).

A presença das referidas mutações *kdr* foi avaliada em 60 mosquitos da ilha da Madeira, não expostos a qualquer inseticida. As respectivas frequências alélicas foram calculadas com a seguinte fórmula (onde RR significa que o indivíduo é homocigótico resistente e RS é heterocigótico): 
$$Frequencia\ RR = \frac{(2 \times n^{\circ}\ de\ mosquito\ RR) + n^{\circ}\ de\ RS}{(2 \times Total)}$$

Os reagentes e a quantidade de DNA padrão (*template*) utilizados nas reações podem ser consultados na Tabela S3 (em material suplementar).

#### Mutação *kdr* F1534C

Na detecção da mutação F1534C foram utilizados os primers AaEx31P (5'-TCG CGG GAG GTA AGT TAT TG-3'), AaEx21Q (5'-GTT GAT GTG CGA TGG AAA TG-3'), AaEx31wt (5'-CCT CTA CTT TGT GTT CTT CAT CAT CTT-3') e AaEx31mut (5'-GCG TGA AGA ACG ACC CGC-3') descritos previamente por Harris et al. (65). As condições de amplificação aplicadas foram as seguintes: 95°C - 5 min; 35 ciclos (94°C – 30 seg, 63°C – 30 seg, 72° - 30 seg); 72°C- 10 min

A visualização dos produtos de PCR foi efetuada com recurso a uma eletroforese em gel de agarose 2%, corado com 8 µl de GreenSafe Premium (NZYTech) e a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi efetuada por comparação com o marcador de peso molecular GRS ladder 100 bp (GRiSP Research Solutions). Como

controle foram utilizadas amostras da mesma região (Funchal) anteriormente genótipadas para esta mutação. A eletroforese decorreu nos primeiros 15 min a 90V e nos 30 min restantes a 120V. De acordo com o número e tamanho dos produtos de PCR, o indivíduo foi considerado homozigoto para o alelo selvagem (*wild type*) (SS) se aparecesse duas bandas ( $\approx 200$  pb e  $\approx 300$  pb), homozigótico para a mutação em causa (RR) se apresentar uma banda ( $\approx 150$  pb) e quando foram visualizadas as três bandas o indivíduo foi considerado heterozigoto (RS) (65).

### **Mutação *kdr* V1016I**

Foram utilizados os *primers* Val1016F (5'-CGG GCA GGG CGG CGG GGG CGG GGC CAC AAA TTG TTT CCC ACC CGC ACC GG-3'), Iso1016F (5'-GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A-3') e Iso1016R (5'-GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA AAG C-3') para a deteção da mutação V1016I com as seguintes condições para o termociclador: 95°C - 12 min; 39 ciclos (95°C - 20 seg, 60°C - um minuto, 72° - 30 seg); 72°C - 5 min (17).

Para visualização dos produtos de PCR as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 3%, corado com 8  $\mu$ l de GreenSafe Premium (NZYTech). Como controle foram utilizadas amostras da mesma região (Funchal) anteriormente genótipados para esta mutação. Para determinação do tamanho dos produtos amplificados foi aplicado no gel 6  $\mu$ l de marcador de peso molecular GRS ladder 100 bp (GRiSP Research Solutions). A eletroforese decorreu durante 90 min a 80V. De acordo com o número de produtos amplificados e respetivos tamanhos(17) os exemplares processados foram considerados: homozigóticos para o alelo selvagem (SS) quando apresentaram apenas uma banda com  $\approx 100$  pb; homozigótico para a mutação *kdr* em causa (RR) quando exibiram uma banda com  $\approx 50$  pb; designados de heterozigóticos (RS) sempre que mostraram amplificação de dois fragmentos com  $\approx 100$ pb e  $\approx 50$ pb;

### **Mutação *kdr* V410L**

Os *primers* Aa410F1 (5'-TTACGATCAGCTGGACCGTG-3'), Aa410F2 (5'-ATCAGCTGGACCGTGGCA-3') e Aa410R1 (5'-TTCCTCGGCGGCCTCTTC-3') previamente descritos por Haddi et al. (15) foram utilizados para detetar a mutação

V410L, sendo as condições de amplificação as seguintes: 94°C - 2 min; 35 ciclos (94°C – 40 seg, 58°C – 45 seg, 72°-1 minuto); 72°C- 10 min.

Relativamente ao número e tamanho dos produtos amplificados, a presença de uma banda de 113 pb representa um indivíduo com genótipo SS (homozigótico para o alelo selvagem), a observação de apenas uma banda com aproximadamente  $\approx 133$  pb corresponde a um indivíduo RR (homozigótico para a mutação *kdr*), e se existirem as duas bandas o indivíduo é considerado heterozigoto (RS). As amostras foram analisadas em gel de agarose 4%, de acordo com o procedimento mencionado anteriormente. A eletroforese decorreu a 120 V durante 30 min (15).

### **Análise estatística das mutações *kdr***

De modo a avaliar uma possível associação entre as diferentes mutações *kdr* foi realizado um teste *t-student* que comparou os resultados obtidos com a genótipagem de cada indivíduo para as referidas mutações. O teste estatístico que foi utilizado para comparar as mutações ao longo dos anos foi o teste exato de *Fisher*.

### **3.5.3 VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS (CNV)**

#### **Quantificação de DNA**

As amostras de DNA para a deteção de CNV, foram quantificadas no aparelho Qubit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Este equipamento utiliza um marcador fluorescente que se liga ao DNA alvo, o que torna possível a deteção e quantificação do DNA.

As recomendações do fabricante foram seguidas para a quantificação de DNA. Foram preparados dois tubos para os padrões e um tubo para cada amostra a ser quantificada. Assim, cada tubo continha 190  $\mu$ L de solução de trabalho (diluição do reagente Qubit<sup>TM</sup> 1:200 no tampão Qubit<sup>TM</sup> (buffer)) e 10  $\mu$ L de cada padrão respetivamente (os padrões correspondem aos limites de deteção, um é 0 ng/ $\mu$ L e o outro é de 10 ng/ $\mu$ L). As amostras continham 198  $\mu$ L de solução de trabalho e 2  $\mu$ L de DNA. A Figura S1 (em material suplementar) ilustra um *output* do Qubit. Para finalizar, a concentração de DNA de todas as amostras foi normalizada para 0,1 ng/ $\mu$ l.

### **Eficiência dos primers**

Para avaliar a eficiência dos *primers* foi feita uma curva padrão para cada gene estudado em qPCR. De seguida, foi realizada uma diluição seriada: 1/10, 1/100; 1/1000 e 1/10000 do DNA da colónia Bora Bora, e foram utilizadas três réplicas biológicas.

No Excel, foram construídos gráficos de dispersão, onde foi calculada a equação da reta e o respetivo coeficiente de correlação linear (R). No eixo das ordenadas estão representados os valores das diluições seriadas, e no eixo das abcissas os respetivos valores de Ct. De modo a avaliar a eficiência de cada *primer* foi observado o coeficiente de correlação linear.

### **Especificidade dos primers**

A especificidade de cada *primer* foi avaliada primeiramente com recurso a uma PCR alelo-específica, seguida de um gel de agarose onde se pode observar se o tamanho dos produtos amplificados coincidia com o tamanho esperado relatado na literatura. Através da qPCR com programa Bio-Rad CFX Manager 3.1, no seguimento do passo anterior observámos a curva de dissociação que o programa gera automaticamente. A curva de dissociação ou de *melting* (*melting curve*) é gerada à medida que os marcadores se ligam à dupla cadeia de DNA. Com o aumento da temperatura as duas cadeias separam-se e o marcador liberta-se, diminuindo deste modo a fluorescência, formando assim um único pico, se o *primer* for específico.

### **Técnica de qPCR para a deteção de CNV**

Para identificação do número de cópias dos genes possivelmente associados à resistência aos inseticidas foi utilizada a técnica de qPCR (PCR quantitativo), descrito no protocolo da CNRS-LECA ZikAlliance.

Foram avaliados nove genes alvos previamente descritos como associados à resistência (9)(24)(62). Dois genes de referência foram usados como controlo endógeno, o CYP4D39 e Cl prot channel (Gene ID: 5569664 e 5567294, respetivamente). Os mosquitos utilizados nesta etapa foram previamente fenotipados como resistentes e suscetíveis em bioensaios OMS para a deltametrina, ciflutrina e *temephos*.

Dos genes previamente associados a mecanismos de resistência metabólica, oito codificam proteínas Citocromo P450 (CYP4D39, CYP6BB2, CYP6CC1, CYP6P12, CYP9J10, CYP9J28, CYP9J23 e CYP9J32), os restantes codificam: uma proteína do canal de cloreto (Cl prot channel), uma esterase (CCEae3A) e uma Glutathione S-transferase (GSTE2). Os *primers* utilizados para cada gene estão descritos na Tabela 3.

Para cada reação foram adicionados os seguintes componentes: 7,5 µl de SYBRGreen 1X; 0,45 µl de cada *primers* específicos para cada gene; 3µl de DNA e água para perfazer um volume final de 15 µL. Foram utilizadas placas de 96 poços (96 PCR Plate non-skirted low profile - VWR: We Enable Science) e as reações foram feitas no termociclador da BIO-RAD (CFX Connect™ Real-Time System). O programa de qPCR usado foi o seguinte: 3 min a 95 °C; 40 ciclos (15 seg a 95 °C e 30 seg a 60 °C); 15 seg a 95 °C; 30 seg a 60 °C; entre os 60 °C e os 95°C a temperatura aumenta 0,6°C a cada 10 seg; por fim 15 seg a 95°C.

A análise do número de cópias dos genes de interesse, em mosquitos do Funchal e das colónias de referência Rockefeller e RecR, em comparação à colónia Bora Bora foi feita no programa CFX Maestro™ v. 4.0.2325.0418 (Bio-Rad).

A análise dos resultados foi feita por quantificação relativa com o método comparativo de  $\Delta\Delta C_t$  (64), detalhado na introdução.

Tabela 3: Genes utilizados no qPCR para pesquisa de CNV. \*(genes endógenos utilizados como referência)

Gene	NCBI, Gene ID:	Seqüência dos <i>primers</i>		Tam. (bp)	Temp (°C)	Tamanho do produto
* CYP4D39	5569664	FW:	5'-AGTCCTGGAAGTTCTGCACG-3'	20	60	132
		Rev:	5'-AAGGCGACTTTCGACGAAT-3'	20	60	
* Cl prot channel	5567294	FW:	5'-TCCGGTTCCGTCTGGTATCT-3'	20	60	186
		Rev:	5'-GTGTGTGTAACGGCTCCAGA-3'	20	60	
CCEae3A	5566024	FW:	5'-TCTAAGAAACCCGAATATGACG-3'	22	54	130
		Rev:	5'-TTGAGGAGGCACGAACAG-3'	18	54	
CYP6BB2	5565578	FW:	5'-AGTTCAAGGGCCGAGGATTG-3'	20	60	143
		Rev:	5'-CGGATCCACGAAAATTCCGC-3'	20	60	
CYP6CC1	5565579	FW:	5'-CGAACGTTGCGTTCTTGGTT-3'	20	60	185
		Rev:	5'-CCGGGCCTTCAAATCTCTGT-3'	20	60	
CYP6P12	5576391	FW:	5'-TTCACCTTCAGCGAAGACCC-3'	20	60	152
		Rev:	5'-GATTAGGTGCGGCGTCCTTA-3'	20	60	
CYP9J10	5564750	FW:	5'-GGAAGCGTTGAGCATGTGTG-3'	20	60	121
		Rev:	5'-AACTGTGAAACCGTGGGGTC-3'	20	60	
CYP9J28	5564751	FW:	5'-CTATTCGGAGTCCTAGTGGCC-3'	22	60	197
		Rev:	5'-CTTTGACTCCTCGGTACTTGTCG-3'	23	60	

<b>CYP9J23</b>	5564764	FW:	5'-AGAATCCACGAAGCGATGAG-3'	20	55	122
		Rev:	5'-CTATCCAGGGCGGCAATG-3'	18	55	
<b>AAEL007951</b>	110676855	FW:	5'-CCACTTTGGCACCAATACAGA-3'	21	55,3	100
<b>Ou GSTE2</b>		Rev:	5'-TTGCCGTAAGTGAAACT-3'	20	57	
<b>CYP9J32</b>	5571141	FW:	5'-TGGCATAACGAACTTGCTCTG-3'	20	51	100
		Rev:	5'-TCATAGGTCGCAGGTTTT CC-3'	20	52	

### **Análise estatística dos CNVs**

Os resultados da análise da qPCR para determinação do CNV entre as amostras do Funchal, RecR e Rockefeller foram avaliados no programa CFX Maestro v. 4.0.2325.0418 (Bio-Rad).

O programa foi configurado para determinar os valores de Ct usando o modo *single threshold* e a opção *baseline subtracted curve* foi escolhida para ajustar os sinais de fluorescência entre as amostras. O programa aplica o teste *t-student* para comparar os níveis de expressão génica e o valor limite de 0,5% (*p*-valor) como probabilidade foi estabelecido para rejeitar a hipótese nula. Valores de amplificação génica iguais ou acima de 2x em relação à colónia de referência Bora Bora foram considerados significativos para a presença de alteração do número de cópias dos genes em estudo.

Para avaliar a associação da alteração do número de cópias dos genes de interesse e a suscetibilidade aos inseticidas foi utilizado o teste exato de *Fisher*. O valor de *p*- pode ser observado na Tabela S6 (em material suplementar). A análise foi feita individualmente para cada gene e com os resultados que implicavam diretamente com esse gene de acordo com a classe de inseticida a que está associado.

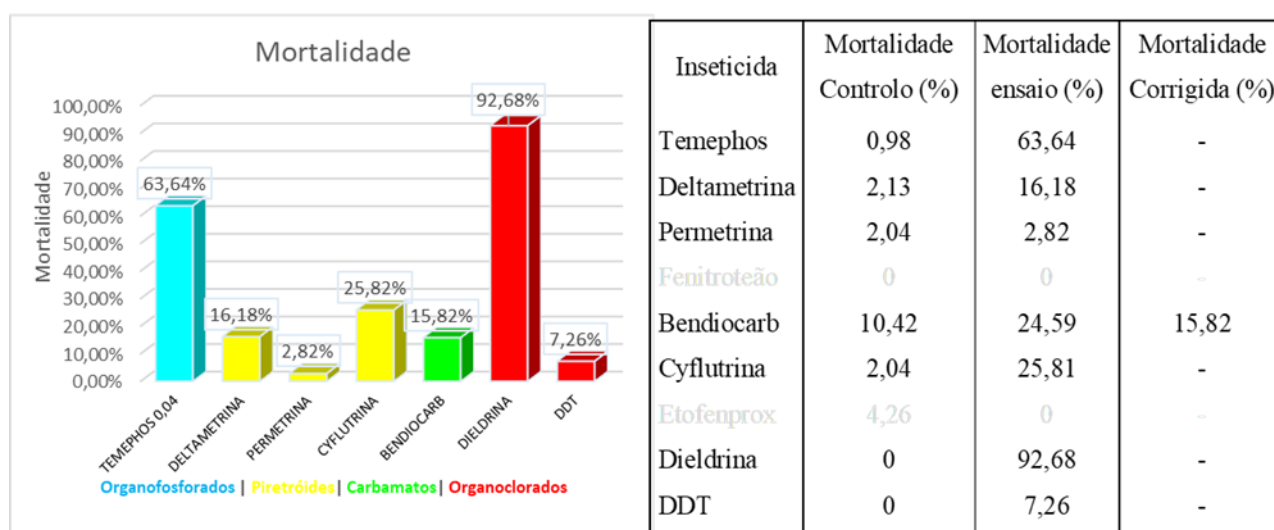


# 4- Resultados

## 4 RESULTADOS

### 4.1 BIOENSAIOS

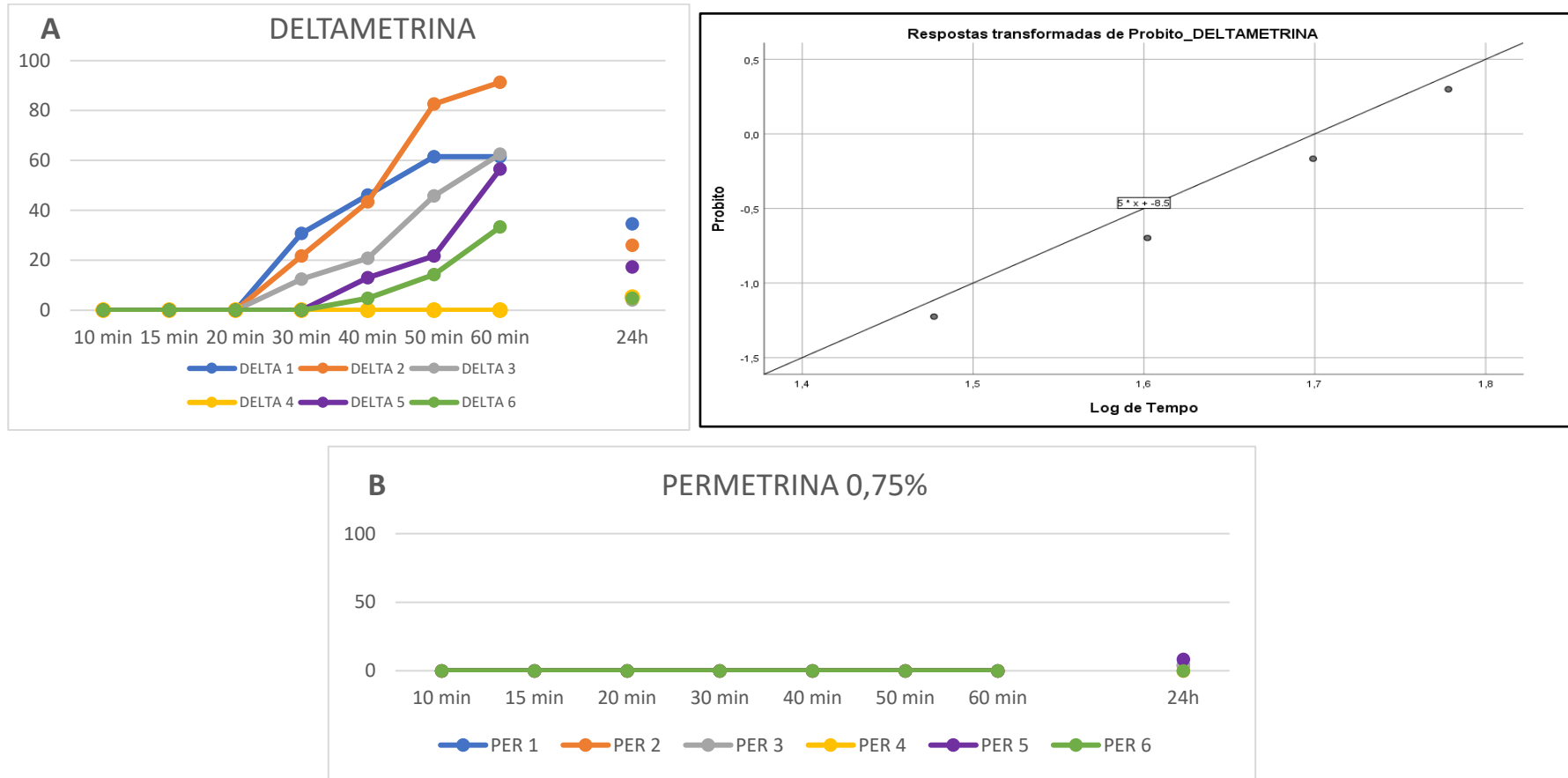
Os testes feitos com o fenitrotião e *etofenprox* não apresentaram mortalidade no grupo da colónia referência de suscetibilidade Rockefeller e, portanto, ambos foram descartados da análise. Os outros inseticidas induziram 100% de mortalidade em indivíduos da colónia Rockefeller, indicando a boa qualidade dos papéis impregnados e a consequente validade do teste. Os resultados dos bioensaios revelaram que a população em estudo é resistente a todos os inseticidas testados. A figura 15 ilustra os resultados dos testes. A permetrina foi o inseticida que apresentou a menor taxa de mortalidade (2,82%), enquanto a dieldrina que foi a que apresentou maior taxa (92,68%). A resistência à dieldrina foi confirmada após a realização de testes laboratoriais, como a genótipagem de mutações *kdr*.



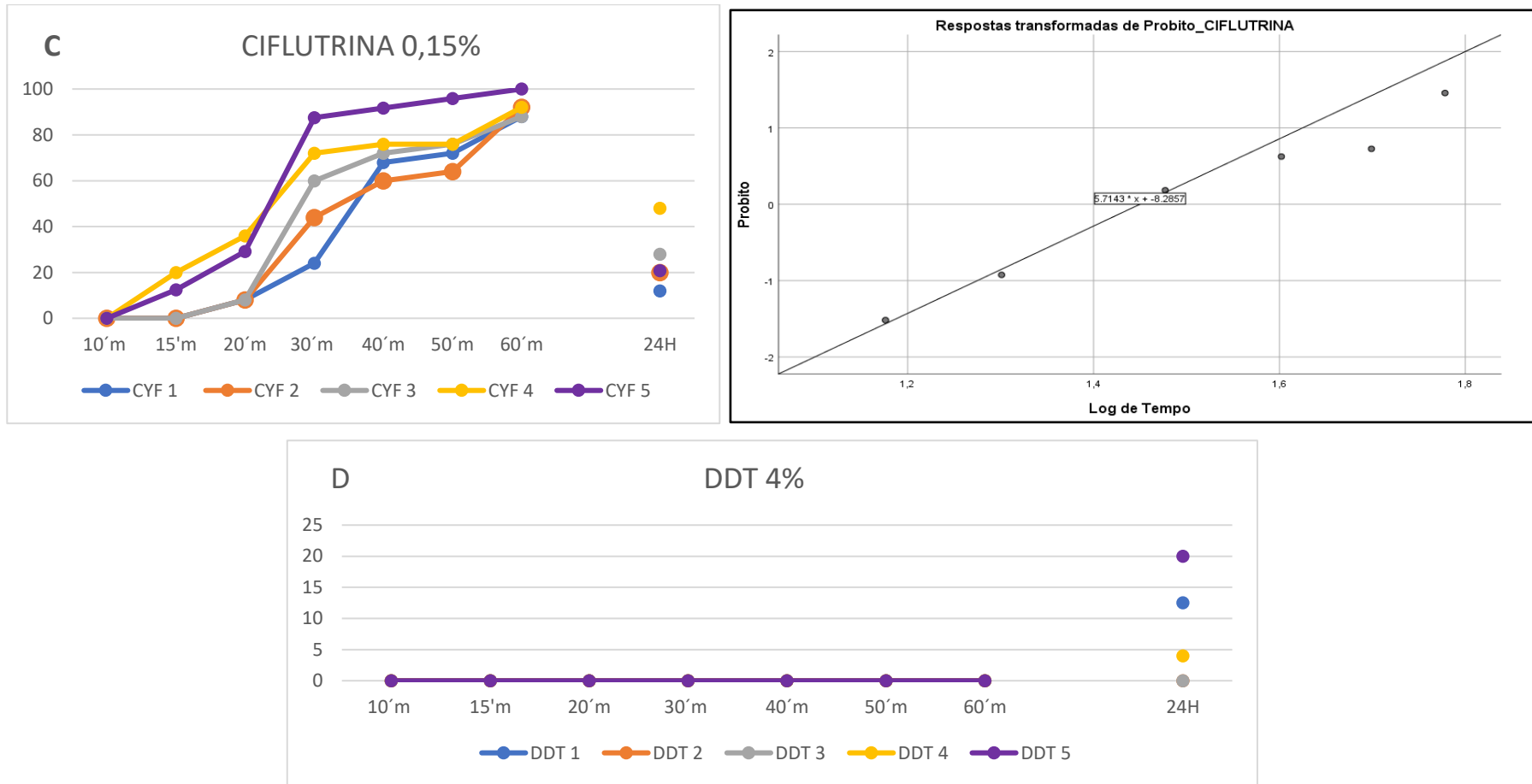
**Figura 15:** Gráfico das mortalidades dos bioensaios realizados na Ilha da Madeira e respetiva Tabela de Mortalidade

Com os valores de mortalidade obtidos durante a realização de cada bioensaio, foi realizado um gráfico com a percentagem de mortalidade no eixo das ordenadas e com os respetivos tempos de observação no eixo das abcissas, como se pode observar na Figura

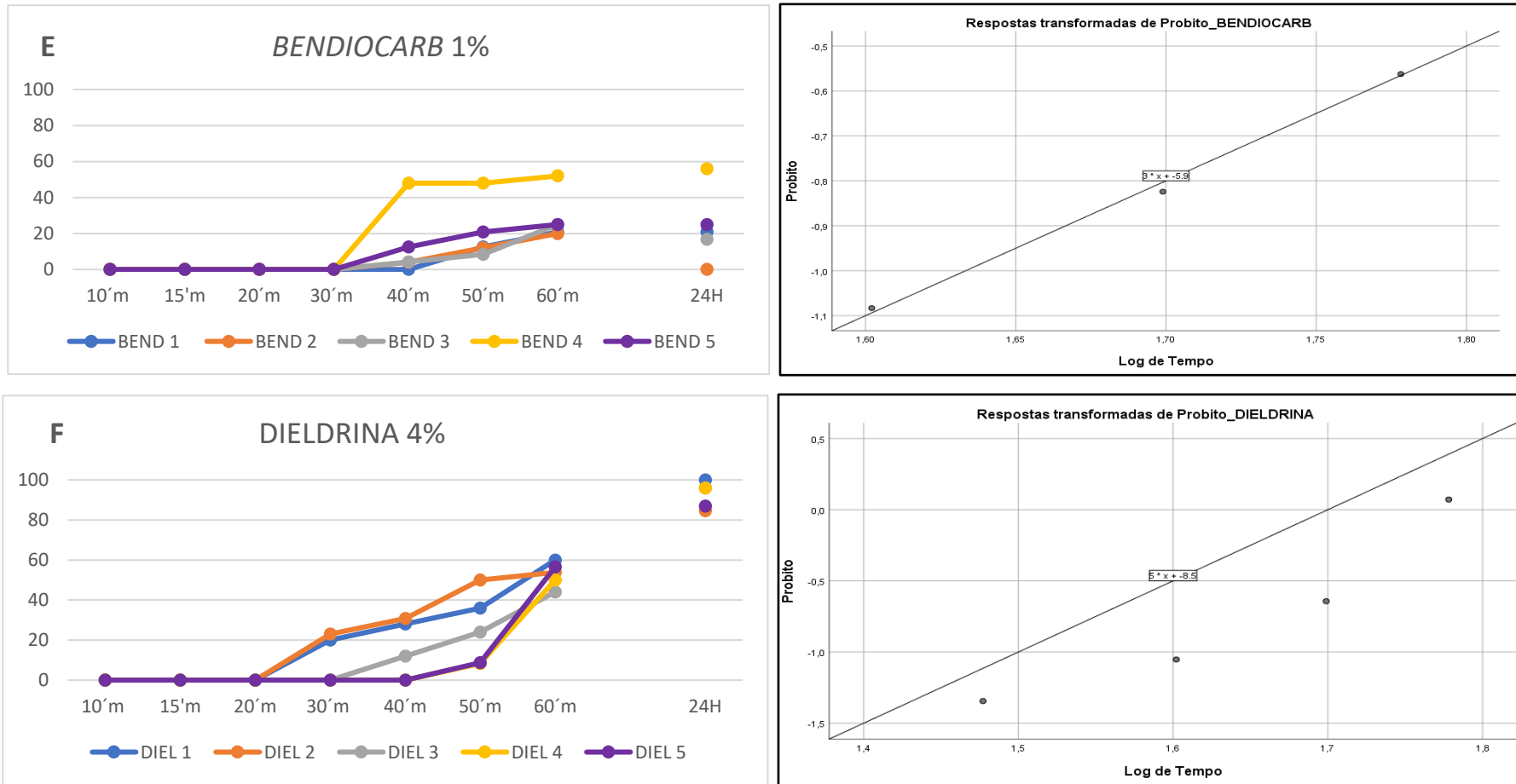
16. Na mesma imagem, podemos observar as respectivas análises *Probit*, que foram passíveis de realizar. Quando o teste estatístico permite fazer uma regressão *Probit* entre os valores de *knockdown* e o tempo, (na Tabela S2 estão descritos mais detalhes da análise, em material suplementar), o  $LT_{50}$  e  $LT_{99}$  estão muito acima do tempo diagnóstico, e os 100% de mortalidade nunca são atingidos, podendo assim concluir que o inseticida não é eficaz.



**Figura 16 A e B:** Gráficos dos mosquitos *knockdown* ao longo do tempo de exposição ao inseticida nos bioensaios e quando possível o respetivo *Probit*. **A:** Deltametrina; **B:** Permetrina;

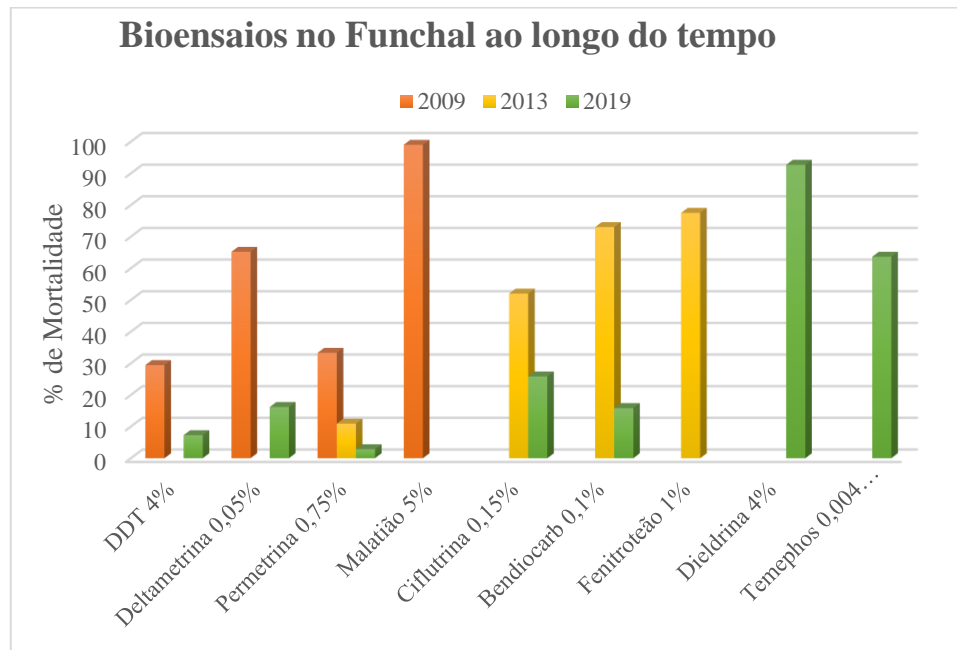


**Figura 16 C e D:** Gráficos dos mosquitos *knockdown* ao longo do tempo de exposição ao inseticida nos bioensaios e quando possível o respetivo *Probit*. **C:** Ciflutrina; **D:** DDT;



**Figura 16 E e F:** Gráficos dos mosquitos *knockdown* ao longo do tempo de exposição ao inseticida nos bioensaios e quando possível o respectivo *Probit*. **E:** *bendiocarb*; **F:** *Dieldrina*.

Com a compilação dos resultados dos bioensaios na população de *Aedes aegypti* do Funchal, (76)(24), pudemos realizar o gráfico da Figura 17, onde podemos acompanhar as taxas de mortalidade aos diferentes inseticidas ao longo dos anos. Comparando os dados de 2009 com os de 2019 a mortalidade diminuiu significativamente (GraphPad V.8.3.0 - teste exato de *Fisher* ( $p < 0,0001$ ), assim como, comparando os resultados de 2013 com os de 2019 (teste exato de *Fisher*,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 17:** Comparação dos bioensaios realizados no Funchal nos anos 2009, 2013 e 2019.

## 4.2 MUTAÇÕES *KDR*

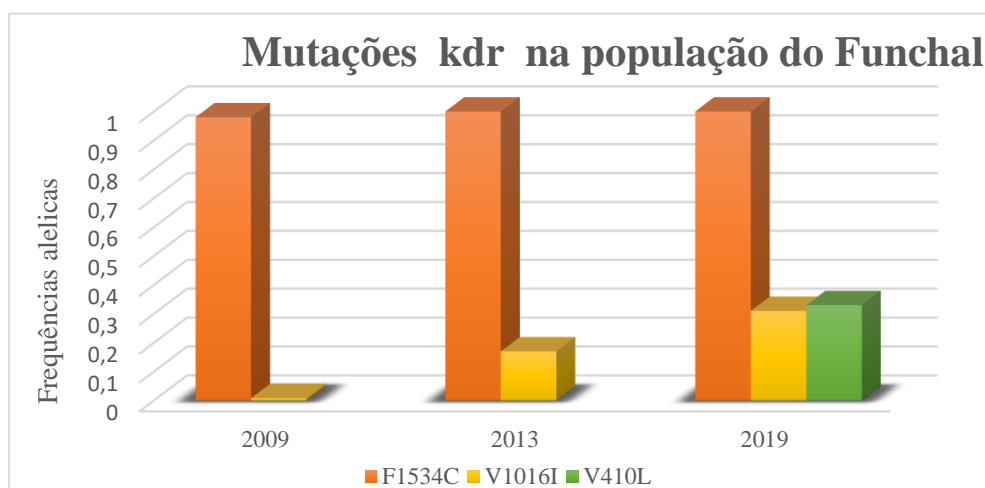
### 4.2.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

As frequências alélicas encontradas para a população de *Aedes aegypti* do Funchal foram de 100% relativamente à mutação F1534C, 31% para a mutação V1016I e a mutação V410L foi encontrada numa frequência de 33%. Na Tabela 4 pode ser observado o genótipo de cada indivíduo relativamente às três mutações (Tabela S4, em material suplementar pode ser observado o genótipo de cada indivíduo para as três mutações).

**Tabela 4:** Número de mosquitos: homozigóticos para o alelo selvagem (SS); homozigótico para a mutação *kdr* (RR); heterozigóticos (RS) e respectivas frequências genotípicas entre parêntesis.

	RR	SS	RS
<b>F1534C</b>	60 (1)	0 (0)	0 (0)
<b>V1016I</b>	4 (0,10)	27 (0,48)	29 (0,43)
<b>V410L</b>	4 (0,11)	25 (0,46)	31 (0,44)

Tal como nos bioensaios, foi possível reunir os resultados da identificação de mutações *kdr* ao longo dos anos. Apresentamos no gráfico seguinte a frequência alélica das mutações da população de *Aedes aegypti* do Funchal entre 2009 e 2019 (Figura 18). Podemos observar um aumento significativo na frequência da mutação V1016I entre os anos de 2009 e 2013 (teste exato de Fisher's,  $p < 0,019$ ), assim como, para os anos de 2013 e 2019 (teste exato de Fisher's,  $p < 0,006$ )



**Figura 18:** Gráfico das frequências alélicas das mutações ao longo do tempo no Funchal.

Quando analisámos o genótipo dos diferentes indivíduos para as três mutações, reparámos que 58 dos 60 indivíduos tinham o mesmo genótipo para a mutação V1016I e V410L. Assim, realizámos o teste de *linkage disequilibrium* e foi encontrada uma



associação entre as mutações V1016I e V410L (*Markov*,  $p < 0,0001$ ). Não foi possível fazer a associação entre as restantes mutações (F1534C-V1016I e F1534C-V410L) porque a mutação F1534C encontra-se fixa na população.

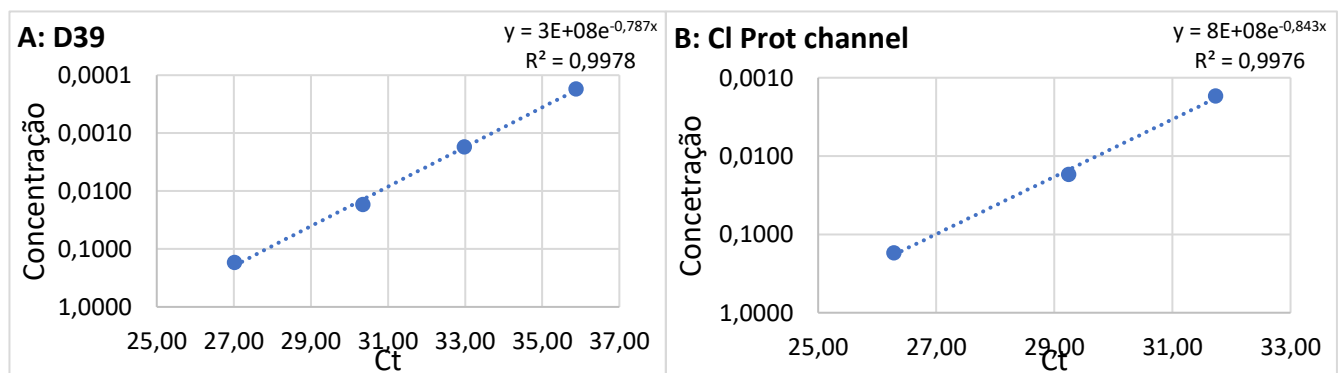
### 4.3 CNV

#### 4.3.1 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Todas as amostras processadas produziram DNA de qualidade. As amostras processadas e quantificadas no Qubit (Qubit™ 4 Fluorometer da ThermoFisher Scientific) produziram concentração de DNA que variou entre 0,70 a 226 ng/μl. As amostras foram normalizadas para a concentração de 0,1 ng/μl. A quantidade de DNA por amostra pode ser observado na Tabela S5 (em material suplementar).

#### 4.3.2 EFICIÊNCIA DOS PRIMERS

A eficiência dos *primers* para a qPCR foi avaliada através de curva padrão, com três replicas biológicas para cada amostra. Os valores do coeficiente de correlação linear (R) variaram de 0,97 a 0,99, mostrando que não existe competição entre os reagentes em nenhuma das reações, como se pode observar na Figura 19. A eficiência dos *primers* para cada gene também foi observada no programa CFX Bio-Rad, onde variou de 80% a 100%.



**Figura 19 A e B:** Curva padrão para cada gene, com a respetiva equação da reta e coeficiente de correlação

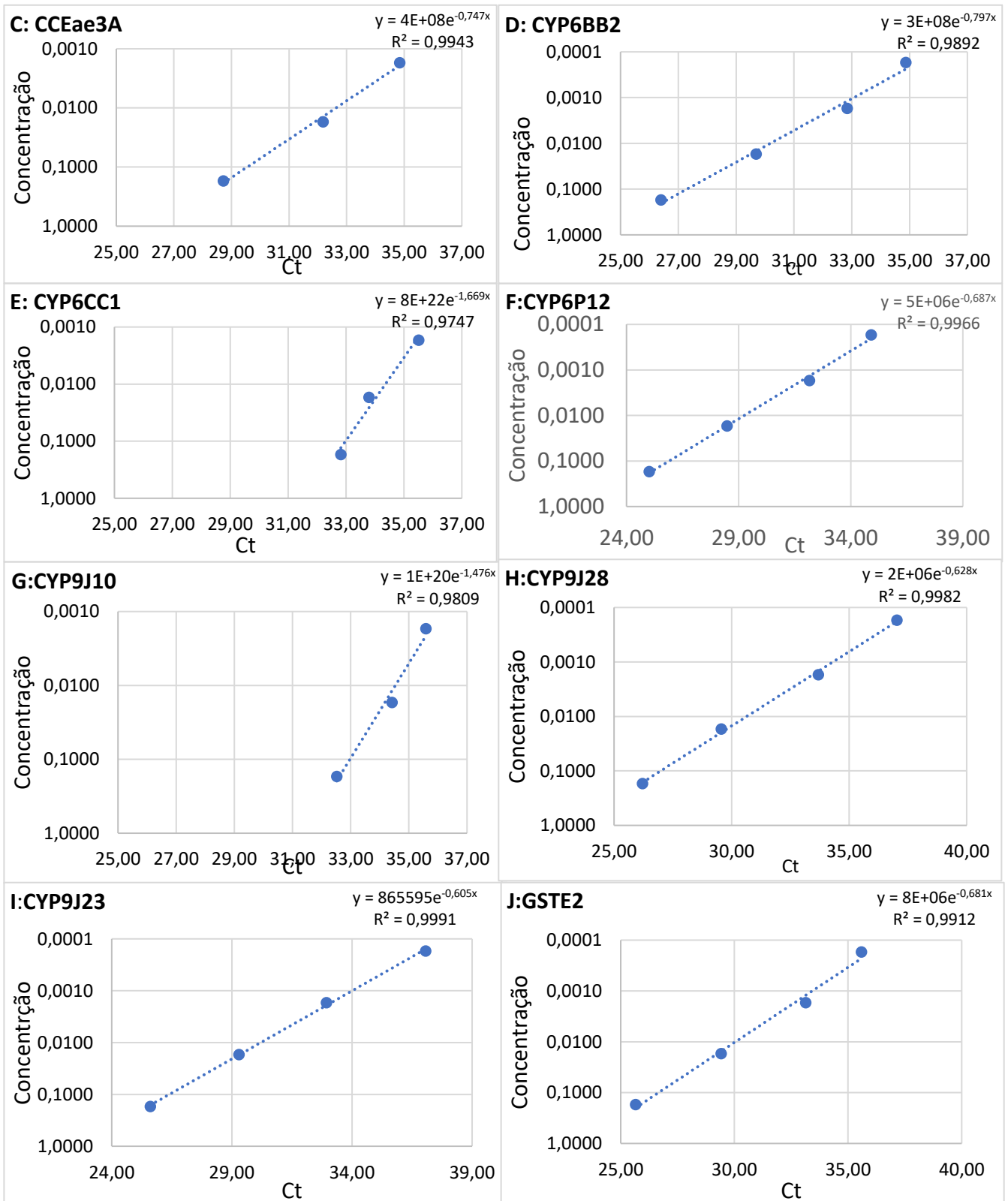
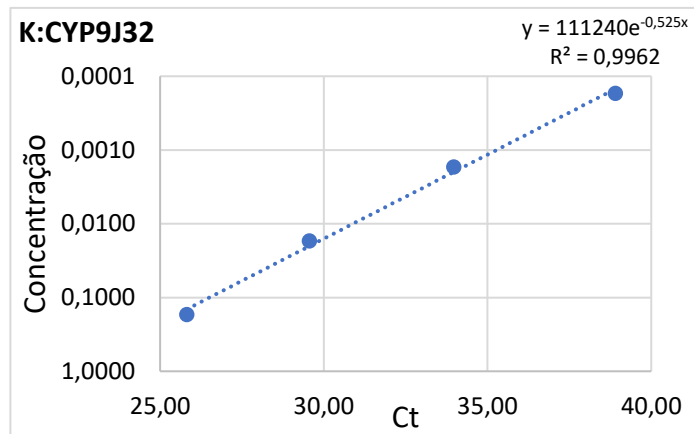


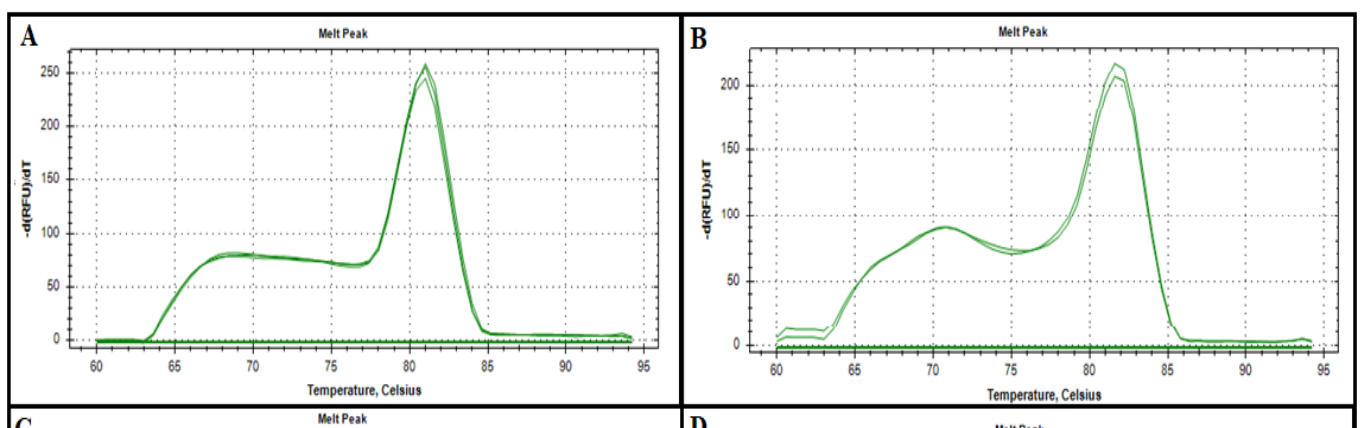
Figura 19 C a J: Curva padrão para cada gene, com a respectiva equação da reta e coeficiente de correlação



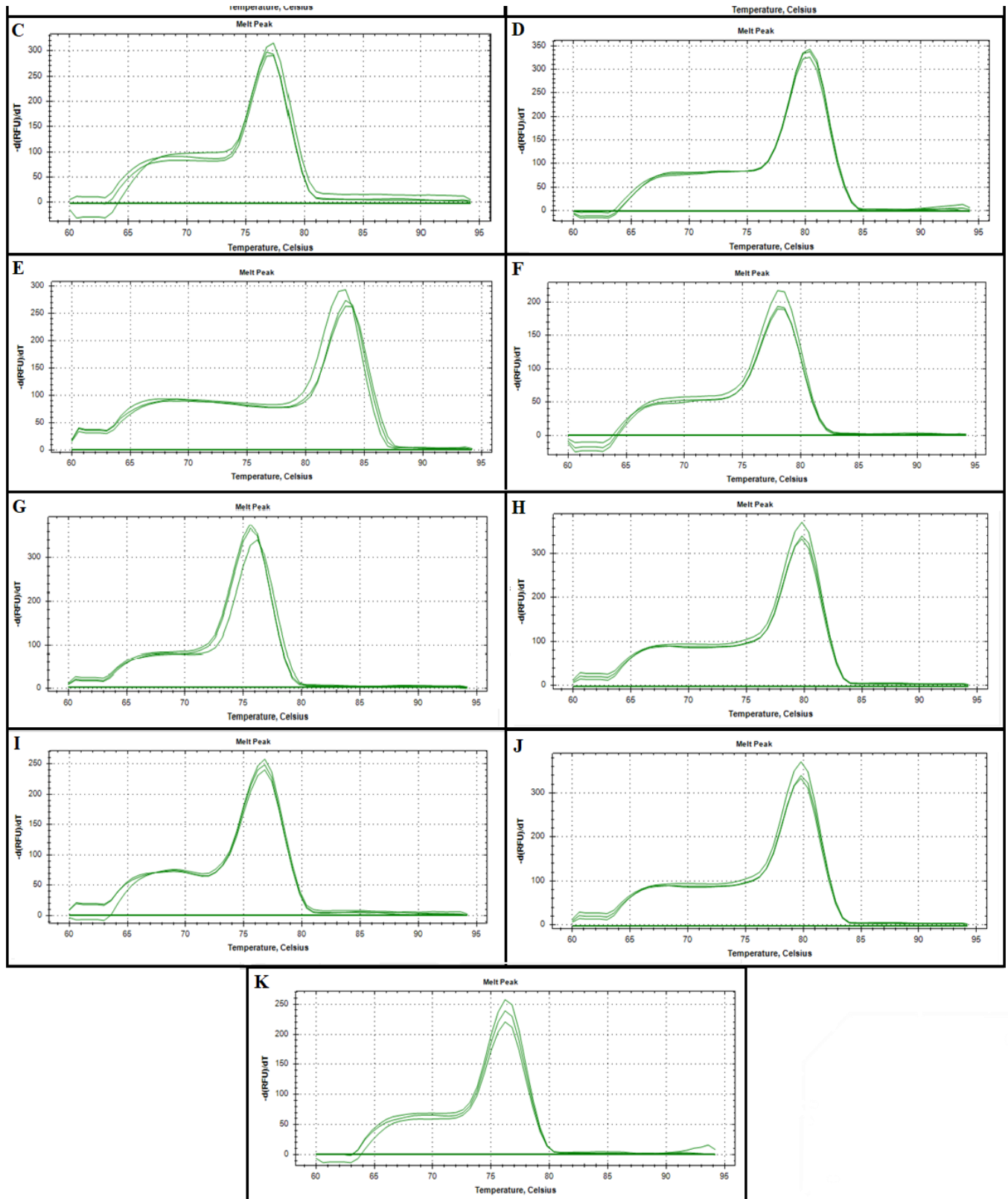
**Figura 19 K:** Curva padrão para cada gene, com a respectiva equação da reta e coeficiente de correlação

### 4.3.3 ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS

A especificidade dos *primers* foi observada com recurso a uma PCR alelo-específico, onde foram observados os produtos amplificados em gel de agarose e obtivemos apenas uma banda específica no gel para cada par de *primers*. Posteriormente, observamos a especificidade dos *primers* através do *software* CFX da Bio-Rad utilizado para analisar os resultados da qPCR. Pela curva de dissociação gerada verificámos a existência de um único pico para cada par de *primers* (Figura 20), o que confirma a sua especificidade.



**Figura 20 A e B:** Curva de dissociação gerada pelo programa CFX da Bio-rad, para todos os genes: **A:** CYP4D39, **B:** Cl *prot channel*;

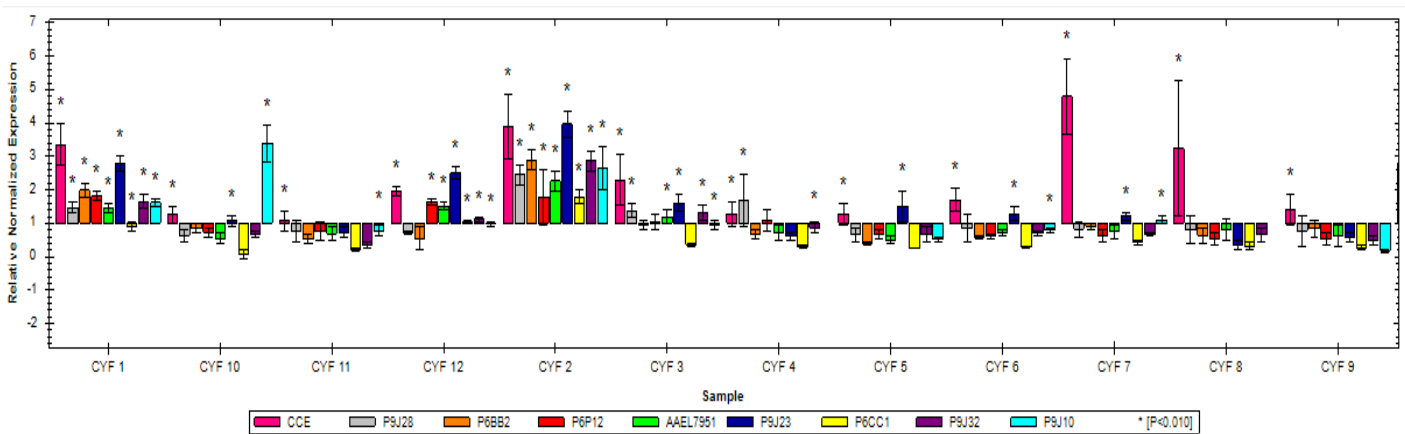


**Figura 20 C a K:** Curva de dissociação gerada pelo programa CFX da Bio-rad, para todos os genes: **C:** CCEae3A; **D:** CYP6BB2; **E:** CYP6CC1; **F:** CYP6P12; **G:** CYP9J10; **H:** CYP9J28; **I:** CYP9J23; **J:** GSTE2; **K:** CYP9J32;

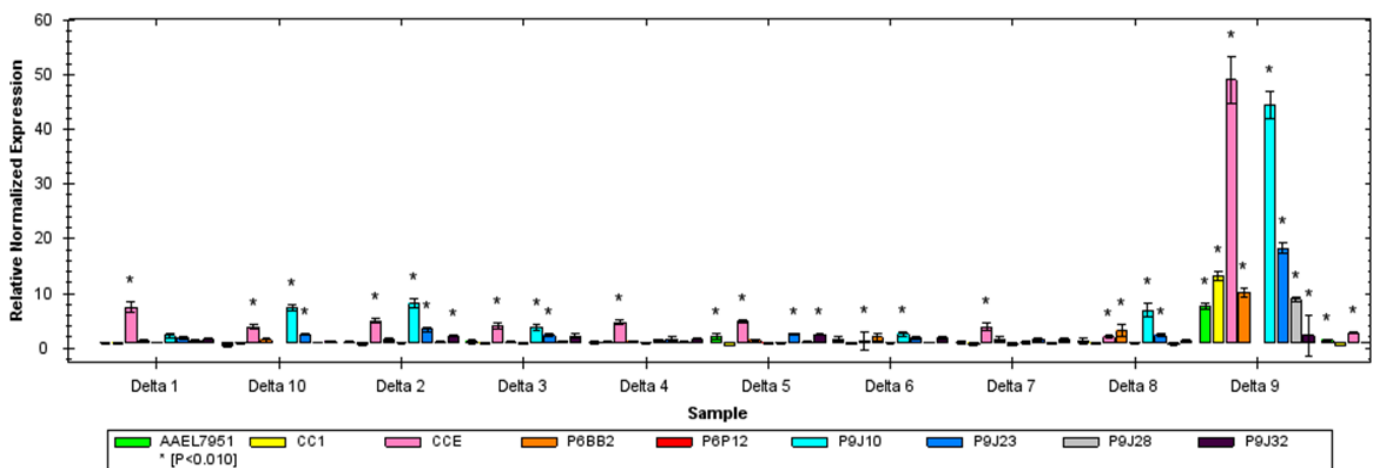
### 4.3.4 AMPLIFICAÇÃO GÊNICA

#### População *Aedes aegypti* do Funchal.

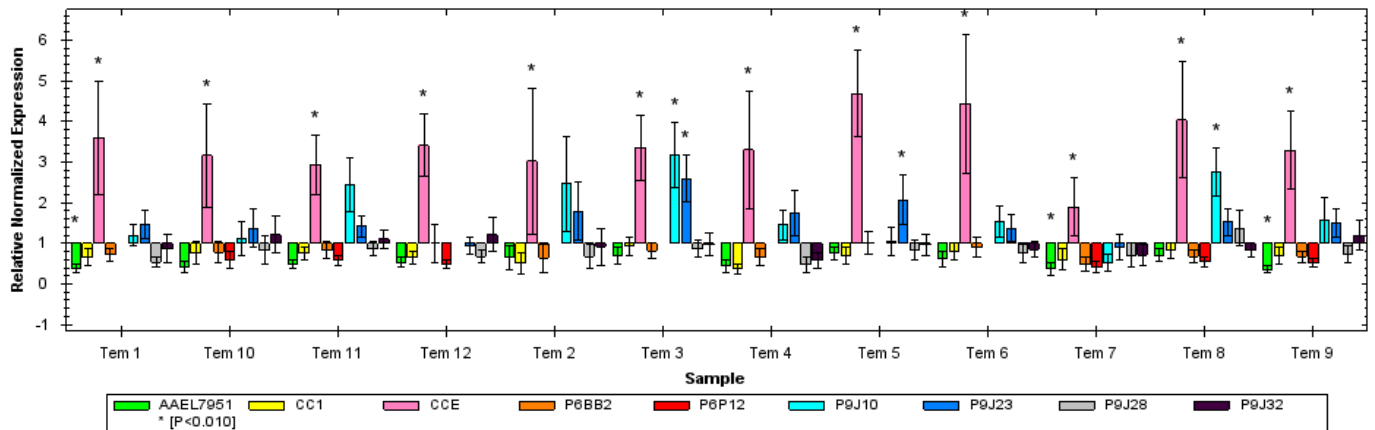
O programa permite fazer vários tipos de análise, e é possível agrupar as amostras por genes ou por *pools* originando gráficos diferentes, de acordo com o que se pretende (Figura 21, 22 e 23). Como referido anteriormente, o programa aplica o teste *t-student* para comparar os níveis de expressão génica e o valor limite de 0,5% (p-valor) como probabilidade foi estabelecido para rejeitar a hipótese nula.



**Figura 21:** Padrão de CNVs dos genes-alvo dos 10 *pools* analisados relação à colónia Bora Bora de *Aedes aegypti* do Funchal, expostos a ciflutrina (CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e CCE ao gene CCEae3A) \*(*t-student*,  $p < 0,010$ )



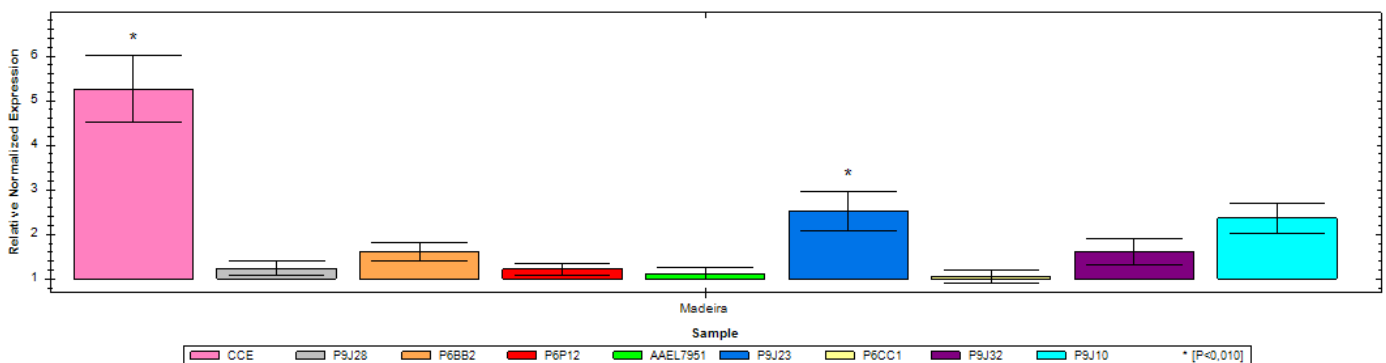
**Figura 22:** Padrão de CNVs do genes-alvo dos 10 *pools* analisados relação à colónia Bora Bora de *Aedes aegypti* do Funchal, expostos a deltametrina (CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e CCE ao gene CCEae3A) \*(*t-student*,  $p < 0,010$ )



**Figura 23:** Padrão de CNVs dos genes-alvo dos 10 pools analisados relação à colônia Bora Bora de *Aedes aegypti* do Funchal, expostos a *temephos* (CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e CCE ao gene CCEae3A) \*(*t-student*,  $p < 0,010$ )

Analisando a população de *Aedes aegypti* do Funchal por pool (Figura 21-23) vemos uma enorme diversidade entre as amostras, por outro lado analisando como um grupo biológico independentemente do fenótipo ou da exposição a inseticidas, não temos a noção da variabilidade entre as mesmas.

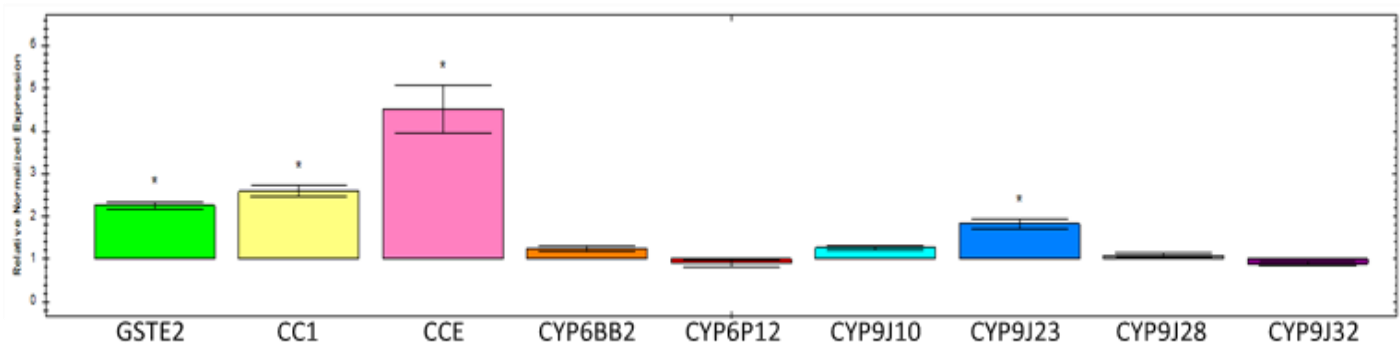
Verificámos que a análise utilizando os pools, não era intuitiva e agregámos todos os dados do Funchal para uma interpretação global. Assim, verificámos um aumento do número de cópias apenas para os genes CCEae3A e CYP9J23 \*(*t-student*,  $p < 0,010$ ), em relação à colônia de referência Bora Bora.



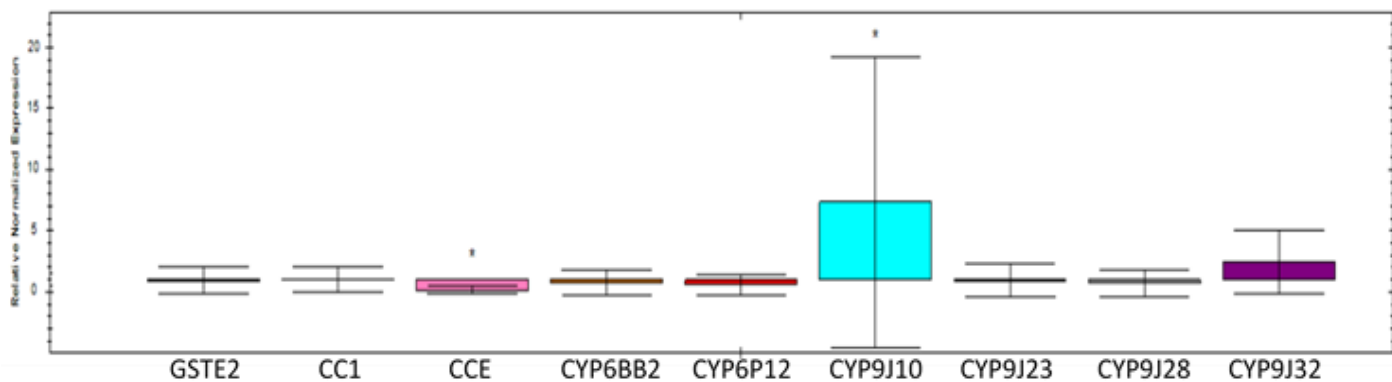
**Figura 24:** Padrão de CNVs dos genes-alvo de *Aedes aegypti* do Funchal em relação à colônia de referência Bora Bora. (CC1 corresponde ao gene CYP6CC1, CCE ao gene CCEae3A e AAEL7951 corresponde ao gene GSTE2) \*(*t-student*,  $p < 0,010$ ).

### Colónias de referência

A análise feita para a população do Funchal foi efetuada para as colónias de referência. Relativamente à colónia resistente ao *temephos*, RecR, (Figura 25) esta apresentou um elevado número de cópias em comparação com a colónia Bora Bora para os genes GSTE2, CYP6CC1, CCEae3A e CYP9J23, (*t-student*,  $p < 0,010$ ). Por outro lado, a colónia de referência de suscetibilidade Rockefeller (Figura 26) apresentou um elevado número de cópias nos genes CCEae3A e CYP9J10, (*t-student*,  $p < 0,010$ ).



**Figura 25:** Padrão de CNVs dos genes-alvo da colónia RecR em relação à colónia Bora Bora. (onde CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e CCE ao gene CCEae3A) (*t-student*,  $p < 0,010$ )



**Figura 26:** Padrão de CNVs dos genes-alvo da colónia Rockefeller em relação à colónia Bora Bora. (onde CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e CCE ao gene CCEae3A) (*t-student*,  $p < 0,010$ )

De modo a facilitar a interpretação dos resultados obtidos, resumámos os resultados desta secção numa Tabela (Tabela 5), onde podemos observar todas as

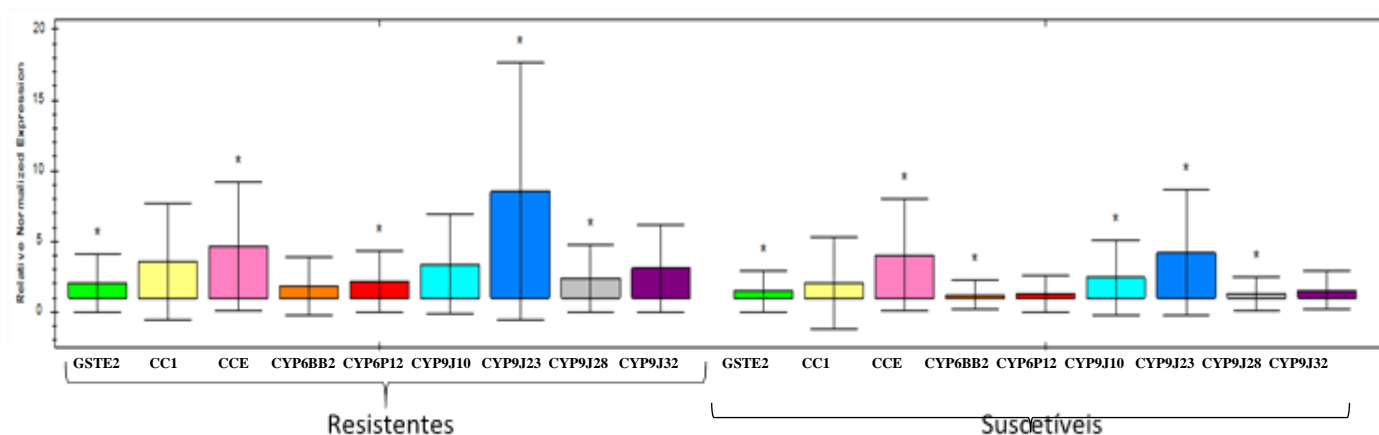
populações/colónias de *Aedes aegypti* estudadas, assim como os genes de interesse que apresentaram variação no número de cópias.

**Tabela 5:** Genes que apresentaram alteração no número de cópias, comparativamente com a colónia de referência Bora Bora \*(*t-student*,  $p < 0,010$ ).

	GSTE2	CYP6CC1	CCEae3A	CYP6BB2	CYP6P12	CYP9J10	CYP9J23	CYP9J28	CYP9J32
RecR	✓	✓	✓				✓		
Rock			✓			✓			
Funchal			✓				✓		

No entanto, tentando explorar os nossos dados fomos observar quais as diferenças dos indivíduos suscetíveis e resistentes da população do Funchal para os inseticidas ciflutrina, deltametrina e *temephos*, no que diz respeito à variação do número de cópias dos genes de interesse.

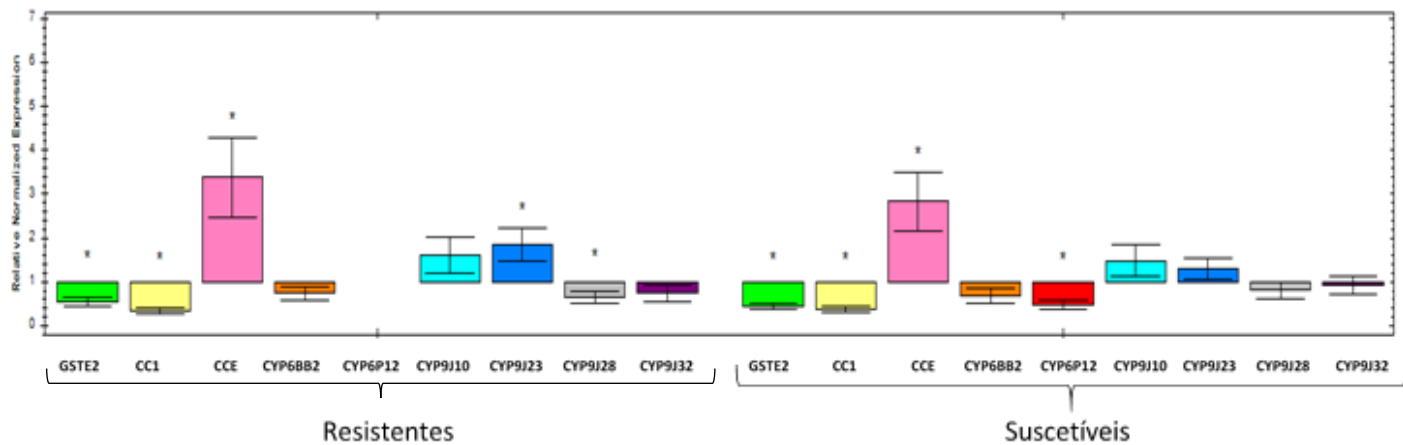
Os indivíduos expostos a ciflutrina, independentemente do fenótipo, (Figura 27) apresentaram alteração do número de cópias nos genes GSTE2, CCEae3A, CYP9J23 e CYP9J28 (*t-student*,  $p < 0,010$ ). Apenas os indivíduos resistentes apresentam alteração no gene CYP6P12 e os suscetíveis nos genes CYP6BB2 e CYP9J10 (*t-student*,  $p < 0,010$ ).



**Figura 27:** Padrão de CNVs dos genes-alvo de *Aedes aegypti* do Funchal, expostos à ciflutrina em relação à colónia Bora Bora. (CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e CCE ao gene CCEae3A) \*(*t-student*,  $p < 0,010$ ).

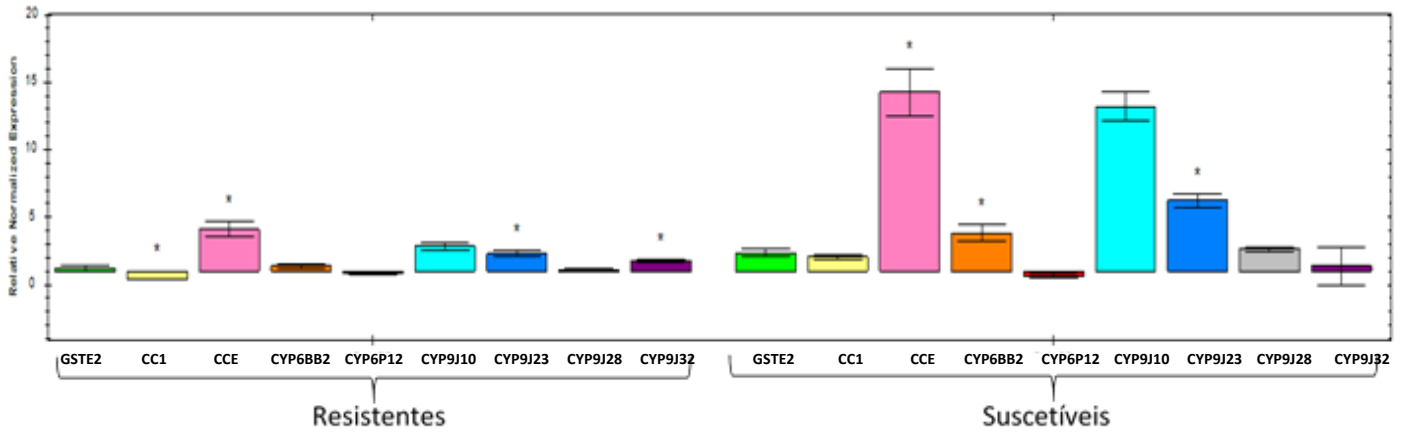


Foram observados dois genes com um número elevado de cópias para os mosquitos expostos à deltametrina, independentemente do fenótipo, sendo eles GSTE2, CYP6CC1 e CCEae3A (*t-student*,  $p < 0,010$ ). Apenas os indivíduos resistentes apresentaram aumento do número de cópias para os genes CYP9J23 e CYP9J28 e os suscetíveis para o gene CYP6P12 (*t-student*,  $p < 0,010$ ), (Figura 28).



**Figura 28:** Padrão de CNVs de genes-alvo de *Aedes aegypti* do Funchal, expostos à deltametrina em relação à colónia Bora Bora. (CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e CCE ao gene CCEae3A) \*(*t-student*,  $p < 0,010$ ).

Os indivíduos expostos a *temephos* (Figura 29) apresentam dois genes com um número elevado de cópias, independentemente do fenótipo, CCEae3A e CYP9J23 ( $p < 0,010$ ). Os indivíduos suscetíveis apresentam um aumento do número de cópias para o gene CYP6BB2 e os indivíduos resistentes para os genes CYP6CC1 e CYP9J32 (*t-student*,  $p < 0,010$ ).



**Figura 29:** Padrão de CNVs de genes-alvo de *Aedes aegypti* do Funchal, expostos ao *temephos* em relação à colônia Bora Bora. (CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e CCE ao gene CCEae3A) \*(*t-student*,  $p < 0,010$ )

A associação da variação do número de cópias de genes de interesse e o fenótipo de resistência foi analisada através do teste estatístico *chi*-quadrado (Tabela 6). Para a realização desta análise separámos os resultados de acordo com a resistência às classes de inseticidas a que os genes estão associados. Assim, para os genes CCEae3A, CYP6BB2, CYP9J28, CYP9J23, GSTE2 utilizámos os resultados dos *pools* dos inseticidas das classes organofosfatos e piretroides, para o gene CYP6CC1 utilizámos apenas os resultados do inseticida *temephos* da classe dos organofosfatos e, finalmente, para os genes CYP6P12, CYP9J10 e CYP9J32 utilizámos os resultados obtidos com os inseticidas deltametrina e ciflutrina, classe dos piretróides. Não foi encontrada nenhuma associação entre a variação do número de cópias de genes de interesse e o fenótipo referente à resistência a inseticidas (Tabela 6).

**Tabela 6:** Valores de  $p$  do teste *chi*-quadrado para a associação da variação do número de cópias de genes de interesse e o respectivo fenótipo de resistência aos inseticidas (mais detalhe na tabela S6, em material suplementar).

<b>Genes</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>
<b>CCEae3A</b>	1
<b>CYP6BB2</b>	1
<b>CYP9J28</b>	0,270
<b>CYP9J23</b>	0,327
<b>GSTE2</b>	0,660
<b>CYP6CC1</b>	1
<b>CYP6P12</b>	1
<b>CYP9J10</b>	0,675
<b>CYP9J32</b>	0,204

# **5-Discussão e Conclusão**

## 5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As populações de *Aedes aegypti* são resistentes a vários inseticidas de diferentes classes, tal como referido na introdução. Este fenómeno parece ser particularmente frequente nas populações da América Latina. Tal poderá estar associado aos intensivos programas de controlo aplicados nesta região, durante as décadas de 50 e 60 do século passado, e que restringiu a dispersão geográfica deste vetor, até então continental, a pequenos focos localizados (85). Face ao sucesso do programa, durante a década de 70, na maioria dos países, ocorreu o abandono ou desintensificação das estratégias de controlo desta espécie. Como resultado, três décadas após a cessação dos programas de controlo, *Aedes aegypti* encontrava-se disperso por toda a América Latina e as populações analisadas apresentavam elevados níveis de resistência a inseticidas (86). Por outro lado, em África, local de origem da referida espécie, nunca foi implementado nenhum programa de controlo, concertado e transnacional, como ocorreu na América Latina. Em relação a estudos de suscetibilidade aos inseticidas existe menos informação disponível para as populações africanas e os dados publicados apresentam populações com perfis de resistência, genericamente, menos pronunciados quando comparados com as das suas populações congéneres americanas.

A população de *Aedes aegypti* da Madeira apresenta elevada resistência aos inseticidas apesar de ser uma população recente na RAM e das estratégias de controlo adotadas pelas Autoridades de Saúde não se basearem na aplicação sistemática de compostos inseticidas. De um modo genérico, podemos afirmar que o perfil de resistência da população de *Aedes aegypti* da Madeira assemelha-se mais ao perfil de resistência das populações da América Latina do que ao perfil das populações africanas, não obstante a maior proximidade geográfica do território com África. No entanto, este facto é facilmente explicável já que estudos anteriores sugerem que a resistência já existia nos mosquitos que colonizaram a Ilha da Madeira na medida em que, de acordo com estudos genéticos, as mais prováveis origens da população de *Aedes aegypti* da Madeira são o Brasil ou a Venezuela (76).

A população de *Aedes aegypti* do Funchal revelou ser resistente aos seguintes compostos: *temephos*, deltametrina, permetrina, ciflutrina, dieldrina, *bendiocarb* e DDT. Em 2013, foram efetuados testes de suscetibilidade a inseticidas químicos para a

população de *Aedes aegypti* do Funchal. Estes testes indicam resistência a todos os inseticidas testados (permetrina, *bendiocarb*, ciflutrina e fenitrotião) (24). Comparativamente com os resultados do presente estudo, observamos uma diminuição significativa nas taxas de mortalidade entre os anos analisados (2009, 2013 e 2019). Tendo em conta que as Autoridades de Saúde da Madeira apenas utilizam inseticidas químicos em casos de emergência, será interessante averiguar a origem da pressão seletiva que está a levar a um agravamento do padrão de resistências. Uma das hipóteses pode residir na aplicação de inseticidas químicos no contexto doméstico. *Aedes aegypti* é uma espécie incomodativa, pelo que as unidades hoteleiras e as unidades habitacionais unifamiliares (vivendas) recorrem a empresas privadas para a desinsetização destas instalações. Por outro lado, os habitantes também devem recorrer aos inseticidas domésticos para eliminar os mosquitos das suas habitações já que estas, tradicionalmente, não têm proteções de redes nas janelas e portas ou ar condicionado. Sendo a Madeira um dos poucos locais no globo onde o controlo vetorial de *Aedes aegypti* não passa pela aplicação de estratégias químicas é, assim, o local ideal para estimar o contributo do uso doméstico de inseticidas para o desenvolvimento e agravamento dos perfis de resistência nesta espécie.

Quando analisamos as frequências alélicas das mutações *kdr* ao longo do tempo estas estão concordantes com o aumento dos níveis de resistência observados na população do Funchal. Em 2009, foram identificadas as mutações V1016I, com 8% de frequência alélica, e F1534C com 98% na população de *Aedes aegypti* na Madeira (76). Em 2013, as frequências sofreram alterações: 17% para a mutação V1016I e 100% na mutação F1534C (24). Em 2019, com os resultados do nosso trabalho, verificámos um aumento significativo ( $p < 0,006$ ) na frequência da mutação V1016I, entre os anos de 2013 e 2019 e a manutenção da mutação F1534C fixa. Estes dados não são estranhos já que estas mutações conferem uma vantagem evolutiva quando a espécie se encontra sobre a pressão seletiva da aplicação de inseticidas (87)

A mutação V410L, foi descrita pela primeira vez numa colónia brasileira de *Aedes aegypti* (15), e foi recentemente encontrada numa população do México, com uma frequência elevada (14)(88), e numa população da Colômbia, com uma frequência moderada (89).

Identificámos, pela primeira vez, na população de *Aedes aegypti* da Ilha da Madeira a mutação V410L, com uma frequência de 33%. Esta é a primeira referência da presença desta mutação numa população em território Europeu. No entanto, em trabalhos paralelos realizados na UEI de Parasitologia Médica do IHMT, e nos quais também estamos envolvidos, esta mutação foi também pela primeira vez identificada em populações africanas de Angola (13% em Huambo e 71% em Luanda) e também já se encontrava presente na população da Ilha da Madeira, em 2013, mas em menor frequência (18% no Funchal) (artigo submetido (90)).

Foi observado que na população do Funchal esta nova mutação V410L ocorre em associação com a mutação V1016I ( $p < 0,001$ ). A presença e o aumento destas duas mutações em simultâneo, e o facto de aparecerem estatisticamente associadas deverão ser alvo de estudos subsequentes, de modo a perceber qual o mecanismo molecular ou biológico responsável por este resultado.

Atualmente, existem várias metodologias em aplicação ou em desenvolvimento para o estudo dos mecanismos moleculares responsáveis pelo fenómeno da resistência aos inseticidas, nomeadamente, a resistência do tipo metabólica. Uma nova abordagem é tentar perceber até que ponto a amplificação génica pode ser responsável pelos padrões de resistência metabólica que ocorrem em várias populações.

Este é o primeiro trabalho a avaliar a variação no número de cópias de genes envolvidos na resistência metabólica em *Aedes aegypti* da Ilha da Madeira. É também um dos primeiros trabalhos a utilizar uma qPCR para a determinação do número de cópias de determinados genes, selecionados pelo seu papel previamente descrito na resistência metabólica de várias populações. Assim, durante este trabalho, não só se testou e implementou um novo protocolo experimental como podemos comparar o perfil de nove genes entre a população do Funchal e três colónias de referência: Rockefeller, RecR e Bora Bora.

Ao comparar o padrão do número de cópias dos genes selecionados da colónia de referência de resistência, RecR, com a colónia de controlo Bora Bora, observamos diferenças nos genes GSTE2, CYP6CC1, CCEae3A e CYP9J23. No entanto, este resultado era expectável já que uma colónia é resistente, enquanto a outra é uma colónia suscetível. Quando efetuamos a mesma comparação com a colónia Rockefeller

observamos que dois genes (CYP9J10 e CCEae3A) também apresentam um número de cópias superior aos genes da colónia de controlo. Neste caso, a amplificação génica observada não deverá estar associada a mecanismos de resistência metabólica, mas a outros processos celulares em que as enzimas codificadas por estes genes estão envolvidas.

Dos nove genes estudados, apenas dois apresentaram CNV para a população do Funchal (CCEae3A e CYP9J23) comparando com a colónia suscetível Bora Bora. Quatro (CYP9J32, CYP9J28, CYP6BB2 e CCEae3A) dos nove genes apresentados neste trabalho, já tinham sido identificados como sobreexpressos na população de *Aedes aegypti* da Madeira (24). No entanto, apenas um desses quatro genes apresentou variação no número de cópias (CCEae3A). O facto da alteração no número de cópias não ter sido observada em todos os genes que estavam descritos na literatura como sobreexpressos sugere que esta sobreexpressão pode ser originada por outro fator, como por exemplo, mutações no promotor dos genes mencionados.

Não encontramos nenhuma associação entre a variação do número de cópias dos genes de interesse e o fenótipo de suscetibilidade aos inseticidas (Tabela S5, em material suplementar). Como os mecanismos de resistência são múltiplos não se consegue uma correlação linear, visto que, a resposta fenotípica é modelada por vários fatores (e.g. a presença de mutações *kdr*). Esta não associação também pode estar camuflada pela utilização de *pools* em vez de mosquitos individuais.

Tal como para o estudo das mutações *kdr*, estivemos também envolvidos num estudo paralelo para a avaliação dos perfis de amplificação destes mesmos nove genes para a população de Benguela. Para o caso da população angolana, quatro genes (CCEae3A, CYP9J23, GSTE2 e CYP9J10) apresentaram variação no número de cópias quando comparados com os genes da colónia de referência Bora Bora (Figura S2 e S3, em material suplementar). Tal como os nossos trabalhos demonstram, outros trabalhos mostram que os perfis de amplificação génica são altamente conservados dentro de cada região, mas diferem entre continentes (62). Assim, os padrões de amplificação génica de um painel extenso de genes podem ser utilizados como informação complementar para identificar a origem das populações recentemente instaladas em novas regiões e ajudar a implementar medidas que limitem o ocorrência de novas introduções.



Gostaríamos de terminar esta sessão de discussão com algumas sugestões para trabalhos futuros:

1. O protocolo utilizado deverá ser otimizado de modo a permitir que estes tipos de estudos possam ser efetuados em mosquitos individuais e não em *pools*, como referido anteriormente. Embora a informação seja mais abrangente e fácil de extrapolar para a população em geral, na nossa opinião, perde-se informação e podemos estar a camuflar alguns resultados interessantes;

2. A identificação das mutações *kdr* seria uma mais valia ser realizada em mosquitos fenotipados para se poder avaliar as possíveis associações entre o genótipo e o fenótipo.

3. Deve ser uniformizado um protocolo que descreva quais os tipos de mecanismos de resistência que devem ser estudados, com todos os procedimentos detalhados, para que possa ser aplicado em várias partes do mundo, de modo a perceber a situação global do mosquito vetor *Aedes aegypti* e decidir que estratégias de controlo deverão ser aplicadas a cada região.

Voltando a uma das problemáticas iniciais: o controlo do *Aedes aegypti* da ilha da Madeira. A população não só apresenta elevados níveis de resistência como esta resistência é mediada por diversos tipos de mecanismos moleculares e genéticos. Assim, a utilização de inseticidas deverá ser reduzida ao essencial pois, mesmo com a descoberta de novos inseticidas, a possibilidade da população já ter o fenótipo de resistência para estes novos compostos é muito elevada. Assim, é importante investir em novas alternativas para controlar o vetor. No entanto, até que novas estratégias sejam desenvolvidas, a gestão ambiental implementada pelas Autoridades de Saúde da Madeira, como a eliminação de criadouros larvares e a utilização de inseticidas biológicos (BTI) e sal, continua a ser a melhor opção para o controlo do mosquito vetor *Aedes aegypti*, na ilha da Madeira.

# 6 Bibliografia

## Bibliografia

1. Jansen CC, Beebe NW. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect* [Internet]. 2010;12(4):272–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.011>
2. Gouveia de Almeida AP. Os Mosquitos (Diptera, Culicidae) e a Sua Importância Médica em Portugal: Desafios para o Século XXI. *Acta Med Port*. 2011;24(6):961–74.
3. Natal D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico, São Paulo*. 2002;64(2):205–7.
4. Attardo GM, Hansen IA, Raikhel AS. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005;35(7):661–75.
5. Wong J, Stoddard ST, Astete H, Morrison AC, Scott TW. Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4).
6. Azar SR, Weaver SC. Vector Competence: What Has Zika Virus Taught Us? *Viruses*. 2019;11(9):867.
7. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2007;16(4):279–93.
8. Zalucki MP, Furlong MJ. Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. *Curr Opin Insect Sci* [Internet]. 2017;21(17):19–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.006>
9. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dufour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–20.
10. Casida JE, Durkin KA. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu Rev Entomol*. 2013;58(1):99–117.
11. Du Y, Nomura Y, Zhorov BS, Dong K. Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Insects*. 2016;7(4):1–11.

12. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34(7):653–65.
13. Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol* [Internet]. 2014;50(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>
14. Villanueva-Segura OK, Ontiveros-Zapata KA, Lopez-Monroy B, Ponce-Garcia G, Gutierrez-Rodriguez SM, Davila-Barboza JA, et al. Distribution and Frequency of the kdr Mutation V410L in Natural Populations of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) From Eastern and Southern Mexico. *J Med Entomol*. 2019;(X):1–6.
15. Haddi K, Tomé HVV, Du Y, Valbon WR, Nomura Y, Martins GF, et al. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: A potential challenge for mosquito control. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(October 2016):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep46549>
16. World Health Organization: Global Malaria Programme, Linss JGB, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, et al. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1347–59. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1)
17. Linss JGB, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JBP, et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–11.
18. Millar NS, Denholm I. Nicotinic acetylcholine receptors: Targets for commercially important insecticides. *Invertebr Neurosci*. 2007;7(1):53–66.
19. Fournier D. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. 2005;158:257–61.

20. Vaughan A, Rocheleau T, Ffrench-Constant R. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exp Parasitol*. 1997;87(3):237–44.
21. Lee SH, Kim YH, Kwon DH, Cha DJ, Kim JH. Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: Implications for pesticide resistance and tolerance. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2015;120:118–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.004>
22. Shotkoski F, Lee H -J, Zhang H -G, Jackson MB, Ffrench-Constant RH. Functional expression of insecticide-resistant GABA receptors from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 1994;3(4):283–7.
23. Karunaratne P, De Silva P, Weeraratne T, Surendran N. Insecticide resistance in mosquitoes: Development, mechanisms and monitoring. *Ceylon J Sci*. 2018;47(4):299.
24. Seixas G, Grigoraki L, Weetman D, Vicente JL, Silva AC, Pinto J, et al. Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–16.
25. Dos Santos Beckel H, Lorini I, Lazzari SMN. Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. *Rev Bras Entomol*. 2006;50(1):110–4.
26. Carrasco D, Lefèvre T, Moiroux N, Penner C, Chandre F, Cohuet A. Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control. *Curr Opin Insect Sci*. 2019;34:48–54.
27. Hemingway J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000;30(11):1009–15.
28. Montella IR, Schama R, Valle D. The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(4):437–49.
29. Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, et al.

- Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008;38(1):113–23.
30. Smith LB, Tyagi R, Kasai S, Scott JG. CYP-mediated permethrin resistance in *Aedes aegypti* and evidence for trans-regulation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(11):1–13.
31. Che-Mendoza A, Penilla RP, Rodriguez DA. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. *African J Biotechnol*. 2009;8(8):1386–97.
32. Ranson H, Rossiter L, Orтели F, Jensen B, Wang X, Roth CW, et al. Dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in Ghana. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2001;20(3):294–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17044880](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17044880)
33. Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol*. 2005;14(1):3–8.
34. Freitas DRJ de, Vaz Junior I da S, Masuda A. Expressão e atividade enzimática de glutathione s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Rev Bras Parasitol Veterinária* [Internet]. 2008 Jun [cited 2019 Aug 22];17(2):99–104. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612008000200007&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612008000200007&lng=pt&tlng=pt)
35. Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz CM. Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. *Nature*, 2018 November. 2017;176(7732):139–48.
36. Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara L aied, et al. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* [Internet]. 2011;41(3):203–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.12.005>

37. Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J*. 2003;373(3):957–63.
38. Djègbè I, Agossa FR, Jones CM, Poupardin R, Cornelie S, Akogbéto M, et al. Molecular characterization of DDT resistance in *Anopheles gambiae* from Benin. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1):1–9.
39. World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *World Heal Organ Commun Dis Control Prev Erad Who Pestic Eval Scheme* [Internet]. 2005;1–41. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1)
40. Aïzoun N, Ossè R, Azondekon R, Alia R, Oussou O, Gnanguenon V, et al. Comparison of the standard WHO susceptibility tests and the CDC bottle bioassay for the determination of insecticide susceptibility in malaria vectors and their correlation with biochemical and molecular biology assays in Benin, West Africa. *Parasites and Vectors*. 2013;6(1):1–10.
41. Brogdon W, Chan A. Guidelines for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay/methods in *Anopheles* research. 2010;1–28. Available from: [https://scholar.google.fr/scholar?q=Guideline+for+Evaluating+Insecticide+Resistance+in+Vectors+Using+the+CDC+Bottle+Bioassay&btnG=&hl=fr&as\\_sdt=0%2C5#0](https://scholar.google.fr/scholar?q=Guideline+for+Evaluating+Insecticide+Resistance+in+Vectors+Using+the+CDC+Bottle+Bioassay&btnG=&hl=fr&as_sdt=0%2C5#0)
42. World Health Organization: Global Malaria Programme. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes: Second edition. *World Heal Organ Tech Rep Ser*. 2013;22.
43. Brogdon WG, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(4):605–13.
44. Pinto J, Palomino M, Mendoza-Uribe L, Sinti C, Liebman KA, Lenhart A. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in three populations of

- Aedes aegypti* from Peru. Parasit Vectors [Internet]. 2019;12(1):494. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3739-6>
45. Leong CS, Vythilingam I, Liew JWK, Wong ML, Wan-Yusoff WS, Lau YL. Enzymatic and molecular characterization of insecticide resistance mechanisms in field populations of *Aedes aegypti* from Selangor, Malaysia. Parasites and Vectors [Internet]. 2019;12(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3472-1>
  46. Saha P, Chatterjee M, Ballav S, Chowdhury A, Basu N, Maji AK. Prevalence of kdr mutations and insecticide susceptibility among natural population of *Aedes aegypti* in West Bengal. PLoS One. 2019;14(4):1–15.
  47. Liebman KA, Billeter SA, Yoshimizu MH, Yang F, Metzger ME, Schildhauer S, et al. Identification of Molecular Determinants of Resistance to Pyrethroid Insecticides in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations in California, USA. J Med Entomol. 2019;56(5):1353–8.
  48. Maestre-Serrano R, Pareja-Loaiza P, Gomez Camargo D, Ponce-García G, Flores AE. Co-occurrence of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel and resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from the Colombian Caribbean region. Pest Manag Sci. 2019;75(6):1681–8.
  49. Bamou R, Sonhafouo-Chiana N, Mavridis K, Tchuinkam T, Wondji CS, Vontas J, et al. Status of Insecticide Resistance and Its Mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* Populations from Forest Settings in South Cameroon. Genes (Basel). 2019;10(10):741.
  50. Badolo A, Sombié A, Pignatelli PM, Sanon A, Yaméogo F, Wangrawa DW, et al. Insecticide resistance levels and mechanisms in *aedes aegypti* populations in and around ouagadougou, Burkina Faso. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13(5):1–17.
  51. Lol JC, Castañeda D, Mackenzie-Impoinvil L, Romero CG, Lenhart A, Padilla NR. Development of molecular assays to detect target-site mechanisms associated with insecticide resistance in malaria vectors from Latin America. Malar J [Internet]. 2019;18(1):202. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-019-2834-7>



52. Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores A., Fernandez- Salas I, et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. 2007;16(June):785–98.
53. Silva SJR da, Paiva MHS, Guedes DRD, Krokovsky L, Melo FL de, Silva MAL da, et al. Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–12.
54. Maia LMS, Bezerra MCF, Costa MCS, Souza EM, Oliveira MEB, Ribeiro ALM, et al. Natural vertical infection by dengue virus serotype 4, Zika virus and Mayaro virus in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus*. *Med Vet Entomol*. 2019;1–6.
55. Strode C, de Melo-Santos M, Magalhães T, Araújo A, Ayres C. Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS One*. 2012;7(8):1–8.
56. Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Adriana E. F, Garcia-Luna S, Reyes-Solis G, ... Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes following temephos selection. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
57. David J-P, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, et al. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(11):4080–4.
58. Müller P, Donnelly MJ, Ranson H. Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics*. 2007;8:1–12.
59. Weetman D, Djogbenou LS, Lucas E. Copy number variation (CNV) and insecticide resistance in mosquitoes: evolving knowledge or an evolving problem? *David*. 2016;25(3):289–313.
60. Lucas ER, Miles A, Harding NJ, Clarkson CS, Lawniczak MKN, Kwiatkowski

- DP, et al. Whole genome sequencing reveals high complexity of copy number variation at insecticide resistance loci in malaria mosquitoes. bioRxiv [Internet]. 2018;399568. Available from:  
<https://www.biorxiv.org/content/early/2018/08/25/399568>
61. Bhanuprakash V, Chhotaray S, Pruthviraj DR, Rawat C, Karthikeyan A, Panigrahi M. Copy number variation in livestock: A mini review. *Vet World*. 2018;11(4):535–41.
  62. Poupardin R, Reynaud S, Thanispong K, Gaude T, Chandre F, Corbel V, et al. Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing . *Genome Res*. 2015;25(9):1347–59.
  63. Weetman D, Mitchell SN, Wilding CS, Birks DP, Yawson AE, Essandoh J, et al. Contemporary evolution of resistance at the major insecticide target site gene *Ace-1* by mutation and copy number variation in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol*. 2015;24(11):2656–72.
  64. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* [Internet]. 2013;3(3):71–85. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4280562>
  65. Harris AF, Rajatileka S, Ranson H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(2):277–84.
  66. Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, et al. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: A case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*. 2009;10:494.
  67. Francis S, Karla SR, Perera R, Paine M, Black WC, Delgoda R. Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew Jamaica. *PLoS One*. 2017;12(6):1–13.

68. Morales D, Ponce P, Cevallos V, Espinosa P, Vaca D, Quezada W. Resistance Status of *Aedes aegypti* to Deltamethrin, Malathion, and Temephos in Ecuador . J Am Mosq Control Assoc. 2019;35(2):113–22.
69. de Araújo AP, Paiva MHS, Cabral AM, Cavalcanti AEHD, Pessoa LFF, Diniz DFA, et al. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations From Pernambuco, Brazil for Resistance to Temephos, Diflubenzuron, and Cypermethrin and Characterization of Potential Resistance Mechanisms. J Insect Sci. 2019;19(3).
70. Demok S, Endersby-Harshman N, Vinit R, Timinao L, Robinson LJ, Susapu M, et al. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes in Papua New Guinea. Parasites and Vectors [Internet]. 2019;12(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3585-6>
71. Rocha HDR, Paiva MHS, Silva NM, de Araújo AP, de Azevedo Camacho D dos R da R, da Moura AJF, et al. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. Acta Trop [Internet]. 2015;152:66–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.013>
72. Dia I, Diagne CT, Ba Y, Diallo D, Konate L, Diallo M. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* populations from Senegal and Cape Verde Archipelago. Parasites and Vectors [Internet]. 2012;5(1):1. Available from: Parasites & Vectors
73. Konan LY, Coulibaly IZ, Kone BA, Ziogba JCT, Diallo A, Ekra DK, et al. *Aedes aegypti* susceptibility to insecticide from Abidjan City, Cote D'ivoire. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2012;12(4):325–9.
74. Kamgang B, Marcombe S, Chandre F, Nchoutpouen E, Nwane P, Etang J, et al. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. Parasites and Vectors [Internet]. 2011;4(1):79. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/79>
75. Almeida AP, Gonçalves YM, Novo MT, Sousa CA, Melim M, Gracio AJ. Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous Region of Madeira, Portugal. Euro Surveill. 2017;12(46):pii:<https://doi.org/10.2807/esw.12.46.03311-en>.

76. Seixas G, Salgueiro P, Silva AC lar., Campos M, Spenassatto C, Reyes-Lugo M, et al. *Aedes aegypti* on Madeira Island (Portugal): genetic variation of a recently introduced dengue vector. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(1998):3–10.
77. Seixas G. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas. UNL - IHMT; 2012.
78. Seixas G, Salgueiro P, Bronzato-Badial A, Gonçalves Y, Reyes-Lugo M, Gordicho V, et al. Origin and expansion of the mosquito *Aedes aegypti* in Madeira Island (Portugal). Sci Rep. 2019;9(1):1–13.
79. Köppen-Geiger. Classification Köppen-Geiger [Internet]. [cited 2019 Nov 18]. Available from: <https://en.climate-data.org/europe/portugal/madeira-1102/>
80. Kuno G. Early History of Laboratory Breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Focusing on the Origins and Use of Selected Strains. J Med Entomol. 2010;47(6):957–71.
81. Melo-Santos MAV, Varjal-Melo JJM, Araújo AP, Gomes TCS, Paiva MHS, Regis LN, et al. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Trop. 2010;113(2):180–9.
82. Diniz DFA, Melo-Santos MAV De, Santos EMDM, Beserra EB, Helvecio E, De Carvalho-Leandro D, et al. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. Parasites and Vectors [Internet]. 2015;8(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1276-5>
83. Testing insecticide susceptibility in larvae (WHO 1981).pdf.
84. Calderón-Cortés N, Quesada M, Cano-Camacho H, Zavala-Páramo G. A simple and rapid method for DNA isolation from xylophagous insects. Int J Mol Sci. 2010;11(12):5056–64.
85. Pang T, Mak TK, Gubler DJ. Prevention and control of dengue—the light at the end of the tunnel. Lancet Infect Dis. 2017;17(3):e79–87.

86. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Washington, D.C : PAHO; 1994. 104 p.
87. Smith LB, Sears C, Sun H, Mertz RW, Kasai S, Scott JG. CYP-mediated resistance and cross-resistance to pyrethroids and organophosphates in *Aedes aegypti* in the presence and absence of kdr. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2019;160:119–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.07.011>
88. Saavedra-Rodriguez K, Maloof FV, Campbell CL, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P, et al. Parallel evolution of vgsc mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–9.
89. Granada Y, Mejía-Jaramillo AM, Strode C, Triana-Chavez O. A point mutation V419I in the sodium channel gene from natural populations of *Aedes aegypti* is involved in resistance to  $\lambda$ -cyhalothrin in Colombia. *Insects*. 2018;9(1).
90. Ayres C, Seixas G, Borrego S, CS M, Gouveia B, Leal S, et al. The V410L knockdown resistance mutation occurs in island and continental populations of *Aedes aegypti* in West and Central Africa. *PLoS Negl Trop Dis*.



# **Material suplementar**

**Tabela S1:** Classe, concentração, lote e validade dos inseticidas usados nos bioensaios.

Classe	Inseticidas WHO	Concentração	Impregnação	Validade	Número do lote
<b>Piretróide</b>	Deltametrina	0,05%	nov/17	nov/18	DE 553
	Permetrina	0,75%	jul/17	jul/18	PE 523
		0,75%	set/17	set/18	PE 436
	Ciflutrina	0,15%	set/17	set/18	CY 142
	Etofenprox	0,50%	set/17	set/18	ET 132
	PY-Control		set/17	set/18	PY 266
<b>Organofosfatos</b>	Fenitrotião	1%	jan/16	jan/19	FE 106
<b>Carbamatos</b>	<i>bendiocarb</i>	0,10%	nov/16	nov/19	BE 171
	OP-Carbamate Control		jul/17	jul/20	OP 180
<b>Organoclorados</b>	Dieldrina	4,00%	jul/17	jul/22	DI 113
	DDT	4%	set/15	set/20	DD 228
	OC-Control		set/17	set/22	OC 122

**Tabela S2:** Detalhes da análise estatística dos bioensaios (*Probit*), relativamente ao teste estatístico *chi*-quadrado. Abaixo, indicam-se os valores, estimados com base no modelo “*probit*”, para os tempos de exposição de cada inseticidas testados, pra obter 50% e 99% de mortalidade.

Deltametrina	Testes qui-quadrado			
		Qui-quadrado	df <sup>b</sup>	Sig.
PROBIT	Teste de grau de adequação de Pearson	2,753	5	,738 <sup>a</sup>
<p>a. Como o nível de significância é maior que ,001, nenhum fator de heterogeneidade foi usado no cálculo de limites de confiança.</p> <p>b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.</p>				

<b>Bendiocarb</b>	<b>Testes qui-quadrado</b>			
		Qui-quadrado	df <sup>b</sup>	Sig.
	PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	8,140	5	,149 <sup>a</sup>
	<p>a. Como o nível de significância é maior que ,001, nenhum fator de heterogeneidade foi usado no cálculo de limites de confiança.</p> <p>b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.</p>			
<b>Ciflutrina</b>	<b>Testes qui-quadrado</b>			
		Qui-quadrado	df <sup>b</sup>	Sig.
	PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	11,757	5	,038 <sup>a</sup>
	<p>a. Como o nível de significância é maior que ,001, nenhum fator de heterogeneidade foi usado no cálculo de limites de confiança.</p> <p>b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.</p>			
<b>Dieldrina</b>	<b>Testes qui-quadrado</b>			
		Qui-quadrado	df <sup>b</sup>	Sig.
	PROBIT Teste de grau de adequação de Pearson	7,747	5	,171 <sup>a</sup>
	<p>a. Como o nível de significância é maior que ,001, nenhum fator de heterogeneidade foi usado no cálculo de limites de confiança.</p> <p>b. As estatísticas baseadas em casos individuais são diferentes das baseadas em casos agregados.</p>			



### **PROBIT - Limites de confiança - Deltametrina**

	95% de Limites de Confiança para Tempo			95% de Limites de Confiança para log (Tempo) <sup>a</sup>		
	Probabilidade Estimativa	Limite inferior	Limite superior	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
,010	20,374	17,256	22,990	1,309	1,237	1,362
,020	22,787	19,714	25,337	1,358	1,295	1,404
,030	24,465	21,448	26,954	1,389	1,331	1,431
,040	25,808	22,848	28,242	1,412	1,359	1,451
,050	26,954	24,052	29,339	1,431	1,381	1,467
,060	27,970	25,123	30,309	1,447	1,400	1,482
,070	28,892	26,100	31,188	1,461	1,417	1,494
,080	29,744	27,004	32,000	1,473	1,431	1,505
,090	30,540	27,851	32,759	1,485	1,445	1,515
,100	31,292	28,653	33,477	1,495	1,457	1,525
,150	34,606	32,190	36,656	1,539	1,508	1,564
,200	37,488	35,249	39,465	1,574	1,547	1,596
,250	40,152	38,034	42,123	1,604	1,580	1,625
,300	42,705	40,641	44,752	1,630	1,609	1,651
,350	45,216	43,129	47,428	1,655	1,635	1,676
,400	47,734	45,547	50,209	1,679	1,658	1,701
,450	50,304	47,939	53,139	1,702	1,681	1,725
,500	52,968	50,349	56,263	1,724	1,702	1,750
,550	55,774	52,825	59,633	1,746	1,723	1,775
,600	58,777	55,421	63,316	1,769	1,744	1,802
,650	62,051	58,200	67,405	1,793	1,765	1,829
,700	65,698	61,247	72,040	1,818	1,787	1,858
,750	69,876	64,685	77,435	1,844	1,811	1,889
,800	74,841	68,712	83,953	1,874	1,837	1,924
,850	81,075	73,696	92,283	1,909	1,867	1,965
,900	89,662	80,448	103,992	1,953	1,906	2,017
,910	91,869	82,166	107,042	1,963	1,915	2,030
,920	94,328	84,071	110,458	1,975	1,925	2,043
,930	97,108	86,216	114,343	1,987	1,936	2,058
,940	100,310	88,674	118,847	2,001	1,948	2,075
,950	104,090	91,560	124,204	2,017	1,962	2,094
,960	108,715	95,068	130,811	2,036	1,978	2,117
,970	114,682	99,562	139,423	2,059	1,998	2,144
,980	123,125	105,859	151,764	2,090	2,025	2,181
,990	137,711	116,590	173,491	2,139	2,067	2,239

a. Base de logaritmo = 10.

**PROBIT - Limites de confiança - Bendiocarb**

Probabilidade	95% de Limites de Confiança para Tempo			95% de Limites de Confiança para log (Tempo) <sup>a</sup>		
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
,010	25,901	20,164	30,004	1,413	1,305	1,477
,020	29,273	23,816	33,109	1,466	1,377	1,520
,030	31,637	26,452	35,267	1,500	1,422	1,547
,040	33,540	28,611	37,002	1,526	1,457	1,568
,050	35,172	30,482	38,494	1,546	1,484	1,585
,060	36,624	32,157	39,828	1,564	1,507	1,600
,070	37,946	33,686	41,054	1,579	1,527	1,613
,080	39,170	35,101	42,202	1,593	1,545	1,625
,090	40,318	36,424	43,293	1,605	1,561	1,636
,100	41,404	37,669	44,342	1,617	1,576	1,647
,150	46,221	43,010	49,283	1,665	1,634	1,693
,200	50,445	47,301	54,154	1,703	1,675	1,734
,250	54,376	50,932	59,165	1,735	1,707	1,772
,300	58,167	54,180	64,353	1,765	1,734	1,809
,350	61,915	57,228	69,745	1,792	1,758	1,844
,400	65,694	60,187	75,393	1,818	1,780	1,877
,450	69,570	63,136	81,368	1,842	1,800	1,910
,500	73,608	66,138	87,766	1,867	1,820	1,943
,550	77,880	69,251	94,710	1,891	1,840	1,976
,600	82,475	72,540	102,364	1,916	1,861	2,010
,650	87,510	76,083	110,954	1,942	1,881	2,045
,700	93,149	79,986	120,816	1,969	1,903	2,082
,750	99,642	84,407	132,471	1,998	1,926	2,122
,800	107,406	89,601	146,803	2,031	1,952	2,167
,850	117,224	96,042	165,509	2,069	1,982	2,219
,900	130,861	104,787	192,508	2,117	2,020	2,284
,910	134,386	107,013	199,670	2,128	2,029	2,300
,920	138,323	109,483	207,754	2,141	2,039	2,318
,930	142,786	112,265	217,025	2,155	2,050	2,337
,940	147,940	115,453	227,871	2,170	2,062	2,358
,950	154,046	119,198	240,908	2,188	2,076	2,382
,960	161,542	123,750	257,185	2,208	2,093	2,410
,970	171,260	129,583	278,719	2,234	2,113	2,445
,980	185,088	137,760	310,171	2,267	2,139	2,492
,990	209,186	151,697	367,130	2,321	2,181	2,565

a. Base de logaritmo = 10.

**PROBIT - Limites de confiança - Ciflutrina**

Probabilidade	95% de Limites de Confiança para Tempo			95% de Limites de Confiança para log (Tempo) <sup>a</sup>		
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
,010	9,929	8,508	11,258	,997	,930	1,051
,020	11,330	9,858	12,693	1,054	,994	1,104
,030	12,320	10,822	13,699	1,091	1,034	1,137
,040	13,120	11,608	14,509	1,118	1,065	1,162
,050	13,810	12,288	15,204	1,140	1,089	1,182
,060	14,426	12,897	15,823	1,159	1,110	1,199
,070	14,988	13,456	16,387	1,176	1,129	1,215
,080	15,510	13,976	16,910	1,191	1,145	1,228
,090	16,001	14,466	17,401	1,204	1,160	1,241
,100	16,466	14,931	17,865	1,217	1,174	1,252
,150	18,541	17,015	19,935	1,268	1,231	1,300
,200	20,375	18,865	21,764	1,309	1,276	1,338
,250	22,092	20,598	23,481	1,344	1,314	1,371
,300	23,757	22,276	25,155	1,376	1,348	1,401
,350	25,411	23,935	26,831	1,405	1,379	1,429
,400	27,088	25,604	28,546	1,433	1,408	1,456
,450	28,815	27,308	30,333	1,460	1,436	1,482
,500	30,623	29,071	32,229	1,486	1,463	1,508
,550	32,544	30,920	34,274	1,512	1,490	1,535
,600	34,619	32,890	36,518	1,539	1,517	1,563
,650	36,903	35,024	39,028	1,567	1,544	1,591
,700	39,473	37,390	41,899	1,596	1,573	1,622
,750	42,448	40,086	45,276	1,628	1,603	1,656
,800	46,026	43,277	49,403	1,663	1,636	1,694
,850	50,578	47,276	54,741	1,704	1,675	1,738
,900	56,951	52,780	62,350	1,756	1,722	1,795
,910	58,607	54,195	64,350	1,768	1,734	1,809
,920	60,460	55,774	66,598	1,781	1,746	1,823
,930	62,566	57,559	69,165	1,796	1,760	1,840
,940	65,005	59,617	72,153	1,813	1,775	1,858
,950	67,903	62,050	75,724	1,832	1,793	1,879
,960	71,473	65,030	80,153	1,854	1,813	1,904
,970	76,119	68,884	85,962	1,881	1,838	1,934
,980	82,768	74,351	94,356	1,918	1,871	1,975
,990	94,444	83,840	109,310	1,975	1,923	2,039

a. Base de logaritmo = 10.

### **PROBIT - Limites de confiança Dieldrina**

Probabilidade	95% de Limites de Confiança para Tempo			95% de Limites de Confiança para log (Tempo) <sup>a</sup>		
	Estimativa	Limite inferior	Limite superior	Estimativa	Limite inferior	Limite superior
,010	21,932	17,912	25,143	1,341	1,253	1,400
,020	24,742	20,813	27,835	1,393	1,318	1,445
,030	26,708	22,884	29,702	1,427	1,360	1,473
,040	28,290	24,570	31,196	1,452	1,390	1,494
,050	29,645	26,027	32,473	1,472	1,415	1,512
,060	30,850	27,330	33,608	1,489	1,437	1,526
,070	31,947	28,521	34,642	1,504	1,455	1,540
,080	32,962	29,627	35,601	1,518	1,472	1,551
,090	33,913	30,664	36,501	1,530	1,487	1,562
,100	34,812	31,646	37,357	1,542	1,500	1,572
,150	38,798	35,975	41,211	1,589	1,556	1,615
,200	42,289	39,678	44,731	1,626	1,599	1,651
,250	45,533	42,984	48,184	1,658	1,633	1,683
,300	48,657	46,016	51,702	1,687	1,663	1,714
,350	51,744	48,870	55,356	1,714	1,689	1,743
,400	54,854	51,629	59,190	1,739	1,713	1,772
,450	58,040	54,363	63,250	1,764	1,735	1,801
,500	61,357	57,132	67,591	1,788	1,757	1,830
,550	64,863	59,996	72,287	1,812	1,778	1,859
,600	68,631	63,014	77,440	1,837	1,799	1,889
,650	72,755	66,264	83,189	1,862	1,821	1,920
,700	77,371	69,843	89,746	1,889	1,844	1,953
,750	82,680	73,898	97,433	1,917	1,869	1,989
,800	89,023	78,669	106,803	1,950	1,896	2,029
,850	97,032	84,595	118,901	1,987	1,927	2,075
,900	108,141	92,661	136,133	2,034	1,967	2,134
,910	111,010	94,718	140,663	2,045	1,976	2,148
,920	114,213	97,002	145,756	2,058	1,987	2,164
,930	117,841	99,577	151,573	2,071	1,998	2,181
,940	122,030	102,531	158,347	2,086	2,011	2,200
,950	126,989	106,004	166,446	2,104	2,025	2,221
,960	133,074	110,233	176,497	2,124	2,042	2,247
,970	140,955	115,660	189,696	2,149	2,063	2,278
,980	152,159	123,284	208,793	2,182	2,091	2,320
,990	171,653	136,320	242,893	2,235	2,135	2,385

a. Base de logaritmo = 10.

**Tabela S3:** Tabela de concentrações utilizadas para cada mutação *kdr*

PCR- <i>kdr</i> V1016I			PCR- <i>kdr</i> F1534C			PCR- <i>kdr</i> V410L		
Componentes	[ ] tubo mãe	[ ] final	Componentes	[ ] tubo mãe	[ ] final	Componentes	[ ] tubo mãe	[ ] final
ddH <sub>2</sub> O		até 25 µl	ddH <sub>2</sub> O		até 25 µl	ddH <sub>2</sub> O		até 25 µl
PCR buffer	5 X	1 X	PCR buffer	5 X	1 X	PCR buffer	5 X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 mM	MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	MgCl <sub>2</sub>	25 Mm	2,5 mM
dNTPs	2 mM	0,2 mM	dNTPs	2 mM	0,4 mM	dNTPs	2 mM	0,4 mM
<i>primers</i> Val1016f	10 µM	0,1 µM	<i>primers</i> 31P	10 µM	0,25 µM	<i>primers</i> Aa410F1	10 µM	0,1 µM
<i>primers</i> Iso1016f	10 µM	0,1 µM	<i>primers</i> 31Q	10 µM	0,25 µM	<i>primers</i> Aa410F2	10 µM	0,1 µM
<i>primers</i> Iso1016r	10 µM	0,1 µM	<i>primers</i> 31wt	10 µM	0,25 µM	<i>primers</i> Aa410R1	10 µM	0,1 µM
Taq DNA	5 U/µl	1 U/µl	<i>primers</i> 31 mut	10 µM	0,25 µM	Taq DNA	5 U/µl	1 U/µl
Total		25 µM	Taq DNA	5 U/µl	1 U/µl	Total		25 µl
			Total		25 µM			
gDNA	~10 ng	1 µl	gDNA	~10 ng	2 µl	gDNA	~10 ng	3 µl

**Tabela S4:** Genotipagem dos sessenta indivíduos de *Aedes aegypti* da Ilha da Madeira coletados em 2018

Indivíduos	<i>kdr</i>		
	F1534C	V1016I	V410L
MAD 1	RR	SS	SS
MAD 2	RR	RS	RS
MAD 3	RR	SS	RS
MAD 4	RR	SS	SS
MAD 5	RR	RS	RS
MAD 6	RR	SS	SS
MAD 7	RR	RS	RS
MAD 8	RR	RS	RS
MAD 9	RR	SS	SS
MAD 10	RR	SS	SS
MAD 11	RR	SS	SS
MAD 12	RR	SS	SS
MAD 13	RR	RS	RS
MAD 14	RR	RS	RS
MAD 15	RR	SS	SS
MAD 16	RR	SS	SS
MAD 17	RR	RR	RR
MAD 18	RR	SS	SS
MAD 19	RR	RS	RS
MAD 20	RR	RS	RS
MAD 21	RR	RS	RS
MAD 22	RR	SS	SS
MAD 23	RR	SS	SS
MAD 24	RR	RS	RS
MAD 25	RR	RS	RS
MAD 26	RR	RS	RS
MAD 27	RR	RS	RS
MAD 28	RR	SS	SS
MAD 29	RR	RS	RS
MAD 30	RR	SS	SS
MAD 31	RR	SS	SS
MAD 32	RR	RR	RR
MAD 33	RR	RS	RS
MAD 34	RR	SS	SS
MAD 35	RR	RS	RS
MAD 36	RR	SS	SS
MAD 37	RR	SS	SS
MAD 38	RR	RS	RS
MAD 39	RR	RS	RS
MAD 40	RR	SS	SS
MAD 41	RR	RS	RS
MAD 42	RR	RS	RS
MAD 43	RR	SS	SS
MAD 44	RR	SS	SS
MAD 45	RR	RS	RS
MAD 46	RR	RS	RS
MAD 47	RR	RS	RS
MAD 48	RR	SS	SS
MAD 49	RR	SS	SS
MAD 50	RR	RS	RS
MAD 51	RR	RS	RS
MAD 52	RR	RS	RS
MAD 53	RR	SS	SS
MAD 54	RR	RR	RR
MAD 55	RR	RS	RS
MAD 56	RR	SS	RS
MAD 57	RR	SS	SS
MAD 58	RR	RS	RS
MAD 59	RR	RS	RS
MAD 60	RR	RR	RR

**Tabela S5:** Concentração de DNA de cada amostra.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ng/uL)</b>
CYF 1 RR	3,7
CYF 2 RR	1,38
CYF 3 RR	14
CYF 4 RR	11,4
CYF 5 RR	10,8
CYF 6 RR	10,5
CYF 7 SS	22,6
CYF 8 SS	10,1
CYF 9 SS	12
CYF 10 SS	5,68
CYF 11 SS	10,1
CYF 12 SS	2,07
DELTA 1RR	9,11

DELTA 2 RR	34,7
DELTA 3 RR	2,17
DELTA 4 RR	2,78
DELTA 5 RR	47
DELTA 6 RR	8,72
DELTA 7 SS	5,25
DELTA 8 SS	18
DELTA 9 SS	0,926
DELTA 10 SS	5,68
TEM 1 RR	45,9
TEM 2 RR	23,8
TEM 3 RR	27,8
TEM 4 RR	29,2
TEM 5 RR	17,1
TEM 6 RR	60

TEM 7 SS	51
TEM 8 SS	46
TEM 9 SS	46,1
TEM 10 SS	57
TEM 11 SS	59
TEM 12 SS	48,5
ROCK (1)	53
ROCK (2)	46,3
ROCK (3)	48,1
Angola 1	48,8
Angola 2	55
Angola 3	59
Angola 4	52
Angola 5	82,9
Angola 6	55

Tabela S6: Teste estatístico para ver a associação entre o fenótipo e a variação do número de cópias.

CCEae3A	<p><i>Fisher Exact Probability Test:</i></p> <table border="1"> <tr> <td>P</td> <td>one-tailed</td> <td>0.5294117647058634</td> </tr> <tr> <td></td> <td>two-tailed</td> <td>1</td> </tr> </table>	P	one-tailed	0.5294117647058634		two-tailed	1	CYP6BB2	<p><i>Fisher Exact Probability Test:</i></p> <table border="1"> <tr> <td>P</td> <td>one-tailed</td> <td>0.6524926686216964</td> </tr> <tr> <td></td> <td>two-tailed</td> <td>1</td> </tr> </table>	P	one-tailed	0.6524926686216964		two-tailed	1
P	one-tailed	0.5294117647058634													
	two-tailed	1													
P	one-tailed	0.6524926686216964													
	two-tailed	1													
CYP6CC1	<p><i>Fisher Exact Probability Test:</i></p> <table border="1"> <tr> <td>P</td> <td>one-tailed</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td></td> <td>two-tailed</td> <td>1</td> </tr> </table>	P	one-tailed	1		two-tailed	1	CYP6P12	<p><i>Fisher Exact Probability Test:</i></p> <table border="1"> <tr> <td>P</td> <td>one-tailed</td> <td>0.5714285714285653</td> </tr> <tr> <td></td> <td>two-tailed</td> <td>1</td> </tr> </table>	P	one-tailed	0.5714285714285653		two-tailed	1
P	one-tailed	1													
	two-tailed	1													
P	one-tailed	0.5714285714285653													
	two-tailed	1													
CYP9J10	<p><i>Fisher Exact Probability Test:</i></p> <table border="1"> <tr> <td>P</td> <td>one-tailed</td> <td>0.45356037151703243</td> </tr> <tr> <td></td> <td>two-tailed</td> <td>0.6749226006192002</td> </tr> </table>	P	one-tailed	0.45356037151703243		two-tailed	0.6749226006192002	CYP9J28	<p><i>Fisher Exact Probability Test:</i></p> <table border="1"> <tr> <td>P</td> <td>one-tailed</td> <td>0.18221930090673008</td> </tr> <tr> <td></td> <td>two-tailed</td> <td>0.27005763980179903</td> </tr> </table>	P	one-tailed	0.18221930090673008		two-tailed	0.27005763980179903
P	one-tailed	0.45356037151703243													
	two-tailed	0.6749226006192002													
P	one-tailed	0.18221930090673008													
	two-tailed	0.27005763980179903													
CYP9J23	<p><i>Fisher Exact Probability Test:</i></p> <table border="1"> <tr> <td>P</td> <td>one-tailed</td> <td>0.23974388018214066</td> </tr> <tr> <td></td> <td>two-tailed</td> <td>0.32691888351239207</td> </tr> </table>	P	one-tailed	0.23974388018214066		two-tailed	0.32691888351239207	CYP9J32	<p><i>Fisher Exact Probability Test:</i></p> <table border="1"> <tr> <td>P</td> <td>one-tailed</td> <td>0.15634674922600567</td> </tr> <tr> <td></td> <td>two-tailed</td> <td>0.20433436532507623</td> </tr> </table>	P	one-tailed	0.15634674922600567		two-tailed	0.20433436532507623
P	one-tailed	0.23974388018214066													
	two-tailed	0.32691888351239207													
P	one-tailed	0.15634674922600567													
	two-tailed	0.20433436532507623													
GSTE2	<p><i>Fisher Exact Probability Test:</i></p> <table border="1"> <tr> <td>P</td> <td>one-tailed</td> <td>0.38876529477196853</td> </tr> <tr> <td></td> <td>two-tailed</td> <td>0.6602285367580165</td> </tr> </table>	P	one-tailed	0.38876529477196853		two-tailed	0.6602285367580165								
P	one-tailed	0.38876529477196853													
	two-tailed	0.6602285367580165													



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	Run ID	Assay Name	Test Name	Test Date	Qubit(TM) tube conc.	Units	Original sample conc.	Units	Sample Volume (ul)	Dilution Factor	Std 1 RFU	Std 2 RFU	Std 3 RFU	Excitation	Emission	Green RFU	Far Red RFU
2	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 10 SS	28/02/2019 13:56	56.8 ng/mL		5.68 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	2645.82		
3	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 9 SS	28/02/2019 13:56	9.26 ng/mL		0.926 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	457.26		
4	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 8 SS	28/02/2019 13:56	180 ng/mL		18.0 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	8352.24		
5	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 7 SS	28/02/2019 13:56	52.5 ng/mL		5.25 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	2446.31		
6	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 6 RR	28/02/2019 13:56	87.2 ng/mL		8.72 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	4053.99		
7	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 5 RR	28/02/2019 13:56	470 ng/mL		47.0 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	21960.02		
8	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 4 RR	28/02/2019 13:55	27.8 ng/mL		2.78 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	1308.82		
9	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 3 RR	28/02/2019 13:55	21.7 ng/mL		2.17 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	1027.21		
10	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 2 RR	28/02/2019 13:55	347 ng/mL		34.7 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	16206.22		
11	28/02/2019	1x dsDNA High Sensitivity	DELTA 1 RR	28/02/2019 13:55	91.1 ng/mL		9.11 ng/uL		2	100	38.06	23369.42	Blue	Green	4235.49		

Figura S1: Exemplo de uma Tabela com dados do Qubit

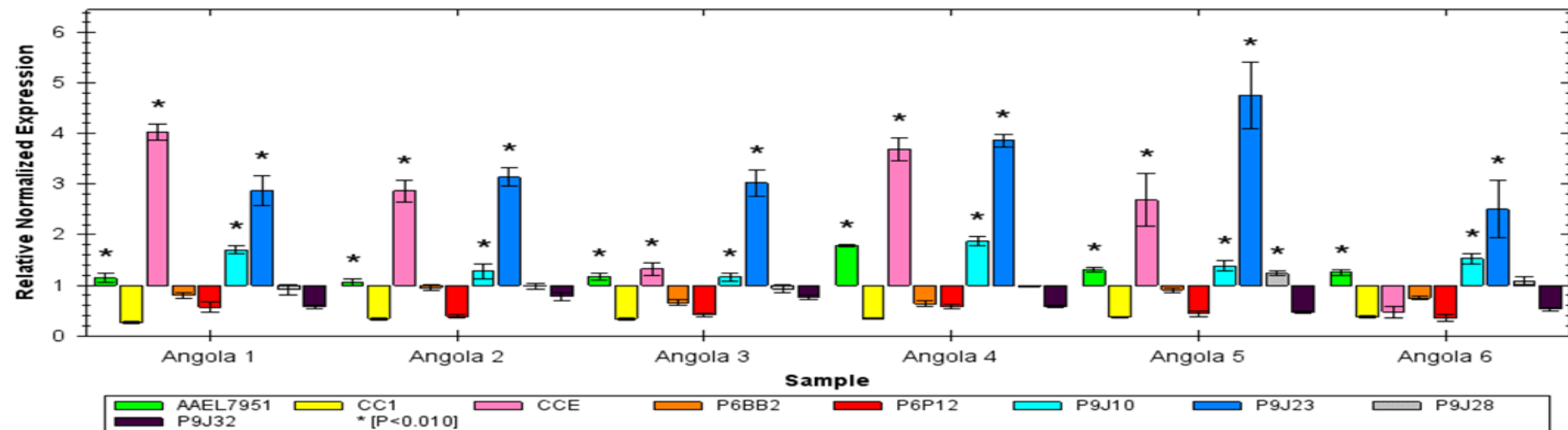
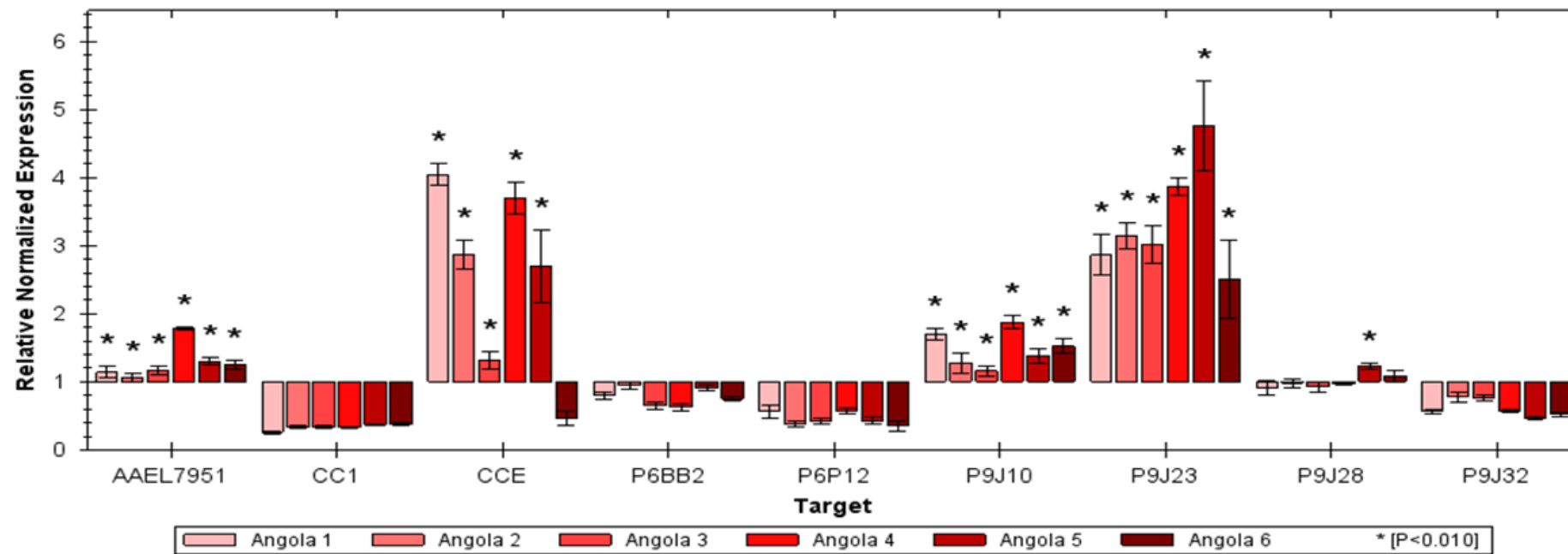


Figura S2: Padrão de CNV de *Aedes aegypti* de Benguela, Angola em relação à Bora Bora, agrupado por *pool* de amostras (onde CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e o CCE corresponde ao gene CCEae3A) ( $p < 0,010$ )



**Figura S3:** Padrão de CNVs de genes-alvo de *Aedes aegypti* de Benguela, Angola em relação à Bora Bora, agrupado por genes (onde CC1 corresponde ao gene CYP6CC1 e o CCE corresponde ao gene CCEae3A) ( $p < 0,010$ )