



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS



RAFAELA CASSIANO MATOS

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE MOSQUITOS DAS ESPÉCIES
Aedes aegypti E *Culex quinquefasciatus*, PROVENIENTES DE PONTOS
ESTRATÉGICOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE.**

RECIFE
2022

RAFAELA CASSIANO MATOS

**AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE MOSQUITOS DAS
ESPÉCIES *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus*,
PROVENIENTES DE PONTOS ESTRATÉGICOS DA REGIÃO
METROPOLITANA DO RECIFE.**

Monografia apresentada a coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. José Dijair Antonino de Souza Júnior.

Supervisor: Marcelo Henrique Santos Paiva.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M433a

Matos, Rafaela Cassiano

Avaliação da variabilidade genética de mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, provenientes de pontos estratégicos da Região Metropolitana do Recife. / Rafaela Cassiano Matos. - 2022.

71 f. : il.

Orientador: José Dijair Antonino de Souza Júnior.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

1. *Aedes aegypti*. 2. *Culex quinquefasciatus*. 3. Variabilidade genética. I. Junior, Jose Dijair Antonino de Souza, orient. II. Título

CDD 574

Data da defesa: 07/10/2022

**Título : AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE MOSQUITOS
DAS ESPÉCIES *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus*,
PROVENIENTES DE PONTOS ESTRATÉGICOS DA REGIÃO
METROPOLITANA DO RECIFE.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. José Dijair Antonino de Souza Júnior

(Orientador)

UFRPE

Dr. Martin Alejandro Montes

(Titular interno a UFRPE)

UFRPE

Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa

(Titular externo a UFRPE)

Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Dr. Derciliano Lopes da Cruz

(Suplente)

Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Dedico este trabalho à minha querida avó Gemima e a minha mãe, Sueli,
meus maiores exemplos de força e de resiliência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu supervisor/orientador, Marcelo Henrique, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, por toda a paciência, ensinamentos, conhecimento e confiança ao longo desses anos.

A meu orientador da UFRPE, professor Djair, por toda paciência e disponibilidade em ajudar.

A minha co-orientadora, Duschinka, por todo o suporte e apoio não só na elaboração desse trabalho, mas também ao longo dessa minha trajetória.

A minha co-orientadora, Luísa, por toda paciência em esclarecer as minhas inúmeras dúvidas e por toda a dedicação e cuidado.

Agradeço a minha vó, Gemima, que com o seu jeitinho, sempre me deu apoio e incentivo nas horas difíceis. Que me orientou, mesmo de longe, e sempre cuidou de mim. Agradeço a força maior que rege nossas vidas por ter a senhora comigo nesse momento.

A minha mãe, guerreira, professora, Sueli, meu maior exemplo de resiliência e de força, pois nunca se deixou abalar com as rasteiras da vida e foi com ela que aprendi a lutar e viver sem ter a vergonha de ser feliz!

Agradeço a minha família, em especial a minha prima/irmã Quézia, por ser um dos pontos de luz dessa minha trajetória.

A minha amiga Hitala, por ser quem ela é e por me permitir ser exatamente quem eu sou.

Ao meu melhor amigo e porto seguro, Thiago, por sempre ter me dado a força e o incentivo necessário para continuar. Por cuidar de mim nos momentos mais difíceis e por está sempre ao meu lado para absolutamente tudo.

As amigas que o curso me deu, Bruna, Lud, Laura e Letícia, vocês contribuíram não só na minha formação acadêmica, mas também na minha formação como pessoa. Vou sentir falta da convivência doida e linda da gente.

As “Pupas”, pela amizade, apoio, e pela companhia nessa trajetória acadêmica.

A todos os colaboradores, pesquisadores e alunos do departamento de Entomologia pelo conhecimento passado e por estarem sempre dispostos a ajudar.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigada!

“Algumas batalhas são vencidas com espadas e lanças, outras com papel e caneta.”

George R.R. Martin, A Storm of Swords.

RESUMO

Espécies invasoras como os mosquitos do gênero *Aedes* (*Ae.*) e *Culex* (*Cx.*), ocupam um papel relevante devido à sua participação na transmissão de vários arbovírus como o vírus da Dengue, Chikungunya e Zika. A complexidade em controlar esses mosquitos, se torna um desafio quando consideramos os efeitos da globalização, as mudanças climáticas e o processo desordenado da urbanização nos centros urbanos. Métodos alternativos de controle vêm sendo desenvolvidos e implementados para controlar a dispersão e transmissão de patógenos por esses vetores. No entanto, apesar de todos os esforços as epidemias se mostram constantes. Com isso, conhecer mais sobre a biologia do vetor pode auxiliar na criação de estratégias mais eficazes de controle, a fim de reduzir as populações desses culicídeos e consequentemente a transmissão de arbovírus. Diante disso, com o intuito de avaliar mosquitos coletados em pontos de entrada da Região Metropolitana do Recife, este trabalho analisou a variabilidade genética das espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em quatro localidades, Porto do Recife, Terminal Integrado de Passageiros, Porto de Suape e o Centro de Abastecimento e logística de Pernambuco. Ovos e as formas imaturas desses culicídeos foram coletados e posteriormente levadas ao insetário do Departamento de Entomologia do IAM, onde completaram seu ciclo de desenvolvimento para coleta dos adultos. As fêmeas dessas populações foram submetidas à extração de DNA, seguida de amplificação por PCR dos genes mitocondriais Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) e NADH subunidade 4 (ND4), sequenciados e analisados. A análise realizada para o gene COI revelou baixa diversidade nucleotídica ($\pi=0,00174$; $0,00016$) para ambas as espécies. Já para o gene ND4 a diversidade nucleotídica foi de (π) $0,01086$ e $0,0000$, para as populações de *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, respectivamente. A análise do gene COI e ND4 para as populações de *A. aegypti* revelou a presença de 5 e 34 haplótipos, respectivamente, com o haplótipo H1 e o H3 sendo os mais frequentes, presentes em 91,48% e 56%. A análise do gene COI e ND4 para as populações de *Cx. quinquefasciatus* revelou a presença de quatro e um haplótipo, respectivamente, com o haplótipo H1 sendo o mais frequente para o gene COI, presentes em 96,04 % dos indivíduos. Diante dos resultados obtidos foi observado que a espécie *A. aegypti* se mostra mais diversa que a espécie *Cx. quinquefasciatus*, além disso, a localidade do TIP possui as maiores taxas de diversidade nucleotídica para ambas as espécies, o que pode estar atrelado ao fato de múltiplas introduções desses culicídeos que são promovidas pelo constante fluxo

de pessoas e transportes de diversos tipos.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. *Culex quinquefasciatus*. Variabilidade genética.

ABSTRACT

Invasive species such as *Aedes* (Ae.) and *Culex* (Cx.) mosquitoes play a relevant role due to their association with the transmission of several arboviruses such as Dengue, Chikungunya and Zika viruses. The complexity in controlling these mosquitoes becomes a challenge when we consider the effects of globalization, the changes climate change and the disorderly process of urbanization in urban centers. Alternative control methods have been developed and implemented to control dispersion and transmission of pathogens by these vectors. Nonetheless, despite all efforts, epidemics show constants. With this, knowing more about the biology of the vector can help in the creation of more effective strategies of control, in order to reduce the populations of these Culicidae and consequently the transmission of arboviruses. That said, in order to evaluate mosquitoes collected at points of entrance of the Metropolitan Region of Recife, this work analyzed the genetic variability of the species *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in four locations, Porto do Recife, Terminal Integrado de Passageiros, Porto de Suape and the Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco. Eggs and immature forms of these Culicidae were collected and later taken to the insectary of the Department of Entomology at IAM, where they completed their development cycle for collection of adults. Females from these populations underwent DNA extraction, followed by PCR amplification of the mitochondrial genes Cytochrome C Oxidase subunit I (COI) and NADH subunit 4 (ND4), sequenced and analyzed. The analysis performed for the COI gene revealed low nucleotide diversity ($\pi=0.00174$; 0.00016) for both species. As for the ND4 gene, the nucleotide diversity was (π) 0.01086 and 0.0000 , for the populations of *A. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*, respectively. The analysis of the COI and ND4 gene for *A. aegypti* populations revealed the presence of 5 and 34 haplotypes, respectively, with the H1 and H3 haplotypes being the most frequent, present in 91.48% and 56%. Analysis of the COI and ND4 gene for *Cx. quinquefasciatus* populations revealed the presence of four and one haplotype, respectively, with the H1 haplotype being the most frequent for the COI gene, present in 96.04% of the individuals. In view of the results obtained, it was observed that the species *A. aegypti* is more diverse than the species *Cx. quinquefasciatus*, in addition, the TIP locality has the highest rates of nucleotide diversity for both species, which may be linked to the multiple introductions of these Culicidae that are promoted by the constant flow of people and transport of

different types.

Keywords: *Aedes aegypti*. *Culex quinquefasciatus*. Genetic variability.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	BIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE <i>Aedes aegypti</i> E <i>Culex quinquefasciatus</i>	16
2.1.1	<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	16
2.1.2	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Say, 1823).....	19
2.2	EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES <i>Aedes aegypti</i> E <i>Culex quinquefasciatus</i>	21
2.3	BREVE HISTÓRICO E DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS TRADICIONAIS DE CONTROLE DE CULICÍDEOS.....	25
2.3.1	Inovações no controle vetorial	27
2.4	MARCADORES GENÉTICOS	28
2.4.1	DNA mitocondrial	29
3.	METODOLOGIA	32
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	32
3.1.1	Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA- PE)	33
3.1.2	Porto do Recife	34
3.1.3	Terminal Integrado de Passageiros	35
3.1.4	Porto de Suape	35
3.2	COLETA E AMOSTRAGEM.....	36
3.2.1	Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR)	38
3.2.2	Sequenciamento	39
3.2.3	Análises filogenéticas	40
4.	RESULTADOS	41
4.1	COLETA E AMOSTRAGEM.....	41

4.2	EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO.....	42
5.	DISCUSSÃO	51
6.	CONCLUSÕES.....	54
7.	REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

A introdução de espécies em novos habitats é impulsionada pelo aumento do fluxo de mercadorias e de pessoas, que ocorre por meio de transportes mais rápidos e eficientes que visam atender a demanda do crescimento econômico e populacional (KILPATRICK, 2011). Como exemplo de espécies invasoras temos os mosquitos do gênero *Aedes* (*Ae.*) e *Culex* (*Cx.*), que ocupam um papel relevante devido à sua participação na transmissão de várias doenças infecciosas causadas por arbovírus emergentes e reemergentes que geram graves consequências para a saúde pública (LWANDE et al., 2019). Outro fator que atua paralelamente a globalização e influencia diretamente na dispersão desses vetores são as mudanças climáticas, que atuam modificando a dinâmica populacional através do aumento da proliferação desses mosquitos, seja por meio do aumento da temperatura global, que causa a diminuição do tempo de desenvolvimento dos estágios imaturos, ou , pela instabilidade dos índices pluviométricos, que acabam aumentando a oferta de criadouros para esses culicídeos (REINHOLD; LAZZARI; LAHONDÈRE, 2018; CIOTA; KEYEL, 2019).

Além disso, esses vetores são extremamente associados ao homem e ao ambiente urbano, o que aumenta o risco de transmissão dos arbovírus, que saltaram dos ciclos estritamente silvestres e se tornaram um dos principais responsáveis por produzirem infecções de ampla distribuição classificadas como epidemias em diversos centros urbanos (WEAVER; REISEN, 2010). Como exemplo desses arbovírus podemos citar os vírus da dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) e o vírus do Nilo Ocidental (WNV) (LWANDE et al., 2019; CABI, 2022).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde demonstram que houve um aumento de casos de DENV em 189,1% no ano de 2022, quando comparado ao mesmo período no ano de 2021 (BRASIL, 2022). No Nordeste, Pernambuco demonstrou dados alarmantes em relação ao vírus CHIKV, no ano de 2021, ocupando o primeiro lugar entre os estados que possuem altas taxas de sorologia positiva, com uma porcentagem de 69,2% (BRASIL, 2021). Além disso, existe o ZIKV, que foi responsável pela epidemia no ano de 2015 e pelo aumento de casos de microcefalia em recém-nascidos no estado de Pernambuco, e que atualmente observa-se um aumento de 98,8% no número de casos, quando comparado ao mesmo período no ano de 2021 (LOWE et al., 2018; SOUZA et al., 2018; BRASIL, 2022).

Portanto, o contato de humanos com esses vetores é frequente em todo o país e para a maioria dos arbovírus de importância médica e sanitária, não existem vacinas comercialmente disponíveis nem tratamento específico, por essa razão, o controle dessas enfermidades se dá, primariamente, pelo controle dos vetores responsáveis pela sua disseminação (LIMA- CAMARA, 2016). Esse controle é realizado através de diferentes métodos, sendo esses mecânicos, químicos, biológicos e por meio da engenharia genética (ZARA et al., 2016).

A implementação desses métodos de controle, se rigorosamente aplicados, pode reduzir a transmissão desses arbovírus, porém, fatores como a resistência a inseticidas, podem tornar os métodos ineficazes (ACHEE et al., 2019). Com isso, conhecer a estrutura genética populacional e os padrões de fluxo gênico desses vetores se torna uma ferramenta fundamental para formular e implementar estratégias mais efetivas e apropriadas, a fim de interromper a transmissão do patógeno (MAITRA, 2019).

Para examinar a estrutura genética dessas populações de culicídeos vem sendo utilizados nos últimos anos diversos marcadores genéticos, dentre eles pode-se citar as isoenzimas, Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente (RAPD), Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP), microssatélites, além do sequenciamento do DNA mitocondrial (DNAMt) e de genes de RNA ribossomal (RNAr) (SPENASSATTO, 2011). Dentre esses, a caracterização molecular baseada no DNA mitocondrial tem se convertido em uma técnica amplamente utilizada para o estudo da diferenciação de populações a partir da sua estrutura genética (REINHOLD; LAZZARI; LAHONDÈRE, 2018).

O DNAMt atua como um excelente marcador molecular para estudos de genética de populações de mosquitos (MARTINS; AMORIM; CALDEIRA, 2021). A rara existência de recombinação no DNA mitocondrial (DNAMt) de mosquitos, taxa de mutação relativamente alta e consequente níveis altos de polimorfismos e divergências, o torna uma ferramenta molecular necessária para conhecer a estrutura genética desses vetores e identificar parâmetros populacionais como o fluxo gênico e história evolutiva (AVISE 1994; BIRUNGI;MUNSTERMANN, 2002; HLAING et al., 2009; BEEBE, 2018).

Dentre os genes mitocondriais que são utilizados como ferramentas para estudos evolutivos, eventos de colonização e estrutura genética de populações, estão o Citocromo Oxidase I (COI ou COX1) e o gene Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

subunidade 4 (ND4), respectivamente (TWERDOCHLIB et al., 2012; BEEBE, 2018). O amplo uso desses marcadores está relacionado com a sua presença em todos os organismos eucarióticos possuindo um alto número de cópias o que os torna a ferramenta molecular ideal para compreender a história evolutiva e demográfica de uma população, assim como, a taxonomia molecular de indivíduos (TWERDOCHLIB et al., 2012; BEEBE, 2018).

Diante disso, conhecer a biologia desses vetores a nível individual e populacional torna-se importante para determinar parâmetros de dispersão, comportamento e origem, permitindo compreender relações de isolamento ou conectividade com outras populações existentes assim como sua movimentação em diferentes cenários urbanos o que auxilia na compreensão da transmissão de patógenos e na escolha de melhores estratégias de controle (DONALÍSIO; GLASSER, 2002 ; PADUAN; RIBOLLA, 2008; PLESS et al., 2017).

Diante do que foi exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de populações utilizando dois genes mitocondriais de mosquitos dos gêneros *Aedes* spp. e *Culex* spp., provenientes de pontos estratégicos na Região Metropolitana do Recife (RMR) afim de caracterizar o padrão de diferenciação genética e estrutura populacional dessas espécies e com isso auxiliar na elaboração de medidas de controles mais eficazes e focalizadas contra esses culicídeos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade genética de populações de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*, provenientes de áreas estratégicas, como portos, rodoviárias e Central de Abastecimento e Logística da Região Metropolitana de Recife (RMR).

1.1.2 Objetivos específicos

- Estimar o grau de variabilidade genética e caracterizar a estrutura genética das populações de mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex* coletados nos portos de Recife e Suape, bem como no Terminal Integrado de Passageiros de Recife (TIP) e na Central de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA/PE);

- Identificar e caracterizar os diferentes haplótipos mitocondriais dos genes ND4

e COI em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* dessas localidades;

- Correlacionar o padrão de diversidade genética dos mosquitos, com o padrão encontrado para outros no mundo;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dentre as principais espécies que compõem a família Culicidae estão os mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Estas espécies são encontradas no Brasil e em outras regiões tropicais e subtropicais do globo e possuem grande importância epidemiológica por estarem relacionadas com a transmissão patógenos (CONSOLI; LOURENÇO, 1994).

2.1 BIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus*

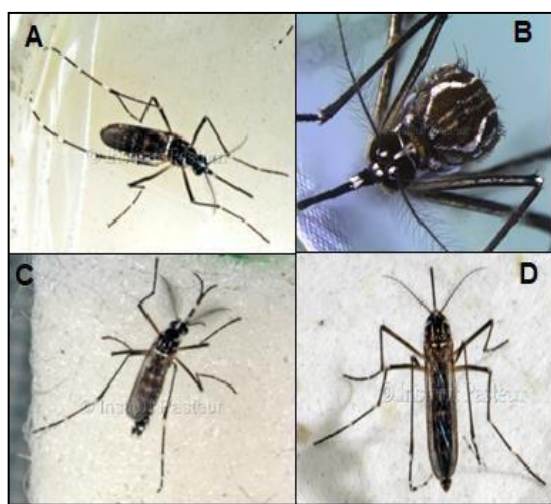
2.1.1 *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

A espécie *Aedes aegypti* é originária do seu ancestral silvestre africano e zoofílico *Aedes aegypti formosus*, que habitava ambientes florestais e geralmente realizava oviposição em criadouros naturais, como buracos encontrados em árvores (TABACHNICK, 1991; BROWN et al., 2011). O princípio da sua domesticação pode ser explicado a partir de uma população de *A. aegypti formosus* que após um período de grande seca ficou isolada no Norte da África (TABACHNICK, 1991). Segundo essa hipótese, essa população teria sofrido uma adaptação necessária para a sua sobrevivência, o que a levou a utilizar recipientes artificiais para a sua oviposição provenientes das populações humanas que se encontravam no local (TABACHNICK, 1991; POWELL; TABACHNICK, 2013).

Sua rota de migração e consequente introdução na África Ocidental ocorreu no final do século VIII, seguidas de novas introduções no Novo Mundo nos séculos XV ao XVII, devido principalmente ao comércio de escravos, (TABACHNICK, 1991) e alcançando em seguida Ásia e Austrália (WALLIS, 1983; TABACHNICK, 1991; POWELL, 1983). A introdução no Brasil tem seus primeiros registros datados no século XVII devido a epidemia de febre amarela que ocorreu na cidade de Recife (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2022). Atualmente, *A. aegypti* é considerado uma espécie cosmopolita, presente em regiões tropicais e subtropicais do globo, dentre elas as Américas, África e Ásia (SOUMAHORO et al., 2010; MEDLOCK et al., 2012).

Adultos da espécie *A. aegypti* se caracterizam morfológicamente pela cor escura e pela presença de faixas brancas nas patas, localizadas, mais precisamente, em alguns segmentos do tarso, e escamas brancas na parte dorsal do tórax que formam um desenho característico em formato de lira (**Figura 1**). As fêmeas são significativamente maiores que os machos e possuem mantas com pêlos mais curtos e escassos, já os machos possuem palpos mais longos e desenvolvidos e antenas plumosas (NELSON; SALUD, 1986; ZETTEL; KAUFMAN, 2009). Mosquitos dessa espécie possuem hábitos diurnos e tanto as fêmeas quanto os machos se alimentam de seivas, flores e frutos com o intuito de obter os açúcares necessários para o seu metabolismo (CONSOLI; LOURENÇO, 1994; MCBRIDE, 2016). As fêmeas são hematófagas, também se alimentam de sangue, o que está diretamente relacionado ao desenvolvimento dos ovos, tendo geralmente como preferência de fonte alimentar o homem (CONSOLI; LOURENÇO, 1994; MCBRIDE, 2016).

Figura 1- Ilustrações de algumas características morfológicas e dimorfismo sexual da fase adulta do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: Institut Pasteur, 2007.

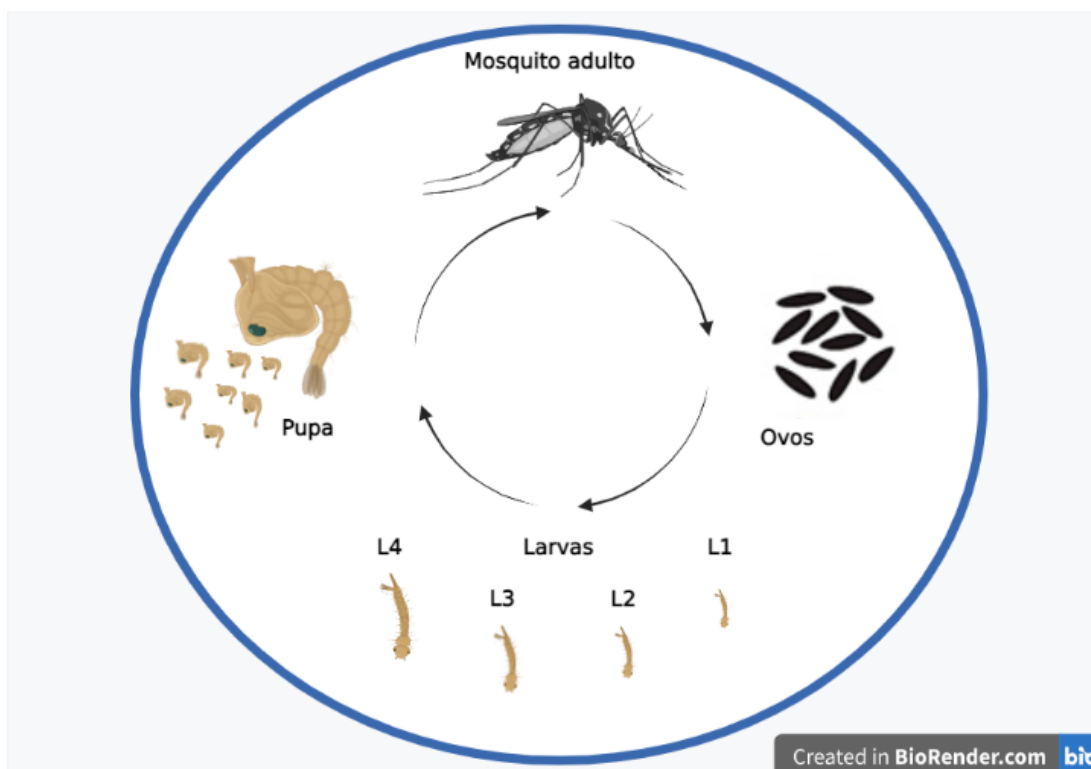
- A.** Características morfológicas do mosquito *Aedes aegypti*. Na imagem é possível observar as faixas brancas presentes em alguns segmentos do tarso do mosquito. **B.** Desenho em formato de lira composto pelas escamas brancas localizadas na parte dorsal do tórax. **C.** Mosquito macho adulto. Na imagem é possível observar as antenas plumosas. **D.** Mosquito fêmea adulta.

Esses mosquitos possuem um ciclo de vida holometábolo, ou seja, possuem um desenvolvimento indireto, onde o processo pós embrionário ocorre em quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e mosquito adulto (FORATTINI 2002). Seu ciclo biológico

tem início quando as fêmeas depositam seus ovos fertilizados em superfícies que ficam acima do nível da água, seja em criadouros artificiais, como latas e pneus, ou naturais (NELSON; SALUD, 1986). O número de ovos produzidos por cada fêmea varia conforme a disponibilidade de sangue ingerido, em média são produzidos 120 ovos (NELSON; SALUD, 1986). Essa oviposição é realizada de forma “saltitante”, onde a fêmea distribui os ovos em diferentes criadouros visando aumentar as chances de sobrevivência da prole, uma vez que, criadouros com condições instáveis podem ser prejudiciais (ABREU et al., 2015; FARNESI et al., 2018). Logo após a oviposição, se o ambiente possuir condições de umidade e temperatura adequadas, os ovos se desenvolvem em um período de 48h, podendo chegar a 5 dias em temperaturas mais baixas (NELSON; SALUD, 1986). Em condições ambientais desfavoráveis os ovos desta espécie entram em estado de quiescência, que consiste em um mecanismo de resistência que permite que o ovo permaneça viável até que as condições ambientais se tornem mais favoráveis (KOŠTÁL, 2006; DENLINGER; ARMBRUSTER, 2014). Essa viabilidade pode variar de 100 dias até um ano (SILVA; SILVA, 1999; OLIVA et al., 2018).

Após a eclosão, as larvas se desenvolvem em ambiente aquático passando por 4 estágios(**Figura 2**): L₁, L₂, L₃, L₄, onde, em condições adequadas, com temperatura favorável, disponibilidade de alimento e baixa densidade de larvas no criadouro, esse período possui uma duração de 7 a 14 dias (NELSON; SALUD, 1986). A larva L₄ torna-se pupa, que não requer alimentação, este estágio também ocorre no ambiente aquático com duração de dois a três dias (NELSON; SALUD, 1986). Após esta última fase o mosquito adulto emerge com um tempo médio de vida de 30 dias (GADELHA E TODA, 1985).

Figura 2 - Ilustração do ciclo de vida de ciclo de vida de *Aedes aegypti* com os seus diferentes estágios de desenvolvimento.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

2.1.2 *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823)

Presente em áreas tropicais e subtropicais, a espécie *Culex quinquefasciatus* é encontrada em grande parte na Afro-Eurásia e em partes mais quentes das Américas (FARAJOLLAHI et al., 2011). Estudos baseados na diversidade de microssatélites relatam queo mesmo possui uma possível origem asiática (FONSECA et al., 2006; HARVEY-SAMUEL et al., 2021), a hipótese é que esta espécie se disseminou para outras localidades por transporte passivo através de veículos humanos, principalmente navios que levavam mercadorias e escravos durante o século XVII. (BARR, 1957). Essas embarcações possibilitaram o desenvolvimento de larvas devido à abundância de fonte alimentar, que era composta tanto por animais quanto por humanos (FARAJOLLAHI et al., 2011).

Caracterizado por possuir cor escurecida, variando do marrom claro a escuro, a espécie *Cx. quinquefasciatus* faz parte do complexo de espécies *Culex pipiens*, e foi descrita pela primeira vez por Thomas Say em 1823 (CONSOLI; LOURENÇO, 1994). Indivíduos dessa espécie possuem hábitos noturnos, e pela manhã se abrigam em

moradias humanas. Sua preferência alimentar pode variar conforme a localização e disponibilidade de hospedeiros presentes no ambiente, como mamíferos, aves e anfíbios, porém, mesmo as fêmeas realizando o repasto sanguíneo em outras espécies, elas são predominantemente antropofílicas (DAVIS; SHANNON, 1929; FARAJOLLAHI et al., 2011; FERNANDES, 2017; HARVEY-SAMUEL et al., 2021). Geralmente se desenvolve bem em criadouros artificiais e naturais, próximos a habitações humanas (peridomicílio) ou dentro delas (intradomicílio), ricos em matéria orgânica, podendo conter água contaminada com dejetos humanos ou de animais (DAVIS; SHANNON, 1929; LAPOINTE 2008).

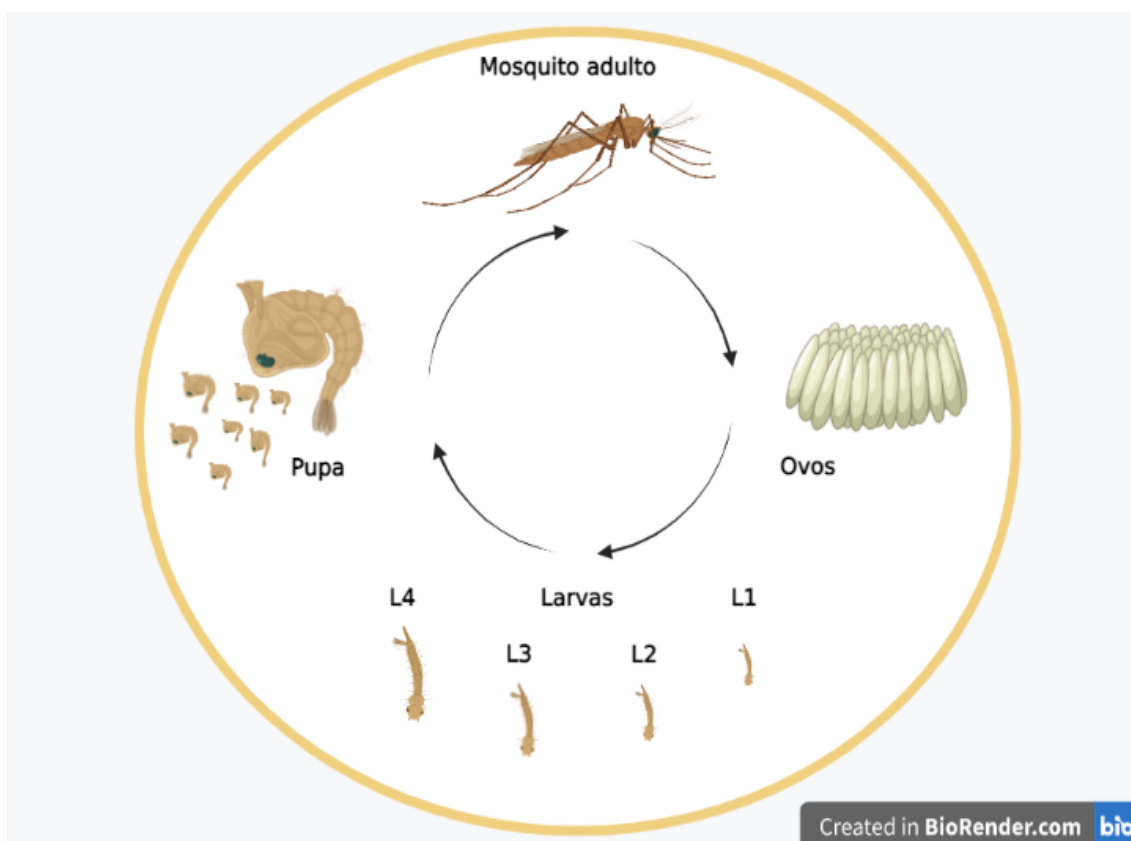
Figura 3 - Fotografia mostrando algumas características morfológicas da espécie *Culex quinquefasciatus*, tais como suas tonalidades que variam do marrom claro ao mais escuro.



Fonte: ICPMR Westmead, 2013.

Assim como *A. aegypti*, o ciclo desta espécie também é holometábolo, com as fases de ovo, larva, pupa e mosquito adulto, porém a deposição de seus ovos ocorre em locais com baixa luminosidade e de forma conjunta, formando um tipo de “barca” na superfície líquida (CONSOLI; LOURENÇO, 1994). Suas formas imaturas podem se desenvolver em ambientes que possuem grande quantidade de matéria orgânica, como esgotos e efluentes industriais, visto que estas larvas possuem adaptações na forma como se alimentam nesses ambientes possuindo um sistema coletor-filtrador que permite a filtração e seleção dessas substâncias (MERRITT; DADD; WALKER, 1992; WILKE, 2008).

Figura 4 - Ilustração do ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* com seus diferentes estágios de desenvolvimento.



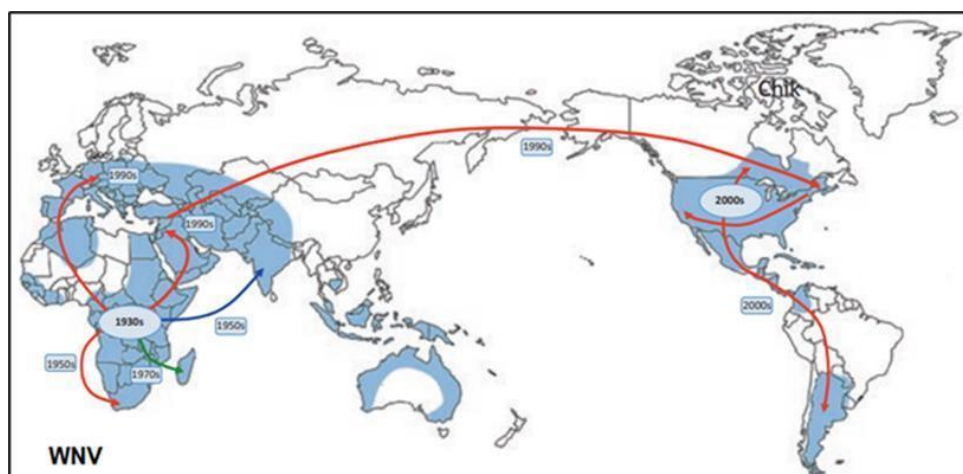
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

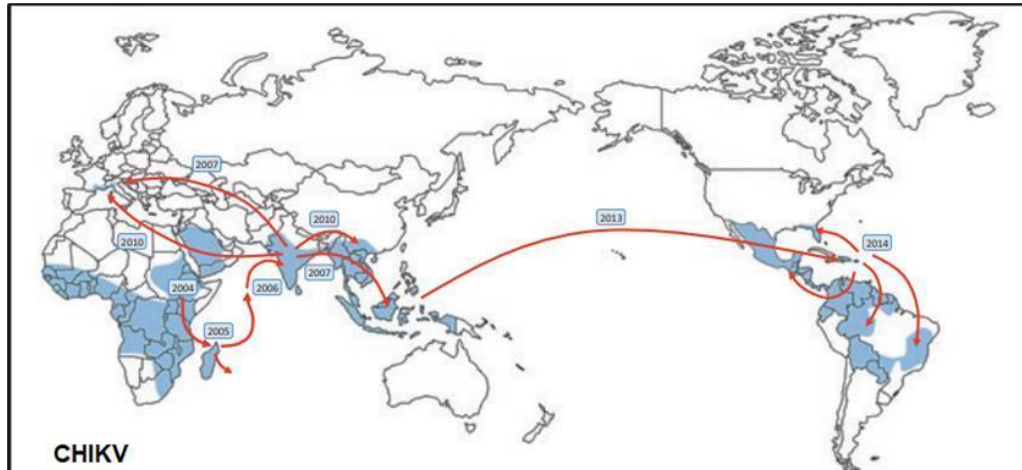
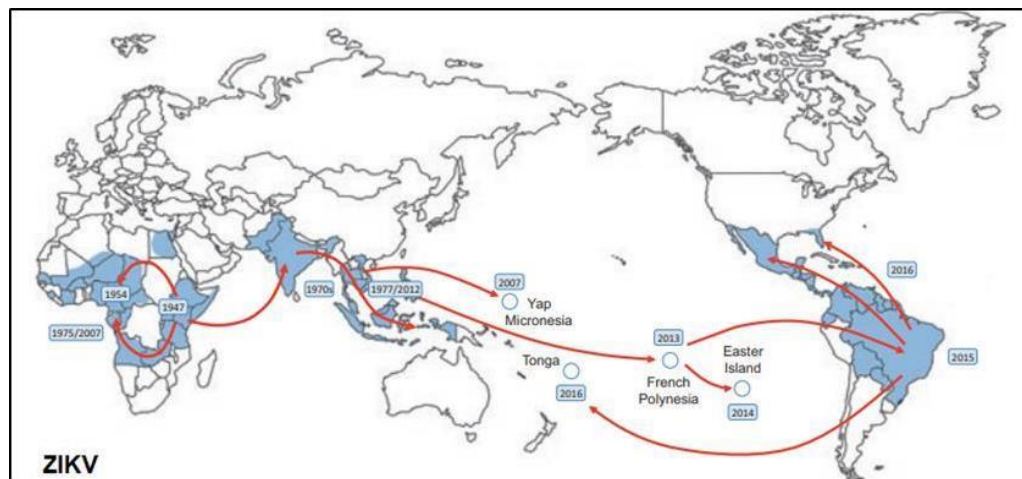
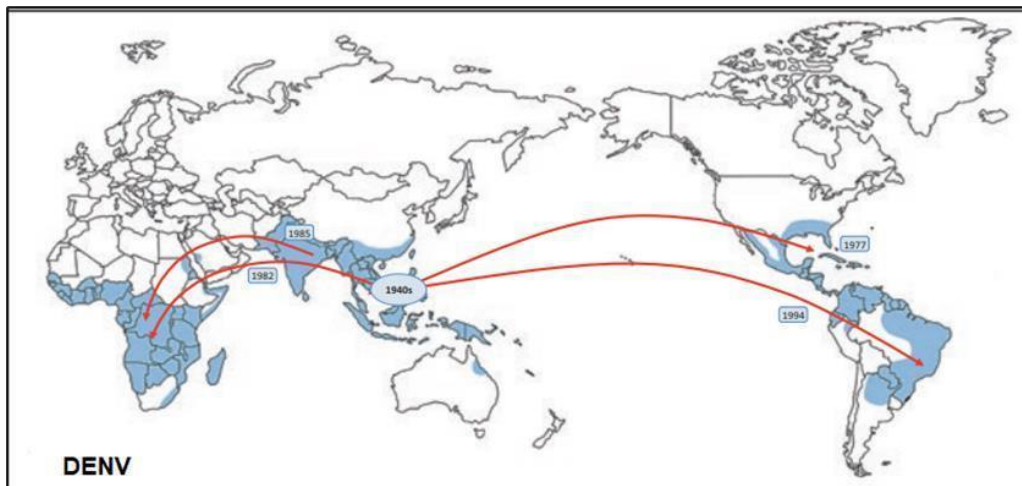
2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus*

O comportamento hematófago associado às distribuições cosmopolitas das espécies *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, estão diretamente ligados à capacidade de transmissão de diversos patógenos (FORATTINI, 2002). Dentre eles estão os arbovírus do gênero *Flavivirus*, que tem como integrantes o DENV, com os seus quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), o ZIKV e o WNV, e os do gênero *Alphavirus* sendo representado principalmente pelo CHIKV (GUBLER, 2002). O DENV, ZIKV e CHIKV possuem como vetor principal a espécie *A. aegypti*, enquanto WNV é disseminado pelo *Cx. quinquefasciatus* (GUBLER, 2002). Além desses arbovírus, a espécie *A. aegypti* se mostra um potencial vetor para o vírus Mayaro (MAYV) enquanto *Cx. quinquefasciatus* possui a mesma característica para o ZIKV (GUBLER, 2002; HOLMES; TWIDDY, 2003; FRANCA et al., 2016; GUO et al., 2016; WILDERSMITH et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO, 2017; PEREIRA et al., 2020).

Ao longo das últimas duas décadas, esses vírus sofreram uma grande expansão a nível global. Como exemplo, temos a expansão do DENV no início da década de 1940 durante a Segunda Guerra Mundial, onde, após a erradicação dos vetores na primeira metade do século XX, o vírus foi reintroduzido nas Américas através do seu principal vetor, *A. aegypti*, chegando posteriormente a América do Sul (YOUNG, 2018). Além disso, temos a expansão do WNV, do Oriente Médio para as Américas, o espalhamento do CHIKV para as ilhas no sudoeste do Oceano Índico e de lá para Ásia e para as Américas, e a disseminação do vírus Zika, que se propagou da África para o continente Asiático, chegando depois ao Brasil e provocando uma grande epidemia em 2015–2016 (LANCIOTTI et al., 2002; DEEBA et al., 2015; YOUNG, 2018).

Figura 5 – As quatro rotas de disseminação correspondentes aos DENV, WNV, CHIKV, ZIKV. As regiões geográficas sombreadas em azul indicam a circulação viral ao longo dos anos com as datas indicando os principais eventos de translocação epidêmica desses vírus.





Fonte: YOUNG, 2018

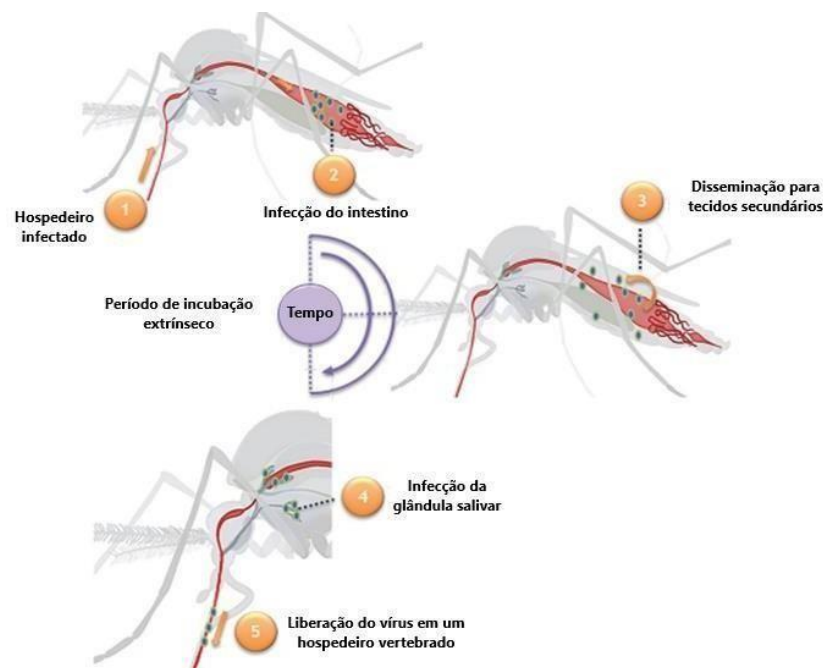
Atualmente, esses vírus acompanham a rota de migração dos seus vetores que têm uma ampla distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes, em regiões temperadas e tropicais, com prevalência nestas últimas por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis (CASSEB et al., 2013). No Brasil, está amplamente distribuído em todas as regiões, com destaque para a região Centro – Oeste, que possui

as maiores taxas de DENV com 1.867,3 casos/100 mil habitantes, e Nordeste com 243,7 casos/100 mil habitantes para o vírus CHIKV (BRASIL, 2022). Além disso, o ZIKV foi responsável, entre os anos de 2015 a 2022, por 20.874 casos da síndrome congênita associada ao vírus Zika (SCZ), com a região Nordeste com a maior concentração de casos no período entre 2015 a 2017 (DE OLIVEIRA et al., 2017; BRASIL, 2022).

Em regiões tropicais, as arboviroses geralmente ocorrem durante a estação chuvosa devido ao aumento da densidade populacional desses vetores, que são diretamente afetados pela quantidade de chuvas e inundações em uma determinada região. Esse fator determina a permanência dos corpos d'água, que fornecem os criadouros, naturais e artificiais, para o desenvolvimento desses culicídeos (YOUNG, 2018).

Com essa forte associação do vetor ao ambiente, esses arbovírus causadores de zoonoses, que acometem principalmente vertebrados, podem causar infecções e doenças em humanos (WEAVER; REISEN, 2010). A exposição de mosquitos a esses arbovírus, ocorre quando há a ingestão do sangue de um hospedeiro que esteja infectado (SHIELDS, 2017). Quando isso acontece, o vírus utiliza as células do mosquito como maquinaria para a sua replicação (SHIELDS, 2017). Após o período de incubação extrínseca, que consiste desde o momento do repasto sanguíneo contaminado até a presença de conteúdo viral na secreção salivar, o mosquito se torna viável para transmitir o vírus para outro hospedeiro (**Figura 6**) (SHIELDS, 2017). Este ciclo de transmissão pode ser diretamente afetado pelas mudanças climáticas, pois em altas temperaturas há o aumento das taxas de replicação viral em hospedeiros ectotérmicos, o que causa períodos de incubação extrínsecos mais curtos e maior transmissibilidade, gerando um aumento no número de casos e disseminação geográfica desses vírus (YOUNG, 2018; CIOTA; KEYEL, 2019).

Figura 6 - Ilustração da cinética de replicação de um arbovírus no interior do mosquito vetor.



Fonte: CHOUIN-CARNEIRO; SANTOS, 2017.

A imagem demonstra o ciclo do vírus no mosquito vetor. (1) A fêmea é infectada ao ingerir sangue do hospedeiro contaminado; (2) o sangue ingerido segue para o intestino do inseto onde as partículas virais infectam as células epiteliais do intestino médio, onde ocorre a replicação viral; (3) disseminação do vírus para os tecidos secundários; (4) Ocorre a infecção das glândulas salivares do mosquito; e (5) liberação do vírus para as glândulas salivares, que consequentemente torna o mosquito capaz para transmitir o vírus para um novo hospedeiro.

Portanto, a única forma de conter a propagação desses vetores e consequentemente as arboviroses transmitidas por eles, é através do controle vetorial, já que as doenças resultantes da infecção desses arbovírus não possuem tratamento específico nem vacinas disponíveis comercialmente. (DEEBA et al., 2015; BARRETT, 2016; LIMA-CAMARA, 2016).

2.3 BREVE HISTÓRICO E DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS TRADICIONAIS DE CONTROLE DE CULICÍDEOS

Os esforços para combate desses vetores no Brasil têm início nas décadas de 1930 e 1940, quando foram realizadas intensas campanhas de erradicação de *A. aegypti* nas Américas pela Fundação Rockefeller (BRAGA; VALLE, 2007). Posteriormente, programas contra o vetor foram responsáveis por erradicar essa espécie em alguns pontos

do continente Americano, com exceção de alguns países como os Estados Unidos da América, Suriname, Venezuela, Cuba, Jamaica, Haiti, República Dominicana e uma pequena parte da Colômbia (SOPER, 1965). O Brasil foi um dos países que obteve sucesso na erradicação do mosquito *A. aegypti* e teve êxito na primeira eliminação desse vetor em 1955 (BRAGA; VALLE, 2007). Porém no ano de 1967, foi confirmada a reintrodução do mosquito *A. aegypti* no país, que foi novamente eliminado e considerado erradicado do território brasileiro em 1976 (BRAGA; VALLE, 2007). Entretanto, o mosquito retornou ao Brasil, devido a falhas na vigilância epidemiológica e em decorrência da urbanização acelerada que acontecia nessa época (BRAGA; VALLE, 2007).

Em 1996, o Ministério da Saúde elaborou o Plano de Erradicação do mosquito *Aedes aegypti* (PEAa), e que previa um modelo descentralizado com a participação das três esferas de governo, e tinha como objetivo principal a redução dos casos de dengue hemorrágica, no entanto o programa não obteve sucesso. (ZARA et al., 2016).

Posteriormente, com a elaboração do Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD), as secretarias municipais de saúde passaram a gerir e a executar as ações do PNCD, que envolviam dez componentes principais: vigilância epidemiológica, combate ao vetor, assistência aos pacientes, integração com atenção básica, ações de saneamento ambiental, ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social, capacitação de recursos humanos, legislação, sustentação político-social e acompanhamento e avaliação do PNCD (MINISTÉRIO SAÚDE, 2009). Assim, o Programa deixou de ser exclusivamente direcionado ao combate do mosquito *Aedes aegypti* e se adequou as especificidades locais. (SAÚDE, 2009).

Com isso, foi estabelecido que os Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e Agentes de Combate a Endemias (ACE), em parceria com a população, são responsáveis por promover o controle do vetor, que de maneira geral é direcionado principalmente aos criadouros e a redução populacional, realizados por meio de métodos mecânicos, químicos, biológicos, genéticos ou por meio da junção de várias técnicas distintas (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; LIMA; GOULART; ROLIM NETO, 2015; ZARA. et al., 2016; ROIZ et al., 2018; ACHEE et al., 2019).

O controle mecânico consiste na eliminação de criadouros a fim de reduzir o contato do mosquito com o homem, como por exemplo a destruição de criadouros, drenagem de reservatórios e instalação de telas em portas e janelas (SAÚDE, 2009). O

controle químico é caracterizado pelo uso de larvicidas e inseticidas das classes dos organoclorados, organofosforados e carbamatos, para matar as larvas e mosquitos adultos, respectivamente (BRAGA, VALLE, 2004). O uso desses larvicidas e inseticidas pode ser feito por meio da aplicação de um produto larvicida, de composição química ou biológica, nos depósitos positivos e pela aplicação de inseticidas através de equipamentos portáteis ou acoplado a veículos (ZARA. et al., 2016). No entanto, o uso excedente destes inseticidas químicos, podem deixar uma carga residual tóxica no ambiente, que pode gerar problemas ambientais como também causar uma seleção de vetores resistentes (BRAGA, VALLE., 2004).

Dentre os métodos biológicos utilizados há o uso de predadores ou patógenos que reduzem a densidade populacional vetorial (ZARA. et al., 2016). Como por exemplo temos o uso de peixes em recipientes com água estagnada que se alimentam das larvas dos mosquitos, no entanto, a utilização desse método fica restrito a áreas grandes e externas, não podendo ser utilizado por exemplo em centros urbanos, onde ocorre a maior incidência de DENV, ZIKV e CHIKV (MARTINEZ-IBARRA et al., 2002; FARENHORST et al., 2009). Há também a utilização de microrganismos como *Bacillus thuringiensis israelenses*, que atuam como larvicidas biológicos, e de fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana*, que podem infectar ovos e juvenis, inviabilizando o seu desenvolvimento. (FARENHORST et al., 2009).

2.3.1 Inovações no controle vetorial

Dentre as inovações no controle vetorial, há o uso da engenharia genética, que tem sido amplamente utilizada a fim de limitar as populações de mosquitos (LWANDE et al., 2019). Essa estratégia consiste em reduzir ou mesmo eliminar espécies de mosquitos por meio do desenvolvimento de genes letais ou capazes de tornar os insetos estéreis (ZARA. et al., 2016). Como exemplo pode-se citar a aplicação de genes autolimitantes como como OX513A, que atuam interrompendo o desenvolvimento da prole desses mosquitos (HARRIS et al., 2012). No Brasil, a liberação de mosquitos geneticamente modificados em Juazeiro e em Jacobina, na Bahia, e em Piracicaba, São Paulo, teve sucesso obtendo uma taxa de redução populacional de 80% a 95% (LWANDE et al., 2019).

Além dessas técnicas, há a produção de machos estéreis através da exposição à radiação, a qual consiste em tratar os insetos machos com uma dose mínima de raios

gama ou raios X a fim de provocar a sua esterilização (SANTOS et al., 2018). Essa técnica já é utilizado no Brasil, principalmente em áreas endêmicas (SANTOS et al., 2018).

Outra alternativa de controle vetorial é a utilização de *Wolbachia*, uma espécie de bactéria simbiote intracelular encontrada naturalmente em mais de 60% dos insetos, que atua gerando uma incompatibilidade citoplasmática (IC) que interfere diretamente na prole e na transmissão de arbovírus (ZARA. et al., 2016; PEÑA et al. 2022). A estratégia consiste em infectar mosquitos machos da espécie *A. aegypti* com cepas específicas da *Wolbachia* (ZARA. et al., 2016). Esses mosquitos contendo a bactéria são liberados no ambiente e se acasalam com mosquitos fêmeas sem *Wolbachia*, onde, devido ao fenômeno de IC, os ovos dessas fêmeas não eclodirão (ZARA. et al., 2016). Ao longo das liberações ocorre, portanto, uma redução da população local dessa espécie (ZARA. et al., 2016).

Porém, mesmo com todos os métodos e esforços realizados pelos programas de controle, as epidemias se repetem ano após ano em vários centros urbanos, permitindo a expansão desses vetores (DIAS, 2006). Com isso, estudos que visam conhecer mais da estrutura genética e da dispersão desses vetores podem fornecer e indicar as melhores estratégias para o bloqueio de focos de mosquitos infectados em momentos inter-epidêmicos e epidêmicos (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

2.4 MARCADORES GENÉTICOS

Dentre os métodos que permitem o melhor conhecimento da biologia de insetos está a utilização de marcadores moleculares, que possibilitam entender mais características genéticas, como a diversidade e evolução (BEHURA, 2006). A utilização dessas ferramentas teve seu início com o uso de marcadores de proteínas, onde, através de alozimas variantes produzidas pelos indivíduos, foi possível determinar a heterogeneidade de um locus em uma população (AVISE, 2004). Além disso, essa mesma técnica também permite avaliar a variação genética, dentro e entre as populações, a resistência a inseticidas, mapeamento cromossômico, dentre outras possibilidades (AVISE, 2004).

Posteriormente, houve o desenvolvimento de marcadores baseados em DNA, que alcançam um maior nível de polimorfismo, devido às mutações que ocorrem nos íntrons e nos códons do genoma (BEHURA, 2006). Dentre os marcadores moleculares que são mais comumente utilizados em pesquisas para avaliar o genoma, tanto nuclear

quanto mitocondrial, pode-se citar as sequências simples repetidas (SSR) ou microssatélites, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), e o DNA mitocondrial (BEHURA, 2006). Devido a maior taxa evolutiva, esses marcadores são os preferidos em estudos que visam conhecer a estrutura genética de uma população (BEHURA, 2006).

Os microssatélites são considerados os marcadores moleculares que possuem mais regiões polimórficas com altas taxas de mutações (AVISE, 2004). São caracterizados como sequências curtas de 1 a 6 pares de bases, repetidas em tandem, que ficam espalhadas aleatoriamente por todo o genoma (AVISE, 2004). Esses marcadores passaram a ser utilizados em culicídeos a partir da década de 90 e desde então o número de trabalhos publicados só tem aumentado, principalmente para estudar populações de mosquitos vetores de patógenos causadores de doenças como do gênero *Culex* e *Aedes* (BEHURA, 2006; WILKE et al., 2014; VIDAL, 2015; CUNHA, 2016; HIRAGI 2022).

Outras classes de marcadores como os RAPD e os AFLP, são largamente utilizados em estudos populacionais, pois permitem a inferência de relações de parentesco entre indivíduos de uma dada população assim como a história de divergência entre populações de uma mesma espécie (SUNNUCKS, 2000). Foi observado em um estudo realizado por Ayres et al., (2004) a diferenciação em populações de *A. aegypti* de diferentes cidades e estados do Brasil, sugerindo um baixo fluxo gênico em escalas micro e macro geográficas.

Outro marcador molecular bastante utilizado para o estudo da estrutura genética em insetos é o DNAm. Sua facilidade de amplificação através de primers universais, projetados a partir de genes mitocondriais altamente conservados, permite construir a história evolutiva de espécies de insetos com base na sua evolução fenotípica (BEHURA, 2006; AZAMBUJA, et al., 2013).

Juntamente com os projetos de sequenciamento do genoma nuclear, as sequências do DNAm são consideradas importantes recursos adicionais que permitem inferir relações filogenéticas assim como a genética de populações e a evolução molecular em geral. (BEHURA, 2006).

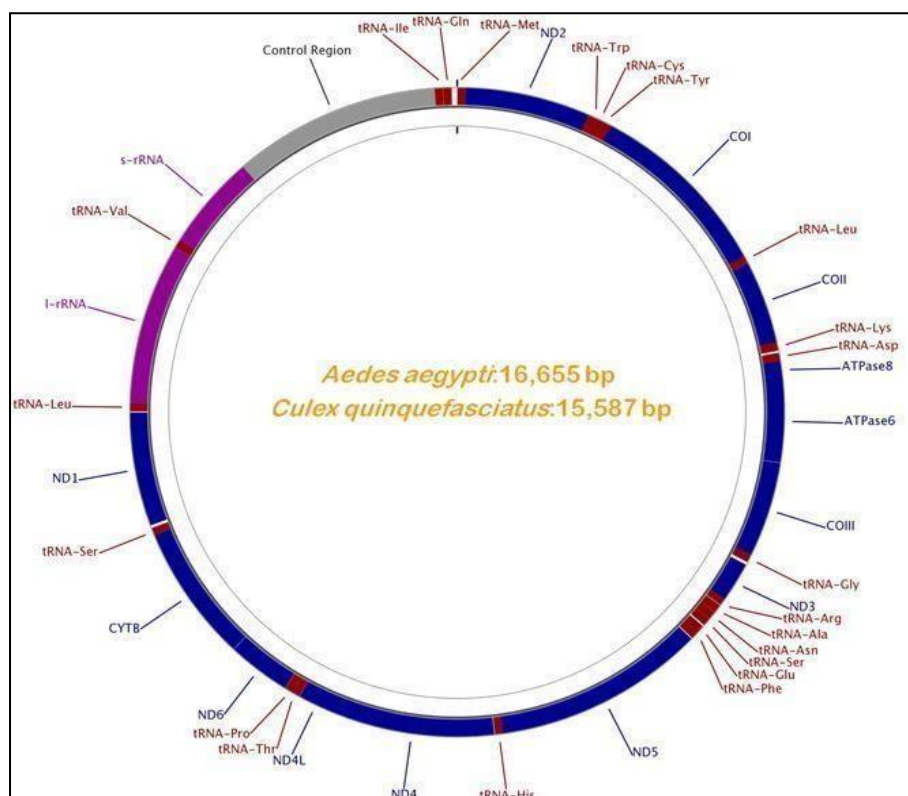
2.4.1 DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas encontradas em todos os organismos eucarióticos e possuem inúmeras cópias idênticas presentes em cada célula que geram

adenosina trifosfato (ATP) (BALLARD; WHITLOCK, 2004). O seu DNA, que é herdado matematicamente, possui uma estrutura simples em formato circular e é constituído por 37 genes, sendo 13 deles codificadores de proteínas mitocondriais (COI, COII, COIII, ATP6, ATP8 e Citocromo *b*, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), dois genes de subunidades ribossomais (12S e 16S) e 22 genes de RNA transportador (RNAt) (SIMON et al., 1994; PEREIRA et al., 2017). Além disso, o DNA mitocondrial (DNAm) também possui uma região controle não-codificante, que é responsável pela replicação e a transcrição do genoma da mitocôndria (**Figura 7**) (GUEDES, 2006).

O DNA mitocondrial (DNAm) de culicídeos como *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* possuem um tamanho de 16.655 pb e 15.587 pb, respectivamente. Essa variação é devido à diferença no comprimento da região controle desses culicídeos (BEHURA et al., 2011).

Figura 7 – DNA mitocondrial de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Os genes que integram essa estrutura em formato circular estão marcados e codificados por cores; genes codificadores de proteínas em azul, genes RNAt em vermelho, genes RNAr em roxo e região de controle (CR): cinza.



Fonte: BEHURA et al., 2011.

Além das características citadas, o DNAm_t pode gerar cópias de sequências, que através dos mecanismos de junção de extremidades não homólogas, são integradas no genoma nuclear (BLANCHARD; SCHMIDT, 1996; BEHURA et al., 2011) Essas cópias são chamadas comumente como sequências mitocondriais nucleares (NUMT's) (BLANCHARD; SCHMIDT, 1996; BEHURA et al., 2011). Essa integração foi descoberta em muitos eucariotos, sendo relatada pela primeira vez em camundongos (DU BUY; RILEY, 1967; BEHURA et al., 2011). Atualmente, a presença de NUMT's já foi demonstrada em insetos como os besouros tigre, gafanhotos e abelhas (BENSASSON et al., 2000; PONS e VOGLER, 2005; PAMILO et al., 2007, BEHURA, 2006).

Em culicídeos como *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* as NUMTs ocupam, respectivamente, aproximadamente 0,008% e 0,001% do genoma (BEHURA et al., 2011). Já foram encontrados vários NUMTs localizados nos íntrons de genes codificadores de proteínas em ambas as espécies, com 32 genes em *A. aegypti* e quatro em *Cx. quinquefasciatus* (BEHURA et al., 2011).

Além dessas características, o DNA mitocondrial (mtDNA) não realiza recombinação, se replica independentemente do genoma nuclear, possui maior resistência à degradação e tem uma taxa de mutação muito maior em relação ao DNA nuclear, o que permite que essa estrutura seja utilizada como um marcador de DNA para avaliar a taxa de evolução em populações (BROWN; GEORGE; WILSON, 1979; PANETO, 2006; AZAMBUJA DE OLIVEIRA, et al., 2013).

Dos genes que compõe a estrutura do DNAm_t os genes codificadores de proteínas da subunidade do citocromo c oxidase I (COI) e da subunidade 4 da NADH desidrogenase (ND4) são os mais utilizados para estudos genéticos, com a subunidade COI sendo mais utilizada para identificação de espécies de mosquitos (HELMERSSON, 2013; LWANDE et al., 2019). Isso é devido a esses genes sofrerem uma evolução mais rápida, o que permite caracterizar as relações entre populações (HELMERSSON, 2013; LWANDE et al., 2019).

Estudos genéticos realizados com a espécie *A. aegypti* e o gene COI em municípios brasileiros, detectaram populações com múltiplas introduções e um alto fluxo gênico, além disso, através da análise filogenética foi possível distinguir as suas diferentes origens geográficas, o que reforça que o transporte entre regiões endêmicas, desempenha um papel crucial na dispersão desses vetores e na disseminação de

arbovírus (SCARPASSA;CARDOZA; CARDOSO, 2008; VIDAL, 2015).

Já a subunidade ND4, se comparada ao gene COI, possui maiores taxas de substituição e variação de nucleotídeos (SIMON et al., 1994). Isso pode ser observado através de estudos genéticos onde foram obtidos altos níveis de diversidade (SCARPASSA; CARDOZA; CARDOSO, 2008; VIDAL, 2015; CUNHA, 2016).

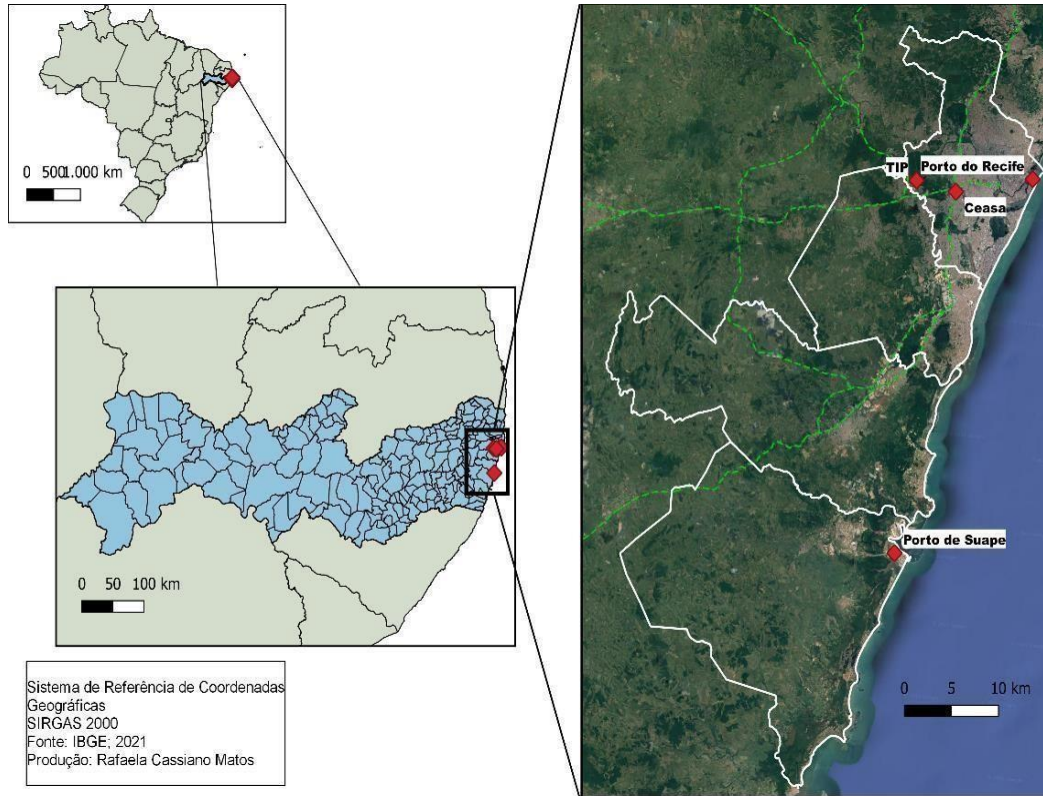
Desta forma, o estudo da genética de populações utilizando genes mitocondriais como marcadores moleculares revela as diferentes linhagens genéticas de mosquitos, auxiliando na compreensão de suas origens, rotas de entrada e estabelecimento. Este conhecimento pode ser utilizado para elaborar estratégias de prevenção e controle mais eficazes para as populações-alvo deste trabalho a fim de diminuir sua distribuição e consequente transmissão de arboviroses.

3. METODOLOGIA

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo abrangeu os municípios de Recife e Ipojuca, localizados no estado de Pernambuco, que possui clima tropical, com temperatura máxima média de 30° C e mínima de 20,6° C (APAC, 2021). A escolha dos pontos dentro desses municípios foi realizada levando em consideração potenciais pontos de entrada de culicídeos no estado de Pernambuco. Dentre os pontos escolhidos estão o Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA- PE), Porto de Recife, Terminal Integrado de Passageiros (TIP), localizados no município de Recife, capital de Pernambuco, e o Porto de Suape, que fica localizado entre os municípios de Ipojuca e Cabo de Santo Agostinho, a 50,9 km da capital.

Figura 8 - Mapa de localização contendo os pontos referentes às coletas de mosquitos da espécie *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* realizadas entre agosto de 2018 e fevereiro de 2019, no estado de Pernambuco.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

3.1.1 Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA- PE)

O Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA- PE) localizado no bairro do Curado, em Recife, é caracterizado como uma Organização Social (OS), de direito privado, que possui uma área total de 580.000 m² e que se destina a comercialização de produtos da hortifruticultura a nível de atacado na região de Pernambuco (CEASA/PE, 2020). Além disso, sua estrutura conta com 48 galpões de comercialização, com uma circulação semanal de 13.000 veículos, que são provenientes de todo o estado, e 65.000 pessoas por dia (CEASA/PE,2020).

Figura 9 - Foto aérea mostrando o Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA/PE).



Fonte: CEASA/PE, 2020

3.1.2 Porto do Recife

O Porto de Recife possui uma área de 114.000 m², que engloba armazéns, pátios de contêineres e pátios para cargas diversas, sua localização permite acessos estratégicos aos principais pontos da Região Metropolitana, possuindo as menores distâncias dos principais centros de distribuição de mercadorias que ficam localizados do interior ao litoral do Estado (PORTO DO RECIFE S.A, 2022). O Porto atende vários estados do Nordeste como a Paraíba, Rio Grande do Norte, Alagoas, dentre outros, além de estar na rota de navegação do Mercosul e das principais rotas internacionais (PORTO DO RECIFE S.A, 2022). Além disso, atua na prestação de serviços para atendimento de navios para importação e exportação de cargas nacionais e estrangeiras (PORTO DO RECIFE S.A, 2022).

Figura 10 - Foto aérea do Porto do Recife.



Fonte: Agência Pixel Press/Divulgação, 2022.

3.1.3 Terminal Integrado de Passageiros

O Terminal Integrado de Passageiros localizado na Zona oeste do Recife, no bairro da Várzea, a 16 km do centro da cidade, conta com uma área de 50 mil m² e atua diariamente com mais de 100 mil linhas de ônibus que operam em rotas intermunicipais e interestaduais com um fluxo médio diário de 6 mil pessoas, realizando embarque e desembarques (TERMINAIS, 2022).

Figura 11 - Foto aérea do Terminal Integrado de Passageiros do Recife (TIP).



Fonte: Google imagens, 2020.

3.1.4 Porto de Suape

Com uma área total de 13,5 hectares, o Porto de Suape está dividido em zonas portuária, industrial, administrativa, de preservação ecológica, de preservação cultural e zona agrícola florestal (PERNAMBUCO, 2010). Dentre os produtos que são exportados pelo porto estão automóveis, açúcar (PERNAMBUCO, 2010).

A região apresenta um clima tropical úmido com temperatura elevada, com média anual em torno dos 25 °C. A média anual de precipitação é superior a 2000 milímetros, concentrados entre os meses de abril e julho (PERNAMBUCO, 2010).

O acesso ao porto externo é através do mar, também há vias de acesso por transporte terrestre pelas rodovias federais BR-101 e BR-232, pelas rodovias estaduais PE-060 e a PE-028, e pela ferrovia EF-101 (PERNAMBUCO, 2010).

Figura 12 - Foto aérea do Porto de Suape, localizado entre os municípios de Ipojuca e Cabo de Santo Agostinho.

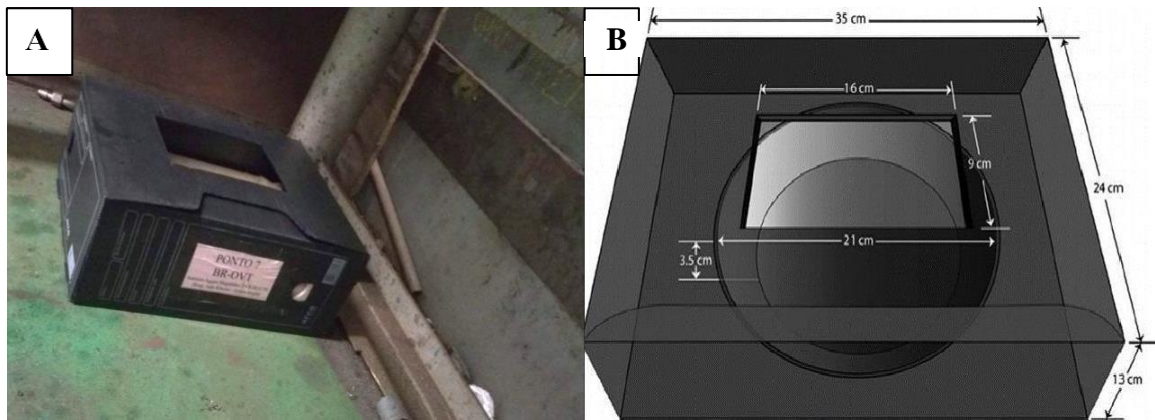


Fonte: PORTUÁRIO DE SUAPE, 2020

3.2 COLETA E AMOSTRAGEM

As coletas foram realizadas entre agosto de 2018 e fevereiro de 2019. Os ovos e larvas dos mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* foram coletados nas áreas citadas anteriormente. Foram utilizadas para as coletas nas localidades do Porto do Recife, TIP e Porto de Suape armadilhas de oviposição do tipo Double BR-OVT (XAVIER et al., 2020), que consistem em armadilhas compostas por uma caixa de plástico preta (13 x 35 x 24 cm) com uma abertura central (16 x 9 cm) na superfície superior, que possibilita o acesso das fêmeas dos mosquitos para que ocorra o processo de oviposição. Na parte inferior foi colocada uma bandeja envolta por uma tira de algodão cru com a infusão da gramínea *Eleusine indica* (Poaceae) não diluída como atraente de oviposição, seguindo a metodologia utilizada por Barbosa (2001). A infusão foi preparada em botijões com capacidade de 10 litros, onde foi adicionada 150 g de grama fresca em 10 litros de água de torneira, que posteriormente permaneceu em repouso por sete dias à temperatura ambiente.

Figura 13 - Foto ilustrativa das armadilhas de oviposição Double BR - OVT, usada nas coletas dos indivíduos imaturos dos gêneros *Aedes* e *Culex*.



Fonte: Elaborado pela autora; BARBOSA (2010)

A. Armadilha instalada em uns dos pontos na localidade do Porto de Suape. **B.** Descrição das dimensões e características da armadilha Double BR – OVT.

Na CEASA-PE, foram utilizadas armadilhas de oviposição do tipo Ovitampa Sentinela (Ovt-S), desenvolvida por Fay e Eliason (1966), devido a vigilância já estabelecida no local.

Figura 14 - Imagem de uma Ovitampa- Sentinela utilizada nas coletas realizadas na CEASA-PE.



Fonte: INÁCIO DA SILVA, 2018.

O processo de coleta em cada localidade foi realizado durante um período de 15 dias. Após sete dias da instalação das armadilhas, foi feita uma manutenção nos dispositivos, que consistia na coleta do material existente e a troca do atrente de oviposição. Após mais sete dias, as armadilhas foram retiradas de campo e o material obtido foi levado para o insetário do Departamento de Entomologia do IAM, onde foram mantidos até a fase adulta sob uma temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a uma umidade relativa do ar de 60 a 80% e um fotoperíodo 12:12h claro/escuro. As larvas foram mantidas em água potável e alimentadas com ração para gatos (Whiskas®) até a fase de pupa.

Os indivíduos adultos foram identificados por meio de características morfológicas externas, através da utilização das chaves dicotômicas para identificação de Forattini (1996) e Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994), e posteriormente foram separados por localidade, sexo e espécie, e acondicionados em microtubos de 1,5 ml a -20°C .

3.2.1 Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR)

As fêmeas adultas de cada espécie foram submetidas à extração de DNA de forma individual, utilizando o método de suspensão em álcool seguindo o protocolo de extração feito com DNAzol™ (PAIVA et al., 2019). Este protocolo tem seu início na maceração, de forma individual, em 100 μl de DNAzol™, seguido de uma homogeneização por um minuto e uma centrifugação a 12000 rpm por um período de 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante obtido foi removido e colocado em um novo tubo de eppendorf contendo 50 μl de etanol puro e gelado, onde foi homogeneizado no vórtex por 30 segundos e depois centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μl de etanol a 75%, seguido novamente de uma homogeneização e posterior centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto. Depois desse procedimento, o sobrenadante foi descartado novamente e os tubos foram postos no concentrador para a secagem por um período de 30 minutos. Ao término do procedimento, o pellet de DNA obtido foi eluído em 50 μl de tampão de eluição 1X. Por fim, o DNA extraído foi armazenado a -20°C . Os produtos obtidos na extração foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0 %, corados com brometo de etídeo (10mg/ml) e fotografados em um transluminador de luz ultravioleta.

Para a análise da diversidade genética, foram selecionados dois genes mitocondriais, Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase subunidade 4 (ND4) (Tabela 1). As reações de PCR foram

realizadas para um volume final de 25 µl, da seguinte forma: 200 µM de cada dNTP, 1.5 µM MgCl₂, 10 mM de cada primer (tabela 1), 1,25u de Taq Polimerase (Invitrogen) e aproximadamente 20 ng de DNA. As reações foram amplificadas em termociclador BIOMETRA Trio Block (Thermo Scientific) programado da seguinte forma: COI (1 ciclo 94° C por 2 min, 35 ciclos a 94° C por 1 min, 58° C por 50 s, 72° C por 1 min, 1 ciclo a 72° C por 8 min e um ciclo final a 13° C) e ND4 (1 ciclo a 95° C por 5 min, 10 ciclos a 92° C por 1 min, 48° C por 1 min, 72° C por 2 min, 32 ciclos a 92° C por 1 min, 50° C por 35s, 72° C por 2 min, 1 ciclo final a 72° C por 10 min e um ciclo final a 13° C. Foi utilizado como controle positivo amostras de indivíduos já amplificados anteriormente para ambos os genes. Já como controle negativo foram utilizados apenas os reagentes usados na reação da PCR, que foram citados anteriormente. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese, sob condições descritas anteriormente.

Tabela 1- Descrição dos *primers* utilizados no presente trabalho.

Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)	Fonte
ND4 foward	ATTGCCTAAGGCTCATGTAG	400 pb	Birungi e Munstermann (2004)
ND4 reverse	TCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT		
COI foward	GGAGGRTTTGGAAAYTAGTYCC	650 pb	Paiva et al. (2018)
COI reverse	GCWGAWGTAARTAAAGCTCGWGTA		

3.2.2 Sequenciamento

Após amplificação por PCR, o produto foi enviado para sequenciamento no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM/FIOCRUZ-PE, onde o procedimento foi realizado no sequenciador ABI 3500xl (Applied Biosystems) com o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®). Para a reação de sequenciamento foram utilizados, 1 µl de cada primer a 3,2 pmol/µl; 0,5 µl de BigdyeTerminator v3.1; 1 µl tampão de sequenciamento 5X

(Tris-HCl, 200 mM, pH 9.0, MgCl₂, 5 mM); 1 µl do produto de PCR purificado (5 a 20 ng/µl) e água MiliQ 10 µl q.s.p. As condições de amplificação foram: 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 15 seg, 50 °C por 10 seg e 60 °C por 4 min. Após a amplificação, foi realizada a purificação e a precipitação do DNA utilizando 1 µl de EDTA (125 mM, pH 8,0) e 25 µl de etanol 100%, em seguida o produto foi centrifugado a 1533 g por 45 minutos. Após a centrifugação, o precipitado foi lavado com 25 µl de etanol 70% e centrifugado. Por fim, o precipitado foi ressuscitado em 10 µl de Formamida Hi-Die aplicado no sequenciador.

3.2.3 Análises filogenéticas

Após o sequenciamento, todas as amostras foram analisadas, para checagem da qualidade das sequências, editadas e alinhadas através do método *ClustalW* utilizando o programa CodonCode Aligner (CODONCODE, 2021). Em seguida, foi realizada uma comparação das sequências na plataforma BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2018) para confirmar se as amostras eram das espécies identificadas anteriormente através das chaves dicotômicas. Posteriormente, as sequências foram alinhadas no programa MAFFT V.7 através do método progressivo e do método de refinamento iterativo (FFT-NS-1, FFT-NS-2, FFT-NS-i) (MAFFT VERSION 7, 2019). O programa DnaSP versão 6.0 foi utilizado para calcular a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade de haplótipos (h) (ROZAS et al., 2019). Ainda no programa DnaSP, as sequências do gene ND4 foram analisadas pelo método de reconstrução de haplótipos que é conduzido pelos os algoritmos fornecidos pela PHASE (STEPHENS et al. 2001; STEPHENS e DONNELLY 2003), fastPHASE (SCHEET e STEPHENS 2006) e HAPAR (WANG e XU 2003).

Para construção da rede haplótipos foi utilizado o software PopART versão 1.7, que opera através do método de inferência median-joining networks, que combina o algoritmo de Krustal em conjunto com o algoritmo de Máxima Parcimônia (LEIGH; BRYANT, 2015). As árvores filogenéticas construídas nos softwares PhyML, onde foi utilizado o método de máxima verossimilhança, com avaliação de suporte de ramo por aLRT-SH like, com uma árvore inicial definida pelo algoritmo *Biological-Neighbor joining* (BioNJ) (GUINDON; GASCUEL, 2003). As árvores filogenéticas foram construídas a partir dos genes mitocondriais, através do método *Neighbor Joining* utilizando um *bootstrap* de 1000 e editadas na versão online do software iTOL (versão 6.5.2). Foi adicionada uma sequência da espécie *Anopheles albitarsis*, proveniente do

banco de dados GenBank[®] (GEBANK,2022), com número de acesso NC_020662.1, como grupo externo.

4. RESULTADOS

4.1 COLETA E AMOSTRAGEM

Foram realizadas um total de 4 coletas, nas localidades correspondentes ao Porto do Recife, TIP, Porto de Suape e na CEASA/PE. O total de mosquitos coletados nas quatro localidades variou de 18 a 813 para *Aedes aegypti* e de 0 a 1328 para *Culex quinquefasciatus*.

De forma geral, foram coletados 1492 indivíduos da espécie *A. aegypti* e 3459 da espécie *Cx. quinquefasciatus*, com o Porto do Recife e o TIP sendo as localidades com os maiores números de indivíduos, respectivamente (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Números de indivíduos obtidos por localidade, na Região Metropolitana de Recife.

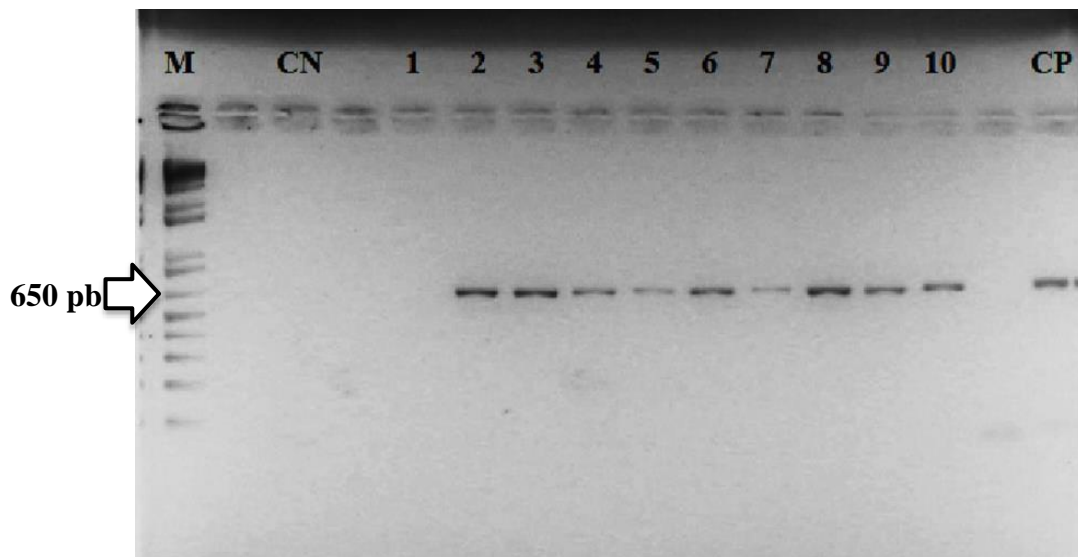
Localidades	<i>Aedes aegypti</i>			<i>Culex quinquefasciatus</i>		
	♂	♀	Total por localidade	♂	♀	Total por localidade
Porto de Recife	404	409	813	555	773	1328
TIP	144	132	276	892	830	1722
Porto de Suape	11	6	18	192	217	409
CEASA/PE	209	176	385	0	0	0
Total de mosquitos	768	724	1492	1639	1820	3459

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E SEQUENCIAMENTO

A partir dos indivíduos coletados foram realizadas 246 extrações de DNA, sendo 80 provenientes do Porto de Recife, 80 do TIP, 46 do Porto de Suape e 40 da Ceasa. A partir da extração de DNA das amostras, foi possível obter como produto após amplificação por PCR um total de 244 amostras para o gene COI e 245 amostras para o gene ND4.

Em gel de agarose, os produtos de PCR apresentaram um padrão de banda em torno de 650 pares de base (pb) para o gene COI (**Figura 15**) e 400 pb para o gene ND4 (**Figura 16**).

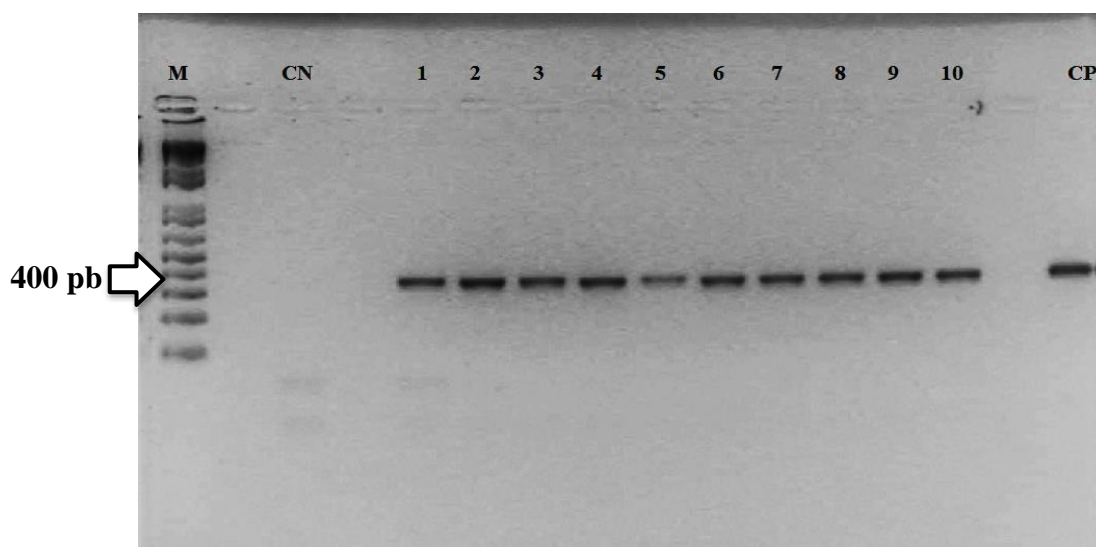
Figura 15 - Gel de agarose demonstrando o padrão de bandas 650 pb encontrado para os fragmentos do gene COI.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

M: Marcador 1Kb Plus; **CN:** Controle Negativo; **Números de 1 a 10:** Produtos de PCR para o gene ND4; **CP:** Controle Positivo.

Figura 16 - Gel de agarose demonstrando o padrão de bandas de 400 pb encontrado para os fragmentos do gene ND4.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

M: Marcador 1Kb Plus; **CN:** Controle Negativo; **Números de 1 a 10:** Produtos de PCR para o gene ND4; **CP:** Controle Positivo.

Do total de 126 amostras amplificadas por PCR, foram obtidas, após o alinhamento e retirada de sequências com baixa qualidade, 102 sequências de espécimes de *A. aegypti* para o gene COI. O fragmento do gene COI continha 650 nucleotídeos, porém, após o alinhamento e retirada de nucleotídeos foi utilizada uma sequência composta por 520 pb. As análises iniciais de diversidade genética revelaram a existência de um total de cinco haplótipos diferentes, compartilhados entre as localidades do Porto do Recife, TIP, Porto de Suape e CEASA/PE. Além disso, foi observado um número médio de diferenças de nucleotídeos entre indivíduos (k) 0,90460 com a diversidade de nucleotídeos (π) 0,00174.

Já para o gene ND4, foram amplificadas por PCR 126 amostras, destas, 100 sequências foram obtidas após o alinhamento e retirada de sequências com baixa qualidade. O fragmento do gene ND4 continha 400 nucleotídeos, porém, após o alinhamento e retirada de nucleotídeos foi utilizada uma sequência composta por 306 pb. Nessas sequências foram observadas bases ambíguas nas posições 49, 118, 127, 166, 211, 244, 259, 289. Diante disso, foram geradas pelo programa DnaSP, cópias das sequências que continham sítios heterozigotos.

Com isso, foram obtidas no total 200 sequências, onde foram observados 34

haplótipos, com um número médio de diferenças de nucleotídeos de 3,32347 e diversidade de nucleotídeos de 0,01149.

Para a espécie *Cx. quinquefasciatus* de 118 amostras amplificadas, foram obtidas, foram obtidas, após o alinhamento e retirada de sequências com baixa qualidade, 101 sequências de indivíduos para o gene COI, com tamanho de 504 pb. Foram observados índices de diversidade nucleotídica de 0,00016 e um número médio de diferenças de nucleotídeos de 0,07881. As análises revelaram a existência de um total de 4 haplótipos diferentes, compartilhados entre as localidades já citadas anteriormente. Para ND4, de 119 amostras amplificadas, 102 foram utilizadas com um tamanho de 306 pb. Para esses indivíduos foi observado apenas um haplótipo, com os índices de diversidade nulos ($\pi=0,000$).

Tabela 3 – Número de haplótipos (H) e diversidade nucleotídica (π) para os genes COI e ND4 das populações de *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* provenientes das localidades do Porto do Recife, TIP, Porto de Suape e CEASA/PE.

Localidades	H		π	
	COI	ND4	COI	ND4
<i>A. aegypti</i>	2	11	0,00016	0,01200
	Porto do Recife			
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	2	1	0,00013	0,00000
<i>A. aegypti</i>	3	15	0,00403	0,01149
	TIP			
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	3	1	0,00028	0,00000

Continua

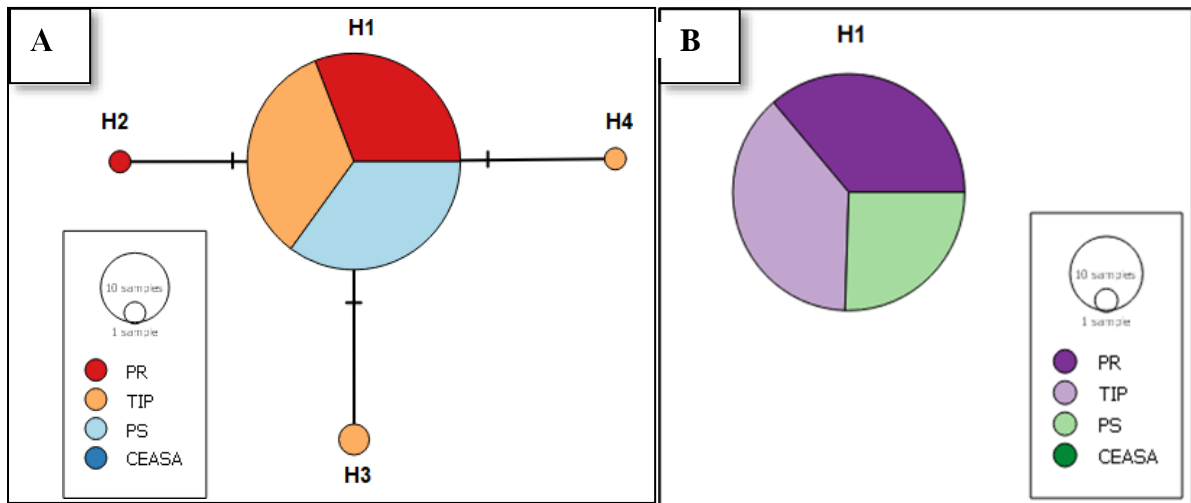
Cont. da Tabela 3

Porto de Suape	<i>A. aegypti</i>	1	6	0,00000	0,00804
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	1	1	0,00000	0,0000
CEASA	<i>A. aegypti</i>	2	17	0,00023	0,00899
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	-	-	-	-
Todas as localidades	<i>A. aegypti</i>	5	34	0,00174	0,01086
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	4	1	0,00016	0,0000

A partir destes dados foi criada uma rede de haplótipos, para ambos os genes, a partir das populações de *Cx. quinquefasciatus* (**Figura 17**) e *A. aegypti* (**Figura 18 e 19**).

Na rede de haplótipos do gene COI, para a espécie *Cx. quinquefasciatus*, foi observado que o H1 foi o haplótipo mais frequente, encontrado em 96,04% dos indivíduos das quatro populações das localidades amostradas. Os três haplótipos, H2, H3 e H4, foram gerados a partir de três pontos mutacionais nas posições 22, 201, 315. Para o gene ND4, foi demonstrado que todos os indivíduos, de todas as localidades amostradas compartilham de um mesmo haplótipo (H1) (**Figura17**).

Figura 17 - Rede de haplótipos dos genes COI e ND4 geradas a partir de populações de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de regiões metropolitanas da cidade do Recife.



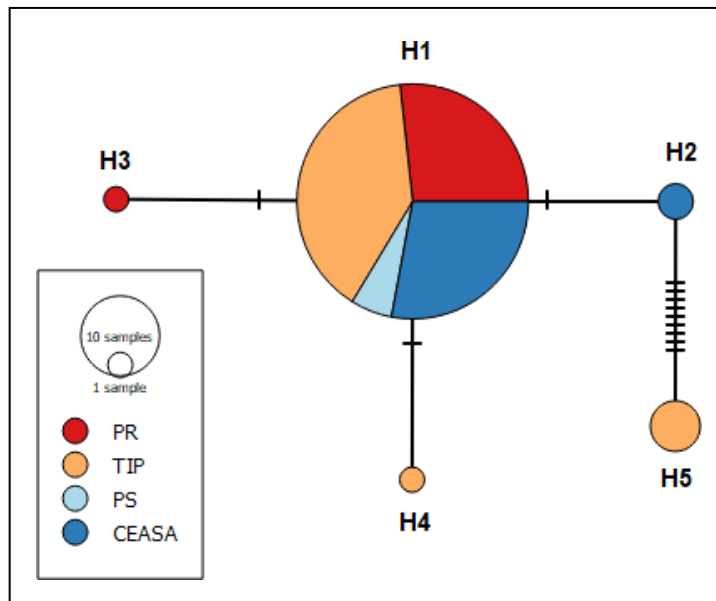
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A. Rede de haplótipos do gene COI. **B.** Rede de haplótipos do gene ND4.

Para a espécie *A. aegypti*, a rede gerada para o gene COI demonstrou que o haplótipo H1 foi o mais frequente com uma porcentagem de 91,48%. Os quatro haplótipos, H2, H3, H4 e H5, foram gerados a partir de doze pontos mutacionais nas posições 24, 34, 42, 105, 129, 135, 186, 264, 285, 297, 306, 519 (**Figura 18**).

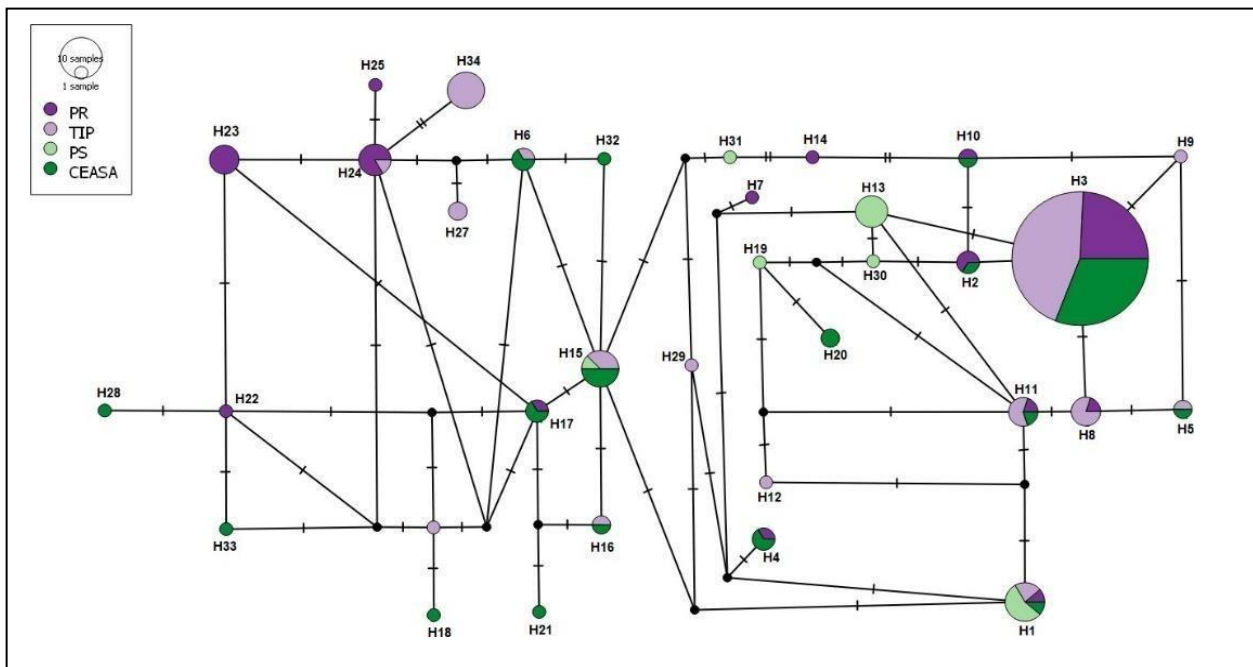
Para a rede gerada para o gene ND4, através das sequências geradas, foi observado que o haplótipo mais frequente foi o H3 com uma porcentagem de 56%. Os outros 33 haplótipos foram gerados a partir de onze pontos mutacionais nas posições 49, 109, 118, 127, 166, 193, 211, 244, 247, 259, 289. Além disso, essa rede demonstrou 16 haplótipos únicos, gerados a partir do H3 (**Figura 19**).

Figura 18 - Rede de haplótipos do gene COI, geradas a partir de populações de *A. aegypti* provenientes de regiões metropolitanas da cidade do Recife.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 19 - Rede de haplótipos do gene ND4, geradas a partir de populações de *A. aegypti* provenientes de regiões metropolitanas da cidade do Recife.



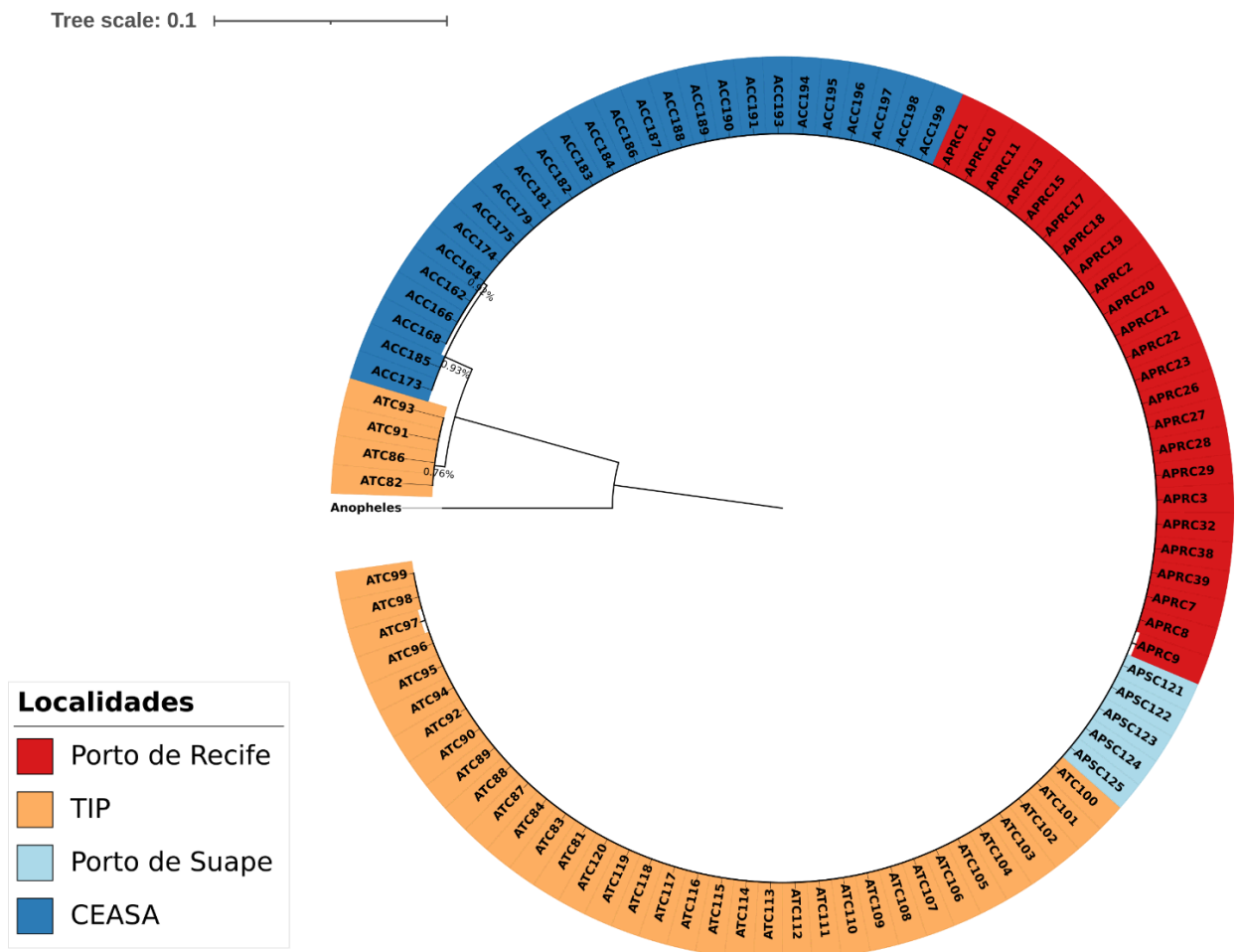
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A relação entre os indivíduos coletados nas diferentes localidades foi verificada através das árvores filogenéticas geradas. Para os indivíduos da espécie *A. aegypti*, gene

COI, foi observado dois grupos distintos, com valores de *bootstrap* 76 a 92 %, que mostram a existência dos 4 haplótipos. Já para o gene ND4, foi observada uma árvore bastante heterogênea com um valor de *bootstrap* variando entre 23 a 98% (Figura 20 e 21).

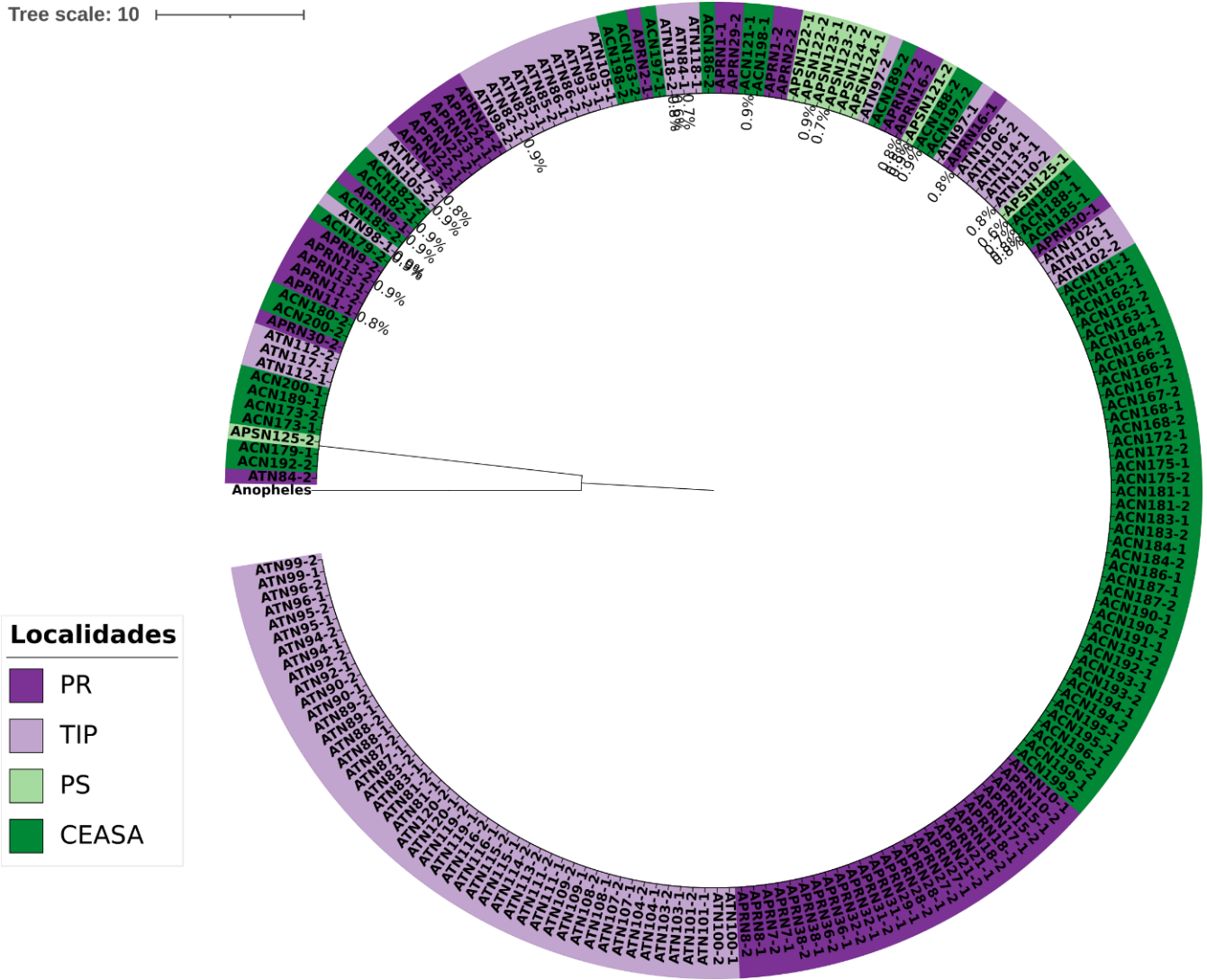
Para *Cx. quinquefasciatus* os valores de *bootstrap* foram de 80 e 90% para a árvore construída com o gene COI. Para o gene ND4, a árvore filogenética, demonstrou que os indivíduos pertenciam a um único grupo, com valores de *bootstrap* de 80% (Figura 22 e 23).

Figura 20 - Árvore filogenética referente ao gene COI, construída através do método *Neighbor Joining*, que mostra as relações entre os indivíduos das populações de *Aedes aegypti* provenientes das localidades do Porto do Recife, TIP, Porto de Suape e CEASA, obtidas a partir de um *bootstrap* de 1000.



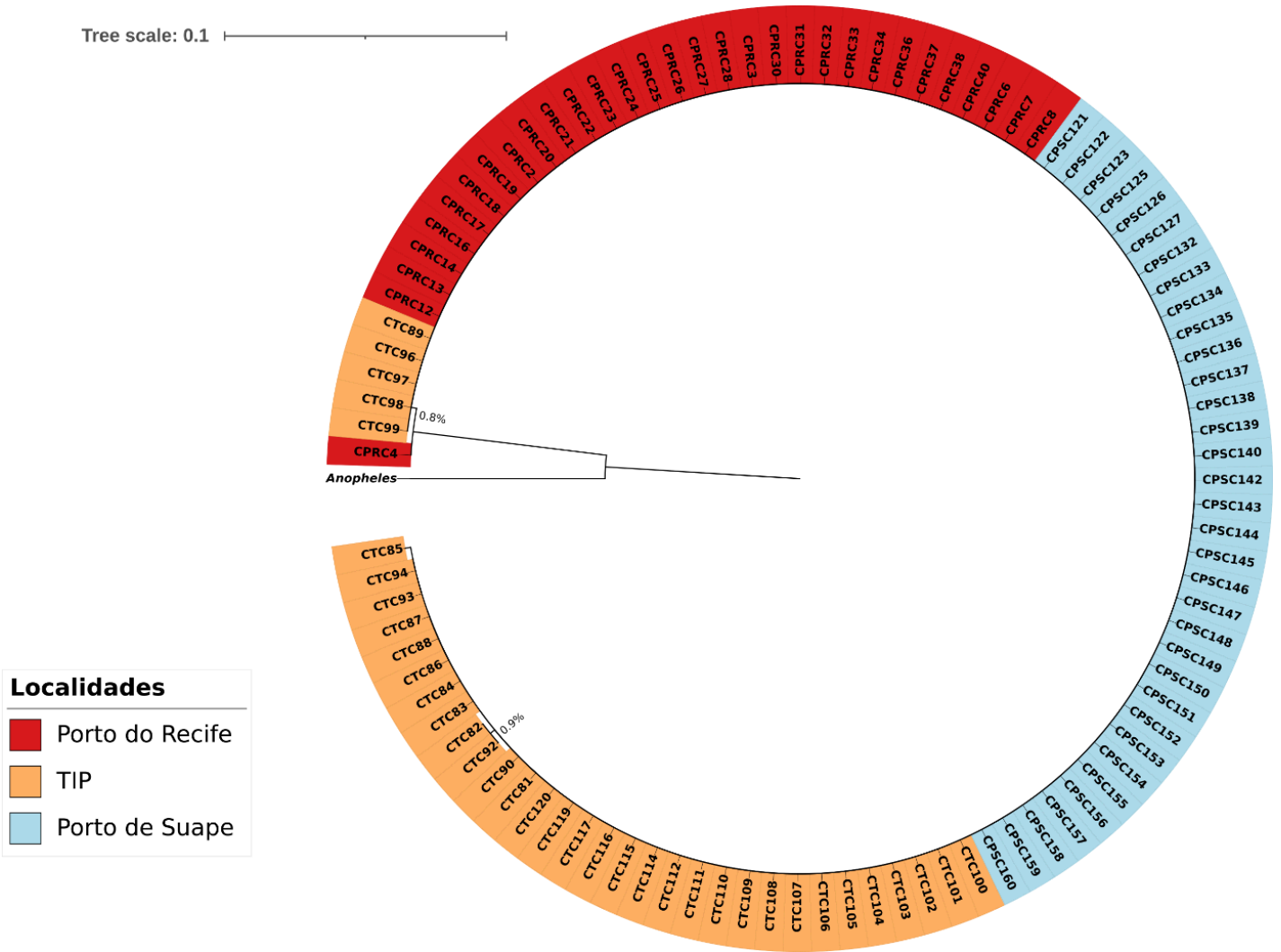
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 21 - Árvore filogenética referente ao gene ND4, construída através do método *NeighborJoining*, que mostra as relações entre os indivíduos das populações de *Aedes aegypti* provenientes das localidades do Porto do Recife, TIP, Porto de Suape e CEASA, obtidas a partir de um *bootstrap* de 1000.



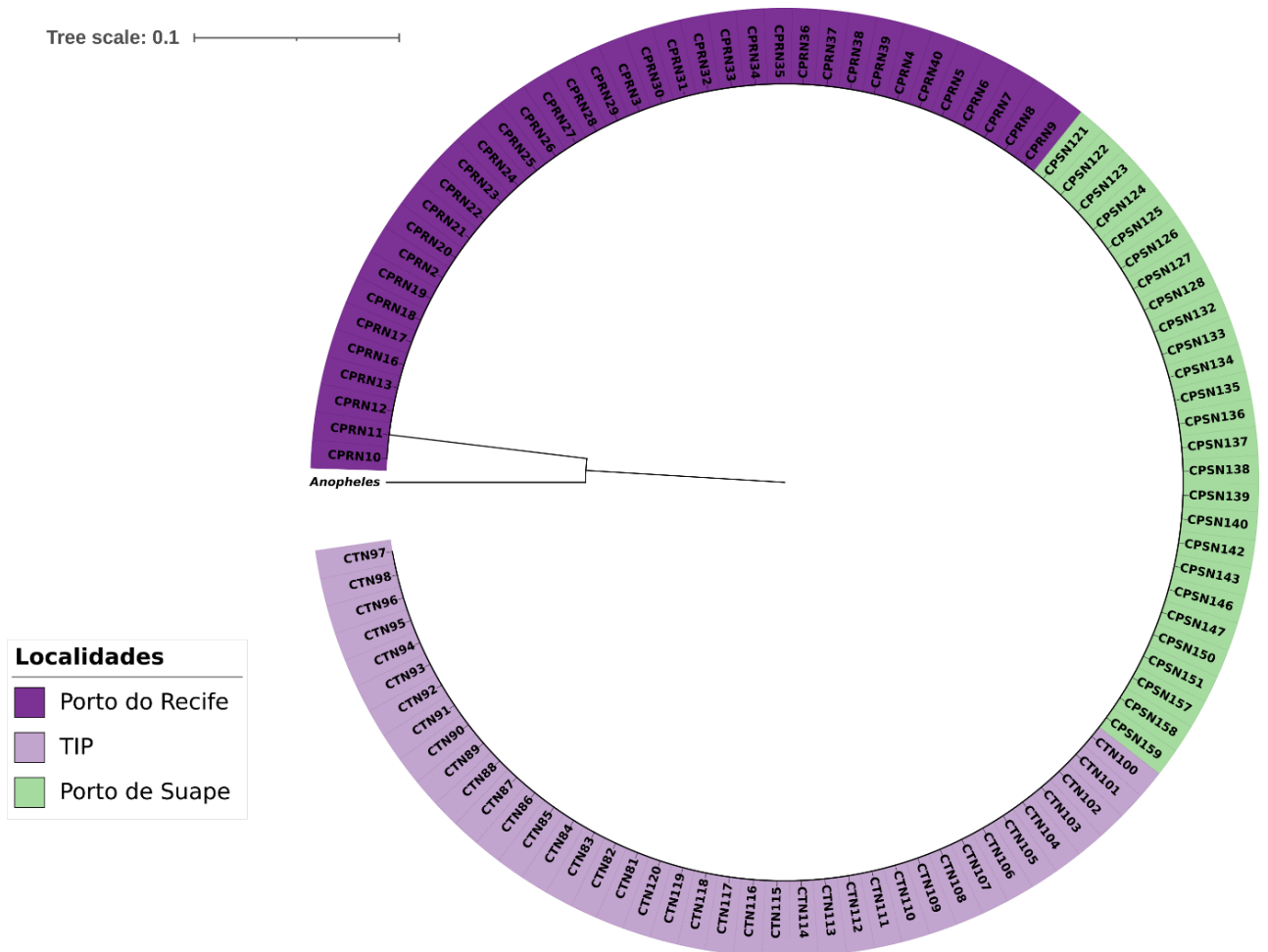
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 22 - Árvore filogenética referente ao gene COI, construída através do método *NeighborJoining*, que mostra as relações entre os indivíduos das populações de *Culex quinquefasciatus* provenientes das localidades do Porto do Recife, TIP, Porto de Suape e CEASA, obtidas a partir de um *bootstrap* de 1000.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 23 - Árvore filogenética referente ao gene ND4, construída através do método *NeighborJoining*, que mostra as relações entre os indivíduos das populações de *Culex quinquefasciatus* provenientes das localidades do Porto do Recife, TIP, Porto de Suape e CEASA, obtidas a partir de um *bootstrap* de 1000.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

1. DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizados dois genes mitocondriais para caracterizar o padrão de diferenciação genética e estrutura populacional das espécies *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* em áreas de entrada desses culicídeos na Região Metropolitana do Recife. Como resultados obtidos neste trabalho foi observado que a população de *A. aegypti* se mostra mais diversa que a da espécie *Cx. quinquefasciatus* e ambas as populações provenientes da localidade TIP podem estar sofrendo múltiplos eventos de introduções.

Dentre as espécies coletadas, *Cx. quinquefasciatus* foi a que se mostrou mais

abundantes localidades do Porto do Recife, TIP e Porto de Suape. Isso pode estar relacionado com o uso do atraente de oviposição natural descrito por MBOERA e colaboradores (2000) associado a armadilha Double BR-OVT, que juntos funcionam como um potente ferramenta de atração para fêmeas grávidas desta espécie, gerando, consequentemente, um número maior de indivíduos (BARBOSA 2007, 2010).

O baixo número de mosquitos da espécie *A. aegypti* obtidos no Porto de Suape, é explicado pela mortalidade das larvas logo após o estabelecimento dos imaturos no insetário do Departamento de Entomologia do IAM. Dentre as hipóteses para essa mortalidade há a de que os imaturos tenham sofrido alguma interferência externa do ambiente, já que a localidade citada possui um sistema de controle vetorial ativo com implementações de programas de controle (PERNAMBUCO, 2017). A inexistência de indivíduos da espécie *Cx. quinquefasciatus* na CEASA/PE pode ser explicada pelo método de coleta utilizado pelos agentes de saúde na região, na qual foram utilizadas ovitrampas do tipo sentinela, que são armadilhas mais sensíveis e utilizadas para *A. aegypti* (ACIOLY 2006; NUNES, 2013; INÁCIO DA SILVA 2018).

Dentre as populações de *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* coletadas neste estudo, a diversidade nucleotídica obtida para o gene COI e para o gene ND4 foram maiores no TIP, e menores no Porto de Suape. Estes resultados corroboram com estudos realizados na Amazônia brasileira (LIMA JÚNIOR; SCARPASSA, 2009), o que levanta a hipótese de que essas populações do TIP podem estar sofrendo múltiplas introduções ocasionadas pelo transporte de mosquitos adultos através do fluxo de carros e transportes públicos.

Além disso a baixa diversidade nucleotídica e quantidade de haplótipos em ambos os genes para a espécie *Cx. quinquefasciatus*, corrobora com o estudo realizado por MORAIS et al. (2012), em 10 cidades, dentre elas Recife, onde foram obtidos resultados semelhantes para os índices de diversidade além e uma maior frequência para o H1.

Já para espécie *A. aegypti* foi observada uma diversidade nucleotídica (π) para o gene ND4 maior, se comparada ao gene COI. Essa diferença pode surgir devido a restrições mais altas na taxa de mutação no gene COI, por se tratar de um gene mais conservado. Essa variância entre os dois genes, que ocorre nessa espécie, já foi demonstrada em outros estudos realizados no Brasil (GUEDES, 2006; SCARPASSA; CARDOZA; CARDOSO, 2008; VIDAL, 2015; CUNHA, 2016; INÁCIO DA SILVA,

2018).

Além disso, a análise de sequências do gene ND4 da espécie *A. aegypti*, na Região Metropolitana do estado de Pernambuco revelou a presença de 34 haplótipos. Esse alto número de haplótipos corrobora com o estudo realizado por Paduan e Ribolla (2008) em 12 cidades brasileiras onde foi observado a existência de 24 haplótipos diferentes nos mosquitos coletados, além de uma expressiva variabilidade na estrutura genética entre as populações.

Em alguns espécimes de *A. aegypti*, foram encontradas a presença de mais de uma sequência de DNAm dentro das células. A ocorrência de duas sequências de genes mitocondriais distintas em um indivíduo pode ser explicada por vários fatores como sequenciamento de NUMT'S, mutação dentro do DNAm, ou heteroplasmia, que consiste na mistura dos genomas nucleares e mitocondriais (PADUAN; RIBOLLA, 2008; HLAING et al., 2009). Nas análises realizadas neste estudo procuramos diminuir essa ambiguidade com a utilização de três diferentes tipos de algoritmos que têm como objetivo estimar a taxa de recombinação ao longo das sequências, modificar o algoritmo PHASE levando em consideração os padrões de desequilíbrio de ligação, e estimar a menor quantidade de haplótipos.

A espécie *A. aegypti* possui a segunda maior densidade de NUMT's se comparada a outros insetos (BLACK IV; BERNHARDT, 2009). As posições em que foram encontrados os pontos mutacionais nesse estudo corroboram com a faixa de distribuição de NUMT's encontrada por Black IV e Bernhardt (2009). Diante disso, acreditamos que a variação encontrada nos indivíduos utilizados nesse estudo é devida a essa introdução de sequências mitocondriais no genoma nuclear desses mosquitos, como já foi demonstrado em outros estudos (BLACK IV; BERNHARDT, 2009; HLAING et al., 2009; BEHURA et al., 2011; PAUPY et al., 2012), porém é preciso análises mais robustas para determinar a causa dessa variação.

A introdução acidental de espécies invasoras como *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, já foi demonstrada em estudos realizados em pontos de entrada como aeroportos, portos marítimos e rodovias (SHAIKEVICH et al., 2016; IBÁÑEZ-JUSTICIA et al., 2020). Nesses estudos, foram constatados o estabelecimento e dispersão dessas espécies através da utilização de genes mitocondriais (SHAIKEVICH et al., 2016; IBÁÑEZ-JUSTICIA et al., 2020). Essa dispersão está ligada ao fato do alto fluxo de transportes, que fornece o meio necessário para esses vetores se estabelecerem

em novas regiões (SHAIKEVICH et al., 2016; IBÁÑEZ-JUSTICIA et al., 2020). Este fato reforça a importância do uso de ferramentas moleculares, como o DNAm, para auxiliar na identificação da origem e os possíveis locais de introdução dessas espécies. Além disso, a partir desse conhecimento é possível elaborar estratégias de controle mais eficazes e focalizadas, nas regiões que sofrem com essas múltiplas introduções desses culicídeos, com o intuito de diminuir a dispersão e transmissão de patógenos.

2. CONCLUSÕES

- A população de *A. aegypti* se mostra mais diversa que a da espécie *Cx. quinquefasciatus*;
- Ambas as populações provenientes da localidade TIP podem estar sofrendo múltiplos eventos de introduções;
- Os resultados obtidos neste trabalho servem de base para entendermos como se comportam as populações desses vetores na Região Metropolitana do Recife, e que através deles podem ser elaboradas estratégias de controle mais eficazes, focalizadas e direcionadas a pontos de entrada que possuem múltiplas introduções desses culicídeos, com o intuito de diminuir a seu estabelecimento, dispersão e consequentemente transmissão de patógenos.

3. REFERÊNCIAS

ABREU, F. V. S. *et al.* Influence of breeding site availability on the oviposition behaviour of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 669–676, 7 jul. 2015.

ACIOLY, R. V. **O uso de armadilhas de Oviposição (ovitrampas) como ferramenta para monitoramento populacional do *Aedes spp* em bairros do Recife**. 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

ACHEE, N. L. *et al.* Correction: Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007275, 26 mar. 2019.

APAC. **APAC - Agência Pernambucana de Águas e Climas.**

Disponível em:<<https://www.apac.pe.gov.br/climatologia/519-climatologia>>.

Acesso em: 15 ago. 2022.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution.** Boston, MA: Springer US, 1994.

AYRES, C. E. J. *et al.* Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro and macrogeographic levels in Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 20, n. 4, p. 350–356, 1 dez. 2004.

AZAMBUJA, D. O. *et al.* Secuencias del gen mitocondrial para identificación de especies de animales. **Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA**, v. 5, n. 2, p. 396, 12 jul. 2013.

BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 4, p. 729–744, abr. 2004.

BARBOSA, R. M. R. **Estudo do comportamento de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) na escolha de um sítio de postura para construção de armadilha de oviposição.** 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

BARBOSA, R. M. R. **Aperfeiçoamento e avaliação da armadilha de oviposição BR-OVT para *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).** 2007. 150 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2007.

BARBOSA, R. M. R. *et al.* *Culex* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Egg Laying in Traps Loaded With *Bacillus thuringiensis* Variety israelensis and Baited With Skatole. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 3, p. 345–348, 1 maio 2010.

BARR, A. R. The Distribution of *Culex P. Picipiens* and *C. P. Quinquefasciatus* in North America 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 1, p. 153–165, 1 jan. 1957.

BARRETT, A. D. T. Zika vaccine candidates progress through nonclinical development and enter clinical trials. **NPJ Vaccines**, v. 1, n. 1, 10 nov. 2016.

BEEBE, N. W. DNA barcoding mosquitoes: advice for potential prospectors. **Parasitology**, v.145, n. 5, p. 622–633, 22 mar. 2018.

BEHURA, S. K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 11, p. 3087–3113, 24 jul. 2006.

BEHURA, S. K. *et al.* Complete sequences of mitochondria genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 10, p. 770–777, out. 2011.

BENSASSON, D.; ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 3, p. 406-415, 2000.

BIRUNGI, J.; MUNSTERMANN, L. E. Genetic Structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations Based on Mitochondrial ND5 Sequences: Evidence for an Independent Invasion into Brazil and United States. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 95, n. 1, p. 125–132, 1 jan. 2002.

BLACK IV, W. C.; BERNHARDT, S. A. Abundant nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in the *Aedes aegypti* genome. **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 6, p. 705–713, dez. 2009.

BLANCHARD, J. L.; SCHMIDT, G. W. Mitochondrial DNA migration events in yeast and humans: integration by a common end-joining mechanism and alternative

perspectives on nucleotide substitution patterns [published erratum appears in *Mol Biol Evol* 1996 Jul;13(6):893]. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 3, p. 537–548, 1 mar. 1996.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113–118, 1 jun. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico28**: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 29, 2021.

Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_28.pdf. Acesso em: 25 abr. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico28**: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 34, 2022.

Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_28.pdf. Acesso em: 25 abr. 2022.-

BROWN, J. E. *et al.* Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1717, p. 2446–2454, 12 jan. 2011.

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1967–1971, 1 abr. 1979.

CABI. **West Nile virus**. Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/59558>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

CASSEB, A. DO R. *et al.* ARBOVÍRUS: IMPORTANTE ZOOSE NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391–403, 2013.

CEASA/PE. **O CEASA**. Disponível em: <<https://www.ceasape.org.br/quemsomos>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

CIOTA, A.; KEYEL, A. C. The Role of Temperature in Transmission of Zoonotic Arboviruses. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1013, 1 nov. 2019.

CODONCODE. **Sequence Assembly and Alignment Software - CodonCode**. Disponível em: <<https://www.codoncode.com/index.htm>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

CONSOLI, B.; LOURENÇO, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [s.l.] Editora Fiocruz, 1994.

CUNHA, P. B. **VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Aedes aegypti* EM POPULAÇÕES DO NORDESTE BRASILEIRO ATRAVÉS DE GENE MITOCONDRIAL**. 2016. 45 f v 1. DISSERTAÇÃO. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO.

DAVIS N.C., SHANNON R.C. Studies on yellow fever in south america: v. Transmission experiments with certain species of *Culex* and *Aedes*. **J Exp Med**. 1929;50(6):803-808.doi:10.1084/jem.50.6.803.

DE OLIVEIRA, W. K. *et al.* Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **The Lancet**, v. 390, n. 10097, p. 861–870, ago. 2017.

DEEBA, F. *et al.* Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 3, p. ftv119, 10 dez. 2015.

DENLINGER, D. L.; ARMBRUSTER, P. A. Mosquito Diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 59, n. 1, p. 73–93, 7 jan. 2014.

DIAS, J. P. Avaliação da efetividade do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*. Brasil, 1996 a 2002. **repositorio.ufba.br**, 2006.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259–279, dez. 2002.

DU BUY, H. G.; RILEY, F. L. Hybridization between the nuclear and kinetoplast dna's of leishmania enriettii and between nuclear and mitochondrial DNA's of mouse liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 57, n. 3, p. 790–797, mar. 1967.

FARAJOLLAHI, A. *et al.* “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, n. 7, p. 1577–1585, out. 2011.

FARENHORST, M. *et al.* Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 41, p. 17443– 17447, 13 out. 2009.

FARNESI, L. C. *et al.* The influence of a light and dark cycle on the egg laying activity of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**,v. 113, n. 4, p. e170362, 5 fev. 2018.

FAY R.M, ELIASON D.A. A preferred ovoposition sites as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosquito News** 26: 531-535, 1966.

FERNANDES, R. S. **Competência vetorial de populações brasileiras de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* frente a diferentes cepas do vírus Zika isoladas no Brasil.**2017. 93f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

FONSECA, D. M. et al. Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 2, p. 284–289, 1 fev. 2006.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia Vol. 2**. [s.l.] EdUSP, 2002.

FRANCA, R. F. O. et al. First International Workshop on Zika Virus Held by Oswaldo Cruz Foundation FIOCRUZ in Northeast Brazil March 2016 – A Meeting Report. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004760, 3 jun. 2016.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, M. DA S. **Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor - Manual de Normas Técnicas**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2022.

GADELHA, D.D., & Toda, A. **Biologia e comportamento do *Aedes aegypti***. (1985).

GENBANK. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Acesso em: 27 jul. 2022.

GUBLER, D. J. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330–342, jul. 2002.

GUEDES, Duschinka Ribeiro Duarte. **Epidemiologia Molecular do *Aedes Albopictus* (Diptera: Culicidae)**. 2006. Dissertação (Mestrado Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696–704, 1 out. 2003.

GUO, X. et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 1, p. 1–5, jan. 2016.

HARRIS, A. F. et al. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 828–830, set. 2012.

HARVEY-SAMUEL, T. et al. *Culex quinquefasciatus*: status as a threat to island avifauna and options for genetic control. **CABI Agriculture and Bioscience**, v. 2, n. 1, 4 mar. 2021.

HELMERSSON, Erik. **Molecular identification of mosquito species: Evaluation of a rapid DNA extraction method together with DNA barcoding as a tool for identification of species**. 2013.

HLAING, T. et al. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. **BMC Genetics**, v. 10, n. 1, p. 11, 2009.

HIRAGI, C. et al. Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology** [online]. 2009, v. 38, n.4. Acessado em 29 setembro 2022, pp. 542-547.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000400018>>. Epub 14 Set 2009. ISSN 1678-8052. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000400018>.

HOLMES, E.; TWIDDY, S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 19–28, maio 2003.

IBÁÑEZ-JUSTICIA, A. et al. Detection of Exotic Mosquito Species (Diptera: Culicidae) at International Airports in Europe. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 10, p. 3450, 15 maio 2020.

INÁCIO DA SILVA, L. **Análise da variabilidade genética de *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) provenientes de Fernando de Noronha como ferramenta para acompanhamento da técnica do inseto estéril.** 2018. 66 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biomedicina, UFPE, Recife, 2018

INSTITUT PASTEUR. Disponível em: <<https://phototheque.pasteur.fr/en>>. Acesso em: 10 abr. 2022.

KILPATRICK, A. M. Globalization, Land Use, and the Invasion of West Nile Virus. **Science**, v. 334, n. 6054, p. 323–327, 20 out. 2011.

KOŠTÁL, V. Eco-physiological phases of insect diapause. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 2, p. 113–127, fev. 2006.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Complete Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of West Nile Virus Strains Isolated from the United States, Europe, and the Middle East. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 96–105, jun. 2002.

LAPOINTE, D. A. Dispersal of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in a Hawaiian RainForest. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 4, p. 600–609, 1 jul. 2008.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, jul. 2015.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W293–W296, 22 abr. 2021.

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. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 414–422, 27 mar. 2009.

LIMA, E. P.; GOULART, M. O. F.; ROLIM NETO, M. L. Meta-analysis of studies on chemical, physical and biological agents in the control of *Aedes aegypti*. **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, 4 set. 2015.

LIMA-CAMARA, T. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50:36, 2016.

LOWE, R. *et al.* The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, p. 96, 9 jan. 2018.

LWANDE, O. W. *et al.* Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 2, 26 set. 2019.

MAFFT VERSION 7. **MAFFT alignment and NJ / UPGMA phylogeny**. Disponível em: <<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>>. Acesso em: 30 jun. 2022.

MAITRA, A. Genética populacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de diferentes regiões do Brasil, com marcadores microssatélites e mitocondrial. **repositorio.inpa.gov.br**, 28 fev. 2019.

MARTÍNEZ-IBARRA, J. A. *et al.* Indigenous fish species for the control of *Aedes aegypti* in water storage tanks in Southern México. **BioControl**, v. 47, n. 4, p. 481–486, 2002.

MARTINS, L.; AMORIM, M. R. C.; CALDEIRA, A. J. R. Origem e importância filogenética do DNA mitocondrial. **Anais do I Congresso Nacional On-line de Biologia Celular e Estrutural**, v. 2, 13 set. 2021.

MBOERA, L. E. G. *et al.* Sampling Gravid *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Tanzania with Traps Baited with Synthetic Oviposition Pheromone and Grass Infusions. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 172–176, 1 jan. 2000.

MCBRIDE, CAROLYN S. Genes and Odors Underlying the Recent Evolution of Mosquito Preference for Humans. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R41–R46, jan. 2016.

MEDLOCK, J. M. *et al.* A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 6, p. 435–447, jun. 2012.

MERRITT, R. W.; DADD, R. H.; WALKER, E. D. Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, v. 37, n. 1, p. 349–374, jan. 1992.

MORAIS, S. A. *et al.* (2012). Low genetic diversity in Wolbachia-infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 54, 325-329.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST: Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

NELSON, M. J.; SALUD, O. P. DE LA. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. **iris.paho.org**, 1986.

NUNES, V. N. Avaliação da metodologia de aspiração de mosquitos adultos para monitoramento da infestação por *Aedes aegypti* em área endêmica de dengue em Recife/PE. 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde Pública) - **Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**, Recife, 2013.

OLIVA, L. O. *et al.* Quiescence in *Aedes aegypti*: Interpopulation Differences Contribute to Population Dynamics and Vectorial Capacity. **Insects**, v. 9, n. 3, p. 111, 1 set. 2018.

PADUAN, K. D. S.; RIBOLLA, P. E. M. Mitochondrial DNA Polymorphism and

Heteroplasmy in Populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 1, p. 59–67, 1 jan. 2008.

PANETO, G. G. [UNESP. Utilização do DNA mitocondrial no contexto forense brasileiro. **Aleph**, p. 86 f., 18 dez. 2006.

PAMILO P.; VILJAKAINEN L.; VIHAVAINEN A. Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 6, p. 1340-1346, 2007.

PEÑA, L. C.; PAMPHILE, J. A.; DOS SANTOS OLIVEIRA, J. A. Mosquito *Aedes spp.* vetor de importantes arboviroses: do controle clássico ao biotecnológico, uma breve revisão. **Revista Valore**, [S.l.], v. 7, p. e-7052, set. 2022. ISSN 2526- 043X.

Disponível em: <<https://revistavalore.emnuvens.com.br/valore/article/view/1223>>. Acesso em: 19 set. 2022.

PANETO, G. G. UNESP. Utilização do DNA mitocondrial no contexto forense brasileiro. **Aleph**, p. 86 f., 18 dez. 2006.

PATRICIA, D. *et al.* Ciclo de vida del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue. **ACTA PEDIATR MÉX**, v. 22, n. 2, p. 114–117, 2001.

PEREIRA, L. P. L. A. *et al.* Molecular studies with *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), mosquito transmitting the dengue virus. **Parasitology Research**, v. 116, n. 8, p. 2057– 2063, 30 maio 2017.

PEREIRA, T. N. *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n.4, p. e0007518, 14 abr. 2020.

PERNAMBUCO. Governo do Estado. **Plano de Desenvolvimento e Zoneamento**. 2010. Disponível em:

<http://web.antaq.gov.br/Sistemas/WebServiceLeilao/DocumentoUpload/Audiencia%2025/PD_Z_Porto_de_Suape_2010.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2022.

PLESS, E. *et al.* Multiple introductions of the dengue vector, *Aedes aegypti*, into California. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005718, 10 ago. 2017.

PONS, J.; VOGLER, A. P. Padrão complexo de coalescência e rápida evolução de um pseudogene de RNAr mitocondrial em uma radiação recente de besouros-tigre. **Biologia Molecular e Evolução**, v. 22, n. 4, pág. 991-1000, 2005.

PORTUÁRIO DE SUAPE, C. I. **O Porto do Futuro**. Disponível em: <<https://www.suape.pe.gov.br/pt/>>. Acesso em: 30 jul. 2022.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. suppl 1, p. 11–17, 2013.

PORTO DO RECIFE S.A (Pernambuco). **O porto e a cidade**. 2022. Disponível em: https://www.portodorecife.pe.gov.br/porto_cidade.php. Acesso em: 10 ago. 2022.

REINHOLD, J.; LAZZARI, C.; LAHONDÈRE, C. Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. **Insects**, v. 9, n. 4, p. 158, 6 nov. 2018.

ROIZ, D. *et al.* Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. e0006845, 6 dez. 2018.

ROY, S. K.; BHATTACHARJEE, S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 687–702, out. 2021.

ROZAS, J. *et al.* **DnaSP**. Disponível em: <<http://www.ub.edu/dnasp/>>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SANTOS, M. A. V. DE M. et al. Tecnologias integradas para controle biológico, mecânico e genético de *Aedes aegypti*. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 28, n. 01, p. 58–63, 2 fev.2018.

SAÚDE. Ministério. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengu_e.pdf>. Acesso em: 25 set. 2022.

SCARPASSA, V. M.; CARDOZA, T. B.; CARDOSO, R. P. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 895–903, 1 jun. 2008.

SCHEET, P., STEPHENS, M. (2006). A Fast and Flexible Statistical Model for Large-Scale Population Genotype Data: Applications to Inferring Missing Genotypes and Haplotypic Phase. **American Journal of Human Genetics**, 78: 629-644.

SHAIKEVICH, E. V. et al. Genetic diversity of *Culex pipiens* mosquitoes in distinct populations from Europe: contribution of *Cx. quinquefasciatus* in Mediterranean populations. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 27 jan. 2016.

SHIELDS, V. D. C. **Biological control of pest and vector insects**, [s.l.] Intech Open Access Publisher, 2017.

SILVA, H. H. G. DA; SILVA, I. G. DA. 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, n. 4, p. 349–355, ago. 1999.

SIMON, C. et al. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651–701, 1 nov. 1994.

SOUMAHORO, M.-K. et al. Imported Chikungunya Virus Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 162–163, 1 jan. 2010.

SOUZA, W. V. DE *et al.* Microcephaly epidemic related to the Zika virus and living conditions in Recife, Northeast Brazil. **BMC public health**, v. 18, n. 1, p. 130, 12 jan. 2018.

SPENASSATTO, C. UNESP. Desenvolvimento de metodologia high-throughput para estudo populacional do mosquito *Aedes aegypti* e comparação de dados de genes mitocondriais. **Aleph**, p. 96 f., 6 abr. 2011.

STEPHENS M., DONNELLY P. (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype DnaSP v6. Documentation 112 / 112 reconstruction from population genotype data. **American Journal of Human Genetics**, 73, 1162-1169.

STEPHENS M., SMITH. N, DONNELLY P. (2001). **A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. American Journal of Human Genetics**, 68, 978-989.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199–203, maio 2000.

TABACHNICK, W. J. Evolutionary Genetics and Arthropod-borne Disease: The Yellow Fever Mosquito. **American Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 14–26, 1 jan. 1991.

TERMINAIS, S. **Sobre o Terminal.** Disponível em: <<https://www.rodoviariarecife.com/sobre-o-terminal/>>. Acesso em: 2 ago. 2022.

TWERDOCHLIB, A. L. *et al.* Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 56, n. 2, p.249–256, jun. 2012.

VIDAL, P. O. **Caracterização molecular e morfológica de populações de *Aedes***

aegypti (Diptera: Culicidae) no estado de São Paulo. 2015. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidad de São Paulo, São Paulo, 2015. doi:10.11606/T.42.2016.tde-04032016-083314. Acesso em: 2022-09-29

WALLIS, G. P.; TABACHNICK, W. J.; POWELL, J. R. Macrogeographic genetic variation in a human commensal: *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito. **Genetical Research**, v. 41, n.3, p. 241–258, jun. 1983.

WANG, L. S., XU, Y. (2003) **Haplotype inference by maximum parsimony**. **Bioinformatics** 19: 1773– 1780

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v.85, n. 2, p. 328–345, 1 fev. 2010.

WILDER-SMITH, A. *et al.* Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. e101–e106, 1 mar. 2017.

WILKE, A. B. B. **Controle genético de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. 2008.** Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. doi:10.11606/D.6.2008.tde-24092008-133834. Acesso em: 2022-10-19.

WILKE, A. B. B. ***Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): aspectos da manipulação genética e estudos populacionais utilizando marcadores microssatélites.** 2013. Tese (Doutorado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, University of São Paulo, São Paulo, 2013. doi:10.11606/T.6.2013.tde-17042013-093442. Acesso em: 2022-09-29.

WILKE, A. B. B. *et al.* Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, 5 out. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. **Vector-borne diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em: 27jul. 2022.

XAVIER, M. DO N. et al. Double BR-OVT: a new trap model for collecting eggs and adult mosquitoes from *Culex quinquefasciatus* and *Aedes spp.* **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020.

YOUNG, P. R. Arboviruses: A Family on the Move. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1062, n. 978-981-10-8726-4, p. 1–10, 2018.

ZARA, A. L. D. S. A., (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 25, p. 391-404, 2016.

ZETTEL, C.; KAUFMAN, P. Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta:Diptera: Culicidae). **EDIS**, v. 2009, n. 2, 2 abr. 2000.