Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Avaliação da atividade locomotora de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) com diferentes perfis de resistência
a inseticidas do Estado de São Paulo

Bruno Magalhães Nakazato

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tamara Nunes de
Lima Camara

São Paulo
2018

**Avaliação da atividade locomotora de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) com diferentes perfis de
resistência a inseticidas do Estado de São Paulo**

Bruno Magalhães Nakazato

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública para obtenção
do título de Mestre em Ciências**

Área de Concentração: Epidemiologia

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tamara Nunes de
Lima Camara**

Versão revisada

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo

Nakazato, Bruno Magalhães.

Avaliação da atividade locomotora de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) com diferentes perfis de resistência a inseticidas do Estado de São Paulo / Bruno Magalhães Nakazato; orientadora, Tamara Nunes de Lima Camara. - 2018.

80 fls.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

1. *Aedes aegypti*. 2. Resistência a inseticidas. 3. Atividade locomotora. 4. Populações do Estado de São Paulo.

Ao meu avô Janssen (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos na minha vida.

Agradeço à minha esposa e eterna companheira Livia, por sempre estar ao meu lado, compartilhando momentos bons e também os desafios da vida. Agradeço por cada instante que se dedicou corrigindo algumas muitas versões do texto deste trabalho.

Agradeço imensamente à minha família, em especial à minha mãe Regina e avó Ana, aos meus pais Marcelo e Edi, pelo apoio e pelos mais sábios conselhos que alguém poderia carinhosamente oferecer. E como são valiosos! Agradeço aos meus sogros Miriam e Roni, e aos meus cunhados Nádia e Talles por todo companheirismo e acolhimento que sempre tiveram comigo. Vocês são demais!

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Tamara Nunes de Lima Camara, por ter abraçado a ideia deste trabalho mesmo antes do meu ingresso na pós-graduação, além das inúmeras sugestões, ensinamentos, críticas que foram indispensáveis!

Agradeço aos membros da banca prof. Dr. Lincoln Suesdek, Dra. Regiane Tironi e Dra. Márcia Bicudo, por todas observações e sugestões feitas na pré-banca que foram indispensáveis para melhor elucidação do meu trabalho, além de contribuírem para o meu amadurecimento acadêmico.

Agradeço ao meu ex-orientador e grande amigo Dr. José Eduardo Bracco, por ter sido um grande divisor de águas no início da minha vida científica, principalmente por me ensinar a aprender. Muito obrigado!

Agradeço pela equipe do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública, em especial a Rosa Maria de Sá e ao prof. Dr. Paulo Urbinatti, por toda contribuição no meu trabalho, além da valiosa amizade. Aos alunos e companheiros de laboratório, MSc Marta Ribeiro, MSc Filipe Pancetti, MSc Ronan Rocha, MSc Pâmela Andrade, Rubens Silveira, Thaís Azevedo, Thaís Feitoza e Victor Lima, obrigado pelas altas doses de risadas, discussões, cumplicidade, que foram fundamentais para tornar as coisas e situações mais leves. Aos grandes amigos da faculdade, Mariana Dantas, Dra. Sandra Nagaki, Dra. Ivy Sá, MSc Leonardo Suveges, Dr. Fredy Galvis, MSc Vanessa Gusmão, MSc Amanda Camargo, MSc Cecília Lavitschka, Dra. Bruna Demari, prof. Dr. Delsio Natal, Dra. Márcia Bicudo, com quem tive a honra de conhecer e conviver, compartilhando momentos inesquecíveis, principalmente os incontáveis cafés na copa, muito obrigado!

Agradeço as pesquisadoras da Sucen, Dra. Juliana Teles de Deus e Dra. Regiane Tironi, pela amizade e por sempre serem prestativas, seja para conversar ou mesmo para qualquer dúvida que eu pudesse ter. À PqC. Dra. Maria de Lourdes da Graça Macoris (Lula) e a toda equipe técnica da Sucen de Marília, SP, por terem cedido o material necessário para a execução dos experimentos e por terem acreditado neste trabalho.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro quanto à bolsa oferecida.

“A verdade é filha do tempo, e não da autoridade.”

(Galileu Galilei)

RESUMO

NAKAZATO, Bruno Magalhães. **Avaliação da atividade locomotora de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) com diferentes perfis de resistência a inseticidas do Estado de São Paulo**. 2018. 80 fl. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Diversas populações de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) têm mostrado resistência a muitos inseticidas químicos, empregados no controle desse vetor de arboviroses como dengue, chikungunya, Zika e febre amarela urbana. O presente trabalho teve como objetivo avaliar quantitativamente a atividade locomotora de populações de *Ae. aegypti* do Estado de São Paulo, com diferentes perfis de resistências a inseticidas, sendo Campinas e Marília suscetíveis, Santos, Ribeirão Preto e Barretos resistentes e uma linhagem laboratorial Rockefeller. Além disso, foi verificado se a resistência a inseticida não aumenta a atividade locomotora (H_0) e, também foram feitas comparações entre as populações testadas quando ao perfil e possíveis variações temporais entre os anos de 2016 e 2017. A atividade locomotora das populações foi avaliada e aquelas classificadas como resistentes, mostraram um aumento da atividade locomotora em relação a linhagem laboratorial, exceto a população de Barretos em relação a Rockefeller de 2016 (Kruskal-Wallis; $p = 0,05$). As populações suscetíveis de Campinas e Marília, diferentemente de 2016, apresentaram um padrão de atividade locomotora semelhante ao da população resistente de Santos, em 2017 (Dunn; $z = 1,46$; $p = 0,11$ | $z = 0,33$; $p = 0,71$). Desta forma, populações de *Ae. aegypti* do Estado de São Paulo, com resistência a inseticida, mostraram um aumento na atividade locomotora, e experimentos realizados em diferentes anos mostraram uma mudança no perfil populacional de Campinas e Marília quanto à resistência a inseticida, de acordo com a atividade locomotora avaliada.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Resistência a inseticidas. Atividade locomotora. Populações do Estado de São Paulo.

ABSTRACT

NAKAZATO, B. M. **Evaluation of the locomotor activity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with different insecticide resistance profiles of the State of São Paulo.** 80 sh. (Master's degree in Public Health) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Several populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) have shown resistance to many chemical insecticides used to control this vector of arboviruses such as dengue, chikungunya, Zika and urban yellow fever. This study evaluated quantitatively the locomotor activity of *Ae. aegypti* populations from the State of São Paulo, with different insecticide resistance profiles, being Campinas and Marília susceptible, Santos, Ribeirão Preto and Barretos resistant and a Rockefeller laboratory strain. Additionally, it was verified if the resistance to insecticide does not increase the locomotor activity (null hypothesis), and comparisons were also made between the populations tested when the profile and possible temporal variations between the years 2016 and 2017. The locomotor activity of the populations was evaluated and those classified as resistant, showed an increase in locomotor activity in relation to the laboratory lineage, except the population of Barretos in relation to Rockefeller of 2016 (Kruskal-Wallis test; $p = 0.05$). Populations susceptible to Campinas and Marília, differently from 2016, presented a pattern of locomotor activity similar to that of Santos' resistant population in 2017 (Dunn test; $z = 1.46$; $p = 0.11$ | $z = 0.33$; $p = 0.71$). Thus, populations of *Ae. aegypti* from the State of São Paulo, with resistance to insecticide, showed an increase in locomotor activity, and experiments carried out in different years showed a change in the population profile of Campinas and Marília regarding insecticide resistance, according to the locomotor activity evaluated.

Keywords: *Aedes aegypti*. Insecticide resistance. Locomotor activity. Populations of the State of São Paulo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>Ae. aegypti</i>	26
Figura 2 – Faixas formando uma figura de “lira” característica conspícua da espécie <i>Ae. aegypti</i>	26
Figura 3 – Número de casos de dengue suspeitos ou confirmados por laboratório, notificados à OMS entre 1990 a 2015. AMRO: Escritório Regional das Américas; SEARO: Escritório Regional do Sudeste da Ásia; WPRO: Escritório Regional do Pacífico Ocidental.	30
Figura 4 – Topologia da estrutura transmembranaral do canal de sódio e voltagem. A subunidade α formadora do poro, consiste em uma cadeia polipeptídica simples, formada por quatro domínios homólogos internos (I-IV), sendo cada um constituído por seis hélices transmembranosas (S1-S6). Cada domínio se alinha, formando um poro aquoso central (PD), cercado pelas hélices S5 e S6, com “linkers” (P-loops). As hélices S1 e S4 são responsáveis pela parte sensível à voltagem do canal e se arranjam formando quatro domínios independentes (VSD). (Somente dois são mostrados na figura). A tensão de ativação do canal depende do movimento dos quatro segmentos S4, carregados positivamente.	33
Figura 5 – Mutações <i>Kdr</i> em artrópodes.	38
Figura 6 – Pupas individualizadas em borreis, separados em bandejas por população.....	45
Figura 7 – Populações de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> separadas em gaiolas no interior da Incubadora de Precisão Mod. 818 – Thermo Scientific®.	46
Figura 8 – Espécimes de <i>Ae. aegypti</i> alocados no interior do tubo.....	48
Figura 9 – Disposição dos monitores no interior da incubadora pouco antes de iniciar o experimento.....	48
Figura 10 – Atividade locomotora de fêmeas virgens de <i>Ae. aegypti</i> , das populações suscetíveis de (A) Campinas, (B) Marília, resistentes (C) Santos, (D) Ribeirão Preto/Barretos e uma linhagem laboratorial Rockefeller (E) de 2016 (linha azul) e 2017 (linha vermelha). Gráfico da média de um dia, referente aos quatro dias dos experimentos, sob regime de LD 12:12, a 25°C. Barras de erros (linhas tracejadas)	

são mostradas em intervalos de 30 minutos. Eixo X: o tempo Zeitgeber, referente ao número de horas após a luz acender; barra branca e preta representam 12h de luz (1ª hora) e 12h de escuro (13ª hora). Eixo Y: média geométrica de Williams. Valores excedentes da escala: a=18,05; b=19,98; c=18,90; d=18,60; e=20,72.....51

Figura 11 – Atividade locomotora de fêmeas virgens de *Ae. aegypti* de 2016. (A) populações suscetíveis Campinas (linha verde), Marília (linha vermelha); (B) populações resistentes Santos (linha azul), Ribeirão Preto (linha amarela); linhagem Rockefeller (linha preta). Valores excedentes da escala: a=18,90 e b=18,60.....55

Figura 12 – Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* de 2017. Linha azul (CAMP; n = 96), linha vermelha (MAR; n = 78), linha preta (ROCK; n = 102). Gráfico da média geométrica de Williams de quatro dias de experimento dos três experimentos realizados, sob regime de LD 12h claro (barra branca) e 12h escuro (barra cinza), a 25°C. Barras de erros (linhas tracejadas) são mostradas em intervalos de 30 minutos.....56

Figura 13 – Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* de 2017. Linha azul (CAMP; n = 96), linha vermelha (MAR; n = 78), linha verde (SAN; n = 79). Valores excedentes da escala a=25,15.....57

Figura 14 – Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* de 2017. Linha azul (CAMP; n = 96), linha vermelha (MAR; n = 78), linha roxa (BAR; n = 98).....58

Figura 15 – Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* das populações de 2016; linha amarela (CAMP; n = 95), linha marrom (MAR; n = 104). E da população de 2017; linha roxa (BAR; n = 98).58

Figura 16 – Distribuição da variância das médias na atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti*. Eixo Y: atividade locomotora de Log+1; eixo X: número de indivíduos testados por população; populações suscetíveis (a) CAMP, (b) MAR; populações resistentes (c) SAN, (d) BAR; linhagem laboratorial ROCK (e).59

SIGLAS UTILIZADAS

ACE – Agente de Controle de Endemias

Acetyl-CoA – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ACS – Agente Comunitário de Saúde

ADL – Análise de Densidade Larval

AMRO – Escritório Regional das Américas

BAR – Barretos

CA – Carbamato

CAMP – Campinas

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CETESB – Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Básico e de Controle de Poluição das Águas

CHIKV – Chikungunya vírus

COSEMS-SP – Conselho de Secretários Municipais de Saúde do Estado de São Paulo

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DENERu – Departamento Nacional de Endemias Rurais

DENV – Dengue vírus

EST – Esterases

FA – Febre amarela

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FAS – Febre amarela silvestre

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

GST – Glutathione-S-Transferases

JEV – Encefalite japonesa vírus

Kdr – *Knockdown resistance*

KW – Kruskal-Wallis

LAM – *Locomotor Activity Monitor*

LD – *light/dark*

LIRAA – Levantamento Rápido de Índices de Infestação por *Aedes aegypti*

MAR – Marília

MAYV – Mayaro vírus

MFO – Oxidases de Função Mista

MPD – Meio Período Diurno

OC – Organoclorado

OMS – Organização Mundial da Saúde

OP – Organofosforado

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PNCD – Programa Nacional de Controle da Dengue

PNH – Primatas não humanos

PTQ – Piretro, Tetracloreto de carbono e Querosene

PY – Piretróide

RIB – Ribeirão Preto

RNA – Ácido Ribonucleico

ROCK – Rockefeller

RRV – Rio Ross vírus

SAN – Santos

SEARO – Escritório Regional do Sudeste da Ásia

SES-SP – Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo

SNC – Sistema Nervoso Central

SUCAM – Superintendência de Campanhas de Saúde Pública

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias

SUSAM – Superintendência de Saneamento Ambiental

WNF – Oeste do Nilo vírus

WPRO – Escritório Regional do Pacífico Ocidental

YFV – Febre amarela vírus

ZIKV – Zika vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. RITMOS CIRCADIANOS	13
1.1.1. Fatores Genéticos do Relógio Circadiano	14
1.2. HISTÓRICO DO <i>Aedes Aegypti</i> : PRIMEIROS RELATOS EMPÍRICOS E CIENTÍFICOS DA TRANSMISSÃO DAS MOLÉSTIAS	16
1.2.1. Histórico no Brasil da Dengue e Febre Amarela	17
1.2.2. Febre Amarela: A Mazela do Brasil	18
1.2.3. Rio de Janeiro: E o Desafio de Oswaldo Cruz	18
1.2.4. A Vacina Antiamarílica	20
1.2.5. Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>	20
1.2.6. Reinfestação e Primeiro Relato de Resistência a Inseticidas	22
1.2.7. O Declínio do DDT	23
1.3. <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	24
1.4. OS ARBOVÍRUS	27
1.4.1. Vetor e Agente Etiológico: Evidência em Números	29
1.5. CONTROLE VETORIAL	30
1.5.1. Inseticidas: Tipos, Efeitos e Aplicações	32
1.5.2. Programas de Controle do <i>Ae. aegypti</i> no Brasil	34
1.6. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	35
1.7. ATIVIDADE LOCOMOTORA: DIFERENTES PERSPECTIVAS	39
2. OBJETIVOS	43
2.1. GERAL	43
2.2. ESPECÍFICOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. PERFIS POPULACIONAIS	44
3.2. CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS	44
3.3. EXPERIMENTO DE ATIVIDADE LOCOMOTORA: PROCEDIMENTOS	47
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4. RESULTADOS	50
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8. CURRÍCULO LATTES	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. RITMOS CIRCADIANOS

Os organismos, desde o princípio da vida, estão submetidos a variações cíclicas do ambiente, como, por exemplo, a presença e ausência de luz. Essa periodicidade está diretamente relacionada com a rotação da Terra no eixo solar. Diversas estratégias evolutivas foram adotadas pelos organismos a fim de suportar e explorar essas variações bruscas no tempo, bem como nas próprias mudanças sazonais do clima e temperatura (SAUNDERS, 2002).

Ciclos diurnos, noturnos e crepusculares, são observados em diversos insetos, mesmo naqueles que passam por períodos de estivação (estocar cargas) e hibernação. Com efeito, atividades como busca por alimentos, reprodução, oviposição e outras, raramente são desempenhadas todo o tempo, sendo concentradas em períodos ou ritmos específicos, denominados “fase”, de acordo com a espécie. Essas atividades comportamentais, além de estarem relacionadas ao ambiente, estão intimamente alinhadas às oscilações endógenas (SAUNDERS, 2002; TOMOTAMI & ODA, 2012). De modo geral, essas oscilações endógenas – ou ciclos circadianos (do latim *circa* = cerca, *diem* = dia) evoluíram em ciclos periódicos próximos de 24h (SAUNDERS, 2002; AMORETTY *et al.*, 2013).

Observações sobre ritmos circadianos são registradas desde a antiguidade. Em caráter científico, Thasos (325 a.C.), um historiador de Alexandre – o grande, observou o movimento circadiano das folhas de tamarindo *Tamarindus indicus* Linnaeus. No século XVIII, o naturalista e botânico Carolus Linnaeus (1707-1778) notou também que esta periodicidade no abrir e fechar das pétalas das flores, propondo um relógio de flor, que marca as horas do dia (AMORETTY *et al.*, 2013). Semelhantemente, uma descoberta feita por um estudo pioneiro realizado em 1729, pelo astrônomo, geofísico e cronobiologista francês Jean-Jacques d’Ortous de Mairan (1678-1771), mostrou a persistência dos movimentos de abrir e fechar de folhas da planta dormideira *Mimosa pudica* Linnaeus mesmo em condições de escuro constante.

Todos esses fenômenos descritos oferecem uma organização temporal independentemente de fatores externos, o chamado “período de livre-curso”. Na ausência dessa indicação temporal, o período endógeno do relógio se aproxima de um dia solar e a compensação pela variação da temperatura, bem como o ajuste e sincronia com as oscilações ambientais, fundamentam o termo “relógio circadiano” (SAUNDERS, 2002; AMORETTY *et al.*, 2013). Em 1971, o geneticista Ron Konopka (1947-2015) e o biofísico Seymour Benzer (1921-2007), verificaram que o funcionamento do relógio biológico estava relacionado com genes específicos, por meio de estudos realizados com a mosca-de-fruta *Drosophila melanogaster* Meigen. Resumidamente, o estudo foi realizado com linhagens de moscas-de-fruta que foram expostas a três mutagênicos distintos, resultando em três padrões de atividade locomotora. Foram relatados os grupos “*pershot*”, com ritmo diário menor que 24h (19h); “*perlong*”, com ritmo diário maior que 24h (29h) e “*per01*”, com padrão totalmente arritmico, por meio de mutações no gene *period*. Desta forma, o estudo elucidou a presença de fatores hereditários nas oscilações endógenas, sendo um produto da evolução, não imposto pelo ambiente, e esses osciladores exógenos, ou *Zeitgeber* (KONOPKA & BENZER, 1971). A palavra germânica *Zeitgeber* (do alemão *zeit* = tempo, *Geber* = doador), foi proposta na década de 50 pelo pesquisador e cronobiologista Jünger Aschoff (1913-1998) e engloba os indicadores ambientais que sincronizam o ciclo, compreendendo, principalmente, a variação de luz e escuro e temperatura, sendo o ciclo diário principal em seres vivos (MARQUES & MENNA-BARRETO, 1999; SAUNDERS, 2002; AMORETTY *et al.*, 2013).

1.1.1. Fatores Genéticos do Relógio Circadiano

Em insetos, os hábitos e atividades – característicos de cada espécie – são, normalmente, concentrados em um período do dia e estão sob influência dos fatores endógenos, frequentemente modulados pelos exógenos, resultando em uma mistura desses dois componentes. Estudos com *Anopheles gambiae* (Theobald) e *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann), mostraram um padrão de atividade noturna, com picos bimodais de atividade locomotora (SAUNDERS, 2002). TAYLOR & JONES

(1969), estudaram o padrão de atividade locomotora de *Ae. aegypti* – vetor de vírus que causam doenças como a dengue, febre amarela (FA), Zika e chikungunya, notando que, além do padrão ser diurno, os picos são bimodais, concentrados, principalmente, após o crepúsculo matutino, com maior intensidade no crepúsculo vespertino.

A natureza endógena que determina esses padrões nessas espécies é controlada por genes que transcrevem diversas proteínas. Os principais genes conhecidos, e que estão diretamente envolvidos nesses mecanismos, são *Clock* (*Clk*) e *cycle* (*cyc*) que, pela formação de um heterodímero (*Clk/cyc*), ativam a transcrição de *period* (*per*) e *timeless* (*tim*). Esses e vários outros genes do relógio circadiano estão organizados em pelo menos três alças autorregulatórias, compondo um sistema complexo, controlados pela ativação e fosforilação dos produtos transcritos. Tal sistema regulatório está associado com fatores abióticos (luz, temperatura) e bióticos (alimentação e interação social), ou seja, mais de um *Zeitgeber* está presente na sincronização do ritmo biológico. Uma outra proteína, ou fotopigmento, associada a esta sincronização, é chamada de *Cryptochrome* (*CRY*). Trabalhos com genes mutantes dessa proteína em *D. melanogaster* evidenciam a relação de erros na sincronização entre os ciclos de claro/escuro (RIVAS, 2012; AMORETTY *et al.*, 2013).

Em insetos vetores, o ritmo do hábito alimentar é determinado pelo relógio circadiano, determinando a ocorrência do contato com o hospedeiro, podendo transmitir patógenos (RIVAS, 2012). Em um estudo realizado com o vetor do parasito causador da doença de Chagas *Rhodnius prolixus* Stal, foi mostrado que o processo de ecdise é controlado por hormônios – os ecdisteróides – que se acumulam em um dia, mesmo em condições de escuro constantes (AMPLEFORD & STEEL, 1985; VAFOPOULOU & STEEL, 1991).

Estudos com mosquitos, como citado anteriormente, mostraram diferentes padrões de ritmos de atividades entre as espécies, influenciando o hábito alimentar delas (SAUNDERS, 2002). Todavia, estudos com técnicas moleculares foram desenvolvidos, a fim de explorar o comportamento dos genes do relógio circadiano, que ainda é pouco conhecido. GENTILE *et al.* (2006), por meio de análises moleculares de clonagem e pela técnica de Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), observaram que a expressão dos genes *tim* está completamente interligada

com a alimentação e com as condições de luminosidade. Um estudo comparativo entre *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* Say – mosquito de hábito noturno, vetor da filariose linfática e do vírus do leste do Nilo –, mostrou que apesar dos milhões de anos de evolução que os separam, essas espécies possuem regiões conservadas para todos os genes relacionados com as expressões circadianas. No entanto, um desses genes, *cry2*, pode estar fortemente relacionado aos diferentes padrões de atividade locomotora das duas espécies (GENTILE *et al.*, 2009). LIMA-CAMARA *et al.* (2011), em um estudo utilizando fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com o vírus dengue (DENV-2), mostraram a relação do relógio circadiano com a transmissão dessa doença, determinada pelo aumento na atividade locomotora desses indivíduos em relação ao grupo controle não infectado.

1.2. HISTÓRICO DO *Aedes Aegypti*: PRIMEIROS RELATOS EMPÍRICOS E CIENTÍFICOS DA TRANSMISSÃO DAS MOLÉSTIAS

Relatos envolvendo *Ae. aegypti* com a transmissão de vírus causadores de doenças foram observados entre 420 a 265 a.C. na dinastia chinesa e apontavam uma doença clinicamente semelhante a dengue, que envolvia locais alagados com a presença de insetos alados. Esses registros foram organizados em uma enciclopédia datada de 610 a.C. No século XVII houve surtos de doenças amplamente distribuídos que, por falta de comprovação, eram semelhantes à dengue ou ao vírus chikungunya, na Índia Francesa (1635) e Panamá (1699) (GUBLER, 1998).

Paralelamente, o primeiro relato de febre amarela – considerado pelos pesquisadores como a descrição de características da febre amarela silvestre (FAS) –, foi na Ilha de Guadalupe, feito pelo jesuíta Raymond Bréton (1609-1679) em 1635. Nele, Bréton informa que imigrantes apresentavam sintomas de icterícia, vômitos e aparência amarelada; apontou ainda, uma relação da derrubada de árvores com o agravamento nos casos (FRANCO, 1969). Não obstante, o trabalho do cientista Carlos Juan Finlay (1833-1915), de 1881, apontou que o *Ae. aegypti* – *Culex taeniatus*, na época –, era o vetor do vírus da FA desde 1801, mas sua teoria

não teve notável repercussão (CHRISTOPHERS, 1960). De 1780 a 1940, apesar da grande amplitude, as epidemias por dengue não eram periódicas. Todavia, no século XIX, surtos da doença eram considerados comuns em cidades de porto nas Américas e no arquipélago caribenho (GUBLER, 1998).

1.2.1. Histórico no Brasil da Dengue e Febre Amarela

Entre os anos de 1846 a 1853, houve relatos de epidemias de dengue no Brasil, em São Paulo e no Rio de Janeiro. Os registros, de caráter científico, relatam surtos em 1912 e 1916, em Curitiba e São Paulo, além do surto em Niterói (1923). Contudo, a primeira epidemia de dengue no Brasil ocorreu em 1982 na cidade de Boa Vista (RR), com os vírus DENV-1 e 4 isolados. A mobilização em massa na Segunda Guerra Mundial (1939-1945) contribuiu para tornar doenças como a dengue com característica pandêmica. O vírus foi isolado pela primeira vez por Kimura e Hotta, em 1943 e 1944 (BARRETO & TEIXEIRA, 2008; DICK *et al.*, 2012). A introdução do sorotipo DENV-2 no país, ocorreu na epidemia em Nova Iguaçu (1990), e em 2001 houve a introdução do sorotipo DENV-3 no Rio de Janeiro, causando a epidemia no ano seguinte. Os registros históricos das epidemias de dengue, desde então, têm exibido uma ocorrência periódica, com padrões sazonais (BARRETO & TEIXEIRA, 2008).

O relato mais acolhido sobre a introdução da FA no Brasil, datado de 1685, ocorreu em Recife, e a doença provavelmente foi trazida das Antilhas em uma nau francesa, a “Oriflamme”. Suposições anteriores a este registro são desconsideradas, pois por se tratar de uma moléstia com severas complicações, haveria algum registro feito pelos historiadores na época (FRANCO, 1969).

1.2.2. Febre Amarela: A Mazela do Brasil

Alicerçado na teoria de que a espécie de mosquito transmitia o vírus amarílico, proposta por Finlay, o médico sanitaria Emílio Marcondes Ribas (1862-1925) publicou em uma brochura a relação dos casos da doença com a presença do *Ae. aegypti*. No início do século XX, o país passava por diversas epidemias, principalmente na cidade de Santos, devido ao seu porto, e em pequenas cidades interioranas, como Sorocaba (FRANCO, 1969).

Em 1901, mesmo ano em que a espécie foi retirada do gênero *Culex* por Theobald, Emílio Ribas iniciou – antes até do médico William Crawford Gorgas (1854-1920) em Havana – a primeira campanha contra o vetor (SEVERO, 1955). Diversas diretrizes foram adotadas na campanha, e dentre elas, destacou-se o uso de produtos químicos, como querosene, para combater as formas aquáticas e inseticidas em pó, para o combate dos adultos. Essa campanha ficou conhecida pelo êxito obtido, mesmo que para o sanitaria se tratasse apenas de uma prevenção, e não “ataque” a uma epidemia. Campanhas de combate contra o vetor – já conhecido como *Stegomyia fasciata* –, foram realizadas em diversas cidades do Estado de São Paulo, nos anos de 1902 e 1903. Dentre as diversas técnicas, foi adotado o expurgo pela queima de enxofre, junto de uma solução à base de piretro, tetracloreto de carbono e querosene (PTQ) nas residências (SEVERO, 1955; FRANCO, 1969).

1.2.3. Rio de Janeiro: E o Desafio de Oswaldo Cruz

O Rio de Janeiro, assim como São Paulo, estava tomado por epidemias de febre amarela. Desta forma, semelhantemente ao objetivo de Emílio Ribas, o também médico sanitaria Oswaldo Cruz (1872-1917), após a ocupação do cargo de Diretor-Geral de Saúde Pública do Estado do Rio de Janeiro (1903), assumiu publicamente o compromisso de eliminar – em quatro anos – a FA em todo o Estado. Em uma coligação entre as esferas federal e municipal, regida por Oswaldo

Cruz, houve uma intensa e incansável mobilização. A campanha tinha como objetivo eliminar criadouros e destruir as larvas, isolar os doentes do vetor, queimar e expurgar o pó de piretro – o “pó-da-Pérsia” –, pó de enxofre e folhas de eucalipto dentro de todas as casas, para combater as formas aladas do vetor. Esta campanha, entre altos e baixos, findou, em 1907, a forma epidêmica da FA, configurando êxito; com total eliminação de casos e vestígios da doença, em 1909 (SEVERO, 1955; FRANCO, 1969; DICK *et al.*, 2012).

Em 1928, houve uma nova epidemia de FA no Rio de Janeiro, originária a partir do ciclo silvestre importado, previamente conhecido por ser transmitido por mosquitos do gênero *Haemagogus* sp. Somente anos mais tarde seria responsável por estabelecer o ciclo silvestre e autóctone do vírus, marcado pelo primeiro surto ocorrido no Vale do Canaã (ES), em 1932 (FUNASA, 2001). Entretanto, a conduta do Estado do Rio de Janeiro para combater o mosquito *Ae. aegypti* e controlar os casos estava mais robusta e intensa, por conta da memória da campanha anterior. Mesmo com essa resiliência de contatos passados, a epidemia cessou somente dezessete meses depois de seu início (SEVERO, 1955; FRANCO, 1969). Por muitos anos, houve diversas parcerias do governo brasileiro com a Fundação Rockefeller em outros estados além do Rio de Janeiro, visando a vigilância e combate do vetor da febre amarela. A demanda gerada pela doença promoveu diversas renovações nos contratos com a Fundação, sendo estendidos até 1939, e conferindo, consequentemente, êxito no combate à doença (FRANCO, 1969).

De 1939 em diante campanhas de combate ao *Ae. aegypti* no país ganharam novas perspectivas. Mesmo com toda a barbárie cometida no período da Segunda Guerra Mundial, a formulação do composto químico dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), pelo químico suíço Paul Hermann Müller (1899-1965), em 1939, foi muito utilizada para combater piolhos vetores de Tifo em soldados. O DDT foi também um respaldo para novas abordagens no combate de artrópodes, tanto na esfera agrícola quanto na saúde pública. A utilização do composto foi iniciada, ao que tudo indica, na Bolívia e, posteriormente, em diversos outros países, incluindo o Brasil (SEVERO, 1955; RAJU, 1999; DICK *et al.*, 2012).

1.2.4. A Vacina Antiamarílica

Em 1937, teve início a produção da vacina contra a febre amarela no Rio de Janeiro, oriunda de uma amostra de vírus feita pela Fundação Rockefeller, em Nova Iorque, e trazida pelo Dr. Hugh Hollingsworth Smith. A produção foi baseada em duas séries de culturas de tecido, conhecidas como 17D e 17DD, sendo a última referente à 229ª subcultura. A eficácia da vacina foi comprovada em um estudo e, desta forma, a produção foi realizada pelo Instituto Oswaldo Cruz, utilizando a cepa 17D. Inicialmente, contaminações no preparo do composto resultaram em alguns casos de icterícia em pacientes (BENCHIMOL, 2001).

Em 1940, foi realizado um estudo na cidade de Pouso Alegre, MG – pois tratava-se de uma região livre do vírus amarílico –, a fim de testar a eficácia da vacina de maneira ampliada. Mais de cinco mil pessoas foram vacinadas e, após um mês, testes sorológicos foram realizados com uma amostra dessa população e observou-se a presença de anticorpos neutralizadores em 100% dos envolvidos no estudo. Intervalos de coletas foram realizados em frações da população original, mostrando que, mesmo após dezessete anos, 97% das pessoas vacinadas apresentavam níveis consideráveis de anticorpos. Após trinta e um anos de campanha, mais de quarenta e dois milhões de pessoas foram vacinadas em todo país (FRANCO, 1969; BENCHIMOL, 2001).

1.2.5. Erradicação do *Aedes aegypti*

Até 1935, não havia qualquer menção ou plano de erradicação do *Ae. aegypti*, pois tal objetivo era entendido como uma tarefa inalcançável. Contudo, desde o início da década de 1930, havia um incentivo, por meio da Fundação Rockefeller, para o combate do vetor, movido pelo ímpeto nas campanhas contra a febre amarela. Entretanto, paralelamente a isto, a preocupação com a expansão da malária pelo vetor *An. gambiae* fez com que a Fundação Rockefeller concentrasse

suas atividades na região norte do país – principalmente na região da Amazônia – descontinuando a profilaxia contra a FA (FRANCO, 1969).

Para que houvesse sucesso na erradicação do *Ae. aegypti*, países da América do Sul, incluindo o Brasil, teriam de adotar as mesmas medidas de combate ao vetor, somando forças de maneira sincronizada. Desta forma, em 1941, o epidemiologista americano Frederick Lowe Soper (1893-1977), notório pela coordenação do Programa Global de Erradicação da Malária, se encarregou de negociar acordos com países limítrofes do Brasil, visando cooperação e principalmente a mobilização de técnicos e especialistas (MAGALHÃES, 2016).

Por se tratar de um período marcado por diversas mobilizações, conflitos de interesse decorrentes da guerra, além de diversas epidemias por outras doenças, só foi possível instaurar a Campanha Continental para a Erradicação do *Aedes aegypti* em 1947, popularmente conhecida como “Era Soper de erradicação” (MAGALHÃES, 2016).

Nesta campanha, a erradicação do *Ae. aegypti*, entre outras estratégias, foi gerida pelo uso intenso de DDT. Esse inseticida, utilizado anteriormente em campanhas contra malária e doença de Chagas, teve um protagonismo fundamental contra o *Ae. aegypti*. Assim, todos os países envolvidos nessa ação conjunta, foram “lavados” por este organoclorado, considerado um inseticida versátil. Ele combatia tanto formas imaturas quanto as aladas do vetor, principalmente pelo alto nível de suscetibilidade que as populações de mosquitos tinham pelo inseticida.

O último foco do *Ae. aegypti* no Brasil foi registrado em 1955, no município de Santa Terezinha, BA. (FRANCO, 1969; MAGALHÃES, 2016). Desta forma, em 1958, por meio da Resolução XXXV, a XV Conferência Sanitária Pan-Americana, concedida pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), declarou o Brasil livre da presença do vetor, assim como outros países fronteiriços (MAGALHÃES, 2016).

1.2.6. Reinfestação e Primeiro Relato de Resistência a Inseticidas

Em um estudo feito nos anos de 1955 e 1956, foi constatado o surgimento de resistência ao DDT em populações naturais de *Anopheles sundanicus* (Cellia) – vetor primário da malária –, na ilha de Java, Indonésia (CHOW & SOEPARMO, 1957). O primeiro relato de resistência ao DDT em *Ae. aegypti*, ocorreu um ano depois, na cidade de Cúcuta, México. Como alternativa, o inseticida dieldrina, da mesma classe do DDT, foi utilizado no combate ao vetor em todo país. Assim, em 1963, México e outros países próximos ganharam o certificado da OPAS pelo sucesso na erradicação do *Ae. aegypti*. Entretanto, houve reinfestação por essa espécie de mosquito no México no mesmo ano, colocando à prova todo o sistema de monitoramento. Adicionalmente, a defasagem dos serviços de controle e vigilância possibilitou a reinfestação do mosquito nos demais países da América do Sul (MAGALHÃES, 2016).

No Brasil, em decorrência dos mesmos fatores dos países vizinhos, ou seja, precarização dos serviços de controle, grande fluxo de pessoas e comércio, dentre outros, as primeiras reinfestações por *Ae. aegypti* ocorreram em Belém (PA) e São Luiz (MA), em 1967 e 1968, respectivamente (PONTES & RUFFINO-NETTO, 1994). Em seguida, houve reinfestação em Salvador (BA), em 1977, e no Rio de Janeiro (RJ), em 1978. Em um curto período de tempo, já havia a presença do mosquito em 42 municípios do país. Na década de 90, somavam mais de 480 municípios brasileiros, incluindo São Paulo e Santos (PONTES & RUFFINO-NETTO, 1994).

1.2.7. O Declínio do DDT

Nas décadas de 1960 e 1970, foram produzidas em torno de 80 mil toneladas de DDT pelos Estados Unidos, destinadas somente à exportação. Além do uso nos programas de controle, o DDT era empregado indiscriminadamente no controle de pragas agrícolas, e, apesar da versatilidade do composto e toxicidade moderada, tinha longa ação residual. Livros como “Primavera Silenciosa”, de Rachel Carson (1907-1964), em 1962, atrela essa ação residual, portanto causa e efeito, à diminuição de muitas aves de topo de cadeia alimentar (D’AMATO *et al.*, 2002). Em decorrência de diversos relatos e estudos evidenciando os malefícios do composto químico, a Suécia, em 1970, banuiu sumariamente a aplicação do DDT em todo território.

No Brasil, em 1971, houve as primeiras restrições na utilização do inseticida, seguida da efetiva proibição, em 1985, no âmbito agropecuário, devido à sua ação residual incorporada na carne e no leite de origem bovina. Como resultado, houve prejuízos na exportação desses produtos. Ademais, a proibição baseou-se no fato de que o acúmulo do efeito residual em longos períodos no ambiente contaminou a biota, ecossistemas aquáticos, marinhos e dulcícolas, além de causar danos no Sistema Nervoso Central (SNC) humano. Dessa forma, o emprego do inseticida ficou restrito aos programas de combate a vetores, principalmente ao *Anopheles* sp. Desde 1995, a OMS, juntamente com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), padronizou diretrizes muito específicas para o uso do DDT, dentre elas o uso exclusivo em interiores de ambientes e a priorização do uso de inseticidas alternativos, a fim de evitar o surgimento de resistência em insetos (BRASIL, 1985; D’AMATO *et al.*, 2002).

1.3. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

Originalmente descrito no Egito, o *Ae. aegypti* é considerado um mosquito cosmopolita, sendo encontrado principalmente em regiões de clima subtropical e tropical, dentro de zonas isotérmicas acima de 20° centígrados. Por se tratar de uma espécie exótica, foi trazida para o Brasil em embarcações de tráfico de escravos e, pelo mundo todo, acompanhou passivamente a expansão humana, sendo conduzido por carros, trens, aviões e, principalmente, por transportes marinhos. Esta convivência longa com humanos contribuiu para a expansão da espécie e rápida adaptação a novos ambientes (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

O mosquito se tornou ecologicamente adaptado em conglomerados urbanos, no que diz respeito à reprodução, deslocamento por meio do voo e alimentação. Ele possui hábitos crepusculares e as fêmeas são hematófagas, de hábito preferencialmente antropofílico, e, muitas vezes, restringem seu ciclo quase que exclusivamente dentro das casas, mantendo a proximidade com humanos. Em virtude disso e da densidade demográfica, a dispersão do *Ae. aegypti* por meio do voo raramente ultrapassa 50 metros, contudo, em áreas montanhosas, rodovias, entre outras, o raio de dispersão pode ultrapassar 500 metros (FIOCRUZ, 2018a; HONÓRIO *et al.*, 2009; DZUL-MANZANILLA *et al.*, 2016).

Pelo repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito obtém, além de energia, diversos aminoácidos que são fundamentais para maturação dos oócitos. Em cada ciclo de oviposição, há, geralmente, um repasto, caracterizado pela concordância gonotrófica; todavia, a discordância é frequente em *Ae. aegypti* e tem sido observada em diversos estudos (PUTNAM & SCOTT, 1995; BARATA *et al.*, 2001; BERMUDI *et al.*, 2017).

Os criadouros escolhidos para oviposição são, geralmente, artificiais e com vasta ramificação, abrangendo qualquer recipiente – preferencialmente de coloração escura – ou objeto que possa se tornar um reservatório de água, englobando desde pneus, caixas d'água, até tampas de garrafa, calhas, entre outros. A condição desses criadouros se caracteriza pela disposição de água parada, sendo turva ou

translúcida – exceto efluente líquido –, com oferta de matéria orgânica e abrigados da luz. Há registro de criadouros de *Ae. aegypti* também em internódio de bambus, bromélias e até mesmo em oco de troncos de árvores (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; BERMUDI *et al.*, 2017).

A fêmea, quando não infectada, vive entre 30 e 50 dias e produz 1500 ovos, em média, durante toda sua vida, providos, geralmente, de um único cruzamento (FIOCRUZ, 2018b). Ela deposita seus ovos, de formato elíptico, na margem do recipiente e a eclosão das larvas é estimulada pela umidade local (SIMARD *et al.*, 2005). As condições de alimentação, competição, temperatura e predação vão determinar o tempo de desenvolvimento dos estágios de vida do mosquito, variando de cinco a dez dias, em temperaturas maiores que 25°C (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). O ciclo de vida da espécie é holometábolo, ou seja, apresenta desenvolvimento completo, constituído das fases aquáticas – ovo, larva (estádios L1 a L4) e pupa – e fase terrestre, representada pelo adulto alado (**Figura 1**). A larva, ao eclodir, migra para a coluna d'água e se alimenta da matéria orgânica disponível no local. Nos estádios L1 a L4, ela possui respiração sifonada e mobilidade ativa. A fase de pupa não se alimenta, possui mobilidade reduzida e respiração através de um par de trompetas (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). O adulto emerge da pupa pelo cefalotórax da mesma, iniciando seu ciclo sexual em 24h (FUNASA, 2001). SILVA & SILVA (1999) avaliaram a taxa de eclosão de ovos em diversos períodos de quiescência que variou de 3 a 492 dias, ainda viáveis. Ovos com 120 dias mostraram uma taxa de eclosão de 97%.

Aedes aegypti possui características na identificação, como tons castanhos, pernas com listras brancas, tórax e clipeo com escamas branco-prateadas, além de faixas formando uma figura de “lira”, característica considerada conspícua que separa morfologicamente a espécie (**Figura 2**) (FORATTINI, 2002).

Figura 1 – Ciclo de vida do *Ae. aegypti*.

Fonte: Schmandt-Besserat *et al.*, 1978.

Figura 2 – Faixas formando uma figura de “lira” característica conspícua da espécie *Ae. aegypti*.

Fonte: Urbinatti, P.R.

1.4. OS ARBOVÍRUS

Alguns arbovírus, termo abreviado do inglês “*arthropod borne virus*”, são vírus transmitidos por artrópodes pertencentes às famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae*. A família *Flaviviridae* (do latim *flavus* = amarelo), recebeu esse nome pela cor amarelada que os indivíduos com febre amarela apresentavam nos sinais clínicos. Em média, 70 patógenos virais dessa família causam doenças graves em animais e humanos. Estes estão descritos nos gêneros *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Flavivirus*. Os arbovírus da dengue (DENV 1-4), febre amarela (YFV), encefalite japonesa (JEV), Zika (ZIKV) e febre do nilo ocidental (WNV), pertencem ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (SCHMALJOHN & MCCLAIN, 1996; HUNSPERGER, 2012; HUANG, *et al.*, 2014; CDC, 2018).

A família *Togaviridae*, representada pelos gêneros *Rubivirus* e *Alphavirus*, possui em média 27 patógenos, representados principalmente pelo vírus que causa a febre de Mayaro (MAYV), vírus chikungunya (CHIKV) e febre do Rio Ross (RRV). Todos os vírus citados compartilham a mesma via de transmissão, os culicídeos, principalmente representantes das tribos Aedini, Culicini e Sabethini. Estes vírus possuem RNA de fita simples, nucleocapsídeo icosaédricos, tipo “bola de futebol”, envelope lipoproteico, com tamanhos de 40-50 nm e 30-70nm para *Flavivirus* e *Alphavirus*, respectivamente (SCHMALJOHN & MCCLAIN, 1996).

O vírus Zika, sendo isolado pela primeira vez em macacos rhesus no final da década de 40, é originário da floresta Zika, em Uganda (DICK *et al.*, 1952). Casos esporádicos eram reportados na Ásia e na África, porém, somente em 2007 houve o primeiro surto fora destes locais, nas ilhas Yap, Micronésia e uma grande epidemia na Polinésia Francesa, em 2013. No Brasil, o primeiro caso autóctone, confirmando a introdução do vírus Zika no país – proveniente de uma cepa do Pacífico –, foi na cidade de Camaçari, BA (2015). No mesmo ano, outros estados da região Nordeste, sobretudo Rio Grande do Norte e Pernambuco, tiveram casos confirmados, e desde então o vírus está presente em todas as Unidades Federativas do país (ZANLUCA *et al.*; CAMPOS *et al.*, 2015). Em 2016, o vírus foi responsável por mais de 200 mil casos confirmados, com oito óbitos (BRASIL, 2017). Além de apresentar sintomas

como febre, exantemas, dor muscular, entre outros, o vírus está relacionado como agente causal em diversas malformações como meningoencefalite, encefalomielite aguda, síndrome de Guillain-Barré, sendo qualquer uma dessas descrita como Síndrome Congênita, atingindo o SNC de fetos (RIBEIRO *et al.*, 2017).

De origem africana, o CHIKV foi originalmente isolado em 1956, na Tanzânia (FILIPE & PINTO, 1973). A palavra chikungunya – derivada de “kungunyala” –, significa “aqueles que se dobram”, na linguagem Makonde, pois se refere à aparência curvada de pacientes que sofrem por severas artralgias. *Aedes albopictus* (Skuse) é o vetor primário em diversas localidades banhadas pelo Oceano Pacífico, pois se trata de uma espécie que se adapta tanto em ambiente rural quanto urbano (SWAROOP *et al.*, 2007). No Brasil, o primeiro caso autóctone da doença foi confirmado em setembro, no município de Oiapoque (AP), seguido de Feira de Santana (BA), em 2014. Até o final deste ano, foram confirmados mais de 2 mil casos, abrangendo cinco Estados brasileiros (BRASIL, 2015). Em 2016, foram registrados mais de 260 mil casos prováveis de febre chikungunya, com 196 óbitos confirmados, principalmente em grupos acima dos 60 anos de idade (BRASIL, 2017).

No Estado de São Paulo, surtos periódicos de FAS foram notificados e confirmados desde o início dos anos 2000. Como destaque, a presença do vírus foi confirmada em quatro casos seguidos de óbitos, dois em 2000 e dois em 2008, além de 28 casos confirmados, com 11 óbitos em 2009 (CVE, 2018a).

Recentes notificações de epizootias ocorreram em diversos municípios do Estado de São Paulo no biênio de 2016 (32 notificações) e 2017 (108), ocasionando a morte de diversos primatas não-humanos (PNH) dos gêneros *Alouatta* sp. (bugio), *Sapajus* sp. (macaco-prego) e *Callithrix* sp. (sagui). Como destaque, houve ocorrência de epizootia em plena praça pública (Praça Camões), por um macaco do gênero *Callithrix* sp. no interior de Ribeirão Preto em 2016 (COSEMS-SP, 2018), além das que ocorreram no Parque Estadual da Cantareira, zona norte de São Paulo em 2017. Essas áreas compartilham uma configuração semelhante de grande concentração de populações humanas e de *Ae. aegypti* (CVE, 2018b).

A recente reemergência da febre amarela no Brasil, proveniente do ciclo silvestre, foi responsável – desde junho de 2017 até o momento – por mais de 700 casos confirmados, vitimando mais de 230 pacientes (BRASIL, 2018). Contudo, não

há, até o presente momento, transmissão confirmada por populações selvagens do mosquito *Ae. aegypti*, mesmo com estudos apontando a suscetibilidade de algumas populações em transmitir o vírus amarelo. É conhecido que os principais vetores de FAS são *Haemagogus janthinomys* Dyar / *capricornii* (Lutz) e *Sabethes chloropterus* Von Humboldt. Os mosquitos das tribos: Aedini (gêneros *Aedes*, *Haemagogus* e *Psorophora*) e Sabethini (gênero *Sabethes*, que dá nome à tribo) são potenciais vetores de FAS (FORATTINI, 2002). Estudos recentes apontam que tanto *Haemagogus (Conopostegus) leucocelaneus* (Dyar & Shannon) quanto *Sabethes (Sabethes) albiprivus* Theobald são os mosquitos silvestres mais suscetíveis para as três cepas circulantes do vírus (COUTO-LIMA *et al.*, 2017).

1.4.1. Vetor e Agente Etiológico: Evidência em Números

O *Aedes aegypti* é um mosquito hematófago de hábitos essencialmente urbanos e comumente relacionado como vetor de diversos patógenos. Os vírus dengue (HALSTEAD, 1993), Zika (MARCHETTE, 1969), chikungunya (FILIPE & PINTO, 1973) e da febre amarela (CHRISTOPHERS, 1960) são transmitidos ao ser humano principalmente pela picada da fêmea infectada desta espécie, e são compreendidos por arbovírus (FORATTINI, 2002; KANTOR, 2016).

A dengue é uma doença endêmica em diversos países, com notável número de casos todos os anos (**Figura 3**). Em razão das altas taxas de prevalência da doença na população, estimou-se, em um estudo, que quase 4 bilhões de pessoas estão em risco de infecção, em 128 países (BRADY *et al.*, 2012). BHATT *et al.* (2013), estimam que 390 milhões de pessoas estão em risco de infecção, todos os anos.

No Brasil, a dengue está presente em todas as Unidades Federativas. Em 2015, devido a uma grande epidemia, o arbovírus foi responsável por mais de 1,6 milhões de casos, com quase mil óbitos decorrentes do quadro severo da doença. As porcentagens de casos e óbitos por dengue no Estado de São Paulo representaram, respectivamente, 62% e 65% do total, sendo considerada a principal

doença humana transmitida por um vetor e um problema de saúde pública (BRASIL, 2017).

Figura 3 – Número de casos de dengue suspeitos ou confirmados por laboratório, notificados à OMS entre 1990 a 2015. AMRO: Escritório Regional das Américas; SEARO: Escritório Regional do Sudeste da Ásia; WPRO: Escritório Regional do Pacífico Ocidental.

Fonte: Adaptado de OMS (2018) <<http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>>

1.5. CONTROLE VETORIAL

O desenvolvimento de diversas vacinas foi essencial para o combate de inúmeras doenças, como a da febre amarela, que se tornou um marco histórico por minimizar grandes epidemias e diminuir drasticamente o número de casos, principalmente em países da América do Sul. Todavia, a dengue é um exemplo de doença que não possui uma vacina totalmente eficaz até o momento, apesar de ser responsável por grandes números de casos e óbitos todos os anos (BRAGA & VALLE, 2007a).

Por conta disso, o controle vetorial é uma estratégia extremamente importante e está diretamente relacionado à diminuição da transmissão de doenças. Algumas diretrizes adotadas são baseadas na prevenção de epidemias, redução de fatores

de risco e/ou que possibilitem a reintrodução de doenças. Para isso, essas diretrizes, preconizadas pelo Ministério da Saúde, criaram modelos eficientes no controle do vetor. Para o controle do *Ae. aegypti*, são realizadas estratificações nos diversos municípios, de acordo com o Levantamento Rápido do Índice de Infestação (LIRAA), por meio da análise de densidade larval (ADL), conforme metodologia determinada pelo Índice de Breteau, realizado em intervalos trimestrais. Nesse levantamento, são realizados diversos trabalhos de campo a fim de verificar o grau de infestação na localidade, e as informações são tabuladas de acordo com a presença das formas imaturas e aladas do vetor. Por se tratar de uma espécie endêmica, ações de rotina são desempenhadas todo o ano.

Segundo as diretrizes propostas, o controle vetorial é dividido em quatro principais métodos. O controle mecânico que visa, resumidamente, eliminar ou realocar adequadamente criadouros, sendo supervisionado pelos Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Controle de Endemias (ACE), com a autorização do proprietário do local. A coleta de lixo sólido, além de incentivar a reciclagem, está diretamente ligada ao controle de mosquitos (BRAGA & VALLE, 2007a; BRASIL, 2009). O controle biológico pode ser empregado de maneiras distintas. A primeira é realizada por meio de larvas predadoras aquáticas como *Toxorhynchites* sp., ou peixes dos gêneros *Trichogaster*, *Betta* e *Poecilia*, no controle das formas imaturas do *Ae. aegypti* (CAVALCANTI *et al.*, 2007; SENG *et al.*, 2008; BRASIL, 2009). A segunda utiliza propriedades bioquímicas de microrganismos como os fungos *Lagenidium giganteum* Couch e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, bem como as bactérias *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (Meyer & Neide) (Bs), são também utilizados como ferramentas de controle (BRAGA & VALLE, 2007a; BRASIL, 2009). A responsabilidade do proprietário pela manutenção, limpeza e autorização da atividade do imóvel pelos Agentes, está dentro das diretrizes do controle legal.

1.5.1. Inseticidas: Tipos, Efeitos e Aplicações

O método mais utilizado ainda para controle de vetores, seja em períodos de altas ou baixas infestações, está debruçado no uso de inseticidas químicos. Essa medida de controle visa adotar compostos orgânicos ou inorgânicos, de efeito residual e que permanecem ativos por longos períodos (BRAGA & VALLE, 2007a). Assim como o DDT foi utilizado desde o período da Segunda Guerra Mundial – e posteriormente banido pela toxicidade e longa ação residual –, outras classes de inseticidas foram desenvolvidas como medida alternativa no combate a vetores, sobretudo em populações que apresentaram resistência ao DDT (FRANCO, 1969; MAGALHÃES, 2016). Atualmente, além da classe dos organoclorados (OC), a eliminação das formas imaturas e aladas de diversos artrópodes e, principalmente, de mosquitos vetores, é efetuada por agentes químicos da classe dos organofosforados (OP), carbamatos (CA) e piretróides (PY). A diluição e método de aplicação são baseados em normas técnicas preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2009).

Os organoclorados atuam no canal de sódio e voltagem (Na_v), localizado na região do axônio, mais precisamente na bainha de mielina, em mosquitos e em outros organismos. Sob efeito da molécula do inseticida, o sítio-alvo permanece na configuração aberta, desestabilizando o equilíbrio e passagem de íons de sódio e potássio (BRAGA & VALLE, 2007a).

Os organofosforados possuem o fósforo como molécula base e, diferentemente dos OC, são biodegradáveis e não cumulativos no organismo. Contudo, possuem maior instabilidade química e são mais tóxicos que os organoclorados. Essa classe de inseticida é utilizada principalmente na eliminação das formas imaturas, fosforilando a Acetilcolinesterase (AChE) – uma molécula localizada entre os tecidos celular e nervoso – permanentemente. Isto impede que a Acetilcolina (Acetyl-COA) seja degradada, interrompendo o potencial de ação ao neurônio seguinte (WARE & WHITACRE, 2004; BRAGA & VALLE, 2007a).

Derivados de ácido carbâmico, os carbamatos são semelhantes aos OP, tendo como principal diferença a reversibilidade da inibição da AChE que é causada pela

hidrólise na molécula do inseticida entre 12h a 48h *in vivo* (CALDAS, 2000; WARE & WHITACRE, 2004; BRAGA & VALLE, 2007a).

A substância base na classe dos piretróides é a molécula de piretro, inicialmente extraída da planta *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Trevir.). De maneira industrialmente evolutiva, os PY tiveram quatro gerações, sendo a aletrina (1949) a primeira geração, e a tetrametrina (1965), a resmetrina (1967), a bioresmetrina (1967), a bioaletrina (1969) e a phonotrina (1973), abrangendo a segunda geração. A permetrina (1972-3), da terceira geração, foi muito utilizada como pesticida agrícola. Por fim, a quarta e atual geração, contempla a cipermetrina, deltametrina, ciflutrina, entre outros compostos. Similarmente ao DDT, os PY atuam no canal de sódio e voltagem (WARE & WHITACRE, 2004; BRAGA & VALLE, 2007a). Segundo SODERLUND (2008), o canal de sódio e voltagem, é codificado em um *loci* do cromossomo III e é constituído por quatro domínios (I-IV) com seis hélices transmembranas (S1-6), por domínio (**Figura 4**).

Figura 4 – Topologia da estrutura transmembranal do canal de sódio e voltagem. A subunidade α formadora do poro, consiste em uma cadeia polipeptídica simples, formada por quatro domínios homólogos internos (I-IV), sendo cada um constituído por seis hélices transmembranas (S1-S6). Cada domínio se alinha, formando um poro aquoso central (PD), cercado pelas hélices S5 e S6, com “linkers” (P-loops). As hélices S1 e S4 são responsáveis pela parte sensível à voltagem do canal e se arranjam formando quatro domínios independentes (VSD). (Somente dois são mostrados na figura). A tensão de ativação do canal depende do movimento dos quatro segmentos S4, carregados positivamente.

Fonte: adaptado de DAVIES *et al.* (2007).

De maneira geral, todas as classes de inseticidas apresentadas têm o SNC como alvo em comum e, de maneira rápida, causam o efeito conhecido como

“*knockdown*”, ou “efeito de queda” e morte nos mosquitos (WARE & WHITACRE, 2004; BRAGA & VALLE, 2007a). Cronologicamente, o temefós (OP) foi o primeiro a ser utilizado em todas as Unidades Federativas do Brasil, desde a década de 80. Ele foi utilizado para controlar a população larvária de *Ae. aegypti*, sendo utilizado paralelamente com a pulverização do malathion (OP), iniciada em 1985. Somente no Estado de São Paulo, o uso do piretróide (cipermetrina) foi iniciado em 1989. Em 1999, o malathion caiu em desuso em todos os estados, sendo substituído por PY, como adúltica (MACORIS *et al.*, 2007).

1.5.2. Programas de Controle do *Ae. aegypti* no Brasil

Em todas as campanhas visando o combate da febre amarela e erradicação do *Ae. aegypti* no século XX, diversos departamentos e instituições foram criados no intuito de fomentar diferentes metodologias. A criação do Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERu), em 1956, tinha como objetivo combater os vetores da febre amarela e da malária no país. Em 1967, a Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) foi criada, absorvendo as funções da DENERu, além de coordenar o Programa Nacional do Controle da Febre Amarela e Dengue. Quase trinta anos depois, as ações de controle da dengue foram coordenadas pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), antiga SUCAM, em 1990. Mais tarde, o Ministério da Saúde criou o Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (1996). Entretanto, o plano só foi capaz de programar as ações preconizadas, tendo como principal fracasso a falta de adesão de maneira unificada pelos municípios, sendo extinto em 2001 (BRAGA & VALLE, 2007b).

Nesse hiato cronológico, o uso de PY por órgãos governamentais foi descontinuado em 2001 diante da evidente ineficiência do produto, principalmente pela resistência em populações de *Ae. aegypti* ao composto (SUCEN, 2006; MACORIS *et al.*, 2018). Como estava clara a impossibilidade de erradicação do mosquito, em 2002, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) foi instaurado, focando na vigilância epidemiológica, principalmente em prever cenários de surtos (BRAGA & VALLE, 2007b; FUNASA, 2018).

Em São Paulo, foi criada a Superintendência de Saneamento Ambiental (SUSAM), na década de 70. A ela, foi atribuída a coordenação de programas de saneamento ambiental, combate de vetores e hospedeiros intermediários, tendo em vista o controle ou erradicação de endemias. Em 1975, ela foi segmentada, originando a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) e a Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Básico e de Controle de Poluição das Águas (CETESB). À SUCEN, uma autarquia do Governo do Estado, foi incumbida de coordenar os programas de vigilância e controle de doenças veiculadas por vetores, sobretudo do *Ae. aegypti* a partir da década de 80, e a estatal (CETESB) ficou encarregada da coordenação dos programas de saneamento, controle da poluição do ar, entre outros (SUCEN, 2006).

A resistência a inseticidas em populações brasileiras de *Ae. aegypti* é observada desde 1994. Em razão disso, foi instaurado o monitoramento da suscetibilidade de populações de *Ae. aegypti* a inseticidas, pela SUCEN. Desde 1996, esse monitoramento tem como objetivo coletar populações dessa espécie de mosquito, em municípios sentinela, ou seja, aqueles que possuem registros de epidemias frequentes de dengue, como Santos, Campinas, Marília, Barretos, Ribeirão Preto, entre outros. Uma vez coletados, os mosquitos são colonizados em laboratório e, utilizando inseticidas, são submetidos a testes de bioensaios, para avaliar o grau de suscetibilidade dessas populações. O Laboratório de Entomologia Aplicada, na Regional de Marília-SP, está, até o presente momento, encarregado desse monitoramento (SUCEN, 2006; MACORIS *et al.*, 2014). Com diversas populações de mosquitos apresentando resistência pela pressão seletiva que muitos agentes químicos favorecem, a FUNASA, em 1999, estabeleceu um programa nacionalmente integrado de monitoramento de resistência a inseticidas em *Ae. aegypti* (BRAGA *et al.*, 2004).

1.6. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A resistência é definida como uma característica herdada que confere uma tolerância aumentada ao pesticida, ou grupos de pesticidas, de modo que os indivíduos resistentes sobrevivem a uma concentração dos compostos que seriam, naturalmente, letais para a espécie (OMS, 1992, p. 2).

Em vetores de arbovírus, os mecanismos de resistência a inseticidas estão atrelados a processos microevolutivos, de modo que a população de mosquito sofre uma pressão seletiva do ambiente. Desta forma, mutações pontuais em genes são selecionadas e alteram a composição da molécula-alvo do inseticida, ocorrendo de maneira hereditária. Como se trata de uma característica herdável, ou seja, em células diploides, o processo inicia-se em pequenos grupos de indivíduos heterozigotos, podendo gerar, após algumas gerações, indivíduos homozigotos para determinada mutação. Consequentemente, os indivíduos homozigotos resistentes, quando expostos aos agentes químicos, possivelmente irão sobreviver a este ambiente modificado, caracterizando essa mutação como uma vantagem nas demais populações suscetíveis. É importante destacar que mesmo em indivíduos heterozigotos, o gene selvagem, ou seja, inalterado, tem caráter dominante, expressando o fenótipo suscetível (HEMINGWAY & RANSON, 2000; BRAGA & VALLE, 2007a).

A ocorrência dessas mutações é aleatória, inespecífica e resultante de erros genéticos, cujo efeito causado no indivíduo – de natureza deletéria ou benéfica – será, portanto, direcionada de acordo com o fator ambiental que o mosquito estará exposto. Existem três principais tipos de alterações de mecanismos. Em primeiro, a de penetração, reduzindo a quantidade de moléculas de inseticida absorvidas, que é caracterizada pela presença de um tegumento mais espesso e de caráter lipídico, localizado na superfície de contato das pernas do mosquito, dificultando a penetração de doses letais do agente químico (HEMINGWAY & RANSON, 2000; BRAGA & VALLE, 2007a). ARIARATNAM & GEORGHIOU (1975), avaliaram os níveis de penetração no tegumento de larvas de *Anopheles albimanus* Wiedemann, utilizando o inseticida propoxur (CA), e observaram que a taxa de absorção do CA nas linhagens resistentes foi duas vezes menor do que nas linhagens suscetíveis. Contudo, não ficou clara a atuação dos mecanismos nesse processo.

Em segundo, a resistência metabólica, envolvendo diversos mecanismos – de natureza enzimática – no sistema regulador, transformando o agente químico em moléculas de teor menos tóxico. Existem dois tipos de alterações: as que aumentam a produção de determinada enzima e as que aumentam a capacidade da enzima de degradação. Alguns grupos, como as Esterases (EST), Glutathione-S-Transferases (GST) e Oxidases de Função Mista (MFO), são discriminados por apresentarem

alterações, providas de mutações, conferindo esse aumento na degradação de xenobióticos (BROGDON & MCALLISTER, 1998; BRAGA & VALLE, 2007a).

Em terceiro, a alteração do sítio-alvo, caracterizada pela alteração do gene codificante da molécula alvo, impossibilitando a ligação com a molécula do inseticida. A Acetilcolinesterase (AChE) é sítio-alvo do OP e CA, assim como OC e PY vão atuar no Nav. O efeito de resistência a essas classes que diminui a sensibilidade aos inseticidas é conhecido como “*knockdown resistance*” (*Kdr-resistance*), ou efeito de resistência à queda (BRACCO & BARATA, 1998; BRAGA & VALLE, 2007a; SILVA, 2011; BATISTA, 2012).

Desde a descrição do gene *paralysis* ou “*para*” – referente à localização no *locus* do cromossomo X –, em *D. melanogaster*, foi possível entender o tipo do mecanismo envolvido na resistência do canal de sódio e voltagem em outros artrópodes (LOUGHNEY *et al.*, 1989).

Um estudo realizado com *Musca domestica* Linnaeus mostrou que a resistência a inseticida, do tipo *Kdr*, era proveniente de uma mutação não sinônima no gene e, ao transcrever a trinca do códon do mRNA, houve a substituição, traduzindo a proteína Fenilalanina no lugar de uma Leucina, na posição 1014 da cadeia polipeptídica (BUSVINE, 1951). A posição – além da substituição – de mutações *Kdr* no canal de sódio e voltagem, também varia entre diferentes espécies (**Figura 5**). BRENGUES *et al.* (2003), descreveram diversas mutações no Nav que estão relacionadas à resistência a inseticidas em *Ae. aegypti* (**Tabela 1**).

Contudo, diferentes mutações no Nav são encontradas periodicamente e, além daquelas apontadas no trabalho de BRENGUES *et al.* (2003), vale destacar as substituições da Valina por Isoleucina e Fenilalanina por Cisteína, nas posições 1016 e 1534 respectivamente. Essas substituições são apontadas com importante relação à resistência a inseticidas em todo o mundo (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; HARRIS *et al.*; YANOLA *et al.*, 2010; YANOLA *et al.*, 2011).

Figura 5 – Mutações *Kdr* em artrópodes.

Fonte: adaptado da revisão de Dong (2007).

A avaliação por meio do fenótipo era o método mais utilizado no monitoramento de linhagens brasileiras de *Ae. aegypti* resistentes a inseticidas (SUCEN, 2006). Contudo, técnicas moleculares foram empregadas para qualificar e quantificar o genótipo que confere resistência, como na população de Belém (PA) para as mutações G932V e I1011M (BRENGUES *et al.*, 2003). Semelhantemente, estudos recentes apontaram a presença da mutação V1016I em diversas populações brasileiras de *Ae. aegypti*, com forte relação ao fenótipo de resistência. Essa mutação está se difundindo no país, juntamente com a mutação Fenilalanina > Cisteína no *locus* 1534 (MARTINS *et al.*, 2009; LINSS *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Mutações em *Ae. aegypti* associadas a resistência em inseticidas piretróides, segundo BRENGUES *et al.*, 2003.

Posições na cadeia polipeptídica	Substituições
923	Glicina → Valina (<i>Gly</i> 923 <i>Val</i>)
952	Valina → Isoleucina (<i>Val</i> 952 <i>Ile</i>)
961	Histidina → Lisina (<i>His</i> 961 <i>Lys</i>)
982	Leucina → Triptofano (<i>Leu</i> 982 <i>Trp</i>)
1011	Isoleucina → Metionina (<i>Ile</i> 1011 <i>Met</i>)
	Isoleucina → Valina (<i>Ile</i> 1011 <i>Val</i>)
1016	Valina → Glicina (<i>Val</i> 1016 <i>Gly</i>)

Fonte: BRENGUES *et al.* (2003).

O uso de organofosforados tem sido empregado pela Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo (SES-SP), em resposta à diminuição da sensibilidade de populações de *Ae. aegypti* por piretróides (SUCEN, 2006). Entretanto, estudos apontam que diversas populações de *Ae. aegypti*, sobretudo no Estado de São Paulo, ainda mantêm uma frequência elevada de resistência a piretróides, principalmente nas cidades de Santos e Ribeirão Preto (MACORIS *et al.*, 2014; MACORIS *et al.*, 2018).

1.7. ATIVIDADE LOCOMOTORA: DIFERENTES PERSPECTIVAS

Em um estudo proposto por BRITO *et al.* (2013), diversos aspectos da biologia de populações resistentes de *Ae. aegypti* foram avaliados. Eles relacionaram o efeito que mutações *Kdr* puderam causar nos diferentes estágios de vida do vetor. No trabalho, mutações *Kdr* foram isoladas, por meio de cruzamentos de linhagens resistentes com uma linhagem laboratorial (Rockefeller) suscetível, chamado de Rock-Kdr. Ao submeter os grupos de indivíduos a um sistema de monitoramento, com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados por uma incubadora de precisão, observou-se um aumento significativo na atividade locomotora da linhagem Rock-Kdr, em relação ao controle. Esses dados mostram uma alteração no padrão da atividade locomotora que pode influenciar no hábito alimentar e, conseqüentemente, na disseminação de arbovírus. Os autores apontam ainda que houve menor porcentagem de ovos postos, bem como menor quantidade, emergência e tempo de desenvolvimento nos indivíduos da linhagem testada, evidenciando o custo adaptativo, ou “*fitness cost*”, que essas mutações acarretam (BRITO *et al.*, 2013). E esses achados corroboram com os trabalhos de BELINATO & VALLE 2015; DINIZ *et al.*, 2015.

SAMPAIO *et al.* (2017), submeteram fêmeas de *Anopheles aquasalis* Curry a uma avaliação da atividade locomotora após alimentá-las com sangue contendo diferentes concentrações de doses sub-letais de Ivermectina – um antimalárico. Como resultado, os indivíduos sobreviventes apresentaram uma atividade locomotora noturna e bimodal – característica da espécie. Contudo, a atividade foi

sempre inferior em relação ao grupo controle. Semelhantemente, um estudo realizado com machos e fêmeas de *Ae. aegypti* expostos a concentrações de Triflumuron – um inibidor da síntese de quitina – apontou, dentre diversos resultados, uma menor intensidade na atividade locomotora das fêmeas no período claro (fotofase). Além disso, como consequência do efeito do composto químico, as pernas dos adultos se quebravam facilmente, fator que influenciou na atividade locomotora avaliada (BELINATO *et al.*, 2009).

Desta forma, embasado no estudo pioneiro realizado por KONOPKA & BENZER (1971), é possível definir a atividade locomotora como o deslocamento de um determinado táxon, partindo de um ponto A para um ponto B, de modo que as condições propostas para esse deslocamento mimetizem aquelas encontradas no ambiente natural.

Em um estudo de LIMA-CAMARA *et al.* (2011), fêmeas de *Ae. aegypti* foram infectadas com o sorotipo DENV-2. Os indivíduos infectados apresentaram maior atividade locomotora em relação ao controle durante a fotofase. O aumento da atividade locomotora pode estar relacionado com a dinâmica do hábito alimentar, aumentando a frequência de repastos e, conseqüentemente, a transmissão do vírus dengue ao homem. Similarmente, um estudo com *Wolbachia pipientis* Hertig mostrou que a bactéria causou um aumento na atividade locomotora de machos e fêmeas de *Ae. aegypti* (EVANS *et al.*, 2009).

Alterações fisiológicas também influenciam diretamente na atividade locomotora de mosquitos. LIMA-CAMARA *et al.* (2013) mostraram que fêmeas de *Ae. aegypti* inseminadas com uma solução de glândulas acessórias de machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, tiveram uma diminuição da atividade locomotora em ambos os grupos. Além disso, ambas as fêmeas foram refratárias à inseminação. A atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* somente inseminadas, somente alimentadas e inseminadas/alimentadas, além de fêmeas de *Ae. albopictus* inseminadas/alimentadas foi menor em comparação ao grupo controle, composto por fêmeas virgens e não alimentadas de cada espécie (LIMA-CAMARA *et al.*, 2014). Alterações de luz podem interferir no ciclo circadiano de mosquitos. Um estudo com alteração abiótica de luz, SHEPPARD *et al.* (2017) mostrou que fêmeas de *An. gambiae*, mantidas em um regime de claro/escuro, ou LD (L > light e D >

dark) 12:12, diminuíram a quantidade de repastos, além da supressão da atividade locomotora, resultante de breves períodos de acender de luzes na fase escura.

Diante dos dados publicados periodicamente pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2015 e 2017), é possível afirmar que mesmo com os programas de controle e vigilância epidemiológica no Brasil, ainda há um grande número de casos e óbitos – sobretudo nos períodos epidêmicos – por arbovírus como dengue, Zika e chikungunya, transmitidos pelo mosquito *Ae. aegypti*. Apesar de estratégias alternativas, o controle do vetor está predominantemente apoiado no uso de inseticidas químicos, que possuem diversas formulações e classes de compostos que agem, de maneira geral, no sistema nervoso central do vetor, e resultam em um efeito rápido de queda e morte. Assim, desde a primeira formulação, os inseticidas têm sido utilizados em larga escala, sobretudo em campanhas de erradicação e controle de vetores, para suprimir a demanda causada pelas grandes epidemias, ocorridas em diversos momentos por todo o país (BRAGA & VALLE, 2007a). Contudo, a consequência inerente da dependência por este meio de controle foi o surgimento de linhagens de *Ae. aegypti* com suscetibilidade reduzida a diversas classes de inseticidas. A pressão de seleção, dada pela exposição do vetor em ambientes com inseticidas, selecionou mutações genéticas e aleatórias. De maneira hereditária, essas mutações, principalmente alterações no sítio-alvo do canal de sódio e voltagem (Nav) e da acetilcolinesterase (AChE), se difundiram em inúmeras populações brasileiras de *Ae. aegypti*, sobretudo no Estado de São Paulo, onde algumas cidades possuem frequências muito elevadas dessas mutações (MACORIS *et al.*, 2018). Diversos aspectos, como estados fisiológicos, infecção por vírus e mutações que conferem resistência a inseticidas, podem influenciar nos ritmos biológicos e no relógio circadiano do *Ae. aegypti*. Muitos estudos apontam que o efeito desses aspectos reflete tanto quantitativamente quanto qualitativamente na atividade locomotora desse mosquito vetor (BRITO *et al.*, 2013; LIMA-CAMARA *et al.*, 2011, 2014). A atividade locomotora compõe o hábito de vida do mosquito, sendo executada principalmente por meio do voo. Quando há um aumento natural da atividade locomotora, em períodos diários característicos de cada espécie, os indivíduos desempenham funções para atender às necessidades fisiológicas do seu ciclo de vida, sendo, principalmente, a busca por parceiros para cópula, oviposição, além da busca por alimentos. Em um contexto epidemiológico envolvendo o *Ae.*

aegypti, a busca por sangue pelas fêmeas hematófagas, quando infectadas, contribuem com a disseminação de diversos arbovírus, responsáveis por surtos e grandes epidemias.

Desta forma, avaliar se a resistência a inseticidas em populações de *Ae. aegypti* não influencia no aumento da atividade locomotora é fundamental para compreender a extensão e o comprometimento de um conjunto de hábitos, principalmente aqueles voltados à alimentação e reprodução, como no caso da discordância gonotrófica. Caso haja qualquer alteração, no aumento do número de repastos por fêmeas infectadas, por exemplo, pode se tornar um agravante em um contexto epidemiológico de transmissão de patógenos e um problema de saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar quantitativamente a atividade locomotora de populações de *Ae. aegypti* do Estado de São Paulo, com diferentes perfis de resistência a inseticidas.

2.2. ESPECÍFICOS

- Verificar se resistência a inseticidas, presentes em algumas populações paulistas de *Ae. aegypti*, não aumenta a atividade locomotora no ritmo circadiano do mosquito (hipótese nula).
- Comparar possíveis diferenças entre os perfis populacionais sendo eles: suscetíveis, resistentes e uma linhagem laboratorial de *Ae. aegypti*
- Comparar possíveis mudanças nos perfis populacionais na série temporal analisada entre os anos de 2016 e 2017.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PERFIS POPULACIONAIS

Os critérios para selecionar as populações de *Ae. aegypti* no estudo foram determinados por meio da frequência fenotípica previamente conhecida, segundo o estudo realizado por MACORIS *et al.* (2014). Esse estudo é parte de uma rotina realizada compulsoriamente pela SUCEN de Marília - SP, que monitora a frequência das populações de *Ae. aegypti*, quanto à resistência a inseticidas de diversos municípios do Estado de São Paulo, utilizando o método de bioensaios. Os perfis foram classificados como: suscetíveis, resistentes, bem como de uma linhagem laboratorial. Assim, as populações suscetíveis foram representadas por Campinas e Marília, resistentes foram representadas por Santos, Ribeirão Preto e Barretos, além de uma linhagem laboratorial Rockefeller, muito utilizada como padrão suscetível para diversas mutações genéticas.

3.2. CRIAÇÃO DOS MOSQUITOS

Os ovos das populações de Campinas (CAMP), Marília (MAR), Santos (SAN), Ribeirão Preto (RIB) e Rockefeller (ROCK) foram gentilmente cedidos pela SUCEN – Regional de Marília, SP no ano de 2016. Em 2017, as populações mantiveram-se as mesmas, com apenas a substituição da população de Ribeirão Preto por Barretos (BAR), esta cujo perfil de resistência à inseticidas é semelhante a anterior.

Aproximadamente 500 ovos, de geração F1, foram postos, a princípio, em recipientes de tamanho 10 cm x 10 cm x 5 cm, separadamente para cada população e ano, com os experimentos sendo realizados nos mesmos anos. Em cada recipiente, foram adicionados 400 ml de água de torneira em descanso de 24h – para evaporação do cloro, e 0,2 mg de ração para peixe (TetraMin®) previamente triturada em almofariz com pistilo, a ração foi polvilhada na água, estimulando a eclosão das larvas.

Após a eclosão, as larvas foram mantidas nos mesmos recipientes até estágio L2 e foi ofertado 0,2 mg de ração para peixe apenas uma vez, como reforço alimentar. Ainda em L2, as larvas foram cuidadosamente transferidas, com auxílio de pipeta do tipo Pasteur, para recipientes de tamanho 30 cm x 20 cm x 5 cm, com 1 litro de água de torneira em descanso de 24h, tal procedimento foi realizado visando evitar qualquer tipo de estresse devido ao espaço. Nos recipientes foram ofertados 20 mg de ração de peixe triturada, sendo reforçada em intervalos de dois dias, ou conforme necessidade, evitando a competição entre as larvas. A água foi trocada uma ou duas vezes, no período de desenvolvimento de L2 até L4, juntamente com a retirada dos indivíduos mortos. Essa medida foi adotada a fim de evitar a formação de uma “membrana de gordura” na superfície proveniente da matéria em decomposição, que dificulta a troca gasosa dos indivíduos por meio do sifão.

Após o surgimento das primeiras pupas, estas foram separadas individualmente e por localidade, em pequenos borreiros contendo 5 ml de água de torneira em descanso de 24h. As pupas foram mantidas nessas condições até a emergência dos adultos, garantindo que as fêmeas permanecessem virgens (**Figura 6**). Em todo o processo, os recipientes foram mantidos em temperatura ambiente de 25°C, com pequenas variações e fotoperíodo LD 12:12. Os procedimentos metodológicos foram adaptados de LIMA-CAMARA *et al.* (2014).

Figura 6 – Pupas individualizadas em borreiros, separados em bandejas por população.

Fonte: Nakazato, B.M.

Conforme a emergência, as fêmeas adultas foram imediatamente realocadas com a abertura dos borréis no interior de gaiolas específicas para cada localidade, evitando afogamento dos indivíduos adultos. No interior de cada gaiola foi disponibilizado um frasco com pavio de algodão embebido em uma solução açucarada a 10%, como oferta de alimento. Todas as gaiolas foram mantidas dentro de uma Incubadora de Precisão Mod. 818 – Thermo Scientific®, com umidade (aproximadamente 80%) e temperatura (25°C) controladas, bem como fotoperíodo de LD 12:12 (**Figura 7**), como descrito por LIMA-CAMARA *et al.* (2011). As fêmeas permaneceram na incubadora por um período de três a cinco dias para se aclimatarem com as condições experimentais, ou até ser obtida a quantidade ideal de 38 fêmeas para cada população. Os indivíduos machos e fêmeas excedentes foram descartados.

Figura 7 – Populações de fêmeas de *Ae. aegypti* separadas em gaiolas no interior da Incubadora de Precisão Mod. 818 – Thermo Scientific®.

Fonte: Nakazato, B.M.

3.3. EXPERIMENTO DE ATIVIDADE LOCOMOTORA: PROCEDIMENTOS

Após o período de adaptação das fêmeas adultas de *Ae. aegypti*, estas foram colocadas individualmente em tubos de vidro (1cm x 10cm), contendo algodão embebido em solução açucarada a 10%, em uma das extremidades. Para tanto, algumas fêmeas eram aspiradas por vez – com auxílio de aspirador bucal – e colocadas em baixas temperaturas (freezer), por poucos instantes. Desta forma, os indivíduos foram induzidos à dormência e, com auxílio de pinça entomológica, foram cuidadosamente depositados nos tubos. As extremidades dos tubos foram vedadas com Parafilm® e, posteriormente, os tubos foram alocados nos slots do Monitor de Atividade Locomotora (LAM – *Locomotor Activity Monitor*; *TriKinects Inc* – *Waltham, MA, USA*) (**Figura 8**).

Todo o processo, após indução à dormência, foi realizado sobre a mesa fria, prolongando o estado de dormência dos indivíduos. Em cada LAM com capacidade para 32 tubos, foi completado com indivíduos de cada população testada, iniciando pelo monitor 2 Campinas, 3 Marília, 4 Santos, 5 Ribeirão Preto/Barretos e 6 Rockefeller – o monitor 1 é responsável por medir as variações dentro da incubadora – além de seis fêmeas excedentes, de cada população, que foram alocadas no sétimo e último monitor a fim de otimizar o N amostral. No centro de cada LAM existe um feixe de ondas infravermelhas que se cruzam, e toda vez que esta é interrompida pela passagem do mosquito, a variável é registrada em um dado quantitativo numérico discreto por meio do programa “*DAMSystem data collection*”. Ocorreram três réplicas para cada ano (2016-17), com duração de sete dias ininterruptos, por experimento – sob fotoperíodo de LD 12:12, com temperatura e umidade constantes (**Figura 9**).

Figura 8 – Espécimes de *Ae. aegypti* alocados no interior do tubo.

Fonte: Nakazato, B.M.

Figura 9 – Disposição dos monitores no interior da incubadora pouco antes de iniciar o experimento.

Fonte: Nakazato, B.M.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Descritiva – Para a análise estatística, a média da atividade locomotora foi considerada a partir do primeiro horário claro do segundo dia, evitando dados enviesados oriundos do estresse do primeiro dia. Os dados foram utilizados até o dia de corte, (5º dia) e somente quando os registros de atividade locomotora de cada indivíduo ultrapassavam, no mínimo, 12h após horário de corte. Para análise, a média aritmética de 96 horas de dados por experimento foram calculadas a partir da média bruta, esta transformada em Log+1 por conter muitos zeros. Para a representação gráfica, foi calculado a média dos dados de Log+1, convertidas em potência de 10 e apresentadas por meio da média geométrica de Williams.

Inferencial – A Normalidade dos dados amostrais foi verificada por meio do teste D'Agostino, indicado para conjunto de dados mais numerosos. Por se tratar de amostras com distribuição não-normal, foi utilizado o teste de Levene para verificar a homocedasticidade das variâncias. As populações foram comparadas como amostras independentes de maneira interespecífica, utilizando o teste de Kruskal-Wallis (KW) indicado para análise acima de três médias, com o respectivo teste *post-hoc* de Dunn. O conjunto de dados dos experimentos de cada população no ano foi ainda analisado de maneira intraespecífica (três réplicas/ano) com o teste de Wilcoxon – calculado “*step by step*” entre os experimentos –, para verificar possíveis diferenças entre os experimentos de uma mesma população no ano. Mesmo algumas populações estarem em homocedasticidade, a utilização de teste paramétrico inviabilizaria a aplicação em todos os dados, tornando-os incomparáveis, pois, a maioria são dados não Normais. Todas as diferenças apontadas nos testes foram avaliadas com um nível significativo $\alpha < 0,05$.

Para a aplicação dos testes, somente a média de Log+1 do Meio Período Diurno (MPD) de cada indivíduo foi considerada, por se tratar de um período de atividade locomotora naturalmente mais intensificado e característico da espécie, conhecido como antecipação, ou seja, período de aumento na atividade locomotora do mosquito que antecede o pico, crepuscular neste caso (TAYLOR & JONES, 1969). Para representatividade nos gráficos e tabelas, as médias total e diurna foram utilizadas. Todos os testes estatísticos foram calculados utilizando o software gratuito BioEstat versão 5.3.

4. RESULTADOS

A atividade locomotora de um total de 972 fêmeas virgens de cinco populações de *Ae. aegypti*, com diferentes perfis de resistência a inseticidas foi avaliada quantitativamente entre os anos de 2016 e 2017. A **Figura 10** mostra o padrão de atividade locomotora, simplificados e representados pela média de um dia, das populações suscetíveis de Campinas (A) e Marília (B), das populações resistentes de Santos (C), Ribeirão Preto/Barretos (D) e da linhagem Rockefeller (E).

As populações suscetíveis de Campinas e Marília de 2017 apresentaram um padrão de atividade locomotora maior do que no ano anterior, em todo o período claro, evidenciando uma variação temporal. Esse aumento, no período de antecipação, ocorreu na segunda metade do período claro, e sobrepôs completamente o padrão dos indivíduos de 2016 testados (**Figura 10A e B**). O padrão de atividade locomotora da população de Santos mostrou pouca variação, entre os anos de 2016 e 2017 (**Figura 10C**) além de picos semelhantes no período de antecipação. A população de Barretos, mesmo configurada como uma população de perfil resistente apresentou um padrão de atividade locomotora consideravelmente menor do que Ribeirão Preto de 2016 (**Figura 10D**). A linhagem Rockefeller apresentou um padrão de atividade locomotora semelhante para os dois anos analisados, com uma pequena diferença no tamanho do segundo pico.

Figura 10 – Atividade locomotora de fêmeas virgens de *Ae. aegypti*, das populações suscetíveis de (A) Campinas, (B) Marília, resistentes (C) Santos, (D) Ribeirão Preto/Barretos e uma linhagem laboratorial Rockefeller (E) de 2016 (linha azul) e 2017 (linha vermelha). Gráfico da média de um dia, referente aos quatro dias dos experimentos, sob regime de LD 12:12, a 25°C. Barras de erros (linhas tracejadas) são mostradas em intervalos de 30 minutos. Eixo X: o tempo Zeitgeber, referente ao número de horas após a luz acender; barra branca e preta representam 12h de luz (1ª hora) e 12h de escuro (13ª hora). Eixo Y: média geométrica de Williams. Valores excedentes da escala: a=18,05; b=19,98; c=18,90; d=18,60; e=20,72.

A **Tabela 2** mostra a média aritmética do período total (24h), diurno sem o acender das luzes (12h, com exceção dos primeiros 30 minutos do acender das luzes) e meio período diurno (MPD - 6h equivalentes à segunda metade da fase clara), das populações de 2016 e 2017 avaliadas.

Tabela 2 – Valores da média aritmética ($\pm$ desvio padrão) de atividade locomotora das populações de fêmeas de *Ae. aegypti* segundo perfil de resistência a inseticidas e ano de experimento

Ano	Populações	Perfil	n*	Média aritmética de atividade locomotora**		
				Período total (24h)	Período diurno (12h) ^a	MPD
2016	CAMPINAS	Suscetível	95	8,7 ($\pm$ 0,53)	13,2 ($\pm$ 0,74)	16,0 ($\pm$ 0,90)
	MARÍLIA	Suscetível	104	8,6 ($\pm$ 0,54)	12,3 ($\pm$ 0,75)	15,4 ($\pm$ 0,90)
	SANTOS	Resistente	105	12,5 ($\pm$ 0,80)	19,5 ($\pm$ 1,31)	23,3 ($\pm$ 1,50)
	RIBEIRÃO PRETO	Resistente	109	12,9 ($\pm$ 0,70)	17,4 ($\pm$ 1,04)	20,2 ($\pm$ 1,19)
	ROCKEFELLER	Controle	106	9,9 ($\pm$ 0,70)	12,8 ($\pm$ 0,87)	16,0 ($\pm$ 1,11)
2017	CAMPINAS	Suscetível	96	11,7 ($\pm$ 0,62)	17,2 ($\pm$ 1,01)	19,6 ($\pm$ 1,19)
	MARÍLIA	Suscetível	78	11,2 ($\pm$ 0,75)	17,9 ($\pm$ 1,23)	22,6 ($\pm$ 1,45)
	SANTOS	Resistente	79	14,7 ($\pm$ 0,89)	21,6 ($\pm$ 1,29)	24,8 ($\pm$ 1,49)
	BARRETOS	Resistente	98	9,4 ($\pm$ 0,55)	14,7 ($\pm$ 1,16)	16,6 ($\pm$ 1,16)
	ROCKEFELLER	Controle	102	10,8 ($\pm$ 0,79)	10,3 ($\pm$ 0,64)	12,7 ($\pm$ 0,76)

* número total de indivíduos testados nos três experimentos/ano

** média de três experimentos (4 dias/experimento)

^a período diurno sem o acender das luzes

MPD – Meio Período Diurno

Entre as médias aritméticas, os valores são mais expressivos no MPD – momento do dia que o *Ae. aegypti* mostra maior atividade locomotora. As populações de 2016 analisadas, CAMP e MAR, classificadas como populações suscetíveis, apresentaram semelhança quando comparadas a linhagem ROCK, com uma pequena diferença de 3,75% na média aritmética na população de MAR em

comparada a CAMP e ROCK, sendo 16,0, 15,4 e 16,0, respectivamente. As médias aritméticas das populações resistentes de SAN (23,3) e RIB (20,2) apresentaram valores maiores comparados a linhagem ROCK, bem como às demais populações suscetíveis testadas.

Para as populações de 2017 analisadas, foi possível observar um aumento na média aritmética da atividade locomotora da segunda metade da fase clara em, aproximadamente, 22% a 46% em CAMP (19,6) e MAR (22,6), respectivamente, comparadas ao ano anterior. O aumento da atividade locomotora nesse período da fase clara foi, pelo menos, 50% maior comparado a linhagem ROCK (12,7). Entretanto, a atividade locomotora da população de BAR (16,6), classificada como população resistente, foi 23,5% maior comparada a ROCK, mas 18% menor quando comparada à CAMP e MAR e 50% menor que SAN.

A Normalidade na distribuição dos dados apresentou diferença entre os experimentos das populações em ambos os anos (D'Agostino; $p < 0,05$), bem como nas comparações das médias (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$).

As comparações entre populações foram abordadas de modo interespecífico, contudo, vale ressaltar que as populações de CAMP e SAN em 2016, MAR e ROCK em 2017 mostraram diferença estatisticamente significativa (Wilcoxon; $p < 0,05$) na análise intraespecífica entre os experimentos/ano (**Tabela 3**). A diferença das populações de CAMP e SAN em 2016 e ROCK em 2017 foi resultante do tamanho amostral ou podemos considerar a plausibilidade biológica de cada indivíduo testado, pois na comparação par-a-par essas diferenças não se mantiveram entre os experimentos. Para MAR em 2017, a diferença entre o experimento 01 se manteve aos demais experimentos daquele ano, mas quando comparado ao respectivo experimento 01 de ROCK 2017 (KW; $p < 0,05$; Dunn; $z = 5,29$; $p < 0,05$; cálculos independentes, não ilustrados), manteve a mesma diferença tal qual a nível populacional.

Tabela 3 – Valores de comparações intraespecífica das médias do MPD das populações de fêmeas de *Ae. aegypti*, dos experimentos realizados nos anos.

Ano	Populações	Experimentos (teste de Wilcoxon)					
		01 x 02		01 x 03		02 x 03	
		z-obs	p-valor	z-obs	p-valor	z-obs	p-valor
2016	Campinas	2.50	<0,05	1.59	0.11	0.34	0.74
	Marília	0.63	0.53	1.68	0.09	0.94	0.35
	Santos	2.21	<0,05	0.64	0.52	1.96	0.05
	Ribeirão Preto	0.94	0.35	1.65	0.10	0.94	0.35
	Rockefeller	0.91	0.36	1.21	0.22	0.00	1.00
2017	Campinas	1.01	0.31	0.73	0.46	1.22	0.22
	Marília	3.67	<0,05	3.09	<0,05	0.00	1.00
	Santos	1.57	0.12	1.81	0.07	1.87	0.06
	Barretos	0.24	0.81	1.59	0.11	0.30	0.77
	Rockefeller	2.37	<0,05	1.48	0.14	0.34	0.18

Resultados obtidos pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon, com nível significativo $\alpha < 0,05$; z-crítico = 1,96.

Ao realizar os testes de comparações múltiplas, foi possível observar que, diferentemente dos resultados da média aritmética em 2016, somente MAR, de perfil suscetível, não teve diferença com a linhagem laboratorial ROCK (teste de Dunn; $z = 1,12$; $p = 0,26$). CAMP não teve diferença estatisticamente significativa comparada a população de MAR ($z = 1,12$; $p = 0,26$) (**Tabela 4**). Apesar de apresentar o segundo pico de atividade locomotora maior do que as demais populações suscetíveis de 2016, a diferença estatisticamente significativa entre CAMP e ROCK foi devida maior amplitude no período de antecipação de CAMP (**Figura 11A**). SAN ($z = 5,87$; $p < 0,05$), RIB ($z = 4,28$; $p < 0,05$) e CAMP ($z = 2,44$; $p < 0,05$), apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparadas a linhagem ROCK (**Tabela 4**; **Figura 11B**).

Tabela 4 – Valores de comparações entre as populações de fêmeas *Ae. aegypti* segundo perfil de resistência a inseticidas e ano de experimento.

2016					2017			
Perfil	Populações	Dif. postos	z-observado	p-valor	Populações	Dif. postos	z-observado	p-valor
Suscetível/ Suscetível	CAMP x MAR	23.8	1.12	0.26	CAMP x MAR	22.1	1.11	0.23
	CAMP x ROCK	51.7	2.44	<0,05	CAMP x ROCK	88.5	4.76	<0,05
	MAR x ROCK	27.9	1.35	0.18	MAR x ROCK	110.7	5.62	<0,05
Suscetível/ Resistente	CAMP x SAN	69.6	3.28	<0,05	CAMP x SAN	29.1	1.46	0.11
	CAMP x RIB	35.8	1.70	0.09	CAMP x BAR	46.1	2.45	<0,05
	MAR x SAN	93.4	4.50	<0,05	MAR x SAN	6.9	0.33	0.71
	MAR x RIB	59.6	2.90	<0,05	MAR x BAR	68.3	3.44	<0,05
	SAN x ROCK	121.3	5.87	<0,05	SAN x ROCK	117.6	6.00	<0,05
	RIB x ROCK	87.5	4.28	<0,05	BAR x ROCK	42.4	2.29	<0,05
Resistente	SAN x RIB	33.8	1.65	0.08	SAN x BAR	75.2	3.80	<0,05

CAMP=Campinas, MAR=Marília, SAN=Santos, RIB=Ribeirão Preto, BAR=Barretos, ROCK=Rockefeller.
Resultados obtidos pelo teste *post-hoc* de Dunn, com nível significativo $\alpha < 0,05$; z-crítico = 1,96.

Figura 11 – Atividade locomotora de fêmeas virgens de *Ae. aegypti* de 2016. (A) populações suscetíveis Campinas (linha verde), Marília (linha vermelha); (B) populações resistentes Santos (linha azul), Ribeirão Preto (linha amarela); linhagem Rockefeller (linha preta). Valores excedentes da escala: a=18,90 e b=18,60.

As populações de 2017 analisadas, como mostrado na média aritmética (**Tabela 2**), apresentaram diferenças comparadas a linhagem laboratorial. As populações de CAMP (Dunn; $z = 4,76$; $p < 0,05$) e MAR ($z = 5,62$; $p < 0,05$), diferentemente de 2016, mostraram diferenças estatisticamente significante quando comparadas a linhagem ROCK. A **Figura 12** mostra que o padrão de atividade locomotora de ROCK foi menor em relação à CAMP e MAR, além de uma amplitude menor no período de antecipação.

A população de SAN (**Figura 13**), de perfil resistente, não apresentou diferença estatisticamente significante com as populações suscetíveis de CAMP e MAR (Dunn; $z = 1,46$; $p = 0,11$ e $z = 0,33$; $p = 0,71$), e a diferença, como no ano anterior, se manteve comparada a Rockefeller ($z = 6,0$; $p < 0,05$). Além disso, o padrão da atividade locomotora de *Ae. aegypti* das três populações, ilustrado na figura, mostra, sobreposição das linhas em diversos pontos, inferindo uma semelhança na atividade dessas populações.

Figura 12 – Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* de 2017. Linha azul (CAMP; $n = 96$), linha vermelha (MAR; $n = 78$), linha preta (ROCK; $n = 102$). Gráfico da média geométrica de Williams de quatro dias de experimento dos três experimentos realizados, sob regime de LD 12h claro (barra branca) e 12h escuro (barra cinza), a 25°C. Barras de erros (linhas tracejadas) são mostradas em intervalos de 30 minutos.

Figura 13 – Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* de 2017. Linha azul (CAMP; n = 96), linha vermelha (MAR; n = 78), linha verde (SAN; n = 79). Valores excedentes da escala a=25,15.

A população de BAR mostrou um padrão de atividade locomotora do MPD diferente quando comparada a linhagem laboratorial e de todas as demais populações de 2017. Esse padrão da atividade locomotora de BAR foi sempre menor que as populações de CAMP e MAR (**Figura 14**). Os indivíduos dessa população apresentaram diferença (atividade locomotora menor) estatisticamente significativa quando comparados com CAMP ($z = 2,45$; $p < 0,05$), MAR ($z = 3,44$; $p < 0,05$) e SAN ($z = 3,80$; $p < 0,05$), além da diferença (atividade locomotora maior) da linhagem ROCK ($z = 2,29$; $p < 0,05$).

Complementarmente, a **Figura 15** mostra BAR com um padrão de atividade locomotora semelhante às populações de CAMP e MAR de 2016. Na média aritmética do MPD apresentou um valor de 16,0, e, por meio das comparações entre as médias, não teve diferença estatisticamente significativa das populações de CAMP e MAR de 2016 (Kruskal-Wallis; $p = 0,54$; cálculos independentes, não ilustrados), mesmo quando comparado a ROCK 2016 (Kruskal-Wallis; $p = 0,05$), contudo este último pode ser considerado um valor *borderline*.

Figura 14 – Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* de 2017. Linha azul (CAMP; n = 96), linha vermelha (MAR; n = 78), linha roxa (BAR; n = 98).

Figura 15 – Atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* das populações de 2016; linha amarela (CAMP; n = 95), linha marrom (MAR; n = 104). E da população de 2017; linha roxa (BAR; n = 98).

A homogeneidade das populações apresentou diferença estatisticamente significativa somente em CAMP e ROCK de 2017 (teste de Levene $p < 0,05$). Apesar da **Figura 16** mostrar a distribuição das médias na atividade locomotora dos indivíduos em homocedasticidade, por não haver qualquer agrupamento nos pontos representados nos gráficos, os dados foram analisados por testes não-paramétricos. Pois, a maioria das médias não apresentavam distribuição Normal.

Figura 16 – Distribuição da variância das médias na atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti*. Eixo Y: atividade locomotora de Log+1; eixo X: número de indivíduos testados por população; populações suscetíveis (a) CAMP, (b) MAR; populações resistentes (c) SAN, (d) BAR; linhagem laboratorial ROCK (e).

5. DISCUSSÃO

Inseticidas químicos ainda são amplamente empregados no combate do *Ae. aegypti* e têm como alvo o sistema nervoso central desse mosquito, sobretudo nas regiões do axônio, como a Acetilcolinesterase (AChE) e o canal de sódio modulado por voltagem (Nav). O uso indiscriminado de diversas classes de inseticidas favoreceu o surgimento de mutações aleatórias, e estas foram responsáveis por tornar diferentes populações brasileiras de *Ae. aegypti* resistentes aos efeitos desses compostos (BRAGA & VALLE, 2007a; LINSS *et al.*, 2014).

Desde 1994, populações de *Ae. aegypti* têm apresentado resistência a inseticidas (SUCEN, 2006). Diversas populações apresentavam resistência aos organofosforados, e uma alternativa a este cenário foi a utilização de piretróides para o controle vetorial em todos os estados brasileiros nos anos 2000 – exceto no Estado de São Paulo, que já o utilizava desde 1989 (BRAGA & VALLE, 2007a; MACORIS *et al.*, 2007). Os piretróides foram amplamente aplicados pelos programas de controle vetorial do *Ae. aegypti*, principalmente por se tratar de um inseticida fotoestável, de baixa toxicidade e baixa persistência no ambiente (SODERLUND *et al.*, 2008). Contudo, como ocorrido com as demais classes de inseticidas utilizadas, houve o surgimento de populações resistentes pouco tempo depois de sua utilização (SUCEN, 2006; MACORIS *et al.*, 2018). O rápido surgimento de resistência a determinado composto químico parte do pressuposto de que diversas linhagens foram expostas a ambientes tratados com inseticidas no passado, favorecendo mutações que aumentam a expressão de enzimas desintoxicantes, bem como a perda de sensibilidade do sítio alvo (BRAGA & VALLE, 2007a).

Inicialmente, a resistência em populações era monitorada compulsoriamente pela SUCEN de Marília – SP, por meio de testes com bioensaios que analisavam o fenótipo dos mosquitos (SUCEN, 2006). Entretanto, com as abordagens moleculares se tornando cada vez mais acessíveis, principalmente a técnica de PCR convencional, foi possível identificar o envolvimento de diversas mutações com a resistência, além de compreender como se expressam no fenótipo. Foi possível

quantificar a frequência de mutações, principalmente mutações *Kdr*, por meio da genotipagem de indivíduos (BRENGUES *et al.*, 2003; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; HARRIS *et al.*, 2010; YANOLA *et al.*, 2010; YANOLA *et al.*, 2011).

O estudo de SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.* (2007) mostrou substituições não sinônimas ocorridas nos *loci* de proteínas transcritas, a partir de diversas mutações nos genes do canal de sódio e voltagem. Vale ressaltar que mutações podem conferir resistência, de maneira geral, a mais de um tipo de inseticida de uma classe. Além disso, estudos sugerem que a co-ocorrência de mutações *Kdr* podem agir sinergicamente, além de serem preferencialmente selecionadas por apresentar melhores níveis de resistência e menos efeitos deletérios nos indivíduos (LINSS *et al.*, 2014; SAINGASOOK *et al.*, 2017). Assim, com base na literatura científica, duas mutações estão fortemente relacionadas com resistência a piretróides em populações de *Ae. aegypti*: a substituição da Valina por Isoleucina, na posição 1016 da proteína (MARTINS *et al.*, 2009; BATISTA, 2012; LINSS *et al.*, 2014), e a substituição da Fenilalanina por Cisteína na posição 1534 (MARTINS *et al.*, 2009; YANOLA *et al.*, 2010; LINSS *et al.*, 2014; AGUIRRE-OBANDO *et al.*, 2016; SAINGASOOK *et al.*, 2017). No estudo proposto por LINSS *et al.* (2014), a frequência alélica dessas duas mutações foi avaliada em populações de *Ae. aegypti* de diversas localidades do Brasil. O estudo mostra que tanto o alelo mutante 1016/Ile quanto 1534/Cys, estão amplamente disseminados no território.

O monitoramento da resistência a inseticidas em populações paulistas de *Ae. aegypti* é realizado, por meio de bioensaio, compulsoriamente pela SUCEN - Regional de Marília, SP, desde 1996 (SUCEN, 2006). MACORIS *et al.* (2014) traçaram o impacto que diversos inseticidas causam em populações de *Ae. aegypti*, expostas em diferentes períodos. O estudo mostrou que a maioria das populações testadas possui uma taxa de mortalidade abaixo dos 80%, configurando resistência. MACORIS *et al.* (2018) recentemente mostraram a ocorrência da transição da frequência de alelos predominantemente suscetíveis para quase totalmente resistentes nas populações paulistas de Campinas, Marília, Ribeirão Preto, entre outras, em um curto período de dez anos. Além disso, a população de Santos foi apontada com as mais altas frequências para as mutações, até mesmo a fixação dos alelos resistentes. Entretanto, o uso de piretróides por órgãos governamentais foi descontinuado em 2001, não sustentando a permanência de altas frequências

desses alelos resistentes presentes nas populações, indicando que a manutenção da resistência nessas populações resulta da utilização de inseticidas domésticos (BATISTA, 2012; MACORIS *et al.*, 2018).

A resistência a inseticidas, além de ser uma vantagem em ambientes alterados, proporciona custos adaptativos nos diferentes aspectos de vida do mosquito, como alimentação, reprodução e desenvolvimento. BELLINATO & VALLE (2015) avaliaram diferentes parâmetros nos estágios de vida do *Ae. aegypti*. Nesse estudo, os autores observaram, por exemplo, que, apesar da menor quantidade de ovos postos pelas fêmeas, a prole demandou de um período menor de tempo na eclosão das larvas e no desenvolvimento até a fase adulta.

Em um estudo de BRITO *et al.* (2013), diversos aspectos e estados de vida foram avaliados em linhagens de *Ae. aegypti*. Os autores isolaram mutações *Kdr* por meio de inúmeros cruzamentos entre populações de mosquitos oriundas de Cachoeiro do Itapemirim (ES), por apresentar alta frequência de alelos resistentes para 1016//e, com a linhagem Rockefeller, por se tratar de uma colônia mantida por muitos anos em laboratório. A Rock-Kdr resultou desses cruzamentos, contendo somente a mutação 1016//e em seu código genético. Em seus achados, não observaram qualquer diferença entre o controle e Rock-Kdr, no que diz respeito a mortalidade de indivíduos adultos, curva de sobrevivência, peso dos indivíduos, viabilidade dos ovos, preferência de parceiros na reprodução. Entretanto, os autores notaram um desenvolvimento 40% mais rápido no grupo controle em relação a Rock-Kdr, e menor oviposição de fêmeas e quantidade de ovos por fêmea, além de queda na frequência do alelo resistente de Rock-Kdr, quando ambas populações compartilharam o mesmo ambiente. Isso porque a mutação possui um custo de manutenção, ou “*fitness cost*” deletério em relação ao alelo suscetível (BRITO *et al.*, 2013).

Contudo, no estudo de BRITO *et al.* (2013) a linhagem Rock-Kdr apresentou níveis de atividade locomotora significativamente maiores no período diurno, comparada ao grupo controle. Esses resultados corroboram os achados deste estudo, pois os perfis das populações de fêmeas de *Ae. aegypti* de Ribeirão Preto e Santos, classificadas como resistentes, apresentaram uma média de atividade locomotora no MPD semelhante ($z = 1,65$; $p = 0,08$), com diferença estatisticamente significativa das demais populações, inclusive da linhagem Rockefeller ($p < 0,05$).

Assim como mutações que conferem resistência a inseticidas, outros aspectos distintos podem influenciar na alteração do padrão da atividade locomotora de *Ae. aegypti*, bem como de outras espécies de mosquitos.

No estudo de LIMA-CAMARA *et al.* (2011), por exemplo, fêmeas de *Ae. aegypti* foram infectadas intratoracicamente com o sorotipo DENV-2, cuja presença foi detectada na cabeça desses mosquitos uma semana após a infecção. Consequentemente, os indivíduos infectados apresentaram maior atividade locomotora em relação ao controle durante a fotofase, quando a espécie se encontra mais ativa. O aumento da atividade locomotora por fêmeas infectadas de *Ae. aegypti* pode estar relacionado com a dinâmica do hábito hematofágico, aumentando a frequência de repastos e, consequentemente, a transmissão do vírus dengue ao homem. Isso poderia resultar em epidemias mais frequentes e com casos graves da doença, conforme demonstrado no modelo matemático desenvolvido por LUZ *et al.* (2011), baseados nos resultados do estudo de LIMA-CAMARA *et al.* (2011).

Similarmente, um estudo realizado com machos e fêmeas virgens de *Ae. aegypti*, infectados com uma cepa de *Wolbachia pipientis*, mostrou que a bactéria causou um aumento na atividade locomotora dos indivíduos infectados, em comparação com o grupo controle (EVANS *et al.*, 2009).

O aumento no período de atividade locomotora está diretamente relacionado com o número de repastos sanguíneos e vice-versa, pois sabe-se que em *Ae. aegypti* a discordância gonotrófica é comum e, em razão disso, há mais de um repasto por ciclo gonotrófico e, em razão disso, o aumento da procura por sangue possivelmente proporciona maior atividade locomotora das fêmeas (FIOCRUZ, 2018c). Em um contexto epidemiológico, pode significar um aumento na transmissão de doenças como a dengue, Zika, chikungunya e febre amarela urbana, apesar de não haver, até o momento, confirmação de transmissão – em condições naturais – de qualquer uma das três cepas do vírus amarílico por *Ae. aegypti* (COUTO-LIMA *et al.*, 2017).

A mudança em aspectos fisiológicos também pode influenciar diretamente na atividade locomotora das espécies de mosquitos. LIMA-CAMARA *et al.* (2013) inseminaram intratoracicamente fêmeas de *Ae. aegypti* com uma solução de glândulas acessórias de machos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Em decorrência disso, houve uma diminuição da atividade locomotora em ambos os grupos, em

comparação com as fêmeas do grupo controle. Além disso, as fêmeas de ambos os grupos, injetadas com as glândulas acessórias, foram refratárias à posterior inseminação coespecífica. Semelhantemente, fêmeas de *Ae. aegypti* somente inseminadas, somente alimentadas e inseminadas/alimentadas, bem como fêmeas de *Ae. albopictus* inseminadas/alimentadas apresentaram uma diminuição na atividade locomotora em comparação ao grupo controle, com fêmeas virgens e não alimentadas de cada espécie (LIMA-CAMARA *et al.*, 2014).

A simples alteração nos fatores abióticos pode refletir no relógio biológico das espécies. Em um trabalho de SHEPPARD *et al.* (2017), fêmeas de *An. gambiae* foram mantidas em um regime de LD 12:12, e em dado momento da fase escura, as luzes foram acesas por um breve período de 10 minutos. Como resultado, houve uma diminuição no número de repastos nas primeiras 2h a 4h do início da atividade locomotora dessa espécie. Adicionalmente, os indivíduos, quando expostos a um intervalo maior de luz (30'), durante a fase escura, tiveram a atividade locomotora completamente suprimida no início da fase escura, e esta atividade concentrou-se intensamente no final desta. Esses resultados mostram que pequenas alterações de luz podem influenciar no ciclo circadiano de mosquitos noturnos, além de alterar todo o padrão de alimentação esperado.

Em nosso estudo, a atividade locomotora de fêmeas de *Ae. aegypti* mostrou diferenças nos perfis populacionais e entre os anos testados neste estudo. A população de Campinas, considerada suscetível, mostrou um padrão de atividade locomotora em 2016 – em relação à média aritmética do MPD – mais próximo de Rockefeller (16,0) do que das populações resistentes de Santos (23,3) e Ribeirão Preto (20,2). Entretanto, mesmo apresentando essa semelhança na média aritmética, houve diferença significativa da linhagem Rockefeller nos testes post-hoc (teste de Dunn $z = 2,44$; $p < 0,05$). Isso pode estar relacionado ao fato de Campinas possuir uma frequência de alelos suscetíveis e resistentes que flutuam em diferentes períodos temporais (MACORIS *et al.*, 2018).

MACORIS *et al.* (2014), coletaram amostras da população de *Ae. aegypti* de Campinas em 2001, e os testes de bioensaio mostraram uma porcentagem de mortalidade acima dos 80% para o piretróide cipermetrina (tipo II – atuam na AChE), caracterizada pela OMS como uma população com suscetibilidade reduzida. Nos anos de 2007 até 2012, a população de Campinas exibiu resistência a outro

piretróide tipo II, a deltametrina, com porcentagem de mortalidade que variou de 34% até 70%, categorizando a população como resistente. Em 2013, essa porcentagem de mortalidade voltou a aumentar para 80,2%. A mudança desses percentuais de mortalidade expressados no fenótipo é um reflexo direto do genótipo. No estudo de MACORIS *et al.* (2018), indivíduos genotipados para as mutações 1016Ile e 1534Phe mostraram uma frequência de ambos os alelos em 0,27, 0,77 e 0,63, nos anos de 2004, 2010 e 2014 respectivamente. Os autores desse estudo mostraram ainda a correlação positiva entre a taxa de indivíduos de populações paulistas de *Ae. aegypti* que mostraram resistência a deltametrina com a incidência cumulativa de casos de dengue.

BATISTA (2012), em um estudo de genotipagem para mutações *Kdr* de várias populações paulistas de *Ae. aegypti* mostrou que indivíduos de Campinas de 2001 genotipados para 1016, tiveram uma frequência de 1,00 (ou 100%) para o alelo suscetível, traduzindo em uma Valina. Entretanto, é importante ressaltar que mesmo com a ausência do alelo resistente na população de Campinas em 2001, outros fatores genéticos podem contribuir para a resistência a inseticidas, como os próprios mecanismos metabólicos que garantem a sobrevivência de linhagens, mesmo as consideradas suscetíveis para mutações *Kdr* (BROGDON & MCALLISTER, 1998; BRAGA & VALLE, 2007a).

Contudo, BATISTA (2012) mostrou que esse cenário foi quase completamente revertido em apenas dez anos, pois indivíduos coletados em 2011 e genotipados para o mesmo *locus*, exibiram uma frequência de 0,77 para o alelo resistente, Isoleucina. Apontou ainda a possibilidade de migração e introdução de uma nova população, que explica a propagação de um alelo antes inexistente, ou pelo menos não suficientemente presente para ser representativo no material coletado. Os resultados atestam com os achados deste estudo, pois essa população, em um curto período, mostrou uma mudança brusca no padrão da atividade locomotora em 2017, e apresentou diferença significativa quando comparada a população Rockefeller ($z = 4,76$; $p < 0,05$) e semelhança quando comparada a população de Campinas, com um aumento de 50% na atividade locomotora.

Com esses resultados, é possível afirmar que essa mudança na atividade da população de Campinas foi maior comparada a linhagem laboratorial, pois a diferença que existia para a população de Santos em 2016 não se manteve em 2017

($z = 1,46$; $p = 0,11$). Um estudo de CHEDIAK *et al.* (2016) mostrou que mesmo com inúmeras populações brasileiras de *Ae. aegypti* apresentando níveis consideráveis de resistência ao organofosforado temefós, as populações do Estado de São Paulo – incluindo as analisadas neste estudo –, continuaram apresentando suscetibilidade ao larvicida, no biênio de 2010-2011. Isso sustenta a premissa de que o aumento na atividade locomotora das populações testadas neste estudo está relacionado a genótipos de resistência a inseticidas do tipo *Kdr*.

A análise de indivíduos de Marília do ano de 2016 mostrou, em todos os experimentos, uma média de atividade locomotora semelhante quando comparada a Rockefeller. Desta forma, a caracterização prévia da população como suscetível para resistência a inseticidas foi satisfatoriamente comprovada pelos resultados obtidos neste estudo em 2016; ratificada pela diferença estatisticamente significativa das populações resistentes de Santos e Ribeirão Preto.

A população de Marília apresentava um perfil fenotípico de resistência para cipermetrina (~80% mortalidade), semelhante à de Campinas em 2001. No biênio de 2002-2003, a população era considerada suscetível para organofosforado (malation e fenitrothion) e carbamato (bendiocarb). Contudo, indivíduos de 2011 da população de Marília apresentavam uma taxa de mortalidade abaixo dos 70% para todas as três classes de inseticidas (MACORIS *et al.*, 2014). Nas análises genéticas para mutações no canal de sódio, a frequência para a mutação *Kdr* na posição 1016/le em 2011 foi de 0,53 (BATISTA, 2012). Nada obstante, a frequência do alelo suscetível para o *locus* 1016 foi de quase 0,5 em 2015, sendo concomitante na frequência dos alelos resistentes para 1016 e 1534 para Marília, no mesmo ano (MACORIS *et al.*, 2018). Os achados da literatura atestam os resultados obtidos neste trabalho, justificando o aumento no padrão da atividade locomotora que foi observado nos indivíduos da população de Marília de 2017. Esses resultados evidenciam claramente a relação da atividade locomotora com resistência a inseticidas, pois Marília, diferentemente de 2016, apresentou diferença significativa com Rockefeller, e semelhança com Campinas ($z = 1,11$; $p = 0,11$), sobretudo com Santos ($z = 0,33$; $p = 0,71$). Adicionalmente, estudos apontam que, assim como Campinas, altas taxas de suscetibilidade para o larvicida temefós (OP) são presentes na população de Marília (CHEDIAK *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2017).

A população de Ribeirão Preto foi, assim como Santos, selecionada para os experimentos deste estudo, enquadrando-se como linhagem de perfil resistente, pois exibe um perfil fenotípico de resistência para piretróides, desde 2001 (MACORIS *et al.*, 2007 e 2014). Um estudo de genotipagem *Kdr* com populações paulistas de *Ae. aegypti*, BRACCO (não publicado)¹ mostrou, no biênio de 2013-2014, a frequência do alelo 1016//e, que confere resistência a piretróides, de 0,68 e 0,83 para Santos e Ribeirão Preto, respectivamente. Dados semelhantes foram encontrados nessas populações quando genotipadas para mutação 1534Cys, cuja frequência foi de 0,80 e 0,85, no mesmo período. Desta forma, esses achados atestam os resultados deste estudo, pois a análise da atividade locomotora da população de Ribeirão Preto mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparada a linhagem Rockefeller, e com as demais populações suscetíveis.

Estudos apontam a população de Santos com altas frequências de mutações *Kdr* e baixas porcentagens de mortalidade para inseticidas (MACORIS *et al.*, 2014 e 2018). A população tem mostrado resistência para inseticidas de diversas classes como cipermetrina e deltametrina (PY), malation e fenitrothion (OP), bendiocarb (CA), em diferentes períodos. Como destaque, somente em 2001, a população apresentou suscetibilidade reduzida para malation (MACORIS *et al.*, 2014). Na abordagem molecular, a frequência para mutação 1016//e foi de 0,76 em 2001, e 0,86 em 2011 (BATISTA, 2012). Contudo, um cenário distinto e mais expressivo na frequência das mutações 1016//e e 1534Cys mostrou a fixação de ambos os alelos na população em 2006, 2009 e 2014 (MACORIS *et al.*, 2018). Esses estudos consolidaram os resultados do presente estudo, pois a média aritmética da atividade locomotora de Santos no MPD foi a maior entre todas as populações testadas, sendo de 23,3 e 24,8 em 2016 e 2017, respectivamente.

Diante do fato da população ter apresentado este perfil característico de resistência (Dunn $z = 5,87$; $6,00$; $p < 0,05$), e devido ao seu comportamento de atividade locomotora significativamente maior em relação a Rockefeller em 2016 e 2017, foi possível abordar a população de Santos como um “controle positivo” para aumento da atividade locomotora e, assim, foi possível inferir na interpretação do aumento da atividade locomotora de Campinas e Marília de 2017, a partir da estatística apresentada.

¹ Informação fornecida por José Eduardo Bracco, São Paulo, não publicado.

A população de *Ae. aegypti* oriunda de Barretos mostrou baixa porcentagem de mortalidade quando exposta a piretróides, observadas desde 2001 (MACORIS *et al.*, 2014), porém alta suscetibilidade a organofosforado (MACORIS *et al.*, 2007 e 2014; CHEDIAK *et al.*, 2016). Adicionalmente, a utilização desta população de *Ae. aegypti* em nossos experimentos de 2017 como linhagem resistente foi consolidada segundo MACORIS (2017)², informando que esta população possui um perfil fenotípico de resistência a inseticidas, principalmente pela semelhança à Ribeirão Preto (comunicação pessoal). A frequência alélica de Barretos para as mutações 1016//e e 1534Cys, foram 0,43 e 0,53 respectivamente, em 2013 (BRACCO, não publicado). Nossos resultados mostraram que a média de atividade locomotora de Barretos no MPD teve diferença comparada a Rockefeller, bem como das populações de Campinas, Marília e Santos ($z = 2,45; 3,44; 3,80; p < 0,05$).

Curiosamente, mesmo classificada como resistente, a população de Barretos não apresentou diferença estatisticamente significante quando comparada com as populações de Campinas e Marília (KW $p = 0,54$), assim como da própria linhagem Rockefeller (KW $p = 0,05$) de 2016. Segundo nossos resultados, podemos inferir estatisticamente que a população de Barretos exibiu uma configuração no padrão da média da atividade locomotora semelhante aos perfis populacionais suscetíveis e da linhagem laboratorial, testados em 2016. Apesar da população de Barretos conter alelos que conferem resistência a inseticidas, o padrão da média de atividade locomotora de Barretos como mencionado, apresentou diferenças estatisticamente significantes comparada as demais populações de 2017, não desqualificando os demais achados.

É importante destacar a existência de duas variações de *Ae. aegypti* no Brasil: a africana, que inicialmente colonizou o Norte do país, e a asiática, que originou as populações do Sul (POWELL *et al.*, 1980; BRACCO *et al.*, 2007). Diante disso, o presente estudo avaliou a atividade locomotora de *Ae. aegypti*, visando somente os diferentes perfis de resistência a inseticida das populações analisadas, sem considerar essas variações, o que poderia dar margem a um viés metodológico. Contudo, a frequência aleatória dessas variações presentes nas populações de campo utilizadas neste estudo, pode não ter representatividade tendenciosa nos resultados, devido a ampla distribuição destas em território brasileiro (LIMA-JÚNIOR

² MACORIS, M.L.G. **Perfil populacional**. Informação recebida via telefone, fevereiro de 2017.

et al., 2009; MONTEIRO *et al.*, 2014). JÚNIOR *et al.* (2009) apontam que diferentes variações podem apresentar suscetibilidades distintas aos vírus DENV e YFV. Assim sendo, diferentes variações de *Ae. aegypti*, bem como as subespécies, podem exibir um padrão distinto de atividade locomotora isoladamente.

Um ponto importante a ser considerado é que todos os estudos mencionados testaram a atividade locomotora de populações de *Ae. aegypti* de campo, exceto os estudos de LIMA-CAMARA *et al.* (2011 e 2014), que utilizaram linhagens laboratoriais Rockefeller e outra linhagem laboratorial denominada Paea. Assim, é possível que, por se tratar de populações de campo, as alterações no padrão de atividade possam ter ocorrido também por mutações que estão disseminadas nas mesmas, e até mesmo da interferência dos aspectos citados nos estudos.

Por meio dos comparativos deste estudo com o que se tem publicado, foi possível notar uma carência de estudos que avaliem a atividade locomotora quanto à resistência a inseticidas (fenótipo e genótipo) de populações paulistas de *Ae. aegypti*, ou de populações de campo de modo geral. Desta forma, os achados desse estudo podem contribuir de maneira inédita na elucidação dos diversos aspectos que estão envolvidos diretamente com a atividade locomotora de populações urbanas deste mosquito. Apesar de não termos determinado as características genotípicas das populações estudadas neste trabalho, observamos um forte indicativo de que populações caracterizadas como resistentes, a partir de bioensaios, apresentaram maior atividade locomotora do que as suscetíveis.

Em virtude dos fatos encontrados neste estudo, percebe-se ainda que a mudança no perfil populacional em um curto período de tempo, está relacionada à frequência de indivíduos resistentes presentes na população, e nas sucessivas linhagens que se originam. Dessa forma, novos estudos que avaliem aspectos comportamentais, sobretudo de atividade locomotora dessas e de outras populações de *Ae. aegypti* que apresentem ou não resistência a inseticidas são necessários.

6. CONCLUSÃO

O padrão de atividade locomotora de *Ae. aegypti* das populações suscetíveis de Campinas e Marília, das populações resistentes de Ribeirão Preto, Barretos e Santos, além da linhagem Rockefeller, foi avaliado nos anos de 2016 e 2017.

Nas comparações múltiplas feitas entre as populações testadas, em 2016 a população suscetível de *Ae. aegypti* de Marília não apresenta diferença na atividade locomotora, sendo semelhante a linhagem laboratorial Rockefeller. As populações de *Ae. aegypti*, caracterizadas como resistentes, provenientes de Santos e Ribeirão Preto, apresentam diferença na atividade locomotora das populações suscetíveis de Marília e do grupo controle Rockefeller, com uma atividade locomotora maior. A população suscetível de Campinas mostrou diferença no padrão de atividade locomotora, sendo maior que Rockefeller e menor do que a população de Ribeirão Preto.

Em 2017, as populações de *Ae. aegypti* suscetíveis de Campinas e Marília apresentaram diferença na atividade locomotora, sendo maiores do que Rockefeller mas não apresentaram diferença quando comparadas a população resistente de Santos, mostrando semelhança com esta. A população de Barretos, com exceção de Rockefeller, mostrou um padrão de atividade locomotora menor do que as populações de Campinas e Marília, bem como de Santos.

O aumento na atividade locomotora de populações com perfil de resistência a inseticidas, pode biologicamente contribuir para maior atividade de voo, bem como maior procura por alimento e maior número de repastos realizados pelas fêmeas. Em um contexto de epidemia por arbovírus, podemos prever um cenário mais complexo para o controle dessa espécie e para a epidemiologia das doenças que envolvem esse vetor, pois o controle vetorial realizado por meio de inseticidas, principalmente os de uso doméstico, podem favorecer no aumento de incidência de número de casos de arboviroses, além da pressão seletiva que linhagens de *Ae. aegypti* são submetidas frequentemente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE-OBANDO, O. A. *et al.* Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in *Aedes aegypti* populations from Jacarezinho (Brazil) after a Dengue Outbreak. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 60, p. 94-100, Dezembro 2016.
- AMORETTY, P. R. D. *et al.* Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio. *Acta Scientidae & Technicae*, Rio de Janeiro, v. 1, p. 12, Fevereiro 2013.
- AMPLEFORD, E. J.; STEEL, C. G. H. Circadian Control of a Daily Rhythm in Hemolymph Ecdysteroid Titer in the Insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *General and Comparative Endocrinology*, Ontario, CA, v. 59, p. 453-459, Janeiro 1985.
- ARIARATNAM, V.; GEORGHIOU, G. P. Carbamate resistance in *Anopheles albimanus*: Penetration and metabolism of carbaryl in propoxur-selected larvae. *Bull. World Health Organ.*, v. 52, p. 6, 1975.
- BARATA, E. A. M. D. F. *et al.* População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Pública*, São Paulo, v. 35, p. 237-242, 2001.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados*, São Paulo, v. 22, p. 20, Dezembro 2008.
- BATISTA, E. *Evolução de mutações do gene do canal de sódio associadas à resistência tipo Kdr em populações de Aedes (Stegomyia) aegypti do Estado de São Paulo*. faculdade de Saúde Pública. São Paulo, p. 95. 2012.
- BELINATO, T. A. *et al.* Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 104, p. 43-47, Fevereiro 2009.
- BELINATO, T. A.; VALLE, D. The Impact of Selection with Diflubenzuron, a Chitin Synthesis Inhibitor, on the Fitness of Two Brazilian *Aedes aegypti* Field Populations. *Plos One*, v. 10, p. 19, Junho 2015.
- BENCHIMOL, J. L. A vacina. In: BENCHIMOL, J. L. *Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, v. 1, 2001. Cap. 3, p. 1-71.
- BERMUDI, P. M. M. *et al.* *Aedes aegypti* breeding site in an underground rainwater reservoir: a warning. *Rev Saúde Pública*, São Paulo, v. 51, p. 5, Maio 2017.

- BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*, Inglaterra, v. 496, p. 504-507, Abril 2013.
- BRACCO, J. E. *et al.* Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, p. 573-580, Agosto 2007.
- BRACCO, J. E.; BARATA, J. M. S. *Avaliação da resistência a inseticidas em população de Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) no Rio Pinheiros (São Paulo, Brasil)*. Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, p. 118. 1998.
- BRADY, O. J. *et al.* Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *Plos One*, v. 6, p. 15, Agosto 2012.
- BRAGA, I. A. *et al.* *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, p. 199-203, Março 2004.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 16, p. 15, Outubro-dezembro 2007a.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, p. 113-118, Abril-junho 2007b.
- BRASIL. *Portaria nº 329*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, p. 1. 1985.
- BRASIL. *Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue - Série A. Normas e Manuais Técnicos*. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BRASIL. *Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014*. Secretaria de Vigilância e Saúde - Ministério da Saúde. Brasília, p. 9. 2015.
- BRASIL. *Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016*. Secretaria de Vigilância e Saúde - Ministério da Saúde. Brasília, p. 11. 2017.
- BRASIL. Febre amarela: Ministério da Saúde atualiza casos no país. *Ministério da Saúde*, 2018. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42655-febre-amarela-ministerio-da-saude-atualiza-casos-no-pais>>. Acesso em: 9 Abril 2018.
- BRENGUES, C. *et al.* Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations on the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 17, p. 87-94, 2003.

- BRITO, L. P. *et al.* Assessing the Effects of *Aedes aegypti* *kdr* Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *Plos One*, v. 8, p. 10, Abril 2013.
- BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, p. 605-613, Outubro-dezembro 1998.
- BUSVINE, J. R. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature*, p. 3, Agosto 1951.
- CALDAS, L. Q. D. A. *Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides*. Niterói: CCIn, 2000.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, Salvador, v. 21, p. 1885-1886, Outubro 2015.
- CAVALCANTI, L. P. D. G. *et al.* Competência de peixes como predadores de larvas de *Aedes aegypti*, em condições de laboratório. *Rev Saúde Pública*, São Paulo, v. 41, p. 7, Abril 2007.
- CDC. Center of Diseases Control, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/vhf/virus-families/flaviviridae.html>>. Acesso em: 9 abril 2018.
- CHEDIAK, M. *et al.* Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 111, p. 311-321, Maio 2016.
- CHOW, C. Y.; SOEPARMO, H. T. DDT-resistance of *Anopheles sundaicus* in Java. *Bulletin of World Health Organization*, v. 15, p. 2, 1957.
- CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti* (L.) The Yellow Fever Mosquito. *The Syndics Of The Cambridge University Press*, Londres, p. 750, 1960.
- CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, v. 1, 1994.
- COSEMS-SP, C. D. S. M. D. S. D. E. D. S. P., 2018. Disponível em: <http://www.cosemssp.org.br/congresso2017/arquivos/apresentacoes/22_de_marco/CURSO-VIGILANCIA-EM-SAUDE/LUZIA%20ROMANHOLI.pdf>. Acesso em: 16 Julho 2018.
- COUTO-LIMA, D. *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Scientific Reports*, v. 7, p. 12, Julho 2017.
- CVE, Centro de Vigilância Epidemiológica., 2018a. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/homepage/destaques/febre-amarela-boletim-epidemiologico>>. Acesso em: 16 Julho 2018.

- CVE, Centro de Vigilância Epidemiológica., 2018b. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/famarela/famarela_seriehistorica.pdf>. Acesso em: 16 Julho 2018.
- D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano); Toxicidade e Contaminação Ambiental - Uma Revisão. *Quim. Nova*, Rio de Janeiro, v. 25, p. 1-8, Março 2002.
- DAVIES, T. G. E. *et al.* DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. *IUBMB Life*, v. 59, p. 151-162, Março 2007.
- DIAS, L. D. S. *et al.* Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. *Plos One*, p. 15, Março 2017.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations And Serological Specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, p. 12, Setembro 1952.
- DICK, O. B. *et al.* Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 87, p. 10, Julho 2012.
- DINIZ, D. F. A. *et al.* Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites & Vectors*, v. 8, p. 15, Dezembro 2015.
- DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. *NIH PA*, v. 7, p. 17-30, Março 2007.
- DZUL-MANZANILLA, F. *et al.* Indoor Resting Behavior of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Acapulco, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, v. 0, p. 4, Dezembro 2016.
- EVANS, O. *et al.* Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipientis*. *The Journal of Experimental Biology*, v. 212, p. 1436-1441, Março 2009.
- FILIPPE., A. F.; PINTO, M. R. Arbovirus studies in Luanda, Angola. *Bull. Org. mond. Santé*, v. 49, p. 37-40, 1973.
- FIOCRUZ. Instituto Oswaldo Cruz. *IOC Fiocruz*, 2018a. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=573&sid=32>> . Acesso em: 6 Abril 2018.
- FIOCRUZ. Instituto Oswaldo Cruz, 2018b. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>>. Acesso em: 6 Abril 2018.
- FIOCRUZ. Instituto Oswaldo Cruz, 2018c. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/curiosidades.html>> Acesso em 6 Abril 2018.

- FORATTINI, O. P. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia*. 2. ed. São Paulo: EDUSP, 2002. 549 p.
- FRANCO, O. *História da Febre Amarela no Brasil*. Rio de Janeiro: [s.n.], 1969.
- FUNASA. *Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor: Manual de Normas Técnicas*. Fundação Nacional da Saúde - Ministério da Saúde. Brasília, p. 75. 2001.
- FUNASA. Cronologia Histórica da Saúde Pública. *Fundação Nacional da Saúde - Ministério da Saúde*, 2018. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/cronologia-historica-da-saude-publica>>. Acesso em: 11 Abril 2018.
- GENTILE, C. *et al.* Cloning and daily expression of the timeless gene in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Elsevier*, v. 36, p. 7, Agosto 2006.
- GENTILE, C. *et al.* Circadian Expression of Clock Genes in Two Mosquito Disease Vectors: cry2 Is Different. *Journal of Biological Rhythms*, Rio de Janeiro, v. 24, p. 444-451, Dezembro 2009.
- GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Review*, Fort Collins, v. 11, p. 480-496, Julho 1998.
- HALSTEAD, S. B. Global Epidemiology of Dengue: Health Systems in Disarray. *Trop. Med.*, Nova Iorque, v. 35, p. 137-146, 1993.
- HARRIS, A. F.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 83, p. 277-284, Abril 2010.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 45, p. 371-391, 2000.
- HONÓRIO, N. A. *et al.* The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 25, p. 1203-1214, Junho 2009.
- HUANG, Y. J. S. *et al.* Flavivirus-Mosquito Interactions. *Viruses*, v. 6, p. 4703-4730, 2014.
- HUNSPERGER, E. Flavivirus Diagnostics. In: SHI, P. Y. *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*. Singapura: [s.n.], 2012. Cap. 13, p. 358.
- KANTOR, I. N. Dengue, Zika y Chikungunya. *Medicina (Buenos Aires)*, Buenos Aires, v. 76, p. 5, 2016.
- KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Estados Unidos, v. 68, n. 9, p. 2112-2116, Setembro 1971.
- LIMA-CAMARA, T. N. *et al.* Dengue Infection Increases the Locomotor Activity of *Aedes aegypti* Females. *Plos One*, v. 6, p. 5, Março 2011.

- LIMA-CAMARA, T. N. *et al.* Male accessory gland substances from *Aedes albopictus* affect the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 108, p. 18-25, Setembro 2013.
- LIMA-CAMARA, T. N. *et al.* Effects of insemination and blood-feeding on locomotor activity of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females under laboratory conditions. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 8, Julho 2014.
- LIMA-JÚNIOR, R. S.; SCARPASSA., V. M. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. *Sociedade Brasileira de Genética*, v. 32, p. 414-422, 2009.
- LINSS, J. G. B. *et al.* Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys *Kdr* mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 11, Janeiro 2014.
- LOUGHNEY, K.; KREBER, R.; GANETZKY, B. Molecular Analysis of the para Locus, a Sodium Channel Gene in *Drosophila*. *Cell*, v. 58, p. 1143-1154, Setembro 1989.
- LUZ, P. M. *et al.* Potential impact of a presumed increase in the biting activity of dengue-virus-infected *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females on virus transmission dynamics. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 106, p. 755-758, Setembro 2011.
- MACORIS, M. D. L. D. G. *et al.* Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, p. 895-900, Dezembro 2007.
- MACORIS, M. D. L. D. G. *et al.* Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, p. 6, 2014.
- MACORIS, M. D. L. *et al.* Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, p. 18, Março 2018.
- MAGALHÃES, R. C. D. S. *A erradicação do Aedes aegypti: febre amarela, Fred Soper e saúde pública nas Américas (1918-1968)*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2016. 413 p.
- MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika Virus from *Aedes aegypti* Mosquitoes in Malaysia. *The American Journal of Tropical and Hygiene*, v. 13, p. 1, 1969.
- MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. 2ª ed. São Paulo: Edusp, 1999. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=Y0l5kohj5oEC&pg=PA6&lpg=PA6>>

&dq=marques+e+menna-barreto+1999+Cronobiologia:+Princ%C3%ADpios+e+Aplica%C3%A7%C3%B5es&source=bl&ots=8-2mK_3-wT&sig=SQ9nPWDaSFxBMD-ZyimB6-75uBQ&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjggPjo57PbAhVIE5AKHU4D>.

- MARTINS, A. D. J. *Diversidade do gene de canal de sódio regulado por voltagem de Aedes aegypti Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) e resistência a piretróide*. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p. 130. 2009.
- MONTEIRO, F. A. *et al.* Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 9, p. 10, Setembro 2014.
- OMS. Vector resistance to pesticides: fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. *WHO technical report series: 818º*, Genebra, 1992. 68.
- PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 28, p. 218-227, 1994.
- POWELL, J. R.; TABACHNICK., W. J. Genetics and the Origin of a Vector Population: *Aedes aegypti*, a Case Study. *Science*, v. 208, p. 3, Junho 1980.
- PUTNAM, J. L.; SCOTT, T. W. Blood-feeding behavior of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, v. 52, p. 225-227, Março 1995.
- RAJU, T. N. K. The Nobel Chronicles. *The Lancet*, Chicago, v. 353, p. 1, Abril 1999.
- RIBEIRO, B. N. D. F. *et al.* Síndrome congênita pelo vírus Zika e achados de neuroimagem: o que sabemos até o momento? *Radiol Bras.*, v. 50, p. 314-22, Setembro-outubro 2017.
- RIVAS, G. B. D. S. Genética molecular dos ritmos circadianos em insetos vetores. In: _____ *Revista da Biologia: Cronobiologia*. São Paulo: IB-USP, v. 9, 2012. Cap. 4, p. 19-25.
- SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. *et al.* A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, v. 16, p. 785-798, Outubro 2007.
- SAINGAMSOOK, J. *et al.* A multiplex PCR for detection of knockdown resistance mutations, V1016G and F1534C, in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 9, Outubro 2017.
- SAMPAIO, V. D. S. *et al.* What does not kill it makes it weaker: effects of sub-lethal concentrations of ivermectin on the locomotor activity of *Anopheles aquasalis*. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 10, Dezembro 2017.
- SAUNDERS, D. S. *et al.* *Insect Clocks*. 3ª. ed. Edimburgo: Elsevier, v. 1, 2002.

- SCHMALJOHN, A. L.; MCCLAIN, D. Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae). In: BARON, S. *Medical Microbiology*. 4. ed. Texas: [s.n.], 1996. Cap. 54.
- SCHMANDT-BESSERAT, D. *et al.* *Investigacion Y Ciencia*. Barcelona: Prensa Cientifica, v. 1, 1978. 110 p.
- SENG, C. M. *et al.* Community-based use of the larvivorous fish *Poecilia reticulata* to control the dengue vector *Aedes aegypti* in domestic water storage containers in rural Cambodia. *Journal of Vector Ecology*, v. 33, p. 139-144, Junho 2008.
- SEVERO, O. P. *Eradication of the Aedes Aegypti Mosquito from The Americas*. Yellow fever, a symposium in commemoration of Carlos Juan Finlay. Philadelphia: Jefferson History and Publications. 1955. p. 23.
- SHEPPARD, A. D. *et al.* Light manipulation of mosquito behaviour: acute and sustained photic suppression of biting activity in the *Anopheles gambiae* malaria mosquito. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 14, Junho 2017.
- SILVA, H. H. G. D.; SILVA, I. G. D. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, p. 349-355, Julho-Agosto 1999.
- SILVA, W. M. D. *Aspectos genéticos e comportamentais da resistência a deltametrina em populações de Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, p. 73. 2011.
- SIMARD, F. *et al.* Geographic Distribution and Breeding Site Preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Cameroon, Central Africa. *J. Med. Entomol*, Oxford, v. 42, p. 6, Março 2005.
- SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science*, v. 64, p. 610-616, Março 2008.
- SUCEN. *Suplemento Especial do Boletim Epidemiológico Paulista*. Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. São Paulo, p. 62. 2006. (ISSN: 1806-4272).
- SWAROOP, A. *et al.* Chikungunya Fever. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, v. 8, p. 5, Abril-Junho 2007.
- TAYLOR, B.; JONES, M. D. R. The circadian rhythm of flight activity in the mosquito *Aedes aegypti* (L.): the phase-setting effects of light-on and light-off. *J. Exp. Biol.*, p. 59-70, 1969.
- TOMOTAMI, B. M.; ODA, G. A. Diurnos ou Noturnos? Discutindo padrões temporais de atividade. In: _____ *Revista da Biologia: Cronobiologia*. São Paulo: IB-USP, v. 9, 2012. Cap. 1, p. 1-6.

- VAFOPPOULOU, X.; STEEL, C. G. H. Circadian Regulation of Synthesis of Ecdysteroids by Prothoracic Glands of the Insect *Rhodnius prolixus*: Evidence of a Dual Oscillator System. *General and Comparative Endocrinology*, Ontario, CA, v. 83, p. 27-34, 1991.
- WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. An Introduction to Insecticides. *University of Minnesota*, 2004. Disponível em: <<https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides>>. Acesso em: 10 Abril 2018.
- YANOLA, J. *et al.* A novel F 1552/C 1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Elsevier*, v. 96, p. 127-131, 2010.
- YANOLA, J. *et al.* High-throughput assays for detection of the F 1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Aedes aegypti and the distribution of this mutation throughout*, v. 16, p. 501-509, Abril 2011.
- ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 110, p. 569-572, Junho 2015.

8. CURRÍCULO LATTES

Bruno Magalhães Nakazato

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6029594013200528>
Última atualização do currículo em 09/11/2018

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Santo Amaro (2013), foi bolsista no Programa de Aprimoramento Profissional pela Fundação de Desenvolvimento Administrativo, realizado na Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN (2016). Possui mestrado pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (2018). Tem experiência na área de Entomologia, com ênfase em: *Aedes aegypti*, resistência à inseticidas, genética de populações, mutações Kdr e atividade locomotora. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Bruno Magalhães Nakazato
Nome em citações bibliográficas	NAKAZATO, B. M.

Endereço

Endereço Profissional	Faculdade de Saúde Pública da USP. Av. Dr. Arnaldo, 715 Pacaembu 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617710 URL da Homepage: http://www.fsp.usp.br/site/
-----------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2016 - 2018	Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Avaliação da atividade locomotora de <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) com diferentes perfis de resistência a inseticidas do Estado de São Paulo, Ano de Obtenção: 2018. Orientador: Tamara Nunes de Lima Camara. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: atividade locomotora; <i>Aedes aegypti</i> ; mutação; inseticida; resistência. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública. Graduação em Ciências Biológicas. Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil. Título: Revisão dos diagnósticos moleculares de malária: abordagem sobre estudos realizados no Brasil. Orientador: Giselle Fernandes Maciel de Castro Lima.
2009 - 2013	

Atuação Profissional

Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2016	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista FUNDAP, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.
-------------	---

Outras informações

Bolsista no Programa de Aprimoramento Profissional (PAP-FUNDAP), desenvolvendo atividades no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. Rotina laboratorial em biologia molecular, aplicada nas