



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LEANDRO FERONATO

**ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE DUAS MUTAÇÕES DE  
RESISTÊNCIA À PIRETRÓIDES EM POPULAÇÕES DE  
*Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM  
FLORESTÓPOLIS – PR**

---

Londrina  
2023



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---



**IDR-Paraná**

Instituto de Desenvolvimento  
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



LEADRO FERONATO

**ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE DUAS MUTAÇÕES DE  
RESISTÊNCIA À PIRETRÓIDES EM POPULAÇÕES DE  
*Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM  
FLORESTÓPOLIS – PR**

LEANDRO FERONATO

**ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE DUAS MUTAÇÕES DE  
RESISTÊNCIA À PIRETRÓIDES EM POPULAÇÕES DE  
*Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM  
FLORESTÓPOLIS – PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dra. Renata da Rosa.  
Coorientador: Prof. Dr. João Antonio Cyrino Zequi.

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F367a Feronato, Leandro .  
Análise da ocorrência de duas mutações de resistência à piretróides em populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Florestópolis – PR / Leandro Feronato. - Londrina, 2023.  
41 f. : il.

Orientador: Renata da Rosa.  
Coorientador: João Antonio Cyrino Zequi.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2023.  
Inclui bibliografia.

1. Análise genética de resistência a piretróides para contribuir no monitoramento e controle eficaz do *Aedes aegypti* - Tese. I. da Rosa, Renata. II. Zequi, João Antonio Cyrino. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 575.1

LEANDRO FERONATO

**ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE DUAS MUTAÇÕES DE  
RESISTÊNCIA À PIRETRÓIDES EM POPULAÇÕES DE  
*Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM  
FLORESTÓPOLIS – PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

---

Profa. Dra. Gislayne Lemes Trindade Vilas-Bôas  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2023.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Étore e Hilda por me conceberem, os cuidados necessários em cada etapa de vida com empenho para que eu chegasse até aqui, me mostraram a retidão, a dignidade e a importância de Deus em minha vida assim agradeço a Deus por me guardar e zelar durante minha caminhada.

Aos meus irmãos, Lia e Tito que supriram minha ausência por tantos anos acompanhando e cuidando de nossos pais e dos interesses da família.

Aos meus três filhos, Thiago, Raquel e Sofia por serem estímulos diário do meu avançar.

À Profa. Dra. Renata da Rosa, minha grande incentivadora, compreensiva, serena e distinta orientadora que foi nessa trajetória acadêmica, muito mais que uma direção ou orientação, acreditou que eu pudesse fazer, mostrou com delicadeza aquilo que é importante, dando plena liberdade e ouvidos às minhas inquietudes de pesquisador iniciante. Professora Renata, muito obrigado, não haveria melhor forma nessa condução.

Ao Prof. Dr. João Antonio Cyrino Zequi, meu coorientador, que muito me transmitiu e fez os dias mais barulhentos sempre com “o café nervoso” nos momentos de conversas uteis e as vezes não tão úteis para o trabalho acadêmico, mas sim para a descontração e créditos de laços de amizade e formação.

Aos demais professores da UEL que contribuíram com a construção de conhecimentos importantes ao longo do mestrado, por meio das disciplinas por mim realizadas, possibilitando meu crescimento e aquisição de experiência na área científica e acadêmica.

Ao Professores Doutores Mario Navarro e Angela Palácio, da Universidade Federal do Paraná pelas valiosas contribuições nas bancas de defesa e qualificação respectivamente.

Aos integrantes do Laboratório de Entomologia Médica que me auxiliaram na realização da minha pesquisa, e me deram apoio, conselhos, companheirismo e momentos de risadas e descontração em Especial minha parceira de caminhada Ana Carolina Alves.

Aos técnicos Aparecido Souza, Edson Santana, pelo apoio e ponderações, e por terem me auxiliado nas coletas deste estudo.

A todos os biólogos que adicionaram componentes especiais nessa

preparação acadêmica e pessoal, com a partilha de vosso conhecimento melhorei meu ser enfermeiro na compreensão da vida e meio ambiente, sei mais sobre equilíbrio daqui pra frente.

Às parceiras de laboratório de Biologia molecular e Genética, Jaqueline, Larissa, Thayná, Kátia, mestrandos, doutorandos e pós doutorandos que pegaram em minha mão, muitas vezes, afim de ensinar como se faz, vocês foram incríveis comigo!

À Secretaria Municipal de Saúde de Florestópolis parceiros nessa caminhada que permitiram a realização de coletas necessárias à presente pesquisa, destaco a equipe de vigilância sanitária, epidemiologia, atenção primária e a equipe de ACE's e ACS's.

À Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Genética, por todo o suporte fornecido durante minha trajetória acadêmica.

À todos os munícipes de Florestópolis que acolheram em seus domicílios nossas armadilhas e nos receberam durante esse período semanalmente com gentileza e diálogos rápidos com cordialidade.

Ao sistema de saúde pública brasileiro que eu tanto aprecio e desejo francamente continuar fazendo parte e construindo melhorias para todos seus trabalhadores, gestores e usuários.

A todos vocês, MUITÍSSIMO Obrigado!

FERONATO, Leandro. **Análise da ocorrência de duas mutações de resistência à piretróides em populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Florestópolis – PR Brasil.** 2023. 41 f. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre, Londrina, 2023.

## RESUMO

A dengue é uma doença viral transmitida pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti*. O vetor está presente nos continentes equatoriais povoados, de modo que a dengue acomete anualmente milhões de pessoas ao redor do mundo. Os países de clima tropical, são os mais castigados pelas dengue, assim como para as demais arboviroses, podendo a doença ser um agravo de sintomas leves e moderados, acarretando sequelas sérias que podem levar a morte e consequentemente expressivo gasto com a saúde pública. Em 2022 foram registrados mais de 1.450.270 casos de dengue no Brasil, uma taxa de incidência de 679,9 casos por 100 mil hab., 1.016 óbitos, desses, 109 no estado do Paraná. 3ª UF em maior número de óbitos. Uma das medidas de controle do mosquito é a aplicação de inseticidas piretróides. Entretanto, esses inseticidas, quando utilizados de forma descontrolada, podem selecionar populações resistentes, que apresentam mutações nos genes que codificam os canais de sódio voltagem dependentes ( $Na_v$ ). Dessa forma, com o objetivo de avaliar a ocorrência e distribuição de duas dessas mutações (Val1016Ile e Phe1534Cys) neste trabalho, foi escolhido como área de estudo o município de Florestópolis/PR, por apresentar um histórico importante de casos de dengue. Foi possível observar uma elevada frequência de genótipos heterozigotos para a mutação Val1016Ile e homozigotos recessivos para Phe1534Cys nos três trimestres analisados. Os resultados demonstram que as populações de *Ae. aegypti* coletadas em Florestópolis já apresentavam alelos que conferem resistência, demonstrando que a aplicação de inseticida piretróides pode não apresentar o resultado esperado, sendo necessário formas alternativas de controle do vetor.

**Palavras-chave:** Inseticida; Monitoramento; Mosquito; Seleção.

FERONATO, Leandro. **Analysis of the occurrence of two mutations of resistance to pyrethroids in populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) in Florestópolis - PR Brazil**. 2023. 41 p. Dissertation presented to the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, at the State University of Londrina as a requirement for obtaining the Master's degree, Londrina, 2023.

## ABSTRACT

Dengue is a viral disease transmitted by the female *Aedes aegypti* mosquito. The vector is present in populated equatorial continents, so that dengue annually affects millions of people around the world. Countries with a tropical climate are the most punished by dengue, as well as other arboviruses, and the disease can be an aggravation of mild and moderate symptoms, causing serious sequelae that can lead to death and, consequently, significant expenditure on public health. In 2022, more than 1,450,270 cases of dengue were registered in Brazil, an incidence rate of 679.9 cases per 100,000 inhab., 1,016 deaths, of which 109 in the state of Paraná. 3rd UF in the highest number of deaths. One of the mosquito control measures is the application of pyrethroid insecticides. However, these insecticides, when used in an uncontrolled manner, can select resistant populations, which present mutations in the genes that encode voltage-gated sodium channels (Nav). Thus, with the aim of evaluating the occurrence and distribution of two of these mutations (Val1016Ile and Phe1534Cys) in this work, the municipality of Florestópolis/PR was chosen as the study area, as it has an important history of dengue cases. It was possible to observe a high frequency of heterozygous genotypes for the Val1016Ile mutation and recessive homozygotes for Phe1534Cys in the three quarters analyzed. The results demonstrate that the populations of *Ae. aegypti* collected in Florestópolis already had alleles that confer resistance, demonstrating that the application of pyrethroid insecticide may not present the expected result, requiring alternative forms of vector control.

**Key-words:** Insecticide; Monitoring; Mosquito; Selection.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Curva epidêmica de casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas. Brasil, 2019 a 2022 Fonte: MS.....	18
<b>Figura 2</b> - Distribuição da taxa de incidência de dengue por região do Brasil, SE 1-52/2022. Fonte: MS.....	19
<b>Figura 3</b> - Divisão do estado do Paraná em macrorregiões e regiões administrativas de Saúde.....	26
<b>Figura 4</b> - 17 <sup>a</sup> Regional de Saúde do estado do Paraná e seus 21 municípios.....	27
<b>Figura 5</b> - Sede urbana de Florestópolis .....	28
<b>Figura 6</b> - Armadilha do tipo ovitrampa para captura de ovos de <i>Aedes</i> . .....	29
<b>Figura 7</b> - Armadilha do tipo ovitrampa para captura de ovos de <i>Aedes</i> com base de concreto adaptado.....	30
<b>Figura 8</b> - Marcação dos pontos de coleta distribuídos no município .....	30
<b>Figura 9</b> - <b>a.</b> identificação da divisão das quatro áreas de Florestópolis. <b>b.</b> Denominação e numeração das armadilhas correlatas .....	32
<b>Figura 10</b> - <b>a.</b> Transporte individualizado para a UEL; <b>b.</b> Recipientes com palhetas para eclosão; <b>c.</b> Recipiente utilizado para a fase adulta; <b>d.</b> Estocagem e manutenção em -80°C .....	33
<b>Figura 11</b> - Mapa do Paraná evidenciando o município de Florestópolis. Em destaque a distribuição das frequências alélicas por região do município de Florestópolis. Os gráficos representam as mutações Val1016Ile (vermelho e azul) e Phe1534Cys (verde e roxo). Observe a predominância de alelos mutantes em todas as regiões do município .....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Localização georreferenciada das armadilhas .....	32
<b>Tabela 2 -</b>	Frequências genotípicas e alélicas para a mutação Val1016Ile durante o primeiro, segundo e terceiro trimestres de coletas. *Equilíbrio de Hardy-Weinberg: teste do Chi-quadrado com grau de liberdade 1 .....	35
<b>Tabela 3 -</b>	Frequências genotípicas e alélicas para a mutação Phe1534Cys durante o primeiro, segundo e terceiro trimestres de coletas. *Equilíbrio de Hardy-Weinberg: teste do Chi-quadrado com grau de liberdade 1 .....	36

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1	Dengue e o vetor <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	12
2.2	Controle de <i>Aedes aegypti</i> .....	15
2.3	<i>Mutações Knockdown resistance (kdr)</i> .....	16
3.	OBJETIVOS.....	18
3.1	Objetivo geral .....	18
3.2	Objetivos específicos .....	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	19
4.1	Características organizacionais de saúde do Paraná.....	19
4.2	Monitoramento por armadilhas.....	21
4.3	Adequação das armadilhas.....	22
4.4	Locais de coleta .....	23
4.5	Monitoramento genético.....	25
5.	CAPÍTULO 1 - "ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE DUAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA À PIRETRÓIDES EM POPULAÇÕES DE <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (LINNAEUS, 1762) EM FLORESTÓPOLIS – PR (BRASIL)" .....	28
	Resumo .....	29
	Introdução.....	30
	Material e métodos.....	31
	Resultados e discussão .....	32
	Agradecimentos .....	38
	Referências .....	38
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

## 1 1. INTRODUÇÃO

2           As arboviroses são doenças virais causadas pelos arbovírus (*ARthropod-*  
3 *BOrne virus*), assim denominados devido parte de seu ciclo de replicação ocorrer nos  
4 insetos, além de serem veiculados a partir de artrópodes hematófagos durante o  
5 repasto sanguíneo (Lopes et al., 2014). A dengue é uma arbovirose pandêmica. O  
6 vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus* e a família Flaviviridae,  
7 apresenta quatro sorotipos distintos, sendo eles DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-  
8 4. A infecção causada pelo vírus da dengue pode ser assintomática, leve ou grave,  
9 podendo ainda tornar-se letal (Ministério da Saúde, 2018).

10           O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito culicídeo de grande  
11 importância epidemiológica. Oriundo do Velho Mundo, atualmente está distribuído em  
12 zonas tropicais e subtropicais, e é o principal vetor da febre amarela na área urbana,  
13 além dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV) e outros vírus, como Zika (ZIKV)  
14 e Chikungunya (CKG). A circulação desses vírus é dependente de muitos aspectos  
15 que extrapolam o setor da saúde pública e parâmetros sociais, e sua incidência está  
16 diretamente ligada a estratégias de controle e manutenção das populações do  
17 mosquito vetor. Condições climáticas e ambientais, assim como as estruturas das  
18 regiões urbanas também favorecem o aumento do número de criadouros disponíveis  
19 para o desenvolvimento desse vetor (Ribeiro et al, 2006).

20           Florestópolis é um município do norte do estado do Paraná com maior  
21 significância epidemiológica regional para dengue nos últimos anos, tendo uma vítima  
22 fatal em 2019 e outras duas em 2020, Florestópolis está localizada ao norte na 17ªRS  
23 - Londrina, a 457 km da capital, uma área territorial de 246,331 km<sup>2</sup>, possui 11.222  
24 habitantes, uma densidade demográfica de 45,56 hab/km<sup>2</sup> e IDHM 0,701 (IBGE,  
25 2020). O clima de Florestópolis, segundo a classificação de Köppen, é do tipo clima  
26 subtropical úmido, com chuvas em todas as estações, podendo ocorrer secas no  
27 período de inverno, favorecendo a proliferação do mosquito *Ae. aegypti*.

28           Muitos estudos demonstram a ocorrência de mutações que levam à  
29 resistência a inseticidas piretróides, reduzindo o efeitos destes no controle dos  
30 mosquitos. Essas mutações ocorrem em proteínas transmembrana do canal de sódio  
31 voltagem-dependente (Nav) que reduzem a ligação aos piretróides são conhecidas  
32 como “*knockdown resistance*” (*kdr*). O termo refere-se a perda imediata da  
33 coordenação dos insetos causada por exposição aos inseticidas e a recuperação  
34 após o efeito dos mesmos (Saavedra-Rodriguez et al., 2007).

35 As análises genéticas dessas mutações podem fornecer informações para  
36 que, em conjunto com demais ações possam controlar a ocorrência de vetores e  
37 conseqüentemente das viroses transmitidas por eles. Diante disso, estudar a  
38 ocorrência e distribuição dessas mutações em populações de *Ae. aegypti* é de  
39 extrema importância, principalmente em municípios com alta incidência da doença,  
40 para que medidas alternativas de controle do vetor sejam utilizadas.

41

## 42 2. Revisão de Literatura

### 43 2.1. Dengue e o vetor *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

44 As arboviroses são doenças virais causadas pelos arbovírus (*ARthropod-*  
45 *BOrne virus*), assim denominados devido parte de seu ciclo de replicação ocorrer nos  
46 insetos, além de serem veiculados a partir de artrópodes hematófagos durante o  
47 repasto sanguíneo (Lopes et al., 2014). A dengue é uma arbovirose pandêmica. O  
48 vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus* e a família Flaviviridae,  
49 apresenta quatro sorotipos distintos, sendo eles DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-  
50 4. A infecção causada pelo vírus da dengue pode ser assintomática, leve ou grave,  
51 podendo ainda tornar-se letal (Ministério da Saúde, 2018).

52 O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito culicídeo de grande  
53 importância epidemiológica. Oriundo do Velho Mundo, atualmente está distribuído em  
54 zonas tropicais e subtropicais, e é o principal vetor da febre amarela na área urbana,  
55 além dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV) e outros vírus, como Zika (ZIKV)  
56 e Chikungunya (CKG). A circulação desses vírus é dependente de muitos aspectos  
57 que extrapolam o setor da saúde pública e parâmetros sociais, e sua incidência está  
58 diretamente ligada a estratégias de controle e manutenção das populações do  
59 mosquito vetor. Condições climáticas e ambientais, assim como as estruturas das  
60 regiões urbanas também favorecem o aumento do número de criadouros disponíveis  
61 para o desenvolvimento desse vetor (Ribeiro et al, 2006).

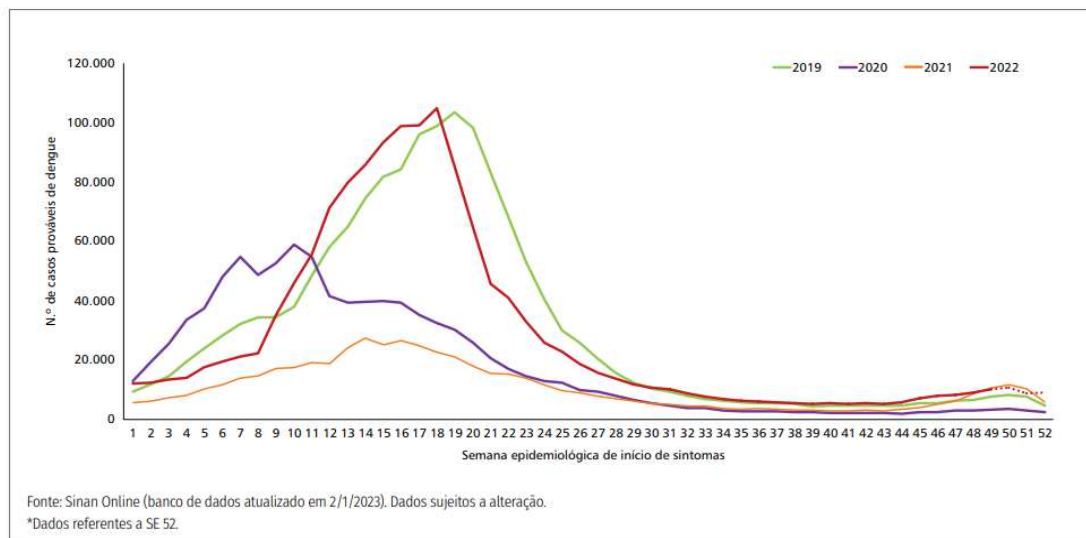
62 Nas últimas décadas, a incidência global de dengue cresceu rapidamente  
63 no mundo, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sobretudo  
64 em áreas urbanas e semiurbanas, sendo veiculada principalmente pelo *Ae. aegypti*, e  
65 secundariamente pelo *Ae. albopictus* em regiões da Ásia e Europa (WHO, 2020a;  
66 ECDC, 2021). Estima-se que haja de 100 a 400 milhões de infecções por ano, em  
67 mais de 100 países endêmicos, deixando cerca de metade da população mundial em  
68 risco de infecção (WHO, 2020a).

69 Mundialmente em 2016 houve um grande surto de dengue, em 2017 uma  
70 diminuição e 2018 manutenção na incidência de número de casos, em 2019  
71 novamente um aumento acentuado de casos nas regiões da África, Américas e  
72 Pacífico Ocidental, sendo o ano com maior número de casos globalmente (WHO,  
73 2020a). Em 2020 sustentadas as ocorrências de dengue em vários países, com  
74 registros de aumento de casos, inclusive no Brasil (WHO, 2020a; MS, 2021).

75 Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil registrou 1.544.987 casos  
76 prováveis de dengue em 2019, representando um aumento de 488% em relação ao  
77 ano anterior. Desse total, foram confirmados 1.419 casos de dengue grave e 782  
78 óbitos (MS, 2020). Em 2020 o total de casos prováveis foi de 987.173, sendo que  
79 89,8% desses casos ocorreu somente no período de janeiro a junho, o Paraná foi um  
80 dos estados que mais se destacou em número de casos, com mais de 250 mil  
81 registros. Também foram registrados 554 óbitos, nos estados do sul, a maior  
82 concentração foi no Paraná (187) (MS, 2021a).

83 O ano de 2021 também iniciou com elevados casos de dengue, porém com  
84 redução de 51,8 % em relação ao mesmo período do ano anterior (janeiro a julho),  
85 sendo registrados 440.012 casos prováveis e 154 óbitos nesse período em 2021. No  
86 entanto, ressalta-se que desde fevereiro de 2020, o Brasil enfrenta uma pandemia da  
87 COVID-19 e isso pode estar ocasionando uma possível subnotificação justificada  
88 pelas orientações de isolamento social e preferencialmente procurar serviços de  
89 saúde em casos de sintomas respiratórios ocorrendo em menor procura da população  
90 por atendimento em unidades de saúde, a ainda as restrições mas atividades dos  
91 agentes de endemias e agentes de saúde da atenção primária aos domiciliados  
92 ocasionando atraso nas notificações das arboviroses (MS, 2021b).

93 De acordo com (Figura 1) o boletim 36 epidemiológico (SVS/MS, setembro,  
94 2022) aponta notificação de 1.346.636 casos prováveis de dengue no país, estando a  
95 região Sul, alvo desta proposta, com uma incidência de 631,3 casos/ mil habitantes  
96 no Brasil. Em comparação com o ano de 2019, houve uma redução de 7,8% de casos  
97 registrados para o mesmo período, quando comparado com o ano de 2021 ocorreu  
98 um aumento de 186,8% casos até a respectiva semana.



99

100

**Fig. 1.** Curva epidêmica de casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas. Brasil, 2019 a 2022 **Fonte:** MS

101

102

103

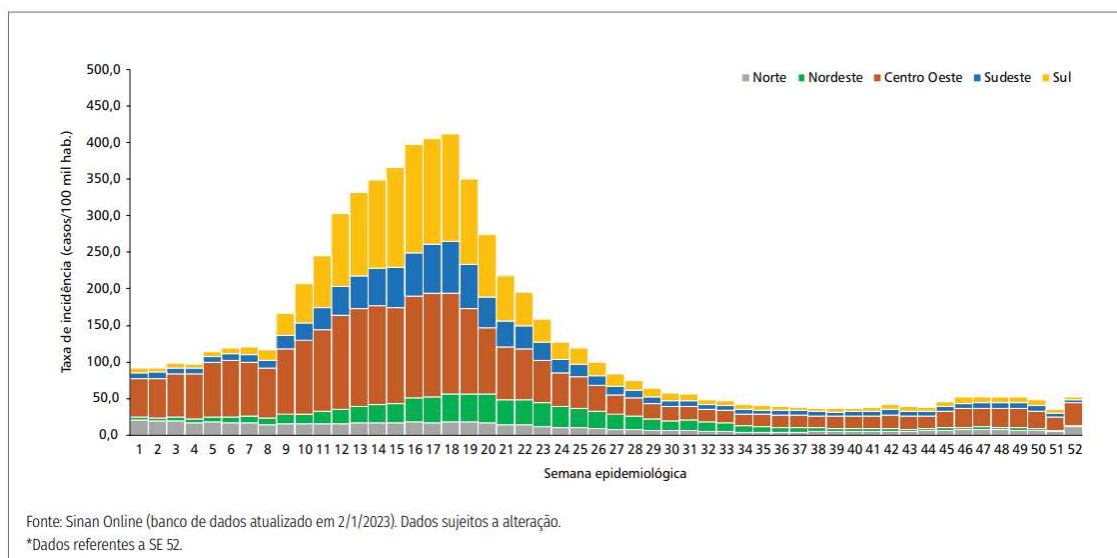
104

Para o ano de 2022, a Região Centro-Oeste destacada na Figura 2. Abaixo, apresentou a maior taxa de incidência de dengue também até a S.E. 36, com 1.885,2 casos/100 mil hab., seguida das Regiões: Sul (1.021,0 casos/100 mil hab.), Sudeste (495,9 casos/100 mil hab.), Nordeste (405,1 casos/100 mil hab.) e Norte (228,5 casos/100 mil hab).

106

107

108



109

110

**Fig. 2.** Distribuição da taxa de incidência de dengue por região do Brasil, SE 1-52/2022. **Fonte:** MS

111

112

113

114

## 115 **2.2 Controle de *Aedes aegypti***

116 O ministério da Saúde organizou em 2002 e o país adota a partir daí a  
117 proposta no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que é a base para o  
118 monitoramento e controle do vetor e demais ações junto a pacientes e as arboviroses.  
119 O Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA) permite verificar a  
120 infestação vetorial, a partir de coletas de larvas de *Aedes* e cálculos de índices  
121 larvários: Índice Predial (IP) e Índice de Breteau (IB), possibilitando levantar o  
122 percentual de edifícios com presença de larvas, e de recipientes com larvas para cada  
123 100 imóveis inspecionados, além de obter informações acerca dos tipos de recipientes  
124 usados como criadouros para as larvas (MS, 2013).

125 Apesar de contribuir no monitoramento do vetor, duas fragilidades são  
126 expressivas nos dados do LIRAA, uma delas é a aleatoriedade dos imóveis  
127 selecionados da amostra, pois os mais críticos e conhecidos da equipe de endemias  
128 municipal podem não fazer parte dos imóveis eleitos para o levantamento naquele  
129 ciclo e a outra é a periodicidade de cada levantamento, se forem realizados os seis  
130 levantamentos no ano em questão. Porém, a normativa do MS aos municípios exige  
131 apenas que quatro deles tenham alcançado 80% dos imóveis sorteados para busca  
132 de criadouros, sendo os dois últimos justamente no período do verão, sendo assim e  
133 de praxes as unidades municipais acabam priorizando os quatro primeiros  
134 levantamentos pois havendo maior infestação e necessidade de outras ações de  
135 controle (Ex.: Bloqueios e busca ativa de casos suspeitos) o município não deixe de  
136 apresentar no mínimo quatro dos seis definidos pelo MS.

137 O Brasil utilizou até dezembro de 2019 para controle o Piriproxifen  
138 (larvicida) e o Malathion (adulticida) que em janeiro de 2020 foram substituídos por  
139 larvicida contendo *Saccharopolyspora spinosa* e adulticida com neonicotinóide e  
140 piretróide pois a Nota Informativa Nº 103/2019-CGAR/DEIDT/SVS/MS (2019)  
141 divulgou ocorrência de resistência de *Aedes* a piretróides e malathion, bem como para  
142 o piriproxifen no nordeste do país. Houve recomendação e substituição, produtos não  
143 seletivos, que pode selecionar resistentes a curto e médio prazo. No município de  
144 Londrina (PR), por exemplo, estudos apontam para uma elevada ocorrência de  
145 mutações envolvidas com a resistência a piretróides. Lopes et al. (2021) analisaram  
146 onze populações de *Ae. aegypti* coletados em todas as regiões do município de  
147 Londrina e verificaram uma alta frequência de alelos mutantes para as mutações  
148 Val1016Ile e Phe1534Cys, conferindo resistência a inseticidas.

149

### 150 **2.3 Mutações *Knockdown resistance* (*kdr*)**

151 A resistência a inseticidas é um mecanismo genético, onde ocorre a  
152 seleção de indivíduos por meio da pressão ocasionada por compostos químicos.  
153 Para que haja resistência é necessário o aumento na frequência dos alelos  
154 selecionados na população e conseqüente formação de populações altamente  
155 resistentes. Dentre os inseticidas mais utilizados, os piretróides são os que  
156 apresentam maior uso descontrolado, comumente utilizados pela população em geral  
157 com o objetivo de eliminar mosquitos adultos, sendo facilmente adquiridos em  
158 supermercados. (Viana-Medeiros et al., 2011).

159 O alvo desses inseticidas são proteínas transmembrana do canal de sódio  
160 voltagem-dependente ( $Na_v$ ). Esses produtos agem deixando os canais na  
161 conformação aberta, ocasionando a propagação contínua do impulso nervoso e a  
162 conseqüente morte do inseto (Braga & Valle, 2007). As mutações ocorridas em  $Na_v$   
163 são conhecidas como "*knockdown resistance*" (*kdr*). Essas mutações reduzem a  
164 ligação dos piretróides, levando a perda imediata da coordenação dos insetos  
165 causada por exposição aos inseticidas e a recuperação após o efeito dos mesmos  
166 (Saavedra-Rodriguez et al., 2007). A mutação *kdr* é considerada um importante  
167 mecanismo de resistência, reduzindo de 10 a 20 vezes a sensibilidade dos sítios-  
168 alvos a piretróides (Vais et al., 2000; Davies et al., 2008). Os genes associados ao  
169 fenótipo *kdr*, apresentam-se de forma recessiva, ou seja, a detecção desse  
170 mecanismo de resistência só é possível em condição de homozigose (Davies et al.,  
171 2008; Lopes et al., 2021).

172 Diversas mutações *kdr* já foram identificadas em *Ae. aegypti*, sendo duas  
173 delas nas posições 1016 e 1534 no segmento 6 dos domínios II e III do  $Na_v$ ,  
174 respectivamente (Rinkevich et al., 2013; Dong et al., 2014). Na posição 1016 ocorre  
175 uma transição A/G na primeira base do códon, o que resulta na troca de uma Valina  
176 por uma Isoleucina (Val1016Ile) (Saavedra-Rodriguez et al., 2007). Já na posição  
177 1534 a mutação leva à substituição de uma fenilalanina por uma cisteína  
178 (Phe1534Cys) (Martins et al., 2009; Linss et al., 2014).

179 No norte do estado do Paraná, estudos relacionados à essas mutações foram  
180 realizados no município de Londrina. Lopes et al. (2021), avaliaram a distribuição das  
181 duas mutações acima citadas e verificaram uma frequência de 50% para a mutação  
182 Val1016Ile e 48% para Phe1534Cys. Os autores relacionaram a forte presença dos

183 alelos de resistência na cidade com o uso doméstico dos piretróides e chamaram a  
184 atenção para ações alternativas de controle dos mosquitos.

185 Os monitoramentos de infestação são extremamente importantes para criar  
186 estratégias de controle do vetor e conscientização da população. O *Aedes aegypti*  
187 está adaptado estritamente ao ambiente urbano e é capaz de manter-se em diferentes  
188 condições ambientais, o que torna o controle do vetor bastante desafiador. Dessa  
189 forma, estudos sobre a vigilância entomológica aliado a estudos de variabilidade  
190 genética e resistência a inseticidas em populações de *Aedes aegypti* de diferentes  
191 localidades é importante para tomada de decisões para o eficaz controle do vetor,  
192 principalmente em municípios, como Florestópolis, que apresentam uma alta  
193 ocorrência de dengue registrada em anos consecutivos.

194

195

196 **3. OBJETIVOS**

197

198 **3.1 Objetivo geral**

199 Este estudo tem por objetivo geral o monitoramento genético de duas mutações  
200 em genes de canais de sódio voltagem dependentes (Val1016Ile e Phe1534Cys)  
201 relacionadas à resistência à piretróides no município de Florestópolis (Paraná).

202

203 **3.2 Objetivos específicos**

204 - Verificar alterações na frequência das mutações Val1016Ile e Phe1534Cys do gene  
205 associado a resistência *Knockdown* (kdr) como possível mecanismo associado a  
206 resistência a inseticidas;

207 - Avaliar se houveram alterações das frequência alélicas após a utilização de inseticida  
208 aplicado por UBV no município.

209

210

211

## 212 4. Material e métodos

213

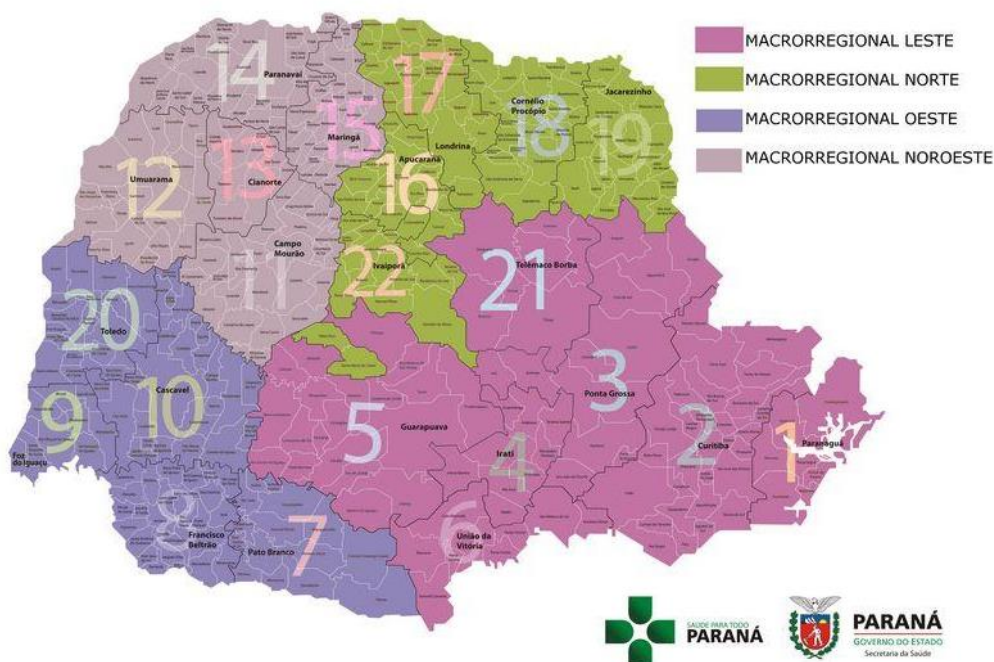
### 214 4.1 Características organizacionais de saúde do Paraná

215 A organização administrativa da gestão da saúde no Paraná, o estado do  
 216 Sul do Brasil é dividido em macrorregiões, a 17ª Regional de Saúde com sede em  
 217 Londrina compõe a Macrorregião Norte, em verde destacada na Figura 3, constituída  
 218 pelas regionais: 16ª Apucarana; 17ª Londrina; 18ª Cornélio Procópio; 19ª Jacarezinho;  
 219 22ª Ivaiporã.

220

221

Mapa Político do Estado do Paraná · Divisão por Macrorregionais



222

223 **Fig. 3.** Divisão do estado do Paraná em macrorregiões e regiões administrativas de Saúde. **Fonte:** SESA/PR

224

225 Alvorada do Sul, Assaí, Bela Vista do Paraíso, Cafeara, Cambé, Centenário  
 226 do Sul, Florestópolis, Guaraci, Ibiporã, Jaguapitã, Jataizinho, Londrina, Lupionópolis,  
 227 Miraselva, Pitangueiras, Porecatu, Prado Ferreira, Primeiro de Maio, Rolândia,  
 228 Sertanópolis e Tamarana são as unidades municipais pertencentes a 17ªRS  
 229 /Londrina, como também demonstrado na (Figura 4.) abaixo.



230

231 **Fig. 4.** 17ª Regional de Saúde do estado do Paraná e seus 21 municípios. **Fonte:** SESA

232

233 Florestópolis o berço da pastoral da criança, possui maior significância  
 234 epidemiológica regional para dengue nos últimos anos, sendo essa a razão da escolha  
 235 do município para o estudo, somando uma vítima fatal por dengue em 2019 e outras  
 236 duas em 2020, Florestópolis está localizada ao norte na 17ªRS - Londrina, a 457 km  
 237 da capital, possui uma área territorial de 246,331 km<sup>2</sup>, possui 11.222 habitantes, uma  
 238 densidade demográfica de 45,56 hab/km<sup>2</sup> e IDHM 0,701 (IBGE, 2020). O clima de  
 239 Florestópolis, segundo a classificação de Köppen, é do tipo clima subtropical úmido,  
 240 com chuvas em todas as estações, podendo ocorrer secas no período de inverno. Sua  
 241 sede municipal (Figura 5.) é concêntrica sem bairros isolados, rios, lagos ou vales  
 242 verdes, topograficamente é uma sede levemente culminada na região central com  
 243 seus bairros sequenciados em pouco alicive topográfico, recebe uma rodovia estadual  
 244 em sua marginal leste.



Fig. 5. Sede urbana de Florestópolis Fonte: Satélite

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

#### 4.2 Monitoramento por armadilhas

255

256

257

258

259

260

261

262

263

O município ocupa a 207<sup>a</sup> posição de 399 municípios do estado de sua população com renda média de 2,0 salários-mínimos. Com 97,2% de escolarização populacional de 6 a 14 anos, apresenta 75,4% com esgotamento sanitário adequado. O conjunto de características de Florestópolis faz da cidade um ambiente propício para o ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.

Estudos de monitoramento de vetores vêm apresentando eficiência e sensibilidade de uma armadilha para captura de ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* na determinação de índices de infestação dos vetores, sendo superior à pesquisa larval (Regis et al., 2008; Nota técnica n.º 3/2014/IOC-FIOCRUZ/Diretoria, 2014; Depoli et al., 2016; Nascimento et al., 2020; Rossi Da Silva et al., 2021). Essa ferramenta foi desenvolvida em 1965, por Fay e Perry, sendo denominada de ovitrampa.

Uma armadilha, adaptada pelo Laboratório de Entomologia Médica da UEL, para captura de ovos e adultos de *Aedes* spp. foi implantada em diferentes pontos do município para gerar dados seguros de infestação em Florestópolis.

264 A exposição das armadilhas de oviposição em campo para os estudos  
265 moleculares, foi limitada em cinco dias. Foi utilizado como atração levedo de cerveja  
266 em uma concentração de 0,11g/l. O tempo de exposição teve como objetivo não  
267 oportunizar a eclosão de larvas/adultos e fazer uma avaliação temporal da infestação  
268 local de forma mensal e comparável também com outras regiões já trabalhadas pela  
269 equipe do projeto.

270 As armadilhas inicialmente foram instaladas em pontos estratégicos  
271 respeitando os critérios: (1) distância média de 200 m. entre elas; (2) Prioridade às  
272 repartições públicas (ex.: UAPS, Escolas, Centros Sociais, Ginásios esportivos,  
273 Igrejas e etc.). (3) Grandes corporações onde circulam muitas pessoas diariamente.  
274 (4) Residências domiciliares as quais seus responsáveis aceitassem receber o  
275 dispositivo, assim como zelar por ela, desta forma dando cobertura a toda sede urbana  
276 monitorada pelas armadilhas de ovoposição. Os procedimentos com armadilhas foram  
277 integrados as ações e diretrizes contidas na Deliberação número 04 de 25/01/2019 da  
278 Comissão Intergestora Bipartite (CIB) do Paraná, SESA e COSEMS/PR.

279 As ovitrampas adaptadas na UEL (Figura 6) consistem em potes de plástico  
280 de coloração preta, contendo uma palheta de madeira (Duratree) com um lado áspero.  
281 No interior podem ser adicionadas soluções atrativas para as fêmeas de *Aedes*.



282

283 **Fig. 6.** Armadilha do tipo ovitrampa para captura de ovos de *Aedes*. **Fonte:** o próprio autor.

284

### 285 **4.3 Adequação das armadilhas**

286 Foi necessário a projeção e construção de uma base concretada (Figura 7)  
287 para servir de base para suportar a ovitrampas para fixação no local definido assim  
288 como dificultar que fossem derramadas ou levadas indevidamente por pessoas ou  
289 animais, então optamos por concreto moldado e ressequido previamente às

290 instalações em seus devidos locais estabelecidos.



291

292 **Fig. 7.** Armadilha do tipo ovitrampa para captura de ovos de *Aedes* com base de concreto adaptado.

293 **Fonte:** os autores.

294

#### 295 **4.4 Locais de coleta**

296 Para a execução do estudo as autorizações da Prefeitura Municipal de  
297 Florestópolis e da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA) foram aprovadas  
298 pelos respectivos órgãos respectivamente após análise.

299 Os exemplares de ovos de *Aedes aegypti* foram coletados em 31 diferentes  
300 pontos do município de Florestópolis (PR) como pode ser observado na Figura 8.

301 Em primeira visita ao município foi realizado reconhecimento da área,  
302 hidrografia, características populacionais e de ocupação urbana assim como áreas de  
303 maior ou menor vulnerabilidade considerando características prediais, saneamento e  
304 densidade populacional. Em um segundo momento, após reuniões com os gestores  
305 municipais e equipe municipal de saúde e Vigilância Sanitária, definimos os pontos  
306 públicos e outros importantes a receberem as armadilhas de ovoposição.



307

308

**Fig. 8.** Marcação dos pontos de coleta distribuídos no município

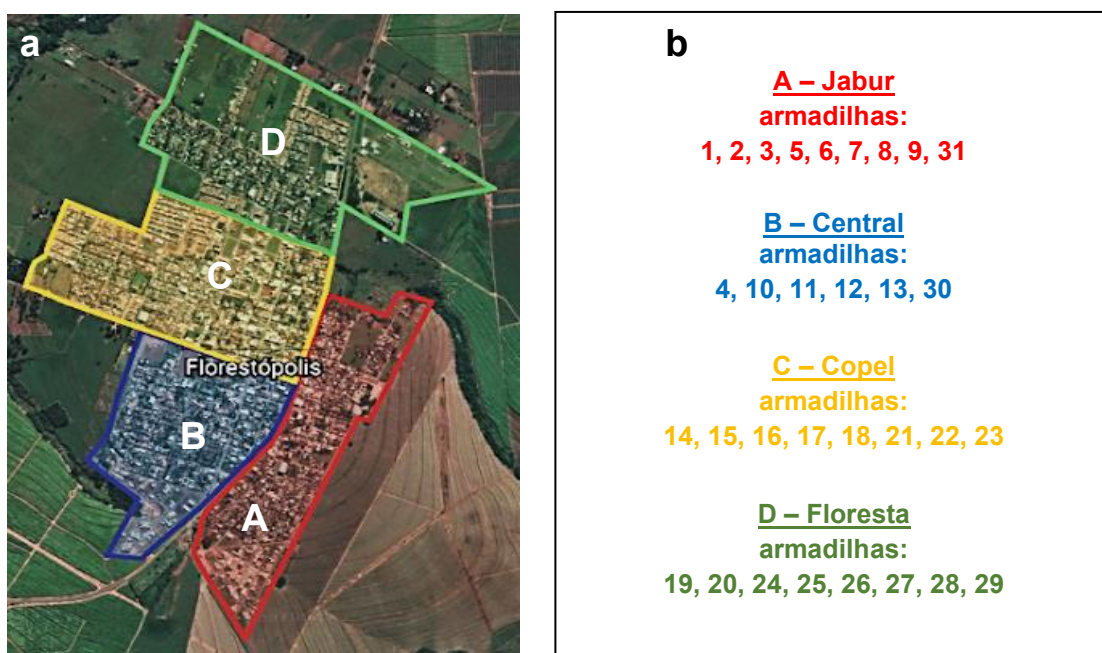
309  
310**Tabela 1.** Localização georreferenciada das armadilhas

<b>Armadilhas Georreferenciadas</b>		
Armadilha	Longitude	Latitude
1	-51,39131667	-22,87753333
2	-51,39163333	-22,87431667
3	-51,39351667	-22,87436667
4	-51,3963	-22,87488333
5	-51,38871667	-22,87328333
6	-51,3898	-22,87135
7	-51,38838333	-22,86771667
8	-51,38578333	-22,8682
9	-51,38673333	-22,86401667
10	-51,39711667	-22,87051667
11	-51,39275	-22,87216667
12	-51,39318333	-22,86953333
13	-51,39501667	-22,86825
14	-51,3956667	-22,86425
15	-51,39136667	-22,86615
16	-51,38855	-22,86455
17	-51,39176667	-22,86393333
18	-51,39266667	-22,8617
19	-51,3879	-22,8617
20	-51,39145	-22,85956667
21	-51,39758333	-22,86235
22	-51,39901667	-22,85918333
23	-51,39573333	-22,861
24	-51,39455	-22,8546
25	-51,3918	-22,85623333
26	-51,38735	-22,85703333
27	-51,3906	-22,85255
28	-51,3887	-22,85388333
29	-51,38608333	-22,85793333
30	-51,39033333	-22,86861667
31	-51,38818333	-22,87111667

311

312

313 Após definido cada ponto de instalação de armadilhas, seguimos com  
 314 reuniões da equipe de pesquisadores do Lacem/UEL foi realizado um zoneado,  
 315 conforme a Figura 9. em todo o território urbano considerando: os preceitos da  
 316 biologia molecular e genética entomológica, a ecologia dos mosquitos e as  
 317 características territoriais da sede municipal de Florestópolis, ficando zoneada então  
 318 em quatro distintas áreas, cada uma delas referenciadas por uma UAPS.  
 319



320 Fig. 9 – a. identificação da divisão das quatro áreas de Florestópolis. b. Denominação e  
 321 numeração das armadilhas correlatas.  
 322  
 323

#### 324 4.5 Monitoramento genético

325 A resistência a piretroides é uma realidade em *Ae. aegypti* (WHO, 2018)  
 326 devido a mutações em proteínas do canal sódio voltagem-dependente (Nav) que  
 327 produzem o efeito chamado *knockdown resistance (kdr)*. Diversas mutações nos  
 328 genes *kdr* em Nav foram observadas em várias populações de *Ae. aegypti*, e com a  
 329 maioria codificando para alto grau de resistência ao piretroide (Saavedra et al, 2018;  
 330 Lima et al. 2011; Linss et al. 2014). Por esse motivo, foram realizadas, com  
 331 periodicidade trimestral, análises da ocorrência e distribuição de mutações  
 332 relacionadas a resistência a inseticidas piretróides, e temos o primeiro e segundo e o  
 333 terceiro trimestre. As coletas do primeiro trimestre foram realizadas antes da aplicação  
 334 de aduldica pela UBV (Ultra Baixo Volume). As coletas do segundo e terceiro

335 trimestres foram realizadas após a aplicação do inseticida por UVB.

336 Os ovos coletados nas armadilhas foram levados ao laboratório para o  
 337 processo de eclosão dos ovos (Figura 10). Para identificação dos exemplares foram  
 338 utilizadas as chaves dicotômicas de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) e Forattini  
 339 (2002) com auxílio de microscópio óptico Olympus CH30LF100. As amostras foram  
 340 congeladas em nitrogênio líquido em temperatura média de  $-200^{\circ}\text{C}$  e mantido  
 341 posteriormente em temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração.

342



343

344 **Fig. 10.** a. Transporte individualizado para a UEL; b. Recipientes com palhetas para eclosão; c.  
 345 Recipiente utilizado para a fase adulta; d. Estocagem e manutenção em  $-80^{\circ}\text{C}$ .

346

347 A extração do DNA total fora realizada de acordo com Lopes (2019). A  
 348 quantificação do DNA obtido foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop®. As  
 349 amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores.

350 As reações de PCR alelo-específica para as mutações Val1016Ile e  
 351 Phe1534Cys foram realizadas conforme Saavedra Rodriguez et al. (2007) e Martins  
 352 et al. (2009), utilizando os *primers forwards* 1016Val 5'-GCG GGC AGG GCG GCG  
 353 GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC CAC CCG CAC CGG-3', 1016Ile 5'-GCG  
 354 GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A-3' e um *primer reverse* comum para  
 355 ambos 5'-GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA AAG C-3'. Para a mutação  
 356 Phe1534Cys foram utilizados os *primers reverse* comum para ambos alelos 5'-TCT  
 357 GCT CGT TGA AGT TGT CGA T-3', dois *primers forward* alelo-específicos 1534Phe+

358 5'-GCG GGC TCT ACT TTG TGT TCT TCA TCA TAT T-3' e 1534Cyskdr 5'-GCG GGC  
359 AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCT CTA CTT TGT GTT CTT CAT CAT GTG-3' de  
360 acordo com Harris et al. (2010).

361 Para verificação alelos amplificados foi preparado um gel de agarose a  
362 2,5%, contendo 8 $\mu$ L de amostra de PCR, 5  $\mu$ L do marcador e 2  $\mu$ L do corante SYBR®  
363 Safe. Após a eletroforese, o gel foi submetido ao transiluminador para visualização de  
364 bandas formadas. A partir do padrão de bandas, para cada uma das populações foram  
365 calculadas as frequências genotípicas e alélicas.

366

367

368

369

370

371

## CAPÍTULO 1

372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405

**Análise de duas mutações de resistência à piretróides em populações de  
*Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Florestópolis – PR Brasil.**

Este artigo será submetido a Revista Brasileira de Entomologia

406 **Análise da ocorrência duas mutações de resistência à piretróides em**  
407 **populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em Florestópolis –**  
408 **PR Brasil.**

409 Leandro Feronato<sup>1</sup>; Larissa Forim Pezenti<sup>2</sup>; Ana C F Alves<sup>2</sup>; Jaqueline Fernanda  
410 Dionisio<sup>1</sup>; João Antonio Cyrino Zequi<sup>3</sup>; Renata da Rosa<sup>1</sup>.

411 <sup>1</sup>*Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia Geral, Universidade*  
412 *Estadual de Londrina.*

413 <sup>2</sup>*Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae, Departamento*  
414 *de Zoologia, Universidade Federal do Paraná.*

415 <sup>3</sup>*Laboratório de Entomologia Médica, Departamento de Biologia Animal e Vegetal,*  
416 *Universidade Estadual de Londrina.*

417

418 **RESUMO**

419 A dengue é uma doença viral transmitida pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti*. O  
420 vetor está presente nos continentes equatoriais povoados, de modo que a dengue  
421 acomete anualmente milhões de pessoas ao redor do mundo. Em 2022 foram  
422 registrados mais de 1,4 milhão de casos de dengue no Brasil, sendo o Paraná o  
423 terceiro estado em maior número de óbitos. Uma das medidas de controle do mosquito  
424 é a aplicação de inseticidas piretróides. Entretanto, esses inseticidas, quando  
425 utilizados de forma descontrolada, podem selecionar populações resistentes, que  
426 apresentam mutações nos genes que codificam os canais de sódio voltagem  
427 dependentes (Nav). Dessa forma, com o objetivo de avaliar a ocorrência e distribuição  
428 de duas dessas mutações (Val1016Ile e Phe1534Cys) neste trabalho, foi escolhido  
429 como área de estudo o município de Florestópolis/PR, por apresentar um histórico  
430 importante de casos de dengue. Foi possível observar uma elevada frequência de  
431 genótipos heterozigotos para a mutação Val1016Ile e homozigotos recessivos para  
432 Phe1534Cys, em três trimestres analisados. A elevada frequência de fenótipos  
433 genótipos mutantes manteve-se alta, tanto antes da aplicação de inseticida como  
434 depois. O alelo mutante Ile<sup>kdr</sup> foi observado em 54% de todos os indivíduos analisados,  
435 enquanto o alelo mutante Cys<sup>kdr</sup> foi observado em 98% dos indivíduos amostrados.  
436 Os resultados demonstram que as populações de *Ae. aegypti* coletadas em  
437 Florestópolis já apresentavam alelos que conferem resistência, evidenciando que a  
438 aplicação de inseticida piretróides pode não apresentar o resultado esperado, sendo  
439 necessário formas alternativas de controle do vetor.

440

441 Palavras-chave: Monitoramento, Mosquito, Inseticida, Seleção

## 442 INTRODUÇÃO

443 *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito culicídeo de grande  
444 importância epidemiológica. De origem no Velho Mundo, está distribuído em zonas  
445 tropicais e subtropicais, e é o principal vetor da febre amarela na área urbana, além  
446 dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV) e outros vírus, como Zika (ZIKV) e  
447 Chikungunya (CKG). A circulação desses vírus e sua incidência está diretamente  
448 ligada a estratégias de controle e manutenção das populações do mosquito vetor.  
449 Condições climáticas e ambientais, assim como as estruturas das regiões urbanas  
450 também favorecem o aumento do número de criadouros disponíveis para o  
451 desenvolvimento desse vetor (Ribeiro et al, 2006).

452 Dentre os arbovírus transmitidos pelo *Ae. aegypti*, o vírus da Dengue é o  
453 de maior importância, sendo que nas últimas décadas a dengue cresceu rapidamente  
454 no mundo, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sobretudo  
455 em áreas urbanas e semiurbanas (WHO, 2020a; ECDC, 2021). Segundo o Ministério  
456 da Saúde (BRASIL, 2021) o ano de 2021 iniciou com elevados casos de dengue,  
457 porém com redução de 51,8 % em relação ao mesmo período do ano anterior (janeiro  
458 a julho), sendo registrados 440.012 casos prováveis e 154 óbitos nesse período em  
459 2021. No entanto, ressalta-se que desde fevereiro de 2020, o Brasil enfrenta uma  
460 pandemia da COVID-19 e isso pode estar ocasionando uma possível subnotificação  
461 justificada pelas orientações de isolamento social e preferencialmente procurar  
462 serviços de saúde em casos de sintomas respiratórios ocorrendo em menor procura  
463 da população por atendimento em unidades de saúde, a ainda as restrições mas  
464 atividades dos agentes de endemias e agentes de saúde da atenção primária aos  
465 domiciliados ocasionando atraso nas notificações das arboviroses (MS, 2021b).

466 Em 2002 o Ministério da Saúde organizou e o país adota a partir daí a  
467 proposta no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que é a base para o  
468 monitoramento e controle do vetor e demais ações junto a pacientes e as arboviroses.  
469 O Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA) permite verificar a  
470 infestação vetorial, a partir de coletas de larvas de *Aedes* e cálculos de índices  
471 larvários: Índice Predial (IP) e Índice de Breteau (IB), possibilitando levantar o  
472 percentual de edifícios com presença de larvas, e de recipientes com larvas para cada  
473 100 imóveis inspecionados, além de obter informações acerca dos tipos de recipientes  
474 usados como criadouros para as larvas (MS, 2013). O Brasil utilizou até dezembro de  
475 2019 o Piriproxifen (larvicida) e o Malathion (adulticida), em janeiro de 2020 foram

476 substituídos por larvicida contendo *Saccharopolyspora spinosa* e adulticida com  
477 neonicotinóide e piretróide pois a Nota Informativa Nº 103/2019-  
478 CGARB/DEIDT/SVS/MS (2019) divulgou ocorrência de resistência de *Aedes* a  
479 piretróides e malathion, bem como para o piriproxifen no nordeste do país. Houve  
480 recomendação e substituição, produtos não seletivos, que pode selecionar resistentes  
481 a curto e médio prazo.

482 Florestópolis é um município do norte do estado do Paraná com maior  
483 significância epidemiológica regional para dengue nos últimos anos, tendo uma vítima  
484 fatal em 2019 e outras duas em 2020, Florestópolis está localizada ao norte na 17ªRS  
485 - Londrina, a 457 km da capital, uma área territorial de 246,331 km<sup>2</sup>, possui 11.222  
486 habitantes, uma densidade demográfica de 45,56 hab/km<sup>2</sup> e IDHM 0,701 (IBGE,  
487 2020). O clima de Florestópolis, segundo a classificação de Köppen, é do tipo clima  
488 subtropical úmido, com chuvas em todas as estações, podendo ocorrer secas no  
489 período de inverno, favorecendo a proliferação do mosquito *Ae. aegypti*.

490 Muitos estudos demonstram a ocorrência de mutações que levam à  
491 resistência a inseticidas piretróides (Duque et al. 2004, Beserra et al. 2007; Martins  
492 et al. 2009, Lima et al. 2011, Bona et al. 2012; Aguirre-Obando et al, 2015, Lopes et  
493 al., 2021), reduzindo os efeitos destes no controle dos mosquitos. Essas mutações  
494 ocorrem em proteínas transmembrana do canal de sódio voltagem-dependente (Nav)  
495 que reduzem a ligação aos piretróides são conhecidas como “*knockdown resistance*”  
496 (*kdr*). O termo refere-se a perda imediata da coordenação dos insetos causada por  
497 exposição aos inseticidas e a recuperação após o efeito dos mesmos (Saavedra-  
498 Rodriguez et al., 2007). As análises genéticas dessas mutações podem fornecer  
499 informações para que, em conjunto com demais ações possam controlar a ocorrência  
500 de vetores e conseqüentemente das viroses transmitidas por eles. Diante disso,  
501 estudar a ocorrência e distribuição dessas mutações em populações de *Ae. aegypti*  
502 é de extrema importância, principalmente em municípios com alta incidência da  
503 doença, como Florestópolis, para que medidas alternativas de controle do vetor  
504 sejam utilizadas.

505

## 506 MATERIAL E MÉTODOS

507 Os ovos de *Aedes aegypti* foram coletados em 31 diferentes pontos do  
508 município de Florestópolis (PR) com a utilização de uma ovitrampa adaptada. Após a  
509 instalação de armadilhas, foi realizado um zoneado, ficando o município dividido em

510 quatro distintas áreas (Figura 9), cada uma delas referenciadas por uma Unidade de  
511 Atenção Primária em Saúde (UAPS) (Tabela 1). As amostras foram analisadas com  
512 periodicidade trimestral. Os ovos coletados nas armadilhas foram levados ao  
513 laboratório para o processo de eclosão. Para identificação dos exemplares foram  
514 utilizadas as chaves dicotômicas de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) e Forattini  
515 (2002) com auxílio de microscópio óptico. As amostras foram congeladas em  
516 nitrogênio líquido em temperatura média de -200°C e mantido posteriormente em  
517 temperatura de -80°C até a extração do DNA.

518 A extração do DNA total fora realizada de acordo com Lopes (2019). A  
519 quantificação do DNA obtido foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop®. As  
520 amostras foram armazenadas a -20°C para análises posteriores. As reações de PCR  
521 alelo-específica para as mutações Val1016Ile e Phe1534Cys foram realizadas  
522 conforme Saavedra Rodriguez et al. (2007) e Martins et al. (2009), utilizando os  
523 *primers fowards* 1016Val 5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA  
524 ATT GTT TCC CAC CCG CAC CGG-3', 1016Ile 5'-GCG GGC ACA AAT TGT TTC  
525 CCA CCC GCA CTG A-3' e um *primer reverse* comum para ambos 5'-GGA TGA ACC  
526 GAA ATT GGA CAA AAG C-3'. Para a mutação Phe1534Cys foram utilizados os  
527 *primers reverse* comum para ambos os alelos 5'-TCT GCT CGT TGA AGT TGT CGA  
528 T-3', dois *primers forward* alelo-específicos 1534Phe+ 5'-GCG GGC TCT ACT TTG  
529 TGT TCT TCA TCA TAT T-3' e 1534Cyskdr 5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG  
530 GGG CCT CTA CTT TGT GTT CTT CAT CAT GTG-3' de acordo com Harris et al.  
531 (2010).

532 Para verificação alelos amplificados foi preparado um gel de agarose a  
533 2,5%, contendo 8µL de amostra de PCR, 5 µL do marcador e 2 µL do corante SYBR®  
534 Safe. Após a eletroforese, o gel foi submetido ao transiluminador para visualização de  
535 bandas formadas. A partir do padrão de bandas, para cada uma das populações foram  
536 calculadas as frequências genotípicas e alélicas.

537

## 538 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

539 Neste estudo, nos três trimestres 360 mosquitos foram genotipados (120  
540 indivíduos em cada trimestre), para cada trimestre foram analisados 30 indivíduos  
541 de cada região de estudo buscando maior diversidade quanto ao mês e as  
542 armadilhas de origem. As coletas do primeiro trimestre foram realizadas em um  
543 período em que não haviam sido aplicados inseticidas piretróides por veículos UBV,

544 enquanto durante o segundo e terceiro trimestre, as populações já haviam sido  
545 expostas ao inseticida piretróide. A pressão de seleção ocasionada por inseticidas  
546 faz com que indivíduos que apresentem mecanismos que possam reverter ou  
547 impedir os efeitos desses inseticidas sejam prevalentes em uma população. O  
548 aumento na frequência dos alelos selecionados na população pelos inseticidas é  
549 responsável pela seleção de populações altamente resistentes.

550 Os inseticidas piretróides, facilmente obtidos pela população em  
551 supermercados e casas agrícolas, agem na manutenção dos canais de sódio  
552 voltagem-dependente na conformação aberta, ocasionando a propagação contínua  
553 do impulso nervoso e a consequente morte do inseto (Braga & Valle, 2007). As  
554 mutações em genes de proteínas transmembrana do canal de sódio voltagem-  
555 dependente ( $Na_v$ ) que reduzem a ligação aos piretróides são conhecidas como  
556 “*knockdown resistance*” (*kdr*) (Saavedra-Rodriguez et al., 2007). Os genes  
557 associados ao fenótipo *kdr*, apresentam-se de forma recessiva, ou seja, a detecção  
558 desse mecanismo de resistência só é possível em condição de homozigose (Davies  
559 et al., 2008).

560 Para a mutação Val1016Ile, de todos os indivíduos genotipados durante  
561 o primeiro trimestre (antes da aplicação de inseticida por UBV), 100% dos indivíduos  
562 foram heterozigotos em todos os pontos de coleta. Já no segundo trimestre houve  
563 mudança sutil na frequência dos genótipos observados, onde foi verificada uma  
564 frequência genotípica de aproximadamente 93% de indivíduos heterozigotos  
565 (Val/Ileu) e aproximadamente 7% de indivíduos homozigotos recessivos (Ileu/Ileu)  
566 para o ponto de coleta A, enquanto no ponto de coleta B foi observado 10% de  
567 homozigotos dominantes (Val/Val) e 90% de heterozigotos (Val/Ileu). Nos demais  
568 pontos de coleta, a frequência genotípica manteve-se a mesma do primeiro  
569 trimestre, com 100% de heterozigotos para a mutação (Tabela 2). No terceiro  
570 trimestre algumas mudanças nas frequências genotípicas foram observadas. Para  
571 o ponto de coleta A foi observado 6% de genótipos selvagens homozigotos  
572 dominantes (Val/Val), 83% de heterozigotos (Val/Ileu) e 10% de homozigotos  
573 recessivos (Ileu/Ileu). Já para os demais pontos de coleta, houve uma diminuição  
574 na porcentagem de heterozigotos e aumento de homozigotos recessivos, como  
575 pode ser observado na Tabela 2.

576

577

578 **Tabela 2.** Frequências genotípicas e alélicas para a mutação Val1016Ile durante o primeiro,  
 579 segundo e terceiro trimestres de coletas. \*Equilíbrio de Hardy-Weinberg: teste do Chi-  
 580 quadrado com grau de liberdade 1

581

Trimestre	Região	Frequência genotípica				*HW $\chi^2$ ( $p \geq 0,05$ )	Frequência alélica trimestral (município)	
		N	Val/Val <sup>+</sup>	Val <sup>+</sup> /Ile <sup>kdr</sup>	Ile/Ile <sup>kdr</sup>		Val	Ile
<b>Primeiro</b>	A	30	0	1	0	30	0,5	0,5
	B	30	0	1	0	30		
	C	30	0	1	0	30		
	D	30	0	1	0	30		
<b>Segundo</b>	A	30	0	0,933	0,06	21,50	0,5	0,5
	B	30	0,1	0,9	0	18,76		
	C	30	0	1	0	30		
	D	30	0	1	0	30		
<b>Terceiro</b>	A	30	0,06	0,83	0,1	13,40	0,38	0,62
	B	30	0	0,73	0,26	10,05		
	C	30	0	0,73	0,26	10,05		
	D	30	0	0,6	0,4	5,51		
<b>Total</b>		<b>360</b>					<b>0,46</b>	<b>0,54</b>

582

583 Dos mosquitos genotipados para a mutação Phe1534Cys nas quatro  
 584 regiões da cidade de Florestópolis, para as coletas realizadas no primeiro trimestre  
 585 20% eram heterozigotos (Phe/Cys) e 80% homozigotos recessivos para o alelo  
 586 mutante (Cys/Cys) no ponto de coleta A (Tabela 3). Para os demais pontos de  
 587 coleta, as frequências genotípicas foram diferentes. No ponto B, apenas 3% eram  
 588 heterozigotos (Phe/Cys) e, aproximadamente 97% homozigotos recessivos para o  
 589 alelo mutante (Cys/Cys), enquanto para os pontos C e D, 100% dos indivíduos  
 590 analisados eram homozigotos recessivos (Cys/Cys) (Tabela 3). Para o segundo  
 591 trimestre, houve alteração da frequência dos genótipos para a mutação  
 592 Phe1534Cys, entretanto, a porcentagem de indivíduos homozigotos recessivos  
 593 (Cys/Cys) ainda foi predominante em todas as populações (Tabela 3). Já no terceiro  
 594 trimestre, apenas a população A apresentou 3% de heterozigotos e 97% de  
 595 homozigotos recessivos, as demais populações apresentaram 100% de genótipos  
 596 homozigotos recessivos (Tabela 3).

597

598

599 **Tabela 3.** Frequências genotípicas e alélicas para a mutação Phe1534Cys durante o  
 600 primeiro, segundo e terceiro trimestres de coletas. \*Equilíbrio de Hardy-Weinberg: teste do  
 601 Chi-quadrado com grau de liberdade 1

602

Trimestre	Região	Frequência genotípica				*HW X <sup>2</sup> (p≥0,05)	Frequência alélica trimestral (município)	
		N	Phe/Phe <sup>+</sup>	Phe <sup>+</sup> /Cys <sup>kd</sup> r	Cys/Cys <sup>kd</sup> r	HW X <sup>2</sup>		
<b>Primeiro</b>	A	30	0	0,20	0,8	0,370	0,03	0,97
	B	30	0	0,03	0,96	0,008		
	C	30	0	0	1	30		
	D	30	0	0	1	30		
<b>Segundo</b>	A	30	0	0,06	0,93	32,63	0,03	0,97
	B	30	0	0,1	0,9	30,31		
	C	30	0	0,06	0,93	32,63		
	D	30	0	0	1	30		
<b>Terceiro</b>	A	30	0	0,03	0,96	0,008	0,004	0,996
	B	30	0	0	1	30		
	C	30	0	0	1	30		
	D	30	0	0	1	30		
<b>Total</b>		<b>360</b>					<b>0,02</b>	<b>0,98</b>

603

604

605

606 As frequências genotípicas observadas para as duas mutações, revelam  
 607 uma mudança discreta na frequência dos genótipos, entretanto, para a mutação  
 608 Val1016Ile ocorre uma predominância de heterozigotos (Val/Ileu) em todos os  
 609 trimestres, enquanto para a mutação Phe1534Cys a frequência de indivíduos  
 610 homozigotos recessivos (Cys/Cys) foi maior em todos os trimestres. Isso também  
 611 pode ser observada pela frequência alélica trimestral observada e pela frequência  
 612 alélica total (Tabelas 2 e 3). Foi possível observar uma frequência alélica semelhante  
 613 para a mutação Val1016Ile, com uma frequência de 0,46 para Val<sup>+</sup> e 0,54 Para Ile<sup>kd</sup>r.  
 614 Já para a mutação Phe1534Cys a frequência de alelos mutantes foi extremamente  
 615 alta, correspondendo a 98% dos alelos dos indivíduos estudados.

615

616

617

618

619

620

621

No Brasil já foram detectadas populações resistentes a piretróides em  
 diversos estudos, inclusive no estado do Paraná (Duque et al. 2004, Beserra et al.  
 2007; Martins et al. 2009, Lima et al. 2011, Bona et al. 2012; Aguirre-Obando et al,  
 2015). Para as mutações analisadas neste trabalho, Val1016Ile e Phe1534Cys, já  
 foram realizadas análises em 30 populações brasileiras de *Ae. aegypti* mostrando a  
 distribuição da, mostrando que estes alelos estão distribuídos de forma regionalizada  
 no país, sendo a distribuição da mutação Phe1534Cys por todo o território e as duas

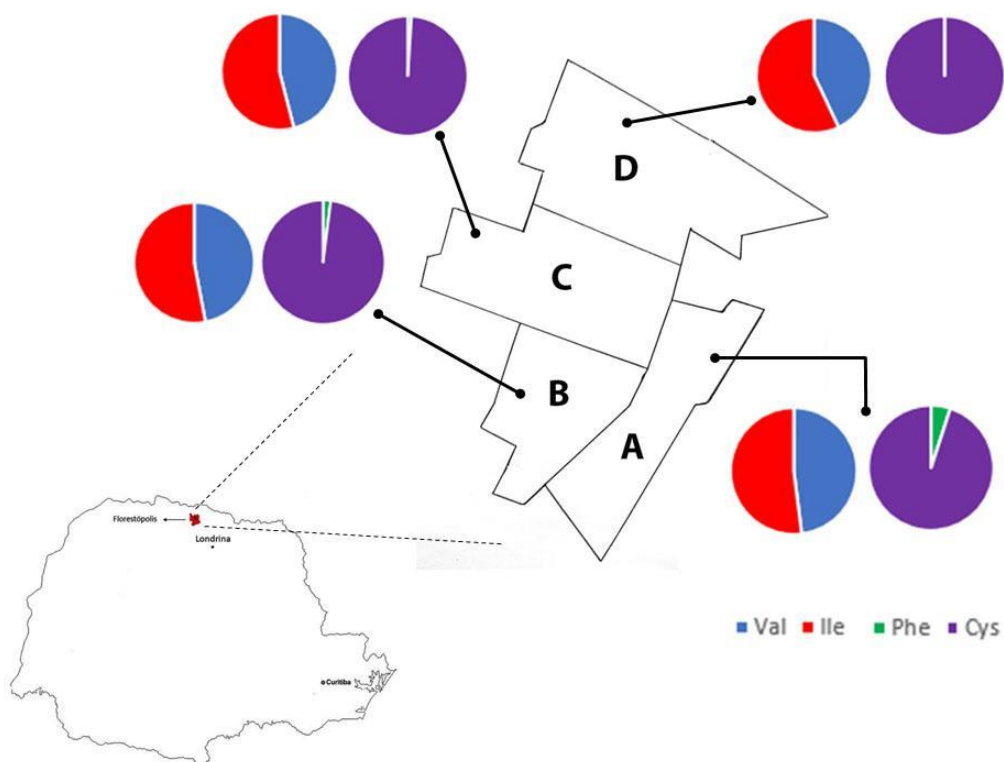
622 mutações *kdr* ocorrem principalmente na região Centro- Sul (Linss et al. 2014).

623 Um estudo realizado por Lopes et al. (2021) na cidade de Londrina  
624 constatou que as mesmas mutações, Val1016Ile e Phe1534Cys, tiveram uma  
625 frequência alélica de 50% Val1016Ile para e 48% para Phe1534Cys. Os autores ainda  
626 observaram um fluxo gênico baixo, com uma elevada diferenciação entre as  
627 populações, sugerindo a influência da deriva genética. Levando em consideração  
628 essas informações, podemos inferir que o mesmo está ocorrendo no município de  
629 Forestópolis, onde a alta frequência de genótipos heterozigotos e mutantes para  
630 ambas as mutações demonstra que indivíduos mutantes estão sendo selecionados e  
631 estabelecendo populações resistentes na cidade, demonstrado pela frequência muito  
632 baixa de indivíduos selvagens para as duas mutações.

633 Nas análises realizadas nos indivíduos de Florestópolis, nenhuma das  
634 populações apresentou-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (que leva em  
635 consideração a ausência de seleção, mutações, deriva genética e acasalamento  
636 preferencial) para ambas as mutações, o que demonstra as populações estão  
637 evoluindo. O equilíbrio de Hardy-Weinberg permite fazer inferências sobre os desvios  
638 das frequências observadas com as esperadas, além de permitir especulações sobre  
639 os motivos que ocasionaram os desvios, tornando-se uma ferramenta essencial nesse  
640 tipo de estudo (Hartl 2008).

641 Analisando a distribuição dos alelos nas diferentes regiões de Florestópolis  
642 na Figura 11, é possível observar que as mutações se distribuem de forma semelhante  
643 por todas as regiões do município, o que evidencia uma frequência elevada de  
644 indivíduos portadores da mutação Val1016Ile e mutantes para Phe1534Cys.

645



646

647

648 **Fig. 11.** Mapa do Paraná evidenciando o município de Florestópolis. Em destaque a distribuição das  
 649 frequências alélicas por região do município de Florestópolis. Os gráficos representam as mutações  
 650 Val1016Ile (vermelho e azul) e Phe1534Cys (verde e roxo). Observe a predominância de alelos  
 651 mutantes em todas as regiões do município.

652

653 As análises genéticas nas populações de *Aedes aegypti* coletadas no  
 654 município de Florestópolis permitiram concluir que as mutações Val1016Ile e  
 655 Phe1534Cys estão presentes em todas as populações coletadas. As frequências dos  
 656 alelos que conferem resistência são elevadas. A análise de populações antes e após  
 657 a aplicação de inseticida no município, demonstra que essas populações já  
 658 apresentavam alelos que conferem resistência, demonstrando que a aplicação de  
 659 inseticida piretróides pode não apresentar o resultado esperado, sendo necessário  
 660 formas alternativas de controle do vetor.

661

662 As análises relativas ao quarto trimestre de coleta estão sendo realizadas  
 663 no laboratório e serão adicionadas aos dados para serem submetidos para publicação  
 664 e assim para uma melhor visão sobre a distribuição dessas mutações no município de  
 665 Florestópolis. Os resultados serão apresentados em câmaras técnicas de trabalho,  
 afim de estimular processos que minimizem a utilização de inseticidas sintéticos assim

666 como estimule a busca por conhecimento sobre outras formas de monitoramento e  
667 controle do mosquito no estado do Paraná.

668

### 669 **Agradecimentos**

670 Os autores agradecem à Universidade Estadual de Londrina e Universidade Federal  
671 do Paraná pelo apoio na realização deste trabalho; à Fundação Araucária pelo suporte  
672 financeiro (079/2021); a Aparecido de Souza e Edson Santana da Silva pelo apoio  
673 durante as coletas.

674

### 675 **REFERÊNCIAS**

676 Consoli, R. A. G. B. & Lourenço-de-Oliveira, R. (1994). Principais mosquitos de  
677 importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 228p.

678 Forattini, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (skuse) no Brasil.  
679 *Revista de Saúde Pública*, 20: 244-245, 1986.

680 Forattini, O. P. *Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia: v. 2,*  
681 *Edusp, São Paulo, p. 860, 2002.*

682 Harris, A. F., Rajatileka, S., & Ranson, H. 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes*  
683 *aegypti* from Grand Cayman. *The American journal of tropical medicine and*  
684 *hygiene*, 83(2), 277-284.

685 Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., da Silva, É. V. G., da Silva, U. M.,  
686 de Oliveira, L. N., ... & Wilding, C. S. (2011). Insecticide resistance in *Aedes*  
687 *aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & vectors*, 4(1), 5.

688 Linss, J. G. B., Brito, L. P., Garcia, G. A., Araki, A. S., Bruno, R. V., Lima, J. B.  
689 P., ... & Martins, A. J. (2014). Distribution and dissemination of the  
690 Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian  
691 natural populations. *Parasites & vectors*, 7(1), 25.

692 Lopes, T.B.F. Estudo genético populacional em *Aedes (Stegomyia) aegypti*  
693 (Linnaeus, 1762) na cidade de Londrina – PR, Dissertação de mestrado,  
694 60pp., 2019.

695 Lopes, T.B.F., Amaro, T.R., Silva, B.P., Zequi, J.A.C., Vilas-Bôas, G.T., Da Silva,  
696 M.A.N., Vilas-Boas, B., Da Rosa, R. Genetic study in *Aedes (Stegomyia)*  
697 *aegypti* (Linnaeus, 1762) from Londrina (Paraná State, Brazil): an approach  
698 to population structure and pyrethroid resistance. *Revista Brasileira de*  
699 *Entomologia* 65(1):e20200088, 2021.

- 700 Martins, A. J., Lima, J. B. P., Peixoto, A. A., & Valle, D. (2009). Frequency of  
701 Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes*  
702 *aegypti* Brazilian populations. *Tropical Medicine & International Health*,  
703 14(11), 1351- 1355.
- 704 Ministério da Saúde. (2018). Boletim epidemiológico Vol.52. Brasília, 2018.  
705 Disponível em: < [http://portalarquivos2.saude.gov.br](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf)  
706 [/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001- Dengue.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf)>.
- 707 Ministério da Saúde. (2018). Chikungunya. Disponível  
708 em:<<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/chikungunya>>. Acesso em:  
709 18 ago. 2018
- 710 Ministério da Saúde. (2018). Dengue. Disponível em:  
711 <<http://portalms.saude.gov.br/saudede-a-z/dengue>>. Acesso em: 18 ago.  
712 2018
- 713 Saavedra-Rodriguez, K., Urdaneta-Marquez, L., Rajatileka, S., Moulton, M.,  
714 Flores, A. E., Fernandez-Salas, I., & Ranson, H. (2007). A mutation in the  
715 voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance  
716 in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology*, 16(6), 785-798.
- 717 Saavedra-Rodriguez, K., Maloof, F. V., Campbell, C. L., Garcia-Rejon, J.,  
718 Lenhart, A., Penilla, P., ... & Lozano, S. (2018). Parallel evolution of *vgsc*  
719 mutations at domains IS6, IIS6 and IIS6 in pyrethroid resistant *Aedes*  
720 *aegypti* from Mexico. *Scientific reports*, 8.
- 721 Medeiros, P. F. V., Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas  
722 e adultos de *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762. Dissertação de mestrado,  
723 140pp., 2011.
- 724 World Health Organization (WHO). (2018). Dengue and Severe Dengue.  
725 Disponível em: <[http://www.who.int/en/news-room/fact-](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengueand-severe-dengue)  
726 [sheets/detail/dengueand-severe-dengue](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengueand-severe-dengue)>. Acesso em: 07 jul. 2018
- 727 World Health Organization (WHO). (2018). Vector-borne diseases. Disponível  
728 em: <[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases)  
729 [diseases](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases)>. Acesso em: 07 jul. 2018.
- 730 Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Dengue  
731 control support through eco-bio-social approach  
732 <[http://www.who.int/tdr/news/2013/dengue\\_control/en/](http://www.who.int/tdr/news/2013/dengue_control/en/)>.

**733 Considerações Finais**

734

735           As análises genéticas nas populações de *Aedes aegypti* coletadas no  
736 município de Florestópolis permitiram concluir que as mutações Val1016Ile e  
737 Phe1534Cys estão presentes em todas as populações coletadas. As frequências dos  
738 alelos que conferem resistência são elevadas. A análise de populações antes e após  
739 a aplicação de inseticida no município, demonstra que essas populações já  
740 apresentavam alelos que conferem resistência, demonstrando que a aplicação de  
741 inseticida piretróides pode não apresentar o resultado esperado, sendo necessário  
742 formas alternativas de controle do vetor.

743