



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

IVALDO JOAQUIM DE FARIAS FILHO

**PROSPECÇÃO GÊNICA DE MUTAÇÕES DE SÍTIO-ALVO DOS INSETICIDAS
PIRETRÓIDES; IMPLICAÇÕES NOS PROGRAMAS DE CONTROLE DO *Aedes*
aegypti NO NORDESTE BRASILEIRO**

CAMPINA GRANDE – PB

2021

EVALDO JOAQUIM DE FARIAS FILHO

**PROSPECÇÃO GÊNICA DE MUTAÇÕES DE SÍTIO-ALVO DOS INSETICIDAS
PIRETRÓIDES; IMPLICAÇÕES NOS PROGRAMAS DE CONTROLE DO *Aedes*
aegypti NO NORDESTE BRASILEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual da Paraíba como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Walter Fabrício Silva Martins

CAMPINA GRANDE – PB

2021

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F224p Farias Filho, Evaldo Joaquim de.

Prospecção gênica de mutações de sítio-alvo dos inseticidas piretróides; implicações nos programas de controle do *Aedes Aegypti* no Nordeste brasileiro [manuscrito] / Evaldo Joaquim de Farias Filho. - 2021.

24 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.

"Orientação : Prof. Dr. Walter Fabrício Silva Martins, Departamento de Biologia - CCBS."

1. Mutações genéticas. 2. Arboviroses. 3. Controle de vetores. 4. *Aedes Aegypti*. I. Título

21. ed. CDD F224p

EVALDO JOAQUIM DE FARIAS FILHO

PROSPECÇÃO GÊNICA DE MUTAÇÕES DE SÍTIO-ALVO DOS INSETICIDAS
PIRETRÓIDES; IMPLICAÇÕES NOS PROGRAMAS DE CONTROLE DO *Aedes aegypti*
NO NORDESTE BRASILEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual da Paraíba como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Molecular

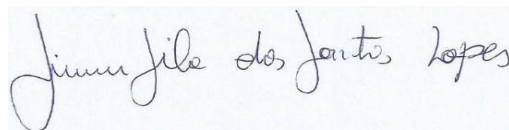
Aprovada em: 19/02/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Walter Fabrício Silva Martins (Orientador)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Paulo Geovani Silva Martins

Universidade Rural Federal de Pernambuco (UFRPE)

À minha mãe, por ser meu porto seguro e
toda luz dessa grande caminhada,
DEDICO

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”. **(Albert Einstein)**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa com a localização da área de coleta, com destaque aos municípios onde foram distribuídas as ovitrampas.....12
- Figura 2:** Mutação Phe1534Cys representada na sequência base de referência para *Aedes aegypti* resistente a piretróides (Amostra de número 6) e nas amostras do estado de Pernambuco (sequência: 7-26).....16
- Figura 3:** Mutações não sinônimas Gly1892Val; Thr1894Pro e Tyr1898Phe, identificadas em Sergipe (Sequências: 11; 17 e 23). Círculos brancos destacam a posição das referidas mutações.....16
- Figura 4:** Mutação Phe2123Ser, corresponde ao estado de Sergipe, presentes nas sequências 22 e 23.....17
- Figura 5:** Diagrama representativo das mutações não sinônimas em *A. aegypti* catalogadas nos estados: Paraíba, Pernambuco e Sergipe.....18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> e respectivas sequências utilizadas na amplificação do gene do canal de sódio regulado por voltagem (<i>Nav</i>) do vetor <i>A. aegypti</i>	13
Tabela 2 - Descrição geral de mutações encontradas em <i>Aedes aegypti</i> no estado da Paraíba, Brasil.....	15
Tabela 3 - Descrição de mutações encontradas nos mosquitos do estado de Pernambuco, Brasil.....	15
Tabela 4 - Descrição das mutações encontradas nos mosquitos do estado de Sergipe, Brasil.....	15

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	12
2.1	Área de estudo	12
2.2	Coleta de ovos do <i>A. aegypti</i>	13
2.3	Extração do RNA	13
2.4	Detecção de mutações em diferentes genes	13
2.5	Análise de dados	14
3	RESULTADOS	14
4	DISCUSSÃO	18
5	CONCLUSÃO	21
	REFERÊNCIAS	21

PROSPECÇÃO GÊNICA DE MUTAÇÕES DE SÍTIO-ALVO DOS INSETICIDAS
PIRETRÓIDES; IMPLICAÇÕES NOS PROGRAMAS DE CONTROLE DO *Aedes aegypti*
NO NORDESTE BRASILEIRO

Evaldo Joaquim de Farias Filho*

RESUMO

Aedes aegypti é vetor de arboviroses de grande impacto para saúde pública. Atualmente tem capacidade vetorial de cinco distintos arbovírus no Brasil; Vírus da Dengue (DENV), Zika vírus (ZKV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV) e vírus da febre amarela (YFV), caracterizando o vetor como de grande importância para a saúde pública. Não existem vacinas específicas para os arbovírus transmitidos pelo vetor, sendo o controle populacional o principal meio de domínio. O controle químico é o meio empregado mundialmente no decréscimo populacional de insetos transmissores de doenças, pela ação rápida e eficaz a curto prazo. A grande problemática do uso indiscriminado de inseticidas químicos trata-se da seleção, atrelada ao surgimento de mutações que trazem devida insensibilidade aos insetos. O presente trabalho teve como objetivo identificar mutações encontradas nas populações de *Aedes aegypti* de três estados do Nordeste brasileiro: Paraíba, Pernambuco e Sergipe. Através da prospecção de variações alélicas no gene *Nav*, foram identificadas um total de dezessete mutações não sinônimas nas amostras dos três estados. Duas mutações já amplamente descritas em *A. aegypti*; Phe1534Cys está presente nos estados de Pernambuco e Paraíba e Val1016Iso no estado da Paraíba. Novas mutações não sinônimas também foram documentadas, Thr1755Pro; Phe1758Cys e Lys1805Thr presente nas populações de Pernambuco, em Sergipe: Gly1892Val; Thr1894Pro; Tyr1898Phe; Lys1941Glu; Gly2111Ser e Phe2123Ser, e na Paraíba Gli440Arg, Glu724Lis, Iso958Tre, Val1395Leu e Lis1473Glu, estas ainda não são catalogadas nas bases científicas. As mutações Phe1534Cys e Val1016Iso podem repercutir no nível de resistência das populações de *A. aegypti* dos estados de Pernambuco e Paraíba, onde documentadas. Dentre a prospecção, foram descritas novas mutações, estas necessitam melhor apuramento para associação a implicações na resistência do vetor.

Palavras-chave: Mutações genéticas. Arboviroses. Controle de vetores. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Aedes aegypti is a vector of arboviroses which has a large impact on public health. It currently has the vectorial capacity of five different arboviruses in Brazil; Dengue virus (DENV), Zika virus (ZKV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV) and Yellow fever virus (YFV), characterizing the vector as being of great importance for public health. There are no specific vaccines for arboviruses transmitted by the vector, thus population control is the main way of dominance. Chemical control is the method used worldwide in decreasing the population of

insects that transmit diseases, due to its quick and effective action in the short term. The major problem with the indiscriminate use of chemical insecticides is selection, linked to emergence of mutations that brings insensitivity to insects. The present study aimed to identify mutations found in populations of *Aedes aegypti* from three states in the Northeast of Brazil: Paraíba, Pernambuco and Sergipe. By prospecting for allelic variations in *Nav* gene, a total of seventeen non-synonymous mutations were identified in samples from the three states. Two mutations already widely described in *A. aegypti*; Phe1534Cys occurs in Pernambuco and Paraíba and Val1016Iso the state of Paraíba. New non-synonymous mutations have also been documented, Thr1755Pro; Phe1758Cys and Lys1805Thr present in the populations of Pernambuco, in Sergipe: Gly1892Val; Thr1894Pro; Tyr1898Phe; Lys1941Glu; Gly2111Ser and Phe2123Ser, and in Paraíba Gli440Arg, Glu724Lis, Iso958Tre, Val1395Leu and Lis1473Glu, these are not yet cataloged in the scientific bases. The Phe1534Cys and Val1016Iso mutations may have an impact on the resistance level of *A. aegypti* populations in the states of Pernambuco and Paraíba, where documented. Among the prospection, new mutations have been described, these need better determination for association with implications on vector resistance.

Keywords: Genetics mutations. Arboviroses. Vector control. *Aedes aegypti*.

1 INTRODUÇÃO

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) é um artrópode predominante em ambiente urbano apresentando hábitos diurnos e domiciliar. Este é considerado o principal vetor de arboviroses em regiões tropicais e subtropicais (BHATT *et al.*, 2013). No Brasil, *A. aegypti* representa o principal vetor do vírus da dengue (DENV), o que remete o nome popular da espécie “mosquito-da-dengue”, além de transmitir outros quatro arbovírus: Zika vírus (ZKV); Chikungunya (CHIKV), vírus da febre amarela e o recentemente descoberto Mayaro vírus (MAYV), respectivamente. A co-circulação desses vírus representa altos riscos para o surgimento de epidemias de grande significância para a saúde pública (DE CASTRO-JORGE *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2020).

A grande diversidade de criadouros de alto potencial é encontrada no peridomicílio e no intradomicílio, o que assegura a manutenção da elevada densidade populacional do inseto no meio urbano, potencializando os riscos de transmissão das respectivas arboviroses (VALENÇA *et al.*, 2013). Geralmente, *A. aegypti* realiza a postura de seus ovos em paredes internas de recipientes com capacidade acumulativa de água como caixas d’água, pneus, vasos de plantas, entre outros, sendo estes criadouros de grande relevância do ponto de vista epidemiológico (BANERJEE *et al.*, 2013).

Seguindo sua extensa distribuição e capacidade vetorial de cinco arboviroses já descritos no Brasil, reforça-se a importância do controle geral do crescimento populacional da espécie (WHO, 2017). No entanto, atualmente a principal forma de controle da dengue é através do controle vetorial, especificamente pelo controle químico, uma vez que não existem vacinas ou drogas antivirais específicas (ZARA *et al.*, 2016).

O combate ao vetor em questão em sua forma larval e adulta, consiste principalmente no uso de inseticidas químicos (larvicidas e adulticidas), estes, quando utilizados por períodos prolongados e de forma indiscriminada quanto a dosagens e intervalos de aplicação, podem selecionar indivíduos resistentes a um ou mais classes de inseticidas (BRAGA; VALLE, 2007). O processo de resistência a inseticidas caracteriza-se pela habilidade herdada de um determinado organismo em tolerar doses de um xenobiótico, onde estas antes seriam letais para a maioria dos indivíduos da respectiva população, levando a uma alteração na sua sequência genética (WHO 1957; CROFT 1988).

Atualmente, o uso de inseticidas químicos é o principal meio empregado de forma mundial no controle populacional de artrópodes vetores, e tem se tornado problemático quando observadas mutações reduzem o efeito letal de diversas formulações de inseticidas. (ZARA *et*

al., 2016). Elencam-se, de forma geral, dois principais mecanismos relacionados ao aumento da insensibilidade a inseticidas químicos; a) redução da sensibilidade no sítio-alvo de ação do inseticida - *Knockdown resistance (Kdr)*, e b) aumento da expressão de genes de detoxificação ou metabolização (KARUNAMOORTHY e SABESAN, 2013; LIU, 2015).

Em *A. aegypti*, diversas mutações no gene que codifica o canal de sódio dependente de voltagem (*Nav*); como S989P, I1011M, L1014, V1016G, e F1534C, estão associadas com aumento da resistência para os inseticidas piretróides e organoclorados (DONG *et al.*, 2014). No entanto, no Brasil o aumento da resistência tem sido associado principalmente às mutações: I1011M, V1016G e F1534C (LINSS *et al.*, 2014).

Estudos indicam que no Brasil, populações de *A. aegypti* adquiriram resistência aos principais produtos utilizados para o seu controle (BRAGA *et al.*, 2004). Entretanto, existem ainda evidências de que o histórico de formulações utilizadas, influenciou o desenvolvimento da resistência registrada nas populações do vetor provenientes das regiões Sudeste e Nordeste (DA-CUNHA *et al.*, 2005). Particularmente, o aumento da resistência aos inseticidas piretróides, tem exposto a fragilidade para manutenção de intervenções de controle de adultos, uma vez que essa classe de inseticidas é preconizada como a mais segura para utilização em ambientes urbanos (LIMA *et al.*, 2003; MACORIS *et al.*, 2003).

A evolução da resistência é considerada uma grande ameaça implicada ao sucesso dos programas de controle sob populações de mosquitos resistentes, um outro ponto que evolui dentro da perspectiva da resistência, diz respeito à resistência múltipla e cruzada, configurando mosquitos ou populações super-resistentes. A resistência cruzada ocorre quando um gene confere resistência a dois ou mais produtos químicos, sendo estes do mesmo grupo ou não, já a resistência múltipla acontece quando ocorrem dois ou mais mecanismos de resistência, por exemplo *Kdr* e resistência metabólica (BISSET 2002; IRAC 2011; RANSON *et al.*, 2009). É de fato importante o monitoramento do status de susceptibilidade e resistência a inseticidas por parte dos programas nacionais de controle de pragas e vetores. O acompanhamento da dinâmica de resistência nessas populações deve ser constante, bem como a definição de alternativas seguras e melhor seguimento dos protocolos de aplicação, evitando que o uso de determinados compostos alcancem um limiar de perda de eficácia, impactando as ações de controle em campo (BRAGA *et al.*, 2004).

Dessa forma, a prospecção e monitoramento da frequência de mutações que venham a expressar fenótipos de resistência no mosquito *A. aegypti* frente a inseticidas, apresentam grande relevância para melhor o delineamento de medidas para a aplicação do controle químico destes insetos. Na região nordeste do país, poucos estudos visam tal desígnio, assim o presente

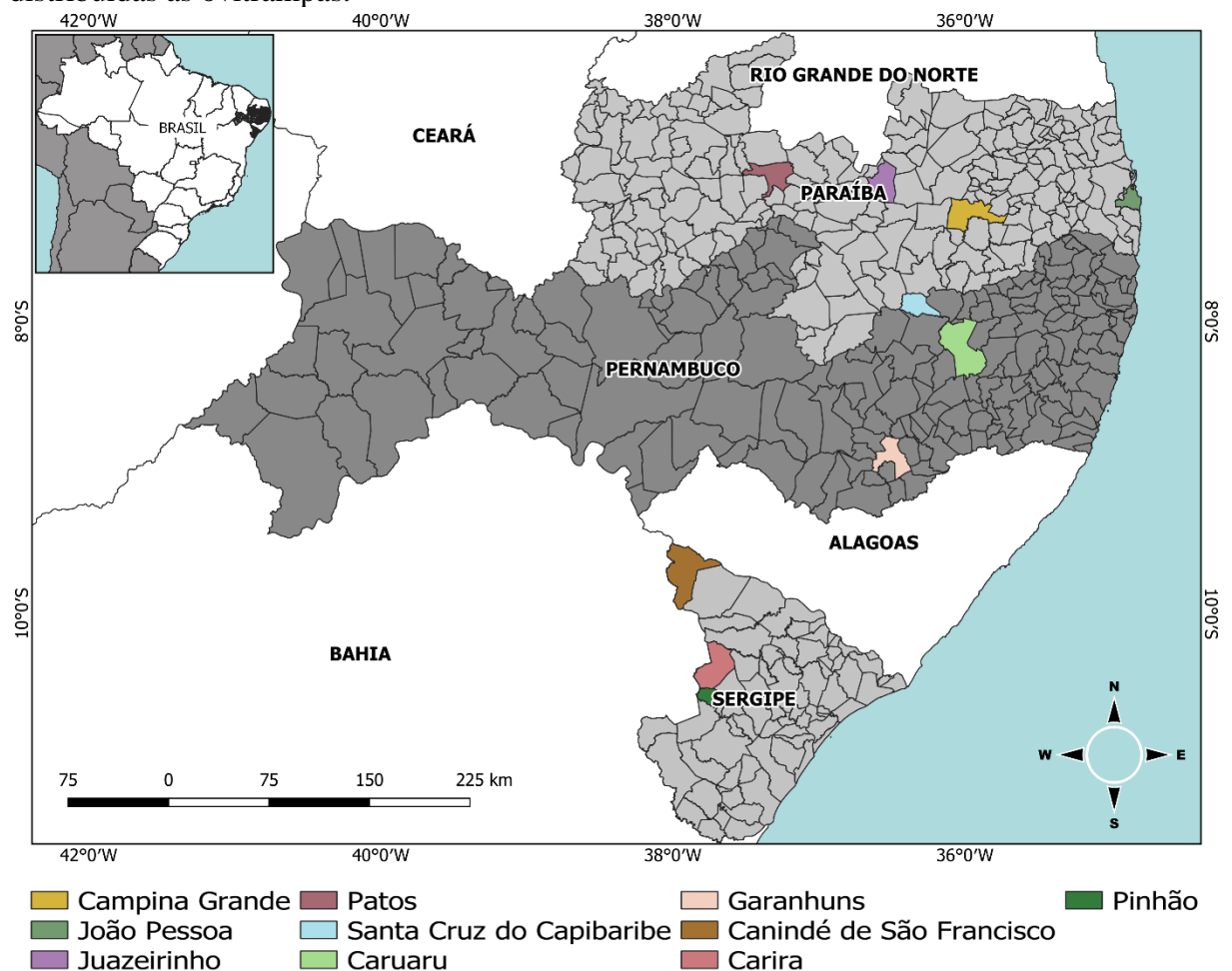
estudo traçou por objetivo principal identificar e caracterizar variações genômicas que possam estar relacionadas com a resistência a inseticidas químicos em populações de *A. aegypti* na região Nordeste.

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

2.1 Área de estudo

As coletas de *A. aegypti* em campo foram realizadas no ano de 2019, em dez municípios de três estados no Nordeste do Brasil (Figura 1), as regiões foram selecionadas de acordo com a incidência de dengue divulgado pelos respectivos órgãos municipais e estaduais. No estado de Pernambuco as coletas foram realizadas nos municípios: Caruaru, Garanhuns e Santa Cruz do Capibaribe; Paraíba: João Pessoa, Campina Grande, Juazeirinho e Patos e Sergipe: Carira, Canindé de São Francisco e Pinhão.

Figura 1: Mapa com a localização da área de coleta, com destaque aos municípios onde foram distribuídas as ovitrampas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

2.2 Coleta de ovos do *A. aegypti*

Em cada área de coleta foram distribuídas 50 armadilhas do tipo ovitrampas de forma aleatória em áreas de intra e peridomicílio de distintas residências. As armadilhas foram recolhidas quatro dias após a instalação, e o material coletado acondicionado em caixas térmicas de isopor, sendo encaminhado para o Laboratório de Entomologia Médica Molecular-LEMMol, na Universidade Estadual da Paraíba, para obtenção dos insetos adultos. As palhetas contendo os ovos de *A. aegypti*, foram colocadas em bandejas plásticas separadas por cidade, contendo água destilada com o intuito de obter insetos adultos da geração F1. A junção das palhetas das diferentes armadilhas da mesma área de coleta objetivou representar a diversidade populacional, e minimizar o possível número de indivíduos da mesma progênie.

2.3 Extração do RNA

O material coletado foi enviado para sequenciamento na Invitrogen, Reino Unido. A extração de RNA genômico foi realizada a partir de um *pool* de 50 fêmeas por estado utilizando o número equivalente de indivíduos dos diversos municípios. Foi utilizado RNeasy Micro Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

2.4 Detecção de mutações em diferentes genes

A presença de polimorfismos no gene do canal de sódio regulado por voltagem (*Nav*) em *A. aegypti*, foi identificado a partir da amplificação das respectivas regiões gênicas (HADDI et al., 2017). As referidas regiões foram amplificadas utilizando a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir dos pares de *primers* conforme a tabela 1:

Tabela 1: *Primers* e respectivas sequências utilizadas na amplificação do gene do canal de sódio regulado por voltagem (*Nav*) do vetor *A. aegypti*.

<i>primer</i>	Sequência	Região amplificada
<i>AaAe F1:</i>	5'-CATTGTTGGCCATATAGACAATG-3'	1 a 1536
<i>AaAe R1:</i>	5'-ATCGACATCTTCTCCTTGTTG-3'	
<i>AaAe F2:</i>	5'-TAGCTCTACTATGCCGACCA-3'	1282 a 2167
<i>AaAe R2:</i>	5'-TAGCTCTACTATGCCGACCA-3'	
<i>AaAe F3:</i>	5'- CAACGACAATCCTTTCATCG-3'	

AaAe R3:	5'- CCATCGCACTCATCGTCTA-3'	2054 a 3647
AaAe F4:	5'-CAAGGACGAAAGCCACAAAG -3'	3536 a 4565
AaAe R4:	5'- GAACGACCCGAAGATGATG -3'	
AaAe F5:	5'-GGCAAGTATTTTAAGTGCGT-3'	4296 a 5326
AaAe R5:	5'- CGTCCTCGTTGATGATACC-3'	
AaAe F6:	5'-TACAATTTCAAGACGTTCCGG-3'	5245 a 6402
AaAe R6:	5'-GCGAGGCCTGGCTCAGACATCCGC-3'	

Fonte: HADDI et al., 2017.

Cada reação de PCR obteve volume final de 25 µl contendo; 1 µl de cDNA (80ng), 1µl de cada *primer* (10 pmol/µl) (*forward e reverso*), 0,5 µl MgCl₂ (50 mM, Invitrogen), 12,5 µl MasterMix - Invitrogen e água Milli-Q® autoclavada q.s.p. A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições; desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, em seguida realizou-se 30 ciclos compostos por desnaturação (94°C por 60 segundos), anelamento (67°C por 60 segundos) e extensão (72°C, por 60 segundos) e, por fim, uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Para confirmar a amplificação do cDNA, os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1% (Sigma-Aldrich) diluído em solução tampão TBE 0,5x e corado com brometo de etídio. Após a eletroforese, os amplicons foram visualizados em transiluminador sobre luz UV. As variações genômicas foram identificadas via sequenciamento em sequenciador capilar ABI 3100 (Applied Biosystems).

2.5 Análise de dados

A edição e a análise das sequências foram realizadas com o programa CodonCode Aligner (9.0.1 for WINDOWS). Análise por alinhamento global e genômica comparativa de sequências realizou-se utilizando o programa MEGA-X 5.2 (KUMAR *et al.*, 2008).

3 RESULTADOS

Através da prospecção de variações alélicas no gene *Nav*, foram identificadas um total de dezessete mutações nas amostras dos três estados. Duas mutações já amplamente descritas em *A. aegypti*; Phe1534Cys está presente nos estados de Pernambuco e Paraíba e Val1016Iso no estado da Paraíba (Tabela 2 -3, Figura 5). Entre as novas mutações identificadas na Paraíba três foram sinônimas, enquanto seis novas mutações não sinônimas: Gli440Arg, Ser568Arg, Glu724Lis, Iso958Tre, Val1395Leu e Lis1473Glu (Tabela 2), em Pernambuco três novas

mutações Thr1755Pro; Phe1758Cys e Lys1805Thr (Tabela 3) e em Sergipe seis Gly1892Val; Thr1894Pro; Tyr1898Phe; Lys1941Glu; Gly2111Ser e Phe2123Ser (Tabela 4).

Tabela 2: Descrição geral de mutações identificadas em *Aedes aegypti* no estado da Paraíba, Brasil.

AMOSTRA*	POSIÇÃO**	DESCRIÇÃO***	ÉXON****	ALTERAÇÃO*****
BRA_1038	2718	SINÔNIMA	18	-
BRA_1038	2719	SINÔNIMA	18	-
BRA_1038	2730	SINÔNIMA	19	-
BRA_Ae	1320	NÃO SINÔNIMA G>R	10	Gli440Arg
BRA_Ae	1706	NÃO SINÔNIMA S>R	13	Ser568Arg
BRA_Ae	2173	NÃO SINÔNIMA Q>L	15	Glu724Lis
BRA_1038	2875	NÃO SINÔNIMA EU>T	20	Iso958Tre
BRA_1038	3067	NÃO SINÔNIMA V>EU	21	Val1016Iso
BRA_534	4186	NÃO SINÔNIMA V>O	26	Val1395Leu
BRA_1085	4420	NÃO SINÔNIMA K>Q	27	Lis1473Glu
BRA_Ae	4694	NÃO SINÔNIMA C >F	29	Fen1534Cis

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

*Amostra (código da amostra); **Posição (posição da mutação dentro do genoma); ***Descrição (sinônima e não sinônima); ****Éxon (éxon em que a mutação se encontra); *****Alteração (nomenclatura da mutação descrita).

Tabela 3: Descrição de mutações encontradas nos mosquitos do estado de Pernambuco, Brasil.

AMOSTRA	POSIÇÃO	DESCRIÇÃO	ÉXON	ALTERAÇÃO
BRA_AeR5	4694	NÃO SINÔNIMA F>C	29	Phe1534Cys
BRA_AeR5	5263	NÃO SINÔNIMA T>P	31	Thr1755Pro
BRA_AeR5	5273	NÃO SINÔNIMA F>C	31	Phe1758Cys
BRA_AeR5	5414	NÃO SINÔNIMA K>T	31	Lys1805Thr

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 4: Descrição das mutações encontradas nos mosquitos do estado de Sergipe, Brasil.

AMOSTRA	POSIÇÃO	DESCRIÇÃO	ÉXON	ALTERAÇÃO
BRA_AeR6	5675	NÃO SINÔNIMA G>V	32	Gly1892Val
BRA_AeR6	5680	NÃO SINÔNIMA T>P	32	Thr1894Pro
BRA_AeR6	5693	NÃO SINÔNIMA Y>F	32	Tyr1898Phe
BRA_AeR6	5821	NÃO SINÔNIMA T>S	32	Lys1941Glu
BRA_AeR6	6331	NÃO SINÔNIMA G>S	32	Gly2111Ser
BRA_AeR6	6368	NÃO SINONIMA F>S	32	Phe2123Ser

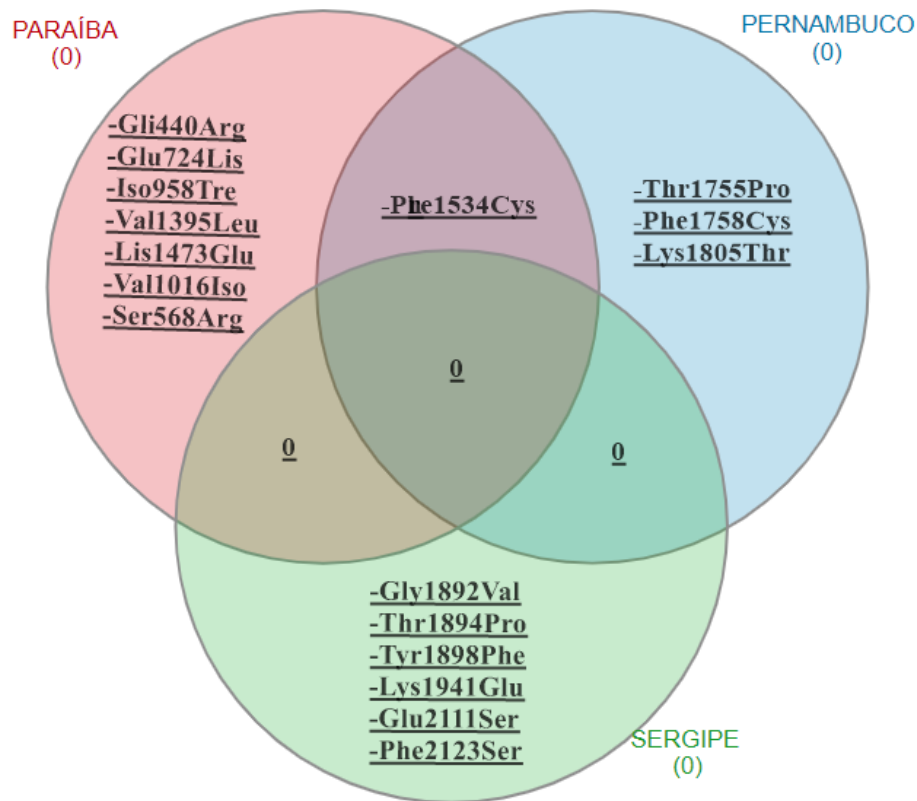
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 4: Mutações Phe2123Ser, correspondem ao estado de Sergipe, presentes nas sequências 22 e 23.

Species/Abbrv	*	*	*	*			*
1. A._aegypti__Per-R_EU399181.1_Aedes_aegypti_s	E	S	D	G	F	V	T K
2. A._aegypti__PYR-SUS_KY747529.1_Aedes_aegy	E	S	D	G	F	V	T K
3. A._aegypti_EU399179.1_Aedes_aegypti_strain_Bc	E	S	D	G	F	V	T K
4. A._aegypti_EU399180.1_Aedes_aegypti_strain_Ns	E	S	D	G	F	V	T K
5. A._aegypti_KC107440.1_Aedes_aegypti_strain_We	E	S	D	G	F	V	T K
6. A._aegypti_PYR-Rest_KY747530.1_Aedes_aegyp	E	S	D	G	F	V	T K
7. E10_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
8. F12_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
9. E11_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
10. C11_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
11. C12_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
12. D11_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
13. A11_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
14. A12_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
15. B12_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
16. G12_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
17. B11_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
18. F10_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
19. F11_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
20. G11_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
21. H10_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
22. H12_AeR6	E	S	D	G	S	V	T K
23. G10_AeR6	E	S	D	G	S	V	T K
24. H11_AeR6	E	S	D	G	F	V	T K
25. D12_AeR6	E	S	D	G	F	A	A K

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 5: Diagrama representativo do compartilhamento das mutações não sinônimas em *A. aegypti* catalogadas nos estados: Paraíba, Pernambuco e Sergipe.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4 DISCUSSÃO

As populações de *A. aegypti* dos estados da Paraíba e Pernambuco apresentam variações alélicas já descritas e associadas com resistência a piretróides, bem como mutações não descritas pela base científica, que podem estar relacionadas com fenótipos resistentes (LINSS et al., 2014). Dentro da perspectiva de controle vetorial, é imprescindível considerar a presença das diversas variações gênicas para desenvolver sistemas de monitoramento da evolução das resistências mais realistas. Neste estudo, apesar da cobertura parcial da região gênica *NaV*, área genética de não abrangência de todo o genoma nas respectivas populações, as principais mutações, Val1016Iso na Paraíba e Phe1534Cys para Paraíba e Pernambuco (**Figura 2**) são detectáveis, expondo a importância geral do monitoramento de mutações de sítio-alvo para elaboração do programa de controle através de inseticidas químicos.

Em 2019, DE ARAÚJO e colaboradores trazem um apanhado geral do estado de Pernambuco no que diz respeito à resistência do *A. aegypti*, referente ao período de 2009 e

2012. O trabalho citado identificou uma frequência de até 0,50 de frequência alélica para a mutação Phe1534Cys em mosquitos resistentes no estado, sendo notório que pelo menos sete anos depois, considerando a data de coleta deste estudo, a mutação ainda ocorre em Pernambuco, expondo a fragilidade dos programas de controle químico dos municípios.

No estado da Paraíba há uma escassa documentação das mutações específicas, principalmente sob a resistência a piretróides. No presente trabalho, as mutações Phe1534Cys e Val1016Iso são presentes nas amostras da Paraíba, levando em consideração que para esse Estado o material analisado foi em maior escala, abrangendo os diversos éxons do gene *Nav*. São descritas também, seis mutações novas, aparente apenas na Paraíba comparando aos Estados incluídos na área de estudo. Assim, estudos adicionais, a nível molecular, a exemplo a modelagem molecular, é essencial para validar possíveis implicações dessas variações na resistência a piretróides, melhores avaliações para compreender os possíveis mecanismos envolvidos. Um ponto notório dentre as pesquisas documentadas é a especificidade dos marcadores para detecção de mutações já descritas, bem como a análise da susceptibilidade mediante os compostos específicos. Não devem ser descartadas possibilidades do surgimento de novas mutações que expressem resistência, uma vez que há uma grande pressão seletiva exercida sob essas populações do *A. aegypti*.

Em Sergipe, a análise deste estudo incluiu apenas o éxon 32 do gene *Nav*, assim não se detectou mutações específicas de resistência, já que o respectivo éxon não inclui mutações relacionadas com resistência a piretróides já validadas. DOLABELLA et al., 2016, demonstram o nível de resposta de susceptibilidade mediada por Val1016Iso, nos sete municípios de Sergipe em que aplicaram o estudo. Os referidos autores descrevem ainda uma alta frequência dessa mutação para todos os municípios. DA-CUNHA et al., 2005 estudou um composto piretróide e demonstrou também em seus resultados uma redução da sensibilidade para as populações de Sergipe. Na região analisada no presente estudo, Em Sergipe as seis mutações nunca descritas representam uma quantidade relativamente alta principalmente quando comparado ao estado de Pernambuco. As mutações Gly1892Val, Thr1894Pro e Tyr1898Phe (**Figura 3**) por exemplo, não apresentam uma frequência relevante a ser considerada importante dentro do perfil de resistência dessas populações. Porém, é importante salientar que o número de mosquitos utilizados para sequenciamento foi limitado, consequentemente coletas mais amplas e genotipagem de um número maior de indivíduos se faz necessário para descrever um padrão mais realista da frequência de novas variações no gene *Nav*.

Outro estudo de abrangência nacional, dentro do panorama de resistência, foi desenvolvido por CHEDIK et al., 2016. O mesmo, trata da evolução da resistência a temefós

no país nos últimos doze anos antecedentes. O Nordeste se destaca nos resultados pela baixa mortalidade entre 2008 e 2011, pós exposição aos compostos. Mesmo não sendo a mesma classe de inseticida abordado, esse estudo pode trazer uma criticidade ao Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), levando em consideração a problemática da resistência múltipla e cruzada.

BRENGUES et al., publicam em 2003 uma pesquisa de grande abrangência, expondo a resistência cruzada no Brasil desde o ano de 1998. São escassos estudos que visem a identificação de resistência cruzada no Nordeste no Brasil, este estudo quando em conjunto à documentos recentes amplia a possibilidade de uma constância nesse tipo de resistência, o que sugere um melhor manejo aos protocolos de aplicação considerando tamanho impacto não apenas à uma classe de químicos utilizados nos programas.

Embora haja limitações, principalmente com a prospecção do genoma completo para elucidar os mecanismos genéticos relacionados com a resistência, esse tipo de abordagem desencadeia novas possibilidades para desenvolver novas ferramentas de diagnóstico da resistência. A genotipagem de mutações diretamente relacionadas à resistência a inseticidas é uma importante ferramenta de vigilância para fins agrícolas e sanitários. Sendo esta, associada a diversos meios de investigação por procedimentos distintos juntamente com ferramentas da bioinformática que propiciam melhor predição funcional destas mutações, além da inclusão desses elementos para conhecimento abrangente da comunidade científica. Sendo assim, há o reforço de que a descrição de novas mutações ou mutações previamente descritas, são de fato necessárias para que haja o emprego de novas metodologias de controle a nível regional e mundial (DONNELLY, 2009).

Além da identificação alélica através de sequenciamento e genotipagem, o emprego de estudos de associação genótipo-fenótipo são fundamentais para elucidar possíveis níveis de resistência a inseticidas químicos, como exemplo a utilização de modelagem molecular e testes de suscetibilidade. Esta ferramenta permite que através de técnicas computacionais possamos modelar e visualizar tais moléculas associando ao comportamento das mesmas, o que poderá prever o tipo de mutação e o possível vínculo com resistência de sitio-alvo para os inseticidas químicos aprovados para o controle vetorial na perspectiva de saúde pública.

5 CONCLUSÃO

As mutações Val1016Ile e Phe1534Cys, encontradas no estado da Paraíba, e Phe1534Cys, documentada nas amostras de Pernambuco, podem repercutir no nível de resistência a inseticidas piretróides nesses estados, principal classe de químicos utilizados pelos programas de controle de vetores urbanos há décadas.

Quinze novas mutações não sinônimas foram descritas para os três estados do Nordeste, considerando a detecção das respectivas alterações nunca documentadas, impõe-se a necessidade de um melhor apuramento das mesmas. Estudos que associam as mutações quanto suas funções na resistência, exemplo: a modelagem molecular, avaliando que de fato podem ocorrer novas mutações diante de um ou mais classes de inseticidas.

REFERÊNCIAS

BANERJEE, Soumyajit; ADITYA, Gautam; SAHA, Goutam K. Household disposables as breeding habitats of dengue vectors: linking wastes and public health. **Waste management**, v. 33, n. 1, p. 233-239, 2013.

BHATT, S.; GETHING, P. Y. V. Brady oJ, et al. the global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, p. 504-507, 2013.

BISSET, Juan A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 54, n. 3, p. 202-219, 2002.

BRAGA, Ima Aparecida et al. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

BRAGA, Ima Aparecida; VALLE, Denise. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 179-293, 2007.

BRENGUES, Cécile et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Medical and veterinary entomology**, v. 17, n. 1, p. 87-94, 2003.

CHEDEIAK, Mateus et al. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 311-321, 2016.

CROFT, B. A.; VAN DE BAAN, H. E. Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. *Experimental & applied acarology*, v. 4, n. 3, p. 277-300, 1988.

DA-CUNHA, Marcella Pereira et al. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 441-444, 2005.

DE ARAÚJO, Ana Paula et al. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Pernambuco, Brazil for resistance to temephos, diflubenzuron, and cypermethrin and characterization of potential resistance mechanisms. **Journal of Insect Science**, v. 19, n. 3, p. 16, 2019.

DE CASTRO-JORGE, Luiza A. et al. The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 9, p. e1007934, 2019.

DOLABELLA, S. S. et al. Detection and distribution of V1016I kdr mutation in the voltage-gated Sodium Channel gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Sergipe state, Northeast Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 53, n. 4, p. 967-971, 2016.

DONG, Ke et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 50, p. 1-17, 2014.

DONNELLY, Martin J. et al. Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes?. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 5, p. 213-219, 2009.

HADDI, Khalid et al. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (IRAC). 2011. Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance. 70 p.

KARUNAMOORTHY, Kaliyaperumal; SABESAN, Shanmugavelu. Insecticide resistance in insect vectors of disease with special reference to mosquitoes: a potential threat to global public health. 2013.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 299-306, 2008.

LIMA, José Bento Pereira et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LINSS, Jutta Gerlinde Birgitt et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 25, 2014.

LIU, Nannan. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. **Annual review of entomology**, v. 60, p. 537-559, 2015.

MACORIS, Maria de Lourdes G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.

PEREIRA, Thiago Nunes et al. Competência vetorial dos mosquitos *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* para o vírus Mayaro. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, pág. e0007518, 2020.

RANSON, Hilary et al. Resistência a inseticidas em *Anopheles gambiae*: dados do primeiro ano de um estudo multinacional destacam a extensão do problema. **Jornal da malária**, v. 8, n. 1, pág. 1-12, 2009.

VALENÇA, M. A. et al. Dynamics and characterization of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) key breeding sites. **Neotropical entomology**, v. 42, n. 3, p. 311-316, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global vector control response 2017-2030. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert committee on insecticides: seventh report. Geneva, Technical Report Series, p. 125,31, 1957.

ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

AGRADECIMENTOS

Gratidão ao universo e forças espirituais, pela possibilidade de aqui estar e pelo autoconhecimento desenvolvido nesse processo do período de graduação.

À minha mãe, Walmeria, que sempre apoiou minhas escolhas e se dedicou junto a mim nessa caminhada, você é minha inspiração de força de vontade, dedicação e equilíbrio. Ao meu pai, Evaldo, que deu sempre seu melhor por mim.

Às minhas irmãs, Edjara e Jamilly, por sempre estarem presentes e ouvirem minhas reclamações, pelos momentos de cumplicidade e alegrias. À minha sobrinha Gaby, titio te ama e você é o melhor presente que pude receber da vida. À minha vó Maria e minha prima Duda, amo vocês. À minha tia Zilda, que sempre esteve presente, você me inspira pela pessoa forte que é, não medindo amor e zelo pelos seus.

Ao professor e amigo Walter Fabrício, pela orientação e paciência, sou muito grato pelo aprendizado e tudo que desenvolvemos nesses 4 anos de trabalho.

Aos meus amigos do curso e da vida, Vitor, Kézia, Juce, Manu e Dayrila por toda experiência compartilhada, pelo apoio, presença e até pelas brigas, vocês são parte de tudo isso, levarei um pouco de cada um para minha vida.

Ao meu companheiro, João, que foi tão essencial nessa conclusão, amo você.

Aos grandes professores do departamento de Biologia, pela inspiração e por lutarem pela educação de uma forma tão linda.

A toda a equipe do Laboratório de Entomologia Médica Molecular (LEMMol), pelo companheirismo nos momentos de coleta, foi incrível trabalhar com vocês.

A todos que contribuíram de alguma forma para execução deste trabalho, expresso aqui minha gratidão.