

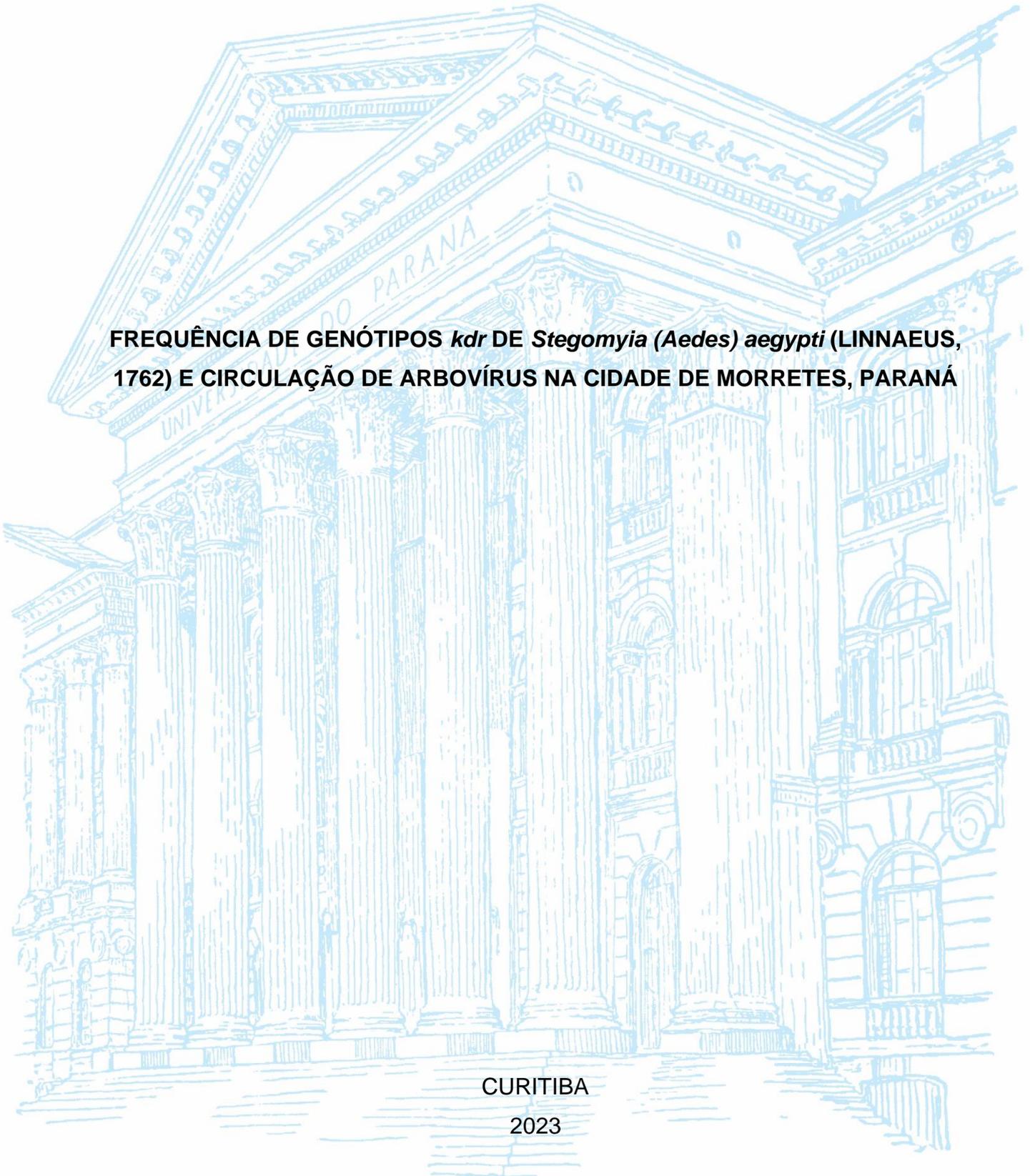
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA LAWANE DE FREITAS

FREQUÊNCIA DE GENÓTIPOS *kdr* DE *Stegomyia (Aedes) aegypti* (LINNAEUS, 1762) E CIRCULAÇÃO DE ARBOVÍRUS NA CIDADE DE MORRETES, PARANÁ

CURITIBA

2023



PATRÍCIA LAWANE DE FREITAS

FREQUÊNCIA DE GENÓTIPOS *kdr* DE *Stegomyia (Aedes) aegypti* (LINNAEUS, 1762) E CIRCULAÇÃO DE ARBOVÍRUS NA CIDADE DE MORRETES, PARANÁ

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Coorientadora: Dra. Angela Maria Palacio Cortés

CURITIBA

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Karina e Valcinei, sem eles nada disso teria acontecido, agradeço pelos incentivos, por tudo o que me permitiram fazer, por todo o carinho, e pelo apoio financeiro. Agradeço também a minha irmã Carol por ter trazido tanta alegria na minha vida, sempre muito bagunceira junto com nossa cachorrinha. Agradeço a todos os meus familiares mais próximos, em especial meus avós Antônio e Flora e minha tia Everly, que estiveram sempre me apoiando na caminhada.

Agradeço aos meus amigos Jéssica e Drew que jogaram e conversaram comigo sempre que eu podia (e foram pacientes em todas as vezes que eu desmarquei pois tinha coisa da faculdade para resolver), e em especial, a Jéssica, que acompanhou eu me “tornando a biologia” no ensino médio, e que sempre está comigo, que viveu as épocas que minha vida mudou completamente, que ouviu minhas histórias, minhas choradeiras, reclamações e ideias mais malucas, que sempre esteve comigo quando precisei e que foi muito especial em todos os momentos que estivemos juntas.

Agradeço às minhas amigas Bruna e Nathália, minhas parceiras de fofoca, que encontrava todos os dias e o assunto nunca acabava, sem elas, eu não teria chegado onde cheguei com tanta alegria e leveza depois de tanto sofrer com provas, trabalhos e atividades que passamos juntas. Agradeço ao meu namorado Gustavo, que sempre me apoiou, me acolheu, me fez rir e foi meu parceiro de jogos.

Agradeço a todo o laboratório LAMFIC², pelos ensinamentos e paciência do professor Mário, pelo apoio, conversas e ensinamentos da Angela, pelas fofocas e brincadeiras com Cinara, Ana e Ítallo. Além disso, agradeço ao laboratório LAFIPE, pelo apoio do professor Marcelo e das pessoas que ainda converso vez ou outra, que me divertem bastante nas festas e churrascos que ainda participo.

Agradeço por fim, a todas as pessoas que estiveram comigo, em qualquer parte da minha formação, que permanecem apenas como aquelas pessoas que eu vejo uma coisa ou outra no Instagram ou que já não vejo mais.

“Somos criaturas nascidas do calor, da pressão e do movimento cansativo
e incessante. Estar quieto é não estar vivo.”

N. K. Jemisin

RESUMO

Stegomyia aegypti é o principal vetor da dengue, Zika e chikungunya no Brasil, determinando epidemias recorrentes de dengue. Entre os métodos de controle, está a utilização de inseticidas feitos à base de piretróides direcionados para população de adultos, principalmente em situações de epidemia. A utilização de inseticidas é autolimitada pela seleção de indivíduos resistentes na população, o que pode resultar no insucesso do controle. Nos procedimentos de monitoramento vetorial o ideal é avaliar precocemente a susceptibilidade a um princípio ativo. Portanto, o objetivo do trabalho foi investigar a frequência dos genótipos de resistência de *Stegomyia aegypti* na área urbana de Morretes. Para a obtenção dos exemplares de *S. aegypti*, foram instaladas armadilhas de oviposição na área urbana de Morretes no período de 04/11/2021 a 08/11/2021, que foram recolhidas e enviadas para o laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae – LAMFIC² (Departamento de Zoologia - UFPR), onde foram analisadas para presença e ovos e imersas em água para a eclosão das larvas até o estágio adulto. Os adultos foram congelados a -80°C e 40 indivíduos foram selecionados para extração de DNA e posterior reação em cadeia de polimerase (PCR), para então detectar a presença ou não das mutações Val1016Ile, Phe1534Cys e Val410Leu. Foram determinadas as frequências gênicas e alélicas e o equilíbrio de Hardy Weinberg. Também foi realizada a revisão histórica dos casos de dengue, Zika e chikungunya no município de Morretes, entre os períodos epidemiológicos 2018/2019 a 2021/2022 a partir dos boletins epidemiológicos disponibilizados pela Secretaria de Estado de Saúde do Paraná. A partir dos dados moleculares, foi possível observar uma alta incidência de genes de resistência na população analisada. Os boletins epidemiológicos demonstraram ocorrência de elevada incidência de dengue no período de 2020/2021, que foi seguida por baixa incidência no período de 2021/2022. A alta presença de genes de resistência pode reduzir a efetividade das ações de controle sustentadas prioritariamente na utilização de inseticidas, tendo como princípio ativo piretróides, e, com isso, pode-se também influenciar na circulação de arboviroses, aumentando a incidência, principalmente de dengue.

Palavras-chave: Culicidae. Piretróides. Resistência. Vetores.

ABSTRACT

Stegomyia aegypti is the main vector of dengue, Zika and chikungunya in Brazil, where causes recurrent dengue epidemics. Among the control methods, to the adult population, pyrethroids are utilized, mainly in epidemic situations. The use of insecticides is self-limited by the selection of resistant individuals in the population, which may result in control failure. In vector monitoring procedures, it is appropriate to study the susceptibility to an active principle early. Therefore, this work aimed to investigate the frequency of resistance genotypes of *Stegomyia aegypti* in the urban area of Morretes. *S. aegypti* adults were obtained from oviposition traps that were installed in the urban area of Morretes from 11/04/2021 to 11/08/2021. Ovitrap were analyzed at the Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae – LAMFIC² (Departamento de Zoologia - UFPR). The wooden pallets containing eggs were immersed in water to allow the hatching of the larvae, and the subsequent obtaining of adults, which were then frozen at -80°C. 40 individuals were selected for DNA extraction and subsequent polymerase chain reaction (PCR) to detect the presence or absence of mutations Val1016Ile, Phe1534Cys and Val410Leu. Gene and allele frequencies and the Hardy-Weinberg equilibrium were determined. A historical review of cases of dengue, Zika and chikungunya in Morretes was also carried out between the epidemiological periods 2018/2019 and 2021/2022, based on the epidemiological bulletins available by the Secretaria de Estado de Saúde do Paraná - SESA. It was possible to observe a high incidence of resistance genes in the analyzed population, in addition, the epidemiological bulletins showed the occurrence of an elevated incidence of dengue in 2020/2021, which was followed by a low incidence in the period 2021/2022. The high presence of resistance genes can reduce the effectiveness of control based on pyrethroids, and consequently, this resistance status can reduce the efficiency of the vector control, compromising the level of arbovirus circulation in the city.

Keywords: Culicidae. Pyrethroids. Resistance. Vectors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO SOBRE A NOMENCLATURA DE <i>Stegomyia (Aedes) aegypti</i>	13
FIGURA 2 – CANAL DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTE (NA_v).....	16
FIGURA 3 – ARMADILHAS DE OVIPOSIÇÃO (OVITRAMPAS)	18
FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO DAS PALETAS NA CIDADE DE MORRETES.....	19
FIGURA 5 – CRIAÇÃO DE <i>Stegomyia aegypti</i> EM LABORATÓRIO	20
FIGURA 6 – LOCALIZAÇÃO DAS PALETAS CONTENDO INDIVÍDUOS SELECIONADOS PARA O EXPERIMENTO EM MORRETES.....	21
FIGURA 7 – BANDAS DE ELETROFORESE DA MUTAÇÃO VAL1016ILE	22
FIGURA 8 – NÚMERO DE CASOS TOTAIS DE DENGUE EM MORRETES E NO PARANÁ	28
FIGURA 9 – NÚMERO DE CASOS IMPORTADOS E AUTÓCTONES DE MORRETES E DO PARANÁ.....	29
FIGURA 10 – NÚMERO DE ÓBITOS DE MORRETES E DO PARANÁ.....	30
FIGURA 11 – RELAÇÃO DE CASOS EM FUNÇÃO DOS BOLETINS DURANTE CADA ANO	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRIMERS UTILIZADOS PARA A REAÇÃO DE PCR.....	24
TABELA 2 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS	26
TABELA 3 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS.....	27
TABELA 4 – EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA VAL1016ILE E PHE1534CYS	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo geral	11
1.1.2 Objetivos específicos.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 <i>Stegomyia (Aedes) aegypti</i>	12
2.1.1 Taxonomia.....	12
2.1.2 Biologia e ecologia	13
2.2 INSETICIDAS E KDR	14
2.3 CASOS DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 LOCAL DE ESTUDO E COLETA	18
3.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	21
3.3 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	21
3.3.1 PCR alelo-específica para mutações Val1016Ile	21
3.3.2 PCR alelo-específica para mutações Phe1534Cys.....	22
3.3.3 PCR alelo-específica para mutações Val410Leu	23
3.4 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS	24
3.4.1 Frequência genotípica	24
3.4.2 Frequência alélica	25
3.4.3 Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)	25
3.5 REGISTROS EPIDEMIOLÓGICOS	26
4 RESULTADOS	26
4.1 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS	26
4.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS	27
4.3 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (EHW)	27
4.4 REGISTROS EPIDEMIOLÓGICOS	27
5 DISCUSSÃO	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Stegomyia (Aedes) aegypti* (Linnaeus, 1762) (CLEMENTS; HARBACH, 2018) pertencente à família Culicidae (Ordem Diptera). É originário da África e é de grande importância para a saúde pública, com ocorrência cosmopolita influenciada principalmente pelas temperaturas (maior abundância nas regiões tropicais e subtropicais) (KRAEMER et al., 2015; MATTINGLY, 1957). *Stegomyia aegypti* é o principal vetor do vírus da dengue e é responsável por transmitir outros arbovírus como chikungunya, Zika vírus e febre amarela urbana (COGAN, 2022).

S. aegypti possui comportamento sinantrópico e está relacionado estritamente ao modo de vida antropogênico. Possui ciclo de vida holometabólico, onde os ovos são depositados em fontes de água parada e preferencialmente limpa, as larvas e pupas são aquáticas, e os adultos, alados (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). A espécie se alimenta principalmente de néctar de plantas, no entanto, as fêmeas necessitam de sangue, preferencialmente humano, para maturar os ovos, podendo transmitir agentes etiológicos nesta etapa (BECKER et al., 2010; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Dessa forma, o desenvolvimento desta espécie é favorecido em ambientes urbanos, devido à maior disponibilidade de sangue humano e com problemas socioambientais, uma vez que possui preferência por criadouros artificiais, geralmente reservatórios de água de origem antrópica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

O controle destes mosquitos pode utilizar três formas: biológico, físico ou químico, podendo ser direcionado a larvas e adultos, em que, para os adultos, o controle químico é realizado por diversas classes de moléculas, dentre elas, os piretróides são os mais comuns no ambiente doméstico (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015), além de serem recomendados pela organização mundial da saúde já que são considerados seguros de manipular devido a sua baixa toxicidade para mamíferos, possuindo um efeito rápido e persistente (APONTE et al., 2019). No entanto, essas moléculas são responsáveis por induzir pressão de seleção, favorecendo indivíduos resistentes a esse inseticida (VIANA-MEDEIROS et al., 2017). A resistência pode ocorrer por vias enzimáticas e/ou por alterações nos sítios de *kdr* (do inglês *knockdown resistance*), onde mutações nesses genes alteram a conformação dos canais de sódio voltagem dependente, afetando a ligação dos piretróides e consequentemente diminuindo sua eficácia (MAESTRE-SERRANO et al., 2014).

Morretes é um dos sete municípios litorâneos do estado do Paraná, contém uma população estimada em 2021 de 16.485 habitantes em uma área de 684,580 km², onde cerca de 64,6% das casas possuem esgotamento sanitário considerando o último censo feito em 2010 (IBGE, 2021). O primeiro caso registrado de dengue autóctone em Morretes ocorreu em 2016, no entanto, o maior número foi observado em 2021, com 489 casos autóctones confirmados (SESA, 2022). Diante deste contexto, é importante compreender a susceptibilidade da população do *Stegomyia aegypti* a piretróides na região urbana do município de Morretes, uma vez que o controle da população a base destas moléculas pode gerar uma seleção de indivíduos resistentes, reduzindo a efetividade do controle.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a incidência de genes de resistência *kdr* a inseticidas piretróides na população de *Stegomyia aegypti* da cidade de Morretes (Paraná) e analisar o histórico de ocorrência das arboviroses no período de 2018 a 2022.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar as frequências das mutações *kdr* associadas à resistência a piretróides Phe1534Cys, Val1016Ile e Val410Leu de mosquitos coletados na área urbana de Morretes.
- Reunir as informações sobre a ocorrência de óbitos, casos totais, autóctones e importados de dengue, Zika e chikungunya dos períodos epidemiológicos de 2018/2019 a 2021/2022 para o Município de Morretes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Stegomyia (Aedes) aegypti*

2.1.1 Taxonomia

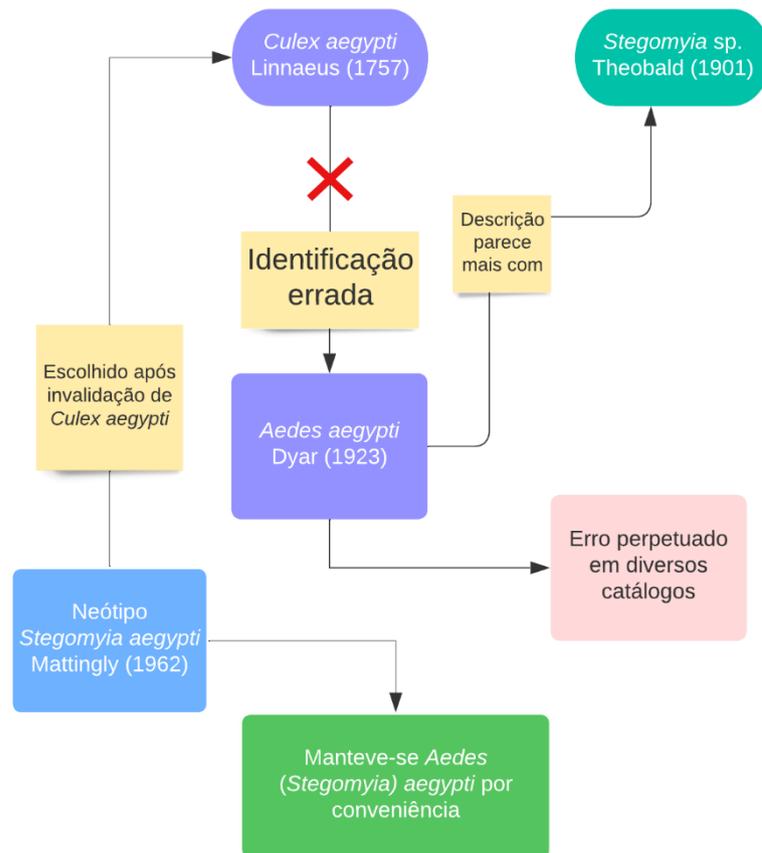
O primeiro registro do mosquito vetor da febre amarela foi feita no Egito, publicado em 1757 no trabalho de Frederic Hasselquist e nomeado como *Culex aegypti*, no entanto, a autoria foi designada a Linnaeus (CLEMENTS; HARBACH, 2018). Posteriormente, Theobald (1901) utilizou o gênero *Stegomyia* para descrever suas espécies de mosquito separadas de *Culex*, e Howard (1901), sabendo de seu trabalho, nomeou espécies vetores da febre amarela enviadas para ele de Cuba com o nome de *Stegomyia fasciata* (CLEMENTS; HARBACH, 2018; HOWARD, 1901)

Em 1923, Dyar nomeou uma espécie das Filipinas como *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus), no entanto, sua descrição diferia da descrição de *Culex aegypti* de Hasselquist (Linnaeus) e se parecia mais com a de Theobald de *Stegomyia fasciata*, conseqüentemente, isso gerou sérias conseqüências na nomenclatura e taxonomia do mosquito, e o engano de Dyar foi perpetuado em diversos catálogos (CLEMENTS; HARBACH, 2018). Ainda segundo Clements e Harbach (2018), em 1933, Patton concluiu que a descrição de coloração de corpo de *Culex aegypti* de Hasselquist encaixava com a do *Aedes caspius*, mas não se parecia com *Stegomyia fasciata*, então, em 1956 a comissão internacional de nomenclatura zoológica invalidou o nome *Culex aegypti*, indicando que deveria ser escolhido entre os nomes *Culex argenteus* (Poiret, 1787) ou *Culex fasciatus* (Fabricius, 1805) e por muitos anos nenhuma medida foi tomada quanto a decisão, até que em 1962, Mattingly et al. requereu à comissão internacional para que uma espécie do subgênero *Stegomyia* fosse utilizada como neótipo de *Culex aegypti*, e que o nome específico *aegypti* fosse mantido para designar o mosquitos da febre amarela, uma vez que o nome já era popular e a troca causaria confusão, em 1964 a comissão aceitou, validando a espécie descrita por Mattingly et al. (1962) como neótipo.

Por fim, a classificação de Aedini sofreu muitas mudanças ao longo dos anos, com o grupo *Stegomyia* sendo modificado diversas vezes, até que através do trabalho de Reinert, *Stegomyia* foi restaurado como gênero e o mosquito *Aedes aegypti* foi reclassificado como *Stegomyia aegypti*, em conclusão, foi aceito o trinômio *Aedes*

(*Stegomyia aegypti* (Linnaeus) por conveniência devido à sua popularidade (FIGURA 1), onde ocorre apenas uma transposição de dois grupos de gênero (CLEMENTS; HARBACH, 2018). Desta forma, seguindo o trabalho de Clements e Harbach (2018), neste trabalho optou-se em priorizar e utilizar o gênero *Stegomyia* para referenciar a espécie.

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO SOBRE A NOMENCLATURA DE *Stegomyia (Aedes) aegypti*



FONTE: A autora (2022).

2.1.2 Biologia e ecologia

O *Stegomyia aegypti* possui coloração preta, com listras e manchas brancas, sendo identificável principalmente por sua ornamentação branca no escudo (dorso do tórax) que se apresenta em forma de lira (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Ainda segundo Consoli e Oliveira (1994), no Brasil, a população destes mosquitos está estritamente relacionada aos humanos, pois possuem preferência por criadouros artificiais, sendo encontrado próximo aos peridomicílios e domicílios urbanos.

A disponibilidade de criadouros para a deposição de ovos de *S. aegypti* está intrinsecamente ligada a questões climáticas, ambientais, governamentais e sociais (FLAUZINO; SOUZA-SANTOS; DE OLIVEIRA, 2011). As estações chuvosas disponibilizam maior abundância de locais favoráveis à sua proliferação, sendo um dos fatores abióticos mais influentes para a maior densidade populacional do *S. aegypti*, ademais, os criadouros podem variar em característica e abundância nas diferentes infraestruturas e extratos urbanos (FLAUZINO; SOUZA-SANTOS; DE OLIVEIRA, 2011; VIANA; IGNOTTI, 2013)

O crescimento rápido e sem uma infraestrutura adequada dentro do ecossistema urbano pode impactar que a coleta de lixo, o abastecimento de água e o saneamento básico por vezes seja insuficiente para atender de forma completa a demanda da área urbana, contribuindo para a maior disponibilidade de locais para a proliferação destes mosquitos, além disso, o acúmulo de resíduos pode estar ligado também a fatores culturais e de educação ambiental (BARBOSA; PEREIRA, 2015; LIMA-CAMARA, 2016). O clima e fatores socioeconômicos também influenciam diretamente na frequência e na característica dos criadouros, por exemplo, recipientes utilizados com maior frequência para o armazenamento de água em épocas de seca, como tambores, tonéis, cisternas e caixas d'água, se não fechados corretamente, podem disponibilizar criadouros para os mosquitos, auxiliando na manutenção destes insetos em épocas de pouca disponibilidade de outros tipos de criadouros, como recipientes que tem o potencial de abrigar água das chuvas (DAVID; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; DE FREITAS, 2009).

2.2 PIRETRÓIDES E KDR

Os piretróides possuem como molécula ativa a piretrina, que de forma natural, pode ser encontrada em flores de espécies de *Chrysanthemum*, no entanto, elas são moléculas instáveis, por isso, a produção de inseticidas ocorre através do desenvolvimento de moléculas sintéticas análogas (ELLIOTT, 1977). O modo de ação dos piretróides se dá pela ligação deles ao sítio alvo dos canais de sódio do sistema nervoso que estão relacionados aos potenciais de ação, com isso, ocorre o aumento do tempo de ativação dos canais e inibição da sua desativação/inativação, resultando em abertura prolongada dos mesmos, isso faz com que ocorra a interrupção da função

nervosa, conseqüentemente causando perda da coordenação, paralisia e morte (efeito *knock down*) (HIRATA, 1995; ZHOROV; DONG, 2017).

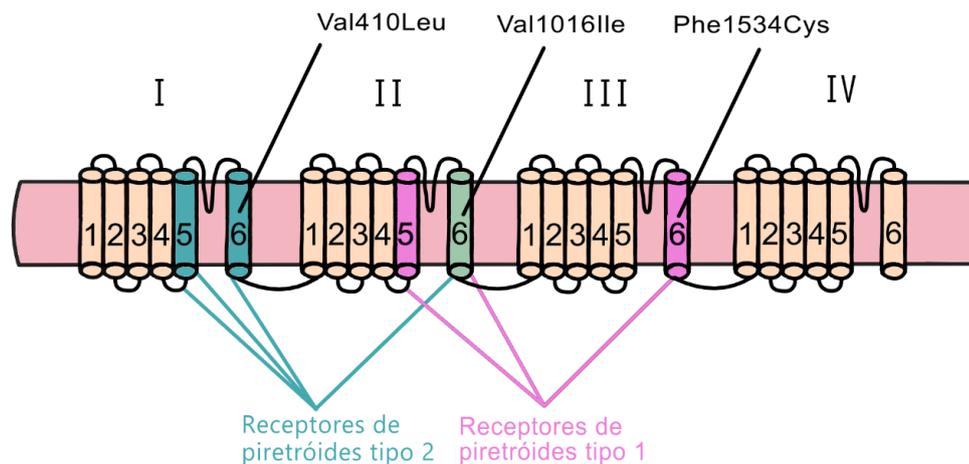
Como mencionado anteriormente, a utilização de piretróides para o controle de populações de *S. aegypti* pode selecionar indivíduos resistentes a estes produtos, o que acaba por induzir a ineficácia do seu controle (MOYES et al., 2017). A resistência pode ocorrer tanto por via enzimática (resistência metabólica) através das enzimas quanto por *kdr* (*knock down resistant*), onde mutações nos genes codificadores das proteínas de canais de sódio voltagem dependente do sistema nervoso (Na_v) podem causar modificações estruturais na proteína codificada, provocando redução ou inibição da ligação dos piretróides, conseqüentemente impedindo a morte dos insetos com esta mutação e ainda selecionando estes indivíduos, que poderão se reproduzir e aumentar sua frequência na população (MELO COSTA et al., 2020; VIANA-MEDEIROS et al., 2017).

Os Na_v são proteínas transmembrânicas constituídas por quatro domínios (I-IV) em que cada um contém seis hélices (S1-S6) (FIGURA 2), essas proteínas são codificadas por apenas um gene que é altamente conservado, portanto, poucas variações podem ocorrer para que seu papel neurofisiológico seja mantido (MARTINS et al., 2009; MELO COSTA et al., 2020). Mutações nos sítios 1016 e 1534 são detectadas mundialmente, sendo nas Américas, Phe1534Cys e Val1016Ile as mais documentadas, porém, recentemente a mutação Val410Leu também vem sendo reportada nas populações Latino-Americanas (MELO COSTA et al., 2020). O haplótipo 1016Ile^{kdr}/1534Cys^{kdr} é o mais associado a resistência a piretróides, onde a mutação 1016Ile^{kdr} parece aumentar a resistência causada pelo 1534Cys^{kdr}; já Val410Leu foi encontrado sozinho ou em combinação com as outras mutações anteriores, conferindo grande grau de resistência (MELO COSTA et al., 2020; MOYES et al., 2017).

Os piretróides podem ser divididos em tipo I e tipo II, sendo diferenciados pela presença de um grupo ciano na porção fenoxibenzil nos piretróides tipo II. Além disso, piretróides do tipo II são mais potentes, mantendo os canais abertos por períodos maiores, além de também inibirem canais GABA-A (BURNS et al., 2013). Alguns produtos que utilizam piretróides tipo I são inseticidas SBP[®], Raid[®] e do tipo II Baygon[®], Kaocid[®], Kelldrin[®] entre outros. O sítio de ligação dos piretróides pode variar dependendo do tipo da molécula utilizada, como por exemplo, piretróides do tipo I se ligam à subunidade II e III do canal, já do tipo II às subunidades I e II, além disso,

dependendo da mutação presente, partes diferentes da proteína serão modificadas, conseqüentemente, a mutação irá influenciar no tipo de piretróide que o indivíduo será resistente. Assim, temos que a mutação 410Leu^{kdr} modifica a conformação da hélice 6 do primeiro domínio (IS6), podendo alterar a resistência do indivíduo a piretróides do tipo I e II, no entanto, ele não faz parte da parte do receptor, provavelmente impedindo a atuação da molécula, e não a sua ligação. A mutação 1534Cys^{kdr} modifica a hélice 6 no domínio 3 (IIIS6), alterando a sensibilidade a piretróides do tipo I. Por fim, a mutação 1016Ile^{kdr} modifica o segundo domínio hélice 6 (IIS6), no entanto, ela sozinha não é capaz de impedir a ligação de piretróides em seu canal, atuando juntamente com 1534Cys^{kdr}, conferindo maior grau de resistência tanto para piretróides do tipo I quanto para o tipo II (FIGURA 2) (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2018).

FIGURA 2 – CANAL DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTE (NA_v).



FONTE: A autora (2022), modificado de SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al. (2018).

LEGENDA: Membrana com canal voltagem sódio dependente com as subunidades (I-IV) e suas hélices (1-6). Localização das mutações Val410Leu, Val1016Ile e Phe1534Cys.

2.3 CASOS DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA

Em relação à dengue no Brasil, ela se tornou endêmica a partir de 1986 e constantemente ocorrem epidemias da doença, geralmente com o aumento de casos dentro de um padrão sazonal, que é acentuado nos períodos mais quentes e úmidos (favoráveis para o vetor) (VIANA; IGNOTTI, 2013). Temos que no ano de 2022 (até a semana epidemiológica 50), foram registrados 1.414.797 casos prováveis de dengue,

com uma redução de 7,7% dos casos no mesmo período analisado em 2019, porém, em relação ao ano de 2021, ocorreu um aumento de 163,8% dos casos. A região sul apresentou a segunda maior taxa de incidência de dengue, com aproximadamente 104 casos/10 mil habitantes, ademais, o Paraná contribuiu com 163.078 dos casos prováveis, sendo ainda o 3º estado com maior número de mortes (108) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Em relação a Chikungunya, até a semana epidemiológica 50 em 2022 houve um aumento de 31,9% dos casos em relação a 2019 e de 78% em relação a 2021 no mesmo período, totalizando 172.082 casos prováveis no ano de 2022, onde 709 casos ocorreram na região sul, e destes, 315 no Paraná (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Já em relação à Zika, em 2022 ocorreram 9.204 casos prováveis até a semana 48, representando uma redução de 8,7% no número de casos do País em relação a 2019, e um aumento de 42,0% em relação a 2021 no mesmo período, sendo que 167 casos ocorreram na região sul, porém, apenas 30 foram no Paraná (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). No Brasil, ambas arboviroses tiveram as primeiras notificações de casos autóctones em 2014, posteriormente, ocorreram epidemias das duas, gerando grande preocupação na população, além de grande movimentação do Ministério da Saúde em trabalhos de detecção, tratamento e prevenção realizados através do SUS, além disso, ambas entraram no sistema nacional de vigilância do Ministério da Saúde (GARCIA, 2018; SILVA et al., 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO E COLETA

Os adultos foram obtidos a partir de ovos coletados com armadilhas de oviposição (FIGURA 3). As mesmas foram instaladas em novembro de 2021 e fazem parte dos ciclos de monitoramento realizados no macroprojeto de vigilância da atividade vetorial de diversos municípios do litoral paranaense. No total, 70 armadilhas de oviposição foram instaladas em diferentes pontos na área urbana de Morretes, que foi previamente dividida em cinco partes (estratos) (FIGURA 4). As armadilhas permaneceram nos peridomicílios de 04/11/2021 a 08/11/2021, e, após serem recolhidas pela equipe da Secretaria de Saúde, foram encaminhadas para o Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LANFIC², UFPR), onde foi feita a contagem de ovos em cada paleta. As paletas positivas foram separadas para a criação dos mosquitos até o estágio adulto.

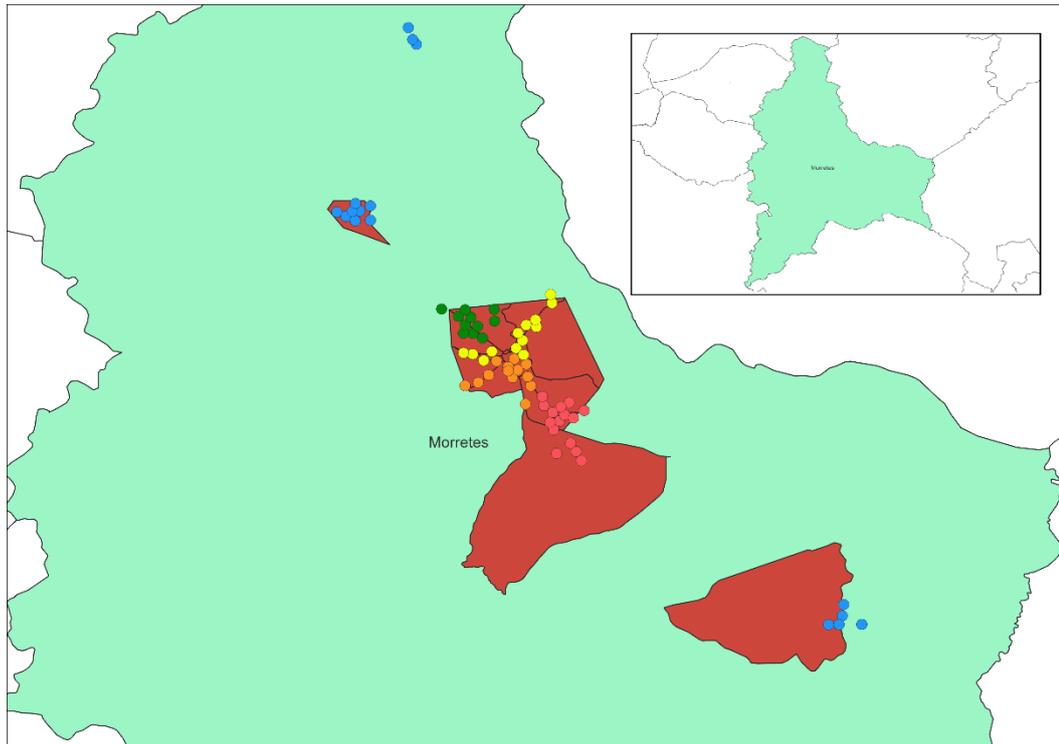
FIGURA 3 – ARMADILHAS DE OVIPOSIÇÃO (OVITRAMPAS).



FONTE: A autora (2022)

LEGENDA: a) Armadilha oviposição contendo água e paleta de ovitrampa, a parte enrugada é onde os ovos serão depositados b) Paleta mostrando a numeração, que é retirada e enviada para contagem dos ovos no laboratório.

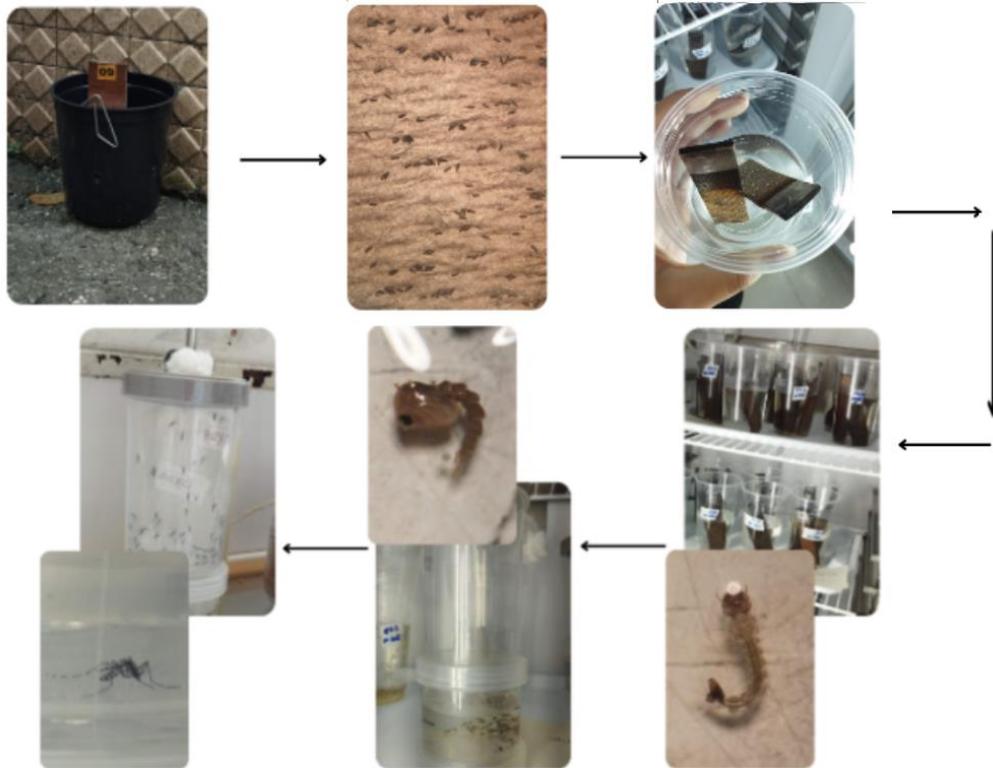
FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO DAS PALETAS NA CIDADE DE MORRETES.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Localização das paletas ao longo da área urbana aproximada (vermelho) do município de Morretes, separadas em 5 estratos (cada estrato contendo uma cor diferente).

A criação dos indivíduos no laboratório (FIGURA 5) ocorreu com a colocação das paletas separadas por estrato em copos plásticos com água e ração de alevinos triturada a temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12 horas claro e 12 escuro) controlados. Após três dias da submersão das paletas, as mesmas foram retiradas, a água foi trocada e adicionado alimento, após a formação de pupas, elas foram transferidas para gaiolas apropriadas para a emergência dos adultos.

FIGURA 5 – CRIAÇÃO DE *Stegomyia aegypti* EM LABORATÓRIO.

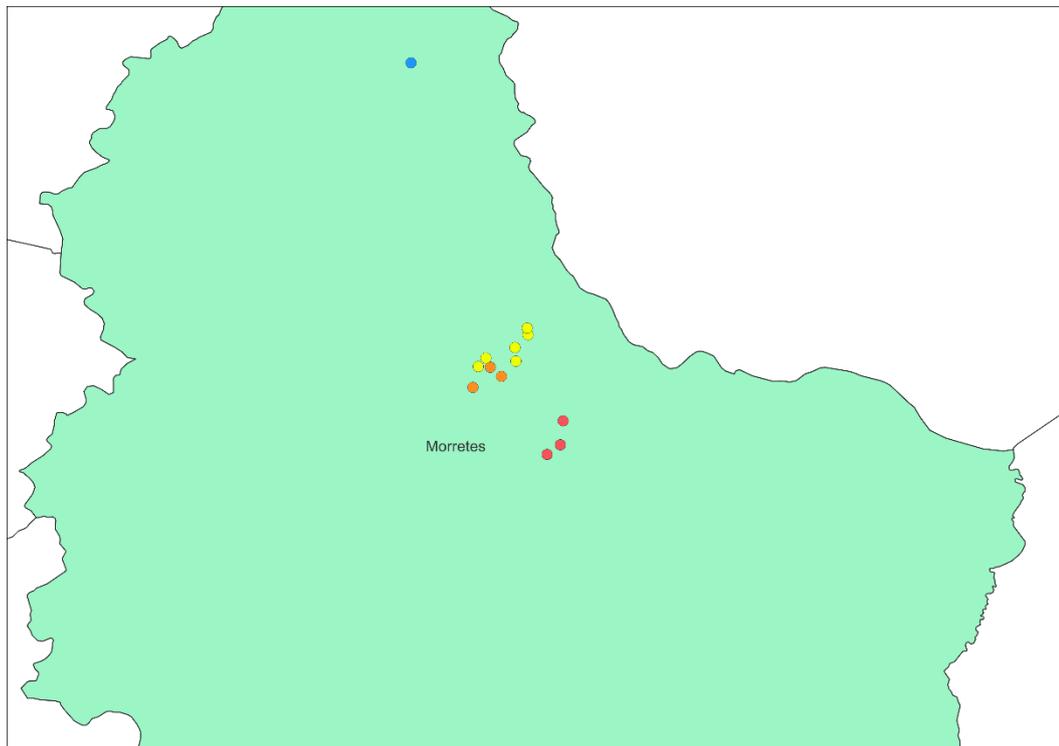
FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Localização das paletas que continham indivíduos selecionados aleatoriamente para análise de PCR.

Após a emergência dos adultos, estes foram congelados e separados por sexo e espécie, uma vez que nas armadilhas de oviposição são depositados ovos tanto pelas fêmeas de *Stegomyia aegypti* quanto *Stegomyia albopictus*. Os espécimes foram adicionados em tubos do tipo *ependorf* de 1,5 mL com aproximadamente 20 indivíduos em cada, e os mosquitos foram mantidos a uma temperatura de -80°C até que fossem retirados para a obtenção dos ácidos nucleicos.

Para este estudo, foram selecionados 40 adultos entre machos e fêmeas aleatoriamente dos tubos, preservando seu local de origem (FIGURA 6), e individualizados para a extração dos ácidos nucleicos e análise dos genótipos.

FIGURA 6 – LOCALIZAÇÃO DAS PALETAS CONTENDO INDIVÍDUOS SELECIONADOS PARA O EXPERIMENTO EM MORRETES.



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Localização das paletas que continham indivíduos selecionados aleatoriamente para análise de PCR.

3.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A extração do ADN dos indivíduos foi realizada utilizando o kit de DNeasy blood & Tissue QIAGEN® seguindo o protocolo do fabricante. A eluição final da membrana foi feita em 30 μL . A qualidade e concentração de ácidos nucleicos ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) de cada amostra foi mensurada considerando as relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} medidas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop®.

3.3 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

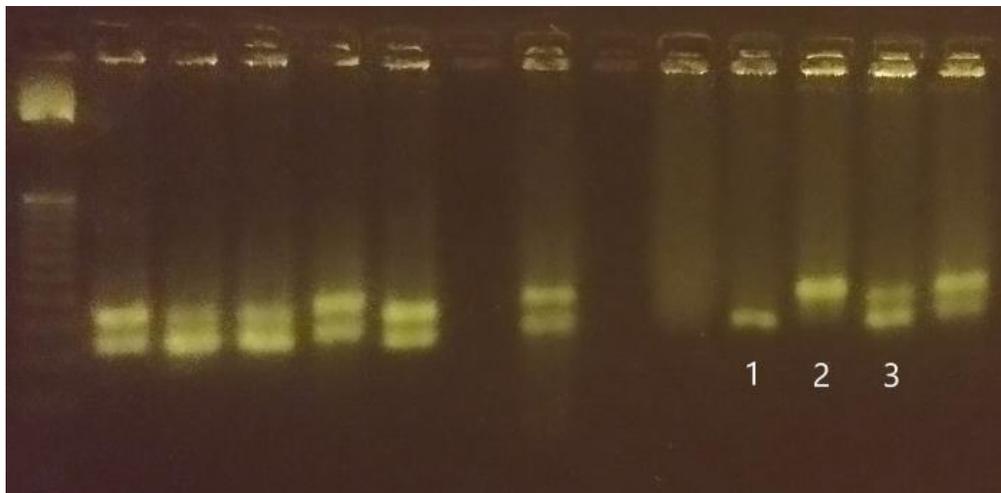
3.3.1 PCR alelo-específica para mutações Val1016Ile

Para avaliar a presença da mutação de Val1016Ile foram realizadas reações de PCR específicas com iniciadores. O volume final da reação foi de 12 μL onde foi adicionado 2 U da enzima Platus Taq (Sigma®), 10X do tampão como recomendado

pelo fabricante (contendo 100 mM Tris-HCl; pH 8,8; 500 mM de KCl e 0,8% de Nonidet P40), 1,6 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®), 0,12 µM de oligonucleotídeos específicos e 0,24 µM de oligonucleotídeos comuns (1016Val⁺ e 1016Ile^{kdr}), 1 µL de ADN e água Milli-Q para completar o volume (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007). Os oligonucleotídeos estão descritos na TABELA 1.

O ciclo da PCR foi adaptado de Saavedra-Rodriguez et al. (2007) e ocorreu com uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 32 ciclos de 95°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos, e por fim, a extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto da PCR foi analisado por bandas de eletroforese em gel de agarose a 3% corado com 1 µL de safer dye (KASVI®), comparados com o marcador de 25 pb *Ultra Low Range ADN Ladder* (Promega®). A corrida foi feita por uma hora a 80V. As bandas de alelos homozigotos selvagens (1016Val⁺) e mutantes (1016Ile^{kdr}) contém bandas de 98pb e 78pb respectivamente, já os heterozigotos contém ambas (FIGURA 7).

FIGURA 7 – BANDAS DE ELETROFORESE DA MUTAÇÃO VAL1016ILE



FONTE: A autora (2022).

LEGENDA: Bandas de eletroforese da mutação Val1016Ile. (1) Alelo 1016Ile^{kdr} (mutante). (2) Alelo 1016Val⁺ (selvagem). (3) Heterozigoto contendo 1016Val⁺ e 1016Ile^{kdr}.

3.3.2 PCR alelo-específica para mutações Phe1534Cys

A PCR foi realizada em um volume final de 12 µL contendo 2U da enzima Platus Taq (Sigma®), 10X do tampão (contendo 100 mM Tris-HCl; pH 8,8; 500 mM de KCl e 0,8% de Nonidet P40), 1,6 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®), 0,12

μM de oligonucleotídeos específicos e $0,24 \mu\text{M}$ de oligonucleotídeos comuns (1534Phe⁺ e 1534Cys^{kd}), $1 \mu\text{L}$ de ADN e água Milli-Q para completar o volume final. Os oligonucleotídeos estão descritos na TABELA 1. A ciclagem foi de 35 ciclos de 94°C por 30s, 63°C por 30s e 72°C por 30s, com extensão final de 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 4%, onde continham as amostras coradas com $1 \mu\text{L}$ de safer dye (KASVI[®]). O tamanho das bandas foi comparado com o marcador de 100 pb *Ultra Low Range ADN Ladder* (Promega[®]). A corrida do gel foi feita por uma hora a 100 V e as bandas de interesse tinham tamanho de 90 e 110 pb correspondentes ao alelo homozigoto selvagem (1534Phe⁺) e o mutante (1534Cys^{kd}) respectivamente; os heterozigotos continham as duas bandas (LINSS et al., 2014).

3.3.3 PCR alelo-específica para mutações Val410Leu

Para avaliar a presença da mutação de Val410Leu, a PCR foi preparada em um volume final de $12 \mu\text{L}$, contendo 2U da enzima Platus Taq (Sigma[®]), 10X do tampão (100 mM Tris-HCl; pH 8,8; 500 mM de KCl e 0,8% de Nonidet P40), $1,5 \text{ mM}$ de MgCl_2 , $0,4 \text{ mM}$ de dNTP (Invitrogen[®]), 100 nM de oligonucleotídeos comuns e específicos (TABELA 1), $1 \mu\text{L}$ de ADN e água Milli-Q para completar o volume final. As reações de ciclagem ocorreram com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 40s, anelamento a 58°C por 45s, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 10 minutos (AYRES et al., 2020; HADDI et al., 2017).

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 3%, onde continha a amostra corada com $1 \mu\text{L}$ de safer dye (KASVI[®]), a corrida do gel foi feita por uma hora a 80 V. As bandas de interesse foram comparadas com o marcador de 25 pb *Ultra Low Range ADN Ladder* (Promega[®]) e possuíam um tamanho de 133 ou 113 pb correspondentes ao alelo homozigoto selvagem (410Val⁺) e o mutante (410Leu^{kd}) respectivamente; os heterozigotos continham ambas (HADDI et al., 2017; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2018).

TABELA 1 – SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA INÍCIO DAS REAÇÕES DE PCR

Primers	Sequência 5' – 3'
COI Foward	TGT AAT TGT AAC AGC TCA TGC A
COI Reverse	AAT GAT CAT AGA AGG GCT GGA C
1016 Val ⁺	GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC CAC CGG
1016 Ile ^{kdr}	GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A
1016 Val ⁺ /Ile ^{kdr}	GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA AAG C
1534 Phe ⁺	GCG GGC TCT ACT TTG TGT TCT TCA TCA TAT T
1534 Cys ^{kdr}	GCG GGC AGG GCT CTT CTT TGT GTT CTT CAT CAT GTG
1534 Phe ⁺ /Cys ^{kdr}	TCT GCT CGT TGA AGT TGT CGA T
410 Foward 1	TTA CGA TCA GCT GGA CCG TG
410 Foward 2	ATC AGC TGG ACC GTG GCA
410 Reverse	TTC CTC GGC GGC CTC TTC

FONTE : A autora (2022).

3.3.4 Sequenciamento parcial do gene Citocromo C Oxidase (COI)

Uma vez que a confirmação da espécie que apresentou a mutação R3 (ocorre em baixas taxas), foi analisado parte do gene mitocondrial citocromo c oxidase (COI), uma das regiões possíveis para o reconhecimento de espécies de Culicidae (SCARPASSA; CARDOZA; CARDOSO JUNIOR, 2008). Desta forma, foi realizada a PCR específica para COI (KAMGANG et al., 2011) contendo 2 U de Taq DNA polimerase e 1x buffer; 100 ng μL^{-1} de ADN, 2,5 μM de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl_2 e 0,4 mM de dNTP em um volume final de 50 μL . As condições da PCR foram: 94 °C por 3 min; a ciclagem foi de 30 ciclos de 94°C por 45s, 47°C por 30s e 72°C por 1 min com extensão final de 72 °C por 7 min. Após a confirmação da presença da banda em gel de eletroforese a 1,5%, foi feita a purificação da amostra utilizando o protocolo e kit da Norgen Biotek[®], e posteriormente, foi enviada para sequenciamento.

3.4 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS

3.4.1 Frequência genotípica

A frequência genotípica foi avaliada apenas para Phe1534Cys e Val1016Ile, portanto, o haplótipo que irá compor o genótipo de cada indivíduo pode ser selvagem (S) quando não há a mutação em nenhum dos alelos analisados do indivíduo (Val⁺ + Phe⁺); pode ser do tipo resistente 1 (R1) quando há apenas a mutação 1534Cys (Val⁺ + Cys^{kdr}); resistente 2 (R2) quando há as duas mutações (Ile^{kdr} + Cys^{kdr}) ou resistente 3 (R3) quando há apenas a mutação 1016Ile (Ile^{kdr} + Phe⁺).

A proporção dos diferentes genótipos, ou seja, a porcentagem de ocorrência de um determinado genótipo em relação ao número total de indivíduos dentro de uma população foi calculada segundo a fórmula (GRIFFITHS, 2016):

$$f(x) = \frac{\text{número de indivíduos com genótipo "x"}}{\text{número total de indivíduos}}$$

3.4.2 Frequência alélica

As frequências alélicas referem-se à proporção dos diferentes alelos de um determinado gene observado na população, foram calculados com base nas seguintes fórmulas (GRIFFITHS, 2016):

$$F(\text{Val}) = \frac{(2 \times \text{n}^\circ \text{ de indivíduos Val/Val}) + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos Val/Ile}}{2 \times \text{n}^\circ \text{ total de indivíduos}}$$

$$F(\text{Ile}) = \frac{(2 \times \text{n}^\circ \text{ de indivíduos Ile/Ile}) + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos Val/Ile}}{2 \times \text{n}^\circ \text{ total de indivíduos}}$$

O exemplo contém apenas a mutação Val1016Ile, portanto, as fórmulas se repetirão para cada mutação (Phe1534Cys e Val410Leu).

3.4.3 Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

O equilíbrio de Hardy-Weinberg refere-se à dinâmica da frequência de alelos em uma população, permitindo estimar as frequências gênicas e genotípicas ao longo das gerações e compará-las com o que é obtido na prática. Se os valores observados forem significativamente diferentes dos esperados, fatores evolutivos estão atuando sobre essa população, ou seja, ela não está em equilíbrio (HARTL; CLARK, 2010).

Foi utilizado o teste de qui-quadrado (χ^2) para testar a hipótese de que a população está em EHW.

3.5 REGISTROS EPIDEMIOLÓGICOS

Foram analisados os números de casos confirmados autóctones e importados e de óbitos da dengue, Zika e chikungunya disponíveis nos boletins epidemiológicos da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná no site <https://www.dengue.pr.gov.br/Pagina/Boletins-da-Dengue>. Os dados dos boletins epidemiológicos do período de 2018 a 2022 foram compilados em tabelas de Excel e organizados segundo os períodos epidemiológicos 2018/2019, 2019/2020, 2020/2021 e 2021/2022.

4 RESULTADOS

4.1 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE CITOCROMO C OXIDASE (COI)

O resultado do sequenciamento mostrou a confirmação de que a amostra era de *Stegomyia aegypti*, com reconhecimento do gene parcial do gene mitocondrial de COI da espécie.

4.2 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS

Todos os adultos avaliados apresentaram frequências genotípicas da mutação Val410Leu com o genótipo selvagem. Já as frequências genotípicas das mutações Phe1534Cys e Val1016Ile mostraram que o genótipo R1R2 teve a maior presença na população analisada (60%), seguido pelo genótipo R1R1 (35%), e por fim, ambos os genótipos SR3 e R2R2 (2,5%).

TABELA 2 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA AS MUTAÇÕES PHE1534CYS E VAL1016ILE.

Genótipos	Quantidade	Frequência
Val/Val + Cys/Cys (R1R1)	14	0,350
Val/Ile + Phe/Phe (SR3)	1	0,025
Val/Ile + Cys/Cys (R1R2)	24	0,600
Ile/Ile + Cys/Cys (R2R2)	1	0,025

FONTE: A autora (2022).

4.3 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

Em relação às frequências alélicas de Val1016Ile, o alelo selvagem Val apareceu com maior frequência na população (66,2%) em relação à mutação Ile (33,8%). Já em relação a Phe1534Cys, o alelo mutante Cys apareceu em maior frequência (97,5%) que o alelo selvagem Phe (2,5%).

TABELA 3 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

Alelos	Frequência
Val	0,662
Ile	0,338
Cys	0,975
Phe	0,025

FONTE: A autora (2022).

4.4 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG (EHW)

Considerando o grau de liberdade 5 ($GL_5 = 12,592$), e X^2 igual a 85,9, podemos inferir de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg que a população não está em equilíbrio ($p:0,05$) (Tabela 4).

TABELA 4 – EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA VAL1016ILE E PHE1534CYS.

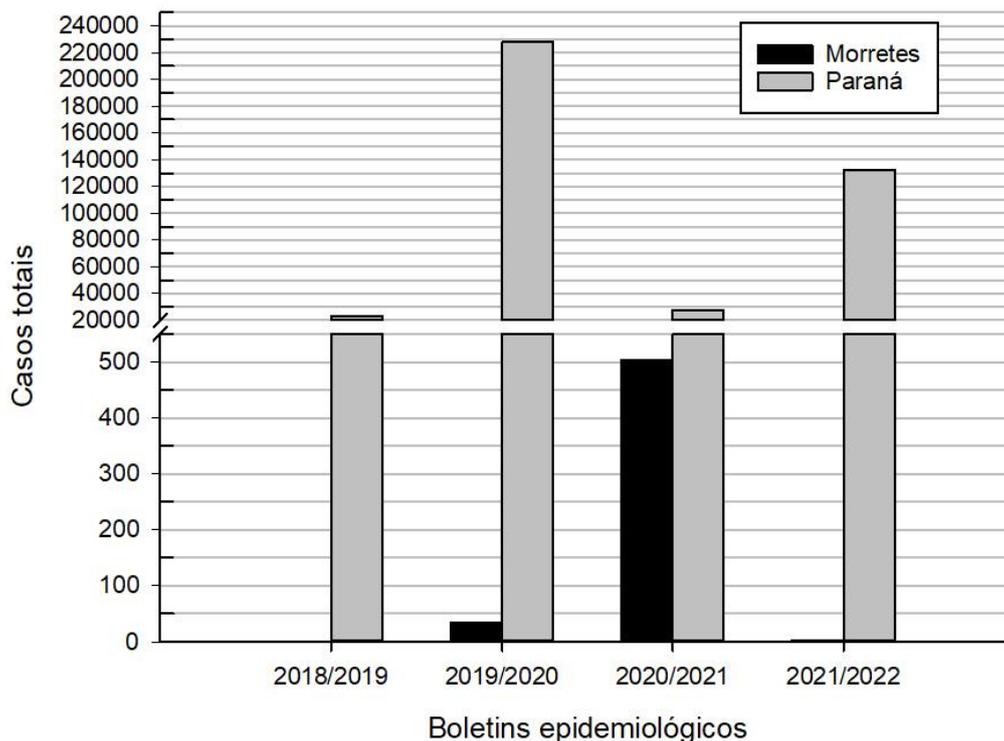
Genótipos	Observado	Esperado	(Obs – Esp) ² /Esp
SS	0	0,00625	0,00625
SR1	0	0,65000	0,65000
SR2, R1R3	0	0,32500	0,32500
SR3	1	0,01250	78,01250
R1R1	14	16,90000	0,49763
R1R2	24	16,90000	2,98284
R2R2	1	4,22500	2,46168
R2R3	0	0,32500	0,32500
R3R3	0	0,00625	0,00625

FONTE: A autora (2022).

4.5 REGISTROS EPIDEMIOLÓGICOS

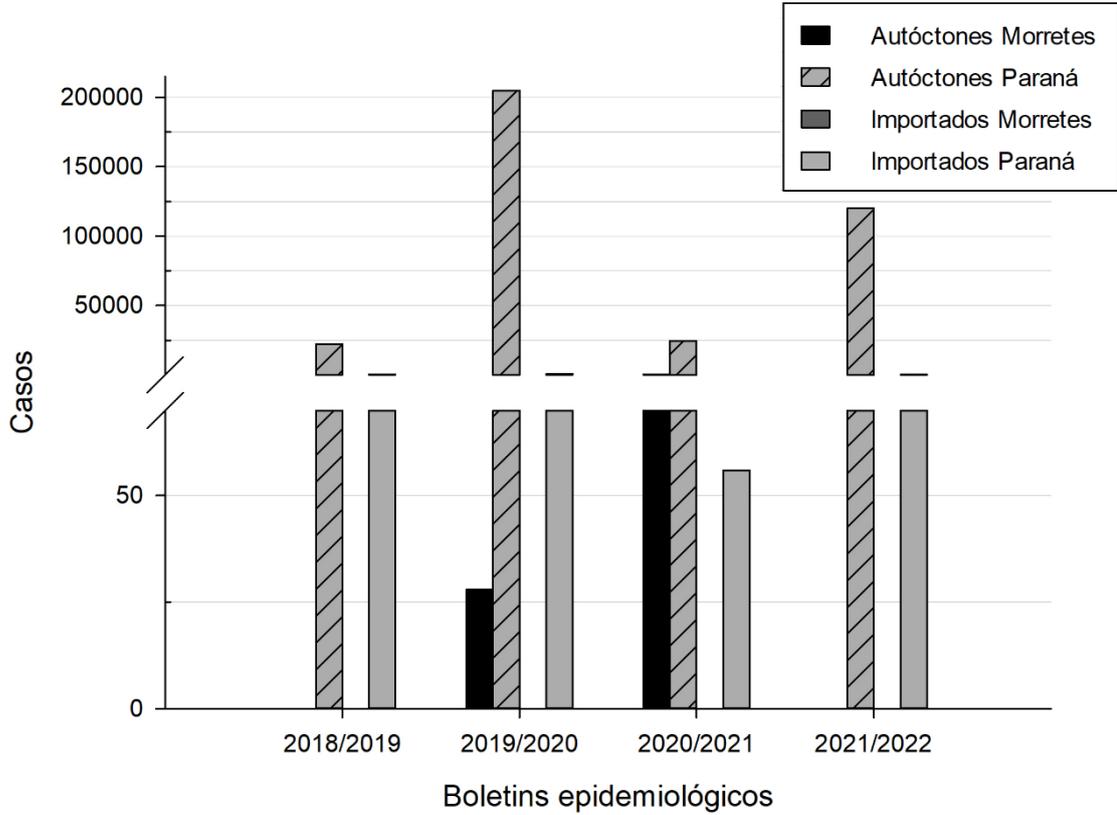
No que se refere aos casos totais de dengue, nos boletins de 2018/2019, em Morretes não foi confirmado nenhum caso, enquanto no Paraná foram confirmados 22.946 casos (FIGURA 8), sendo 22.360 autóctones e 586 importados (FIGURA 9). No período 2019/2020, 35 casos foram confirmados em Morretes, sendo 28 autóctones e 7 inconclusivos, já em relação ao Paraná no mesmo período, foram confirmados 224.598 casos, sendo 204.785 autóctones e 840 importados. Em 2020/2021 foram 503 casos confirmados em Morretes, onde 489 foram casos autóctones e 14 inconclusivos, já no Paraná, no mesmo período foram 27.889 casos confirmados, deles 24.634 autóctones e 56 importados. Por fim, no período de 2021/2022, foram três casos confirmados inconclusivos, enquanto no Paraná foram 132.328 casos, destes 120.073 autóctones e 309 importados.

FIGURA 8 – NÚMERO DE CASOS TOTAIS DE DENGUE EM MORRETES E NO PARANÁ



FONTE: A autora (2022).

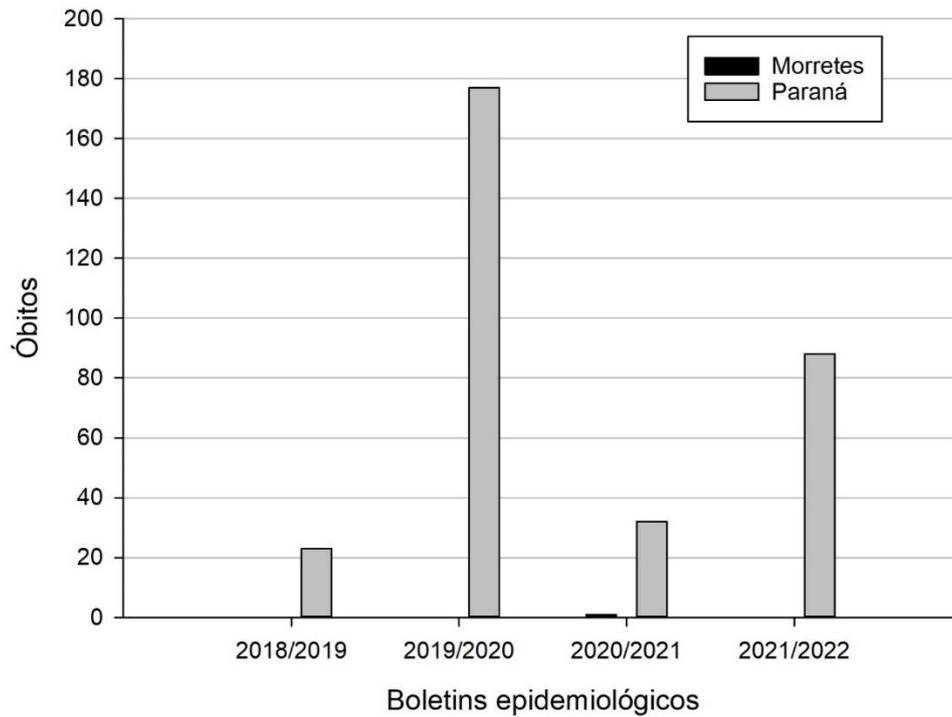
FIGURA 9 – NÚMERO DE CASOS IMPORTADOS E AUTÓCTONES DE DENGUE EM MORRETES E NO PARANÁ



FONTE: A autora (2022).

Em relação ao número de óbitos, Morretes apresentou apenas um caso no período epidemiológico de 2020/2021, enquanto no Paraná foram 23 em 2018/2019, 177 em 2019/2020, 32 em 2020/2021 e 88 em 2021/2022 (FIGURA 10).

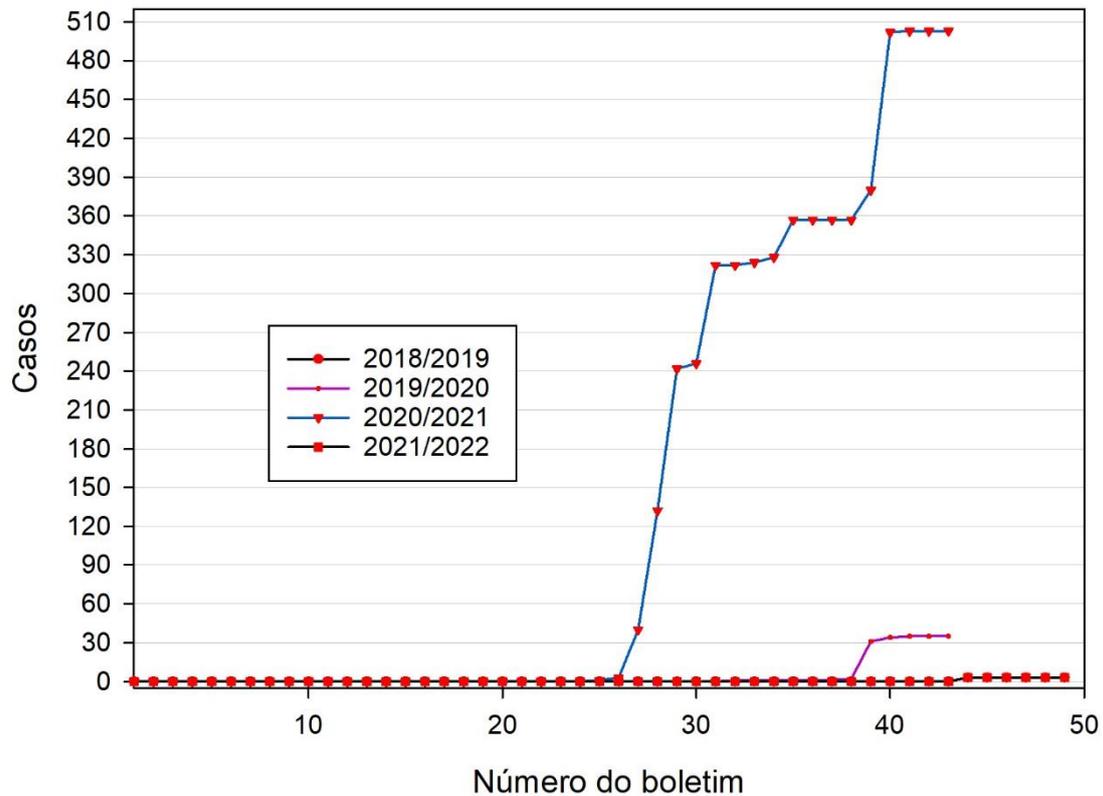
FIGURA 10 – NÚMERO DE ÓBITOS DE MORRETES E DO PARANÁ



FONTE: A autora (2022).

Em 2019/2020, o aumento do número de casos foi mais expressivo considerando o boletim 29 de 19/05/2020, quando aumentou de 2 casos para 31. Logo, no boletim 43 de 14/07/2020, os casos continuaram aumentando até 35. Em 2020/2021, o crescimento mais expressivo ocorreu no boletim 27, aumentando de 3 para 40 casos, ademais, o crescimento continuou expressivo até o fim do período epidemiológico, no boletim 43 de 03/08/2021 (FIGURA 11).

FIGURA 11 – RELAÇÃO DE CASOS DE DENGUE EM MORRETES EM FUNÇÃO DOS BOLETINS DE CADA ANO QUE FOI ANALISADO.



FONTE: A autora (2022).

Em relação aos dados de chikungunya e Zika no município de Morretes, apenas um caso de chikungunya foi notificado nos boletins de 2019/2020, enquanto foram confirmados 10 casos de chikungunya e 11 de Zika no estado. Outro caso foi notificado no período de 2020/2021 no município, e no estado foram confirmados 94 casos de chikungunya e 2 de Zika.

5 DISCUSSÃO

As mutações de resistência a kdr no Brasil foram identificadas pela primeira vez em 2001 nos estados de Alagoas, Sergipe e Rio de Janeiro, e, atualmente ocorre em todas as regiões do Brasil (MELO COSTA et al., 2020). As populações de *S. aegypti* de Morretes apresentaram predominância do genótipo R1R2 (Val⁺/Ile^{kdr} + Cys^{kdr}/Cys^{kdr}), como observado em outras regiões do Brasil (MELO COSTA et al., 2020). Já o genótipo R1R1 (Val⁺/Val⁺ + Cys^{kdr}/Cys^{kdr}) foi mais frequente em Morretes que nas outras regiões onde predominou o R2R2 (Ile^{kdr}/Ile^{kdr} + Cys^{kdr}/Cys^{kdr}).

É proposto que o haplótipo R1 foi o primeiro a ocorrer nas populações, conferindo baixo grau de resistência, ademais, impedindo a atuação apenas de piretróides do tipo I, e então, posteriormente, o R2 pôde ser rapidamente selecionado e dispersado, já que confere maior grau de resistência, impedindo a ligação de piretróides do tipo I e II (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2018; VERA-MALLOOF et al., 2015). O genótipo R1R2 apresenta resistência intermediária (PAULO BRITO et al., 2018), diante do cenário, e, observando-se que a maior frequência encontrada é do heterozigoto, a população pode estar em processo de transição para uma população R2R2 resistente, principalmente quando observamos que a segunda maior frequência é do genótipo R1R1, e que apenas um indivíduo apresenta o genótipo R2R2.

É possível notar que grande parte da população já apresenta o haplótipo resistente, independentemente de ser R1 ou R2, uma vez que apenas um indivíduo com genótipo selvagem foi encontrado, além disso, este mosquito apresenta também o haplótipo R3 (Ile^{kdr} + Phe⁺), raramente encontrado e que não altera a sensibilidade do canal a piretróides, uma vez que a mutação Ile^{kdr} sozinha não confere resistência, atuando em sinergia com a mutação Cys^{kdr} (PAULO BRITO et al., 2018). Ademais, apenas um indivíduo com o genótipo R2R2 foi encontrado, o que indica necessidade de monitoramento desta população, uma vez que este é o genótipo com maior grau de resistência. Devido a esta característica adicionada à manutenção de aplicação de piretróides, ele pode aumentar de frequência na população, sendo selecionado e dispersado rapidamente, podendo futuramente causar problemas de controle destes mosquitos.

Nos períodos epidemiológicos 2018/2019 e 2021/2022, a incidência de dengue foi considerada baixa pelo Ministério da Saúde (abaixo de 10 casos por 10.000 habitantes), nos períodos de 2019/2020 de incidência moderada (acima de 10 casos e <30 casos por 10.000 habitantes) e alta incidência nos períodos de 2020/2021 (acima de 30 casos por 10.000 habitantes). Nota-se ainda, um aumento expressivo dos casos em todo o Paraná no período de 2019/2020 que não foi acompanhado por Morretes, isso pode ser explicado, pois, as cidades em estado de epidemia estavam concentradas no norte, noroeste e oeste do estado, em que, apenas Paranaguá da região do litoral apresentava alta incidência de casos, provavelmente devido a presença de risco climático que essas regiões apresentavam na época (LOUREIRO; DE ALMEIDA; DE SOUZA, 2021; SESA, 2020). Apesar da queda de casos que ocorreu no Paraná no período de 2020/2021 em relação ao período anterior,

especificamente em Morretes, observou-se um aumento de casos, o que pode ser explicado quando compara-se com outras cidades do litoral, onde grande parte apresentou em conjunto um alto índice de casos, com menores índices na região norte, noroeste e oeste do estado em relação ao período anterior, mostrando uma maior concentração de casos nessa região que não foi acompanhada pelo estado inteiro, a alta incidência de casos pode ser explicado pelo risco climático médio que estava ocorrendo na região do litoral no início do aumento de casos do período (Boletim 28, 2020/2021, FIGURA 11) (SESA, 2021). Em relação às arboviroses Zika e chikungunya, como não houve nenhum caso em nenhum dos períodos analisados, provavelmente estes vírus não circulou no município, ademais, quando analisa-se os outros municípios próximos, foram registrados menos de 3, sendo a maioria de casos importados (SESA, 2022), sugerindo que não ocorreu a circulação destes vírus na região.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização do presente estudo, foi possível observar a presença de genes de resistência a piretróides, principalmente para a mutação Phe1534Cys na população de *Stegomyia aegypti* de Morretes, o que pode comprometer o controle destes mosquitos no município. A alta presença do alelo mutante 1534Cys^{kdR} indica, portanto, a presença de uma pressão de seleção que está atuando sobre a população, provavelmente ocasionada pelo uso de inseticidas a base de piretróides, consequentemente demonstrando a necessidade de monitoramento destas mutações, uma vez que a efetividade do controle pode estar sendo comprometida por sua própria utilização. Além disso, situações de alta incidência de dengue podem voltar a atingir o município, como aconteceu no período de 2020/2021, associados a baixa eficiência no controle químico fundamentado em piretróides, em função da presença de mutações associadas à resistência destes compostos presentes na população.

REFERÊNCIAS

- APONTE, Angélica; PENILLA, R. Patricia; RODRÍGUEZ, Américo D.; OCAMPO, Clara B. Mechanisms of pyrethroid resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* from Colombia. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 191, n. December 2018, p. 146–154, 2019.
- AYRES, Constância F. J. et al. The V410L knockdown resistance mutation occurs in island and continental populations of *Aedes aegypti* in West and Central Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. e0008216, 2020.
- BARBOSA, Isabelle Ribeiro; PEREIRA, Lúcio Silva. Influência dos determinantes sociais e ambientais na distribuição espacial da dengue no município de Natal-RN. **Revista Ciência Plural**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 62–75, 2015.
- BECKER, Norbert; PETRIC, Dusan; ZGOMBA, Marija; BOASE, Clive; MADON, Mino; DAHL, Christine; KAISER, Achim. **Mosquitoes and Their Control**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.
- BONIZZONI, Mariangela; GASPERI, Giuliano; CHEN, Xioaguang; JAMES, Anthony A. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: Current knowledge and future perspectives. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 460–468, 2013.
- BURNS, Carol J. et al. Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 16, n. 3-4, p. 127-283, 2013.
- CLEMENTS, Alan N.; HARBACH, Ralph E. Controversies over the scientific name of the principal mosquito vector of yellow fever virus – expediency versus validity. **Journal of Vector Ecology**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 1–14, 2018.
- COGAN, J. E. **Dengue and severe dengue**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 27 set. 2022.
- CONSOLI, Rotraut A. G. B.; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço De. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [S.l.] : Editora FIOCRUZ, 1994.
- DAVID, Mariana Rocha; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo; DE FREITAS, Rafael Maciel. Container productivity, daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* mosquitoes in a high income dengue epidemic neighbourhood of Rio de Janeiro: presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, p. 927–932, 2009.
- ELLIOTT, M.; JANES, N. F. Synthetic Pyrethroids-a new class of insecticide. **Chemical Society Reviews**, v.7, n. 4, p. 473–505, 1978.
- FLAUZINO, Regina Fernandes; SOUZA-SANTOS, Reinaldo; DE OLIVEIRA, Rosely Magalhães. Indicadores socioambientais para vigilância da dengue em nível local. **Saúde e Sociedade**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 225–240, 2011.

GARCIA, Leila Posenato. Epidemia do vírus Zika e microcefalia no Brasil: Emergência, evolução e enfrentamento. [S. l.], 2018.

GRIFFITHS, A. G. F., Doebley, J., Lewontin, R. C., & Carroll, S. B. **Introdução à genética**. 11 ed., Guanabara Koogan, 2016

HADDI, Khalid; TOMÉ, Hudson V. V.; DU, Yuzhe; VALBON, Wilson R.; NOMURA, Yoshiko; MARTINS, Gustavo F.; DONG, Ke; OLIVEIRA, Eugênio E. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. **Scientific Reports** 2017 7:1, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

HARTL, Daniel L.; CLARK, Andrew G. **Princípios de Genética de População**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HIRATA, Rodobiko. Piretróides: Estrutura química - atividade biológica. **Química Nova**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 368–374, 1995.

HOWARD, Leland Ossian. Mosquitoes: how they live; how they carry disease; how they are classified; how they may be destroyed. **McClure, Phillips & Company**, [S. l.], 1901.

IBGE. **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. 2021. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/morretes/panorama>. Acesso em: 25 maio 2022.

KAMGANG, Basile; BRENGUES, Cécile; FONTENILLE, Didier; NJIOKOU, Flobert; SIMARD, Frédéric; PAUPY, Christophe. Genetic Structure of the Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20257, 2011.

KRAEMER, Moritz U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **eLife**, v. 4, n. JUNE2015, p. 1–18, 2015.

LIMA-CAMARA, Tamara Nunes. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 36, 2016.

LINSS, Jutta; PAULO BRITO, Luiz; AZAMBUJA GARCIA, Gabriela; SAORI ARAKI, Alejandra; VIEIRA BRUNO, Rafaela; BENTO PEREIRA LIMA, José; VALLE, Denise; JESUS MARTINS, Ademir. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. **Parasites & vectors**, v.7, n. 1, p. 1-11, 2014.

LOUREIRO, Amanda Beatriz; DE ALMEIDA, José Adolfo Mota; DE SOUZA, Alex Sandro Barros. Levantamento de dados sobre a epidemia de dengue na cidade de Alto Paraíso, Paraná, Brasil: Uma questão de saúde pública / Data survey of dengue epidemic in the city of Alto Paraíso, Paraná, Brazil: A public health issue. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 4052–4069, 2021.

MAESTRE-SERRANO, Ronald; GOMEZ-CAMARGO, Doris; PONCE-GARCIA, Gustavo; FLORES, Adriana E. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 116, p. 63–73, 2014.

MARTINS, Ademir Jesus; LIMA, José Bento Pereira; PEIXOTO, Alexandre Afranio; VALLE, Denise. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. **Tropical Medicine and International Health**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 1351–1355, 2009.

MATTINGLY, P. F. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 392–408, 1957.

MELO COSTA, Monique; CAMPOS, Kauara Brito; BRITO, Luiz Paulo; ROUX, Emmanuel; MELO RODOVALHO, Cynara; BELLINATO, Diogo Fernandes; LIMA, José Bento Pereira; MARTINS, Ademir Jesus. Kdr genotyping in *Aedes aegypti* from Brazil on a nation-wide scale from 2017 to 2018. **Scientific Reports 2020 10:1**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-70029-7.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em saúde. Monitoramento dos casos de arbovirose até a semana epidemiológica 37 de 2022. **Boletim Epidemiológico**. Brasília, 2022.

MOYES, Catherine L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. Public Library of Science, 2017.

PAULO BRITO, Luiz; CARRARA, Luana; MACIEL DE FREITAS, Rafael; BENTO PEREIRA LIMA, José; MARTINS, Ademir J. Levels of Resistance to Pyrethroid among Distinct kdr Alleles in *Aedes aegypti* Laboratory Lines and Frequency of kdr Alleles in 27 Natural Populations from Rio de Janeiro, Brazil. **BioMed research international**, 2018.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect molecular biology**, v. 16, n. 6, p. 785–798, 2007.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, Karla et al. Parallel evolution of vgsc mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. **Scientific Reports 2018 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

SCARPASSA, Vera Margarete; CARDOZA, Tatiana Bacry; CARDOSO JUNIOR, Rubens P. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 2008.

SESA, Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. **Boletins da dengue**. 2022. Disponível em: www.dengue.pr.gov.br/Pagina/Boletins-da-Dengue. Acesso em 10 de jan. 2023.

SESA, Secretaria Estadual de Saúde. **Informe técnico 43 – Período 2019/2020**. 2020. Disponível em: www.dengue.pr.gov.br/Pagina/Boletins-da-Dengue. Acesso em 10 de jan. 2023.

SESA, Secretaria Estadual de Saúde. **Informe técnico 28 - Período 2020/2021**. 2021. Disponível em: www.dengue.pr.gov.br/Pagina/Boletins-da-Dengue. Acesso em 10 de jan. 2023.

SILVA, Nayara Messias Da; TEIXEIRA, Ricardo Antônio Gonçalves; CARDOSO, Clever Gomes; SIQUEIRA JUNIOR, João Bosco; COELHO, Giovanini Evelim; OLIVEIRA, Ellen Synthia Fernandes De. Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. e2017127, 2018.

VALLE, Denise; PIMENTA, Denise Nacif; CUNHA, Rivaldo Venâncio Da. **Dengue: teorias e práticas**. [s.l.] : Editora FIOCRUZ, 2015.

VARIZA, Paula Fassicolo; LORENZ, Camila; OLIVEIRA, Joice Guilherme De; FERNANDES, Millena; NETTO, Sérgio Antonio; PROPHIRO, Josiane Somariva. Updated spatio-temporal distribution of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Brazil. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 232, p. 106511, 2022.

VERA-MALLOF, Farah Z.; SAAVEDRA-RODRIGUEZ, Karla; ELIZONDO-QUIROGA, Armando E.; LOZANO-FUENTES, Saul; BLACK IV, William C. Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. e0004263, 2015.

VIANA, Dione Viero; IGNOTTI, Eliane. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 240–256, 2013.

VIANA-MEDEIROS, P. F.; BELLINATO, D. F.; MARTINS, A. J.; VALLE, D. Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, n. 4, p. 340–350, 2017.

ZHOROV, Boris S.; DONG, Ke. Elucidation of pyrethroid and DDT receptor sites in the voltage-gated sodium channel. **NeuroToxicology**, v. 60, p. 171–177, 2017.