

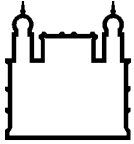
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Aedes Aegypti*: UMA ANÁLISE TEMPORAL DA DINÂMICA
DA RESISTÊNCIA**

DIOGO FERNANDES BELLINATO

Rio de Janeiro
Junho de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DIOGO FERNANDES BELLINATO

Título da Dissertação **Avaliação quantitativa do monitoramento da resistência a inseticidas em populações brasileiras de *Aedes aegypti*: uma análise temporal da dinâmica da resistência**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientador (es): Dr^a. Denise Valle (IOC/Fiocruz)
Dr. Daniel Antunes Maciel Villela (PROCC/Fiocruz)

Rio de Janeiro
Junho de 2018

Bellinato, Diogo Fernandes.

Avaliação quantitativa do monitoramento da resistência a inseticidas em populações brasileiras de *Aedes aegypti*: *uma análise temporal da dinâmica da resistência / Diogo Fernandes Bellinato*. - Rio de Janeiro, 2018.

164 f.; il.

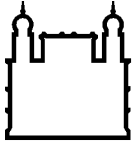
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientadora: Denise Valle.

Co-orientador: Daniel Antunes Maciel Villela.

Bibliografia: f. 102-117

1. *Aedes aegypti*. 2. *Resistência a inseticidas*. 3. *Mecanismos de resistência*. 4. *Incidência de casos de dengue*. 5. *Revisão sistemática*. I. *Título*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: DIOGO FERNANDES BELLINATO

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DO MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM POPULAÇÕES
BRASILEIRAS DE *Aedes aegypti*: UMA ANÁLISE TEMPORAL DA DINÂMICA DA RESISTÊNCIA**

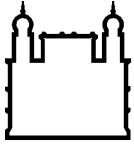
ORIENTADOR (ES): Dr. Denise Valle (IOC/Fiocruz)
Dr. Daniel Antunes Maciel Villela (PROCC/Fiocruz)

Aprovado em: 20 / 06 / 2018

EXAMINADORES:

Dr. Rafael Maciel de Freitas - Revisor e Presidente (IOC/Fiocruz - RJ)
Dr. Mário Antônio Navarro (UFPR)
Dr. Leonardo Bastos (PROCC/Fiocruz - RJ)
Dr^a. Cynara de Melo Rodvalho (IOC/Fiocruz - RJ)
Dr. Max Oliveira de Souza (UFF - RJ)

Rio de Janeiro, 20 de junho de 2018.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

"não sei bem onde foi que me perdi;
talvez nem tenha me perdido mesmo,
mas como é estranho pensar que isto
aqui fosse o meu destino desde o começo."

(Antônio Cícero)

**Dedico esta dissertação a Deus, a minha
família e a minha orientadora Dr^a. Denise Valle
por acreditarem em mim.
Obrigado!**

AGRADECIMENTOS

Sou grato pela vida e pelas pessoas que fazem parte dela, mas acima de tudo grato a Deus por me conceder tudo isso. “Como é feliz o homem que acha a sabedoria, o homem que obtém entendimento, pois a sabedoria é mais proveitosa do que a prata e rende mais do que o ouro. É mais preciosa do que rubis; nada do que você possa desejar se compara a ela”. Provérbios 3:13-15.

Aos meus pais, por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar. A todos os meus familiares, irmãos, primos, tios, sobrinho, amigos e afilhados. Não citarei nomes, para não me esquecer de ninguém. Mas há aquelas pessoas especiais que diretamente me incentivaram. A minha Vó Rosa pela garra, perseverança, simplicidade e fé.

Gostaria de agradecer especialmente a minha orientadora, Dra. Denise Valle, por me guiar ao longo dessa jornada, que começou uns 13 anos atrás, da maneira mais imprevisível possível, uma pia...rs, minto, eram umas seis! Agradeço pela oportunidade, orientação, cobranças e por principalmente acreditar em mim, até mais do que eu. Tudo isto compôs uma somatória fundamental não só para a construção do pensamento que se traduz nas páginas desta dissertação hoje entregue, mas como para a maturidade de toda uma vida a seguir: antes de tudo, este momento se dedica a esta grande mestre e amiga com carinho.

Ao meu orientador Dr. Daniel Villela, por aceitar a tarefa de me guiar pelo universo das análises estatísticas durante o mestrado, pela paciência e ensinamentos. Obrigado!

Aos amigos e equipe do Laficave, em especial aos Drs José Bento e Ademir Martins, pelos ensinamentos.

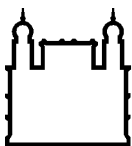
Agradeço também a toda equipe do Labmof, pelo apoio de sempre, principalmente a Dra Myrna.

Agradeço ao Dr. Rafael Maciel de Freitas, pela revisão da dissertação, considerações e amizade.

Aos membros da banca examinadora, Dr^a. Cynara, Dr. Leonardo, Dr Mário e Dr Max, obrigado por aceitarem o convite.

Aos colegas da turma de mestrado de 2016, em especial aos Furões da BP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - Faperj pelo auxílio financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

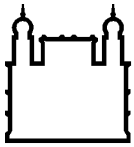
**Avaliação quantitativa do monitoramento da resistência a inseticidas em populações brasileiras de *Aedes aegypti*:
uma análise temporal da dinâmica da resistência**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Diogo Fernandes Bellinato

Aedes aegypti é o vetor de uma série de arboviroses que atualmente circulam no Brasil, como dengue, Zika e chikungunya. Na ausência de vacinas ou de medicamentos específicos, a redução da densidade das populações de *A. aegypti* é a principal ferramenta de controle destes agravos. Ainda hoje, o controle químico é bastante confundido com o controle do vetor, ou seja, inseticidas continuam sendo amplamente aplicados em saúde pública. No Brasil, os organofosforados (OP) têm sido usados contra *A. aegypti* por anos, desde 1967, e os piretroides (PY) desde 2000. Os compostos mais amplamente utilizados em âmbito nacional têm sido o larvicida temephos (OP) e o adulticida deltametrina (PY). Em 2009, os Reguladores do Desenvolvimento de Insetos (IGR) e o OP malathion foram introduzidos para utilização, respectivamente, no controle de larvas e de adultos. O uso intenso de inseticidas pode selecionar indivíduos resistentes nas populações naturais do vetor, eliminando os espécimes suscetíveis e reduzindo a variabilidade das populações. No presente estudo, apresentamos: (1) uma revisão sistemática, baseada na bibliografia disponível até julho de 2017 e em dados inéditos de nossa equipe, do *status* da resistência a temephos e deltametrina de populações brasileiras de *A. aegypti*; estes dados foram avaliados por Região e comparados com a incidência de dengue por município e com o fornecimento de inseticidas aos estados, (2) o perfil de suscetibilidade de 12 populações do vetor frente ao IGR diflubenzuron, um inibidor de síntese de quitina, após sua introdução no país e (3) o uso de ferramentas matemáticas para procurar correlações entre resistência a inseticidas com os mecanismos avaliados e, potencialmente, com a incidência de dengue. Ensaios dose-resposta detectaram altos níveis de resistência para o temephos e para deltametrina embora todas as amostras avaliadas tenham sido suscetíveis ao diflubenzuron. Diferentes padrões regionais de incidência de dengue foram identificados e sua correlação com a resistência a inseticidas foi variável. Os dados também permitiram comparar duas metodologias qualitativas de avaliação da resistência de adultos a inseticidas, 'CDC' (garrafas impregnadas) e 'WHO' (papéis impregnados), sugerindo que a primeira tende a induzir maiores taxas de mortalidade. A resistência metabólica sempre foi maior em fêmeas adultas do que em larvas; glutatona-S-transferases e esterases foram as principais classes enzimáticas alteradas. Em algumas populações do vetor, no caso de resistência a PY, foi possível identificar a opção por resistência metabólica ou, alternativamente, por alteração do sítio-alvo. Regressão de Poisson identificou relação significativa entre resistência e taxas de incidência de dengue, sugerindo impacto da intensificação do controle químico nos perfis de populações do vetor. Regressão logística detectou associação entre o sítio alvo de PY, o Nav, e resistência a deltametrina; foram ainda detectadas alterações de classes específicas de enzimas detoxificantes e resistência a deltametrina, mas não a temephos. Para compreender o perfil da contribuição das diferentes variáveis disponíveis sobre a resistência, iniciamos a decomposição de dados por Análise de Componentes Principais (PCA). O histórico do *status* da resistência a temephos e deltametrina em populações brasileiras de *A. aegypti* revelou a disseminação da resistência aos principais inseticidas utilizados pelo Programa Nacional de Controle da Dengue, mostrando o caráter multifatorial da resistência no país.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Quantitative evaluation of insecticide resistance monitoring in Brazilian populations of *Aedes aegypti*: a temporal analysis of the dynamics of resistance

ABSTRACT

MASTERS DISSERTATION IN PARASITOLOGY

Diogo Fernandes Bellinato

Aedes aegypti is the vector of a series of arboviruses currently circulating in Brazil, such as dengue, Zika and chikungunya. In the absence of vaccines or specific drugs, the reduction of the density of *A. aegypti* populations is the main tool to control these diseases. Even today, chemical control is greatly confused with vector control, that is, insecticides continue to be widely applied in public health. In Brazil, organophosphates (OP) have been used against *A. aegypti* for years, since 1967, and pyrethroids (PY) since 2000. The most widely used compounds at the national level have been temephos for larvae (OP) and deltamethrin as adulticide (PY). In 2009, Insect Growth Regulators (IGR) and the OP malathion were introduced for use, respectively, in larval and adult control. The intense use of insecticides can select resistant individuals in natural populations of the vector, eliminating susceptible specimens and reducing the variability of the populations. In the present study, we present: (1) a systematic review, based on the bibliography available until July 2017 and unpublished data from our team, of the resistance status to temephos and deltamethrin of Brazilian *A. aegypti* populations; these data were evaluated by geographic region and compared to the incidence of dengue per municipality and the supply of insecticides to the states, (2) the susceptibility profile of 12 populations of the vector against the IGR diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, after its introduction in the country and (3) the use of mathematical tools to search for correlations between insecticide resistance and the evaluated mechanisms and, potentially, dengue incidence. Dose-response tests detected high levels of resistance to temephos and to deltamethrin although all samples tested were susceptible to diflubenzuron. Different regional patterns of dengue incidence were identified and their correlation with resistance to insecticides was variable. The data also allowed us to compare two qualitative methodologies for assessing the resistance of adults to insecticides, 'CDC' (impregnated bottles) and 'WHO' (impregnated papers), suggesting that the former tends to induce higher mortality rates. Metabolic resistance has always been higher in adult females than in larvae; glutathione-S-transferases and esterases were the major enzymatic classes altered. In some populations of the vector, in the case of resistance to PY, it was possible to identify the option for metabolic resistance as the main mechanism selected or, alternatively, alteration of the target site. Poisson regression identified a significant relationship between resistance and dengue incidence rates, suggesting the impact of chemical control intensification on the profiles of vector populations. Logistic regression detected association between the target site of PY, Na_v , and resistance to deltamethrin; alterations of specific classes of detoxifying enzymes and resistance to deltamethrin, but not to temephos, were also detected. In order to understand the contribution profile of the different available variables on resistance, we started the data decomposition by Principal Component Analysis (PCA). The historic of temephos and deltamethrin resistance status in Brazilian *A. aegypti* populations showed the dissemination of resistance to the main insecticides used by the Brazilian Dengue Control Program, revealing the multifactorial character of the resistance in the country.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Aedes aegypti</i> - importância epidemiológica.....	1
1.2 Controle vetorial.....	3
1.3 Inseticidas.....	5
1.3.1 Organoclorados	5
1.3.2 Piretroides.....	5
1.3.3 Carbamatos	6
1.3.4 Organofosforados	6
1.3.5 Espinosinas.....	7
1.4 Resistência a inseticidas e mecanismos de resistência.....	7
1.4.1 Resistência comportamental.....	8
1.4.2 Redução na penetração do inseticida.....	8
1.4.3 Resistência metabólica	9
1.4.4 Alteração do sítio alvo.....	11
1.5 Histórico da resistência no Brasil.....	12
1.6 Justificativa.....	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	16
3.1 Capítulo 1 - Revisão do <i>status</i> da resistência a inseticidas em populações brasileiras de <i>A. aegypti</i>	17
3.1.1 Materiais e Métodos.....	20
3.1.2 Resultados.....	26
3.1.3 Discussão	51
3.2 CAPÍTULO 2 - Avaliação do status de susceptibilidade de 12 populações de <i>A. aegypti</i> aos inseticidas utilizados na rotina do controle no país, incluindo, além de temephos e deltametrina, o CSI diflubenzuron	61
3.3 CAPÍTULO 3 - Perfis de resistência a inseticidas e de incidência de dengue	78

3.3.1	Materiais e Métodos.....	82
3.3.2	Resultados.....	84
3.3.3	Discussão	93
4	 DISCUSSÃO GERAL	98
5	 CONCLUSÕES	101
6	 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
7	 ANEXO	118
7.1	Anexo 1 - Tabelas Capítulo 1.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da distribuição global prevista de <i>A. aegypti</i>	1
Figura 2: Ciclo de vida do mosquito <i>A. aegypti</i>	2
Figura 3: Principais modificações que resultam em maior atividade enzimática.....	10
Figura 4: Diagrama de fluxo PRISMA.	25
Figura 5: Comparação entre as metodologias 'CDC' e 'WHO' - Região Norte	29
Figura 6: Comparação entre as RR para deltametrina e mecanismos de resistência	31
Figura 7: Comparação entre as metodologias 'CDC' e 'WHO' - Região Nordeste	36
Figura 8: Comparação entre as RR para deltametrina e mecanismos de resistência	38
Figura 9: Comparação entre as metodologias 'CDC' e 'WHO' - Região Sudeste	41
Figura 10: Comparação entre as RR para deltametrina e mecanismo de resistência	42
Figura 11: Comparação entre as metodologias 'CDC' e 'WHO' - Região Sul	44
Figura 12: Comparação entre as metodologias 'CDC' e 'WHO' - Região Centro-Oeste	46
Figura 13: Incidência de dengue, Luziânia (2011)	47
Figura 14: Comparação entre as RR para deltametrina e mecanismo de resistência	48
Figura 15: Representação gráfica de uma PCA	76
Figura 16 : Representação gráfica das três variáveis e suas distribuições nos PC1 e PC2	77
Figura 17: Representação gráfica da relação entre as médias das razões de resistência de larvas ao temephos e das taxas de incidência de dengue	81
Figura 18: Representação gráfica da relação entre as médias das razões de resistência de adultos a deltametrina e das taxas de incidência de dengue	82
Figura 19: Representação gráfica da relação entre a frequência do alelo <i>Nav</i> suscetível (<i>NavS</i>) e as razões de resistência de adultos a deltametrina	86
Figura 20: Representação gráfica das 12 variáveis relacionadas à resistência em larvas de <i>A. aegypti</i> e suas distribuições nos PC1 e PC2	87
Figura 21: Mapa dos fatores individuais, larvas	87
Figura 22: Representação gráfica das 15 variáveis relacionadas a resistência em adultos de <i>A. aegypti</i> nos dois primeiros PC da PCA.	88
Figura 23: Mapa dos fatores individuais, adultos	88
Figura 24: Esquema da relação entre a incidência de dengue e a resistência aos inseticidas	93

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: larvicidas recomendados pela WHOPES	4
Quadro 2: aduicidas recomendados pela WHOPES para aplicação espacial	4
Tabela 1: dados sobre os inseticidas utilizados nas avaliações	20
Tabela 10: variações das taxas de incidência de dengue entre 2001 e 2012	33
Tabela 38: variações das taxas de incidência de dengue no Brasil, por Região	50
Tabela 39: taxas de dengue acima de 300 casos/100.000 habitantes	51
Tabela 40: taxas de dengue acima de 1.000 casos/100.000 habitantes	51
Tabela 41: regressão de Poisson - resistência a inseticidas x incidência de dengue	81
Tabela 42: regressão logística - resistência a inseticidas x mecanismos de resistência, larvas	83
Tabela 43: regressão logística - resistência a inseticidas x GAB, larvas	84
Tabela 44: regressão logística - resistência a inseticidas x mecanismos de resistência, adultos	85
Tabela 45: regressão logística - resistência a inseticidas x GAB, adultos	85
Tabela 46: regressão logística - resistência a PY x frequência do alelo <i>NavS</i>	86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Celsius
ACE	Acetilcolinesterase
<i>ace-1</i>	gene que codifica a acetilcolinesterase 1 dos insetos
<i>ace-2</i>	gene que codifica a acetilcolinesterase 2 dos insetos
AChE	Ensaio que mede atividade total da enzima acetilcolinesterase
AChI	Ensaio que mede a inibição da enzima acetilcolinesterase pelo carbamato proprocur
AHJ	análogos de hormônio juvenil
BHC	benzenohexacloro
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i>
CA	carbamato
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CE	concentrado emulsionável
CL	concentração letal
CO	Centro-Oeste
<i>CSI</i>	inibidores de síntese de quitina
CYP	genes que codificam P450
DD	dose-diagnóstica
DDT	dicloro-difenil-tricloroetano
DENV- 1-4	vírus dengue - sorotipos 1 a 4
DR	dose-resposta
DT	tablete de aplicação direta
EST	esterases
EW	emulsão
exp	exponencial natural
GAB	avaliação bioquímica 'global'
GABA	ácido gama-aminobutírico
GAB-AChE	avaliação bioquímica 'global', apenas resistência metabólica
GR	granulado
h	horas
IGR	<i>Insect Growth Regulators</i>
<i>kdr</i>	<i>knockdown resistant</i>
MFO	oxidases de função múltipla
MR	matriz de liberação
N	Norte
nAChR	receptores nicotínicos de acetilcolina
<i>Nav</i>	canal de sódio regulado por voltagem
NE	Nordeste
OC	organoclorado
OP	organofosforado
PCA	Análise de Componentes Principais
PNCd	Programa Nacional de Controle da Dengue
PY	piretroide
Rede Nacional	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de <i>A. aegypti</i>

MoReNAa	Inseticidas
RR	razão de resistência
S	Sul
SC	suspensão concentrada
SIT	<i>Sterile Insect Technique</i>
ULV	líquido de ultra baixo volume
WG	granulado dispersível em água
WHO	Organização Mundial em Saúde
WHOPES	<i>World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme</i>
WP	pó molhável
α -EST	esterases quantificadas com o substrato acetato de α -naftil
β -EST	esterases quantificadas com o substrato acetato de β -naftil
p NPA-EST	esterases quantificadas com o substrato acetato de p -nitrofenil

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti* - importância epidemiológica

Zika, chikungunya e dengue são arboviroses que têm como transmissor de seus agentes etiológicos o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), família Culicidae (Ordem: Díptera). É um mosquito extremamente antropofílico e sinantrópico, o que o torna um problema em saúde pública, e está distribuído geograficamente nas áreas tropicais e subtropicais do planeta (Figura 1) (Consoli & Oliveira 1994; Jasen & Beebe 2010; Kraemer et al. 2015; Oliveira 2015), principalmente entre as latitudes 35° N e 35° S (Braga & Valle 2007a; WHO 2009).

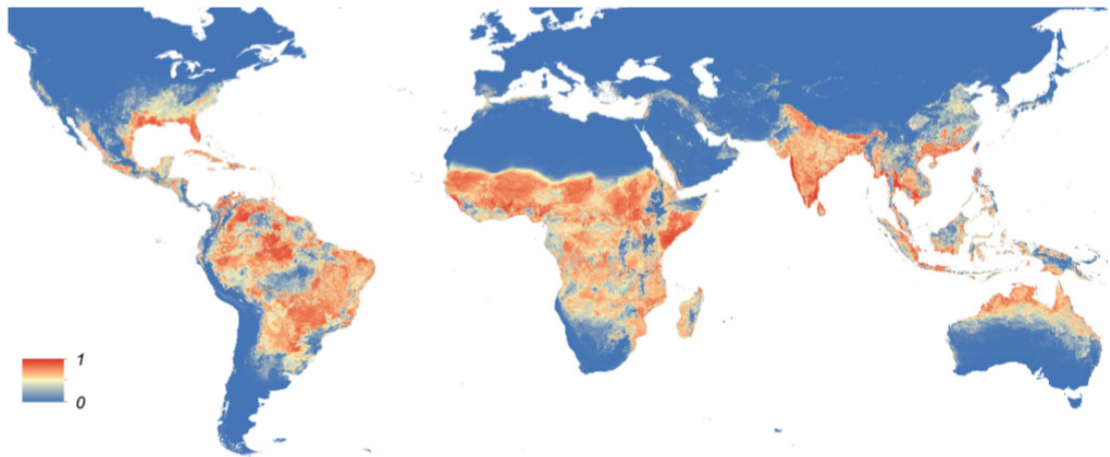


Figura 1: Mapa da distribuição global prevista de *A. aegypti*. O mapa exibe a probabilidade de ocorrência do vetor, em uma escala arbitrária de 0 (azul) a 1 (vermelho), em uma resolução espacial de 5 X 5 km (Figura adaptada de Kraemer et al. 2015).

Não existem antivirais contra estes patógenos e a proteção induzida pela vacina contra dengue, recentemente liberada para comercialização no território nacional (Anvisa 2015; Schwartz et al. 2015; Sanofi-Pasteur 2016), apresenta, entre outras questões, eficiência inferior a 70%. Além de a vacina estar indicada para uma fração pequena da população, não protege contra outros vírus transmitidos pelo vetor que assolam o país. Até o momento ainda não estão disponíveis vacinas contra os vírus Zika e chikungunya, mas possíveis candidatas estão em fase de ensaio clínico para Zika (NIAID/NIH 2017) e em desenvolvimento para chikungunya (Chang et al. 2014; Erasmus et al. 2016).

A. aegypti é um inseto holometábolo, e seu ciclo de vida consiste de ovo, quatro instares larvais, pupa e adulto (Figura 2). Seu desenvolvimento de ovo a mosquito adulto leva cerca de sete a 10 dias, dependendo das condições ambientais. Fêmeas grávidas de *A. aegypti* depositam seus ovos próximos à superfície da água parada, aderidos à parede de recipientes encontrados frequentemente no domicílio ou peridomicílio (Nelson 1986; Consoli & Oliveira 1994; Oliveira 2015). Em condições

controladas, em temperatura de 25 °C, a embriogênese está completa 77,5 horas depois da postura (Farnesi et al. 2009). Na natureza, isto é equivalente a aproximadamente três dias.

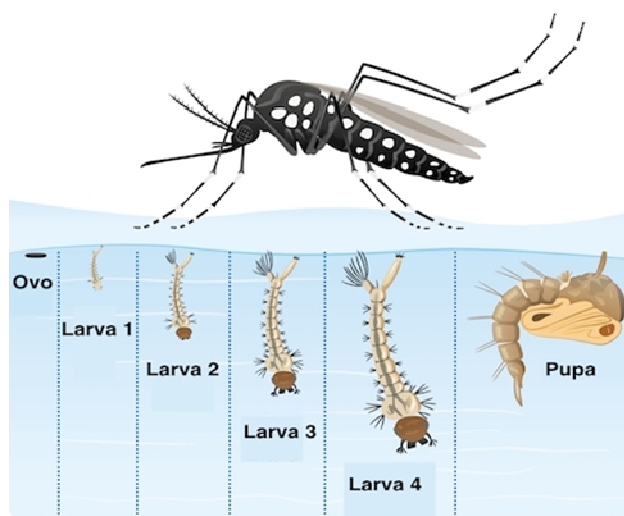


Figura 2: Ciclo de vida do mosquito *A. aegypti* (Figura adaptada de: <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/>).

Os ovos podem entrar em diapausa (estado de dormência temporária) e há registro de que têm o potencial de permanecer viáveis por até 490 dias (Silva & Silva 1999). Depois de imersos na água, os ovos eclodem dando origem a larvas aquáticas que se alimentam da matéria orgânica em suspensão presente nos criadouros. As pupas não se alimentam e passam quase todo tempo paradas em contato com a superfície da água (Consoli & Oliveira 1994; Forattini 2002; Oliveira 2015). Os adultos se alimentam de açúcares principalmente de origem vegetal, sendo os machos estritamente fitófagos. As fêmeas precisam de repasto sanguíneo para maturar seus ovos (Forattini 2002). A atividade hematofágica é maior no período crepuscular, mas pode ocorrer em qualquer momento do dia (Consoli & Oliveira 1994). Fêmeas de *A. aegypti* geralmente realizam mais de um repasto sanguíneo, em indivíduos diferentes, durante um mesmo ciclo gonotrófico (que corresponde ao período entre o repasto sanguíneo, a postura e a procura de um novo repasto). Esta característica, também conhecida como discordância gonotrófica, contribui para a importância epidemiológica de *A. aegypti*, eficiente vetor de vários agentes etiológicos (Consoli & Oliveira 1994; Oliveira 2005).

1.2 Controle vetorial

A principal forma de controle de epidemias veiculadas por *A. aegypti* é a redução da densidade do mosquito, o elo vulnerável da cadeia de transmissão (Tauil 2006). As estratégias comuns para redução da densidade consistem em medidas contra as larvas e adultos do vetor, sendo classificadas em controle mecânico, biológico ou químico (Braga & Valle 2007a; Brasil 2009a).

O controle mecânico tem base em atividades como a eliminação ou proteção adequada dos criadouros potenciais. A redução da densidade da infestação de mosquitos depende não somente da eliminação desses criadouros, como também de melhores condições das redes de abastecimento de água e esgotamento sanitário, bem como de coleta e destino adequado de resíduos (Tauil 2006; Braga & Valle 2007a; Brasil 2009a) e de ações envolvendo o engajamento social. Um exemplo deste último aspecto é o conceito “10 minutos contra o *Aedes*”, elaborado por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz, com base em estratégia de sucesso adotada em Cingapura durante uma epidemia de dengue, e que visava eliminar os criadouros domiciliares (Burattini et al. 2008; Aguiar & Valle 2015).

O controle biológico utiliza organismos que predam ou atacam as larvas e pupas, como pequenos peixes (exemplo: *Poecilia reticulada*), ou patógenos, como bactérias entomopatogênicas, *Bacillus thuringiensis var. israelensis (Bti)* (Becker et al. 2000; Araújo et al. 2013) e *Bacillus sphaericus* (Goldberg & Margalit 1977; Suryadi et al. 2015), e fungos como *Metharizum anisopliae* (Scholte et al. 2003; Paula et al. 2011) e *Beauveria bassiana* (Darbro et al. 2012). Outra abordagem é a utilização da técnica de mosquitos estéreis (SIT, do inglês “*Sterile Insect Technique*”), que emprega machos estéreis visando reduzir a densidade das populações do vetor. A esterilização pode ser feita por modificações genéticas (mosquitos transgênicos) (Carvalho et al. 2015) ou por meio de irradiação (Bellini et al. 2013). Nessa abordagem a prole de fêmeas inseminadas por machos estéreis é inviável.

O controle químico consiste no uso de inseticidas contra larvas e adultos do vetor (Braga & Valle 2007a, Brasil 2009a, WHO 2009). Os inseticidas ainda amplamente utilizados pelos programas de controle do vetor pertencem a quatro principais classes, todas neurotóxicas: carbamatos (CA), organoclorados (OC), organofosforados (OP) e piretroides (PY) (Ranson et al. 2010). Destes, os mais utilizados atualmente são PY e OP. Estão disponíveis também as espinosinas, moduladores de receptores de acetilcolina (Darriet et al. 2005).

Os Reguladores do Desenvolvimento de Insetos (IGR, do inglês “*Insect Growth Regulators*”), como os inibidores de síntese de quitina (CSI) e os análogos de hormônio juvenil (AHJ), diferente dos inseticidas neurotóxicos, atuam interferindo em processos fisiológicos (metabólicos ou endócrinos), o que prejudica o desenvolvimento do inseto até a fase adulta (Valle et al. 2015a). Vale ressaltar que os inseticidas utilizados no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), no Brasil,

são aqueles recomendados pela *World Health Organization* (WHO) por meio da *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme* (WHOPES 2012). Nos Quadros 1 e 2, apresentamos os compostos e formulações aprovados pela WHOPES para utilização em saúde pública contra larvas e adultos do vetor.

Quadro 1: Compostos e formulações recomendados pela WHOPES para controle de larvas de mosquito.

princípio ativo e formulação	classe	ação
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , linhagem AM65-52 (3000 ITU/mg), WG <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , linhagem AM65-52 (200 ITU/mg), GR <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> linhagem AM65-52 + <i>B. sphaericus</i> linhagem ABTS-1743; 50 BspH ITU/mg), GR <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , linhagem 266/2 (≥ 1200 ITU/mg), SC	biolarvicida	lise do epitélio intestinal
Diflubenzuron DT, GR, WP Novaluron CE	inibidor da síntese de quitina	regulador do desenvolvimento
Pyriproxyfen GR Pyriproxyfen 2 MR	análogo do hormônio juvenil	
Chlorpyrifos CE Fenthion CE Pirimiphos-methyl CE Temephos EC, GR	organofosforado	neurotóxico
Spinosad DT, CE, GR, SC Spinosad 83.3 monolayer DT SP 250–500 g/ha 25–50 mg/m ² Spinosad 25 liberação lenta GR	espinosinas	neurotóxico

Legendas: CE - concentrado emulsionável; DT - tablete de aplicação direta; GR - granulado; MR - matriz de liberação; SC - suspensão concentrada; WG - granulado dispersível em água; WP - pó molhável.

Atualizado em 28 de julho de 2017 (WHOPES 2017).

Quadro 2: Compostos e formulações recomendados pela WHOPES para controle de mosquitos adultos, aplicação espacial.

princípio ativo e formulação	classe	ação
Deltametrina EW Deltametrina UL Permetrina (25 cis:75 trans; 10.35% w/w) + s-bioletrina (0.14 w/w) + butóxido de piperolina (9.85% w/w) EW Lambda-cialotrina CE d-d, transcifenotrina CE Malathion EW and UL	piretroide organofosforado	neurotóxico

Legendas: CE - concentrado emulsionável; EW - emulsão; UL - líquido de ultra baixo volume (ULV).

Atualizado em 05 de fevereiro de 2016 (WHOPES 2016).

1.3 Inseticidas

Como mencionado acima, os principais inseticidas neurotóxicos pertencem às classes dos organoclorados, piretroides, carbamatos, organofosforados e espinosinas (Darriet et al. 2005; Braga & Valle 2007a; WHOPES 2017).

1.3.1 Organoclorados

Em sua estrutura química contêm carbono, cloro e hidrogênio, sendo também conhecidos como hidrocarbonetos clorados, compostos clorados orgânicos ou também sintéticos (Ware & Whitacre 2004). Agem sobre o canal de sódio regulado por voltagem (Na_v) ou sobre o receptor do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) pós-sináptico. Exemplos são o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) e o BHC (benzenohexacloro). O DDT é o primeiro pesticida moderno, foi amplamente usado após a Segunda Guerra Mundial para o combate dos mosquitos vetores do plasmódio. Suas propriedades inseticidas contra vários tipos de artrópodes só foram descobertas em 1939, pelo químico suíço Paul Hermann Müller, o que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina de 1948 (Ware & Whitacre 2004). Esta classe está em desuso e sua importância atualmente é histórica. São os inseticidas mais persistentes no meio ambiente dentre todas as classes. Devido a pressões internacionais e nacionais, aliadas a táticas de comercialização agressiva das indústrias produtoras de inseticidas mais caros, o uso do DDT em saúde pública foi descontinuado, sendo restrito aos países que não possuem recursos para aquisição de outros compostos (Braga & Valle 2007a). No Brasil, sua utilização, comercialização, fabricação, exportação, importação e armazenamento no território nacional são proibidos pela lei de nº 11936, de 14 de maio de 2009.

1.3.2 Piretroides

Os PY constituem uma classe importante de inseticidas sintéticos derivados das piretrinas naturais e são muito eficazes contra um amplo espectro de pragas de importância econômica (Vijverberg & Bercken 1990). Atuam nos canais de sódio regulados por voltagem (Na_v), nas membranas dos axônios, mudando sua conformação e mantendo-os abertos, causando paralisia imediata e morte devido à sua rápida ação (Braga & Valle 2007a).

Seu modo de ação é conhecido como efeito *knockdown*, pois, após pouco tempo de exposição ao PY, os insetos caem, aparentemente mortos; depois de alguns minutos ou horas, se a dose não for efetiva, os insetos se recuperam, podendo continuar ativos (Bisset 2002; Braga & Valle 2007a; Nyka et al. 2013).

Os PYs podem ser usados em pequenas concentrações, causando pouca contaminação do meio ambiente quando comparados com os organoclorados e organofosforados; apresentam baixo grau de toxicidade ao homem e a outros animais (Beaty & Marquardt 1996). Alguns exemplos de PY são cipermetrina, deltametrina, etofenprox e permetrina.

1.3.3 Carbamatos

Têm como alvo a acetilcolinesterase (ACE), uma enzima responsável pela degradação, nas sinapses, do neurotransmissor acetilcolina. São inseticidas derivados do ácido carbâmico (WHO 1997). A inibição da ACE pelos carbamatos é bastante rápida e reversível, ocorrendo hidrólise em poucos minutos (Ware 2000); embora o efeito do carbamato seja severo, é curto em relação ao efeito dos organofosforados (WHO 1984). O propoxur e o bendiocarb são exemplos de carbamatos. São tóxicos aos mamíferos, efetivos contra muitas espécies de insetos (Ware & Whitacre 2004) e apresentam baixa persistência no ambiente (Cechine et al. 2000). Em saúde pública, os CA ainda são utilizados nas aplicações residuais no controle dos vetores relacionados com a doença de Chagas, malária e leishmanioses nas regiões onde a resistência a OC e PY foi detectada (WHO 2007). Atualmente, no Brasil, o PNCD recomenda o uso de bendiocarb em pontos estratégicos para o controle de *A. aegypti* (Brasil 2018).

1.3.4 Organofosforados

É o termo que inclui todos os inseticidas contendo fósforo. São derivados de um dos ácidos de fósforo e têm estrutura química e modo de ação semelhante a compostos conhecidos como gases neurotóxicos. Sua propriedade inseticida foi observada na Alemanha, durante a Segunda Guerra Mundial, quando foram estudados os gases OPs, tóxicos ao sistema nervoso-*sarin*, *soman* e *tabun* (WHO 1997; Moraes 1999; Ware & Whitacre 2004).

Assim como os carbamatos, os OP atuam inibindo a ACE, presente nas sinapses, na membrana dos neurônios pós-sinápticos. A inibição da ACE por OP resulta no acúmulo de acetilcolina nas sinapses neuronais e neuromusculares, mantendo a propagação do impulso e provocando rápidas contrações nos músculos voluntários, ocasionando paralisia seguida de morte (Bisset 2002; Ware & Whitacre 2004; Braga & Valle 2007a).

Os OPs possuem ampla eficiência e baixa toxicidade aos mamíferos (Ware & Whitacre 2004; Braga & Valle 2007a). Os OPS mais utilizados em programas de controle do *A. aegypti* são temephos (larvicida) e malathion (adulticida).

1.3.5 Espinosinas

As espinosinas atuam em receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) da membrana pós-sináptica e causam hiperexcitação neuromuscular, paralisia e morte dos insetos (Salgado et al. 1998; Perry et al. 2011; IRAC 2018). Não apresentam efeitos tóxicos aos mamíferos e têm pouca toxicidade para insetos não-alvo, além de limitada persistência ambiental (EPA 2005; Guojun et al. 2016; Pereira et al. 2016). Um exemplo desta classe é o spinosad, composto pela mistura de duas espinosinas, A e D, produtos da fermentação aeróbica de uma actinobactéria do solo, a *Saccharopolyspora spinosa* (Darriet et al. 2005).

A resistência a espinosinas, apesar do pouco tempo de uso desta classe de inseticidas, já pôde ser detectada em algumas espécies de insetos praga (Shono & Scott 2003; Wyss et al. 2003).

1.4 Resistência a inseticidas e mecanismos de resistência

De acordo com Beaty & Marquadt (1996), resistência é a habilidade de uma linhagem de um organismo em sobreviver a doses de compostos tóxicos que seriam letais para a maioria da população normal suscetível da mesma espécie. A pressão por um inseticida permite que alguns insetos, inicialmente raros, que possuem alelos resistentes, sobrevivam e transmitam a característica de resistência para a sua prole, favorecidos pela seleção natural (Mallet 1989). Sendo assim, o uso intenso dos inseticidas e por longos períodos pode selecionar indivíduos resistentes nas populações naturais do vetor, aumentando sua frequência e diminuindo ou até eliminando os indivíduos suscetíveis e reduzindo a variabilidade das populações, comprometendo a eficácia dos inseticidas (ffrench-Constant 2006; Valle et al. 2015a).

Como condutas decorrentes da seleção de resistência nas populações de vetores estão o aumento na dosagem, a aplicação com maior frequência de inseticidas e a substituição por outros compostos (Georghiou 1983; IRAC 2018). A evolução e propagação da resistência a inseticidas são uma ameaça ao sucesso dos programas de controle (Ranson et al. 2010). Programas racionais de controle de vetores devem estar articulados com o monitoramento do *status* de resistência a inseticidas, para acompanhar a dinâmica da resistência nas populações e definir alternativas antes que o uso de determinado composto alcance um limiar considerado de risco (Braga et al. 2004; Ranson et al. 2010).

A resistência de um determinado organismo pode ser manifestada para dois ou mais compostos distintos através da resistência cruzada ou múltipla. A resistência cruzada ocorre quando um único mecanismo confere resistência a dois ou mais compostos e a resistência múltipla quando

pelo menos dois diferentes mecanismos coexistentes conferem resistência a dois ou mais compostos químicos (Valle et al. 2015a; IRAC 2018).

A resistência a inseticidas pode ocorrer por quatro principais mecanismos nos insetos: resistência comportamental; redução da penetração do inseticida; aumento da atividade de detoxificação destes compostos; e insensibilidade do sítio alvo do inseticida. Os principais mecanismos são modificações da molécula do sítio alvo e o aumento da capacidade de detoxificação do xenobiótico, também conhecidos, respectivamente, como resistência por alteração do alvo e resistência metabólica (Braga & Valle 2007a; Valle et al. 2015a).

1.4.1 Resistência comportamental

Os insetos adquirem a habilidade de detectar ou reconhecer os inseticidas, evitando o contato. Este mecanismo, relatado para várias classes de inseticidas, incluindo OC, OP, CA e PY, pode contribuir na redução da proporção de mosquitos dentro das habitações, seja reduzindo sua entrada, ou estimulando sua saída depois de uma pulverização; há ainda relatos de mudança do período de maior atividade de mosquitos, em função do uso de inseticidas (Hemingway et al. 2004; IRAC 2018). Este mecanismo de resistência está mais descrito em mosquitos do gênero *Anopheles*, vetores do plasmódio, no uso de inseticidas por aplicações residuais em paredes e em telas impregnadas (Sougoufara et al. 2017). Chareonviriyaphap et al. (1997), trabalhando com *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820), considerado vetor de malária nas Américas, mostraram evidências de que este mosquito evitava ou permanecia menos tempo em habitações que haviam recebido aplicações dos inseticidas DDT ou PY.

1.4.2 Redução na penetração do inseticida

A resistência à penetração do inseticida ocorre quando o exoesqueleto do inseto, desenvolve barreiras que podem retardar a absorção dos produtos químicos em seus corpos, protegendo-os de uma ampla gama de inseticidas (IRAC 2018). O espessamento ou a modificação de algumas características físico-químicas da cutícula podem gerar diminuição de sua permeabilidade, levando à redução da taxa de penetração do inseticida (Georghiou 1994). A resistência a inseticidas por alteração da penetração via cutícula é um mecanismo frequentemente associado, e com capacidade de intensificar, outras formas de resistência (Braga & Valle 2007a; IRAC 2018).

A superfície cuticular dos insetos é recoberta por uma fina camada de variadas substâncias, sendo lipídeos e ceras as principais. Estas ceras estão relacionadas com a resistência à dessecação e influenciam a absorção de compostos químicos e a penetração de micro-organismos e têm um papel importante na sobrevivência dos insetos (Ginzl & Blomquist 2016). Nesse sentido, alterações que modifiquem a camada lipídica também poderiam impactar na penetração dos

inseticidas. Lilly et al. (2016) compararam a espessura da cutícula e o tempo de *knockdown* em uma linhagem resistente a PY de *Cimex lectularis* (Linnaeus, 1758), popularmente conhecido como percevejo de cama, de uma região da Austrália. Os autores encontraram correlação positiva: percevejos com cutícula mais espessa eram mais resistentes a PY, propriedade que permitia sua maior sobrevivência à exposição a inseticidas quando comparados com insetos menos tolerantes da mesma linhagem e com insetos de uma linhagem suscetível. Ou seja, alterações na espessura da cutícula, ou em sua composição lipídica interferem com a passagem de inseticidas; se combinadas com outros mecanismos, como a expressão de enzimas desintoxicantes ou insensibilidade do sítio alvo, também podem ter consequências importantes para o uso de inseticidas e o controle de percevejos no campo.

Viana-Medeiros (2017) verificou ativação na expressão de um gene que codifica uma proteína cuticular em populações de campo de *A. aegypti* selecionadas em laboratório com malathion. Na mesma ocasião, foram também detectadas diferenças na expressão de elongases e de desaturases, duas classes de enzimas que participam da biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares. Huang et al. (2018) sugeriram a participação de um gene da família das proteínas cuticulares - a *CPLCG5*, que codifica uma proteína de baixa complexidade - na resistência a piretroides por meio da formação de uma matriz mais rígida e com aumento do espessamento da cutícula.

1.4.3 Resistência metabólica

A resistência metabólica agrupa vários mecanismos que levam à degradação dos xenobióticos, resultando em produtos menos tóxicos, ou mesmo não tóxicos. As principais enzimas envolvidas no processo de metabolização dos xenobióticos pertencem a três grandes famílias: (1) oxidases de função múltipla (MFO, ou P450, codificadas por genes CYP) e (2) esterases (EST), ambas famílias de enzimas de fase I, ou seja, responsáveis por modificações químicas, além das (3) glutationa-S-transferases (GST), enzimas de fase II, que promovem conjugação (Hemingway & Ranson 2000; Faucon et al. 2015; IRAC 2018). Famílias de proteínas transmembranares, os transportadores ABC (do inglês “*ATP-Binding Cassete*”) que participam do transporte de uma variedade de substratos através das membranas, também têm sido associadas à resistência metabólica em insetos (Porreta et al. 2008; Epis et al. 2014). Quando o xenobiótico é um inseticida, o aumento da atividade de tais enzimas detoxificadoras, ou de transportadores ABC, pode caracterizar-se como resistência metabólica (Hemingway & Ranson 2000; Hemingway et al. 2004; Braga & Valle 2007b; Li et al. 2007).

O aumento da atividade das enzimas detoxificadoras nos insetos resistentes pode derivar de uma série de alterações: i) amplificação gênica (aumento do número de cópias dos genes que codificam uma ou mais enzimas envolvidas na detoxificação); ii) expressão gênica alterada (decorre de mutação na região promotora dos genes, em geral com aumento de sua expressão); iii) modificação estrutural (mutação na região codificante resultando em espécie molecular com maior atividade e/ou

afinidade pelo composto inseticida (Figura 3) (Hemingway & Ranson 2000; Hemingway et al. 2004; Li et al. 2007; Valle et al. 2015a).

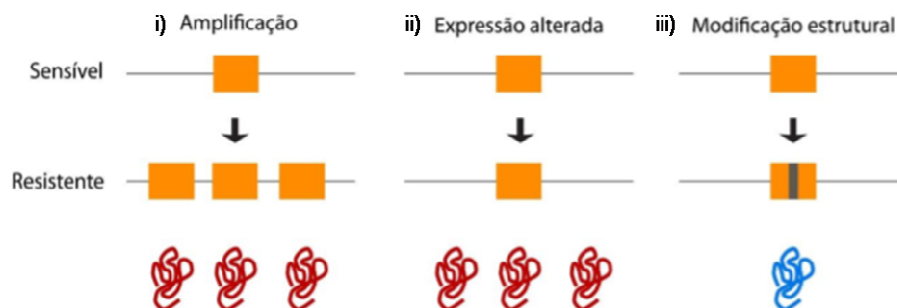


Figura 3: Principais modificações que resultam em maior atividade enzimática, potencialmente responsáveis pela resistência metabólica: i) amplificação gênica; ii) expressão gênica alterada e iii) modificação estrutural (Figura adaptada de Torres 2013).

A resistência via GST parece estar associada a uma quantidade aumentada de moléculas de enzima, resultante de duplicação gênica ou, mais frequentemente, de uma regulação positiva. As GSTs são principalmente associadas à resistência a OC, particularmente ao DDT, e a OP. A sobreexpressão constitutiva de GST foi frequentemente relatada em populações de mosquitos que apresentam níveis elevados de resistência ao DDT (Enayati et al. 2005; Strode et al. 2008; Nyka et al. 2013). Vários trabalhos também relacionam a maior atividade de GST, de forma generalizada, com a resistência a PY em populações de *A. aegypti* (Hemingway et al. 2004; Montella et al. 2007; Polson et al. 2011). Recentemente Riveron et al. (2014) confirmaram a contribuição de GST para a resistência a DDT mas também para PY, em vetores da malária.

Alterações na atividade das MFO foram relatadas como responsáveis pela resistência a DDT, OP e PY (Hemingway et al. 2004; Li et al. 2007); dentre essas, as mais frequentes são mudanças quantitativas e qualitativas em genes das famílias CYP6 e CYP9 (Marcombe et al. 2009; Dusfour et al. 2011; Dusfour et al. 2015; Saavedra-Rodríguez et al. 2015; Ishak et al. 2017).

A superprodução de EST é considerada uma resposta à pressão de seleção por OP ou CA; este fenômeno tem sido verificado em uma série de artrópodes, tais como mosquitos, carrapatos e baratas (Hemingway et al. 2004). Inseticidas OP, CA e PY possuem ligações éster em sua estrutura e, desse modo, podem ser alvos das EST, de forma distinta: EST de insetos têm alta afinidade por OP e CA, e os hidrolisam com taxas muito lentas. Por esse motivo, diz-se que as EST sequestram esses compostos, impedindo-os de chegar ao sítio alvo. Os PY são rapidamente hidrolisados pelas EST (Karunaratne et al. 1993; Hemingway & Karunaratne 1998; Montella et al. 2012). Mudanças qualitativas na enzima podem ser responsáveis pela hidrólise e detoxificação de inseticidas (Hemingway et al. 2004). Casos de amplificação gênica e ativação da transcrição do gene *CCEae3a* - que codifica uma EST, também foram relatados (Strode et al. 2012; Poupardin et al. 2014; Grigoraki et al. 2016; Goindin

et al. 2017). Este gene está relacionado ao forte sequestro de temephos pela EST e sua lenta metabolização em populações de *A. aegypti* das Américas e Ásia (Moyes et al. 2017).

Em populações naturais de *A. aegypti*, vários mecanismos de resistência podem estar presentes ao mesmo tempo (Montella et al. 2007; Strode et al. 2008; Bellinato et al. 2016; Viana-Medeiros et al. 2017; Garcia et al. 2018). No Brasil, Montella et al. (2007) identificaram aumento na atividade de EST e GST em populações deste vetor avaliadas entre 2001 e 2004, logo após a introdução de PY em âmbito nacional para seu controle, em 1999. Alterações em MFO, GST e EST foram associadas à resistência em OP e PY, nas populações avaliadas entre 2010 a 2012, para ambos os estágios do vetor (Bellinato et al. 2016). A resistência simultânea a várias classes de inseticidas encontrada em muitas populações de *A. aegypti* dificulta a correlação entre resistência a classes determinadas e mecanismos específicos (Strode et al. 2008; Saavedra-Rodriguez et al. 2012; Valle et al. 2015a).

1.4.4 Alteração do sítio alvo

Alterações no sítio alvo de um inseticida podem inibir ou mesmo impedir sua ligação, reduzindo ou eliminando seu efeito pesticida (IRAC 2018).

1.4.4.1 Acetilcolinesterase - alvo de OP e CA

Os OP e CA ligam-se e inibem a ação da acetilcolinesterase (ACE), enzima que hidrolisa as moléculas de acetilcolina; com isso, o neurotransmissor permanece na fenda sináptica, o que resulta na transmissão contínua de impulsos nervosos (Hemingway & Ranson 2000, Ranson et al. 2004), eventualmente culminando na morte do inseto (Wu et al. 2010). Análises filogenéticas apontam que, na maioria dos insetos, dois genes codificam a ACE: *ace-1* e *ace-2* (Weill et al. 2002; Cassanelli et al. 2006; Huchard et al. 2006; Jiang et al. 2009). Até o momento, todos os casos de resistência a OP em *Culex* e *Anopheles sp.* por alteração do sítio alvo se relacionam a mutações pontuais na região codificante do gene *ace-1* (Weill et al. 2003, 2004; Mori et al. 2007; Alout et al. 2008). Embora a mutação mais frequente seja a Gly119Ser (Weill et al. 2003), outras mutações de *ace-1* que também se correlacionam à resistência a OP e CA são Phe331Trp, identificada em *Culex tritaeniorhynchus* (Giles, 1901) e Phe290Val, em *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) (Hemingway et al. 2004; Nabeshima et al. 2004; Alout et al. 2008).

Em *A. aegypti*, foi detectada a mutação do gene *ace-1*, no sítio Gly119Ser, participando da resistência a OP em populações de campo da Índia (Muthusamy & Shivakumar 2015). Hasmiwati et al. (2018) detectaram uma nova mutação no gene *ace-1*, em populações de *A. aegypti* resistentes ao temephos oriundas de Padang, na Indonésia, na posição Thr506Thr. Em populações brasileiras de *A.*

aegypti, de nosso conhecimento não há até hoje evidência da resistência a OP conferida por insensibilidade do sítio alvo; todas as alterações já relatadas são por resistência metabólica.

1.4.4.2 Canal de sódio regulado por voltagem (Na_v) - alvo de PY

O alvo dos PY é o canal de sódio regulado por voltagem (Na_v); alterações que tornam o Na_v insensível aos PY são ditas *knockdown resistant (kdr)* (Martins & Valle 2012). Há relatos da presença destas mutações em populações de *A. aegypti* do Brasil (Martins et al. 2009; Linss et al. 2014), e de muitos outros países, a exemplo de México, Martinica e China (Garcia et al. 2009; Marcombe et al. 2012; Li et al. 2015). Em *A. aegypti*, não há registro da mutação *kdr* “clássica” Leu1014Phe, originalmente descrita em *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Ingles et al. 1996). No Brasil, são relatadas substituições nas posições 1534, 1016 e 1011 (Martins et al. 2009; Lima et al. 2011; Linss et al. 2014; Garcia et al. 2018). A alteração no sítio 1016 não é encontrada de forma isolada, estando sempre associada à mutação do sítio 1534 (Linss et al. 2014). Ao contrário das substituições Val1016Ile e Phe1534Cys, a relação da mutação Ile1011Met com a resistência a PY ainda não está clara (Lima et al. 2011; Martins et al. 2013). As mutações *kdr* mais amplamente estudadas, em populações brasileiras e estrangeiras do vetor, são Val1016Ile e Phe1534Cys (Martins et al. 2009; Harris et al. 2010; Yanola et al. 2011; Linss et al. 2014; Moyes et al. 2017; Garcia et al. 2018).

1.5 Histórico da resistência no Brasil

Desde 1967, populações brasileiras de *A. aegypti* têm sido submetidas à pressão de seleção por diferentes classes de inseticidas, principalmente os OP. No Brasil, a resistência de *A. aegypti* aos OP foi identificada inicialmente no final da década de 1990 e há relatos da disseminação deste fenômeno até os dias atuais (Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, Montella et al. 2007, Lima et al. 2011; Bellinato et al. 2016; Viana-Medeiros et al. 2017; Garcia et al. 2018). Com a confirmação da resistência ao OP temephos em 1999, o Ministério da Saúde criou, em conjunto com alguns laboratórios de pesquisa, a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a Inseticidas (Rede Nacional MoReNAa), para avaliação de municípios representativos da situação da dengue no país, a cada dois anos (Braga & Valle 2007b; Valle et al. 2015a). A razão de resistência (RR), uma medida obtida a partir do cálculo entre a concentração letal (CL) da população sob teste e a CL equivalente da linhagem referência em suscetibilidade, foi adotada para quantificar a resistência aos inseticidas. A detecção de resistência ao temephos em vários municípios brasileiros motivou sua substituição por *Bti* em áreas consideradas críticas, onde a resistência havia sido alta (RR > 10). Em

2006, o Brasil adotou um critério funcional para a classificação dos níveis de resistência a temephos: para populações do vetor com $RR_{95} > 3$ passou-se a recomendar a substituição deste OP por outro larvicida. O objetivo desta estratégia foi preservar o inseticida no campo, suspendendo seu uso antes que a resistência estivesse instalada, o que poderia comprometer definitivamente sua utilização (Brasil 2006; Montella et al. 2007; Schechtman & Souza 2015). Esse critério foi validado através de ensaios simulados de campo (Montella et al. 2007). De acordo com o critério anterior ($RR > 10$), dois aspectos concorriam para o agravamento da situação: o tempo de realização dos ensaios simulados de campo e a logística necessária para implementar a interrupção e a troca do inseticida nos municípios - na prática esse processo pode levar até dois anos (Brasil 2006; Braga et al. 2007b; Montella et al. 2007; Valle et al. 2015a).

Em 2009, IGR como os CSI e os AHJ foram introduzidos como alternativa no combate às larvas do vetor (Brasil 2009a, b). Em 2013, o temephos deixou de ser o larvicida de primeira escolha para controle de *A. aegypti*; a partir de 2014 não foi mais utilizado, sendo então substituído pelos IGR para controle larvário: os CSI diflubenzuron e novaluron e o análogo de hormônio juvenil piriproxifen (Brasil 2014).

Em relação ao controle da forma adulta do vetor, observou-se resistência aos PY pouco tempo depois do início da sua aplicação, em 2000 (da-Cunha et al. 2005, Montella et al. 2007, Maciel-de-Freitas et al. 2014). No entanto, até 2009, o PY deltametrina continuou a ser utilizado, em aplicações espaciais e residuais. Detecção, em várias localidades, de disseminação de resistência a PY (Martins et al. 2009; IOC/Fiocruz 2011) acarretou na substituição desta classe pelo OP malathion (Brasil 2009b).

Com o objetivo de resguardar os produtos disponíveis para uso em saúde pública no combate às larvas, a Rede Nacional MoReNAa recomendou o rodízio de inseticidas com mecanismos de ação distintos (Brasil 2012). A adoção de estratégias que podem auxiliar no controle da densidade do vetor e na mitigação da resistência - como mistura de compostos, rotação de inseticidas, aplicação em mosaico e o controle integrado - é um desafio e uma necessidade, já que o número de produtos disponíveis para este fim é limitado (Belinato 2012). Vale deixar registrado que, neste complexo cenário de controle do vetor, uma das ações mais eficientes de prevenção é o controle mecânico do mosquito, que consiste simplesmente na remoção manual de focos potenciais de ovos do mosquito (tema revisto por WHOPES 1997; Brasil 2009; Valle et al. 2015a, entre outros); as demais abordagens, como o controle químico, devem ser tratadas como ações complementares.

1.6 Justificativa

A elucidação de eventos de resistência aos inseticidas disponíveis no combate ao vetor e dos potenciais mecanismos envolvidos é fundamental e pode ser considerado um fator-chave para o controle eficaz de *A. aegypti*. No Brasil, possuímos uma série histórica de avaliações sobre o *status* da resistência de populações de *A. aegypti*. Estudamos de forma sistemática e global estas avaliações produzidas no contexto do monitoramento da resistência a fim de (a) contribuir para o conhecimento sobre o *status* e os mecanismos de resistência envolvidos, (b) acompanhar a introdução dos CSI no país, (c) correlacionar estes dados com a incidência dos casos de dengue e com o fornecimento de inseticidas utilizados no controle por parte do Ministério da Saúde. Uma vez que a resistência a inseticidas de cada população do vetor pode depender de múltiplos mecanismos, utilizamos a análise de componentes principais (PCA) para identificar potenciais grupos de mecanismos associados. Esperamos, com isso, contribuir com o entendimento da dinâmica da resistência nas populações brasileiras de *A. aegypti*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar de forma sistemática e global as avaliações produzidas no contexto do monitoramento da resistência de populações brasileiras de *A. aegypti* a inseticidas a fim de contribuir para o conhecimento sobre os mecanismos de resistência envolvidos, acompanhar a introdução dos CSI no país, em especial procurar associações com o uso de inseticidas e com as epidemias de dengue e levando em conta as características regionais.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Organizar os registros gerados sobre o *status* de resistência e os mecanismos envolvidos nas diferentes populações de *A. aegypti* avaliadas, levando em conta os inseticidas utilizados, a distribuição geográfica das populações e as dinâmicas temporais encontradas
- b) Levantar o histórico de fornecimento de inseticidas pelo Ministério da Saúde aos estados, e comparar com os perfis de resistência obtidos
- c) Fazer avaliação comparativa dos bioensaios (quantificação da resistência) e dos ensaios bioquímicos e moleculares (identificação de mecanismos de resistência), objetivando a detecção de mecanismos diagnósticos, se houver
- d) Comparar os perfis de resistência obtidos com a dinâmica de casos de dengue, nas diferentes regiões do país, de forma a identificar potencial relação com epidemias e com eventual exacerbação do uso doméstico de inseticidas

3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados estão organizados em três capítulos que contêm, na sequência:

i) revisão sistemática da resistência a inseticidas em populações brasileiras de *A. aegypti*. Contemplamos: a resistência aos inseticidas temephos e deltametrina usados no controle em campo, os mecanismos de resistência, além do histórico de uso dos inseticidas pelo Ministério da Saúde por estado e da incidência de dengue por município avaliado.

ii) quantificação da resistência aos inseticidas temephos, deltametrina e ao CSI diflubenzuron em 12 populações de *A. aegypti*. Diflubenzuron foi introduzido no controle das formas imaturas no Brasil em 2009. Este Capítulo, já publicado (Bellinato et al 2016), inclui a avaliação dos mecanismos de resistência das populações e discute o impacto do uso público e doméstico de inseticidas sobre a resistência.

iii) Utilização (ainda preliminar) de ferramentas matemáticas para procurar correlações entre resistência a inseticidas com os mecanismos analisados e, potencialmente, com a incidência de dengue; foram utilizadas, respectivamente, regressão de Poisson e regressão logística. Considerando a natureza multifatorial da resistência, utilizamos ainda a Análise de Componentes Principais (PCA) para identificar associações de grupos de mecanismos; nesta análise procurou-se deixar em evidência os dados por região (N, NE, SE, S, CO).

3.1 Capítulo 1 - Revisão do *status* da resistência a inseticidas em populações brasileiras de *A. aegypti*

Vários fatores modulam a ocorrência das epidemias de dengue, cuja transmissão está condicionada à densidade humana e à densidade e dispersão de seu vetor, *A. aegypti*, mosquito extremamente adaptado ao ambiente modificado pelo homem (Kuno 1995, Oliveira 2015). No Brasil, a distribuição das epidemias de dengue é muito heterogênea, em razão de sua dimensão territorial, da diversidade climática, e do grande número de centros urbanos densamente povoados (Teixeira et al 2015). Desde 1986, a partir da epidemia no Rio de Janeiro, a dengue é um problema de Saúde Pública relevante no país. Hoje, o Brasil é hiperendêmico para esta arbovirose, com circulação dos quatro sorotipos, DENV-1 (desde 1986), DENV-2 (1990), DENV-3 (2001) e DENV-4 (2010) (Schatzmayr et al. 1986; Nogueira et al. 1990; 2001; Brasil 2012). Em adição, em função da sazonalidade do vetor, diferentes regiões do país são submetidas a períodos epidêmicos de dengue, nas estações quentes e chuvosas (Donalísio & Glausser 2002; Teixeira et al. 2015).

Na ausência de medicamentos específicos e de vacinas efetivas e disponíveis para aplicação em grande escala, o controle e a prevenção da dengue dependem particularmente de ações dirigidas a seu vetor. Hoje é crescente o reconhecimento de que a solução para a dengue extrapola o setor saúde, sendo dependente, de um lado, de ações estruturais, como saneamento, coleta de lixo e abastecimento de água e, de outro lado, de mobilização e sensibilização da sociedade, para eliminação de criadouros potenciais, muitos dos quais localizados no intradomicílio. Apesar disto, em muitos casos o controle do vetor ainda é confundido com o controle químico do vetor, o que resulta em intensificação do uso de inseticidas, que culminam com a disseminação de resistência nas populações de *A. aegypti* (Valle 2012; Maciel-de-Freitas et al. 2014; Valle et al. 2015a, b; Bellinato et al. 2016; Macoris, Martins et al. 2018).

No Brasil, as populações do vetor da dengue têm sido submetidas à pressão de seleção por diferentes classes de inseticidas. Desde 1967, o uso continuado de OP tem selecionado espécimes resistentes. Até muito recentemente o OP temephos foi o único larvicida aprovado pela WHO para uso em água potável e, portanto, no controle da fase jovem deste vetor (WHO 1997). No final da década de 1990, surgiram os primeiros relatos de alteração da suscetibilidade de *A. aegypti* ao temephos (Macoris et al. 1999). Em função disto, o Ministério da Saúde, por meio do PNCD, iniciou a coordenação, em parceria com alguns laboratórios de pesquisa, da Rede Nacional MoReNAa, cujo objetivo foi monitorar, nos municípios representativos da situação da dengue no país, o *status* de resistência do vetor aos principais compostos empregados em nível nacional (Braga & Valle 2007b; Valle et al. 2015a).

Com a confirmação da resistência a temephos e com a aprovação de novos larvicidas para uso em água potável, o país passou a adotar outros compostos contra larvas em adição ao OP, a saber, inicialmente *Bti* e depois IGR. Além disso, em 2006 o Brasil modificou o critério de classificação do *status* de resistência a temephos: populações do vetor com $RR_{95} > 3$ passaram a ser classificadas como resistentes, quando a substituição deste OP por outro larvicida era então recomendada. O critério anterior preconizava interrupção quando a RR_{95} fosse maior que 10. O objetivo desta mudança de conduta foi preservar o inseticida como ferramenta de controle, suspendendo seu uso antes que a resistência estivesse instalada, o que poderia comprometer definitivamente sua utilização no campo (Brasil 2006; Montella et al. 2007; Schechtman & Souza 2015). Passamos a utilizar este mesmo critério também para classificar o *status* de resistência à deltametrina das populações, para fins acadêmicos.

Em relação à forma adulta do vetor, resistência a PY foi observada pouco tempo após o início de sua aplicação em campo, em 2000 (da-Cunha et al. 2005; Montella et al. 2007; Maciel-de-Freitas et al. 2014). No entanto, até 2009, o PY deltametrina continuou a ser utilizado, em aplicações espaciais e residuais no controle de *A. aegypti*. A detecção, em várias localidades, da disseminação de resistência a PY (Martins et al. 2009; IOC/Fiocruz 2011) acarretou na substituição desta classe pelo OP malathion (Brasil 2009b). Porém, além do uso doméstico de PY, disponíveis nos mercados de varejo, esta classe de inseticidas ainda continua sendo utilizada no controle dos vetores dos agentes etiológicos da doença de Chagas, malária e de leishmanioses, em várias regiões urbanas do país. Ressaltamos que no Brasil somente são utilizados em saúde pública, contra larvas e adultos do vetor, compostos e formulações aprovados pela WHOPES (WHOPES 2016; 2017).

Neste capítulo apresentamos uma revisão sistemática do *status* da resistência a inseticidas químicos em populações brasileiras de *A. aegypti* aos compostos amplamente utilizados no combate ao vetor em âmbito nacional: o larvicida temephos e o adulticida deltametrina. Esta revisão se baseou em dados inéditos, apresentados ao PNCD no âmbito da Rede Nacional MoReNAa, mas até agora não publicados, e em revisão bibliográfica, que obedeceu a critérios mínimos de representatividade, como indicado na Metodologia. Os dados gerados por nossa equipe consistiram de (1) bioensaios qualitativos para detecção da resistência de adultos à deltametrina, com duas metodologias distintas, (2) bioensaios quantitativos para detecção de resistência de larvas e adultos, respectivamente a temephos e deltametrina e (3) quantificação da atividade das principais classes enzimáticas relacionadas com a resistência metabólica (MFO, EST e GST) e com o sítio-alvo de OP, a enzima ACE. Além disso, utilizamos dados disponíveis para alterações no alvo de PY, *Nav*. Em relação à revisão bibliográfica, confirmamos que grande parte dos dados disponíveis está concentrada no esforço de dois trabalhos anteriores: (1) Ranson et al. (2010), que trata de uma revisão sobre o *status* conhecido de resistência global dos vetores da dengue a inseticidas, com ênfase nas duas classes de inseticidas mais utilizados, OP e PY e (2) Moyes et al. (2017), que atualizaram e ampliaram o trabalho anterior, mapeando a

distribuição geográfica mundial da resistência e os mecanismos envolvidos, em populações do vetor, a partir de evidências disponíveis para as quatro principais classes de inseticidas neurotóxicos (CA, OC, OP e PY). Vale ressaltar que ambos os trabalhos reconheceram o Brasil como um dos poucos países do mundo com um programa bem estruturado de monitoramento da resistência a inseticidas utilizados no controle de *A. aegypti*. Ressaltamos ainda o trabalho de Chediak et al. (2016), que investigaram a propagação espacial e temporal da resistência a temephos de populações de *A. aegypti* no Brasil ao longo de 12 anos, a partir de ensaios qualitativos disponibilizados pelo PNCD.

Em todos os casos, procuramos correlacionar os dados, apresentados por Região, (a) com o fornecimento anual de inseticidas pelo Ministério da Saúde aos estados para o controle de *A. aegypti* e de outros vetores, e (b) com a incidência, também anual, de dengue por município avaliado. Esperamos com este esforço ter consolidado e atualizado todas as informações sobre resistência a temephos e deltametrina de populações brasileiras de *A. aegypti* publicadas até julho de 2017, além de dados inéditos de nossa equipe, para avançar com o entendimento da dinâmica e dos mecanismos envolvidos com este fenômeno no país.

3.1.1 Materiais e Métodos

3.1.1.1 Mosquitos

As amostras cujos resultados são apresentados aqui pela primeira vez foram coletadas em campo entre 2005 e 2011. Ovos de *A. aegypti* oriundos dos municípios foram coletados com o auxílio de armadilhas do tipo ovitrampa seguindo o recomendado pela Rede Nacional MoReNAa (Braga et al. 2001; Lima et al. 2003; Montella et al. 2007; Brasil 2008). Os ovos obtidos nas paletas foram colocados para eclodir e as larvas resultantes, criadas na densidade de 1.000 larvas por bacia plástica de 27 x 19 x 7 cm contendo 1 litro de água parcialmente desclorada. A cada três dias foi adicionado 0,5 g de ração para gato (Friskies®, Purina, São Paulo, SP) e as bacias foram acondicionadas em estufa do tipo BOD a 26 ± 1 °C, onde permaneciam até a fase de pupa (Bellinato et al. 2016). As pupas foram transferidas para gaiolas de papelão e, após a emergência dos adultos, a identificação e triagem de *A. aegypti* foi feita de acordo com a chave dicotômica de Consoli & Oliveira (1994). Para a obtenção dos ovos, foi oferecido alimentação sanguínea, com cobaias anestesiados com ketamina e xilazina (Hawk & Leary 1999), uma vez por semana, durante quatro semanas. Utilizamos, preferencialmente, mosquitos das gerações F1 ou F2 nos ensaios. O protocolo foi aprovado pelo comitê institucional da Fiocruz "Comissão de Ética sem Estudo de Animais" (CEUA / Fiocruz), números de licença: P-0147/02, L-011/09 e LW-20/14.

3.1.1.2 Inseticidas

Foram utilizados temephos e deltametrina. Informações sobre os lotes empregados nas avaliações inéditas estão na Tabela 1.

Tabela 1: Dados sobre os inseticidas utilizados nas avaliações.

classe	inseticida	fabricante	lote
OP	temephos	Fersol	010-07
			041-07
			042-07
		Sigma-Aldrich	6333-x
PY	deltametrina	Bayer Cropscience	DGDLTK057
		Sigma-Aldrich	3240-x

3.1.1.3 Ensaios quantitativos

Os bioensaios dose-resposta de larvas com temephos foram feitos de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO 1981), protocolo também descrito por Lima et al. (2003) e Braga et al. (2004). Para cada município foram realizados pelo menos três ensaios, em dias diferentes,

totalizando, no mínimo, 2.400 larvas expostas: cada ensaio consistiu de 10 concentrações de inseticida, quatro réplicas por concentração e 20 larvas por réplica. A mortalidade foi registrada depois de 24 horas.

A partir de 2009, adultos de algumas populações do vetor foram submetidos a bioensaios para quantificação da resistência a deltametrina, por meio da metodologia de papéis impregnados, com algumas modificações (WHO 1998a; Belinato et al. 2012; Brito et al. 2013; Bellinato et al. 2016). Utilizamos entre 15-20 fêmeas, de um a cinco dias de vida, não alimentadas com sangue, por réplica. Foram usadas três réplicas por concentração e entre oito e 10 concentrações por ensaio. Também neste caso, para cada população foram realizados pelo menos três ensaios, em dias diferentes, totalizando cerca de 1.080 a 1.800 fêmeas. Os mosquitos ficaram expostos ao inseticida por uma hora, depois foram transferidos para tubos de descanso, sem inseticida, e a mortalidade foi registrada depois de 24 h.

A linhagem Rockefeller, referência de suscetibilidade (Kuno 2010), foi usada para calibrar os ensaios e obter as razões de resistência (RR).

3.1.1.4 Ensaios qualitativos

Em muitos casos, a resistência de adultos à deltametrina foi investigada por meio de ensaios com a dose-diagnóstica (DD) utilizando duas metodologias - garrafas e papéis impregnados com inseticidas. Em ambas foram usadas réplicas de 15-20 fêmeas não alimentadas, de um a cinco dias de vida adulta. Para cada município foram realizados pelo menos três ensaios, em dias diferentes.

Para a metodologia de garrafas foram usadas, por ensaio, uma garrafa controle, impregnada apenas com o solvente (acetona) e três garrafas impregnadas com 5 µg de deltametrina. Na metodologia de garrafas, esta é a DD, definida como a menor concentração que mata 100 % dos mosquitos da linhagem Rockefeller no tempo de ação do inseticida (30 minutos, no caso de deltametrina). O ensaio tem duração mínima de 30 minutos, sendo a leitura do efeito *knockdown* realizada a cada 15 minutos até o tempo máximo de 120 minutos de exposição. As fêmeas eram então transferidas para gaiolas de papelão, sem inseticida, onde permaneciam por 24 h, quando a leitura de mortalidade era realizada (Brogdon & McAllister 1998; da-Cunha et al. 2005; Fontoura et al. 2012).

Os ensaios com papéis impregnados seguiram a metodologia da WHO (1998a) com pequenas modificações. Cada ensaio consistiu de três réplicas com papéis impregnados com 3,65 mg de deltametrina/m² e dois tubos controle, impregnados apenas com óleo de silicone (Belinato et al. 2012). A DD, no caso da metodologia com papéis impregnados, equivale ao dobro da CL₉₉ de Rockefeller. Depois de contato com o inseticida por uma hora, os mosquitos eram transferidos para tubos de descanso, sem o inseticida, e 24 h depois a mortalidade era registrada.

3.1.1.5 Ensaios bioquímicos

Para avaliação das enzimas relacionadas com a resistência metabólica, utilizamos os protocolos descritos por Valle et al. 2006 e por Montella et al. 2007 para os adultos e por Viana-Medeiros 2011 para as larvas. Para cada população foram feitas avaliações individuais de aproximadamente 90 larvas (L3 final ou L4 inicial) ou 90 fêmeas não alimentadas com sangue, com até 24 horas de vida adulta, armazenadas em freezer - 80°C até o seu uso. Atividade das enzimas GST, MFO e EST foi quantificada. Para EST foram usados três substratos diferentes: acetato de alfa-naftil (α -EST), beta-naftil (β -EST) e p-nitrofenil (ρ NPA-EST). A atividade do alvo de OP, ACE, também foi medida; neste caso, além da atividade total (AChE), quantificou-se sua inibição por propoxur (AChI) (WHO 1998b).

3.1.1.6 Análises dos ensaios

Para os bioensaios qualitativos usamos o critério proposto por David & Zahar (1973): mortalidade menor que 80% indica resistência; acima de 98%, suscetibilidade; valores intermediários apontam resistência incipiente, e necessidade de acompanhamento da população.

No caso dos ensaios dose-resposta, as concentrações letais (CL) foram calculadas com o auxílio do software Polo-PC (Raymond 1985) via análise probit (Finney 1971). A razão de resistência (RR) foi obtida a partir da razão entre a CL da população sob teste e a CL equivalente da linhagem suscetível de referência. Optamos por utilizar, para OP e PY, o critério funcional adotado pela Rede Nacional MoReNAa em 2006 para classificação da resistência a temephos (Montella et al. 2007; Valle et al. 2015a), segundo o qual RR_{95} acima de 3,0 é indicativo de resistência (ver Discussão).

A classificação dos ensaios bioquímicos foi realizada de acordo com Valle et al. (2006) e Montella et al. (2007), que usam o percentil 99 de Rockefeller obtido para cada enzima como ponto de corte. Para cada população e classe de enzimas, a atividade é classificada como não alterada, alterada ou muito alterada se o percentual das amostras acima do percentil 99 de Rockefeller estiver, respectivamente, abaixo de 15%, entre 15% e 50% ou acima de 50%. Estes resultados percentuais também foram usados para calcular o 'GAB' ('avaliação global dos ensaios bioquímicos'), medida secundária de cada população avaliada, correspondente à média das alterações das atividades de todas as enzimas. Consideramos ainda, apenas a atividade das enzimas detoxificantes, relacionadas exclusivamente com a resistência metabólica, sem as alterações da atividade total de AChE (GAB-AChE).

3.1.1.7 Distribuição dos inseticidas utilizados em Saúde Pública

No Brasil, o Ministério da Saúde distribui para os estados os inseticidas utilizados no controle de vetores em Saúde Pública (Bellinato et al. 2016). Utilizamos os registros anuais de distribuição dos compostos usados no controle de *A. aegypti*, no período de 2003 a 2014. Os larvicidas empregados foram temephos, *Bti* e IGRs (neste caso, estão agrupados novaluron, diflubenzuron e pyriproxifen); os adulticidas mostrados são malathion (OP) e inseticidas PY (deltametrina, cipermetrina, etofenprox, alfacipermetrina, ver Discussão).

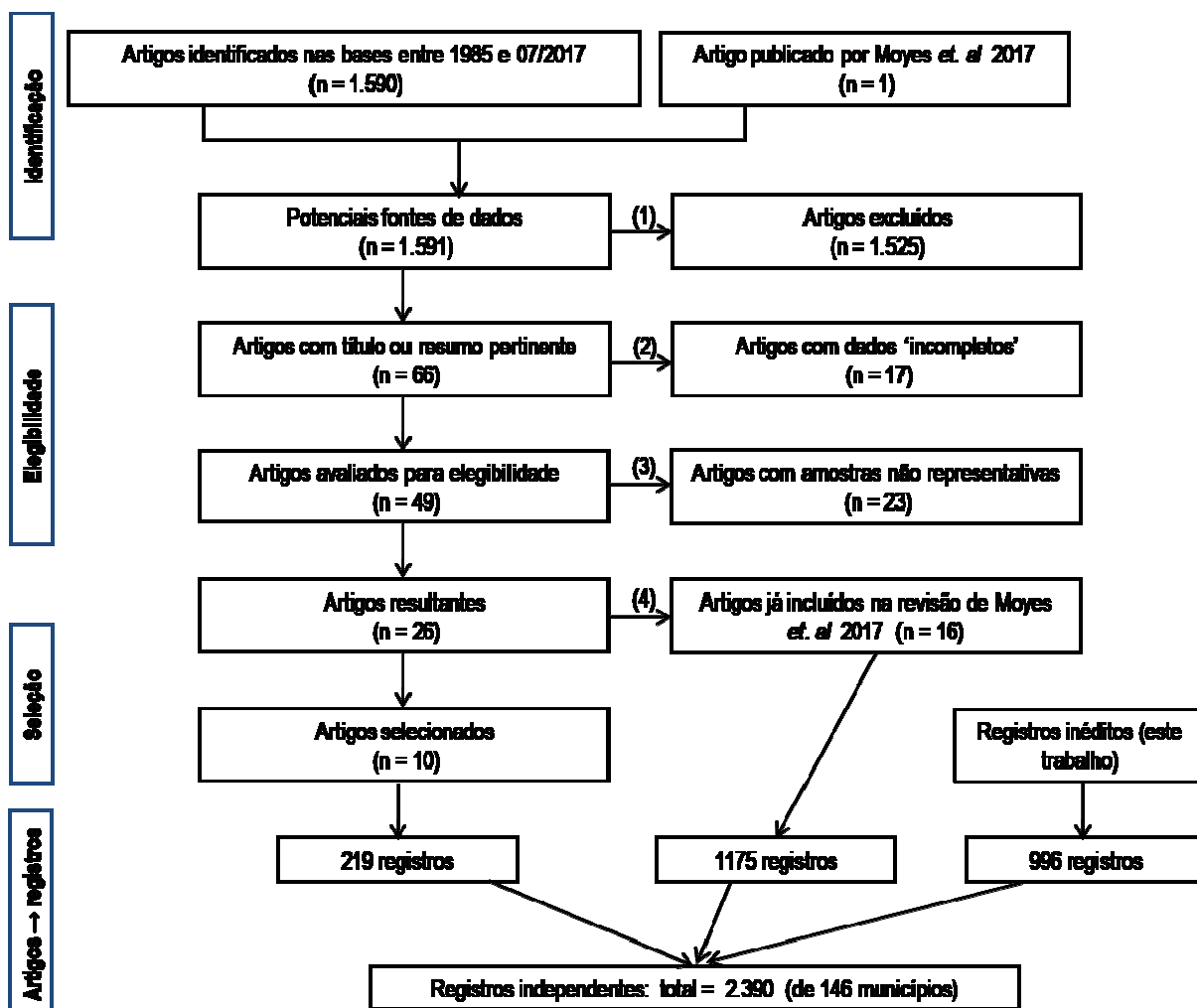
3.1.1.8 Incidência dos casos de dengue

Foram realizadas buscas na base de dados SINAN NET (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) no sítio da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), sobre o histórico de casos de dengue notificados por região, estado e município (Brasil 2015). Foi adotado o critério utilizado pelo PNCD, onde todas as formas da doença são contabilizadas e excluídos apenas os casos classificados como descartados. Realizamos o cálculo estimativo do crescimento populacional dos municípios usando como base os censos populacionais dos anos 2000 e 2010, obtidos no sítio do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), para calcular a taxa de incidência dos casos de dengue no período entre 2000 e 2012 (Brasil 2010). A taxa de incidência dos casos de dengue foi calculada por $(N/P) \times 100.000$ habitantes, onde 'N' é o número de casos novos confirmados de dengue (todas as formas) em residentes e 'P' a população total residente no período determinado (OPAS 2008). Vale ressaltar que, de acordo com o Ministério da Saúde, municípios que apresentam valores superiores a 300 casos por 100 mil habitantes são considerados epidêmicos (Teixeira et al. 2015).

3.1.1.9 Revisão sistemática

Este trabalho também fez uma atualização do *status* de resistência das populações brasileiras de *A. aegypti*, de 146 municípios, a OP e PY. Foram incluídos: (1) os novos dados aqui apresentados; (2) a recente revisão de Moyes et al. (2017), que contempla populações de todo o mundo, e atualiza o trabalho de Ranson et al. 2010; (3) levantamento bibliográfico sistemático, do período de 1 de janeiro de 1985 a 31 de julho de 2017, nas bases contidas no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (PubMed e PubMed Central® - PMC) e no Google Acadêmico. Neste levantamento foram utilizados os seguintes termos de busca, aditivos: "*Brazil*", "*Aedes aegypti*", "*insecticide resistance*", "*organophosphate*", "*pyrethroid*". Os artigos obtidos foram selecionados inicialmente com base em dois critérios: relevância do título e resumo com conteúdo relacionado ao tema. Os artigos escolhidos foram então lidos na íntegra e submetidos a uma nova etapa de seleção, desta vez de acordo com outros critérios: (a) representatividade da amostra coletada em relação à área

de cada município avaliado e (b) presença de dados sobre o *status* de suscetibilidade frente aos inseticidas OP e PY, qualitativos, quantitativos, ou ambos. Descartamos os artigos nos quais a coleta não era representativa (em alguns casos, a origem das amostras não era nem informada). A Figura 4 mostra o quantitativo de registros inéditos apresentados no trabalho e o fluxo da informação nas diferentes fases da revisão sistemática, montado segundo a metodologia PRISMA (Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-Análises) proposta por Moher et al. (2009).



Legendas:

- (1) Título relevante e abstract com conteúdo relacionado ao tema?
- (2) Dados completos sobre resistência a OP e/ou PY?
- (3) Amostra representativa da localidade avaliada?
- (4) Artigos já citados por Moyes et. al 2017?

Figura 4: Diagrama de fluxo PRISMA - informação das diferentes fases do levantamento e consolidação dos dados de avaliação da resistência de populações brasileiras de *A. aegypti* a inseticidas usados em seu controle, no período entre 1985 e 2017.

Critérios adotados para aceitação dos artigos incluídos na revisão sistemática:

- (1) artigos com título e resumo relacionados à temática.
- (2) dados do *status* de susceptibilidade frente aos inseticidas OP e PY: se os autores informaram ensaios qualitativos ou quantitativos para os inseticidas temephos, deltametrina e cipermetrina. Para os ensaios qualitativos, foram incluídos aqueles que informaram a concentração diagnóstica e o percentual de mortalidade obtido. Nos ensaios quantitativos, os que informaram as CL (50, 90, 95 ou ambas) e as RR correspondentes.
- (3) representatividade da coleta em campo: foram aceitos os artigos que informavam a obtenção das amostras levando em consideração seu tamanho e representatividade em relação à área e ao período de coleta para cada município avaliado.

Para as coletas realizadas em bairros ou em outras subdivisões de um município considerou-se a RR média dos valores informados; nestes casos para as CL foi utilizada toda a faixa de variação dos intervalos de confiança. Os artigos que não informaram o ano da coleta foram descartados; com exceção dos dados descritos por Braga et al. (2005), cujos registros estão com nossa equipe.

- (4) Foram excluídos desta análise os artigos já contemplados na recente revisão realizada por Moyes et al 2017.

3.1.2 Resultados

Apresentamos os resultados inéditos, assim como os dados obtidos na literatura, de avaliações do *status* de resistência de populações brasileiras de *A. aegypti* de 514 'municípios/ano'. 'Município/ano' foi a unidade de trabalho escolhida, independente do número de inseticidas testados e dos ensaios realizados. Para cada 'município/ano' estão apresentados vários registros, totalizando 2.390. Definimos como 'registros' os valores obtidos com a mortalidade média, no caso de bioensaios qualitativos e, em relação aos ensaios dose-resposta, cada uma das concentrações letais (CL) disponíveis - 50, 80, 90, 95 - assim como cada uma das razões de resistência (RR) correspondentes. No caso dos ensaios bioquímicos, os resultados obtidos para cada classe enzimática (ACE, MFO, GST, α -EST, β -EST, pnpa-EST) são considerados um registro independente. Os dados referentes à frequência alélica das mutações *kdr* no *Nav*, embora não tenham sido contabilizados como registros, foram informados, sempre que disponíveis, para auxiliar no entendimento dos mecanismos de resistência. Foram consideradas apenas as avaliações das posições 1016 e 1534, simultaneamente, que estão fortemente associadas à resistência a PY (Linss et al. 2014; Dusfour et al. 2015).

Os dados de cada município estão agrupados por ano de coleta e organizados sequencialmente, por estado e por região geográfica. Com o objetivo de evidenciar as particularidades regionais, para cada Região (Norte, Nordeste, Sudeste, Sul, Centro-Oeste) está apresentado um conjunto de tabelas e gráficos com foco nos bioensaios com larvas, nos bioensaios qualitativos ('dose diagnóstica') com adultos, ou ainda nos ensaios quantitativos ('dose-resposta') com adultos. Sempre que possível, foram incluídos os resultados obtidos com os ensaios bioquímicos, e moleculares, nas planilhas correspondentes, na tentativa de identificar mecanismos associados. Para cada região foi também montada uma tabela que procurou agrupar, no caso dos municípios para os quais dispúnhamos de dados bioquímicos ou moleculares, todos os dados obtidos também com os bioensaios, independente do estágio ou do inseticida avaliado e do tipo de ensaio realizado. Além destes resultados, derivados das avaliações de resistência, foram incluídas tabelas que apresentam o histórico de uso de inseticidas no controle de larvas e de adultos de cada estado assim como a incidência de dengue no período, por município avaliado.

A intenção com o esforço de sistematização dos dados foi apresentar, da forma mais completa possível, toda a série histórica disponível de avaliação da resistência das populações brasileiras de *A. aegypti* aos inseticidas usados no PNCD, assim como o contexto de utilização de inseticidas e da incidência de dengue. Vale ressaltar que 96,8 % dos registros apresentados foram gerados em laboratórios que faziam parte da Rede Nacional MoReNAa.

3.1.2.1 Região Norte

3.1.2.1.1 Incidência de dengue

A Tabela 2 mostra o histórico de incidência de dengue entre 2001 e 2012 nos municípios da Região Norte aqui analisados. O Ministério da Saúde considera altas, indicativas de epidemia, as taxas de incidência superiores a 300 casos por 100.000 habitantes (Teixeira et al. 2015). A maior parte dos municípios apresentados se localiza no Pará, onde as incidências elevadas foram esporádicas. Por outro lado, nos demais estados, em alguns municípios houve registros de epidemias, inclusive em anos consecutivos e, por vezes com incidências ultrapassando o 'limiar' de epidemia, 300 casos/100.000 habitantes, em 5-30 vezes: Rio Branco (2009-2011), Oiapoque (2007-2011) e Boa Vista (entre 2001 e 2003 e, depois, entre 2008 e 2010). Em Pacaraima e Palmas, embora a incidência de dengue não tenha sempre atingido níveis tão elevados, os valores foram compatíveis com epidemias na maior parte do período apresentado.

3.1.2.1.2 Resistência ao larvicida temephos

De maneira geral, no período avaliado, houve fornecimento quase que contínuo de temephos em todos os estados. Mesmo quando outros produtos eram introduzidos, como *Bti* ou IGR, na maioria dos casos não substituíam, mas se somavam, a este larvicida (Tabela 3). Em consonância, larvas de *A. aegypti* de praticamente todos os 20 municípios da Região Norte incluídos nesta base de dados apresentaram perfil alterado de resistência ao temephos. As únicas exceções foram Porto Velho/RO em 2002 (Braga et al. 2005), e Boa Vista em 2010, municípios/ano classificados como suscetíveis ao temephos (Tabela 4) de acordo com critérios atualmente adotados pelo Ministério da Saúde (Montella et al. 2007; Valle et al. 2015a).

Os valores de RR_{95} para temephos na Região Norte, em sua maioria, oscilaram entre 4 e 12 no período. A principal exceção foi Oiapoque/AP, em 2009, com níveis de resistência extremamente altos: RR_{50} de 42,1 e RR_{95} de 102,5 (Araújo et al. 2013). Este valor de RR_{95} foi cinco vezes mais elevado que a segunda maior RR_{95} obtida para a região em todo o período, de 21,4, em Dom Eliseu/PA, em 2003 (Montella et al. 2007). Ensaio mais recentes com amostras do estado do Amapá, a partir de coletas realizadas entre dezembro de 2014 e janeiro de 2015, revelaram uma significativa redução dos níveis de resistência a temephos (Costa MM 2017, dados não publicados); embora sem informação sobre a RR_{95} , detectou-se RR_{50} de 21,8 para Oiapoque, praticamente a metade do valor encontrado em 2009. A partir de coletas simultâneas, ainda no estado do Amapá, Costa também detectou redução significativa do nível de resistência a temephos de outra população, Macapá. Neste sentido, vale lembrar que temephos deixou de ser fornecido ao Amapá pelo PNCD em 2013, e que

desde 2010 este OP vem sendo gradualmente substituído por IGR (Tabela 3), o que pode justificar a queda dos níveis de resistência.

A elevada RR para temephos em Oiapoque poderia ser justificada como reflexo das ações de controle do vetor durante longo período epidêmico: no ano da avaliação, 2009, a incidência de dengue neste município já estava, há dois anos, aproximadamente 10 vezes acima do limiar que define epidemias (Tabela 2). Este perfil, no entanto, não parece ser geral: (a) Palmas/TO apresentou RR menores que 10, em duas avaliações, 2006 e 2009, com incidência alta de dengue em todos os anos entre as coletas; (b) o caso de Rio Branco é ainda mais contundente: tem perfil de RR parecido com o de Palmas, abaixo de 10, com avaliações em 2007 e 2011, antes e depois de quatro anos sucessivos de alta incidência de dengue, com taxas que chegaram a 30 vezes o limiar de epidemia, no ano de 2010, ano anterior à última avaliação de resistência. Ou seja, não parece ser apenas a epidemia que está associada à resistência, mas a resposta que se dá ao fato, em particular a importância relativa que se atribui ao controle químico.

3.1.2.1.3 Resistência a deltametrina

Em relação aos adulticidas, na Região Norte deltametrina foi amplamente utilizada no período avaliado, entre 2003 e 2014 (Tabela 5). Malathion, o inseticida que a sucedeu, foi utilizado pontualmente no Pará em 2011 e começou a ser empregado posteriormente em alguns outros estados.

De acordo com o critério proposto por David & Zahar (1973), adotado para classificar o *status* das populações avaliadas por meio de ensaios qualitativos frente aos PY, uma mesma população pode ser classificada de forma distinta dependendo do ensaio adotado, com garrafas (Brogdon & McAllister 1998) ou papéis impregnados (WHO 1998a). O consolidado dos resultados da Região Norte revelou que, das 18 populações avaliadas com a metodologia WHO, 15 foram classificadas como resistentes e nenhuma foi considerada suscetível. Por outro lado, os ensaios com garrafas impregnadas resultaram em mortalidades mais elevadas: das 11 populações avaliadas só duas foram classificadas como resistentes de fato; quatro foram consideradas suscetíveis e as restantes apresentavam resistência incipiente (Tabela 6). De fato, no ensaio com garrafas (metodologia 'CDC') as mortalidades tendem a ser maiores, devido à peculiaridade do ensaio: na garrafa o mosquito tem contato forçado com o inseticida, a cada pouso, uma vez que toda a superfície interna é impregnada com o produto (inclusive a tampa). A metodologia em tubos cilíndricos com as bases teladas e equipados com papéis impregnados ('WHO'), por outro lado, tem como principal desvantagem justamente a existência de pontos sem inseticida (as telas), o que diminui o potencial de exposição de cada mosquito individual e pode aumentar a variabilidade do resultado final. Em princípio, a metodologia CDC é mais versátil pois o próprio usuário pode impregnar diretamente e com relativa facilidade suas garrafas, enquanto o uso dos papéis impregnados necessita de processo mais delicado

de impregnação, ou depende de sua aquisição. Em contrapartida, as garrafas impregnadas, mas não os tubos 'WHO', têm limitações para uso, principalmente em campo, em lugares úmidos, pois pode haver condensação em seu interior, com prejuízo para o ensaio, já que os mosquitos podem aderir às paredes das garrafas. Embora os valores absolutos dos ensaios tenham sido distintos para as duas metodologias observamos, para a Região Norte, correlação entre as duas abordagens (Figura 5). Este resultado, no entanto, não se repetiu para todas as regiões, como detalhado nos próximos itens.

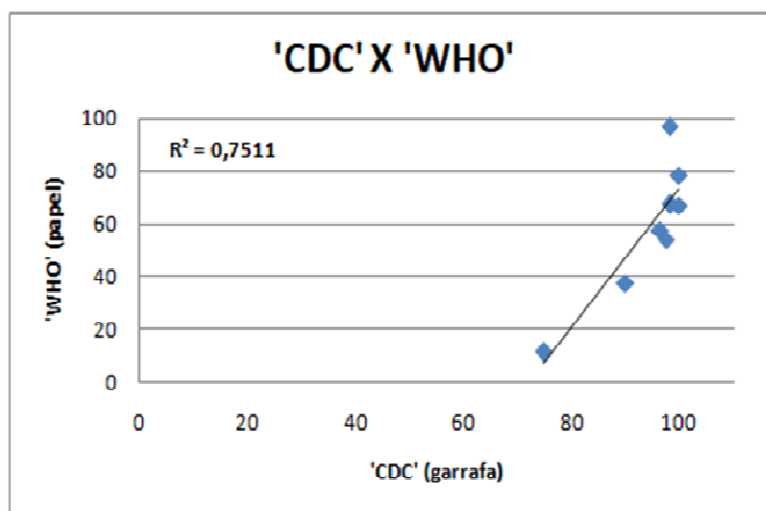


Figura 5 - Comparação entre as metodologias qualitativas 'CDC' (garrafas) e 'WHO' (papéis) usadas para avaliar a resistência de *A. aegypti* a deltametrina, usando dados de municípios da Região Norte.

Para os adultos, os ensaios quantitativos, feitos a partir de 2009, corroboram a alteração de suscetibilidade a deltametrina sugerida pelos ensaios qualitativos apresentados acima, apesar de estes últimos terem sido feitos com material de localidades distintas (Tabelas 6 e 7). Todas as populações apresentaram níveis muito altos de resistência a deltametrina, com RR_{95} maiores que 8,0. No entanto, com exceção de dois municípios avaliados em 2011, Pacaraima/RR e Marabá/PA, a maior RR_{95} foi 26,6. Em Pacaraima a RR_{95} a deltametrina, avaliada em 2011, foi 60,3 (Bellinato et al. 2016). Este alto nível de resistência foi encontrado depois de quatro anos consecutivos de incidência elevada de dengue no município (Tabela 2), e justifica o alto valor encontrado. Infelizmente só há uma avaliação para este município, o que impede identificação de tendências. Apenas para a localidade de Marabá há mais de uma avaliação; neste caso, evidenciamos um aumento de oito vezes nos níveis de resistência em intervalo de apenas dois anos entre as avaliações: RR_{95} 8,8 em 2009 e 70,7 em 2011. Este foi o maior valor de RR para deltametrina encontrado na Região Norte. No entanto, desde 2002 este município não exibiu taxas elevadas de dengue, compatíveis com epidemia. Ou seja, a exemplo do que foi observado para temephos, também não é possível fazer generalizações entre incidência de dengue e o aumento dos níveis de resistência a PY, mesmo levando-se em conta que o uso de PY em geral aumenta em epidemias, em função tanto das ações de bloqueio pelos serviços de saúde quanto da

intensificação do uso doméstico (Maciel-de-Freitas et al. 2014; Maciel-de-Freitas & Valle 2014; Bellinato et al. 2016, Macoris, Martins et al. 2018).

3.1.2.1.4 Mecanismos de resistência

Com relação aos mecanismos de resistência, para ambos os estágios do vetor avaliados, duas classes enzimáticas estavam consistentemente mais alteradas: GST e, com mais intensidade, EST - neste caso com diferentes substratos (Tabela 8). Poucas populações do vetor apresentaram alteração de MFO. Em relação ao alvo de OP, em apenas três das 20 avaliações a atividade total de ACE pareceu aumentada, de acordo com o critério empregado (percentual da população com atividade maior que o percentil 99 da cepa referência). No entanto, a exemplo de outras populações de campo de *A. aegypti*, todas foram classificadas como sensíveis à inibição pelo carbamato propoxur utilizado no ensaio, segundo o critério WHO (1998b; dados não mostrados). Em nenhuma oportunidade a resistência metabólica de larvas foi avaliada em dois momentos de uma mesma localidade, na Região Norte. No entanto, houve avaliação simultânea de larvas e adultos em seis ocasiões. Destas, em todas a atividade esteve mais alterada em adultos (Tabela 8, mais facilmente observado na coluna 'GAB').

Em relação aos PY, alguns relatos sugerem que a resistência mediada por alterações metabólicas tende a resultar em níveis de resistência mais baixos do que aquela mediada por alterações no alvo, o Na_V (Saavedra-Rodriguez et al. 2012; Martins & Valle 2012; Brito et al. 2013). Para testar esta possibilidade, comparamos as RR_{50} e RR_{95} para deltametrina com GAB. Os resultados estão mostrados na Figura 6a, b. Detectamos correlação inversamente proporcional entre a RR para o PY e GAB, ou seja, quanto maior o nível de resistência a deltametrina, de fato, menor parece ser a participação das enzimas quantificadas. Quando as mesmas comparações foram feitas restringindo os ensaios bioquímicos às enzimas detoxificantes, responsáveis pela resistência metabólica (ou seja, excluindo-se AChE, o alvo de OP), as correlações observadas ficaram ainda mais significativas (Figura 6c, d). Também comparamos as RR_{50} e RR_{95} para deltametrina com a frequência do alelo S, suscetível, do Na_V (Figura 6e, f). No entanto, neste caso não foi possível, com o conjunto de dados disponíveis para a Região Norte, confirmar associação forte entre RR muito altas para deltametrina e frequência de alterações no Na_V . Embora tenha sido encontrada, como esperado, relação inversamente proporcional entre a RR para deltametrina e a frequência do alelo suscetível, a correlação neste caso foi baixa.

Também procuramos investigar de forma direta a existência de relação entre resistência metabólica e resistência por alteração do alvo de PY. Para isso, comparamos os resultados de todos os 'municípios/ano' para os quais estavam disponíveis tanto quantificações da frequência de mutações no Na_V quanto avaliações bioquímicas da resistência metabólica. Mais especificamente, comparamos a atividade das enzimas detoxificantes ('GAB-AChE') com a frequência do alelo S do Na_V , ou seja, o alelo

suscetível. Embora a quantidade de dados seja bastante pequena, foi encontrada correlação positiva entre os dois parâmetros (Figura 6g), sugerindo opção por um ou outro mecanismo. Em outras palavras, a resistência metabólica tenderia a ser maior quando a alteração do alvo de PY é menor. Este resultado corrobora dados da literatura que demonstraram que mosquitos com a mutação do sítio alvo para PY apresentaram menor alteração de genes relacionados com a via de detoxificação metabólica (Saavedra-Rodriguez et al. 2012). Neste mesmo trabalho, os autores sugerem que diferentes populações de *A. aegypti* podem responder à seleção de formas distintas, o que dificulta, ou mesmo impede, tentativas de identificação de componentes da resistência metabólica que sejam diagnósticos de resistência a PY (Saavedra-Rodriguez et al. 2012).

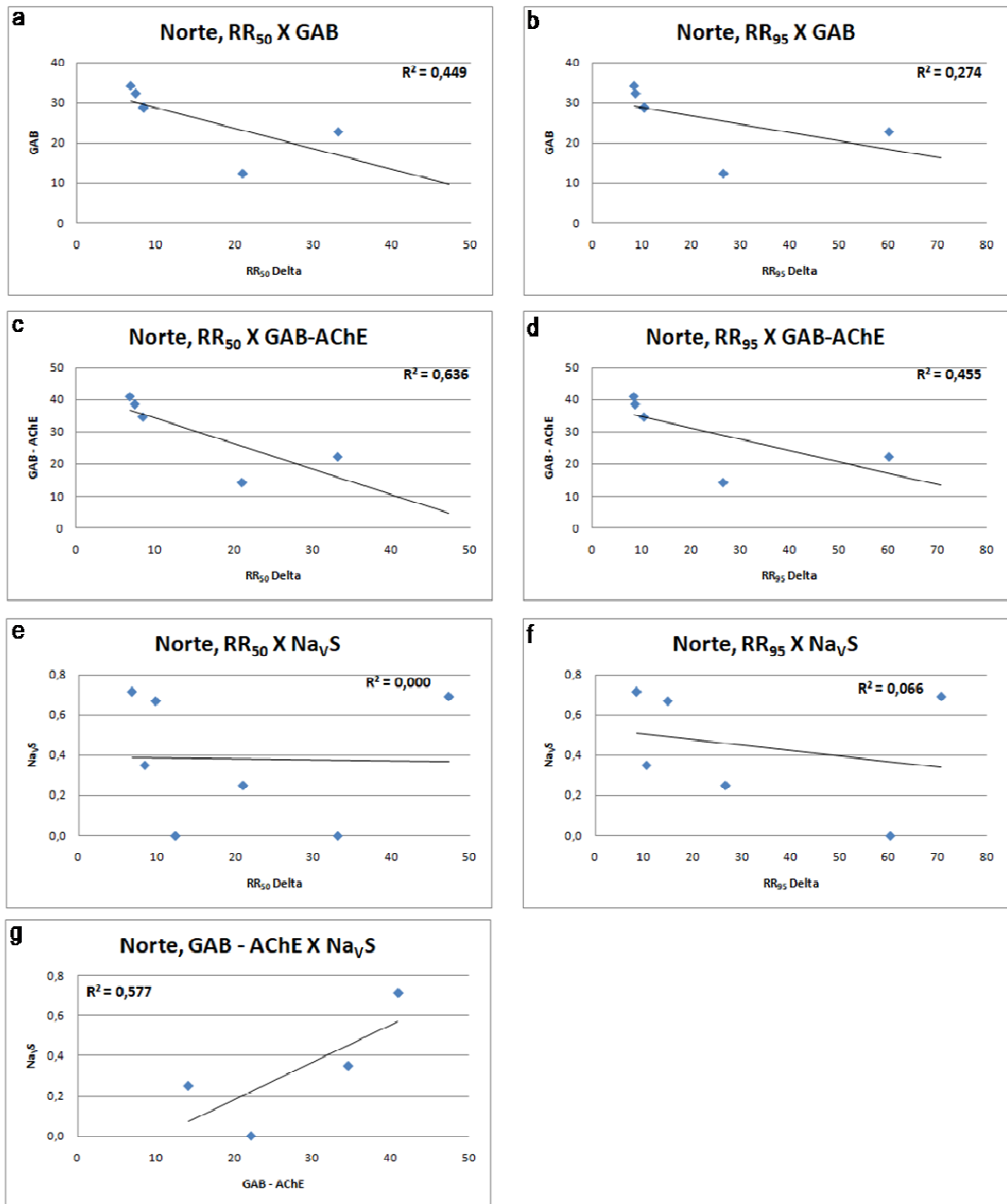


Figura 6 - Comparação entre as RR para deltametrina e os mecanismos de resistência: **a**, **b** - entre as RR₅₀ e RR₉₅ e a 'avaliação bioquímica global' (GAB); **c**, **d** - mesma comparação anterior, porém excluindo-se atividade total da acetilcolinesterase (AChE) da GAB (GAB-AChE); **e**, **f** - entre as RR₅₀ e RR₉₅ para deltametrina e a frequência do alelo S, suscetível, do Na_v; **g** - relação entre a atividade das enzimas detoxificantes ('GAB-AChE') e a frequência do alelo S do Na_v.

3.1.2.2 Região Nordeste

3.1.2.2.1 Incidência de dengue

De maneira geral, a dinâmica de dengue entre 2001 e 2012 na Região Nordeste apresenta quatro triênios com taxas de incidência distintas (Tabela 9). No primeiro e no quarto triênios, 2001-2003 e 2010-2012, as taxas foram altas, compatíveis com quadros epidêmicos, na maior parte das localidades avaliadas, em todos os estados. O segundo triênio, 2004-2006, caracterizou-se pelos menores valores de incidência, enquanto no terceiro triênio, 2007-2009, foram encontradas as maiores variações entre estados e municípios. O estado da Bahia foi particularmente afetado por incidências de dengue extremamente altas em 2009. Em particular, neste terceiro triênio, considerando os municípios avaliados, houve tendência de baixa incidência de dengue no início (2007) nos estados mais ao sul (SE, BA) e no último ano (2009), nos demais estados da Região Nordeste. O número de municípios/ano com incidência acima de 300 casos/100.000 habitantes, o 'ponto de corte' para o Ministério da Saúde, corrobora este cenário: o primeiro e o quarto triênios registraram, respectivamente, 81 e 70 municípios/ano com incidência alta de dengue; por outro lado, em todo o segundo triênio apenas 16 municípios/ano apresentaram incidência de dengue acima de 300/100.000 habitantes. O terceiro triênio teve número intermediário, de 48 municípios/ano com alta incidência de dengue.

A Região Nordeste foi bastante afetada por dengue no período avaliado: em dois estados, CE e RN, o percentual de municípios/ano com taxas de incidência compatíveis com quadro epidêmico foi 50%, ou maior (Tabela 9). Mesmo o estado do MA, que foi o menos afetado, exibiu incidência alta (acima de 300 casos por 100.000 habitantes) em mais que 12% das vezes. Foi também avaliado o percentual de municípios/ano com taxas acima de 1.000 casos/100.000 habitantes, um valor arbitrário, mas que consideramos característico de taxas muito altas de dengue (equivalente a 1% da população, e mais que três vezes o ponto de corte definido pelo Ministério da Saúde, Tabela 10). Neste caso, em consonância com os dados anteriores, não houve registro desta situação no MA. Piauí também não apresentou taxas tão elevadas de incidência. Por outro lado, CE e RN foram confirmados como os estados mais afetados por dengue no período. Taxas elevadas também foram encontradas para AL e BA.

Tabela 10: Variações das taxas de incidência de dengue nos estados da Região Nordeste entre 2001 e 2012. São apresentados os percentuais de municípios/ano de cada estado, no período, com taxas de incidência de dengue (a) acima de 300 casos por 100.000 habitantes, ponto de corte definido pelo Ministério da Saúde para incidência alta, e (b) acima de 1.000 casos por 100.000 habitantes, valor definido arbitrariamente (1%) como típico de incidência extremamente alta de dengue. Percentuais apresentados em ordem crescente a partir do ponto de corte do Ministério da Saúde (a).

Estado	n° de casos/100.000 habitantes	
	>300	>1000
MA	12,5	0,0
SE	25,0	5,6
PI	27,8	0,0
PB	29,2	9,7
PE	32,1	10,9
BA	33,3	15,3
AL	36,1	16,7
RN	50,0	21,7
CE	51,7	16,7

3.1.2.2.2 Resistência ao larvicida temephos

Com exceção do Rio Grande do Norte, o larvicida temephos foi distribuído para todos os estados da região, praticamente de forma contínua até 2011-2014 (Tabela 11). O *Bti* foi utilizado em conjunto ao temephos nos estados do Maranhão, Ceará, Pernambuco e Alagoas, até 2009-2010. Em quase toda a Região Nordeste 2009-2010 também foi o período em que IGR foram introduzidos, inicialmente em adição aos outros larvicidas. Em 2014 porém, quase todos os estados usavam exclusivamente IGR.

Da Região Nordeste, todos os municípios avaliados foram considerados resistentes ao temephos, com exceção de Fernando de Noronha em 2009 (Araújo et al. 2013) (Tabela 12). Vale ressaltar que as maiores RR para temephos encontradas no país, até o momento, são oriundas da Região Nordeste.

Apesar disto, houve muita variação nos níveis de resistência entre os estados. Para 20% dos municípios/ano avaliados, a RR₉₅ para temephos foi acima de 100; no entanto, em quase 40% dos casos, a RR₉₅ esteve abaixo de 10. O estado do MA, para o qual encontramos as menores taxas de incidência de dengue no período, também apresentou os valores mais baixos de RR₉₅ a temephos, sempre inferiores a 10. Por outro lado, os registros de RR a temephos acima de 100 (por vezes acima de 200), valores muito superiores aos encontrados nas outras regiões, se concentraram em municípios de PE (6), sul do CE (2), leste da BA (5) e em um município do interior de AL.

Na Região Nordeste, também houve muita variação em vários aspectos do monitoramento, entre eles: (a) a quantidade de municípios avaliados por estado (apenas dois, como no MA e PI, até mais que 10, como em PE e BA, com respectivamente 13 e 12 municípios acompanhados); (b) a frequência de avaliação dos diferentes municípios: em alguns estados, como MA e PB, cada município

foi avaliado apenas uma vez. No entanto, alguns municípios de outros estados foram avaliados cinco (Juazeiro do Norte/CE, Natal/RN), seis (Fortaleza/CE e Maceió/AL) ou mesmo sete (Aracaju/SE) vezes no período; e (c) a regularidade do monitoramento - neste caso, dois estados chamam a atenção: a PB, onde cinco dos seis municípios/ano foram avaliados em 2003 e, de outro lado, a BA, que tem apenas três, dos 23 registros, anteriores a 2008.

Os perfis de resistência de alguns municípios para os quais havia mais de uma avaliação foram confrontados com os dados levantados sobre as taxas de incidência de dengue e de fornecimento anual de inseticidas para cada estado. Embora estes dois parâmetros não esgotem o leque de possibilidades de aspectos que influenciam a dinâmica da resistência a temephos, foi possível fazer algumas correlações tentativas.

- Em Crato, ao sul do CE, a RR_{95} para temephos em 2009 foi maior que 190. Este município apresentou um forte histórico de epidemias de dengue entre 2001 e 2009, com cinco anos de incidência alta, dos quais dois anos de taxas acima de 1.000 casos/100.000 habitantes. Este cenário pode ter relação com a intensificação do controle químico e a consequente elevada RR para temephos. No entanto, embora a incidência de dengue tenha permanecido alta no município até pelo menos 2012, em 2013 a resistência para temephos decaiu mais de três vezes, para RR_{95} de 65. A interrupção do fornecimento deste larvicida a partir de 2011 no estado pode ter contribuído para este resultado.

- Ainda no CE, a capital, Fortaleza, foi objeto de seis avaliações, entre 2002 e 2007, quando a RR_{95} para temephos aumentou de 8-10 para 43, valor muito elevado. Levando em conta a intensificação do controle químico em períodos epidêmicos, estes resultados poderiam ser parcialmente 'explicados' pelas incidências anuais de dengue, que estiveram acima do 'ponto de corte', 300 casos/100.000 habitantes, cinco vezes entre 2001 e 2007. Infelizmente não há avaliações de Fortaleza posteriores a 2007, para corroborar esta hipótese: três das cinco taxas de incidência de dengue estiveram acima de 1.200 casos/100.000 habitantes entre 2008 e 2012. Vale ressaltar que nos anos seguintes à última avaliação da resistência a temephos das amostras de Fortaleza, em 2008 e 2009, os três larvicidas, temephos, *Bti* e IGRs, foram fornecidos simultaneamente no CE.

- No estado de AL, com exceção de Santana do Ipanema, foram encontrados valores relativamente estáveis de RR_{50-95} para temephos, variando entre 4 e 17. Estes dados são robustos, uma vez que os municípios foram acompanhados entre três e seis vezes no período, e consistentes com o fornecimento de larvicidas no estado: temephos foi fornecido contínua mas não exclusivamente entre 2003 e 2013, tendo sido sempre concomitante com *Bti* e/ou com IGR.

- Por outro lado, no RN, embora só haja registro de fornecimento de temephos em 2004, a RR_{95} para este OP também oscilou na mesma faixa que em AL, em torno de 12 (entre aproximadamente 10 e 19) entre 2004 e 2011. Aqui também este é um dado consistente, considerando que, dos cinco municípios avaliados no RN, quatro foram acompanhados entre três e cinco vezes no

período. Esta é uma situação que revela a necessidade de identificação de mais parâmetros de correlação, além da incidência de dengue e dos registros de fornecimento de inseticidas.

- Barra dos Coqueiros/SE é outro exemplo de que os parâmetros aqui empregados nas correlações não foram suficientes para justificar todas as variações encontradas no perfil de resistência a temephos: a RR para este larvicida, único fornecido no estado entre 2003 e 2008, aumentou mais de sete vezes entre 2000 (3) e 2004 (23), sem que tenha havido registro de taxas elevadas de incidência de dengue naquele município.

Na Bahia houve abastecimento contínuo de temephos entre 2003 e 2013, e este foi o único larvicida fornecido ao estado entre 2004 e 2009. Entre os municípios baianos monitorados mais de uma vez, dois cenários distintos merecem destaque, como exemplos da variabilidade das situações encontradas em campo: (a) registros de incidência alta de dengue e níveis estáveis de resistência a temephos - este é o caso de Barreiras, que passou por dois anos de incidência muito alta de dengue entre 2008 e 2012 (acima de 1.600 casos/100.000 habitantes), embora a RR_{95} para temephos tenha ficado em torno de 5,0; (b) registros de incidência alta de dengue e níveis crescentes de resistência a temephos - esta situação foi identificada em Itabuna, Jequié e em Jacobina. Em Itabuna, a RR_{95} para temephos, que era 18,6 em 2004, foi de 55,8 em 2013; este município teve registros de incidências altíssimas de dengue, na faixa de, respectivamente, 7.000 e 3.000 casos/100.000 habitantes em 2009 e em 2012. Em Jequié, em contraste com as baixas incidências de dengue entre 2004-2008, o período entre 2009 e 2012 foi de incidências elevadas, ao mesmo tempo em que a RR_{95} para temephos quase triplicou de valor. Em Jacobina os níveis de resistência a temephos aumentaram 10 vezes em um ano, entre 2008 e 2009, quando a RR_{95} alcançou 104. Quatro anos depois este nível mais que dobrou, chegando a quase 230. Neste município a incidência de dengue foi alta, ou muito alta, em quase todo o período avaliado, entre 2001 e 2012.

3.1.2.2.3 Resistência a deltametrina

Os PY foram distribuídos para todos os estados da Região Nordeste, entre 2003 e 2014, de forma ininterrupta (Tabela 13). Há registro de fornecimento pontual de malathion para o CE em 2006 e BA em 2011. Este OP começou ser distribuído continuamente, em adição à deltametrina, no CE em 2008 e em alguns outros estados do Nordeste a partir de 2010.

Na Região Nordeste, todos os 39 municípios/ano avaliados para a resistência a deltametrina com ensaios qualitativos, metodologia WHO, foram classificados como resistentes (26) ou com resistência incipiente (13). Quatorze municípios/ano foram avaliados com a metodologia CDC e destes, 13 foram submetidos aos dois ensaios qualitativos. No entanto, como esperado a metodologia CDC classificou uma menor frequência de amostras resistentes: apenas dois municípios/ano foram considerados resistentes de fato; três municípios que haviam sido considerados resistentes com a

metodologia WHO foram classificados como suscetíveis no ensaio CDC (Tabela 14). Quando as duas metodologias, WHO e CDC, foram comparadas, diferente do resultado obtido para a Região Norte, a correlação foi muito mais fraca para a Região Nordeste (Figura 7).

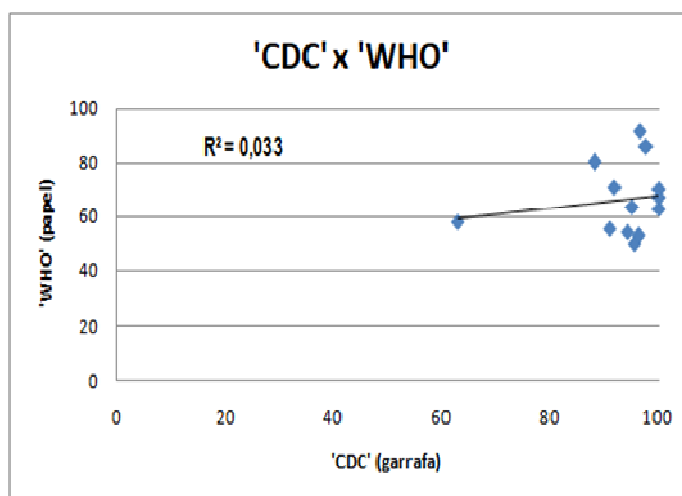


Figura 7 - Comparação entre as metodologias qualitativas 'CDC' (garrafas) e 'WHO' (papéis) usadas para avaliar a resistência de *A. aegypti* a deltametrina, usando dados de municípios da Região Nordeste.

Os ensaios quantitativos de avaliação da resistência de adultos a deltametrina foram realizados em oito municípios pertencentes a quatro estados da região (Tabela 15). Resistência a PY foi confirmada em toda a Região Nordeste, embora em nenhum município tenham sido feitos ensaios dose-diagnóstica em anos para os quais havia dados quantitativos (Tabelas 14 e 15). Todas as RR_{95} encontradas foram altas, sempre acima de 7,0. No entanto, com exceção de dois municípios/ano, Mossoró/2011 e Crato/2013, todos os valores foram inferiores a 20.

Para os municípios de Mossoró e Aracaju há duas avaliações, com um ano de intervalo e a RR_{95} a PY aumentou em ambas as localidades: 2,7 e 1,6 vezes respectivamente. Nas duas localidades, o incremento dos níveis de resistência pode ser justificado pelo aumento do uso doméstico de PY devido à elevada incidência de dengue encontrada no segundo momento de avaliação (Tabela 9). Em paralelo, também foram observadas alterações no sítio alvo de PY, o canal de sódio regulado por voltagem: nos dois casos houve diminuição da frequência do alelo suscetível, o que está de acordo com o aumento dos níveis de resistência.

3.1.2.2.4 Mecanismos de resistência

Em relação à resistência metabólica, duas classes enzimáticas mostraram-se bastante alteradas para ambos os estágios do vetor: GST e EST (Tabela 16). No caso das EST, em larvas α -EST e β -EST pareceram igualmente comprometidas, enquanto α -EST foi a classe mais alterada em adultos. De acordo com o critério adotado para avaliação de atividade total de ACE, apenas dois municípios/ano apresentaram incremento. No entanto, segundo o critério WHO (1998b), que avalia a

inibição de ACE pelo carbamato propoxur, todos os municípios/ano da Região Nordeste são suscetíveis ao inseticida. Evidenciamos alterações da atividade de MFO e de pnpa-EST, em alguns casos, principalmente nas avaliações com adultos. Houve avaliação simultânea para ambos os estágios do vetor em oito municípios da Região Nordeste, com maior atividade evidenciada em adultos (Tabela 16, mais facilmente observado na coluna 'GAB'). Para dois municípios, Aracaju e Caicó, temos mais de um momento de avaliação da resistência metabólica para ambos os estágios. De maneira geral houve incremento na atividade das enzimas detoxificantes (GAB-AChE) no decorrer do tempo, tanto para larvas quanto para adultos.

Procuramos associar os níveis de resistência a deltametrina com mecanismos de resistência específicos. Comparamos as RR_{50} e RR_{95} para deltametrina com a média de variação das atividades enzimáticas ('GAB', Figura 8a, b). Foi encontrada apenas uma fraca correlação negativa entre as RR e a atividade das enzimas, ou seja, maiores níveis de resistência pareceram se correlacionar com menor resistência metabólica. Como esperado, esta correlação aumentou, mas apenas um pouco, quando a comparação se restringiu às enzimas detoxificantes ('GAB-AChE', Figura 8c, d). Uma fraca correlação entre os níveis de resistência a deltametrina e alteração no sítio-alvo de PY também foi encontrada; neste caso, também como esperado, maiores RR estariam associadas a menores frequências do alelo suscetível, ou seja, como visto na Região Norte e em outros exemplos da literatura, alterações do Na_V parecem responder por altos níveis de resistência a PY (Figura 8e, f). Corroborando este resultado, porém com valores bem mais discretos que para a Região Norte, a Região Nordeste apresentou alguma correlação, inversamente proporcional, entre resistência metabólica e resistência por alteração do alvo de PY (Figura 8g).

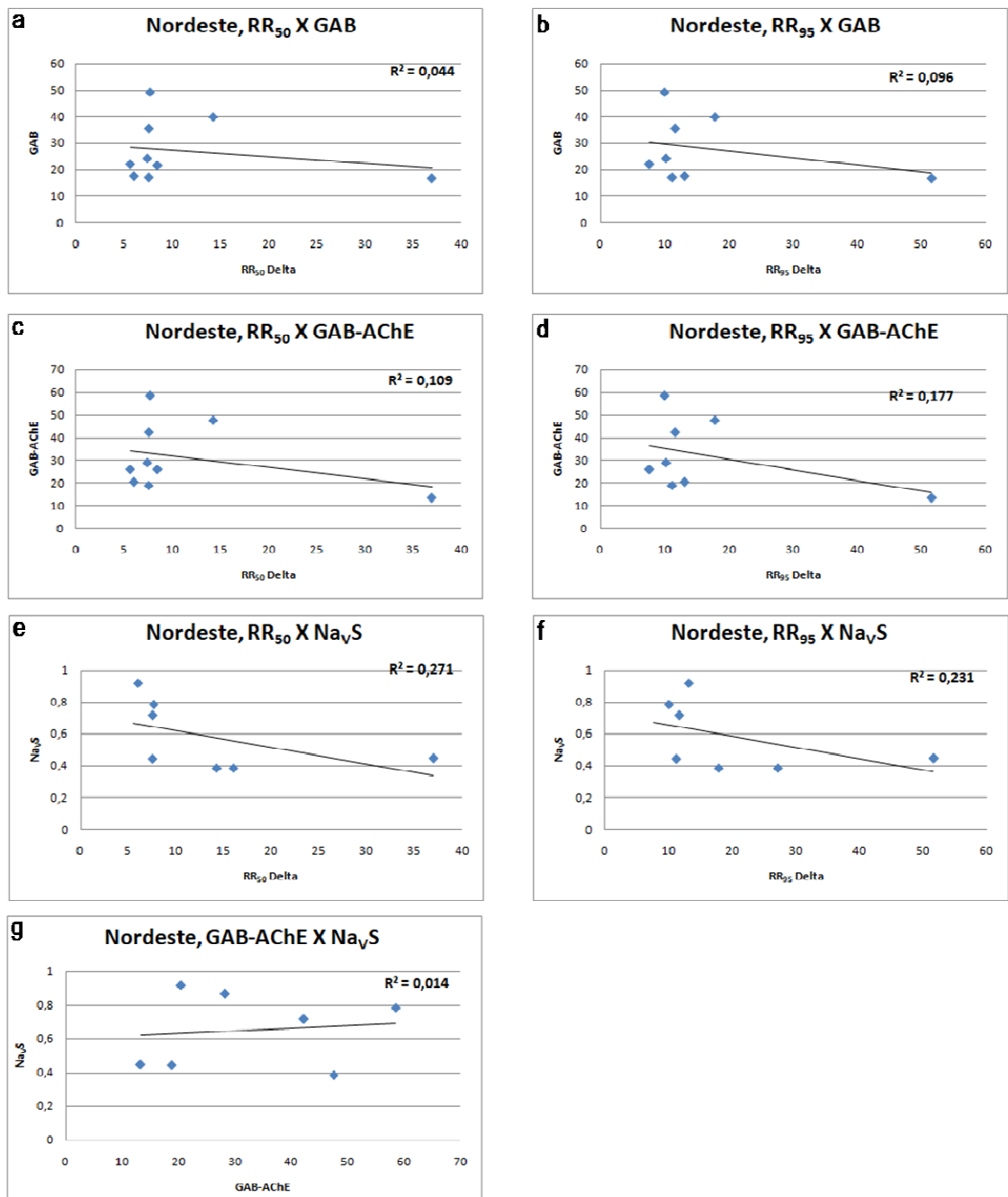


Figura 8 - Comparação entre as RR para deltametrina e os mecanismos de resistência: **a, b** - entre as RR₅₀ e RR₉₅ para deltametrina e a 'avaliação bioquímica global' (GAB); **c, d** - mesma comparação anterior, porém excluindo-se AChE da GAB (GAB-AChE); **e, f** - entre as RR₅₀ e RR₉₅ para deltametrina e a frequência do alelo S, suscetível, do Na_v; **g** - comparação entre atividade das enzimas detoxificantes ('GAB-AChE') e a frequência do alelo S do Na_v.

3.1.2.3 Região Sudeste

3.1.2.3.1 Incidência de dengue

Na Região Sudeste o estado de SP se diferencia em muitos aspectos, como detalhado abaixo. De maneira geral, é o estado que tem maior histórico de monitoramento da resistência a inseticidas e também o que apresenta as menores taxas de incidência de dengue. Em resumo, é um exemplo positivo do efeito da vigilância e do manejo da resistência sobre a prevenção de dengue.

Entre 2001 e 2012, SP foi o estado menos afetado por dengue: menos de 20% dos municípios/ano apresentaram incidência acima do ponto de corte do Ministério da Saúde; destes, na metade, ou em 10% do total de municípios/ano do estado, houve registro de mais que 1.000 casos/100.000 habitantes (Tabela 17). Em contraste, o ES foi o estado mais afetado por dengue no período avaliado, com mais de 50% de municípios/ano apresentando incidência acima de 300 casos/100.000 habitantes, e 20% acima de 1.000 casos/100.000 habitantes. Os estados do RJ e de MG apresentaram entre aproximadamente 45 e 55% de municípios/ano com incidência alta de dengue e em torno de 15-20% com incidência acima de 1%.

3.1.2.3.2 Resistência ao larvicida temephos

No Sudeste, com exceção do RJ, de maneira geral, o temephos foi distribuído continuamente durante todo o período. Dependendo do estado, esta distribuição foi concomitante com *Bti* até 2007-2010, e posteriormente com IGR (Tabela 18). Também neste aspecto o RJ foi exceção, uma vez que recebeu IGR, de forma intermitente, desde 2004. Ainda, no RJ, IGR passaram a ser fornecidos de forma contínua a partir de 2008, antes dos outros estados.

Foram localizados registros de avaliações de 42 municípios, com um total de 250 municípios/ano para temephos na Região Sudeste. Destes registros, mais que 80% são de SP, com 17 (de um total de 20) municípios avaliados várias vezes, alguns quase que a cada ano e, em muitos casos, desde 1998. Enquanto em SP alguns municípios foram avaliados entre 14 e 18 vezes entre 1998 e 2015, nos outros estados do Sudeste os primeiros bioensaios com temephos datam de 1999 (RJ) e 2005 (MG e ES) e se estendem até 2011. Nestes estados a maior parte dos municípios foi avaliada uma ou duas vezes no período e houve no máximo cinco avaliações, no caso da cidade do Rio de Janeiro (Tabela 19).

Este esforço diferencial de monitoramento e manejo da resistência se reflete nos perfis de suscetibilidade: a média das RR_{95} para temephos em SP (3,5) foi pelo menos três vezes menor que dos outros estados do Sudeste (RJ, MG e ES: RR_{95} médias de 10,1, 11,4 e 13,3, respectivamente). Em SP, 60% dos municípios/ano apresentaram RR_{95} acima de 3,0, enquanto que nos outros estados, com

exceção de São José do Vale do Rio Preto/RJ, 100% dos municípios/ano atingiram este valor. Em SP, em apenas 1% dos municípios/ano houve registro de RR_{95} para temephos acima de 10,0 (dois de um total de 194 registros deste parâmetro). Em contraste, este índice foi alcançado por mais da metade dos municípios/ano dos outros estados da Região Sudeste. De um total de 42 localidades avaliadas na Região Sudeste, quatro foram classificadas como suscetíveis ao inseticida (RR_{95} inferior a 3,0). Destas, três se localizam em SP. Em particular, dos quatro municípios, apenas um foi avaliado mais de uma vez: Botucatu, que permaneceu suscetível ao temephos durante todas as seis rodadas de monitoramento, realizadas no decorrer de 10 anos, entre 2004 e 2014. Este município não apresentou taxa de incidência acima do 'limiar' epidêmico.

Em SP, apenas São Sebastião em 2004 e Santos em 2005 apresentaram RR_{95} para temephos acima de 10. Vale ressaltar, nestes municípios, a redução de tais níveis de resistência em todas as avaliações posteriores, culminando com valores compatíveis com suscetibilidade, alcançados em 2015 para ambos os municípios. Em SP, as maiores médias de alteração da RR_{95} para temephos foram obtidas para Itapevi, São Sebastião, Santos e São José do Rio Preto. Destas quatro localidades, as duas últimas estão entre as quatro cidades de SP aqui avaliadas com as maiores médias de taxas de incidência de dengue no período 2001-2012.

Por outro lado, o estado do ES, que registrou as maiores incidências de dengue da Região Sudeste no período, também foi o que apresentou as maiores alterações de RR_{95} para temephos. Estes dados também são consistentes, visto que para todos os municípios do ES houve mais de uma avaliação. No caso do RJ, embora a maior parte das localidades tenha sido avaliada mais de uma vez, há lacunas nos registros de RR_{95} ; e, em MG, apenas a capital, Belo Horizonte, foi avaliada mais de uma vez.

3.1.2.3.3 Resistência a deltametrina

Os PY foram amplamente distribuídos em toda a Região Sudeste (Tabela 20). O estado de SP recebeu malathion durante todo o período, e para os demais estados este OP foi fornecido a partir de 2007, ou mais tarde. Vale ressaltar que a Tabela 20 informa o fornecimento de aduclidas pelo Ministério da Saúde para todos os programas de controle de vetores e que o estado de SP, na prática, parou de utilizar PY para controle do vetor da dengue em 2000, quase 10 anos antes da substituição desta classe de aduclidas pelo PNCD no restante do país (Macoris et al. 2014).

Foram localizadas informações sobre bioensaios qualitativos com deltametrina para 115 e 75 municípios/ano, respectivamente com as metodologias WHO e CDC (Tabela 21). Nenhum resultado foi classificado como suscetível. Todos se mostraram resistentes ou com resistência incipiente. Com a metodologia WHO, 92% dos ensaios (n=106) exibiram resistência instalada; com a metodologia CDC, como esperado, este perfil foi alcançado para uma taxa menor de amostras, 72% dos ensaios (n=54).

Para 46 municípios/ano houve avaliação simultânea com as duas metodologias, WHO e CDC. Entretanto, encontramos uma fraca correlação, negativa, entre as duas avaliações (Figura 9).

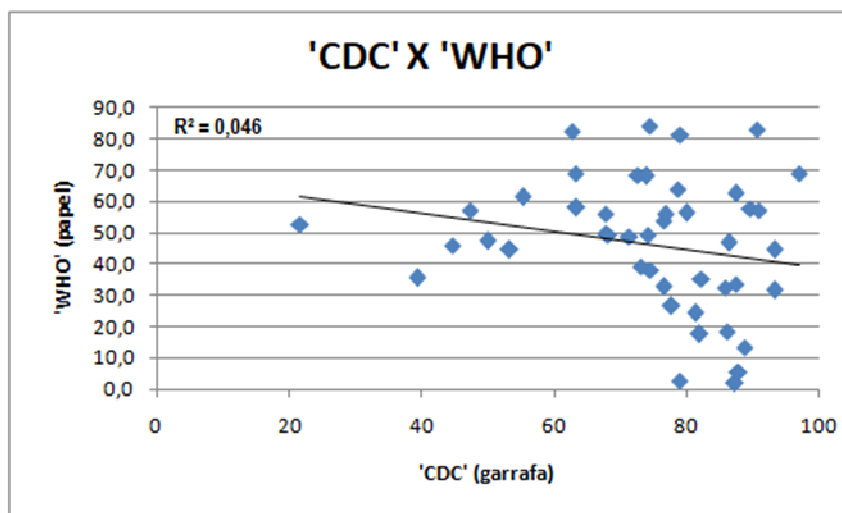


Figura 9 - Comparação entre as metodologias qualitativas 'CDC' (garrafas) e 'WHO' (papéis) usadas para avaliar a resistência de *A. aegypti* a deltametrina, com dados de municípios da Região Sudeste.

Todas as populações submetidas a bioensaios quantitativos para deltametrina apresentaram resistência elevada (Tabela 22), corroborando, de maneira geral, os bioensaios qualitativos. As altas razões encontradas na Região Sudeste podem ser um reflexo da incidência elevada de dengue nos municípios avaliados, no período anterior ou no momento da coleta em campo (Tabela 17).

3.1.2.3.4 Mecanismos de resistência

Em relação à resistência metabólica, GST foi a classe enzimática mais alterada em ambos os estágios do vetor (Tabela 23). Nos adultos também houve alteração das EST, principalmente α -EST e pNPA-EST. Alterações de MFO foram identificadas em algumas amostras, principalmente de adultos. Encontramos alterações na atividade total de ACE em aproximadamente 30% das amostras avaliadas, tanto de larvas quanto de adultos. Em nenhum caso foi notada alteração nesta enzima nos dois estágios de uma mesma população/ano. Apesar deste resultado, todas as amostras foram classificadas como suscetíveis ao OP de acordo com o critério de inibição de atividade por propoxur (WHO, 1998b). Na Região Sudeste, dos oito pares de avaliações simultâneas de larvas e adultos, a resistência metabólica foi sempre maior em adultos. Em nenhuma oportunidade a resistência metabólica de larvas foi avaliada em dois momentos em um mesmo município. Por outro lado, embora para cinco municípios estejam disponíveis, no período, 2-3 avaliações da resistência metabólica de adultos, faltam dados simultâneos de bioensaios quantitativos ou de alterações no N_{av} , o que impede a análise de tendências ou dos principais mecanismos participantes, em cada caso.

De fato, na Região Sudeste, tentativas de investigar a relação entre resistência a PY e os principais mecanismos envolvidos esbarraram na limitada quantidade de dados: para apenas oito amostras havia informação simultânea sobre a RR_{50} e a resistência metabólica. Este número foi reduzido a quatro quando a RR_{95} foi considerada, e a três, no caso de alterações no Na_V . Mesmo assim, foi encontrada correlação entre RR_{95} (mas não RR_{50}) para deltametrina e resistência metabólica ('GAB' ou 'GAB-AChE', Figura 10a-d): maiores níveis de resistência pareceram se correlacionar com menores alterações de atividade metabólica. No caso de alteração do alvo de PY, só foi possível comparar com a RR_{50} , por falta de dados simultâneos ' RR_{95} ' e ' Na_V '. Apesar do número extremamente reduzido de amostras, houve tendência de relação inversamente proporcional entre RR_{50} para deltametrina e a frequência do alelo suscetível para Na_V (Figura 10e). Em consonância, houve correlação, embora fraca, entre resistência metabólica e resistência por alteração do alvo de PY (Figura 10f), sugerindo opção por um ou outro mecanismo.

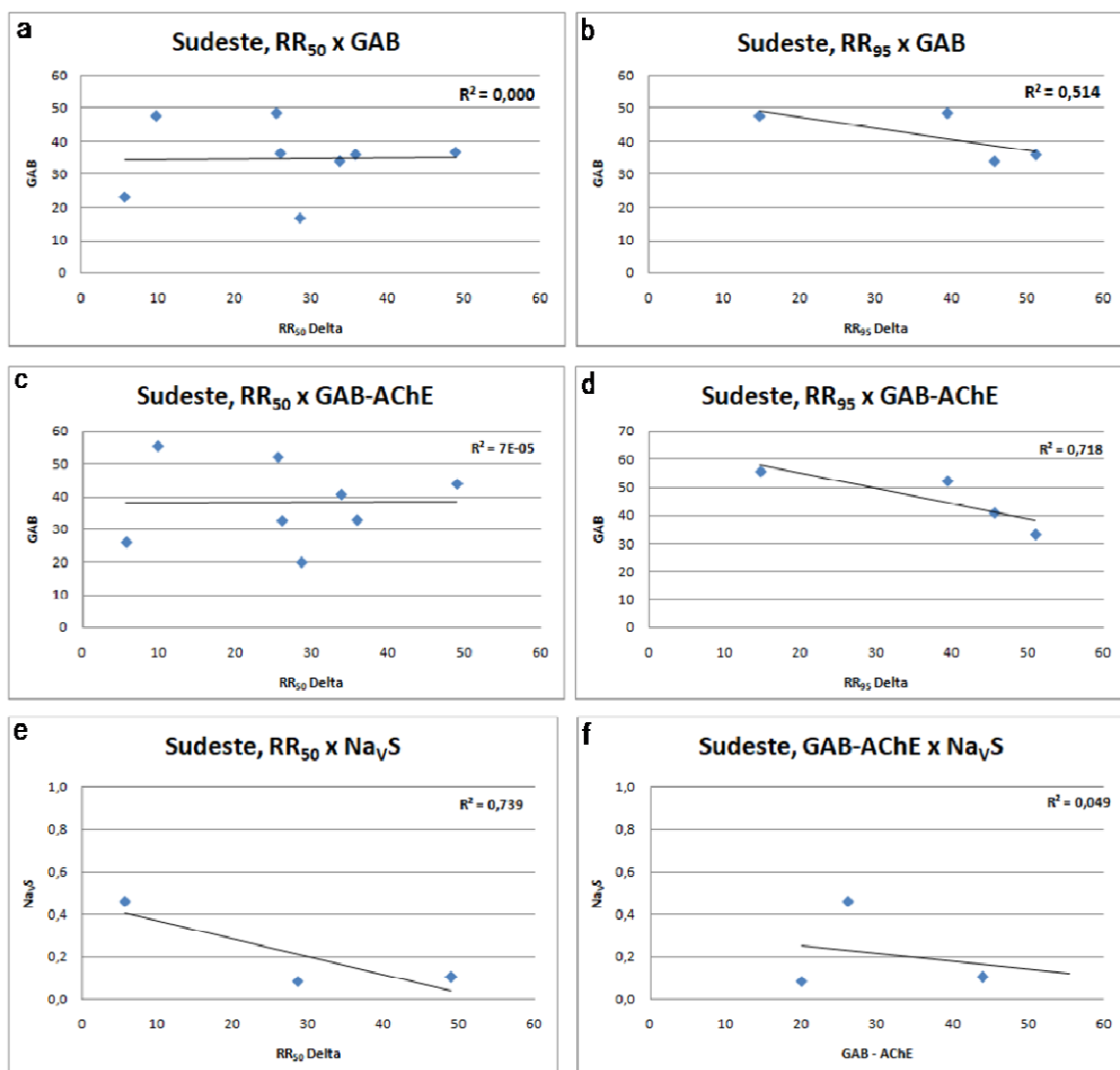


Figura 10 - Comparação entre as RR para deltametrina e os mecanismos de resistência: **a, b** - entre as RR_{50} e RR_{95} para deltametrina e a 'avaliação bioquímica global' (GAB); **c, d** - mesma comparação anterior, porém excluindo-se AChE da GAB (GAB-AChE); **e** - entre a RR_{50} para deltametrina com a frequência do alelo S, suscetível, do Na_V ; **f** - atividade das enzimas detoxificantes ('GAB-AChE') comparada com a frequência do alelo S do Na_V .

3.1.2.4 Região Sul

3.1.2.4.1 Incidência de dengue

A Região Sul foi, sem sombra de dúvida, a menos afetada por dengue do país. No período avaliado não ocorreram epidemias em SC (Tabela 24). No RS, das localidades aqui avaliadas, apenas Ijuí registrou incidência alta de dengue, em 2010; neste caso porém, o índice de notificações chegou a mais que 12 vezes o ponto de corte estabelecido pelo Ministério da Saúde. O estado do PR foi o mais afetado por dengue da Região Sul. Em particular, Foz do Iguaçu, localizado na tríplice fronteira com Paraguai e Argentina, foi o primeiro município do Sul a exibir epidemias de dengue, o que ocorreu inicialmente em 2002. No ano seguinte, 2003, houve registro de epidemia de dengue em três municípios do norte central do Paraná aqui avaliados: Cambé, Iporã e Londrina. A partir daí novos registros de taxas de incidência de dengue altas só voltaram a acontecer no estado em 2007 e, depois, em 2010/2011. Entre os municípios mais afetados no período, destaca-se Foz do Iguaçu, que vivenciou quatro anos com taxas explosivas desta arbovirose, entre três e 12 vezes o limiar de 300 casos/100.000 habitantes.

3.1.2.4.2 Resistência ao larvicida temephos

O larvicida temephos foi distribuído para todos os estados da Região Sul quase que continuamente entre 2003 e 2014 (Tabela 25). Além de temephos, o RS recebeu *Bti* nos anos de 2006 e 2009 e IGR em 2014. Foi também neste ano, 2014, que SC recebeu IGR pela primeira vez. No PR, por outro lado, fornecimento destes larvicidas, CSI, ocorreu a partir de 2010.

Doze municípios da Região Sul foram avaliados em relação à resistência a temephos, totalizando 29 municípios/ano (Tabela 26). Monitoramento efetivo ocorreu para Foz do Iguaçu e Maringá, ambos no PR, avaliados respectivamente oito e seis vezes entre 2001 e 2009. Dos outros municípios, seis foram avaliados apenas uma vez e os quatro restantes, 2-3 vezes. Em 55% dos bioensaios a RR_{95} foi maior que 3,0, o ponto de corte do Ministério da Saúde que define resistência. Porém, em nenhum caso a RR_{95} foi maior que 7,0. As maiores razões de resistência foram identificadas em Maringá/2005 e em Iporã/2006. Na maior parte dos municípios avaliados mais de uma vez no período, notou-se discreto aumento da resistência a OP.

3.1.2.4.3 Resistência a deltametrina

Em relação aos adulticidas, PY foram fornecidos de maneira quase que contínua e exclusiva na Região Sul (Tabela 27). Malathion foi distribuído apenas para o Paraná a partir de 2010. Bioensaios qualitativos com deltametrina foram realizados só para três localidades do PR, tendo sido avaliados oito municípios/ano pelo método WHO e, destes, quatro municípios/ano pela metodologia

CDC (Tabela 28). Em nenhum caso houve registro de suscetibilidade. Correlação entre as duas metodologias, WHO e CDC, foi negativa e muito baixa, a exemplo da Região Sudeste (Comparar Figuras 11 e 9). Informações quantitativas de resistência a deltametrina estão disponíveis apenas para Santa Rosa/RS: RR₉₅ 33,3 em 2011 (Tabela 29).

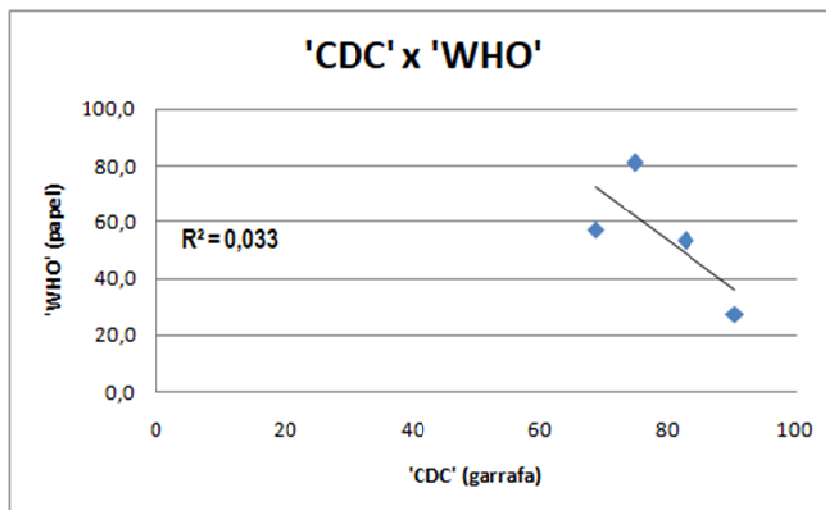


Figura 11 - Comparação entre as metodologias qualitativas 'CDC' (garrafas) e 'WHO' (papéis) usadas para avaliar a resistência de *A. aegypti* a deltametrina, com dados da Região Sul.

3.1.2.4.4 Mecanismos de resistência

Santa Rosa também é o único município da Região Sul para o qual há informação sobre potenciais mecanismos de resistência. Não foram identificadas alterações nas enzimas detoxificantes de larvas, resultado em consonância com o *status* suscetível para temephos de *A. aegypti* do município (Tabela 30). Nos adultos, foram identificadas alterações nas EST, com elevada participação de α -EST e pNPA-EST. Tal atividade aumentada de EST já havia sido atribuída à resistência a PY no país (Montella et al. 2007). Encontramos alteração de AChE nos adultos, porém de acordo com o critério WHO (1998b) a população foi considerada suscetível ao OP quando exposta ao propoxur. Também foi identificada participação de alterações no alvo de PY, o *Nav*.

3.1.2.5 Região Centro-Oeste

3.1.2.5.1 Incidência de dengue

A incidência de dengue entre 2001 e 2012 nos municípios da Região Centro-Oeste avaliados está representada na Tabela 31. Todos os municípios passaram por pelo menos um ano de epidemia no período. Brasília, no DF, foi a localidade menos afetada, com índice elevado de dengue apenas em 2010. Nos municípios do MS avaliados, a partir de 2006, de maneira geral, ocorreu um aumento na taxa de incidência de dengue, com valores até 20 vezes o 'limiar' de epidemia, como visto em Campo Grande em 2007. Em GO, a incidência de dengue também alcançou valores extremamente elevados em várias localidades. Chamaram a atenção os índices elevados de dois municípios vizinhos, Goiânia e Aparecida de Goiânia, durante todo o período avaliado, de 2001 a 2012. Ressalta-se também, em 2010, uma forte epidemia de dengue em toda a Região Centro-Oeste: em 16 dos 17 municípios avaliados a incidência de dengue esteve acima de 300 casos por 100.000 habitantes; destes, em quatro os valores foram mais que 10 vezes este limiar.

3.1.2.5.2 Resistência ao larvicida temephos

Com exceção do DF, em toda a Região o fornecimento de temephos foi contínuo entre 2003 e 2013. Vale ressaltar que, em MT e no DF, temephos foi o único larvicida disponível até 2009. Tanto *Bti* em alguns estados e intervalos de tempo, quanto, posteriormente, IGR em todo o Centro-Oeste, foram utilizados em adição ao temephos até 2013. Em 2014 passou-se a usar apenas IGR como larvicida em todo o Centro-Oeste (Tabela 32).

Todos os municípios da Região Centro-Oeste avaliados foram classificados como resistentes ao temephos, com exceção do DF em 2008 (Moyes et al. 2017) (Tabela 33). Esta foi a localidade com maior número de avaliações e também com os menores níveis de resistência ao larvicida, resultado simultâneo às menores taxas de incidência de dengue observadas no período. A RR₉₅ de Cuiabá a temephos também esteve entre as mais baixas da região (Tabela 33). Este, que foi o único município de MT avaliado, e apenas em 2005, não havia apresentado incidências muito altas de dengue até então (Tabela 31), o que poderia justificar o resultado.

No MS a RR₉₅ para temephos não chegou a 8,0 em nenhum caso (Tabela 33). Isto ocorreu mesmo para avaliações feitas em 2011, depois do período 2006-2010, de taxas de incidência de dengue extremamente elevadas (Tabela 31). Em consonância com este resultado, em todo o período temephos foi utilizado simultaneamente a outro larvicida, seja *Bti* ou IGR (Tabela 32), o que pode ter contribuído para uma menor pressão de seleção com o OP no estado.

Em oposição, em GO, as RR₉₅ para temephos em geral foram mais elevadas: das 15 avaliações disponíveis, 10 estavam acima de RR₉₅ 10,0 (Tabela 33). Neste estado o único larvicida

utilizado até 2008 foi temephos (Tabela 32). Inusitadamente, São Miguel do Araguaia apresentou o maior nível de resistência da Região Centro-Oeste, em 2012, segundo ano de incidências baixas de dengue no município. Goiânia e Aparecida de Goiânia são exemplos claros de como diferenças no manejo do controle químico podem ter impacto na resistência. Ambos os municípios, contíguos, tiveram incidências elevadas de dengue durante todo o período avaliado, como mencionado. No entanto, os níveis de resistência a temephos observados para Goiânia foram bastante inferiores aos de Aparecida de Goiânia, o que sugere pressões de seleção distintas nas duas localidades.

3.1.2.5.3 Resistência a deltametrina

Piretroides foram os adulticidas amplamente distribuídos na Região Centro-Oeste, entre 2003 e 2014 (Tabela 34). Malathion começou a ser introduzido nos estados a partir de 2009, em adição a deltametrina.

Nenhuma das 20 localidades avaliadas para a resistência a deltametrina com ensaios qualitativos, metodologia WHO, foi classificada como suscetível; 18 foram consideradas resistentes de fato. Onze destas 20 localidades também foram avaliadas com a metodologia CDC que, como mencionado anteriormente, tende a resultar em taxas de mortalidade mais elevadas (Tabela 35), devido à própria natureza do ensaio. Em consonância, no ensaio CDC, das 11 localidades, apenas cinco foram consideradas resistentes de fato; duas foram classificadas como suscetíveis. Apesar das diferenças nos resultados absolutos, houve alguma correlação entre as duas metodologias, embora muito mais fraca do que aquela encontrada na Região Norte (comparar Figuras 12 e 5).

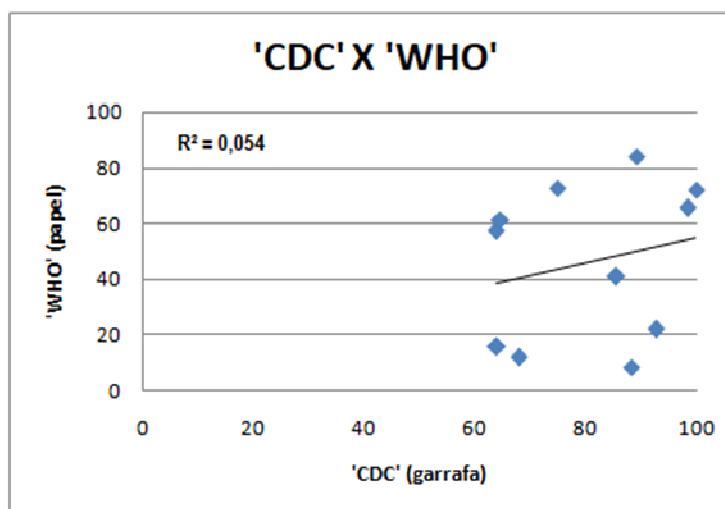


Figura 12 - Comparação entre as metodologias qualitativas 'CDC' (garrafas) e 'WHO' (papéis) usadas para avaliar a resistência de *A. aegypti* a deltametrina, com dados da Região Centro-Oeste.

Ensaio quantitativos de avaliação da resistência de adultos a deltametrina na Região Centro-Oeste só estão disponíveis para municípios de GO, e apenas a partir de 2009; a maioria dos dados é de 2011 (Tabela 36). Em nenhum município tais ensaios dose-resposta foram feitos em anos

para os quais há dados qualitativos (Tabelas 35 e 36). Todas as RR_{95} encontradas foram muito altas, em torno de 50. Em nenhum caso a RR_{95} foi inferior a 20. Em praticamente todas as situações estes níveis de resistência a deltametrina foram obtidos um, ou no máximo dois, anos depois de períodos com elevadas taxas de incidência de dengue (comparar Tabelas 31 e 36).

Em particular, no município de Luziânia/GO, avaliado apenas uma vez, em 2011, os níveis de resistência foram tão altos que não houve material para estimar a RR_{95} . Nesta localidade a RR_{80} foi quase 170. Chamou a atenção que na avaliação qualitativa, feita três anos antes (2008), este município chegou a ser classificado como 'suscetível' de acordo com a metodologia 'CDC'. Em adição, Luziânia parece ter sido um dos municípios menos afetados por epidemias de dengue no período, na Região Centro-Oeste (Tabela 31). Apesar disto, a avaliação quantitativa foi feita com coleta de material no ano de maior taxa de incidência de dengue no município, o que pode apontar para um efeito de sazonalidade no perfil de resistência encontrado. De fato, as coletas foram realizadas precisamente no final do período epidêmico, e os altos níveis de resistência a deltametrina encontrados podem ser reflexo de uma intensificação do uso de adulticidas, incluindo seu uso doméstico (Figura 13). Embora tenha sido identificada uma significativa participação de mutações *kdr*, que contribuem com a resistência a PY, infelizmente não há dados bioquímicos para este 'município/ano', o que dificulta uma avaliação mais global dos principais mecanismos envolvidos.

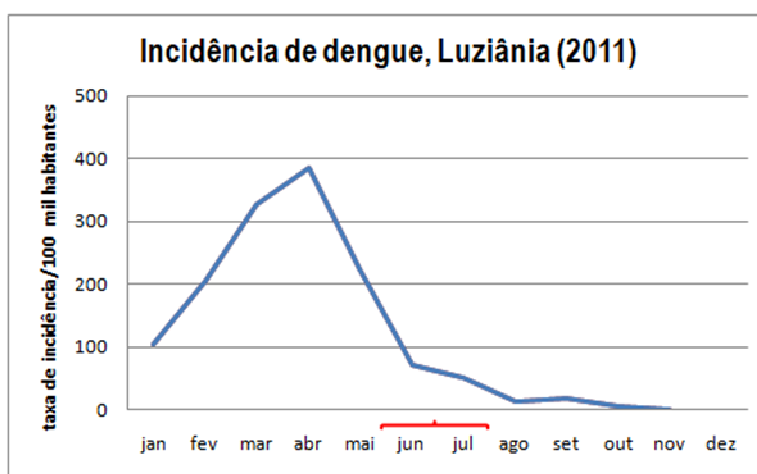


Figura 13 - Incidência de dengue/100 mil habitantes no município de Luziânia/GO (2011). Em vermelho: o período da coleta de *A. aegypti* em campo. Bioensaios com este material resultaram em RR_{80} de 167 para deltametrina.

3.1.2.5.4 Mecanismos de resistência

Frente aos mecanismos de resistência, duas classes enzimáticas mostraram-se bastante alteradas para ambos os estágios do vetor, GST e EST (Tabela 37). Em alguns casos, principalmente nos ensaios com adultos, também evidenciamos elevada alteração da MFO. Apenas duas populações apresentaram alterações de ACE, alvo de OP, de acordo com o critério adotado. No entanto, a atividade de ACE de todas as populações da Região Centro-Oeste foi classificada como suscetível

segundo o critério WHO (1998b). Para três municípios, Aparecida de Goiânia, Goiânia e Rio Verde, dispomos de mais de um momento de avaliação para ambos os estágios. Em todos, de maneira geral houve incremento na atividade da resistência metabólica (GAB-AChE) no decorrer do tempo, tanto para larvas quanto para adultos. Além disso, para os 10 pares disponíveis de avaliações simultâneas de larvas e adultos da Região Centro-Oeste, a resistência metabólica foi maior em adultos em nove deles, mesmo que apenas ligeiramente na maior parte dos casos.

Também aqui tentamos procurar associação entre níveis de resistência a deltametrina e mecanismos de resistência específicos. Comparamos as RR_{50} e RR_{95} para deltametrina com a resistência metabólica ('GAB-AChE', Figura 14a, b). Foi encontrada apenas uma correlação fraca e direta entre RR_{50} e a atividade das enzimas detoxificantes, ou seja, maiores níveis de resistência pareceram se correlacionar com maior atividade metabólica. Este resultado foi contrário ao obtido no resto do país; no entanto, esta relação não se manteve na comparação com a RR_{95} . Os resultados obtidos quando comparamos níveis de resistência com a alteração no sítio-alvo de PY foram conflitantes: ao contrário do esperado, houve relação diretamente proporcional entre RR_{50} e a frequência do alelo suscetível, ou seja, maior resistência a deltametrina pareceu se correlacionar com maior taxa de indivíduos com o alelo Na_V suscetível (Na_VS). No entanto, esta relação se inverteu na comparação entre a RR_{95} para deltametrina e a frequência do alelo Na_VS (Figura 14d), quando encontramos uma relação mais baixa, porém inversamente proporcional, ou seja, maiores níveis de resistência estariam associados a menores frequências do alelo suscetível. Em consonância com estes resultados discrepantes, a Região Centro-Oeste apresentou uma fraca correlação entre resistência metabólica e resistência por alteração do alvo de PY (Figura 14e).

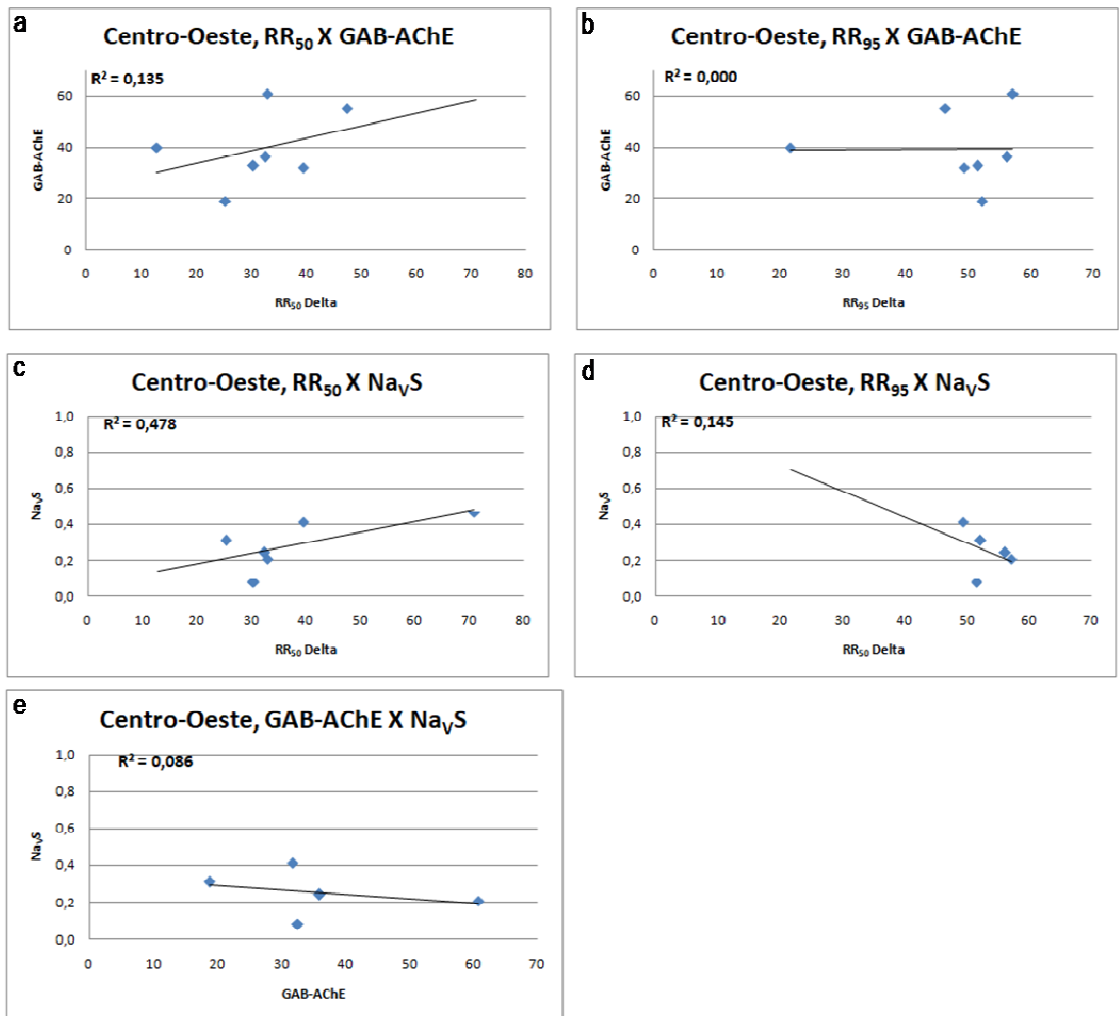


Figura 14 - Comparação entre as RR para deltametrina e os mecanismos de resistência: **a**, **b** - entre as RR₅₀ e RR₉₅ para deltametrina e a 'avaliação bioquímica global', excluindo-se a AChE (GAB-AChE); **c**, **d** - entre as RR₅₀ e RR₉₅ para deltametrina e a frequência do alelo S, suscetível, do Na_v e **e** - entre a atividade das enzimas detoxificantes ('GAB-AChE') e a frequência do alelo S do Na_v.

3.1.3 Discussão

No presente trabalho, no total foram avaliados, ou monitorados, 146 municípios, entre 2001 e 2012, distribuídos pelas cinco regiões do país. Os dados obtidos foram comparados com alguns indicadores, como o fornecimento de inseticidas pelo Ministério da Saúde e o histórico da incidência de dengue no período. Nesta seção procuramos consolidar toda a informação previamente detalhada para cada região. Foi feito esforço de identificar padrões e tendências nacionais em relação a cada um dos principais tópicos abordados: a incidência de dengue no período estudado; o fornecimento, pelo Ministério da Saúde aos estados, dos principais inseticidas usados no controle do vetor; os perfis de resistência a temephos e a deltametrina, e os principais e potenciais mecanismos de resistência envolvidos. Quando pertinente, procurou-se fazer correlações com outros dados da literatura relativos ao assunto, obtidos de outros países.

3.1.3.1 Incidência de dengue

As análises das taxas de incidência de dengue se restringiram aos municípios monitorados para a resistência a inseticidas em cada região, quantitativo que variou de um total entre 13 (Região Sul) e 52 (Região Nordeste). Apesar disso, levando-se em conta que o monitoramento da resistência sempre procurou trabalhar com 'municípios-sentinela', representativos de suas áreas de abrangência em relação à dengue, foi possível traçar um panorama aproximado do histórico desta arbovirose nas diferentes regiões. Com exceção da Região Sul, acometida por epidemias de dengue mais tardiamente que o resto do país, todas as outras regiões registraram incidência de dengue maior do que o ponto de corte definido pelo Ministério da Saúde (300 casos/100.000 habitantes) em mais que 30% dos casos (Tabela 38). Ainda com exceção da Região Sul, taxas extremamente elevadas, de 1% de incidência de dengue (1.000 casos/100.000 habitantes) sempre foram observadas em mais que 10% dos casos. Neste aspecto, a Região Centro Oeste merece destaque: quase 20% dos registros estiveram acima desta taxa, 1.000 casos/100.000 habitantes, no período (Tabela 38).

Tabela 38: Variações das taxas de incidência de dengue no Brasil, por Região, entre 2001 e 2012. São apresentados os percentuais de municípios/ano de cada região com taxas de incidência de dengue acima de 300 casos por 100.000 habitantes, ponto de corte definido pelo Ministério da Saúde para incidência alta, e acima de 1.000 casos por 100.000 habitantes (1%). Análise restrita aos municípios avaliados ou monitorados para a resistência a inseticidas aqui apresentados.

região	n municípios	n casos/100.000 habitantes	
		% > 300	% > 1000
N	20	34	11
NE	52	34	12
SE	44	32	14
S	13	14	8
CO	17	38	19

Estes resultados gerais são confirmados quando os dados são avaliados por ano (Tabelas 39 e 40). De maneira geral as elevadas taxas de incidência de dengue registradas em 2001-2002 e depois, a partir de 2008 (Brasil 2017), são percebidas aqui. Nota-se que as epidemias não acontecem simultaneamente em todas as regiões do país. Em particular vale, de um lado, confirmar a inclusão tardia da Região Sul na área de importância epidemiológica para dengue e, de outro lado, registrar a magnitude das epidemias na Região Centro-Oeste, tanto em termos quantitativos quanto de persistência, notadamente entre 2006 e 2010.

As mudanças climáticas, como o aumento das temperaturas e os padrões de precipitação, favorecem uma maior expansão geográfica do vetor, oferecendo condições mais adequadas para reprodução e crescimento do *Aedes*, e conseqüentemente da dengue (Ebi & Nealon 2016). Como tais mudanças climáticas não ocorrem em todas as regiões ao mesmo tempo, a forma como afetam a biologia do vetor é diferente, o que pode ser traduzido em uma transmissão da dengue não simultânea no país.

Tabela 39: Variação anual das taxas de incidência de dengue nas diferentes Regiões do Brasil, entre 2001 e 2012. Em todos os casos são apresentados os percentuais de municípios com taxas de incidência de dengue acima de 300 casos por 100.000 habitantes, ponto de corte definido pelo Ministério da Saúde para incidência alta. Em vermelho estão assinalados os anos/regiões em que este índice foi 50% ou maior. Análise restrita aos municípios avaliados ou monitorados para a resistência a inseticidas aqui apresentados.

região	n munic	% municípios com incidência de dengue acima de 300 casos por 100.000 habitantes											
		2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
N	20	50	20	30	20	25	10	30	50	30	50	60	30
NE	52	44	60	52	2	21	8	40	35	17	40	38	56
SE	44	43	48	16	7	9	23	34	34	18	50	61	41
S	13	0	8	23	0	0	0	46	0	0	54	38	0
CO	17	29	35	18	0	29	59	53	24	59	94	18	41

Tabela 40: Variação anual das taxas de incidência de dengue nas diferentes Regiões do Brasil, entre 2001 e 2012. Em todos os casos são apresentados os percentuais de municípios com taxas de incidência de dengue acima de 1.000 casos por 100.000 habitantes (1%). Em amarelo e vermelho estão assinalados os anos/regiões em que este índice foi igual ou superior a, respectivamente, 20 ou 50%. Análise restrita aos municípios avaliados ou monitorados para a resistência a inseticidas aqui apresentados.

região	n munic	% municípios com incidência de dengue acima de 1.000 casos por 100.000 habitantes (1%)											
		2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
N	20	20	0	5	5	5	0	10	15	10	30	20	10
NE	52	13	19	15	0	6	2	8	15	15	17	12	25
SE	44	18	25	9	2	0	11	14	20	7	25	23	11
S	13	0	0	5	0	0	0	20	0	0	20	20	0
CO	17	6	18	0	0	6	29	29	12	47	53	12	18

3.1.3.2 Fornecimento de inseticidas pelo Ministério da Saúde

Foram utilizados dados anuais de fornecimento de inseticidas pelo Ministério da Saúde aos estados para controle de diferentes epidemias/endemias transmitidas por vetores artrópodes entre 2003 e 2014. Embora os documentos fornecidos não especificassem os vetores aos quais se destinavam, procuramos restringir a apresentação dos dados àqueles produtos sabidamente utilizados no controle de *A. aegypti*. Embora isto tenha sido possível com os larvicidas, no caso dos PY, usados contra mosquitos adultos, optamos por apresentar todos os produtos desta classe fornecidos pelo Ministério da Saúde. Isto foi feito porque há sobreposição, ainda que parcial, da distribuição da ocorrência de vetores de diferentes patógenos e de *A. aegypti*, cujas populações poderiam então ser submetidas às mesmas pressões de seleção. Além disso, diferentes inseticidas PY têm um modo de ação comum, e é racional supor que possam induzir os mesmos mecanismos de resistência nas populações do vetor.

Confirmamos que o OP temephos foi o larvicida mais utilizado no período de 2003 a 2014, tendo sido fornecido de forma praticamente contínua em quase em todas as regiões do país. Esta informação é compatível com o fato de que, durante muito tempo, temephos foi o único larvicida aprovado pela WHO para uso em recipientes de água potável. No entanto, com exceção da Região Sul, desde pelo menos 2003 (o início do período disponível para verificação dos inseticidas fornecidos pelo Ministério da Saúde), *Bti* também foi usado em todo o território nacional, em geral em adição ao OP. Este produto acabou sendo substituído por IGRs, o que se consolidou para praticamente todo o país a partir de 2009-2010. Novamente a exceção foi a Região Sul, onde só em 2014 os IGR passaram a ser adotados de forma generalizada. Vale ressaltar que desde 2012 (Brasil 2012) foi feita a opção pelo rodízio de larvicidas no país, como forma de preservar os poucos produtos disponíveis. Este rodízio foi iniciado com inibidores da síntese de quitina, principalmente diflubenzuron e novaluron. Hoje os análogos de hormônio juvenil, como o pyriproxyfen, também estão incluídos no rol de larvicidas disponíveis contra *A. aegypti* no Brasil. Em 2013, o temephos deixou de ser o larvicida de primeira escolha para controle de *A. aegypti*; a partir de 2014 não foi mais utilizado, sendo então substituído pelos IGR para controle larvário (Brasil 2014).

Com relação ao uso de adulticidas, de acordo com a WHO, não há muitas opções: dos cinco produtos recomendados, quatro pertencem ao grupo dos PY (WHOPES 2016). Neste contexto, deltametrina foi empregada em praticamente todo o país no período disponível para avaliação (2003-2014). Apenas no estado de São Paulo, PY deixaram de ser usados no controle de adultos de *A. aegypti* desde 2000, em função de confirmação de resistência (Macoris et al. 2014; Macoris, Martis et al. 2018). No entanto, SP continuou recebendo PY do Ministério da Saúde, para o controle de vetores de outros patógenos. Na prática, a presença de inseticidas PY foi sempre registrada em praticamente

todo o país, para controle de diferentes vetores. A partir de 2006-2008 o OP malathion começou a ser distribuído, pontualmente, para alguns estados, principalmente do NE (CE/2006) e SE (RJ/2007; MG/2008). Este é o único adulticida não PY recomendado pela WHO para controle de mosquitos (WHOPES 2016). Em consonância com a disseminação de altos níveis de resistência a PY em todo o país, em substituição, malathion começou a ser introduzido gradualmente para o controle de adultos (Brasil 2009; IOC/Fiocruz 2011). A utilização deste OP consolidou-se no país por volta de 2009-2011, com exceção da Região Sudeste onde, de maneira geral, seu uso iniciou-se antes.

3.1.3.3 Resistência ao larvicida temephos

Em relação à avaliação de resistência a temephos, como mencionado na Introdução, desde 2006 o Brasil mudou o critério de classificação das populações de *A. aegypti*. Passou-se a considerar que RR_{95} de 3 (e não mais 10) é indicativa de resistência. Esta mudança se baseou em critérios funcionais e operacionais. A validação funcional foi obtida quando se confirmou, em ensaios simulados de campo, a redução da efetividade do larvicida em populações com RR_{95} acima de 3. Os critérios operacionais têm relação com a logística do procedimento de implementação da substituição de inseticidas no país, que depende de articulação entre os três níveis de gestão - federal, estadual e municipal - e que, na prática, pode demorar até dois anos para se efetivar.

Resistência a temephos hoje está disseminada no Brasil, a tal ponto que este deixou de ser indicado como o larvicida de primeira escolha contra *A. aegypti*, sendo substituído por outros produtos, não neurotóxicos. No entanto, níveis variados de resistência a temephos foram observados no país. Em alguns casos foi possível correlacionar a resistência com a incidência de dengue; em outros, houve relação entre níveis de resistência e o fornecimento de temephos, ou a interrupção de fornecimento. Apesar destes exemplos, em muitas situações estes indicadores não foram suficientes para explicar a variedade das situações observadas. A Região Sul foi a que apresentou as menores RR_{95} , de maneira geral, durante todo o período avaliado. Este resultado é compatível com a inclusão tardia da região no 'mapa da dengue'. Níveis consistentemente baixos de resistência a temephos também foram encontrados no estado de SP mas, neste caso, em função de um intenso trabalho coordenado de monitoramento e manejo da resistência. A Região Nordeste apresentou a maior variedade de perfis de resistência a temephos mas também os registros mais elevados: em 20% dos casos as RR_{95} estiveram acima de 100 e, em 6%, foram inclusive maiores que 200 (cinco municípios, dos quais três de PE e dois da BA). De acordo com Moyes et al. (2017), o Brasil é o país com maiores níveis de resistência a temephos. Na Martinica, o segundo país nesta escala, o maior registro é de RR_{50} equivalente a 35, no ano de 2009, em Gros Morne (Marcombe et al. 2013). De maneira geral, os resultados revelaram a influência de condutas locais sobre os níveis de resistência a temephos e a

fragilidade de orientações gerais que possam contribuir para o uso racional do controle químico e, em última análise, sua preservação como alternativa complementar de controle vetorial.

3.1.3.4 Resistência a deltametrina

No Brasil foram necessárias algumas décadas até que a disseminação da resistência ao temephos pudesse comprometer o uso no controle do vetor. Porém, no caso dos PY, introduzidos em todo o país em 2000 pelo PNCD, apenas alguns anos foram suficientes para que níveis altos de resistência fossem alcançados pelas populações brasileiras de *A. aegypti* (da-Cunha et al. 2005; Montella et al. 2007; Maciel-de-Freitas et al. 2014; Bellinato et al. 2016; Viana-Medeiros et al. 2017; Garcia et al. 2018).

Dois são os principais métodos de avaliação da resistência de adultos a inseticidas: a 'metodologia CDC' utiliza garrafas impregnadas internamente com o inseticida e a 'metodologia WHO' usa papéis impregnados, colocados no interior de tubos cilíndricos (Brogdon & McAllister 1998; WHO 1998a). A metodologia CDC tende a resultar em maiores níveis de mortalidade, em função na própria natureza do ensaio, como comentado nos Resultados (Região Norte). Comparada com os bioensaios com larvas, a avaliação da resistência de adultos é mais laboriosa. Depende de insumos nem sempre fáceis de se obter, como as garrafas, e principalmente os tubos cilíndricos e papéis impregnados. Além disso, a necessidade de utilização de fêmeas adultas torna os testes mais demorados e dependentes de maior quantidade de espécimes. Provavelmente em função disto, em geral os ensaios disponíveis são qualitativos: a partir dos resultados da exposição a uma só dose do inseticida, as amostras são classificadas como resistentes, suscetíveis, ou com resistência incipiente.

No Brasil, foram usadas ambas as metodologias durante o monitoramento da resistência do vetor de dengue a deltametrina. Na grande maioria das vezes as populações foram classificadas como resistentes. Em particular, em nenhum caso a metodologia WHO identificou populações suscetíveis, enquanto este *status* foi registrado para menos de 8% das populações avaliadas com a metodologia CDC. Tentativas de comparação das duas abordagens resultou em forte correlação positiva, mas somente na Região Norte (8 pares avaliados). Nas outras regiões, apenas correlações fracas foram observadas, positivas, como para as Regiões Nordeste (n = 13) e Centro-Oeste (n = 11), ou negativas, como foi o caso das Regiões Sudeste (n = 46) e Sul (n = 4). Quando todos os bioensaios foram avaliados em conjunto (n = 82), obteve-se uma fraca correlação positiva que, no entanto, não revelou associações conclusivas.

No âmbito da Rede MoReNAa, desenvolvemos metodologia para avaliação quantitativa da resistência de adultos, com base em papéis impregnados e nos tubos cilíndricos utilizados na metodologia WHO (1998a). De nosso conhecimento esta foi a primeira avaliação quantitativa de adultos realizada na rotina de monitoramento da resistência. Em função disto, foi necessário

estabelecer uma série de condições e parâmetros, como a metodologia de impregnação dos papéis e o tamanho do ensaio (quantidade de concentrações por ensaio, de réplicas por concentração e de espécimes por réplica). Além disso, foi necessário definir critérios de avaliação; para tanto, como primeira abordagem, utilizamos o mesmo ponto de corte estabelecido em 2006 para a classificação da resistência das populações de *A. aegypti* a temephos, ou seja, RR_{95} maior que 3,0 foi considerada como indicativa de resistência (Brasil 2006).

Neste trabalho estão relatados ensaios quantitativos para 41 municípios/ano. Embora sua realização tenha se iniciado em 2008-2009, a maior parte dos testes (30) foi feita em 2011-2012. De maneira geral os bioensaios quantitativos com deltametrina confirmaram a disseminada resistência a PY nas populações de *A. aegypti* no país. Com exceção da Região Sul, valores muito altos de RR_{95} , da ordem de 50-70, foram detectados em todas as regiões. No entanto, tais valores elevados foram mais frequentes na Região Centro-Oeste. Por outro lado, a Região Nordeste tendeu a abrigar os menores níveis de resistência ao PY. Há relatos na literatura de que a resistência de *A. aegypti* a PY é mais influenciada pela sazonalidade do vetor e, principalmente, pela sazonalidade das epidemias de dengue, do que os larvicidas. Isto ocorre porque PY estão disponíveis no mercado varejista e, em geral a cada surto de dengue há corrida da população aos mercados, uma clara manifestação da confusão conceitual entre 'controle do vetor' e 'controle químico do vetor adulto'. Este é, inclusive, um dos argumentos usados para justificar a rápida disseminação de resistência a esta classe de produtos em todo o mundo (Garcia et al. 2009; Marcombe et al. 2009; Linss et al. 2014; Li et al. 2015; Bellinato et al. 2016; Garcia et al. 2018; Macoris, Martins et al. 2018).

No Brasil, Maciel-de-Freitas et al. (2014) constataram, durante um surto de dengue em Boa Vista, quando DENV-4 foi detectado, aumento muito significativo da resistência a PY em diferentes áreas da cidade; uma das áreas, inclusive, nem havia recebido aplicações de UBV com deltametrina do serviço de controle de vetores do município. Exemplos mais recentes são os registros de persistência de resistência a PY de populações de *A. aegypti* de várias localidades de SP, mesmo 10 anos depois da interrupção do uso desta classe de inseticidas no controle do vetor da dengue em todo o estado (Macoris, Martins et al. 2018). Em várias situações aqui analisadas as RR_{95} muito altas para deltametrina haviam sido precedidas por epidemias, o que corrobora o uso doméstico intenso e indiscriminado durante surtos. O cenário encontrado na Região Centro-Oeste é bastante ilustrativo. Em praticamente todos os municípios avaliados em 2011/2012 as RR_{95} foram da ordem de, pelo menos, 50. Desde 2006 esta região apresentava surtos de dengue, que culminaram justamente em 2010. Neste ano, a média das taxas de incidência de dengue dos municípios avaliados neste trabalho foi de aproximadamente 1.700 casos por 100.000 habitantes, o que corresponde a quase seis vezes o limiar definido como alto pelo Ministério da Saúde. Em particular, ressalta-se o caso de Luziânia, no estado de GO, em 2011, com a maior taxa de incidência de dengue de sua história (mais de 1.400

casos/100.000 habitantes) e registros extremamente altos de resistência a deltametrina ($RR_{80} = 167$); neste município/ano verificamos que a coleta de material de campo para os bioensaios foi realizada no final do período epidêmico (Figura 13), o que corrobora a influência do uso doméstico de aduicias sobre o *status* de resistência a PY.

3.1.3.5 *Mecanismos de resistência*

A resistência metabólica é causada pela atividade elevada via superexpressão ou mudança conformacional de enzimas que estão envolvidas nos processos de metabolismo, sequestro e excreção de inseticidas. Foram avaliadas, com metodologias de rotina do monitoramento, as atividades das três principais classes de enzimas relacionadas com a resistência metabólica: as enzimas de Fase I, MFO e EST e as enzimas de Fase II, GST. Amostras de larvas e de fêmeas adultas foram avaliadas. Na grande maioria das vezes observou-se maior atividade nos adultos. As principais classes enzimáticas alteradas, em todas as regiões do país, foram GST e EST. As EST foram avaliadas com três diferentes substratos e, em algumas situações, houve variação, entre larvas e adultos, do substrato preferencialmente utilizado. Alterações de GST e EST em populações brasileiras de *A. aegypti* já foram associadas à resistência a PY e a OP (Montella et al. 2007; Bellinato et al. 2016; Garcia et al. 2018).

Enzimas da classe das MFO, são apontadas, em muitas populações de mosquitos vetores em todo o mundo, como o principal componente da resistência metabólica (Marcombe et al. 2009; Varón et al. 2010; Dusfour et al. 2011; David et al. 2013; Saavedra-Rodriguez et al. 2015; Ishak et al. 2017). Apesar disto, nas populações brasileiras de *A. aegypti* avaliadas esta foi a classe menos afetada. Apenas aproximadamente 30% das amostras de adultos e menos que 20% das amostras de larvas exibiram alterações de MFO. No entanto, avalia-se que MFO esteja envolvida na detoxificação de uma ampla gama de compostos (Feyereisen 2012) e que o aumento da sua expressão esteja frequentemente associado à resistência a PY (David et al. 2013).

Também foi avaliada a atividade da enzima ACE, alvo de OP. Neste caso, de acordo com o protocolo classicamente recomendado pela WHO (1998b), que quantifica a inibição da atividade por propoxur ('AChI'), em todos os casos a ACE foi considerada 'suscetível' a OP. Em adição, medimos a atividade total de ACE ('AChE'), quando detectamos alterações em aproximadamente 15% das amostras. No entanto, os ensaios bioquímicos de rotina empregados não permitem discriminar entre a expressão aumentada de ACE, amplificação gênica ou modificação estrutural, todos estes, mecanismos com potencial de resultar em maior eficiência da enzima.

Em relação à resistência a PY, alguns grupos sustentam que alterações metabólicas tendem a resultar em níveis de resistência mais baixos do que aquelas mediadas por alterações no alvo, o Na_v (Martins & Valle 2012; Saavedra-Rodriguez et al. 2012; Brito et al. 2013). Para testar esta possibilidade comparamos, sempre que disponíveis, os níveis de resistência a PY com a intensidade

das alterações enzimáticas quantificadas. Para isto utilizamos, de um lado, tanto a RR_{50} quanto a RR_{95} e, de outro lado, a média dos valores obtidos para as avaliações enzimáticas ('GAB' e 'GAB-AChE'). É fato que estes são dados/valores secundários, como detalhado na metodologia e devem, portanto, ser considerados com cautela. 'GAB' corresponde à média de todas as atividades enzimáticas analisadas, enquanto 'GAB-AChE' é um indicador restrito às enzimas relacionadas à resistência metabólica. As RR também foram comparadas com o outro mecanismo de resistência a PY para o qual tínhamos registros, a saber, alterações do Nav . Neste caso, as RR foram confrontadas com a frequência do alelo suscetível, $NavS$. Apenas a Região Sul não foi incluída, em função da escassez de amostras. Com exceção da Região Centro-Oeste, em todos os casos foi possível relacionar maiores níveis de resistência a PY simultaneamente com menores alterações metabólicas e com maiores frequências dos alelos resistentes ('*kdr*') do Nav . Esta relação foi mais significativa para a Região Norte. Nas outras regiões, estas correlações foram mais fracas e nem sempre se confirmaram para todos os indicadores testados. Outra comparação foi tentada, desta vez diretamente entre a resistência metabólica ('GAB-AChE') e a alteração do Nav ; também neste caso confirmamos, para a maior parte das amostras, tendência à opção por um ou outro mecanismo de resistência. Ou seja, adicionamos evidências de que, quanto maior o nível de resistência a deltametrina, de fato, menor parece ser a participação da resistência metabólica. Este resultado corrobora dados da literatura que demonstraram que mosquitos com mutações *kdr* do Nav apresentaram menor participação da via de detoxificação metabólica (Saavedra-Rodriguez et al. 2012).

O histórico do *status* da resistência a temephos e deltametrina em populações brasileiras de *A. aegypti* revelou a disseminação da resistência aos principais inseticidas utilizados pelo PNCD. Foram encontradas elevadas razões de resistência em larvas, provenientes do uso de temephos por mais de 40 anos. Em relação ao controle de adultos, identificou-se resistência logo após a introdução de PY no país, e altos níveis de resistência, alcançados rapidamente, foram ainda correlacionados à exarcebação do uso doméstico nos períodos de epidemia. No entanto, altas taxas de incidência de dengue continuam recorrentes no Brasil que, na prática, é hiperendêmico para esta arbovirose. Este conjunto de dados destaca as limitações do controle químico como metodologia de escolha para redução da densidade do vetor. Neste sentido, a adoção da prática de rodízio de inseticidas já tem sido adotada no Brasil, como estratégia para preservá-los como ferramenta de controle vetorial. Contudo, há complexidades logísticas na adoção de um processo de rotação, como escolha da nova classe de inseticida, aquisição, capacitação de pessoal e distribuição aos municípios que devem ser avaliadas antes da mudança dos compostos, bem como, um estudo do impacto dessas ações no controle do vetor deve ser realizado. O caráter multifatorial da resistência foi mostrado. Frente ao cenário da resistência a inseticidas de populações de *A. aegypti* no Brasil, deve-se levar em consideração, ao projetar intervenções para reduzir a transmissão da dengue, abordagens alternativas, como o

engajamento comunitário e o controle mecânico. Vale destacar a importância de se respeitar o caráter complementar dos inseticidas, a serem reservados para tratamento de criadouros que não podem ser eliminados e para o trabalho com locais e situações específicos, como o bloqueio de surtos, ou a intervenção em pontos estratégicos.

3.2 CAPÍTULO 2 - Avaliação do status de susceptibilidade de 12 populações de *A. aegypti* aos inseticidas utilizados na rotina do controle no país, incluindo, além de temephos e deltametrina, o CSI diflubenzuron

Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Araujo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D 2016. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. *BioMed Research International* v. 2016, p. 1-12.

Research Article

Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations

Diogo Fernandes Bellinato,¹ Priscila Fernandes Viana-Medeiros,¹ Simone Costa Araújo,^{2,3,4} Ademir J. Martins,^{2,3,5} José Bento Pereira Lima,^{2,3} and Denise Valle^{1,5}

¹Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Gerência de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Denise Valle; dvalle@ioc.fiocruz.br

Received 6 March 2016; Revised 27 April 2016; Accepted 9 May 2016

Academic Editor: Patricia Salgueiro

Copyright © 2016 Diogo Fernandes Bellinato et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Insecticides are still largely applied in public health to control disease vectors. In Brazil, organophosphates (OP) and pyrethroids (PY) are used against *Aedes aegypti* for years. Since 2009 Insect Growth Regulators (IGR) are also employed in the control of larvae. We quantified resistance to temephos (OP), deltamethrin (PY), and diflubenzuron (IGR) of *A. aegypti* samples from 12 municipalities distributed throughout the country, collected between 2010 and 2012. High levels of resistance to neurotoxic insecticides were detected in almost all populations: RR_{95} to temephos varied between 4.0 and 27.1; the lowest RR_{95} to deltamethrin was 13.1, and values higher than 70.0 were found. In contrast, all samples were susceptible to diflubenzuron ($RR_{95} < 2.3$). Biochemical tests performed with larvae and adults discarded the participation of acetylcholinesterase, the OP target, and confirmed involvement of the detoxifying enzymes esterases, mixed function oxidases, and glutathione-S-transferases. The results obtained were discussed taking into account the public chemical control component and the increase in the domestic use of insecticides during dengue epidemic seasons in the evaluated municipalities.

1. Introduction

Currently dengue is spreading worldwide, placing at risk around 40% of the global population [1]. To date, no specific drugs are available and dengue treatment is restricted to supportive care. Although several candidate vaccines, directed against the four dengue serotypes, are presently submitted to human clinical trials, or even licensed for commercialization, none of them attains high protection levels [2]. The major dengue vector is *Aedes aegypti* (Diptera: Linnaeus, 1762), a highly anthropophilic and synanthropic mosquito, distributed throughout tropical and subtropical areas of the world [3–5], mainly between latitudes 35°N and 35°S [6, 7]. In addition, the recent chikungunya and Zika virus dispersion throughout the globe is also primarily attributed to *A. aegypti* [8].

Actions against dengue are mostly focused on the reduction of mosquito densities, and vector control can be accomplished through mechanical, biological, and chemical approaches. Mechanical control is based on the elimination or on the adequate protection of potential breeding sites; biological control makes use of larvae predators, such as small fishes, or formulations with entomopathogenic bacteria, like *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (*Bti*); chemical control consists in the use of insecticides against larvae or adults of the vector mosquito [6, 7, 9].

Insecticides, still largely utilized by a number of vector control programs, belong to four main classes; all of them are neurotoxic compounds: carbamates (CA), organochlorates (OC), organophosphates (OP), and pyrethroids (PY) [10]. Nowadays, PY and OP are the most used. Recently two

additional classes became available, the spinosyns, modulators of acetylcholine receptors [11], and the Insect Growth Regulators (IGR), a group that includes the chitin synthesis inhibitors (CSI) [12]. It should be noted that the Brazilian Dengue Control Program (PNCD) only employs insecticides that are recommended by the World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) for use in potable water or properly approved for space spraying applications [13, 14].

The intensive and prolonged use of insecticides can select resistant specimens in the natural vector populations, decreasing the frequency of susceptible individuals and reducing variability of field populations [5]. Insecticide resistance can derive from different mechanisms, the main ones being modifications in the target sites and higher ability to detoxify xenobiotic compounds; the former mechanism is known as target site resistance and the other as metabolic resistance [5, 6].

The voltage gated sodium channel (Na_v) is the target site of pyrethroids; these insecticides keep Na_v in its opened conformation, resulting in repetitive pulses. Na_v substitutions that affect its susceptibility to PY are known as knockdown resistant ones (kdr) [15]. Such mutations have been reported in *A. aegypti* populations from several countries worldwide [16–18]. In Brazil two major kdr Na_v alleles related to PY resistance are spreading and increasing in frequency. A clear regional distribution pattern is observed with Na_v^{R1} (mutant at position 1534 of the channel protein) present throughout the country while Na_v^{R2} (mutant at both 1534 and 1016 positions) is more frequent in central and southeastern municipalities [19, 20].

The target site of OP insecticides is acetylcholinesterase (AChE), an enzyme that hydrolyzes acetylcholine molecules; as a consequence, this neurotransmitter persists in the synaptic cleft, resulting in the exacerbation of nerve impulse transmission [21, 22]. To our knowledge there are no confirmed evidences of AChE alterations related to OP resistance in field *A. aegypti* populations.

The main detoxifying enzyme classes participating in the xenobiotic metabolizing processes are the Phase I mixed function oxidases (MFO) and esterases (EST) that trigger chemical modifications in the substrates and the Phase II conjugating enzymes, glutathione-S-transferases (GST) [21]. Each of these enzyme families is composed of several molecular entities, bearing distinct levels of specificity [5]. In general, evaluations of *A. aegypti* detoxifying mechanisms worldwide associate ESTs and OP resistance as well as GST and MFO alterations with PY resistance [23–26]. However such relations are not always straightforward due to the variability of enzymes participating in the insecticides detoxification and to the resistance multifactorial character [5, 10].

In Brazil, during more than three decades, only temephos was employed in the control of *A. aegypti* larvae. Resistance to this OP was originally detected at the end of the years 1990, and registers of the dissemination of this phenomenon persist up to the present [23, 24, 27–30]. Since 2009 temephos is being substituted by IGR in the country and a strategy of larvicide rotation, each 3–4 years, is attempted. Development

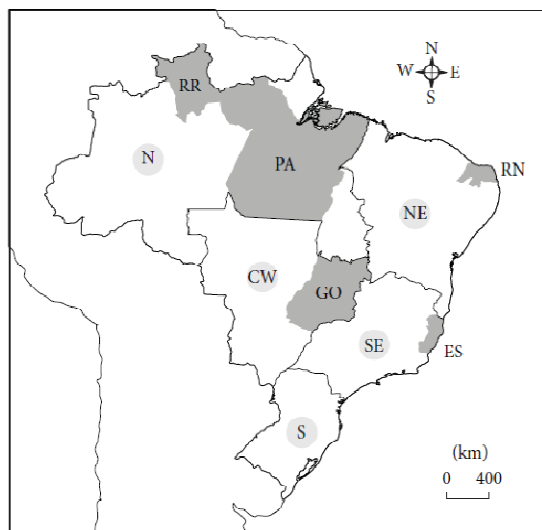


FIGURE 1: Brazilian map with the states used in the study in grey. RR: Roraima; PA: Pará; RN: Rio Grande do Norte; ES: Espírito Santo; and GO: Goiás. The continuous lines indicate the different regions of the country. N: north; NE: northeast; SE: southeast; S: south; and CW: central west.

of resistance was also verified for PY shortly after its use has been implemented for the control of adults, since 2000 [23, 31, 32].

The insecticide susceptibility profiles of several Brazilian field *A. aegypti* populations are presented (Figure 1). Resistance to compounds employed by the PNCD was investigated, in order to collaborate with the elucidation of both the resistance dynamics and the potential related mechanisms. Chemical insecticides are still a relevant control tool employed by public managers against dengue vectors. In addition, in general, dengue epidemic periods are related to a significant increase in the domestic use of insecticides, mainly adulticides. This collective behavior has the potential to contribute to a rapid increase in resistance levels, and it has already been detected in Brazil against pyrethroid compounds [33]. Taking these aspects into account, the results obtained were evaluated in the scope of several parameters, such as the Ministry of Health (MoH) supply of insecticides to the Brazilian States, the local historic of dengue outbreaks, and the frequency of kdr mutations, majorly responsible for PY resistance in the country.

2. Materials and Methods

2.1. Data on Insecticide Distribution and Dengue Cases. The Brazilian MoH coordinates the distribution of insecticides used in public health to all states and to all disease vector control programs. Insecticides are stored in a warehouse of Rio de Janeiro State Health Secretariat, in charge of stock control and supply of the products to the different States. We got MoH authorization to access these data, sorted by year,

since 2003. Figure 2 illustrates the insecticides employed by PNCD from 2003 until 2012, the latter corresponding to the year of collection of the last samples in the field.

Dengue incidence rates were based on the historical series of cases available at the MoH website for each municipality [34] and on the 2010 population census data conducted by the Brazilian Institute of Geography and Statistics [35].

2.2. Mosquitoes. Natural *A. aegypti* populations were collected between 2010 and 2012, in 12 municipalities belonging to a total of five States (Figures 1 and 2): Roraima (RR) and Pará (PA) at the north, Rio Grande do Norte (RN) at the northeast, Espírito Santo (ES), at the southeast, and Goiás (GO) at the central-west region. In all cases, sampling of vector eggs was performed with ovitraps according to MoReNAa (the Brazilian *A. aegypti* insecticide resistance monitoring network) guidelines, as described elsewhere [28, 36]. Depending on the number of buildings in each municipality, 150 to 300 ovitraps were installed during 5–7 days, representing the whole area.

Rockefeller mosquitoes (Rock), a reference strain of insecticide susceptibility [37], were employed as control in all bioassays and also in the biochemical and molecular analysis.

2.3. Mosquitoes Rearing. Eggs derived from field populations were allowed to hatch for two days in plastic cups containing 2.5 L of dechlorinated water and a small amount of cat food (Friskies®, Purina, São Paulo, SP). Pools of 1,000 larvae were then transferred to transparent plastic trays (33 × 24 × 8 cm) filled with 1.0 L of water and fed with 0.5 g of cat food every three days. The resulting pupae were transferred to cartoon cages (18 × 17 cm) and the *A. aegypti* emerging female and male adults were separated from other mosquito species, scored and reared in cages in order to proceed to blood feeding and egg laying. Adult females were fed on xylazine and ketamine-anaesthetized guinea pigs [38] for 30 minutes; oviposition cups were placed inside the cages three days later. Achievement of F1 and F2 generations in the laboratory was performed essentially as described elsewhere [28]. The whole procedure took place at 26 ± 1°C and 80 ± 10% relative humidity.

2.4. Larval Bioassays. In order to maximize synchronous development, egg hatching was induced during one hour in dechlorinated water. Afterwards, groups of 1,000 larvae were reared in plastic trays, as described above, until the third instar (L3).

Dose response bioassays with temephos (Pestanal®, Sigma-Aldrich) were performed with 10 different concentrations of the OP, designed to kill between 10 and 95% of each population. Four 100 mL replicas were employed per concentration and 201.3 larvae per replica. Mortality was registered after 24 hours of exposure [29, 39, 40].

For the CSI diflubenzuron (Sigma-Aldrich), each dose response bioassay employed eight insecticide concentrations, also designed to be effective between 10 and 95%. Four 150 mL replicas per concentration and 10 L3 larvae per replica were employed. Both the bioassay methodology and the evaluation criteria were adapted from previous work [41, 42]. In this case,

records were made each other day. Replicas were covered with a nylon mesh in order to avoid escaping of adults. The assay was considered terminated when all the specimens from the control group, nonexposed to the CSI, emerged as adults.

Two internal controls were placed at every bioassay: (a) Rockefeller larvae exposed to two different insecticide concentrations, the ED₉₉ (effective dose) and half of it, and (b) field specimens kept with the solvent, in the same amount used for the experimental samples.

2.5. Adult Bioassays. Female adults were submitted to dose response bioassays to quantify resistance to the pyrethroid deltamethrin (Sigma-Aldrich) following the World Health Organization [43] methodology of impregnated papers, with some modifications [40, 44]. Assays employed 10 deltamethrin concentrations, ideally killing between 10 and 95% of each mosquito population. In all cases three replicas with 15–20 non-blood-fed females, 1–5 day-old, were used. After exposure to the pyrethroid during one hour, mosquitoes were recovered for 24 hours in insecticide-free compartments, when mortality was recorded. Adult bioassay controls followed the same rational employed for larvae ones: Rockefeller specimens exposed to two different deltamethrin concentrations and field derived adults exposed to the solvent.

2.6. Biochemical Assays. The potential mechanisms involved with resistance were evaluated through biochemical assays that quantified the activity of several classes of enzymes according to WHO and CDC procedures [23, 45, 46]. Two Phase I enzyme classes were evaluated, MFO and EST. While MFO was indirectly measured, three substrates were employed for EST: α - and β -naphthyl and ρ -nitrophenyl acetates, accounting, respectively, for activities named α -EST, β -EST, and ρ NPA-EST. The Phase II GST and the OP target site AChE were also evaluated. For AChE, both total activity and activity inhibited by the carbamate propoxur were assayed. According to WHO criterion [47], AChE inhibition higher than 70% points to an activity compatible with insecticide susceptibility. Dosage of total proteins was done with the Bio-Rad protein assay/dye reagent concentrate (500-0006), and the results were used to calculate enzymatic specific activities.

Tests with each population employed approximately 90 individual non-blood-fed young females (up to 24 hours after adult emergence) and 90 late L3-early L4 larvae. All specimens were stored at –80°C until use.

Enzyme activities were classified essentially according to what was established previously [23]: after calculating the Rockefeller 99 percentile, the rate of specimens above this value was estimated for each enzyme and population. Activities were classified as unaltered, altered, or highly altered if this rate was, respectively, below 15, between 15 and 50, or above 50%.

2.7. Molecular Assays. The results of *kdr* genotyping were previously published [20] and herein explored in parallel with the bioassays. Briefly, the genotyping was conducted with a customized real-time PCR TaqMan SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher), for Val1016Ile (AHSIDL6) and Phe1534Cys

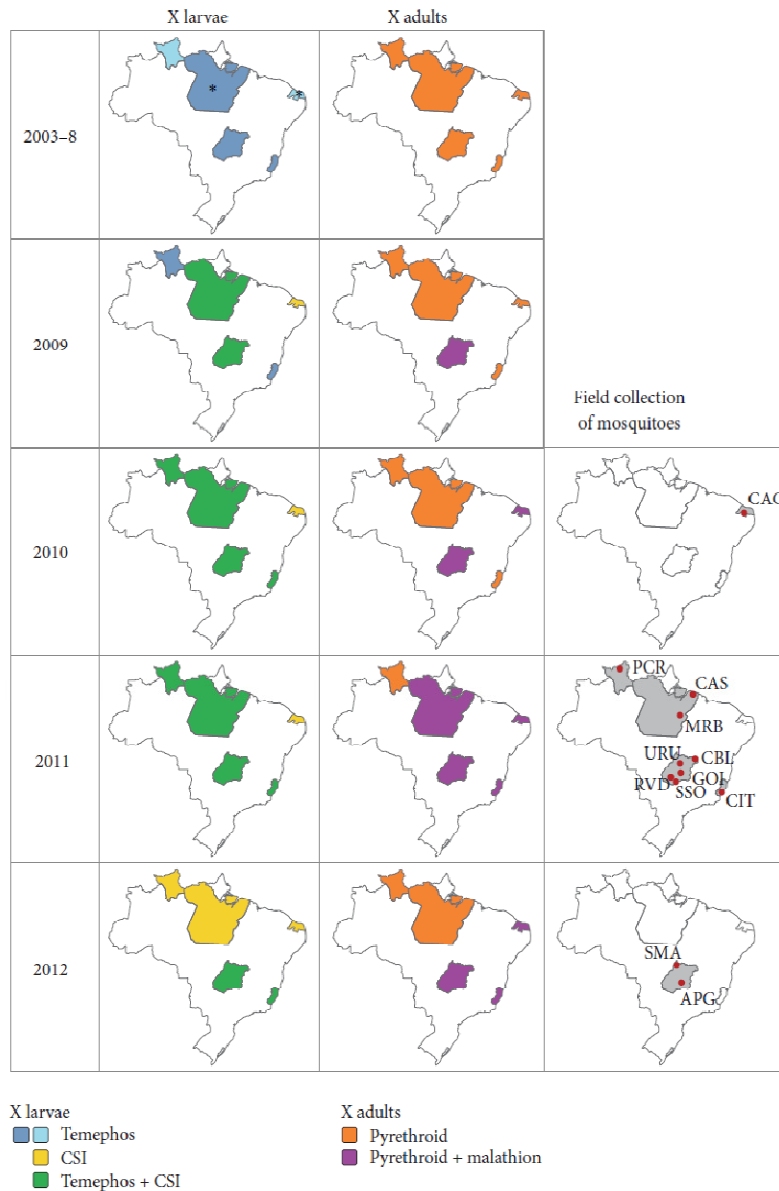


FIGURE 2: Historic of insecticide distribution, between 2003 and 2012, by the Brazilian MoH to the States where mosquitoes samples were collected, in the indicated years. The municipalities evaluated are highlighted with red dots in the panels at right. During 2003–2008, two states, shown in lighter blue in the upper map at left, did not receive temephos continuously: at Roraima (RR) temephos supply started at 2005; at Rio Grande do Norte (RN) it ended at 2004. (*) States that also received CSI (diflubenzuron or novaluron) during 2003–2008 (RN at 2004 and PA at 2008). Compounds against adults: all pyrethroids distributed by the MoH were considered, and not only deltamethrin (see text for details). Municipalities—APG: Aparecida de Goiânia; CAC: Caicó; CAS: Castanhal; CBL: Campos Belos; CIT: Cachoeiro de Itapemirim; GOI: Goiânia; MRB: Marabá; PCR: Pacaraima; RVD: Rio Verde; SMA: São Miguel do Araguaia; SSO: São Simão; and URU: Uruaçu.

(AHUADFA). In general 30 individual adult males preferentially from the parental generation were used in two independent reactions, one for each Na_V kdr SNP (1016 and 1534). The allelic and genotypic frequencies of each population were calculated based on variations at both positions, assuming that they are under linkage disequilibrium, which resulted in the alleles Na_V^S (1016 Val⁺ + 1534 Phe⁺), Na_V^{R1} (1016 Val⁺ + 1534 Cys^{kdr}), and Na_V^{R2} (1016 Ile^{kdr} + 1534 Cys^{kdr}) [20].

2.8. Interpretation of Results. Results of bioassays for each population and every active compound derived from three or four tests performed in different days. The lethal concentrations (LC) in the case of neurotoxic insecticides or the concentrations inhibiting adult emergence (EI), when the IGR was considered, were calculated using probit analyses [48] (Polo-PC, LeOra Software, Berkeley, CA). Resistance ratios (RR_{50} , RR_{95}) were acquired dividing the results obtained for each population by the equivalent Rockefeller's values. For all insecticides, the resistance status of mosquito populations was classified according to the criterion utilized in the country to temephos evaluation. This criterion, recommended by PNCD, considers that populations with RR_{95} above 3.0 are resistant [23, 49] (see Section 4).

3. Results

3.1. Insecticides Employed against *Aedes aegypti* in the Field. Figure 2 exhibits the recent history of insecticides distributed by the Brazilian MoH to the States where field collection of *A. aegypti* populations took place. All larvicides evaluated in the present work are depicted. Beyond these products, Bti was also employed in the field (not shown), during most of the period between 2003 and 2009, except for the central-west State of Goiás. For adulticides, besides the organophosphate malathion, deltamethrin was the pyrethroid elected against *A. aegypti*. However, several PY compounds were also used in the scope of the control of other vectors. Therefore, Figure 2 depicts all pyrethroids distributed for this purpose by the MoH, since these products can interfere with *A. aegypti* populations' susceptibility status. It should also be taken into account that the uncontrolled domestic use of pyrethroids plays an important role in the dissemination of insecticide resistance [32]. However, information regarding domestic use is very difficult to obtain.

Up to 2011, the larvicide temephos was continuously distributed to the states evaluated, with two exceptions: temephos supply to RR started only in 2005 and to RN it lasted until 2004 (Figure 2, light blue states in the 2003–8 line). In this latter state, control of larvae employed Bti between 2005 and 2008. Since 2009–2010 the CSI diflubenzuron was introduced in the *A. aegypti* larvae control, in addition to the organophosphate temephos in all states. The exception was RN where, as mentioned above, temephos had been previously discontinued; in this case, the CSI remained the sole larvicide adopted in *A. aegypti* control from 2009 on.

Control of adult mosquitoes was performed exclusively with pyrethroids between 2003 and 2008. Since 2009, the organophosphate malathion was gradually introduced. At

2011, all the states received both compounds, except RR that employed exclusively PY. At 2012, malathion was not distributed to the state of Pará.

3.2. Dengue Incidence in the Evaluated Municipalities. Figure 3 shows the incidence of dengue reported cases for all municipalities evaluated here. The aim in this case was to investigate if there were local outbreaks that could be related to a domestic intensification of insecticide use and, potentially, to an increase in *A. aegypti* resistance to these compounds. The period chosen ranged from 2008, two years before the collection of the first *A. aegypti* samples here evaluated, up to 2012. Incidence values for municipalities and the corresponding states are also presented in Table S1 of the Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8603263>.

According to the Brazilian MoH, dengue incidence rates higher than 300 cases/100,000 inhabitants are already indicative of an epidemic situation [50]. In almost all municipalities, at least once, the dengue incidence of notified cases was compatible with this scenario. When the whole 2008–2012 period was considered, only Marabá, PA, was the exception. However, the localities of Castanhal, PA, and Caicó, RN, only presented high dengue incidence at 2012, after collection of vector samples was made (compare Figures 2 and 3). In some situations this “epidemic status” persisted throughout the whole evaluated period; this was the case of Pacaraima, RR, and of the GO adjacent municipalities Goiânia and Aparecida de Goiânia. The number of registers well above the threshold value of 300 cases per 100,000 inhabitants also attracted attention. For instance, reported incidence equivalent to at least 1% (1,000 cases/100,000 inhabitants) was found during 2009 and 2010 in half of the evaluated municipalities. Notably, the dengue incidence of Aparecida de Goiânia remained above 1% during the whole evaluated period. In the adjacent locality, Goiânia, those high dengue rates were registered during three years between 2008 and 2012. One should be aware that in general dengue epidemic periods are related to a significant increase in the domestic use of insecticides against adult mosquitoes (see Section 4).

3.3. Bioassays with Larvae. Table 1 summarizes the results of quantitative bioassays performed with the two main larvicides recently employed against *A. aegypti* in Brazil, the OP temephos and the CSI diflubenzuron. Table S2 shows details of these assays, such as effective concentrations and confidence intervals. Data are organized by year and then by geographic region.

All the populations evaluated were considered resistant to temephos. The higher resistance values were obtained in 2012. Nevertheless, since there were no municipalities examined in consecutive years, it is not possible to claim that temephos resistance is increasing in the country, based on the data presented here. In general, temephos resistance was higher at the central-west region: six out of seven municipalities presented RR_{95} above 10. São Miguel do Araguaia, GO, exhibited the higher temephos RR_{95} value, above 27. In contrast, Pacaraima, the municipality with the lower resistance level to the OP, is located at RR, a state where temephos

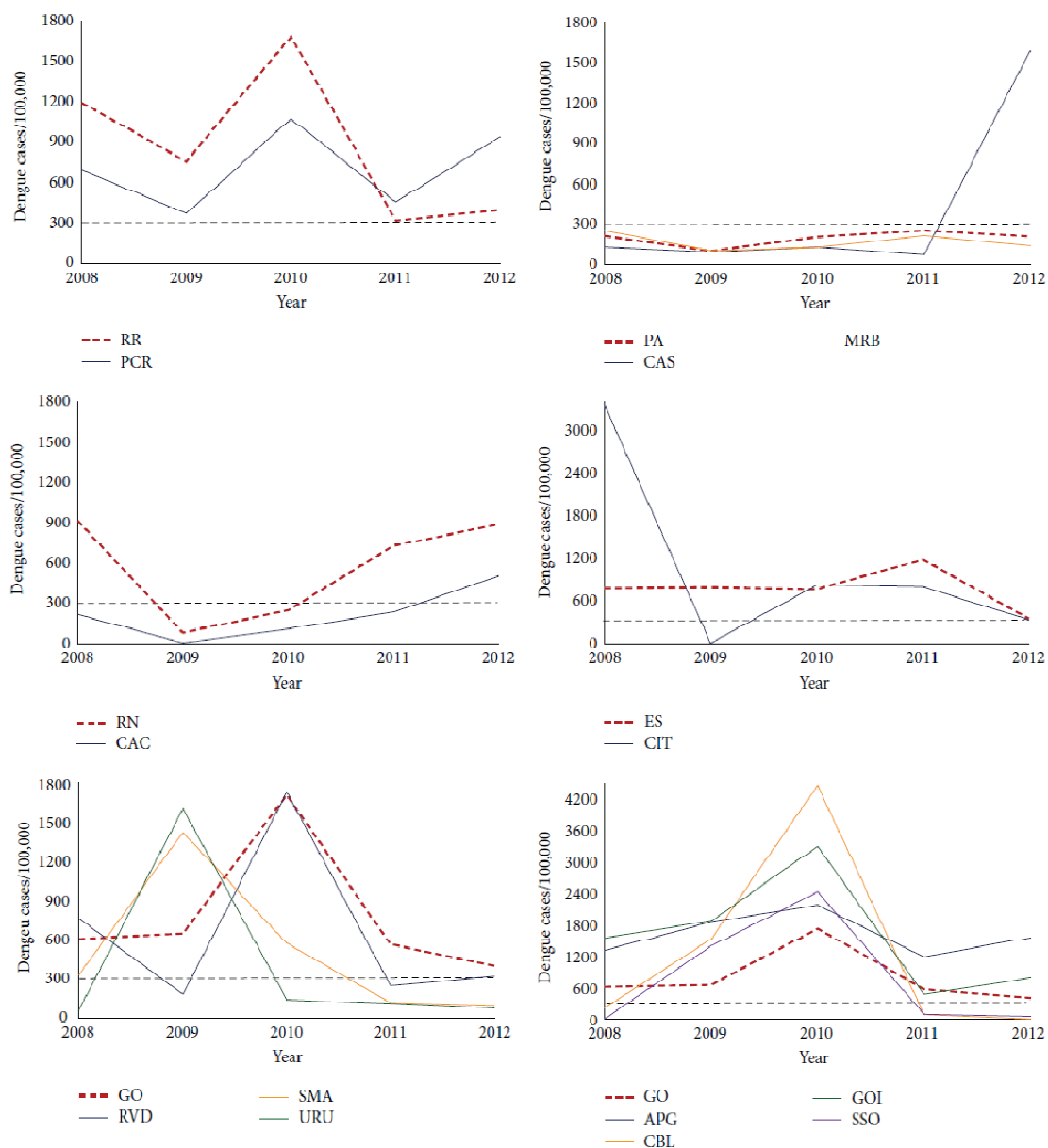


FIGURE 3: Incidence of reported dengue cases in the municipalities evaluated from 2008 to 2012 (values refer to the rate of notified cases per 100,000 inhabitants). In each panel, the thick red line refers to the dengue incidence in the corresponding State. The dashed line indicates the point above which dengue incidence is considered high. Note that in some panels it was necessary to change the y-scale in order to include all values.

supply started later than in the other states (Figure 2). In comparison with Rockefeller, a general higher heterogeneity of field populations was detected, as judged by their low slope values.

In contrast to the results obtained for temephos, all populations analyzed were susceptible to diflubenzuron

($RR_{95} < 3.0$). This was true even for mosquito populations bearing high temephos resistance rates, suggesting absence of cross resistance between these compounds in the localities examined. In contrast to the results obtained with temephos, field populations seemed more homogeneous than Rockefeller strain regarding diflubenzuron resistance profiles.

TABLE 1: Resistance status of several Brazilian municipalities to the larvicides temephos (OP) and diflubenzuron (CSI).

Year	Region	State	Municipality/strain	Generation	Temephos			Generation	Diflubenzuron		
					RR ₅₀	RR ₉₅	Slope		RR ₅₀	RR ₉₅	Slope
2010	NE	RN	Rockefeller		1.0	1.0	6.20		1.0	1.0*	4.85
			Caicó	F2	8.4	9.6	5.07	F2	2.2	1.7*	6.56
2011	N	RR	Rockefeller		1.0	1.0	5.03		1.0	1.0	4.16
			Pacaraima	F2	4.3	4.0	5.70	F2	1.7	1.5	5.05
			Castanhal	F2	8.2	11.2	3.53	F2	1.4	1.2	4.75
	PA	Marabá		F2	8.0	10.3	3.76	F3	1.8	1.6	4.91
				F2	18.4	17.1	5.57	F2	1.9	1.6	5.03
	SE	ES	Cachoeiro de Itapemirim	F1	18.4	17.1	5.57	F2	1.9	1.6	5.03
			Campos Belos	F2	9.1	12.0	3.68	F2	1.7	1.6	4.38
	CW	GO	Goiânia	F2	7.9	8.6	4.56	F2	1.6	1.8	3.63
			Rio Verde	F2	11.5	14.8	3.77	F2	2.0	1.6	5.32
			São Simão	F2	12.1	14.8	3.98	F2	2.0	2.3	3.57
Uruaçu			F2	10.5	12.5	4.08	F2	1.9	1.5	5.78	
Aparecida de Goiânia			F1	17.9	16.6	5.59	F2	1.1	2.1	2.43	
2012	CW	GO	São Miguel do Araguaia	F1	21.1	27.1	3.77	F1	1.6	1.7	3.82

RR₅₀ and RR₉₅: resistance ratios; profiles corresponding to RR₉₅ below or above 3.0 (italic font or bold font numbers) were classified as susceptible or resistant, respectively.

*RR₈₀ is informed. See Table S2 for additional details.

TABLE 2: Resistance status of several Brazilian municipalities to the pyrethroid deltamethrin and allelic frequencies of the major kdr mutations found in the country.

Year	Region	State	Municipality/strain	Generation	RR ₅₀	RR ₉₅	Slope	Na _v allelic frequencies		
								S	R1	R2
2010	NE	RN	Rockefeller		1.0	1.0	2.96			
			Caicó	F2	6.0	13.1	2.51	0.917	0.067	0.017
2011	N	RR	Rockefeller		1.0	1.0	4.55			
			Pacaraima	F2	33.2	60.3	2.65	0.000	0.600	0.400
			Castanhal	F2	9.9	14.9	3.05	0.667	0.300	0.033
	PA	Marabá		F2	47.4	70.7	3.07	0.690	0.310	0.000
				F1	49.0	78.6*	2.16	0.103	0.224	0.672
	SE	ES	Cachoeiro de Itapemirim	F1	49.0	78.6*	2.16	0.103	0.224	0.672
			Campos Belos	F2	25.3	52.3	2.43	0.310	0.086	0.603
	CW	GO	Goiânia	F2	47.6	46.5	4.68			
			Rio Verde	F2	32.5	56.2	2.74	0.241	0.207	0.552
			São Simão	F2	30.4	51.6	2.78	0.083	0.383	0.533
Uruaçu			F2	38.6	51.6	3.37	0.450	0.117	0.433	
Aparecida de Goiânia			F1	33.0	57.2	2.74	0.207	0.362	0.463	
2012	CW	GO	São Miguel do Araguaia	F1	39.6	49.4	3.59	0.414	0.293	0.293

RR₅₀ and RR₉₅: resistance ratios; profiles corresponding to RR₉₅ above 3.0 (bold font numbers) were classified as resistant.

*RR₈₀ is informed. See Table S3 for additional details.

Kdr allelic frequencies S, R1, and R2 refer to the positions 1016 and 1534 of the gene coding for the voltage gated sodium channel (Na_v) as follows: S (susceptible) = 1016 Val⁺/1534 Phe⁺; R1 (single mutant) = 1016 Val⁺/1534 Cys^{kdr}; and R2 (double mutant) = 1016 Ile^{kdr}/1534 Cys^{kdr}. Kdr data have been originally published by Linss et al. 2014 [20].

3.4. *Bioassays and Molecular Assays with Adults.* Resistance rates resulting from bioassays with the adulticide PY deltamethrin are depicted in Table 2, together with the Na_v allelic frequencies, where R1 and R2 are the kdr alleles related to PY target site resistance. Additional details of the bioassays are presented in Table S3 that also includes the kdr allelic frequencies for each position (1016 and 1534) separately [20].

Very high deltamethrin resistance levels were found for all populations; RR₉₅ was always above 10.0. Caicó, RN,

at the northeast region, and Castanhal, PA, in the north region, exhibited the lowest RR₉₅, respectively, 13.1 and 14.9. Accordingly, these municipalities presented the lower frequencies of R1 and R2 kdr alleles. In all other municipalities values remained above 45.0. In two localities, Marabá, PA, and Cachoeiro de Itapemirim, ES, RR₉₅ was higher than 70.0. In this latter locality, due to the high resistance level detected, there was lack of enough specimens to reach LC₉₅ (note that in Tables 2 and S3 the higher value shown for

TABLE 3: Quantification of the enzymatic activity of *A. aegypti* larvae from different Brazilian municipalities. Numbers refer to the rate of specimens with activity higher than the 99 percentile of Rockefeller (% >p99). Municipalities are arranged in descending order of temephos resistance (RR₉₅ OP).

Year	Region	State	Municipality/strain	RR ₉₅ OP	ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2012	CO	GO	São Miguel do Araguaia	27.1	0	0	<u>20</u>	<u>28</u>	<u>21</u>	59
2012	CO	GO	Aparecida de Goiânia	16.6	5	<u>31</u>	85	8	54	63
2011	CO	GO	Rio Verde	14.8	1	0	<u>40</u>	<u>19</u>	<u>38</u>	8
2011	CO	GO	São Simão	14.8	1	4	<u>40</u>	<u>35</u>	<u>33</u>	<u>32</u>
2011	CO	GO	Campos Belos	12.0	1	15	9	1	5	0
2011	N	PA	Castanhal	11.2	0	<u>48</u>	<u>34</u>	3	<u>29</u>	75
2010	NE	RN	Caicó	9.6	0	4	<u>19</u>	0	0	0
2011	CO	GO	Goiânia	8.6	3	6	<u>49</u>	5	<u>34</u>	<u>36</u>
2011	N	RR	Pacaraima	4.0	6	1	<u>21</u>	0	14	3

Activities were classified as normal (regular font), altered (italic and underlined font) or highly altered (italic and bold) if these values ranged respectively below 15%, between 15 and 50% or above 50%.

TABLE 4: Quantification of the enzymatic activity of *A. aegypti* adults from different Brazilian municipalities. Numbers refer to the rate of specimens with activity higher than the 99 percentile of Rockefeller (% >p99). Municipalities are arranged in descending order of deltamethrin resistance (RR₉₅ PI).

Year	Region	State	Municipality/strain	RR ₉₅ PI	ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2011	SE	ES	Cachoeiro de Itapemirim	78.6*	0	80	98	67	3	70
2011	N	RR	Pacaraima	60.3	0	<u>17</u>	<u>40</u>	<u>48</u>	13	2
2012	CO	GO	Aparecida de Goiânia	57.2	1	57	94	70	10	73
2011	CO	GO	Rio Verde	56.2	13	74	4	81	8	13
2011	CO	GO	Campos Belos	52.3	0	8	65	14	1	6
2011	CO	GO	São Simão	51.6	<u>21</u>	9	59	58	14	15
2012	CO	GO	São Miguel do Araguaia	49.4	4	97	8	<u>46</u>	0	8
2011	CO	GO	Goiânia	46.5	0	99	78	55	5	<u>38</u>
2010	NE	RN	Caicó	13.1	3	0	11	63	<u>22</u>	6

Activities were classified as normal (regular font), altered (italic and underlined font) or highly altered (italic and bold) if these values ranged respectively below 15%, between 15 and 50% or above 50%. *RR₈₀ is informed.

Cachoeiro de Itapemirim corresponds to LC₈₀). The supply of pyrethroids for the bulk of the states evaluated here was continuous since at least 2003 (Figure 2). Comparison of the slope values obtained for deltamethrin assays shows that, in general, field populations evaluated demonstrate higher heterogeneity than the Rockefeller strain.

3.5. *Biochemical Assays.* Tables 3 and 4 present the results of biochemical assays for, respectively, larval and adult stages. In both tables, data are organized by decreasing RR₉₅ order of the neurotoxic insecticides temephos (larvae) and deltamethrin (adults). Additional details of these assays are shown in Tables S4 and S5.

According to the WHO criterion, measurements of inhibition of AChE activity, the OP target site, point to unaltered activity for all populations and development stages (data not shown). This was verified because the carbamate propoxur induced more than 70% of AChE activity inhibition in all cases [47]. In addition, quantification of total AChE activity [45, 46] revealed values compatible with susceptibility, in all cases, with exception of adults from one population (São Simão, GO, Table 4).

For all the remaining enzymes, changes were detected for both stages. In the larval stage, major changes were noted in the activities of GST, β -EST, and ρ NPA-EST, while moderate increases were noted for MFO and α -EST. The intensity of enzymatic alterations appeared to be higher at the adult stage, mainly when MFO, GST, and α -EST were considered. In general, populations with a higher RR also tended to exhibit a higher increase in detoxifying enzymes activity, taking into account both the number of altered classes and the intensity of activity increment.

4. Discussion

The use of insecticides in the control of the dengue vector in Brazil has been broad and continuous, a procedure that favored the selection of resistant specimens over the years. In order to assist in the rational use of pesticides, in 2006, the Brazilian Dengue Control Program adopted a functional criterion for the evaluation of the temephos status of *A. aegypti* populations. This criterion, also employed here to classify both deltamethrin and diflubenzuron resistance status, considers that populations with RR₉₅ above 3.0 are resistant. This is the cutoff to conduct insecticide substitution in the

field, and the adoption of this parameter took into account Brazilian operational aspects of insecticide management, like the period of time necessary for the effective implementation of the insecticide substitution in all affected localities. This strategy aimed to preserve the insecticides in the field [23].

Functional validation of this criterion has been previously obtained through simulated field assays with temephos and, more recently, with pyrethroids [23, 51]. Resistance to diflubenzuron was not established in the country and therefore a functional criterion has not yet been defined for this IGR by PNCD. However, Fontoura et al. [42], using simulated assays, did not find impairment of the efficacy of another CSI, novaluron, in *A. aegypti* populations bearing $RR_{90} < 2.0$.

The use of OP pesticides in Brazil for *A. aegypti* control dates back to the 1960s, and it was intensified since 1986, when the DENV-1 virus was introduced in the country [52, 53]. As a result, resistance to temephos has been reported in Brazilian populations of *A. aegypti* collected from 1998 on [23, 27, 28]. Resistance to temephos spread around the country so intensely that, since 2009, PNCD does not recommend the use of this OP as the larvicide of choice [54]. Accordingly, all populations here evaluated between 2010 and 2012 were resistant to temephos.

Investigation of putative resistance mechanisms present in *A. aegypti* larvae excluded the participation of acetylcholinesterase, the OP target site. Regarding metabolic resistance, MFO enzymes are strongly associated with insecticide resistance in several *A. aegypti* populations around the world [25, 26, 55]. We found only discrete alterations in this class of enzymes in larvae from Brazilian *A. aegypti* populations, while adult specimens exhibited levels of MFO alteration equivalent to EST and GST enzymes. In 2007, *A. aegypti* adult FST activities were associated with resistance to both OP and PY in Brazil [23]. Connections between OP resistance and significant alterations of EST as well as association between PY resistance and both MFO and GST elevated activity rates were also reported in other countries [25, 26, 55].

In general, higher RR levels against OP and PY neurotoxic insecticides correlated to increased metabolic alterations in terms of both number of enzymes affected and intensity of activity enhancement [30, 55, 56]. Usually detoxifying enzymes that trigger metabolic resistance participate in the general insect metabolism. These are somewhat generic molecules, with a variable affinity for a number of insecticides or other xenobiotics. Although resistance to the IGR diflubenzuron has not yet been detected in the country, the development of metabolic resistance against these compounds is a potential mechanism that should be monitored.

For some localities here depicted, previous evaluations of the temephos susceptibility status are available. In these cases, the resistance dynamics profiles were compared to the insecticide distribution performed by the MoII to each state (Figure 2). Increase in the temephos resistance status was noted whenever the application of this OP persisted. Examples are the central-west municipalities of Goiânia (GOI) and Aparecida de Goiânia (APG), at GO state: between 2003 and 2011, GOI RR_{95} increased more than twice, from 3.3 to 8.6 (Table 1, [23]). In APG the temephos RR_{95} also increased

significantly between 2006 (11.2) and 2012 (16.6) (Table 1, [57]). In contrast, only a low decrease in the temephos resistance status was noted following its interruption. This was the case of Caicó (CAC), at RN state, where no temephos was provided since 2004 (Figure 2). At that year, CAC temephos RR_{95} was 12.5; six years later this value dropped only slightly, to 9.6 (Table 1, [23]).

One major consequence of the high and disseminated Brazilian *A. aegypti* temephos resistance status was the inclusion of the CSI diflubenzuron in the chemical control of larvae since 2009. Bioassays of mosquito samples obtained between 2010 and 2012 confirmed the susceptible status of all evaluated populations to this product. Diflubenzuron resistance ratios below 3.0 were also found for field *A. aegypti* populations from Cabo Verde, Malaysia, and Martinique [58–60]. Together, these data point that the use of this class of insecticides in the control of larvae of the dengue vector is still viable.

The bulk of results obtained by the *A. aegypti* insecticide resistance monitoring Brazilian network guided the option to rotate products against larvae in the country. Insect Growth Regulators were adopted. Due to operational issues, the maximum period of four years was fixed for alternation of products [61]. The aim of this resistance management strategy was to preserve the few available larvicides. In this regard, it is ought to mention that Brazil only employs larvicides recommended by WHOPES for use in drinking water [14]. Currently, the IGR used against *A. aegypti* larvae is the juvenile hormone analogue (JHA) pyriproxyfen [62].

Some decades were necessary until the spread of resistance to the OP temephos in Brazil could compromise its use in the control of *A. aegypti*. In contrast, in the case of pyrethroids, introduced in the whole country in 2000 by PNCD, only a few years were enough to the achievement of extremely high resistance levels [23, 31, 32]. If, on the one hand, chemical control of *A. aegypti* adults is recommended by the MoH only to block outbreaks or on the imminence of a dengue epidemic [9], on the other hand, unlike temephos, PY insecticides are available in the retail market. The domestic use of pyrethroids is intensified at every dengue epidemic period and certainly contributes significantly to the rapid dissemination of resistance [33]. Accordingly, *A. aegypti* deltamethrin resistance levels doubled between 2009 and 2011 at Cachoeiro de Itapemirim and Goiânia; in the same period, an eightfold increase was observed for this parameter at Marabá (Table 2; Bellinato D, personal communication). Cachoeiro de Itapemirim and Goiânia faced dengue outbreaks in this interval, corroborating the hypothesis that the intensification of the domestic use of PY collaborated in the resistance increase. However no dengue outbreak was noted at Marabá in this period. Marabá is located in the Amazon region, where almost all Brazilian malaria cases are reported. Control of *Anopheles* malaria vectors also employs PY and this could explain the increased resistance observed. In contrast, the lowest PY resistance levels were found for Castanhal at 2010 and Caicó at 2011, two municipalities that had not experienced dengue epidemics since 2008.

To date, the PY resistance ratios found here are among the highest ones reported in the country. In spite of that,

heterogeneity levels exhibited by those vector populations suggest that the insecticide resistance character is still not irreversibly fixed. In relation to the PY target site resistance, the voltage gated sodium channel, this heterogeneity confirms previous observations, reporting the presence of the Na_v susceptible allele (S) with allelic frequencies between 0.0 and 0.92 (Table 2). Regarding metabolic resistance of adult mosquitoes, as for temephos resistance and larvae biochemical profile (mentioned above), a general positive correlation between the resistance level and the magnitude of altered enzymes was also found. It should be noted that, in this case, except for Caicó, all populations exhibited PY resistance levels above 45.0. Hence, while Caicó detoxifying enzymes effects were restricted to esterases, in the remaining populations, GST or MFO activities (and both enzymes in some cases) were significantly enhanced. In addition, GST, MFO, and EST have already been correlated with PY resistance [5, 23, 44, 63].

Due to the spread of high pyrethroid resistance levels throughout the country, since 2009 PY is being gradually replaced by the OP malathion for the control of *A. aegypti* adults, employed in residual applications and UBV [16, 54, 64].

Currently, chemical control is still largely applied in public health, favoring the insecticide resistance dissemination of vector populations. Accordingly, we detected high resistance levels against the OP temephos and the PY deltamethrin, insecticides long used in the country. In some municipalities, comparison with the incidence of dengue outbreaks suggested significant participation of the domestic use of PY insecticides in the rapid resistance increase. The introduction of IGRs is recent in Brazil, and all *A. aegypti* populations here evaluated were susceptible to the CSI diflubenzuron. Together our results indicate the potential of this IGR against the vector but also point to the need for rational use of chemical tools. In this sense, the adoption of rotation of compounds with different mechanisms of action is a positive step. It still remains, however, to invest in awareness campaigns, directed to both managers and the general society, regarding the importance of the mechanical control of vectors as a priority. Spreading the concept that chemical control is a complementary antivector strategy is the best way to preserve insecticides.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

Ademir J. Martins, Diogo Fernandes Bellinato, Denise Valle, José Bento Pereira Lima, and Simone Costa Araújo conceived and designed the experiments. Diogo Fernandes Bellinato and Priscila Fernandes Viana-Medeiros performed the experiments. Diogo Fernandes Bellinato, Denise Valle, Priscila Fernandes Viana-Medeiros, and Simone Costa Araújo analyzed the data. Denise Valle and José Bento Pereira Lima contributed reagents/materials/analysis tools. Diogo Fernandes

Bellinato and Denise Valle wrote the paper. All authors read and approved the final version of the paper.

Acknowledgments

This study is funded by Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Programa Nacional de Controle da Dengue/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (PNCD/SVS/MS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM). The authors acknowledge Heloisa Maria Nogueira Diniz from the Serviço de Produção e Tratamento de Imagem/IOC for help with the figures, Marcos Batata from the Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro for sharing information regarding insecticide supply, and the Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores personnel for help with bioassays.

References

- [1] WHO, *A Global Brief on Vector-Borne Diseases*, WHO/DCO/ WHD/2014.1, 2014.
- [2] L. M. Schwartz, M. E. Halloran, A. P. Durbin, and I. M. Longini Jr., "The dengue vaccine pipeline: implications for the future of dengue control," *Vaccine*, vol. 33, no. 29, pp. 3293–3298, 2015.
- [3] R. Consoli and R. Lourenço-de-Oliveira, *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 1994.
- [4] C. C. Jansen and N. W. Beebe, "The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next," *Microbes and Infection*, vol. 12, no. 4, pp. 272–279, 2010.
- [5] D. Valle, T. A. Belinato, and A. J. Martins, "Controle químico de *Aedes aegypti*. Resistência a inseticidas e alternativas," in *Dengue: Teorias e Práticas*, D. Valle, D. N. Pimenta, and R. V. Cunha, Eds., pp. 93–126, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2015.
- [6] I. A. Braga and D. Valle, "*Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência," *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, vol. 16, no. 4, pp. 279–293, 2007.
- [7] WHO, *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, WHO Press, Geneva, Switzerland, 2009.
- [8] C. W. Cardoso, I. A. D. Paploski, M. Kikuti et al., "Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, Chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 21, no. 12, pp. 2274–2276, 2015.
- [9] Brasil, *Diretrizes Nacionais Para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue*, Normas e Manuais Técnicos, Série A, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brazil, 1st edition, 2009.
- [10] H. Ranson, J. Burhani, N. Lumjuan, and W. C. Black, "Insecticide resistance in dengue vectors," *TropIKA.net Journal*, vol. 1, no. 1, 2010.
- [11] F. Darriet, S. Duchon, and J. M. Hougard, "Spinosad: a new larvicide against insecticide-resistant mosquito larvae," *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 21, no. 4, pp. 495–496, 2005.

- [12] M. S. Mulla, "The future of insect growth regulators in vector control," *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 11, no. 2, pp. 269–273, 1995.
- [13] WHO, *World Health Organization Recommended Insecticides for Space Spraying*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2012, http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul2012.pdf.
- [14] WHO, *WHOPES-Recommended Compounds and Formulations for Control of Mosquito Larvae*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2013, http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_25.Oct.2013.pdf.
- [15] A. J. Martins and D. Valle, "The pyrethroid knockdown resistance," in *Insecticides: Basic and Other Applications*, S. Soloneski and M. S. Larramendy, Eds., InTech, Rijeka, Croatia, 2012.
- [16] G. P. García, A. E. Flores, I. Fernández-Salas et al., "Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, no. 10, article e531, 2009.
- [17] S. Marcombe, R. B. Mathieu, N. Pocquet et al., "Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 2, Article ID e30989, 2012.
- [18] C.-X. Li, P. E. Kaufman, R.-D. Xuc et al., "Relationship between insecticide resistance and *kdr* mutations in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southern China," *Parasites & Vectors*, vol. 8, article 325, 2015.
- [19] A. J. Martins, J. B. P. Lima, A. A. Peixoto, and D. Valle, "Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 14, no. 11, pp. 1351–1355, 2009.
- [20] J. G. B. Linss, L. P. Brito, G. A. Garcia et al., "Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys *Kdr* mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations," *Parasites and Vectors*, vol. 7, no. 1, article 25, 2014.
- [21] J. Hemingway and H. Ranson, "Insecticide resistance in insect vectors of human disease," *Annual Review of Entomology*, vol. 45, pp. 371–391, 2000.
- [22] H. Ranson, M. G. Paton, B. Jensen et al., "Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*," *Insect Molecular Biology*, vol. 13, no. 4, pp. 379–386, 2004.
- [23] I. R. Montella, A. J. Martins Jr., P. F. Viana-Medeiros, J. B. P. Lima, I. A. Braga, and D. Valle, "Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77, no. 3, pp. 467–477, 2007.
- [24] A. P. Araújo, D. F. A. Diniz, E. Helvecio et al., "The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management," *Parasites and Vectors*, vol. 6, no. 1, article 297, 2013.
- [25] C. Strode, C. S. Wondji, J.-P. David et al., "Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 38, no. 1, pp. 113–123, 2008.
- [26] R. Poupardin, W. Srisukontarat, C. Yunta, and H. Ranson, "Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 3, article e2743, 2014.
- [27] M. L. G. Macoris, M. T. M. Andrighetti, L. Takaku, C. M. Glasser, V. C. Garbeloto, and V. C. B. Cirino, "Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil," *Revista de Saúde Pública*, vol. 33, no. 5, pp. 521–522, 1999.
- [28] J. B. P. Lima, M. Pereira da-Cunha, R. C. da Silva Júnior et al., "Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 68, no. 3, pp. 329–333, 2003.
- [29] I. A. Braga, J. B. P. Lima, S. Da Silva Soares, and D. Valle, "*Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 99, no. 2, pp. 199–203, 2004.
- [30] E. P. Lima, M. H. S. Paiva, A. P. de Araújo et al., "Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil," *Parasites & Vectors*, vol. 4, no. 1, article 5, 2011.
- [31] M. P. da-Cunha, J. B. P. Lima, W. G. Brogdon, G. E. Moya, and D. Valle, "Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 100, no. 4, pp. 441–444, 2005.
- [32] R. Maciel-de-Freitas, F. C. Avendanho, R. Santos et al., "Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Article ID e92424, 2014.
- [33] R. Maciel-de-Freitas and D. Valle, "Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 92, no. 9, pp. 685–689, 2014.
- [34] Brasil 2015, *Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)*, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Brasília, Brazil, <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/denguebr.def>.
- [35] Brasil 2010, *Sinopse do Censo Demográfico 2010*, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?uf>.
- [36] Brasil 2008, "Metodologia de amostragem de *Aedes aegypti* por meio de armadilhas de postura (ovitrampas)," Documento da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa), Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brazil.
- [37] G. Kuno, "Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains," *Journal of Medical Entomology*, vol. 47, no. 6, pp. 957–971, 2010.
- [38] C. T. Hawk and S. L. Leary, *Formulary for Laboratory Animals*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1995.
- [39] WHO, "Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides," Tech. Rep. WHO/VBC/81.807, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1981.
- [40] T. A. Belinato, A. J. Martins, and D. Valle, "Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 107, no. 7, pp. 916–922, 2012.
- [41] A. J. Martins, T. A. Belinato, J. B. P. Lima, and D. Valle, "Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos," *Pest Management Science*, vol. 64, no. 6, pp. 676–680, 2008.
- [42] N. G. Fontoura, D. F. Bellinato, D. Valle, and J. B. P. Lima, "The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil,"

- Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 107, no. 3, pp. 387–395, 2012.
- [43] World Health Organization (WHO), *Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-Efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces*, WHO/CDS/CPC/MAL/98.12, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998.
- [44] L. P. Brito, J. G. B. Linss, T. N. Lima-Camara et al., “Assessing the effects of *Aedes aegypti* *kdr* mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, Article ID e60878, 2013.
- [45] D. Valle, I. R. Montella, R. A. Ribeiro, P. F. Viana-Medeiros, A. J. Martins Jr., and J. B. P. Lima, *Quantification Methodology for Enzyme Activity Related to Insecticide Resistance in Aedes aegypti*, Fundação Oswaldo Cruz and Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro and Distrito Federal, Brazil, 2006.
- [46] P. F. Viana-Medeiros, *Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas e adultos de Aedes aegypti, Linnaeus, 1762 [Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária]*, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, 2011.
- [47] J. Hemingway, *Techniques to Detect Insecticide Resistance Mechanisms (Field and Laboratory Manual)*, WHO/CDC/CPC/MAL.98.6, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998.
- [48] M. Raymond, “Presentation d’une programme d’analyse logprobit pour microordinateur,” *Cahiers ORSTOM. Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, vol. 22, pp. 117–121, 1985.
- [49] Brasil 2006, *Reunião Técnica para Discutir Status de Resistência de Aedes aegypti*, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Rio de Janeiro, Brazil.
- [50] M. G. Teixeira, M. C. N. Costa, M. L. Barreto, and F. R. Barreto, “Epidemiologia da dengue,” in *Dengue: Teorias e Práticas*, D. Valle, D. N. Pimenta, and R. V. Cunha, Eds., pp. 293–315, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2015.
- [51] M. L. G. Macoris, M. T. M. Andrighetti, D. M. V. Wanderley, and P. E. M. Ribolla, “Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo,” *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 47, no. 5, pp. 573–578, 2014.
- [52] H. G. Schatzmayr, R. M. Nogueira, and A. P. Travassos da Rosa, “An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro—1986,” *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 81, no. 2, pp. 245–246, 1986.
- [53] I. A. Braga and D. Valle, “*Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil,” *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, vol. 16, no. 2, pp. 113–118, 2007.
- [54] Brasil 2009, “Informa mudança de uso de inseticidas larvicidas e adulticidas na rotina do Programa Nacional de Controle da Dengue,” Nota Técnica 146/2009 CGPNCD/DIGES/SVS/MS, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brazil.
- [55] S. Marcombe, R. Poupardin, F. Darriet et al., “Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies),” *BMC Genomics*, vol. 10, article 494, 2009.
- [56] K. Saavedra-Rodriguez, C. Strode, A. E. Flores et al., “Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection,” *Insect Molecular Biology*, vol. 23, no. 2, pp. 199–215, 2014.
- [57] A. J. Martins, C. D. M. Ribeiro, D. F. Bellinato, A. A. Peixoto, D. Valle, and J. B. P. Lima, “Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, Article ID e31889, 2012.
- [58] S. Marcombe, F. Darriet, P. Agnew et al., “Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies),” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 84, no. 1, pp. 118–126, 2011.
- [59] K. W. Lau, C. D. Chen, H. L. Lee, Y. Norma-Rashid, and M. Sofian-Azirun, “Evaluation of insect growth regulators against field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia,” *Journal of Medical Entomology*, vol. 52, no. 2, pp. 199–206, 2015.
- [60] H. D. R. Rocha, M. H. S. Paiva, N. M. Silva et al., “Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides,” *Acta Tropica*, vol. 152, pp. 66–73, 2015.
- [61] Brasil 2012, *II Seminário Internacional para Avaliações de Ações de Controle Químico de Aedes aegypti no Brasil*, Programa Nacional de Controle da Dengue, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil.
- [62] Brasil 2014, *Larvicidas*, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brazil, <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/632-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/control-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/11387-larvicidas>.
- [63] F. A. D. Diniz, M. A. V. Melo-Santos, E. M. M. Santos et al., “Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos,” *Parasites & Vectors*, vol. 8, article 662, 2015.
- [64] Fiocruz, “Recomendação técnica sobre a interrupção do uso de inseticidas piretroides no controle do *Aedes aegypti* no Brasil,” Nota Técnica 2/2011/IOC-Fiocruz/Diretoria, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2011.

Table S1: incidence of reported dengue cases in the municipalities evaluated from 2008 to 2012 and in the corresponding States (in grey). Values refer to the rate of notified cases per 100.000 inhabitants.

Region	State	Locality	2008	2009	2010	2011	2012
			1.194	756	1.685	322	399
N	RR	Pacaraima	700	374	1.074	460	939
			211	103	205	254	208
	PA	Castanhal	131	95	131	76	1.588
		Marabá	252	106	129	214	141
NE	RN		918	81	248	731	892
		Caicó	217	6	108	234	506
SE	ES		756	767	742	1.148	334
		Cachoeiro de Itapemirim	3.271	7	798	775	320
			609	646	1.700	566	398
CO		Aparecida de Goiânia	1.293	1.821	2.138	1.169	1.536
CO		Campos Belos	217	1.505	4.356	92	5
CO	GO	Goiânia	1.529	1.841	3.217	470	781
CO		Rio Verde	763	184	1.721	249	321
CO		São Miguel do Araguaia	332	1.414	574	117	94
CO		São Simão	12	1.375	2.382	99	59
CO		Uruaçu	62	1.595	141	111	76

Available at [<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?uf=14&dados=21>], accessed at 3rd Aug 2015.

Bold: values above 300, a high incidence rate according to the Brazilian Ministry of Health

Table S2: temephos lethal concentrations (LC) and diflubenzuron adult emergence inhibition doses (EI) of several Brazilian municipalities.

year	Region	State	Municipality/strain	temephos				diflubenzuron			
				LC ₅₀ (µg/L)	LC ₉₅ (µg/L)	range		EI ₅₀ (µg/L)	EI ₉₅ (µg/L)	range	
						LC ₅₀ (µg/L)	LC ₉₅ (µg/L)			EI ₅₀ (µg/L)	EI ₉₅ (µg/L)
2010	NE	RN	Rockefeller	2.89	5.33	2.80 < LC < 2.98	5.17 < LC < 5.50	1.101	1.900*	1.047 < LC < 1.176	1.805 < LC < 1.999*
			Caicó	24.31	51.31	23.68 < LC < 24.95	48.94 < LC < 53.80	2.444	3.283*	2.362 < LC < 2.528	3.119 < LC < 3.456*
2011		RR	Rockefeller	3.56	7.56	3.31 < LC < 3.82	6.75 < LC < 8.46	0.970	2.410	0.918 < LC < 1.025	2.256 < LC < 2.574
			Pacaraima	15.38	29.91	13.49 < LC < 17.54	25.42 < LC < 35.19	1.695	3.591	1.608 < LC < 1.788	3.307 < LC < 3.898
	N	PA	Castanhal	29.03	85.01	25.18 < LC < 33.47	67.00 < LC < 107.85	1.312	2.912	1.239 < LC < 1.389	2.662 < LC < 3.184
			Marabá	28.45	77.8	25.62 < LC < 31.59	66.28 < LC < 91.31	1.791	3.874	1.708 < LC < 1.878	3.561 < LC < 4.213
	SE	ES	Cachoeiro de Itapemirim	65.49	129.35	61.86 < LC < 69.33	118.68 < LC < 1497	1.846	3.921	1.757 < LC < 1.940	3.639 < LC < 4.224
			Campos Belos	32.47	90.87	30.12 < LC < 35.00	78.91 < LC < 104.65	1.654	3.924	1.568 < LC < 1.744	3.530 < LC < 4.362
	CW	GO	Goiânia	28.25	64.83	25.83 < LC < 30.90	55.50 < LC < 75.73	1.509	4.285	1.414 < LC < 1.610	3.754 < LC < 4.891
			Rio Verde	40.99	112.06	37.04 < LC < 45.36	96.92 < LC < 129.57	1.914	3.902	1.830 < LC < 2.002	3.573 < LC < 4.262
São Simão			43.13	111.77	37.50 < LC < 49.68	92.73 < LC < 134.71	1.953	5.637	1.851 < LC < 2.061	5.019 < LC < 6.331	
			Uruaçu	37.37	94.53	32.88 < LC < 42.46	79.93 < LC < 111.81	1.877	3.615	1.799 < LC < 1.958	3.335 < LC < 3.919
2012	CW	GO	Aparecida de Goiânia	63.68	125.36	60.03 < LC < 67.54	115.45 < LC < 136.12	1.069	5.078	0.967 < LC < 1.181	4.201 < LC < 6.137
			São Miguel do Araguaia	75.05	205.21	68.19 < LC < 82.59	175.02 < LC < 2461	1.508	4.067	1.417 < LC < 1.605	3.597 < LC < 4.599

* EI₈₀ is informed.

Table S3: deltamethrin lethal concentrations (LC) and *kdr* frequencies of several Brazilian municipalities. *Kdr* data source: Linss *et al* 2014.

year	Region	State	Municipality/strain	Deltamethrin						generation	sample size	1016Ile frequency	1534Cys frequency	Na, allelic frequencies		
				LC ₅₀ (mg/L)	LC ₈₀ (mg/L)	LC ₉₅ (mg/L)	LC ₅₀ (mg/L)	range LC ₈₀ (mg/L)	LC ₉₅ (mg/L)					S	R1	R2
2010	NE	RN	Rockefeller	0.70		1.45	0.702 < LC < 0.810		2.361 < LC < 3.126	F1	30	0.017	0.084	0.917	0.067	0.017
			Caicó	4.22		19.04	3.617 < LC < 4.915		15.316 < LC < 23.668							
2011	N	RR	Rockefeller	0.92	1.41	2.12	0.842 < LC < 1.009	1.297 < LC < 1.537	1.865 < LC < 2.411	F0	30	0.400	1.000	0.000	0.600	0.400
			Pacaraima	30.61		127.89	25.958 < LC < 36.091		100.193 < LC < 163.248	F0	30	0.033	0.333	0.667	0.300	0.033
		PA	Castanhal	9.12		31.52	8.030 < LC < 10.352		26.970 < LC < 36.859	F0	29	0.000	0.310	0.690	0.310	0.000
		Marabá	43.72		149.97	38.734 < LC < 49.358		115.845 < LC < 194.161	F0	29	0.672	0.896	0.103	0.224	0.672	
	SE	ES	Cachoeiro de Itapemirim	45.19	110.98		41.605 < LC < 49.101	96.715 < LC < 127.365		F0	29	0.603	0.689	0.310	0.086	0.603
	Campos Belos		23.37		110.84	17.963 < LC < 30.424		82.694 < LC < 148.577	F0	29	0.552	0.759	0.241	0.207	0.552	
	CW	GO	Goiânia	43.88		98.57	41.231 < LC < 46.703		89.746 < LC < 108.268	F0	29	0.533	0.916	0.083	0.383	0.533
			Rio Verde	30.01		119.29	25.352 < LC < 35.513		94.313 < LC < 150.889							
São Simão			28.08		109.52	25.531 < LC < 33.516		87.709 < LC < 136.774								
Uruaçu			35.64		109.54	32.363 < LC < 39.241		97.176 < LC < 123.492								
2012	CW	GO	Aparecida de Goiânia	30.48		121.39	27.170 < LC < 34.189		103.054 < LC < 143.000	F0	29	0.4631	0.825	0.207	0.362	0.463
			São Miguel do Araguaia	36.51		104.87	34.262 < LC < 38.901		95.793 < LC < 114.810	F0	29	0.293	0.586	0.414	0.293	0.293

* RRao is informed.

Alleles S, R1 and R2 refer to the positions 1016 and 1534 of the gene coding for the voltage gated sodium channel (Nav) as follows: S = 1016 Val+ / 1534 Phe+ ; R1 = 1016 Val+ / 1534 Cyskdr ; R2 = 1016 Ilekdr / 1534 Cyskdr.

Table S4: details of the of the enzymatic activity quantification in Brazilian *Aedes aegypti* larvae populations. Colors as in Table 3 and 4.

year	Region	State	Municipality/strain	generation	ACE (Abs/hour/ptn mg)				MFO (nmoles cit/ptn mg)				GST (mmol/min/ptn mg)				α-Est (nmol/ptn mg/min)				β-Est (nmol/ptn mg/min)				ρ npa-Est (D Abs/min/ptn mg)			
					n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock
2010	NE	RN	Rockefeller		256	0.04	0.14		268	40.88	78.41		265	0.38	1.10		268	17.06	62.02		268	29.65	82.75		249	3.02	5.46	
			Caicó	F2	83	0.03		0	83	38.50		4	83	0.78		19	55	22.41		0	55	30.05		0	54	2.62		0
2011	N	PA	Rockefeller		179	0.05	0.09		172	35.57	67.48		153	0.47	0.94		178	13.67	22.24		163	19.56	31.19		173	2.47	4.19	
			Pacaraima	F2	80	0.06		6	79	34.56		1	78	0.57		21	80	12.09		0	80	21.66		14	77	1.99		3
			Castanhal	F2	80	0.04		0	80	65.12		48	80	0.76		34	80	15.33		3	80	27.69		29	80	5.29		75
	CO	GO	Campos Belos	F2	79	0.05		1	79	26.32		15	77	0.50		9	79	13.73		1	79	22.46		5	72	1.86		0
			Goiânia	F2	80	0.06		3	80	40.18		6	80	0.93		49	80	16.39		5	80	28.38		34	80	3.75		36
			Rio Verde	F2	81	0.05		1	81	25.63		0	81	0.75		40	81	18.68		19	81	29.54		38	78	2.41		8
2012	CO	GO	São Simão	F2	78	0.06		1	80	36.84		4	80	0.67		40	79	18.98		35	80	27.41		33	77	3.47		32
			Aparecida de Goiânia	F1	80	0.06		5	80	53.97		31	80	1.28		85	80	16.05		8	80	31.91		54	80	4.40		63
			São Miguel do Araguaia	F1	80	0.04		0	80	30.76		0	80	0.73		20	80	19.41		28	80	26.44		21	80	4.58		59

The Rockefeller values used to calibrate each group of assays are shown above the municipalities. (n) Number of specimens evaluated. (med) Median of each enzymatic activity. (p99 Rock) 99 percentil for Rockefeller strain. (%>p99Rock) Rate of the population with activity higher than the Rockefeller 99 percentil.

Table S5: details of the of the enzymatic activity quantification in Brazilian *Aedes aegypti* adult populations. Colors as in Table 3 and 4.

year	Region	State	Municipality/strain	generation	ACE (Abs/hour/ptn mg)				MFO (nmoles cit/ptn mg)				GST (mmol/min/ptn mg)				α-Est (nmol/ptn mg/min)				β-Est (nmol/ptn mg/min)				ρ npa-Est (D Abs/min/ptn mg)			
					n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n ¹	med ²	p99 Rock ³	% > p99 Rock ⁴	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock
2010	NE	RN	Rockefeller		132	0.08	0.12		122	23.89	44.02		124	0.95	1.45		129	4.77	6.32		131	5.96	9.00		98	3.24	6.42	
			Caicó	F2	71	0.08		3	96	26.41		0	93	1.13		11	100	6.62		63	109	5.70		22	97	3.30		6
2011	N	RR	Rockefeller		155	0.12	0.22		137	28.05	44.97		100	0.66	1.07		154	5.49	7.58		153	6.33	10.77		83	3.20	6.39	
			Pacaraima	F2	80	0.17		0	77	38.59		17	60	1.00		40	80	7.52		48	80	8.61		13	65	4.26		2
	SE	ES	Cachoeiro de Itapemirim		80	0.12		0	79	54.8		80	1.60		98	79	8.12		67	80	7.43		3	73	7.71		70	
			Campos Belos	F2	80	0.15		0	80	28.64		8	78	1.22		65	80	6.45		14	80	6.25		1	64	4.58		6
	CO	GO	Goiânia	F2	80	0.16		0	78	70.3		99	79	1.25		78	80	7.90		55	80	7.72		5	78	6.23		38
			Rio Verde	F2	80	0.18		13	78	48.27		74	45	0.64		4	80	8.98		81	79	7.85		8	75	3.76		13
São Simão			F2	80	0.18		21	78	30.98		9	54	1.12		59	80	8.03		58	80	6.98		14	67	5.04		15	
2012	CO	GO	Aparecida de Goiânia	F1	80	0.13		1	77	63.42		57	68	1.58		94	80	8.54		70	80	8.12		10	79	7.40		73
			São Miguel do Araguaia	F1	80	0.18		4	78	62.41		97	52	0.78		8	80	7.50		46	79	6.55		0	79	4.80		8

The Rockefeller values used to calibrate each group of assays are shown above the municipalities. (n) Number of specimens evaluated. (med) Median of each enzymatic activity. (p99 Rock) 99 percentil for Rockefeller strain. (%>p99Rock) Rate of the population with activity higher than the Rockefeller 99 percentil.

3.3 CAPÍTULO 3 - Perfis de resistência a inseticidas e de incidência de dengue

Neste capítulo apresentamos, de forma preliminar, as análises realizadas com os registros gerados pelo Laficave, no período de 2001 a 2012, em suas atividades na Rede MoReNAa. Comparamos os perfis de resistência obtidos nas populações de *A. aegypti* com a incidência de casos de dengue, nas diferentes regiões do país, de forma a identificar relação com epidemias e com eventual exacerbação do uso doméstico de inseticidas, além dos mecanismos da resistência envolvidos.

Os modelos estatísticos de regressão são utilizados quando se deseja estudar a relação entre um desfecho (variável dependente ou resposta) e um conjunto de potenciais fatores de risco (variáveis independentes, preditoras ou explicativas).

Adotamos a regressão de Poisson, que avalia a probabilidade de um determinado evento ocorrer um número de vezes em um intervalo de tempo bem definido, e que tem por característica a análise de dados de contagem (McCullagh & Nelder 1989). O objetivo é analisar o comportamento, em função das variáveis preditoras (X), de uma determinada variável dependente (Y) que se apresenta na forma quantitativa, porém com valores discretos e não negativos. Neste ensaio específico, procuramos investigar se as taxas de incidência de dengue poderiam ser, em alguma medida, associadas com as variações do *status* de resistência das populações de *A. aegypti*.

Os modelos de regressão de Poisson geralmente são utilizados em estudos longitudinais, onde o resultado é uma contagem de um desfecho ao longo do tempo. Utilizamos como exemplo o risco de uma pessoa exposta a uma determinada concentração de poluente adquirir uma doença específica ser (j) vezes maior que uma pessoa que não foi exposta a esta concentração. A probabilidade de risco igual a cinco para uma concentração de poluente de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, por exemplo, indica que uma pessoa exposta a uma concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ possui cinco vezes mais chance de adquirir uma doença que uma pessoa que não foi exposta a essa concentração.

A regressão logística trabalha com a razão de chances de um evento binário - ou seja, o evento pode ocorrer ($P(i)$) ou não ($1 - P(i)$). A razão de chances é definida pelo quociente entre a probabilidade de ocorrência pela probabilidade de não-ocorrência do evento. Adotamos a regressão logística com o objetivo de mostrar a razão potencial entre o *status* de resistência das populações de *A. aegypti* aos inseticidas e os mecanismos potencialmente envolvidos.

Por exemplo, em um determinado estudo buscou-se identificar o risco de crédito relacionado à inadimplência dependendo do estado civil do empreendedor. Os autores identificaram que dentre as variáveis avaliadas, as que reduzem o risco de inadimplência são o estado civil 1 (representado por viúvos, separados e divorciados) e 2 (solteiros). Ambas apresentaram valores de

$\exp(\beta)$ abaixo de um, indicando que diminuem as chances de ocorrer a inadimplência (Ritta et al. 2015).

Como a resistência a inseticidas de cada população de *A. aegypti* pode depender de múltiplos mecanismos, utilizamos a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês “*Principal Components Analysis*”) para identificar possíveis grupos de mecanismos que podem estar associados por componentes, investigando a dinâmica da resistência no país levando em conta as particularidades regionais.

A PCA é um método utilizado para consolidar as variáveis mutuamente correlacionadas de dados observados multidimensionais em novas variáveis. Por exemplo, se um determinado mecanismo de resistência se intensifica e, simultaneamente, outra medida também aumenta, assume-se que estas variáveis estejam correlacionadas. Neste caso, bastaria reduzir as duas variáveis iniciais a um só componente, composto por ambas - com parte majoritária de uma variável (a que melhor explica a variação dos dados) e parte da outra. Para duas variáveis, isto pode ser trivial, mas para grande quantidade de variáveis, isto pode permitir construir novas variáveis que são composições de múltiplas variáveis utilizadas. Uma das mais importantes características dos componentes é que, como todas as variáveis são altamente relacionadas entre si, os novos componentes são completamente não correlacionados, ou seja, são ortogonais. Esta técnica pode ser usada para a compreensão visual de estruturas de dados, consolidando dados de alta dimensão em um número menor de variáveis, reduzindo a dimensão (compactação dimensional) e projetando os resultados em uma reta unidimensional, plano bidimensional, espaço ortodimensional; ou seja, é uma técnica que redistribui a variação observada nos eixos originais de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados (Manly 1986; Konishi 2014). Por exemplo, um conjunto de 30 variáveis que tenham sido investigadas em 80 amostras pode ser reduzido a um conjunto de 5 ou menos componentes, para as mesmas 80 amostras. O ideal é que uma PCA retome entre 70-80% da variação nos três primeiros componentes.

Na Figura 15 apresentamos um exemplo de gráfico obtido a partir da análise PCA e como realizar a leitura do mesmo. Os eixos representados por Dim1 e Dim2 são os componentes principais (PC); também chamados de 'dimensões', se cruzam no ponto zero, ou centróide, da PCA. Cada seta, ou vetor, corresponde a uma variável. Os vetores são representados no gráfico pelo impacto das variáveis em cada PC ou dimensão. Por exemplo, a variável 'a' é majoritariamente representada no PC1 e a variável 'b' majoritariamente no PC2. Também podemos inferir que estas variáveis, 'a' e 'b', não são relacionadas entre si. A variável 'c', por outro lado, tem influência dos dois PC. A variável 'd' é melhor representada pelo PC2. As variáveis representadas por 'e' e 'f' aparecem dispostas muito próximas, ou seja, apenas com um pequeno ângulo de diferença entre elas; logo, inferimos que são altamente correlacionadas. Além disso, 'e' e 'f' são melhor representadas pelo PC1 (os ângulos que

formam com este componente são menores, quando comparados com os que formam com o PC2). As variáveis 'e', 'f' não são correlacionadas à variável 'd', que está melhor relacionada ao PC2. No gráfico, o tamanho da seta indica a abundância da variável na amostra original, ou seja, o quanto aquela variável está representada na amostra. Por exemplo, embora as variáveis 'g' e 'h' sejam altamente correlacionadas entre si, 'g' contribui mais nos PCs 1 e 2 do que 'h'. Alternativa, ou aditivamente, a variável 'g' está mais contemplada na amostra do que 'h', ou seja, há maior quantidade de valores para 'g' do que para 'h'. Em relação a este último aspecto, vale lembrar que variações nos vetores 'maiores', isto é, representados por um conjunto maior de valores, tendem a ser menos evidentes, justamente porque são 'compreendidas' por tal conjunto de valores. Neste caso diz-se que variações nos maiores vetores ocorrem de forma gradual, enquanto as mudanças nos menores vetores são mais rápidas.

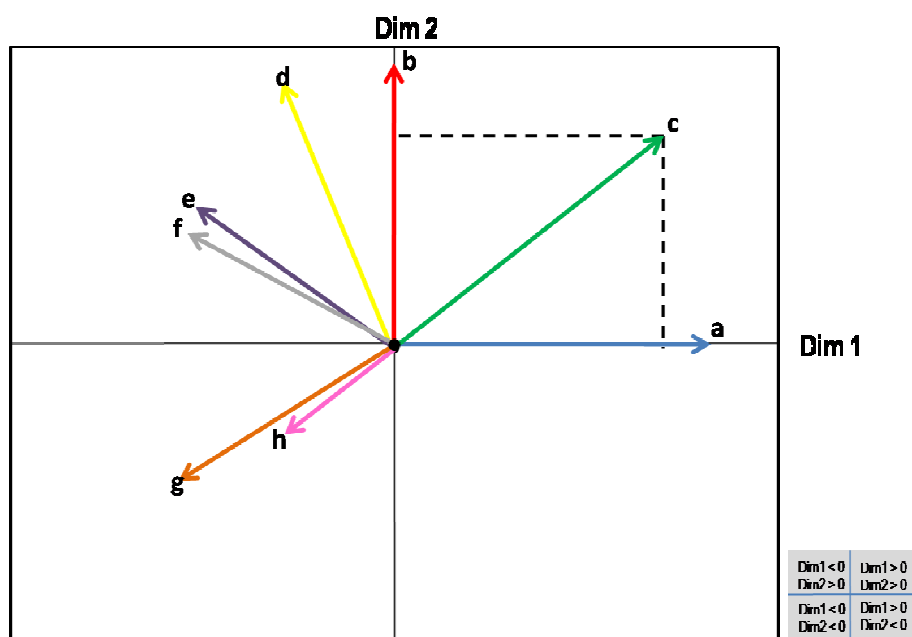


Figura 15: Representação gráfica de uma PCA. As variáveis são representadas pelas letras a-h e os componentes principais por Dim 1 e 2. (Figura elaborada pelo autor).

Como exemplo da aplicação da PCA, citamos o trabalho de Almeida *et al.* (2014) que realizaram comparações morfométricas das micrografias eletrônicas de varredura em ovos de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* (Root, 1926) coletados em nove estados, contemplando as cinco regiões brasileiras. Os autores utilizaram a PCA para avaliar a associação entre algumas variáveis, como: número de discos na micrópila (ND); número de turbéculos mensurados em uma área de 300 μm (NT) e o número de nervuras dos flutuadores (NR). Como observado na Figura 16, as três variáveis parecem independentes; em particular a quantidade de nervuras do flutuador está representada quase que exclusivamente no PC1, confirmando que este foi o atributo cujas variações se mostraram mais relevantes para o estudo.

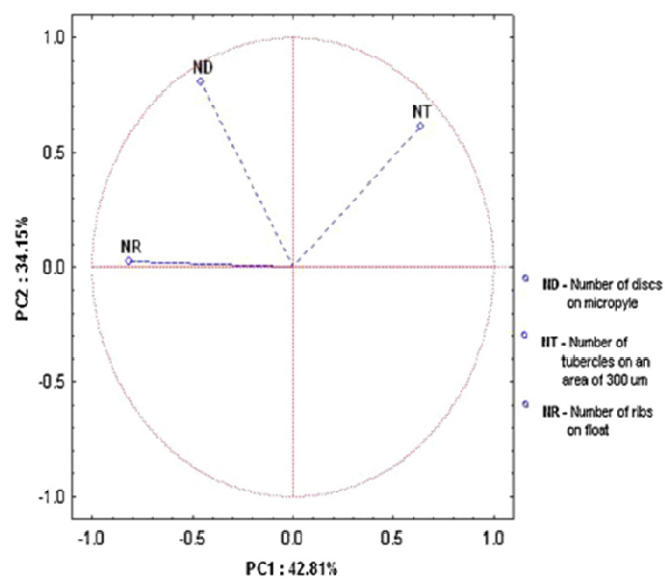


Figura 16: Representação gráfica das três variáveis e suas distribuições nos PC1 e PC2. (Figura adaptada de Almeida *et al.* 2014).

3.3.1 Materiais e Métodos

3.3.1.1 Coleta e análise dos dados

Adotamos os dados produzidos pelo Laficave no âmbito da Rede MoReNAa, no período de 2001 a 2012. Utilizamos os registros das razões de resistência (RR) 50, 90 e 95 para os inseticidas temephos e deltametrina; o percentual de mortalidade após 24 horas de exposição à deltametrina para os bioensaios qualitativos com adultos; o percentual de indivíduos com atividade acima do percentil 99 de Rockefeller para as enzimas MFO, GST, AChE e Esterases (' α -EST', ' β -EST' e ' ρ NPA-EST'), a frequência dos indivíduos homocigotos selvagens (alelo S) para as mutações do gene NaV e a taxa de incidência de casos de dengue. Todos os dados foram conferidos, verificados e validados para compor o banco de dados, etapa fundamental e essencial para garantir sua confiabilidade (Hair et al. 2005; capítulo 1 desta dissertação).

3.3.1.2 Métodos estatísticos

3.3.1.2.1 Regressão de Poisson

Com o objetivo de identificar a relação potencial entre os níveis de resistência de *A. aegypti* a inseticidas e a incidência de dengue para cada município, foi adotado o modelo de regressão de Poisson. Foram testadas as variáveis independentes: RR 50, 80, 90 e 95 de temephos e diflubenzuron para as larvas e de deltametrina para os adultos; a porcentagem da mortalidade de adultos após 24 horas de exposição a deltametrina, metodologias 'CDC' e WHO'. A taxa de incidência de dengue foi adotada como variável dependente.

3.3.1.2.2 Regressão logística

Para identificar a participação dos mecanismos de resistência em relação aos níveis de resistência aos inseticidas nas populações de *A. aegypti* utilizamos o modelo de regressão logística. As RR para temephos e deltametrina foram adotadas como variáveis independentes. As variáveis dependentes avaliadas foram: percentual de indivíduos com atividade acima do percentil 99 de Rockefeller para as enzimas MFO, GST, AChE, α -EST, β -EST e ρ NPA-EST; avaliação global da variação das atividades enzimáticas (GAB), medida secundária de cada população avaliada, correspondente à média das alterações das atividades de todas as enzimas, e frequência do alelo *Nav* suscetível (*NavS*), alvo de piretroides.

3.3.1.2.3 PCA

Avaliamos a potencial relação entre os níveis de resistência e os mecanismos de resistência envolvidos de 48 populações brasileiras de *A. aegypti*, por meio da análise de componentes principais (PCA). As variáveis utilizadas e seus respectivos 'nomes' foram os seguintes: resistência de larvas a temephos ('RR50_temephos', 'RR80_temephos', 'RR90_temephos' e 'RR95_temephos'); resistência de larvas ao diflubenzuron ('RR50_diflubenzuron' e 'RR95_diflubenzuron'); resistência de adultos a deltametrina ('RR50_deltametrina', 'RR80_deltametrina', 'RR90_deltametrina' e 'RR95_deltametrina'); percentual de adultos sobreviventes após 24 horas de exposição a deltametrina ('GARRAFA_deltametrina' e 'PAPEL_deltametrina'); percentual de adultos sobreviventes após 24 horas de exposição a cipermetrina ('GARRAFA_cipermetrina'); a frequência do alelo *Nav* suscetível (S_alelo_Nav); atividade do alvo de organofosforados em larvas e adultos ('AChE_larva', 'AChE_adulto'); enzimas detoxificantes em larvas ('ALFA_larva', 'BETA_larva', 'GST_larva', 'MFO_larva' e 'PNPA_larva'); enzimas detoxificantes em adultos ('ALFA_adulto', 'BETA_adulto', 'GST_adulto', 'MFO_adulto', 'PNPA_adulto') e conjunto das variações das atividades enzimáticas em larvas e adultos ('GAB_larva' e 'GAB_adulto').

3.3.1.2.4 Pacotes computacionais

As análises de regressão de Poisson, regressão logística e PCA foram realizadas usando o software R, versão 3.2.2. Utilizamos os seguintes pacotes: para os gráficos da regressão - ggplot2 (versão 2.21) e os ajustes do modelo com lm.fit e glm.fit - stats (versão 3.4.0), rq.fit - quantreg (versão 5.33), e para a PCA - FactoMineR (versão 1.36). Consideramos significativos os valores de '*p*' inferiores a 0,001.

3.3.2 Resultados

Os dados referentes a incidência de dengue, razões de resistência e potenciais mecanismos envolvidos foram apresentados nos capítulos 1 e 2 desta dissertação. Vale ressaltar que os resultados do presente capítulo referem-se aos registros de 48 municípios brasileiros, todos monitorados apenas pelo Laficave.

3.3.2.1 Modelos de regressão

A interpretação dos coeficientes estimados para preditores categóricos é relativa ao nível de referência do preditor. Um coeficiente estimado próximo de zero indica que o efeito do preditor é pequeno ou inexistente. A força da relação entre duas variáveis é medida pela inclinação da reta ou pelo coeficiente β . O significado do coeficiente α é explicado em cada regressão, ele é representado pelo valor da função natural exponencial (\exp ou e) de β . A interpretação dos resultados levou em consideração o valor obtido para o coeficiente α . Logo, se $\beta_1 > 0 \rightarrow \alpha = e^{\beta_1} > 1 \rightarrow$ efeito crescente, caso o valor de $\beta_1 < 0 \rightarrow \alpha = e^{\beta_1} < 1 \rightarrow$ efeito decrescente. Apresentamos os valores do intervalo de confiança do coeficiente α , calculados por interpolação, por padrão 2,5% e 97,5%.

3.3.2.1.1 regressão de Poisson - resistência a inseticidas x incidência de dengue

Na regressão de Poisson o coeficiente α representa a probabilidade de um evento ocorrer em um intervalo de tempo, nesta regressão ocorre uma transformação “log”, o que garante que os valores ajustados permaneçam no intervalo $[0, \infty]$. Pelo modelo de regressão de Poisson, as análises realizadas para investigar a potencial relação entre RR e a taxa de incidência de dengue foram significativas ($p < 0,001$) para praticamente todas as variáveis testadas referentes aos bioensaios (Tabela 41).

Também tentamos verificar a existência de associação entre as metodologias ‘CDC’ (garrafa impregnada) e ‘WHO’ (papel impregnado), mas não encontramos qualquer efeito significativo ($p = 0,321$).

Tabela 41: Relação entre as Razões de Resistência (RR) e, no caso dos ensaios qualitativos, dos percentuais de mortalidade após exposição a deltametrina, e a incidência de dengue - obtida pela regressão de Poisson.

variável	coeficiente (β_1)	coeficiente (α)	intervalo de confiança (α)	p-value
RR50 temephos	0,011918	1,011990	(1,018728 – 1,019996)	< 0,001
RR80 temephos	- 0,019004	0,998101	(0,979550 – 0,982797)	< 0,001
RR90 temephos	0,017873	1,018034	(1,017550 – 1,018511)	< 0,001
RR95 temephos	0,020306	1,020514	(1,020059 – 1,020963)	< 0,001
RR50 diflubenzuron	- 2,001380	0,135148	(0,128131 – 0,142554)	< 0,001
RR95 diflubenzuron	2,878680	17,790770	(16,549340 – 19,125470)	< 0,001
RR50 deltametrina	0,008262	1,008297	(1,007919 – 1,008674)	< 0,001
RR80 deltametrina	0,000483	1,000484	(1,000097 – 1,000867)	0,0138
RR90 deltametrina	0,006627	1,006650	(1,006445 – 1,006853)	< 0,001
RR95 deltametrina	0,004984	1,004997	(1,004557 – 1,005437)	< 0,001
mortalidade 24 h 'CDC'	0,001546	1,001547	(0,976291 - 1,006554)	< 0,001
mortalidade 24 h 'WHO'	- 0,020485	0,979722	(0,975243 - 1,001945)	< 0,001

Gráficos com comparações entre as médias das RR para os inseticidas temephos e deltametrina e as médias das taxas de incidência de dengue no período avaliado estão apresentados nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

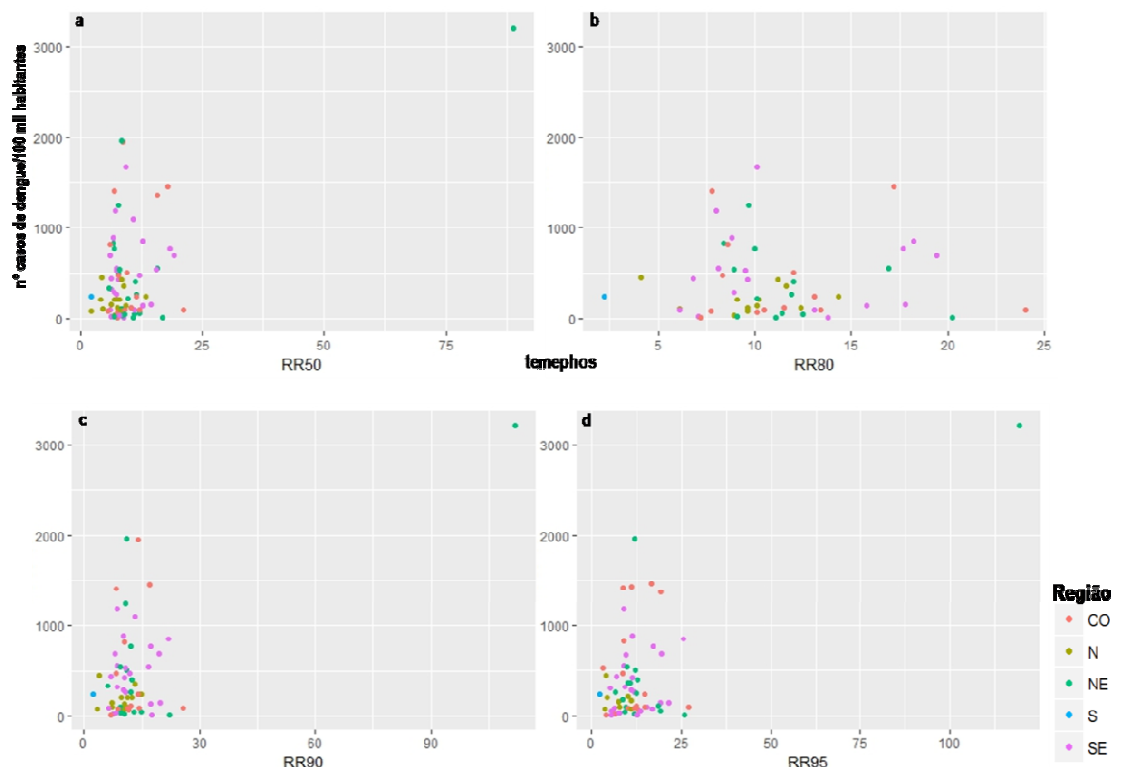


Figura 17: Representação gráfica da relação entre as médias das razões de resistência de larvas ao temephos e das taxas de incidência de dengue. Os painéis a, b, c, d mostram respectivamente as RR 50, 80, 90 e 95 para temephos. O Ministério da Saúde considera que taxas de incidência de dengue superiores a 300 casos/100.000 habitantes são indicativas de epidemia.

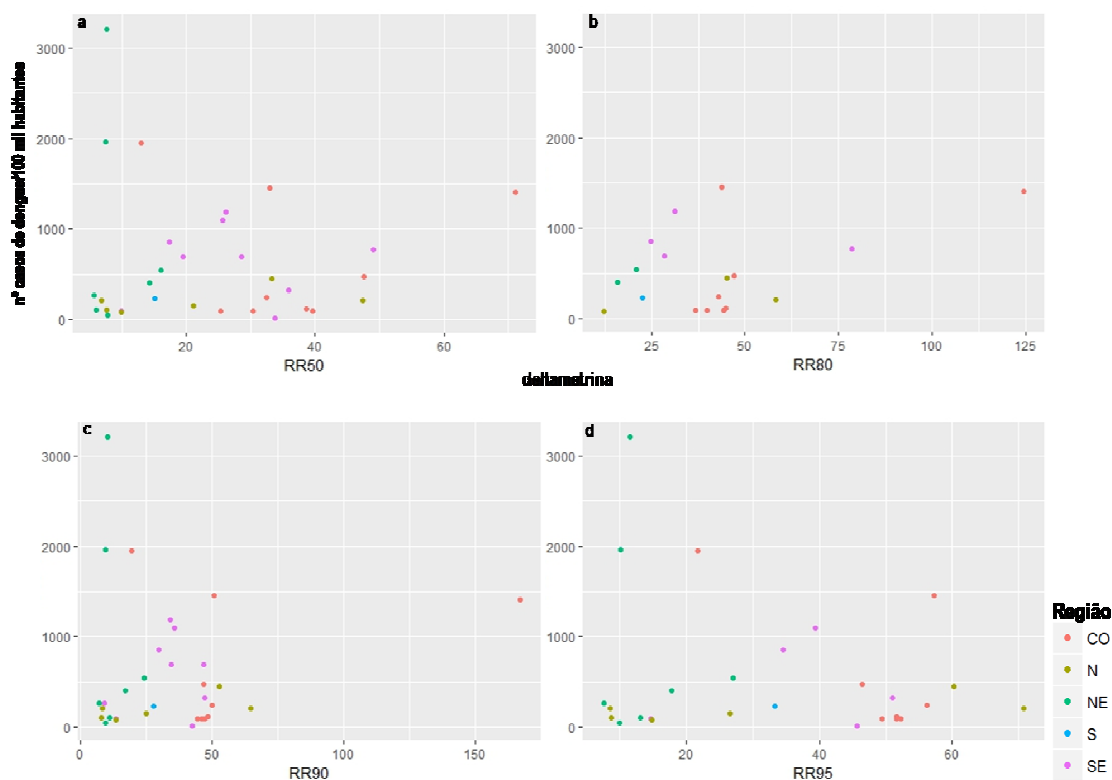


Figura 18: Representação gráfica da relação entre as médias das razões de resistência de adultos a deltametrina e das taxas de incidência de dengue. Os painéis a, b, c, d mostram respectivamente as RR 50, 80, 90 e 95 para deltametrina.

3.3.2.1.2 regressão logística - resistência a inseticidas x mecanismos de resistência

Na regressão logística o coeficiente α representa o impacto da variável independente sobre a razão de chance de um evento ocorrer ou estar associado. A transformação *logit* da probabilidade simplifica o modelo logístico para uma combinação linear das variáveis independentes.

A regressão logística realizada para determinar se houve impacto das alterações mensuráveis de cada classe individual de enzimas estudadas e a RR para temephos não foi significativa (Tabela 42). A única exceção foi a RR80, mas o significado funcional deste resultado deve ser avaliado com cautela (ver Discussão). Também não encontramos participação significativa de ACE na resistência ao temephos nas populações brasileiras de *A. aegypti* avaliadas.

Tabela 42: Relação entre as RR para temephos e as enzimas quantificadas por 'ensaios bioquímicos', o sítio alvo de organofosforados (AChE) e enzimas detoxificantes, em larvas de *A. aegypti*. Coeficientes obtidos por regressão logística.

variável	coeficiente (β_1)	coeficiente (α)	intervalo de confiança (α)	p-value
GST x RR50 tem	0,007346	1,00737	(1,002073 - 1,012516)	0,00534
GST x RR80 tem	0,060290	1,062145	(1,035948 - 1,089169)	< 0,001
GST x RR90 tem	0,003824	1,003831	(0,999459 - 1,008018)	0,0778
GST x RR95 tem	0,002444	1,002447	(0,998308 - 1,064116)	0,235
ALFA x RR50 tem	- 0,001132	0,988743	(0,992058 - 1,005078)	0,732
ALFA x RR80 tem	0,108050	1,114103	(1,083107 - 1,146285)	< 0,001
ALFA x RR90 tem	0,002806	1,002810	(0,997914 - 1,007374)	0,242
ALFA x RR95 tem	0,003906	1,003914	(0,998855 - 1,008563)	0,112
BETA x RR50 tem	- 0,004459	0,995550	(0,989227 - 1,001390)	0,151
BETA x RR80 tem	0,082880	1,086411	(1,059689 - 1,114227)	< 0,001
BETA x RR90 tem	- 0,002009	0,997993	(0,993141 - 1,002507)	0,399
BETA x RR95 tem	- 0,002665	0,997338	(0,992439 - 1,001834)	0,265
PNPA x RR50 tem	0,004705	1,004761	(0,998922 - 1,010201)	0,0992
PNPA x RR80 tem	0,132730	1,141942	(1,111592 - 1,173957)	< 0,001
PNPA x RR90 tem	0,001952	1,001954	(0,997125 - 1,006467)	0,41
PNPA x RR95 tem	0,001166	1,001167	(0,996619 - 1,005421)	0,602
MFO x RR50 tem	- 0,016484	0,983651	(0,970703 - 0,993991)	0,00574
MFO x RR80 tem	0,001014	0,998986	(0,969838 - 1,032559)	0,949
MFO x RR90 tem	- 0,013364	0,986724	(0,976144 - 0,995094)	0,00571
MFO x RR95 tem	- 0,014019	0,986078	(0,974420 - 0,994915)	0,0071
AChE x RR50 tem	- 0,006294	0,993725	(0,976291 - 1,006554)	0,406
AChE x RR80 tem	0,027210	1,027584	(0,983148 - 1,072395)	0,219
AChE x RR90 tem	- 0,008051	0,991981	(0,975757 - 1,003338)	0,242
AChE x RR95 tem	- 0,009000	0,991040	(0,975243 - 1,001945)	0,176

Também tentamos relacionar o possível efeito da RR e a avaliação global da variação das atividades enzimáticas das larvas (GAB). No entanto, não encontramos significância entre as variáveis, ou seja a comparação com o conjunto das enzimas, a exemplo dos resultados relativos a cada classe individual, também não identificou correlação com a RR para temephos (Tabela 43 - RR temephos x GAB larvas).

Tabela 43: Regressão logística - investigação de relação entre as RR a temephos e a avaliação global das variações das atividades enzimáticas quantificadas (GAB) em larvas de *A. aegypti*.

variável	coeficiente (β_1)	coeficiente (α)	intervalo de confiança (α)	p-value
RR50 temephos	- 0,001047	0,998953	(0,992188 - 1,005130)	0,75
RR90 temephos	- 0,001076	0,998924	(0,993470 - 1,003883)	0,684
RR95 temephos	- 0,001671	0,998330	(0,992980 - 1,003158)	0,518

Em oposição aos resultados obtidos para a relação entre resistência a temephos e resistência metabólica, a regressão logística do impacto das alterações enzimáticas associadas com a resistência a deltametrina foi significativa para todas as enzimas, em relação a pelo menos dois valores de RR (Tabela 44). A única exceção foi a acetilcolinesterase, alvo de organofosforados; no entanto, mais uma vez a RR80 apresentou resultado discrepante, o que será discutido posteriormente.

Tabela 44: Regressão logística - verificação de relação entre as RR para deltametrina e as enzimas quantificadas em adultos de *A. aegypti*: detoxificantes e acetilcolinesterase.

variável	coeficiente (β_1)	coeficiente (α)	intervalo de confiança (α)	p-value
GST x RR50 delta	0,016760	1,016901	(1,011069 – 1,022792)	< 0,001
GST x RR80 delta	0,060337	1,062194	(1,050885 – 1,074397)	< 0,001
GST x RR90 delta	0,000954	1,000954	(0,996269 – 1,005565)	0,70232
GST x RR95 delta	0,007080	1,007105	(1,002678 – 1,011563)	0,00165
ALFA x RR50 delta	- 0,023313	0,976956	(0,971253 – 0,982650)	< 0,001
ALFA x RR80 delta	- 0,043072	0,957842	(0,948105 – 0,967206)	< 0,001
ALFA x RR90 delta	- 0,017443	0,982708	(0,978100 – 0,987314)	< 0,001
ALFA x RR95 delta	- 0,023971	0,976314	(0,971870 – 0,980740)	< 0,001
BETA x RR50 delta	- 0,045424	0,955596	(0,947858 – 0,963195)	< 0,001
BETA x RR80 delta	- 0,369600	0,691010	(0,949140 – 0,977899)	< 0,001
BETA x RR90 delta	- 0,0329390	0,967597	(0,961735 – 0,973389)	< 0,001
BETA x RR95 delta	- 0,036273	0,964377	(0,958597 – 0,970045)	< 0,001
PNPA x RR50 delta	0,040456	1,041285	(1,034962 – 1,047724)	< 0,001
PNPA x RR80 delta	0,033483	1,034050	(1,024951 – 1,043631)	< 0,001
PNPA x RR90 delta	0,020115	1,020319	(1,015384 – 1,025309)	< 0,001
PNPA x RR95 delta	0,017747	1,017905	(1,013312 – 1,022549)	< 0,001
MFO x RR50 delta	- 0,026616	0,973735	(0,963739 - 0,983548)	< 0,001
MFO x RR80 delta	- 0,085811	0,917767	(0,899903 - 0,935217)	< 0,001
MFO x RR90 delta	-0,023260	0,977008	(0,969254 - 0,984648)	< 0,001
MFO x RR95 delta	- 0,028330	0,972067	(0,964451 - 0,979474)	< 0,001
AChE x RR50 delta	0,001217	1,001218	(0,990315 - 1,012077)	0,826
AChE x RR80 delta	- 0,106580	0,898903	(0,882918 - 0,914482)	< 0,001
AChE x RR90 delta	0,009711	1,009758	(1,001059 - 1,018602)	0,0282
AChE x RR95 delta	0,010897	1,010957	(1,003141 - 1,018882)	0,00601

A potencial correlação entre RR e GAB nos adultos também foi avaliada; no entanto, no caso de deltametrina, os resultados significativos que haviam sido obtidos com classes individuais de enzimas não foram confirmados por esta análise (Tabela 45).

Tabela 45: Regressão logística - investigação de relação entre as Razões de Resistência a deltametrina e a avaliação global das variações das atividades enzimáticas quantificadas (GAB) em adultos de *A. aegypti*.

variável	coeficiente (β_1)	coeficiente (α)	intervalo de confiança (α)	p-value
RR50 deltametrina	- 0,000792	0,999207	(0,992979 - 1,005449)	0,803
RR90 deltametrina	- 0,004689	0,995322	(0,990273 - 1,000386)	0,0704
RR95 deltametrina	- 0,005469	0,994545	(0,989805 - 0,999292)	0,0246

Análise por regressão logística encontrou relação entre as RR para deltametrina e alterações de seus sítios-alvo, o N_{AV} (Tabela 46). Como esperado, encontramos relação inversamente proporcional

entre a RR para deltametrina e a frequência do alelo suscetível, como mostram as tendências dos pontos representados na Figura 19a-d.

Tabela 46: Regressão logística - investigação de relação entre as RR para deltametrina e a frequência do alelo *NavS* em adultos de *A. aegypti*.

variável	coeficiente (β_1)	coeficiente (α)	intervalo de confiança (α)	p-value
RR50 deltametrina	- 0,027202	0,973164	(0,967578 - 0,978658)	< 0,001
RR80 deltametrina	- 0,019880	0,998014	(0,994011 - 1,001933)	0,326
RR90 deltametrina	- 0,009301	0,990742	(0,987646 - 0,993687)	< 0,001
RR95 deltametrina	- 0,032853	0,967680	(0,962743 - 0,972566)	< 0,001

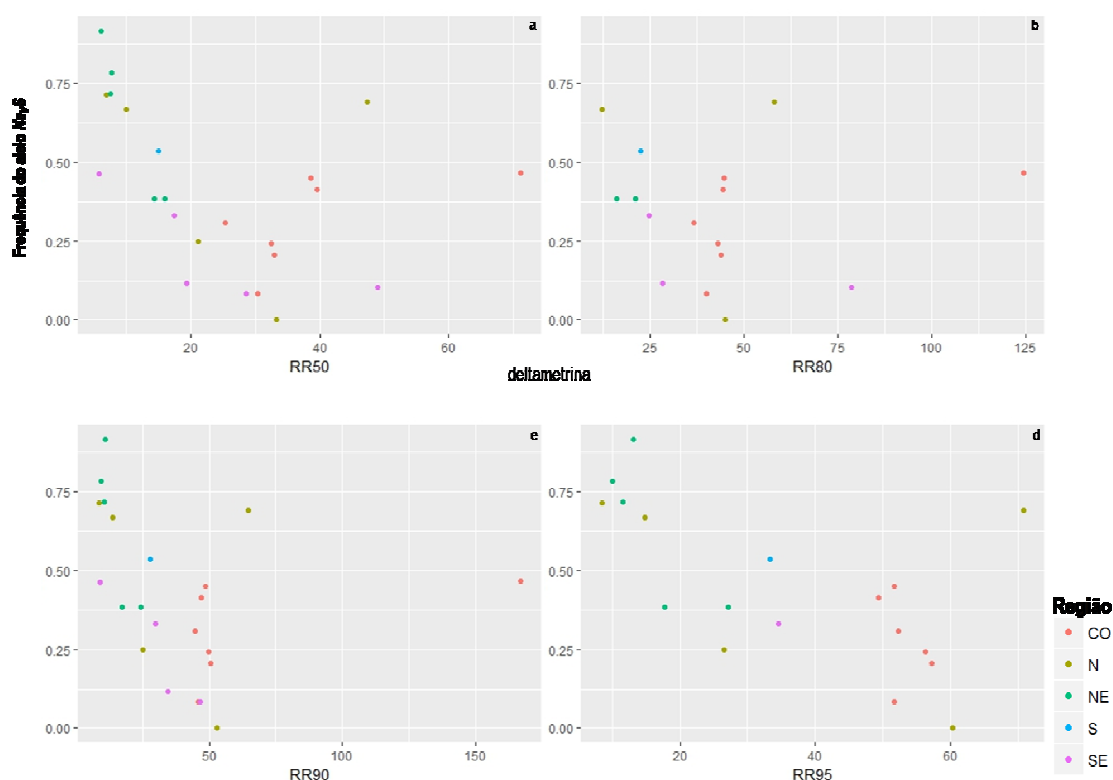


Figura 19: Representação gráfica da relação entre a frequência do alelo *NavS* suscetível (*NavS*) e as razões de resistência de adultos a deltametrina.

3.3.2.2 PCA

Na tentativa de compreender o perfil da contribuição das variáveis na resistência, decomposemos os dados da PCA por estágio: foram avaliadas 12 variáveis relacionadas com a resistência em larvas e 15 variáveis relacionadas aos adultos.

Para as larvas, os dois primeiros componentes principais explicam 70,26% da variação total dos dados (Figura 20). Identificamos a participação da α -EST, enzima relacionada com a resistência em OP, no PC1 ou dimensão 1, aparecendo correlacionada positivamente com a RR50 para temephos.

ACE, alvo dos OP, não está relacionada com as variáveis RR temephos. As variáveis EST (beta e pnpa) e GST relacionadas à resposta metabólica estão melhor representadas pelo PC1, e não apresentaram associação com as variáveis RR temephos. As RR90 e 95 estão relacionadas entre si e são melhor compreendidas pela PC2.

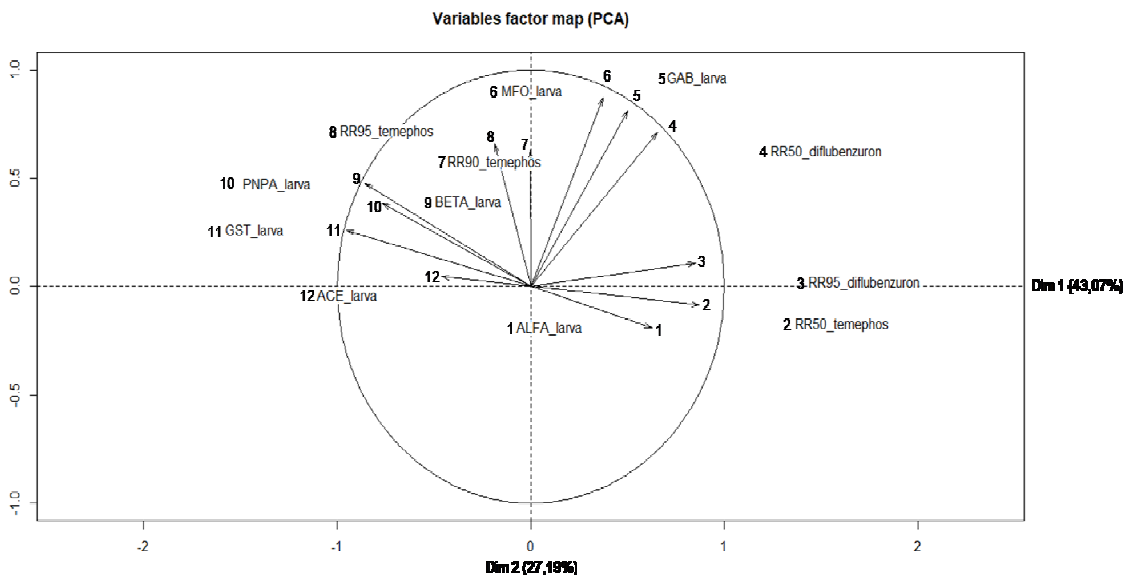


Figura 20: Representação gráfica das 12 variáveis relacionadas à resistência em larvas de *A. aegypti* e suas distribuições nos PC1 e PC2.

Tentamos identificar o impacto das variáveis nas populações e se existe tendência de uma maior participação de um determinado PC por região (Figura 21). De maneira geral, os municípios foram melhor representados pelas variáveis relacionadas ao PC1, tanto de forma positiva ou negativa da contribuição das variáveis.

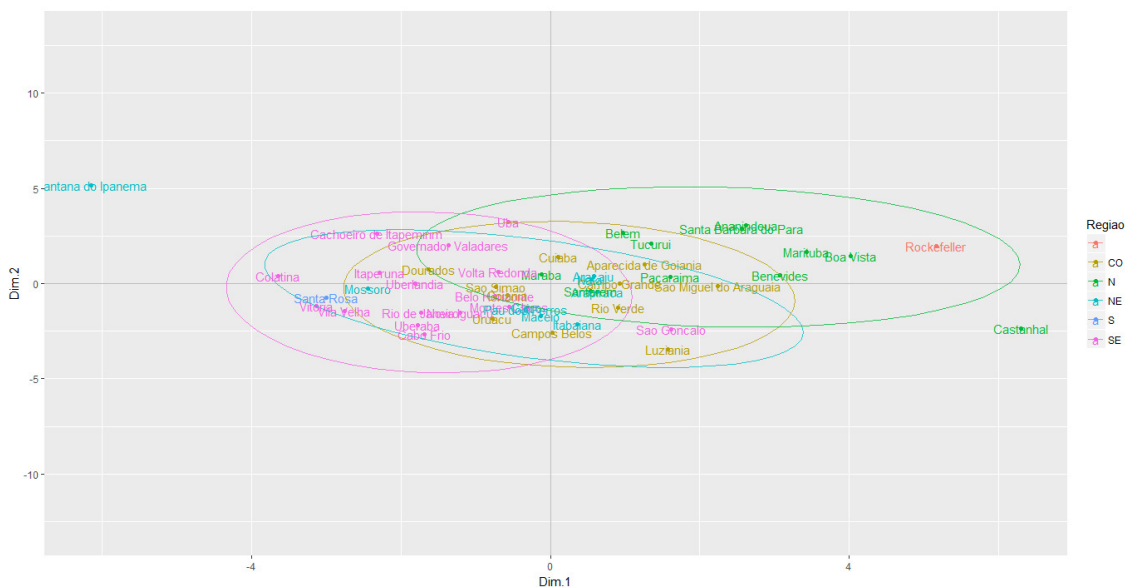


Figura 21: Mapa dos fatores individuais, larvas - representação da contribuição individual das variáveis por município. Agrupamos os municípios e as regiões de origem por elipses.

Para os adultos os dois primeiros PC da PCA retomaram 62,18% da informação inicial (Figura 22). Identificamos um maior impacto positivo das RR50 e 95 de deltametrina na dimensão 1. Com relação aos mecanismos de resistência, as enzimas mais comumente associadas a resistência aos piretroides, GST e pNPA-EST, estão discriminados na segunda dimensão de forma positiva. A frequência do alelo *Na_vS* foi correlacionada inversamente em relação a RR50 e 95 de deltametrina. As variáveis RR80 de deltametrina e GAB adultos estão melhor compreendidas pelo PC2.

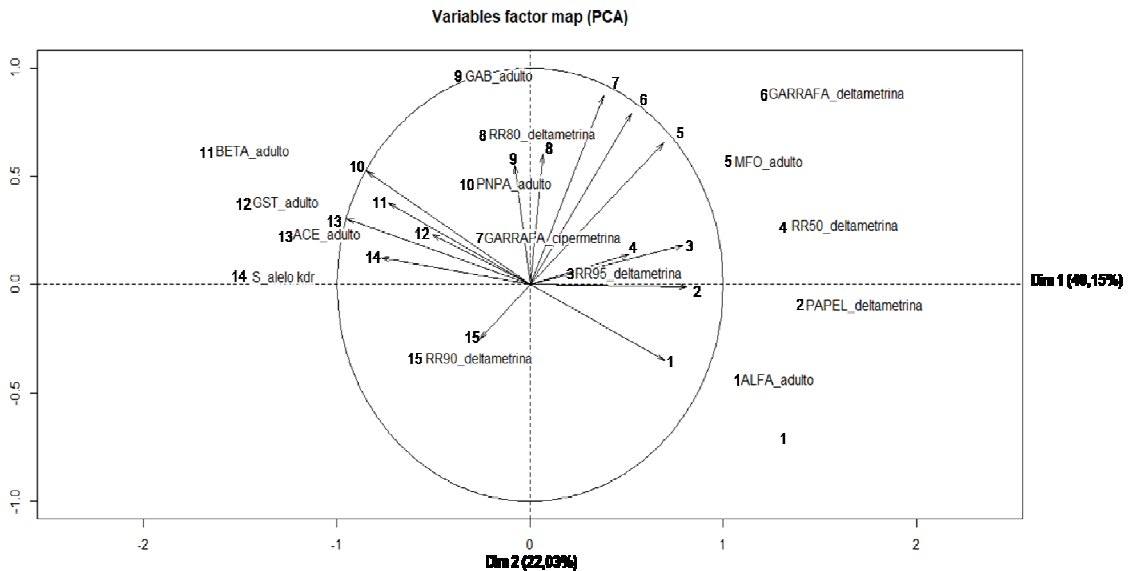


Figura 22: Representação gráfica das 15 variáveis relacionadas a resistência em adultos de *A. aegypti* nos dois primeiros PC da PCA.

Ao avaliarmos o impacto das variáveis que compõem as PC, de maneira geral, foi evidenciado um comportamento nas variáveis relacionadas com a resistência nos adultos, por região, parecido com o das larvas (Figura 23).

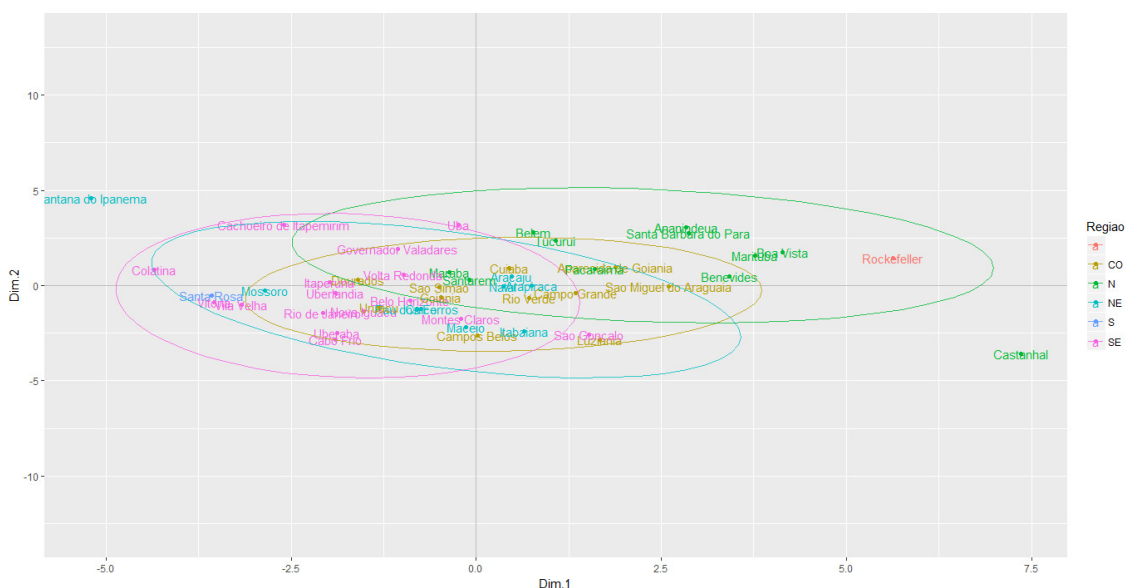


Figura 23: Mapa dos fatores individuais, adultos - representação da contribuição individual das variáveis por município. Agrupamos os municípios e as regiões de origem por elipses.

3.3.3 Discussão

3.3.3.1 Resistência a inseticidas x Incidência de dengue

No Brasil os sorotipos específicos de DENV, que circulam intensamente na população em períodos determinados, combinados com o nível de imunidade de rebanho para cada sorotipo, podem explicar a distribuição espaço-temporal da incidência de dengue e sua variação ao longo dos anos (Teixeira 2012). As taxas de incidência de dengue no Brasil no período de 2001 a 2012 não foram significativamente reduzidas. Em 2001-2002 houve um aumento da incidência, seguida de declínio em 2004-2005, com valores inferiores a 100 casos/por 100 mil habitantes; no entanto, logo após esse período ocorreu um aumento na taxa de incidência de dengue no país (Brasil 2014).

Em resposta ao aumento da incidência de dengue em uma determinada localidade, em geral são realizadas ações de combate ao vetor, com o objetivo de reduzir sua densidade e, com isso, mitigar os novos casos da doença (Braga & Valle 2007a). Uma estratégia ainda amplamente utilizada no controle vetorial é o uso de inseticidas químicos, o que acarreta, a médio e/ou em longo prazo, a seleção de indivíduos resistentes. Observa-se que, na iminência ou no decorrer de uma epidemia, ocorre aumento do uso de inseticidas - tanto público, pelo programa de controle do vetor em saúde pública, quanto doméstico. No último caso, há intensificação de uso de inseticidas voltados para o controle de adultos, o que pode acarretar no aumento da resistência aos inseticidas, ocasionando uma falha no controle do vetor em campo (Figura 24).

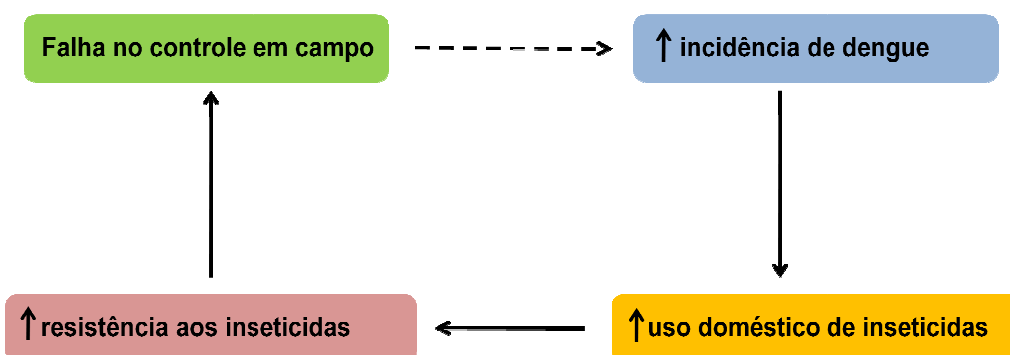


Figura 24: Esquema da relação entre a incidência de dengue e a resistência aos inseticidas.

Os resultados obtidos sobre a resistência de larvas e adultos de populações de *A. aegypti* avaliadas pelo Laficave foram analisados pelo modelo de regressão de Poisson com o objetivo de investigar relação com a incidência de dengue. Este modelo foi usado tanto em comparações com a resistência de larvas ao temephos, composto utilizado por mais de 40 anos no controle das formas imaturas do vetor, quanto com deltametrina, empregada no controle da forma adulta. Foi possível

identificar, em menor ou maior escala, a influência da resistência a inseticidas utilizados em saúde pública sobre a incidência de dengue. Dessa forma, o aumento do número de casos de dengue em uma localidade tende a aumentar o uso de inseticidas, o que por sua vez tende a aumentar a resistência aos inseticidas, possibilitando identificar um caráter dinâmico entre a incidência de dengue e a resistência a inseticidas. Dados da literatura, principalmente nos casos de resistência aos piretroides, corroboram o achado, ou seja, o uso de inseticidas tende a aumentar com a elevação dos índices de dengue. Em particular, a intensificação do uso de piretroides ocorre nas ações de bloqueio realizadas pelo programa de controle mas também com o uso doméstico (Maciel-de-Freitas et al. 2014; Maciel-de-Freitas & Valle 2014; Bellinato et al. 2016, Garcia et al. 2018; Macoris, Martins et al. 2018).

Efeito significativo foi evidenciado quando comparamos as RR obtidas para diflubenzuron e a incidência de dengue. No entanto, em função de sua recente introdução no controle do vetor, ainda não é possível avaliar se os IGR impactam da mesma maneira que os OP e PY na dinâmica entre a resistência e a incidência. Além disso, todas as RR avaliadas para diflubenzuron são menores que 3,0, ou seja, não há evidências de resistência a este composto. Finalmente, vale lembrar que o grupo amostral para o IGR é reduzido. Em conjunto, estas evidências sugerem que o efeito significativo identificado aqui pode não refletir a relevância funcional biológica do achado.

Vale ressaltar que o uso de modelos de previsão de incidência de doenças transmitidas por vetores são muito importantes atualmente. Isto é especialmente relevante no caso da dengue, um grande problema de saúde em países tropicais e subtropicais. Geralmente estes modelos procuram associar a incidência de dengue com variáveis climáticas (Hii et al. 2009; Limper et al. 2015). O trabalho aqui apresentado, de nosso conhecimento, é o primeiro que avalia a influência da resistência aos inseticidas utilizados no controle do vetor sobre a dengue. Não pretendemos, no entanto, inferir que a incidência de dengue dependa, exclusiva ou majoritariamente, do *status* de resistência a inseticidas. A intenção foi simplesmente identificar se há associação entre a incidência de dengue e a resistência. A ocorrência de epidemias depende, como sabemos, de muitos fatores, como a frequência da população imune, a circulação viral, a competência vetorial e a abundância do mosquito, entre outros. No entanto, relacionar altas taxas de incidência de dengue com aumento da resistência do mosquito a inseticidas pode evidenciar a intensificação do uso doméstico de inseticidas e suas consequências.

3.3.3.2 Comparação entre metodologias

Duas metodologias são amplamente utilizadas para avaliar a resistência de *A. aegypti* adultos, baseadas no uso de garrafas ou de papéis impregnados com inseticidas (Brogdon & McAllister 1998; WHO 1998a). Ambas são consideradas eficazes para identificar o *status* de suscetibilidade aos inseticidas (Aizoun et al. 2013; Owusu et al. 2015; WHO 2016). Como abordado no capítulo 1, cada

metodologia possui suas próprias peculiaridades. Os registros do Laficave de mortalidade 24 horas após exposição a deltametrina, não permitiram encontrar associação entre os dois métodos pelo modelo de regressão logística. Tentativa prévia, e mais robusta, de correlacioná-las estatisticamente, realizada por Owusu et al. (2015), também não identificou associação.

3.3.3.3 Mecanismos de resistência

A resistência metabólica decorre de uma série de etapas que levam à degradação do inseticida, contribuindo para sua solubilização e facilitando assim sua excreção. As enzimas detoxificantes envolvidas no metabolismo de xenobióticos podem ser divididas em enzimas de Fase I, que promovem modificações químicas - MFO, EST, e enzimas de Fase II, que promovem conjugação - GST. Procuramos relacionar o envolvimento dessas enzimas, avaliadas nos ensaios de rotina do monitoramento para ambos os estágios do vetor, com as RR obtidas para temephos e deltametrina.

Para as larvas não foi possível relacionar matematicamente, de forma significativa, alterações das enzimas detoxificantes com as RR para temephos. Algumas enzimas demonstraram valor de β negativo, como β -EST e MFO, e valores de α menores que um, apresentando uma participação decrescente do envolvimento destas, logo, um menor incremento destes grupos enzimáticos participando da resistência a OP pode ser esperado. Relatos referentes ao tema associaram alterações de GST e EST e resistência ao temephos em populações brasileiras de *A. aegypti* (Montella et al. 2007; Bellinato et al. 2016; Garcia et al. 2018). Para os adultos, alterações em GST e ρ NPA-EST apresentaram efeito positivo e significativo quando relacionadas à resistência aos PY, confirmando relatos anteriores (Enayati et al. 2005; Montella et al. 2007; Lumjuan et al. 2011; Riveron et al. 2014; Bellinato et al. 2016). As enzimas α -EST e β -EST foram relacionadas negativamente com a resistência a PY, refletindo que estas enzimas não estão envolvidas com a resistência a PY nas populações avaliadas. Resultado equivalente foi obtido para MFO, embora esta classe enzimática seja frequentemente relacionada com a resistência a PY (David et al. 2013).

Adotamos a medida de GAB para larvas e adultos na tentativa de evidenciar, de forma mais genérica, o potencial envolvimento, com a resistência a inseticidas, do conjunto das enzimas cuja atividade foi quantificada, as enzimas detoxificadoras e o sítio alvo de OP. No entanto, para nenhum dos estágios foi possível associar RR com alterações de GAB.

Em nenhum estágio, larva ou adulto, encontramos correlação significativa entre resistência a inseticidas e alterações na atividade de acetilcolinesterase, o que de certa forma já era esperado. De nosso conhecimento não existem até hoje evidências da resistência a OP conferida por mutações em seu alvo, em populações brasileiras de *A. aegypti*; todos os mecanismos identificados estão relacionados à resistência metabólica. Para ACE, foram testadas tanto a atividade total (AChE) como a

atividade inibida pelo carbamato propoxur (AChI). De acordo com o critério da WHO (1998b), AChI igual ou superior a 30% indica resistência aos inseticidas OP e carbamatos. Em todos os casos a ACE foi considerada suscetível ao OP, o que é corroborado pelo efeito negativo encontrado para esta variável.

Alterações no alvo dos PY, o Na_V , tendem a resultar em níveis mais elevados de resistência do que aquela mediada por alterações metabólicas (Martins & Valle 2012; Saavedra-Rodriguez et al. 2012; Brito et al. 2013; Bellinato et al. 2016). Por regressão logística foi possível comparar as RR para deltametrina com as alterações do Na_V , o que nos permitiu correlacionar resistência a PY com maior frequência dos alelo *kdr*, corroborando os dados disponíveis sobre o tema na literatura.

A análise dos resultados de regressão logística revelou resultados discrepantes entre diferentes mecanismos de resistência e a RR80. Para as enzimas GST e EST, em larvas, e ACE nos adultos houve efeito estatisticamente significativo para estas associações de variáveis, efeito oposto às demais RR dos grupos correspondentes. É possível que este resultado, inesperado, seja consequência de diferenças no grupo amostral adotado para realizar as análises com a RR80. As RR50, 90 e 95 são as mais utilizadas na rotina do monitoramento e portanto são as mais abundantes. As RR80 são utilizadas apenas naqueles casos em que não é possível, com os bioensaios, alcançar mortalidades maiores, que permitam o cálculo das RR90 e RR95. Em geral isto ocorre com populações, ou amostras, que são muito resistentes, porque faltam espécimes suficientes para testar concentrações mais elevadas. Em outras palavras, o conjunto de populações para as quais a RR80 está disponível não é representativo da totalidade das amostras avaliadas, o que pode ter impactado na análise.

3.3.3.4 PCA

A análise de componentes principais de 27 variáveis que caracterizam as 48 populações de *A. aegypti* do Brasil sugerem relações potenciais entre as variáveis.

Para as larvas, identificamos correlação entre α -EST e RR50 de temephos, ambas as variáveis aparecendo na primeira dimensão da PCA, essa associação reflete-se como a participação da enzima conferindo resistência a OP. Mediação de resistência a OP por α -EST já foi descrita em populações de *A. aegypti* (Polson et al. 2011; Poupardin et al. 2014; Moyes et al. 2017; Viana-Medeiros et al. 2017). As enzimas GST, EST (β -EST e p NPA-EST) e MFO não aparecem associadas contribuindo para a resistência a OP. Este achado corrobora os resultados obtidos por regressão logística para as avaliações em larvas, que também não apresentaram associação significativa entre as variáveis.

Foi identificada associação negativa entre as RR para diflubenzuron e as enzimas GST e EST, indicando uma não participação dessas enzimas. Por outro lado, a PCA detectou associação entre a

RR50 para este IGR e GAB. No entanto, avaliações adicionais são necessárias para se compreender o significado funcional destes resultados.

A partir da PCA pode-se supor que a resistência à deltametrina em adultos das populações brasileiras avaliadas, em relação as variáveis RR50 e 95 para deltametrina, resultam da combinação: (1) da redução da frequência do alelo selvagem (Na_vS) e (2) da menor participação das enzimas de detoxificação, em especial β -EST, ρ NPA-EST e GST. No entanto, a correlação entre a frequência da mutação *kdr* e a resistência à deltametrina foi significativa, confirmando maior participação deste mecanismo em relação ao papel da resistência metabólica à deltametrina (Saavedra-Rodriquez et al. 2012).

As alterações em MFO aparecem associadas aos resultados de mortalidades obtidas pela metodologia 'CDC' e para a RR80 de deltametrina. Este último resultado foi equivalente ao encontrado por regressão logística para MFO, mesmo que o resultado de regressão logística tenha sido discrepante devido ao impacto da representatividade da amostra na análise.

Vale ressaltar que, mesmo que uma determinada variável possa ter sido considerada significativa, temos que levar em conta o efeito estatístico *versus* o efeito biológico no momento de adotar medidas preventivas para minimizar os efeitos das epidemias de dengue no país. Também demonstramos que a resistência a inseticidas químicos é múltipla e amplamente distribuída entre as populações de *A. aegypti* do Brasil.

4 DISCUSSÃO GERAL

A dinâmica da dengue no Brasil apresenta padrão sazonal, com maior ocorrência no primeiro semestre de cada ano, período de maior variação da temperatura e dos índices pluviométricos (Viana & Ignotti 2013). Na década de 1980 a dengue adquiriu relevância, em função da epidemia que alcançou o Estado do Rio de Janeiro e a Região Nordeste, com a circulação do sorotipo DEN-1 (Schatzmayr et al. 1986; Teixeira et al. 1999). Desde então, e até 2010, foram introduzidos no país, sucessivamente, os outros três sorotipos do vírus dengue (Schatzmayr et al. 1986; Nogueira et al. 1990; 2001; Brasil 2012).

Entre 1990 e 2014 a taxa de incidência de dengue no território nacional apresentou períodos epidêmicos com valores acima de 300 casos da doença/por 100.000 habitantes em todas as regiões, com exceção da Região Sul. As Regiões Centro-Oeste, Nordeste e Sudeste foram as que mais apresentaram taxas elevadas, acima do limiar que define epidemia. Desde 2007 a Região Centro-Oeste sempre esteve em período epidêmico (Brasil 2016).

Até o momento não dispomos nem de vacinas efetivas nem de medicamentos específicos; aqueles disponíveis são restritos ao tratamento dos sintomas (Sanofi Pasteur 2016). A prevenção das arboviroses transmitidas por *A. aegypti* depende, quase que exclusivamente, de medidas de controle voltadas para redução da densidade do vetor, sendo os inseticidas químicos ainda amplamente utilizados pelos programas de saúde pública, o que resulta na seleção de indivíduos resistentes. Com isso, um dos pilares dos programas de controle é o monitoramento do *status* de suscetibilidade de populações naturais do vetor, de forma a subsidiar o manejo da resistência aos inseticidas (Ranson et al. 2010).

No Brasil o uso de inseticidas no controle do vetor da dengue tem sido intenso e contínuo, estratégia que favoreceu a seleção de espécimes resistentes ao longo dos anos. Em 2006, como consequência da identificada disseminação de resistência a temephos no país, o PNCD adotou um critério funcional que considera que populações de *A. aegypti* com RR_{95} acima de 3,0 são resistentes a este larvicida (Brasil 2006). Vale ressaltar que a substituição de inseticidas no país depende de decisões que podem demorar muito, uma vez que são o resultado da ação articulada das três esferas de gestão: nacional, estadual e municipal. Neste sentido, a redução do valor que define o ponto de corte para a 'resistência' a temephos, de RR_{95} 10,0 para 3,0, teve foco em aspectos operacionais, servindo como argumento para a troca de compostos antes que limiar irreversível de resistência tivesse sido atingido. Este mesmo critério também passou a ser empregado, para fins acadêmicos, para classificar tanto o *status* de resistência à deltametrina como ao diflubenzuron.

Reafirmamos, por meio de bioensaios, a alteração no perfil de suscetibilidade das populações brasileiras de *A. aegypti* avaliadas frente ao temephos, corroborando os dados disponíveis na literatura

(Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003, Beserra et al. 2007, Montella et al. 2007, Melo-Santos et al. 2010, Lima et al. 2011, Prophiro et al. 2011, entre outros).

Em virtude da resistência instalada ao OP, temephos passou a ser substituído por larvicidas com modos de ação distintos, os IGR, o que se consolidou para praticamente todo o país a partir de 2009-2010. Avaliamos o perfil de 12 populações de *A. aegypti* a diflubenzuron e todas foram classificadas como suscetíveis, apresentando $RR < 3$ (capítulo 2: Bellinato et al. 2016). O *status* de suscetibilidade de quatro populações brasileiras de *A. aegypti* ao diflubenzuron também havia sido acompanhado por um ano; em todos os casos as RR_{95} para diflubenzuron se mantiveram abaixo de 3,0 (Garcia et al. 2018). Estes resultados são, de certa forma, esperados, em função da introdução recente de diflubenzuron na época destes ensaios. O conjunto dos dados com OP e IGR aponta para a necessidade de realizar o manejo adequado dos inseticidas e da resistência, por exemplo, com a adoção de estratégias como o esquema de rodízio de larvicidas. Tais práticas racionais têm o objetivo de preservar os compostos ainda disponíveis para uso em água potável, em saúde pública (Brasil 2012; 2014; WHOPES 2017). Neste sentido, vale ressaltar que, embora resistência ao diflubenzuron ainda não tenha sido detectada em populações brasileiras de *A. aegypti*, alterações no perfil de suscetibilidade a IGR em populações de *Aedes spp.* da Malásia já foram relatadas (Lau et al. 2015). Em uma população oriunda da Itália de mosquito de outro gênero, *Cx. pipiens*, há registro de aumento de 128 vezes na razão de resistência ao diflubenzuron (Grigoraki et al. 2017).

No Brasil, foram usadas duas metodologias qualitativas de avaliação da resistência de adultos a deltametrina, metodologia CDC (garrafas impregnadas) e metodologia WHO (papéis impregnados), durante o monitoramento da resistência. Em várias oportunidades o mesmo município/ano era avaliado por ambas metodologias simultaneamente, e foi possível compará-las. Embora, na grande maioria das vezes, as populações tenham sido classificadas como resistentes a deltametrina, foi possível identificar uma sutil diferença entre as duas metodologias. Nas avaliações simultâneas, em nenhum caso a metodologia WHO identificou populações suscetíveis, enquanto este *status* foi registrado para quase 8% das avaliações 'CDC'.

Com o conjunto de dados obtidos a partir dos ensaios qualitativos não foi possível associar de forma significativa as metodologias 'CDC' e 'WHO' pela regressão logística. Posteriormente foram desenvolvidos e aplicados bioensaios quantitativos com deltametrina, que confirmaram a disseminada resistência a PY nas populações de *A. aegypti* no país. A detecção, em várias localidades, da dispersão de resistência a PY (Martins et al. 2009; IOC/Fiocruz 2011) acarretou na substituição desta classe pelo OP malathion em 2009 em todo o país (Brasil 2009b)

A resistência metabólica sempre esteve presente com maior intensidade nos adultos do que nas larvas. Glutathione-S-transferases e EST foram as principais classes enzimáticas associadas à resistência a inseticidas em várias populações brasileiras do vetor. Alterações de GST e EST já haviam

sido associadas à resistência de *A. aegypti* a PY e a OP no Brasil (Montella et al. 2007; Bellinato et al. 2016; Garcia et al. 2018). Apesar de todos estes relatos, em geral observa-se em outras populações do vetor no mundo que MFO são as enzimas preferencialmente alteradas (Marcombe et al. 2009; Varón et al. 2010; Dusfour et al. 2011; Saavedra-Rodriguez et al. 2015; Ishak et al. 2017).

A partir do conjunto de dados disponíveis para os mecanismos que conferem resistência aos PY foi possível relacionar um potencial menor envolvimento das alterações metabólicas nas populações com maiores frequências dos alelos resistentes ('*kdr*') do *Nav*, sendo evidenciado tanto por regressão logística quanto pela PCA. Em outras palavras, mosquitos com mutações *kdr* tenderam a apresentar menor participação da resistência metabólica (Martins & Valle 2012; Saavedra-Rodriguez et al. 2012; Brito et al. 2013).

Foi possível sugerir, em várias situações, o impacto das epidemias de dengue sobre a resistência aos inseticidas. Percebe-se, empiricamente, que o aumento do número de casos da doença é seguido pela intensificação do uso de inseticidas, com conseqüente disseminação da resistência. Esta associação tem sido confirmada em várias situações, em função da intensificação do uso de inseticidas resultante tanto das ações do governo quanto de iniciativas privadas (Maciel-de-Freitas et al. 2014; Maciel-de-Freitas & Valle 2014; Bellinato et al. 2016, Garcia et al. 2018; Macoris, Martins et al. 2018).

Nesse sentido, a adoção de rotação de compostos com diferentes mecanismos de ação é um passo importante da estratégia de manejo da resistência. Contudo, em um país com as dimensões e a estrutura de gestão tripartite da saúde como o Brasil, há complexidades logísticas de um processo de rotação a considerar, como aquisição, capacitação de pessoal e distribuição aos municípios. Além disso, é importante rever a importância relativa do controle químico, em um cenário de saneamento e abastecimento de água precários, só para citar alguns fatores que podem influenciar a densidade deste vetor urbano. Finalmente, vale lembrar a necessidade de também investir em campanhas de conscientização, dirigidas tanto aos gestores quanto à sociedade em geral, sobre a importância do controle mecânico de vetores.

5 CONCLUSÕES

A resistência das populações brasileiras de *A. aegypti* ao temephos e à deltametrina é reflexo do uso contínuo no controle.

Identificamos maiores razões de resistência, tanto para temephos quanto para deltametrina, relacionadas com eventos de epidemia de dengue.

O impacto da interferência do uso doméstico de piretróides nos períodos epidêmicos de dengue pode influenciar os índices de resistência.

Redução da frequência do alelo *NavS* nas populações do vetor contribui com maiores níveis de resistência frente aos PY.

A susceptibilidade das populações de *A. aegypti* ao diflubenzuron nos municípios avaliados demonstrou que os IGRs são eficientes no controle do vetor; no entanto é interessante monitorar as populações para resguardar o uso do composto em Saúde Pública.

Confirmamos o caráter multifatorial do fenômeno da resistência nas populações brasileiras do vetor.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar R, Valle D 2015. Prevenção da Dengue: práticas de comunicação e saúde. In Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (Orgs.). Dengue: teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 338-356.
- Aizoun N, Ossè R, Azondekon R, Alia R, Oussou O, Gnanguenon V et al 2013. Comparison of the standard WHO susceptibility test and CDC bottle bioassays for the determination of insecticides susceptibility in malaria vectors and their correlations with biochemical and molecular biology assays in Benin, West Africa. *Parasites & Vectors* 6:147.
- Almeida F, Suesdek L, Motori MT, Bergo E, Sallum MAM 2014. Morphometric comparisons of the scanning electron micrographs of the eggs of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica* 139:115-122.
- Alout H, Djogbénu L, Berticat C, Chandre F, Weill M 2008. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, part B 150(3):271-7.
- ANVISA 2015. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa registra primeira vacina contra dengue no Brasil. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+++noticias+anos/2015/anvisa+registra+primeira+vacina+contra+dengue+no+brasil>>. Acesso: Jan 2016.
- Araújo AP, Diniz DFA, Helvecio E, Barros RA, Oliveira CMF, Ayres CFJ et al 2013: The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. *Parasites & Vectors* 6:297.
- Becker N 2000. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles JF, Delécluse A, LeRoux CN. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 2000 p:383-98
- Belinato TA 2012. Avaliação do efeito da seleção com inibidor de síntese de quitina e da exposição a doses parcialmente letais de inseticidas em populações de campo de *Aedes aegypti*. Tese de doutorado. Pós-graduação em Biologia Parasitária. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, ix+ 180 pp.
- Belinato TA, Martins AJ, Valle D 2012. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107 (7): 917-922.

- Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Araújo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D 2016. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. *BioMed Research International*, Article ID 8603263, 12 pages.
- Bellini R, Medici A, Puggioli A, Basletrino F, Carrieri et al 2013. Pilot Field Trials With *Aedes albopictus* Irradiated Sterile Males in Italian Urban Areas. *Journal of Medical Entomology*, Annapolis 50:317-325.
- Beserra EB, Fernandes CRM, Queiroga M de FC de, Jr. FP de C 2007. Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba. *Neotrop Entomol* 36(2):303-7.
- Bisset JA 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Rev Cubana Med Trop* 54:202-219.
- Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99 (2): 199-203.
- Braga IA, Mello CB, Reis I, Lima JBP, Martins AJ, Viana-Medeiros PF et al 2005. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. *J Med Entomol*, 42(5): 830-7.
- Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidem Serv Saúde* 16: 279-293.
- Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidem Serv Saúde* 16 (2): 113-118.
- Brasil 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Reunião Técnica para Discutir Status de Resistência de *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro: MS.
- Brasil 2008. Metodologia de amostragem de *Aedes aegypti* por meio de armadilhas de postura (ovitampas). Documento da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília.
- Brasil 2009a. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 1ª edição, Brasília, DF.
- Brasil 2009b. Informa mudança de uso de inseticidas larvicidas e adulticidas na rotina do Programa Nacional de Controle da Dengue. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota

Técnica nº 146/2009 CGPNCD/DIGES/SVS/MS.

Brasil 2010. Sinopse do Censo Demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Available: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?uf>> Accessed in August 2015.

Brasil 2012. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. II Seminário Internacional para Avaliações de Ações de Controle Químico de *Aedes aegypti* no Brasil. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle da Dengue, SVS, MS.

Brasil 2014. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Larvicidas. Available at: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/632-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/controle-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/11387-larvicidas>>. Accessed in January 2016.

Brasil 2015. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Brasília. Available at: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/denguebr.def>>. Accessed in July 2015.

Brasil 2017. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016*. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Dengue-classica-ate-2016.pdf>

Brasil 2018. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde. Controle de vetores. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/controle-de-vetores>

Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP et al 2013. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. PLoS ONE 8(4): e60878. doi:10.1371/journal.pone.0060878.

Brogdon WG & McAllister JC 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. J Am Mosq Control Assoc, 14: 159-164.

Burattini MN, Chen M, Chow A, Coutinho FA, Goh KT, Lopez LF et al 2008. Modeling the control strategies against dengue in Singapore. Epidemiol Infect 136(3):309-19.

Cardoso CW, Paploski IAD, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MMO, Campos GS et al 2015. Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. Emerg Infect Dis 21: 2274-2276.

Carvalho DO, McKemey AR, Garziera L, Lacroix R, Donnelly CA, Alphey L et al 2015. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. PLoS Negl Trop Dis 9(7):e0003864.

- Cassanelli S, Reyes M, Rault M, Carlo Manicardi G, Sauphanor B 2006. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochem Mol Biol* 36:642-653.
- Cechine G, Colomb BA, Hilborne LH, Spektor DM, Anthony CR 2000. Pesticides: A review of the scientific literature as it pertains to Gulf War illnesses, Rand Corp Santa Monica Ca. 8. Disponível em: http://www.gulflink.osd.mil/library/randrep/pesticides_paper/index.html
- Chang L-J, Dowd KA, Mendoza FH, Saunders JG, Sitar S, Plummer SH, et al. 2014. Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, Volume 384, Issue 9959, 2046 - 2052
- Chareonviriyaphap T, Roberts DR, Andre RG, Harlan HJ, Manguin S, Bangs MJ 1997. Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. *J Am Mosq Control Assoc* 13(2): 171-83.
- Chediak M, Pimenta FG, Coelho GE, Braga IA, Lima JBP, Cavalcante KRLJ et al 2016. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111(5):311-321.
- Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 225p.
- Costa MM 2017. Avaliação da resistência a inseticidas e mecanismos selecionados em populações de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) da fronteira entre Brasil e Guiana Francesa. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Biologia Parasitária. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 80 pp.
- da-Cunha M, Lima JBL, Brogdon WG, Moya GF, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(4): 441-444.
- Darbro JM, Johnson PH, Thomas MB, Ritchi SA, Kay BH, Ryan PA 2012. Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. Send to *Am J Trop Med Hyg* 86(4):656-64.
- Darriet F, Duchon S, Hougard JM 2005. Spinosad: A new larvicide against insecticide-resistant mosquito larvae. *J Amer Mosq Cont Assoc* 21 (4): 495-496.
- David J, Ismail HM, Chandor-proust A, Paine MJI 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth.

- Philos Trans R Soc B Biol Sci 368:20120429.
- Diniz FAD, Melo-Santos MAV, Santos EMM, Beserra EB, Helvecio E, Carvalho-Leandro D et al 2015. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Par & Vect* 8: 662.
- Donalísio MR, Glasser CM 2012. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Rev Bras Epidemiol* 5(3):259-79.
- Dusfour I, Thalmensy V, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Girod R 2011. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(3): 346-52.
- Dusfour I, Zorrilla P, Guidez A, Issaly J, Girod R, Guillaumot L et al 2015. Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. *PLoS Negl Trop Dis* 9(11): e0004226.
- Ebi KL, Nealon J 2016. Dengue in a changing climate. *Environmentl Research* 151:115-123.
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14(1):3-8.
- EPA 2005. The National-Scale Air Toxics Assessment website is available at <http://www.epa.gov/nata2005>.
- Epis S, Porretta D, Mastrantonio V, Comandatore F, Sassera D, Rossi P et al 2014. ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasit Vectors* 29(7): 349.
- Erasmus JH, Auguste AJ, Kaelber JT, Luo H, Rossi SL, Fenton K et al 2016. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. *Nat Med* 23(2): 192-9.
- Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 124-6.
- Faucon F, Dusfour I, Gaude T, Navratil V, Boyer F, Chandre F et al 2015. Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Research* 25: 1347-59.
- Feyereisen R 2012. Insect CYP genes and P450 enzymes. *Insect Mol Biol Biochem* p:236–316.
- Finney DJ 1971. Probit analysis. London, Cambridge University, 333p
- Fiocruz 2011. Recomendação técnica sobre a interrupção do uso de inseticidas piretroides no

- controle do *Aedes aegypti* no Brasil. Nota Técnica n.º 2/2011/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA.
- Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JBP 2012. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 107 (3): 387-395.
- Forattini OP 2002. Culicidologia Médica. Vol. 2. Editora da Universidade de São Paulo - EDUSP.
- Garcia GA, David MR, Martins AJ, Maciel-de-Freitas R, Linss JGB, Araújo SC et al 2018. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. PLoS Negl Trop Dis 12(2):e0006227.
- Garcia PG, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S et al 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. PLoS Negl Trop Dis 3: e53.
- Georghiou GP 1983. Management of resistance in arthropods, p. 769-792. In G.P. Georghiou & T. Sato (eds.), Pest resistance to pesticides. New York, Plenum
- Georghiou GP 1994. Principles of insecticide resistance management. Phytoprotection 75(4): 51-9.
- Ginzel MD & Blomquist GJ 2016. Insect Hydrocarbons: Biochemistry and Chemical Ecology 221-52.
- Goldberg L, Margalit J 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News 37:355–358.
- Grigoraki L, Balabanidou V, Meristoudis C, Miridakis A, Ranson H, Swevers L et al 2016. Functional and immunohistochemical characterization of CCEae3a, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. Insect Biochem Mol Biol 74: 61-7.
- Grigoraki L, Puggioli A, Douris V, Montanari M, Bellini R et al 2017. Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. Scientific Reports 7:11699.
- Hair JFJ, black WC, Babin BJ, Anderson RE, Tathan RL 2005, Análise Multivariada de Dados. Ed Bookman, Porto Alegre, pp. 593.
- Harris AF, Rajatileka S, Ranson H 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. Am J Trop Med Hyg 83(2): 277-84.
- Hasmiwati, Rusjdi SR, Nofita E 2018. Detection of Ace-1 gene with insecticides resistance in *Aedes aegypti* populations from DHF-endemic areas in Padang, Indonesia. Biodiversitas 19: 31-36.

- Hawk CT, Leary SL 1995. Formulary for laboratory animals. Iowa State University Press, Ames IA.
- Hemingway J & Karunaratne SH 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12(1): 1-12.
- Hemingway J & Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45: 371-91.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 653-65.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann Rev Entomol* 45: 371-391.
- Hii YL, Rocklöv J, Tang CS, Pang FY, Sauerborn R 2009. Climate variability and increase in intensity and magnitude of dengue incidence in Singapore. *Glob Health Action* 2:10.3402/gha.v2i0.2036.
- Huang Y, Guo Q, Sun X, Zhang C, Xu N, Xu Y et al. *Culex pipiens pallens* cuticular protein CPLCG5 participates in pyrethroid resistance by forming a rigid matrix. *Parasites & Vectors* 11: 6.
- Huchard E, Martinez M, Alout H, Douzery EJ, Lutfalla G, Berthomieu A et al 2006. Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 2595-604.
- Ingles PJ, Adam PM, Knipple DC, Soderlund DM 1996. Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant housefly strains. *Insect Biochem Mol Biol* 26:319-326.
- IRAC 2018. IRAC Mode of Action Classification Scheme. 2016;8.1:1–26. Disponível em: www.irac-online.org
- Ishak IH, Kamgang B, Ibrahim SS, Riveron JM, Irving H, Wondji CS 2017. Pyrethroid Resistance in Malaysian Populations of Dengue Vector *Aedes aegypti* Is Mediated by CYP9 Family of Cytochrome P450 Genes. *PLoS Negl Trop Dis* 11(1): e0005302.
- Jansen CC, Beebe NW 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect* 12: 272-279.
- Jiang H, Liu S, Zhao P, Pope C 2009. Recombinant expression and biochemical characterization of the catalytic domain of acetylcholinesterase-1 from the African malaria mosquito, *Anopheles*

- gambiae*. Insect Biochem Mol Biol 39(9): 646-53.
- Karunaratne SHPP, Jayawardena KG, Hemingway J, Ketterman AJ 1993. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Biochemical Journal 294(2):575-579.
- Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM et al 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. eLife. 2015; 4: e08347.
- Kuno G 2010. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. J Med Entomol 47: 957-971.
- Lau KW, Chen CD, Lee HL, Norma-Rashid Y, Sofian-Azirun M 2015. Evaluation of insect growth regulators against field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. J Med Entomol 52(2): 199-206.
- Li CX, Kaufman PE, Xue RD, Zhao MH, Wang G, Yan T et al 2015. Relationship between insecticide resistance and kdr mutations in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southern China. Par & Vect 8: 325.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Annu Rev Entomol 52: 231-53.
- Lilly DG, Latham SL, Webb CE, Doggett SL 2016. CuticleThickeningina Pyrethroid-Resistant Strain of the Common Bed Bug, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera:Cimicidae). PLoSONE 11(4):e0153302.
- Lima EP, Paiva MH, de Araújo AP, da Silva EV, da Silva UM, de Oliveira LN et al 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. Par & Vect 4: 5.
- Lima JBP, Pereira da Cunha M, Silva-Jr RCS, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA et al 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. Am J Trop Med Hyg 68: 329-333.
- Limper M, Thai KTD, Gerstenbluth I, Osterhaus ADME, Duits AJ, van Gorp ECM 2015. Climate Factors as Important Determinants of Dengue Incidence in Curaçao. Zoonoses and Public Health 63(2):129-137.
- Linss JGB, Brito LP, Garcia AG, Araki AS, Bruno RV, Lima JBP et al 2104. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. Par & Vect 7: 25.
- Lumjuan N, Rajatileka S, Changson D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara L et al 2011. The role

- of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41(3):203-209.
- Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araujo SC, Lima JBP et al 2014. Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PLoS One*, 9(3): e92.424.
- Maciel-de-Freitas R, Valle D 2014. Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil. *Bull World Health Org* 92: 685-689.
- Macoris ML Martins AJ, Andrighetti MTM, Lima JBP, Valle D 2018. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 12(3): e0006390.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB 1999. Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. *Rev Saúde Púb* 33: 521-2.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Wanderley DMV, Ribolla PEM 2014. Impact of insecticide resistance the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 47(5): 573-578.
- Mallet J 1989. The evolution of insecticide resistance: Have the insects won? *Trends Ecol Evol* 4(11): 336-40.
- Manly BFJ 1986. *Multivariate Statistical Methods: A Primer*. Chapman and Hall, London – New York, 159 S
- Marcombe S, Darriet D, Agnew P, Etienne M, Yp-Tcha MM, Yébakima A et al 2011. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). *Am J Trop Med Hyg* 84: 118-126.
- Marcombe S, Mathieu RB, Pocquet N, Riaz M-1 A, Poupardin R, Sélior S et al 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS ONE* 7(2): e30989.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C et al 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* 10: 494.
- Martins AJ, Belinato AT, Lima JBP, Valle D 2008. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Manag Sci* 64: 676-

680.

- Martins AJ, Lima JBP, Peixoto AA, Valle D 2009. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health* 14: 1351-1355.
- Martins AJ, Ribeiro CDM, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JBL 2012. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS One* 7: e31.889.
- Martins AJ, Valle D 2012. The pyrethroid knockdown resistance. In: Soloneski S & Larramendy MS (Eds.). *Insecticides: basic and other applications*. Rijeka: InTech.
- McCullagh P and Nelder JA 1989. *Generalized Linear Models*. 2nd Edition, Chapman and Hall, London.
- Melo-Santos MAV, Varjal-Melo JJ, Araújo AP, Gomes TCS, Paiva MH, Regis LN et al 2010. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop* 113: 180-9.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group 2009. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(7): e1000097.
- Montella IR, Martins-Jr AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
- Montella IR, Schama R, Valle D 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(4): 437-49.
- Moraes ACL 1999. Contribuição para o estudo de intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz.
- Mori A, Lobo NF, Bruyn B, Severson DW 2007. Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (Ace 1) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analyses. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 667-74.
- MoyesCL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dufour I et al 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis* 11(7): e0005625.
- Mulla MS 1995. The future of insect growth regulators in vector control. *J Amer Mosq Cont Assoc*

11: 269 -273.

- Muthusamy R e Shivakumar MS 2015. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu, India. *J Vector Borne Dis* 52(2): 159-65.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S et al 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem Biophys Res Commun* 313(3): 794-801.
- Nelson MJ 1986. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Washington, DC, Organización Panamericana de la Salud.
- NIAID/NIH 2017. Zika Virus Vaccines. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/diseasesconditions/zika-vaccines>. Acessado em 19 de julho de 2017.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Fillippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG 2001. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(7):925-926.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(2):253.
- Nyka TE, Akhouayri I, Kisinza W, David JP 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43:407-416.
- Oliveira RL 2005. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. Em: Coura, JR Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, 1ª Ed. Vol 2, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.
- Oliveira RL 2015. Biologia e Comportamento do Vetor. In Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (Orgs.). Dengue: teorias e práticas. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 75-92.
- OPAS 2008. Indicadores básicos de saúde no Brasil: conceito e aplicações / Rede Interagencial de Informação para a Saúde. - Rispa. 2ed - Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde p:349.
- Owusu HF, Jančárová D, Malone D, Müller P 2015. Comparability between insecticide resistance bioassays for mosquito vectors: time to review current methodology? *Parasites & Vectors* 8:357.
- Paula AR, Carolino AT, Paula CO, Samuels RI 2011. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors* 4:8.
- Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD 2011. Characterization of insecticide resistance

- in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Trop* 117(1): 31-8.
- Porreta D, Gargani M, Bellini R, Medici A, Punelli F, Urbanelli S 2008. Defence mechanisms against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps. *Med Vet Entomol* 22:48-54.
- Poupardin R, Srisukontarat W, Yunta C, Ranson H 2014. Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8: e2743.
- Prophiro JS, Silva OS, Luna JED, Piccoli, CF, Karis LA, Silva MAN 2011. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Rev Soc Bras Med Trop* 44(3):300-305
- Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black WC 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net Journal* 1 (1).
- Ranson H, Paton MG, Jensen B, McCarroll L, Vaughan A, Hogan JR et al 2004. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 13(4): 379-86.
- Raymond M 1985. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur cahiers Orstrom. *Sér Ent Med Parasitol* 22: 117–121.
- Ritta CO, Gorla MC, Hein N 2015. Modelo de Regressão Logística para análise de risco de crédito em uma instituição de microcrédito produtivo orientado. *Iberoamerican Journal of Industrial Engineers* 13(7):103-122.
- Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS, Djouaka R, Irving H, Menze BD et al 2014. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol* 15:R27.
- Rocha HDR, Paiva MHS, Silva NM, Araujo AP, Camacho DRRA, Moura AJF et al 2015. Susceptibility profile of *Aedes aegypti* from Santiago Island, Cabo Verde, to insecticides. *Acta Tropica* 152: 66-73.
- Saavedra-Rodriguez K, Beaty M, Lozano-Fuentes S, Denham S, Garcia-Rejon J, Reyes-Solis G et al 2015. Local Evolution of Pyrethroid Resistance Offsets Gene Flow Among *Aedes aegypti* Collections in Yucatan State, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 92(1): 201-9.
- Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Flores AE, Garcia-Luna S, Reyes-Solis G, Ranson H et al 2014. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes following temephos

- selection. *Insect Mol Biol* 23 (2): 199-215.
- Saavedra-Rodriguez K, Suarez AF, Salas IF, Strode C, Ranson H et al 2012. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 21(1): 61-77.
- Salgado VL, Sheets JJ, Wtson GB, Schmidt AL 1998. Studies on the mode of action of spinosad: concentration dependence of neural excitation. *Pestic Biochem Physiol* 103–10.
- Sanofi Pasteur 2016. Comunicado de imprensa: a vacina contra dengue da Sanofi Pasteur é aprovada no Brasil. Disponível em: <http://www.sanofi.com.br/l/br/medias/524EE272-23C54319-B849-70B1D9ECBFD0.pdf>. Acessado em 25 de janeiro de 2016.
- Schatzmayr H, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro – 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81 (2): 245-246.
- Schechtman H, Souza MO 2015. Costly Inheritance and the Persistence of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* Populations. *PLoS ONE* 10(5): e0123961. doi:10.1371/journal.pone.0123961
- Scholte EJ, Nijru BN, Smallgange RC, Knols BGJ 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metharizum anisopliae*. *Malaria Journal* 2:29.
- Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Longini IM Jr 2015. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine* 33: 3292-3298.
- Shono T, Scott JG 2003. Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pest Biochem Physiol* 75:1–7.
- Silva HHG & Silva IG 1999. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 349-355.
- Sougoufara S, Thiaw O, Cailleau A, Diagne N, HarryM, Bouganali C et al 2017. The Impact of Periodic Distribution Campaigns of Long-Lasting Insecticidal-Treated Bed Nets on Malaria Vector Dynamics and Human Exposure in Dielmo, Senegal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 98(5):1343-1352.
- Strode C, de Melo-Santos M, Magalhães T, Araújo A, Ayres C 2012. Expression Profile of Genes during Resistance Reversal in a Temephos Selected Strain of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* 7(8): e39439.
- Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson et al 2008. Genomic analysis of

- detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 38(1):113-23.
- Suryadi BF, Yanuwidi B, Ardyati T, Suhayano 2015. Isolation of *Bacillus sphaericus* from Lombok Island, Indonesia, and Their Toxicity against *Anopheles aconitus*. *International Journal of Microbiology* Article ID 854709, 6 pages.
- Tauil PL 2006. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 30(3):275-277
- Teixeira MG 2012. Few characteristics of dengue's fever epidemiology in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 54(18):S1-S4.
- Teixeira MG, Barreto ML, Guerra Z 1999. Epidemiologias e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiológico do SUS* 8:5-33.
- Teixeira MG, Costa MCN, Barreto ML, Barreto FR 2015. Epidemiologia da dengue. In Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (Orgs.). *Dengue: teorias e práticas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 293-315.
- Valle D, Belinato TA, Martins AJ 2015. Controle químico de *Aedes aegypti*. Resistência a inseticidas e alternativas. In Valle D, Pimenta DN, Cunha RV (Orgs.). *Dengue: teorias e práticas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 93-126.
- Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Viana-Medeiros PF, Martins-Jr AJ, Lima JBP 2006. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Fundação Oswaldo Cruz and Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Rio de Janeiro and Distrito Federal.
- Varón LS, Córdoba BC, Brochero HL 2010. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina em Colombia. *Rev Panam Salud Publica* 27(1):66-73.
- Viana DV, Ignotti E 2013. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. *Rev. bras. epidemiol [online]* 16 (2):240-256.
- Viana-Medeiros PF 2011. Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas e adultos de *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762. Dissertação de mestrado em Biologia Parasitária. Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 140p.
- Viana-Medeiros PF 2017. Avaliação do efeito da seleção de populações de campo de *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) com o inseticida organofosforado malathion. Tese de doutorado. Pós-graduação em Biologia Parasitária. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, vii+ 190 pp.

- Viana-Medeiros PF, Bellinato DF, Martins AJ, Valle D 2017. Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/mve.12241.
- Vijverberg HPM, Bercken J 1990. Neurotoxicological Effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Toxicology* p:105-126.
- Wang ZY, Yao MD, Wu YD 2009. Cross-resistance, inheritance and biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in B-biotype *Bemisia tabaci*. *Pest Manage Sci* 65:1189–1194.
- Ware GW & Whitacre DM 2004. An introduction to insecticides [online]; Minnesota. disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>
- Ware GW 2000. Na introduction to insecticides (3rd edition) - University of Minnesota [online] Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.html>
- Weill M, Berthomieu A, Berticat C, Lutfalla G, Nègre V, Pasteur N et al 2004. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Curr Biol* 14(14): R552-3.
- Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is nonhomologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc Biol Sci* 269(1504): 2007-16.
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C et al 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423(6936): 1367.
- WHO 1981. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807. Geneva.
- WHO 1984. Guidelines for Drinking Water Quality, Vol. I World Health Organization, Geneva.
- WHO 1997. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnostic, Treatment, Prevention and Control, 2 nd ed., World Health Organization, Geneva.
- WHO 1998a. World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO/CDS/CPC/ MAL/98.12.
- WHO 1998b. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (Field and laboratory manual). WHO/CDC/CPC/MAL.98.6.
- WHO 2007. The use of DDT in malaria control. WHO position statement, World Health Organization, Geneva.
- WHO 2009. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and

- control. Geneva: WHO Press.
- WHO 2012. World Health Organization recommended insecticides for space spraying. Geneva, World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul_2012.pdf>. Accessed in March 2016.
- WHO 2013. WHOPEs-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. Geneva, World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_25_Oct_2013.pdf>. Accessed in March 2016.
- WHO 2014. World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases. WHO/DCO/WHO/2014.1.
- WHO 2016. World Health Organization: Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations: Interim guidance for entomologists. Geneva, Switzerland (WHO/ZIKV/VC/16.1).
- WHOPES 2016. WHOPES - recommended insecticides for space spraying against mosquitoes. Disponível em: http://www.who.int/whopes/Space_Spray_products_February_2016.pdf
- WHOPES 2017. WHOPES - recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. Disponível em: http://www.who.int/whopes/Mosquito_larvicides_28_July_2017.pdf
- Wu S, Li M, Tang PA, Felton GW, Wang JJ 2010. Cloning and characterization of acetylcholinesterase 1 genes from insecticide-resistant field populations of *Liposcelis paeta* Pearman (Psocoptera: Liposcelididae). *Insect Biochem Mol Biol* 40(5):415-24.
- Wyss CF, Young HP, Shukla J, Roe RM 2003. Biology and genetics of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), highly resistant to spinosad. *Crop Protect* 22:307–314.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Prapanthadara L 2011. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96: 127-31.

7 ANEXO

7.1 Anexo 1 - Tabelas Capítulo 1

Tabela 2 - taxa de incidência de dengue/100 mil habitantes, região Norte.....	1
Tabela 3 - histórico da distribuição de larvicidas, pelo MS, aos estados da região Norte	2
Tabela 4 - consolidado resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Norte ao larvicida temephos	3
Tabela 5 - histórico da distribuição de adulticidas, pelo MS, aos estados da região Norte	4
Tabela 6 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Norte ao adulticida deltametrina, ensaios qualitativos e bioquímicos	5
Tabela 7 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Norte à deltametrina, bioensaios quantitativos, frequência de mutações no <i>Nav</i> e bioquímicos	6
Tabela 8 - consolidado das informações sobre resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Norte	7
Tabela 9 - taxa de incidência de dengue/100 mil habitantes, região Nordeste	8
Tabela 11 - histórico da distribuição de larvicidas, pelo MS, aos estados da região Nordeste	10
Tabela 12 - consolidado resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Nordeste ao larvicida temephos	11
Tabela 13 - histórico da distribuição de adulticidas, pelo MS, aos estados da região Nordeste	15
Tabela 14 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Nordeste ao adulticida deltametrina, ensaios qualitativos e bioquímicos	16
Tabela 15 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Nordeste à deltametrina, bioensaios quantitativos, frequência de mutações no <i>Nav</i> e bioquímicos	17
Tabela 16 - consolidado das informações sobre resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Nordeste	18
Tabela 17 - taxa de incidência de dengue/100 mil habitantes, região Sudeste	19
Tabela 18 - histórico da distribuição de larvicidas, pelo MS, aos estados da região Sudeste	21
Tabela 19 - consolidado resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Sudeste ao larvicida temephos	22

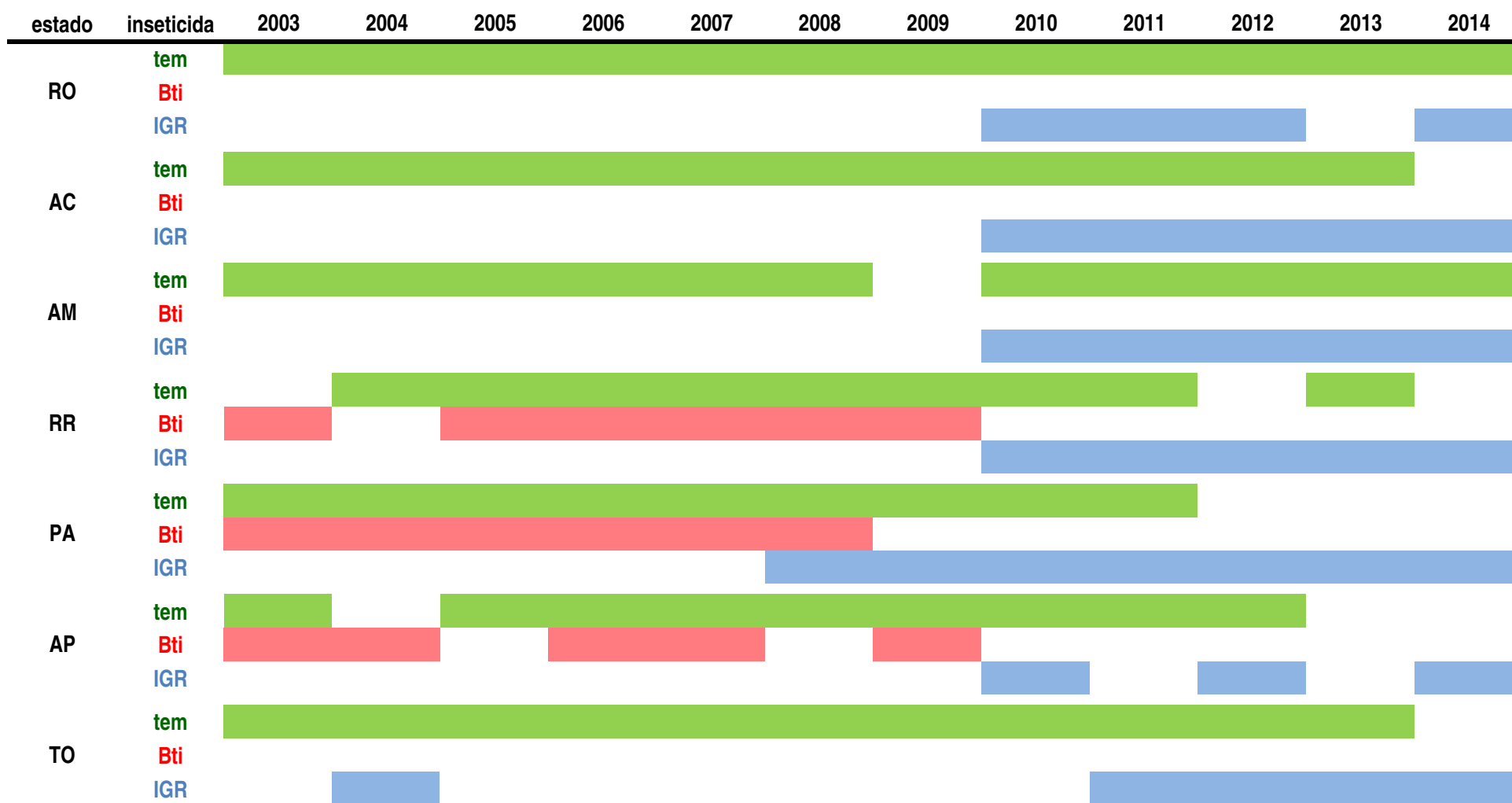
Tabela 20 - histórico da distribuição de adulticidas, pelo MS, aos estados da região Sudeste	28
Tabela 21 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Sudeste ao adulticida deltametrina, ensaios qualitativos e bioquímicos	29
Tabela 22 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Sudeste à deltametrina, bioensaios quantitativos, freqüência de mutações no <i>Nav</i> e bioquímicos	33
Tabela 23 - consolidado das informações sobre resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Sudeste	34
Tabela 24 - taxa de incidência de dengue/100 mil habitantes, região Sul	35
Tabela 25 - histórico da distribuição de larvicidas, pelo MS, aos estados da região Sul	36
Tabela 26 - consolidado resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Sul ao larvicida temephos	37
Tabela 27 - histórico da distribuição de adulticidas, pelo MS, aos estados da região Sul	38
Tabela 28 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Sul ao adulticida deltametrina, ensaios qualitativos e bioquímicos	39
Tabela 29 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Sul à deltametrina, bioensaios quantitativos, freqüência de mutações no <i>Nav</i> e bioquímicos	40
Tabela 30 - consolidado das informações sobre resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Sul	41
Tabela 31 - taxa de incidência de dengue/100 mil habitantes, região Centro-Oeste	42
Tabela 32 - histórico da distribuição de larvicidas, pelo MS, aos estados da região Centro-Oeste	43
Tabela 33 - consolidado resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Centro-Oeste ao larvicida temephos	44
Tabela 34 - histórico da distribuição de adulticidas, pelo MS, aos estados da região Centro-Oeste	45
Tabela 35 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Centro-Oeste ao adulticida deltametrina, ensaios qualitativos e bioquímicos	46
Tabela 36 - resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região CO à deltametrina, bioensaios quantitativos, freqüência de mutações no <i>Nav</i> e bioquímicos	47
Tabela 37 - consolidado das informações sobre resistência de populações de <i>A. aegypti</i> da região Centro-Oeste	48

Tabela 2 - taxa de incidência de dengue/ 100 mil habitantes, região Norte.

UF	UF (município)	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
RO	Porto Velho	128	103	237	118	106	105	106	260	430	1.409	29	35
AC	Rio Branco	553	237	251	1.161	576	53	94	544	5.120	9.792	5.077	512
AM	Borba	403	60	189	9	6	223	14	14	3	332	94	83
	Manaus	1.008	101	206	42	51	27	107	386	31	208	3.006	205
RR	Boa Vista	1.731	529	2.000	224	802	224	204	1.515	829	1.611	301	209
	Pacaraima	82	182	486	72	1.297	155	468	759	327	1.131	445	890
PA	Ananindeua	110	71	62	20	22	16	112	31	59	165	74	77
	Belém	158	238	195	163	98	81	208	103	106	211	119	134
	Benevides	431	508	451	102	298	201	137	112	218	441	137	297
	Castanhal	266	272	75	24	30	55	103	141	97	134	79	152
	Dom Eliseu	2	29	123	117	37	2	2	333	158	39	162	33
	Marabá	494	223	462	45	65	111	208	268	110	147	213	134
	Marituba	24	386	372	337	177	260	426	210	169	437	452	263
	Santa Barbará do Pará	109	96	84	15	182	88	32	56	157	292	367	547
	Santarém	2.198	438	123	84	221	15	24	354	36	155	423	159
	Tucuruí	3.170	98	16	96	218	0	243	333	32	77	482	182
AP	Macapá	786	164	954	535	468	235	611	119	256	394	338	241
	Oiapoque	0	0	24	5	15	5	3.155	2.833	2.331	3.223	2.618	614
TO	Araguaína	214	110	148	333	260	338	478	911	169	106	377	1.191
	Palmas	630	268	293	9	651	656	2.310	1.286	644	1.206	2.206	2.146

Legenda: Incidência de dengue a partir de 300 casos por 100 mil habitantes já é indicativo de epidemia, de acordo com o MS. Levando isto em conta, valores de incidência anual de dengue até 300 estão apresentadas em fundo verde. Em azul e fonte maior, os municípios avaliados para temephos e/ou deltametrina.

Tabela 3 - Histórico da distribuição de larvicidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Norte.



Legenda: Estados - RO: Rondônia; AC: Acre; AM: Amazonas; RR: Roraima; AP: Amapá; PA: Pará; e TO: Tocantins. Inseticidas - tem: temephos; Bti: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; e IGR: *Insect Growth Regulators* .

Tabela 4 - Consolidado da resistência de populações de *A. aegypti* da Região Norte ao larvicida temephos. Para os bioensaios quantitativos estão indicadas as Razões de Resistência (RR), o 'slope' (uma medida de heterogeneidade das populações) e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas, que tratam de mecanismos de resistência metabólica, e do sítio alvo de organofosforados, acetilcolinesterase.

ano	estado	população	bioensaio dose-resposta temephos				referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99 Rock								
			geração	RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅			slope	ACHe	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB	
2002	RO	Porto Velho		2.6	2.6												
2005	AC	Rio Branco		2.9		4.9											
2007	AC	Rio Branco		5.6		6.7											
2011	AC	Rio Branco		5.6		7.8											
2012	AM	Borba		3		4.3											
2003	AM	Manaus		2.1		3.1											
2004	AM	Manaus		8.5		15.6											
2010	AM	Manaus		3.6		5.1											
2002	RR	Boa Vista		3.4		4.3											
2003	RR	Boa Vista		2.7		3.3											
2004	RR	Boa Vista		4.3		4.7											
2007	RR	Boa Vista		4.1		7.4			(&)	12	2	31	8	1	2	9	
2010	RR	Boa Vista		2	2.8												
2011	RR	Pacaraima	F2	4.3	4.0	4.0	5.7			6	1	21	0	14	3	8	
2007	PA	Ananindeua*	F1	10.3	12.4		3.7										
2003	PA	Belém				18.7											
2005	PA	Belém	F2	4.7	7.1	8.0	2.5										
2007	PA	Belém	F1	6.9	12.5		2.7										
2010	PA	Belém	F1	7.5	11.3		3.3		F1	7	4	74	10	4	20	20	
2007	PA	Benevides	F2	9.3	10.6		4.6										
2011	PA	Castanhal	F2	8.2	10.5	11.2	3.5		F2	0	48	34	3	29	75	32	
2003	PA	Dom Eliseu				21.4											
2007	PA	Marabá*	F1	7.3	10.2		2.9										
2009	PA	Marabá	F1	7.7	10.7		3.7		F1	0	14	51	5	2	0	12	
2011	PA	Marabá	F2	8.0	9.7	10.3	3.8										
2007	PA	Marituba*	F1	8.4	11.2		3.1										
2007	PA	Santa Bárbara do Pará*	F2	7.0	8.9		3.4										
2008	PA	Santarém	F1	9.0	13.1		3.5										
2010	PA	Santarém	F2	6.3	7.3	7.6	4.7		F1	0	5	25	2	0	11	7	
2007	PA	Tucuruí	F1	13.4	14.9		4.8										
2010	PA	Tucuruí	F1	2.2	3.3	3.7	3.4		F1	0	1	36	2	1	2	7	
2002	AP	Macapá		8.3	13.3												
2004	AP	Macapá		8.2		10.9											
2009	AP	Macapá		9.1		11.0											
2009	AP	Oiapoque		42.1		102.5											
2006	TO	Araguaína		11.5		8.8											
2009	TO	Araguaína		9.4		12.9											
2006	TO	Palmas		6.8		7.8											
2009	TO	Palmas		6.1		8.1											

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutationa-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)

* para alguns municípios a RR₉₀ está informada no lugar da RR₉₀

cores RRs:

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

(&) dados de mecanismos de resistência: presente estudo

Tabela 5 - Histórico da distribuição de aduaticidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Norte.

estado	inseticida	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
RO	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
AC	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
AM	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
RR	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
PA	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
AP	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
TO	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											

Legenda: Estados - RO: Rondônia; AC: Acre; AM: Amazonas; RR: Roraima; AP: Amapá; PA: Pará; e TO: Tocantins. Inseticidas - PI: piretroides; e OP: organofosforado - malathion.

Tabela 6 - Resistência de populações de *A. aegypti* da Região Norte ao aduldica deltametrina, ensaios qualitativos e 'bioquímicos'. Para os bioensaios qualitativos estão indicadas a porcentagem de mortalidade após 24 horas de exposição para as metodologias 'CDC', 'WHO' e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas. Legendas dos 'bioquímicos' como na Tabela Norte 3 e critério de classificação de mortalidade estão apresentadas no texto e abaixo da figura.

ano	estado	população	bioensaios dose-diagnóstica com deltametrina				fonte	geração	mecanismos de resistência, % > p99					
			CDC, garrafa impregnada		OMS, papel impregnado				AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
			geração	% mort 24 horas	geração	% mort 24 horas								
2007	AC	Rio Branco		98.2		96.6	Moyes et al 2017							
2011	AC	Rio Branco				95.4	Moyes et al 2017							
2012	AM	Borba				52.9	Moyes et al 2017							
2010	AM	Manaus				85.4	Moyes et al 2017							
2012	AM	Manaus				65.2	Moyes et al 2017							
2007	RR	Boa Vista	F2	90.0	F2	37.6	Belinato 2012	F2 (&)	0	0	13	26	0	49
2007	PA	Ananindeua			F1	71.4	presente estudo	F1	0	0	24	44	3	71
2007	PA	Belém	F1	96.4	F1	57.7	presente estudo	F1	0	0	36	43	4	43
2007	PA	Benevides	F2	98.2	F2	67.2	presente estudo	F2	0	0	31	3	0	48
2007	PA	Marabá	F1/F2	97.6	F1	54.0	presente estudo	F1	0	0	27	24	0	57
2007	PA	Marituba	F1	100.0	F1	66.7	presente estudo	F2	0	0	24	11	0	56
2007	PA	Santa Bárbara do Pará	F2	100.0	F2	78.2	presente estudo	F2	1	0	30	42	1	74
2007	PA	Tucuruí	F2	81.0			presente estudo	F1	0	0	46	16	0	68
2008	PA	Santarém	F1	74.8	F1	11.1	presente estudo	F1	55	59	0	31	7	3
2006	TO	Araguaína				71.5	Moyes et al 2017							
2009	TO	Araguaína		88.5		67.5	Moyes et al 2017							
2006	TO	Palmas				31.2	Moyes et al 2017							
2009	TO	Palmas		35.9		15.9	Moyes et al 2017							

legenda

- vermelho: mortalidade menor que 80%
- laranja: mortalidade entre 80 e 98%
- verde: mortalidade maior que 98%

cores enzimas

- %> p99Rock menor que 15
- %> p99Rock entre 15 e 50
- %> p99Rock maior que 50

(&) dados de mecanismos de resistência: presente estudo

Tabela 7 - Resistência de populações de *A. aegypti* da Região Norte ao aditivado deltametrina, bioensaios quantitativos, frequência de mutações no AaNa_v e ensaios 'bioquímicos'. Legendas dos bioensaios e 'bioquímicos' como na Tabela 4. Indicações sobre os alelos de AaNa_v estão apresentadas no texto e abaixo da figura.

ano	estado	população	geração	bioensaios dose-resposta deltametrina				fonte	Frequência alelos AaNa _v			mecanismos de resistência, % > p99							
				RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope		S	R1	R2	geração	AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB
2010	RR	Boa Vista		12.4	15.9			Maciel 2014	0.000	0.732	0.268								
2011	RR	Pacaraima	F2	33.2	52.8	60.3	2.6	Bellinato 2016	0.000	0.600	0.400	F2	0	17	40	48	13	2	20
2010	PA	Belém	F1	6.8	8.5	8.5	4.0	presente estudo	0.714	0.286	0.000	F1	0	17	14	68	47	59	34
2011	PA	Castanhal	F2	9.9	13.6	14.9	3.1	Bellinato 2016	0.667	0.300	0.033								
2009	PA	Marabá	F1	7.5	8.1	8.8	4.3	presente estudo				F1	0	5	23	65	55	45	32
2011	PA	Marabá	F2	47.4	64.7	70.7	3.1	Bellinato 2016	0.690	0.310	0.000								
2010	PA	Santarém	F2	21.1	25.2	26.6	3.9	presente estudo	0.250	0.750	0.000	F1	3	0	2	61	3	5	12
2010	PA	Tucuruí	F1	8.5	10.0	10.5	4.0	presente estudo	0.350	0.650	0.000	F1	0	4	21	71	25	52	29

cores RRs:

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

alelos AaNa_v

S = suscetível a piretróides

R1 = resistente, mutação na posição 1534

R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534

Tabela 8 - Consolidado das informações sobre resistência de populações de *A. aegypti* da Região Norte, larvas e adultos a temephos e deltametrina, e mecanismos relacionados. Estão apresentados apenas os 'municípios/ano' para os quais há alguma avaliação de mecanismos de resistência ('bioquímicos' e/ou AaNa_v). Legendas como nas Tabelas 4, 6, 7).

ano	estado	população	estágio	geração	temephos, dose-resposta				delta, DD		deltametrina, dose-resposta				estágio	mecanismos de resistência, % > p99								Frequência alelos AaNa _v		
					RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope	garrafa%T	papel, %T	RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope		AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB	GAB - AChE	S	R1	R2
2007	RR	Boa Vista	larva		4.1		7.4							L	12	2	31	8	1	2	9.3	8.8				
2007	RR	Boa Vista	adulto						90.0	37.6			A	0	0	13	26	0	49	14.7	17.6					
2010	RR	Boa Vista	adulto								12.4	15.9	A									0.000	0.732	0.268		
2011	RR	Pacaraima	larva	F2	4.3	4.0	4.0	5.7					L	1	1	21	0	14	3	6.7	7.8					
2011	RR	Pacaraima	adulto								33.2	52.8	60.3	2.6	A	26	0	52	13	11	35	22.8	22.2	0.00	0.60	0.40
2007	PA	Ananindeua	adulto						71.4				A	0	0	24	44	3	71	23.7	28.4					
2007	PA	Belém	adulto						96.4	57.7			A	0	0	36	43	4	43	21.0	25.2					
2010	PA	Belém	larva	F1	7.5	11.3		3.3					L	7	4	74	10	4	20	19.8	22.4					
2010	PA	Belém	adulto								6.8	8.5	8.5	4.0	A	0	17	14	68	47	59	34.2	41.0	0.71	0.29	0.00
2007	PA	Benevides	adulto						98.2	67.2			A	0	0	31	3	0	48	13.7	16.4					
2011	PA	Castanhal	larva	F2	8.2	10.5	11.2	3.5					L	30	48	34	3	29	75	36.5	37.8					
2011	PA	Castanhal	adulto								9.9	13.6	14.9	3.1	A							0.67	0.30	0.03		
2007	PA	Marabá	adulto						97.6	54.0			A	0	0	27	24	0	57	18.0	21.6					
2009	PA	Marabá	larva	F1	7.7	10.7		3.7					L	0	14	51	5	2	0	12	14.4					
2009	PA	Marabá	adulto								7.5	8.1	8.8	4.3	A	0	5	23	65	55	45	32.2	38.6			
2011	PA	Marabá	adulto								47.4	64.7	70.7	3.1	A							0.69	0.31	0.00		
2007	PA	Marituba	adulto						100.0	66.7			A	0	0	24	11	0	56	15.2	18.2					
2007	PA	Santa Bárbara do Pará	adulto						100.0	78.2			A	1	0	30	42	1	74	24.7	29.4					
2008	PA	Santarém	adulto						74.8	11.1			A	55	59	0	31	7	3	25.8	20.0					
2010	PA	Santarém	larva	F2	6.3	7.3	7.6	4.7					L	0	5	25	2	0	11	7.2	8.6					
2010	PA	Santarém	adulto								21.1	25.2	26.6	3.9	A	3	0	2	61	3	5	12.3	14.2	0.25	0.75	0.00
2007	PA	Tucuruí	adulto						81.0				A	0	0	46	16	0	68	21.7	26.0					
2010	PA	Tucuruí	larva	F1	2.2	3.3	3.7	3.4					L	0	1	36	2	1	2	7	8.4					
2010	PA	Tucuruí	adulto								8.5	10.0	10.5	4.0	A	0	4	21	71	25	52	28.8	34.6	0.35	0.65	0.00

cores RRs (temephos e deltametrina):

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

cores ensaios DD

vermelho: mortalidade menor que 80%

laranja: mortalidade entre 80 e 98%

verde: mortalidade maior que 98%

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

GAB: avaliação bioquímica 'global' (média das alterações de Ace, MFO, GST e EST)

GAB - AChE: avaliação bioquímica 'global', apenas resistência metabólica

alelos AaNa_v

S = suscetível a piretróides

R1 = resistente, mutação na posição 1534

R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534

Tabela 9 - taxa de incidência de dengue/ 100 mil habitantes, região Nordeste.

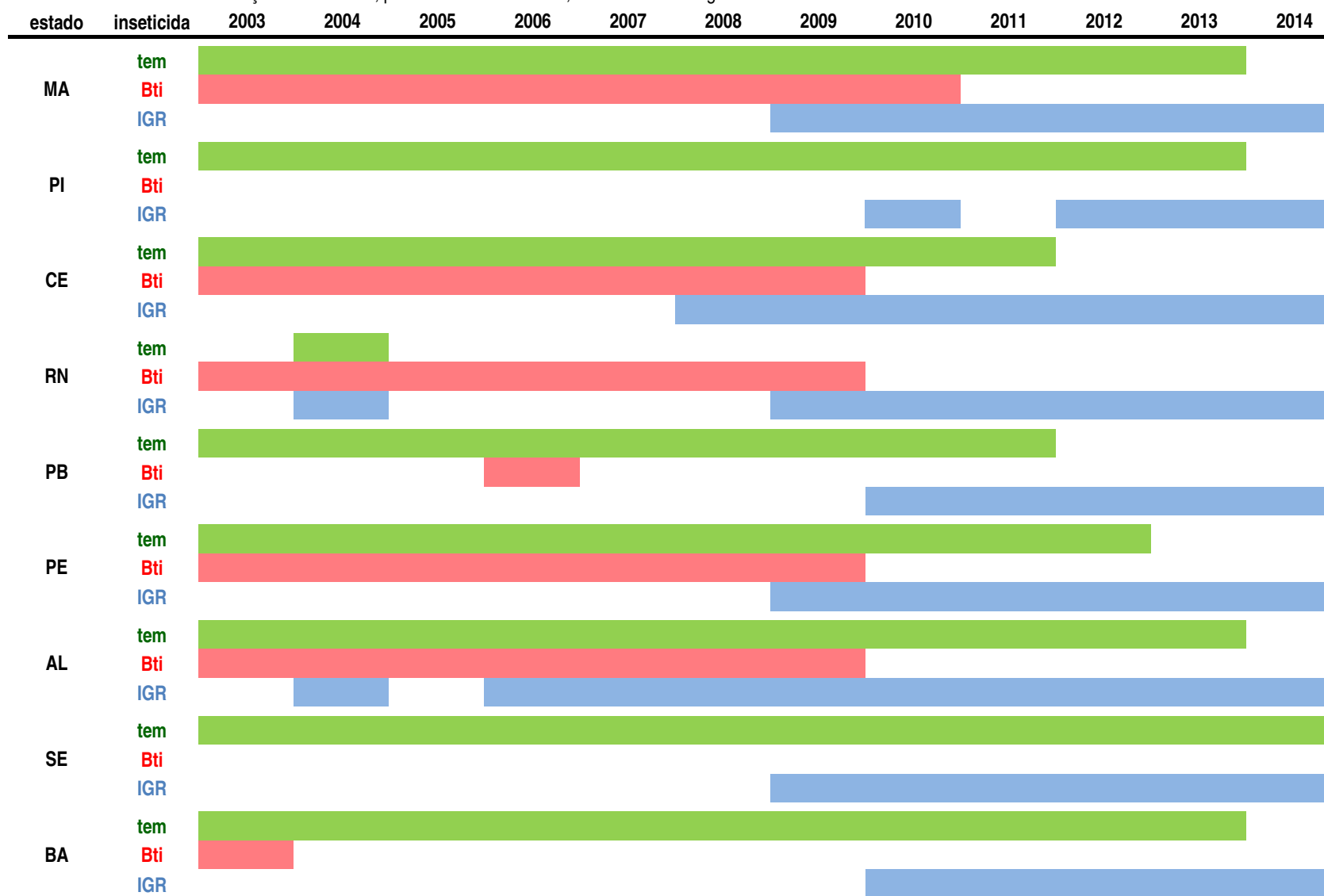
UF	UF (município)	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
MA	Bacabal	45	699	264	45	22	8	106	10	5	7	119	88
	São Luís	35	32	49	13	240	119	340	109	7	250	474	117
PI	Florianópolis	144	142	215	17	43	9	64	28	241	936	36	257
	Parnaíba	45	115	140	48	277	153	727	7	3	8	249	479
	Teresina	546	525	488	15	21	178	568	156	122	308	655	871
CE	Barbalha	320	295	309	89	352	5	1.043	43	22	575	137	634
	Cedro	4	249	1.068	8	652	65	518	2.736	69	8	12	20
	Crato	1.759	343	467	181	329	49	1.038	96	12	1.192	319	986
	Fortaleza	553	202	506	21	482	636	495	1.212	173	213	1.392	1.602
	Juazeiro do Norte	1.325	273	402	12	123	16	317	19	11	388	130	455
RN	Caicó	2.447	243	102	246	329	88	143	221	6	100	278	492
	Mossoró	89	68	68	4	51	54	102	561	51	56	540	501
	Natal	2.642	1.267	1.448	108	192	541	826	1.387	185	509	1.162	1.616
	Parnamirim	418	388	459	72	59	243	629	963	104	223	501	510
	Pau dos Ferros	160	599	1.181	285	1.768	192	533	1.249	18	1.964	1.027	2.674
PB	Boqueirão	59	941	71	0	24	166	201	30	0	118	65	178
	Brejo dos Santos	1.678	1.549	613	16	2.856	0	2.227	65	129	2.872	1.194	194
	Campina Grande	374	360	351	32	32	43	68	75	8	105	90	13
	Itaporanga	461	806	280	17	26	56	108	207	26	103	116	207
	João Pessoa	60	124	27	34	74	76	477	70	18	152	435	542
	Remígio	1.069	660	341	57	80	165	700	182	6	68	370	23

Tabela 9 - taxa de incidência de dengue/ 100 mil habitantes, região Nordeste.

UF	UF (município)	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
PE	A. da Ingazeira	482	311	539	0	6	20	262	137	117	422	1.713	5.443
	Agrestina	159	1.177	1.658	260	203	106	238	101	44	31	13	123
	Araripina	168	749	629	14	16	4	18	43	12	48	169	194
	Arcoverde	728	404	1.362	39	0	1	57	250	12	285	23	142
	Cabo do Santo Agostinho	171	2.531	178	41	118	225	1.058	280	54	797	81	713
	Fernando de Noronha	12.319	38	0	228	342	1.217	494	989	0	2.243	837	4.259
	G. do Goiatá	165	1.082	48	14	0	131	48	410	10	507	134	665
	Jaboatão dos Guararapes	5	1.367	33	9	27	103	153	279	14	376	72	295
	Recife	195	2.277	10	9	35	72	52	192	25	626	292	635
	Salgueiro	99	87	445	2	247	417	304	320	468	1.759	34	235
	S. C. do Capibiribe	505	1.377	360	5	9	90	998	86	21	132	25	13
	S. J. Egito	361	57	710	0	9	19	490	97	9	66	509	2.193
Tamandaré	53	811	111	0	5	14	101	232	5	39	135	92	
AL	Arapiraca	5	168	182	27	22	64	268	778	73	4.052	620	1.437
	Maceió	40	532	362	287	164	227	553	669	268	2.178	246	1.492
	Satana do Ipanema	5	14	71	415	37	9	166	115	85	3.212	57	1.335
SE	Aracaju	339	398	257	31	51	66	54	1.495	74	44	220	400
	Barra dos Coqueiros	68	196	236	0	40	4	16	593	172	32	168	617
	Itabaiana	150	497	562	4	1	7	11	1.113	12	13	140	156
BA	Barreiras	327	194	175	100	7	13	59	108	1.654	164	2.275	24
	Eunápolis	153	255	548	9	1	20	2	127	2.346	16	446	382
	Ibotirama	374	547	94	35	67	16	24	311	2.828	31	142	24
	Ilhéus	293	891	758	38	1.303	116	23	148	2.275	752	845	1.385
	Itabuna	201	843	2.723	12	113	8	13	816	7.117	283	172	3.077
	Jacobina	867	2.521	1.850	112	628	86	483	1.074	1.865	170	256	1.910
	Jequié	78	763	633	76	28	16	54	267	6.611	949	645	918
	Juazeiro	298	158	1.272	180	199	21	209	1.644	181	76	484	136
	Paulo Afonso	32	162	49	18	122	11	57	174	60	172	62	129
	Salvador	66	1.027	34	6	10	14	46	85	231	228	194	193
	Serrinha	324	304	132	186	431	99	35	241	2.096	2.407	291	1.614
	Sobradinho	518	55	27	0	5	18	27	105	23	14	82	9

Legenda: Incidência de dengue a partir de 300 casos por 100 mil habitantes já é indicativo de epidemia, de acordo com o MS. Levando isto em conta, valores de incidência anual de dengue até 300 estão apresentadas em fundo verde. Em azul e fonte maior, os municípios avaliados para temphos e/ou deltametrina.

Tabela 11 - Histórico da distribuição de larvicidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Nordeste.



Legenda: Estados - MA: Maranhão; PI: Piauí; CE: Ceará; RN: Rio Grande do Norte; PB: Paraíba; PE: Pernambuco; AL: Alagoas; SE: Sergipe; e BA: Bahia. Inseticidas - tem: temephos; Bti: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; e IGR: *Insect Growth Regulators* .

Tabela 12 - Consolidado da resistência de populações de *A. aegypti* da Região Nordeste ao larvicida temephos. Para os bioensaios quantitativos estão indicadas as Razões de Resistência (RR), o 'slope' (uma medida de heterogeneidade das populações) e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas, que tratam de mecanismos de resistência metabólica, e do sítio alvo de organofosforados, acetilcolinesterase.

ano	região	estado	população	geração	bioensaio dose-resposta temephos				referência	mecanismos de resistência, % > p99 Rock					
					RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅	slope		AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2009	NE	MA	Bacabal		5.6		6.6		Araujo AP et al 2013						
2006	NE	MA	São Luís		7.6		9.5		Moyes et al 2017						
2004	NE	PI	Parnaíba		14.1		17.0		Moyes et al 2017						
2004	NE	PI	Teresina		10.7		13.8		Moyes et al 2017						
2012	NE	PI	Teresina		11.6		21.6		Moyes et al 2017						
2009	NE	CE	Barbalha				30.0		Lima EP et al 2011						
2012	NE	CE	Barbalha		2.9				Lima EP et al 2014						
2009	NE	CE	Cedro		88.6		132.7		Araujo AP et al 2013						
2003	NE	CE	Crato		13				Lima EP et al 2006						
2009	NE	CE	Crato				192.7		Lima EP et al 2011						
2013	NE	CE	Crato		23.2		64.8		Viana-Medeiros PF et al 2017	0	2	13	4	1	22
2002	NE	CE	Fortaleza				10.0		Moyes et al 2017						
2003	NE	CE	Fortaleza		12				Lima EP et al 2006						
2003	NE	CE	Fortaleza		7.6		8.4		Moyes et al 2017						
2004	NE	CE	Fortaleza		5.9		9.1		Moyes et al 2017						
2006	NE	CE	Fortaleza		9.8		8.3		Moyes et al 2017						
2007	NE	CE	Fortaleza				43		Martins AJ et al 2012						
2002	NE	CE	Juazeiro do Norte		7.0		9.6		Moyes et al 2017						
2003	NE	CE	Juazeiro do Norte		12				Lima EP et al 2006						
2004	NE	CE	Juazeiro do Norte		12.1		17.5		Moyes et al 2017						
2009	NE	CE	Juazeiro do Norte				7.2		Lima EP et al 2011						
2012	NE	CE	Juazeiro do Norte		17.5				Lima EP et al 2014						
2004	NE	RN	Caicó				12.5		Montella et al 2007						
2008	NE	RN	Caicó*	F2	9.8	10.1		3.9	presente estudo						
2009	NE	RN	Caicó*	F1	10.8	11.1			presente estudo	8	8	50	14	3	2
2010	NE	RN	Caicó	F2	8.4	9.3	9.6	5.1	Bellinato et al 2016	0	15	14	58	70	6
2004	NE	RN	Mossoró				12.6		Montella et al 2007						
2009	NE	RN	Mossoró	F1	8.9	14.9		3.0	presente estudo	2	1	68	0	0	0
2011	NE	RN	Mossoró	F1	8.0	9.4	9.8	4.0	presente estudo						
2002	NE	RN	Natal		17.1	24.4			Braga IA et al 2005						
2004	NE	RN	Natal				18.6		Montella et al 2007						
2007	NE	RN	Natal*	F1	6.8	8.4		3.6	presente estudo						
2010	NE	RN	Natal	F1	7.8	11.0	12.2	3.6	presente estudo	1	35	40	1	1	0
2013	NE	RN	Natal						Moyes et al 2017						
2004	NE	RN	Parnamirim				12.6		Montella et al 2007						
2008	NE	RN	Pau dos Ferros	F2	7.8	10.9		3.6	presente estudo						
2009	NE	RN	Pau dos Ferros	F1	6.9	10.6	11.9	3.3	presente estudo						
2010	NE	RN	Pau dos Ferros	F2	8.5	11.1	12.0	4.0	presente estudo	0	5	16	0	0	1

ano	região	estado	população	geração	bioensaio dose-resposta temephos				referência	mecanismos de resistência, % > p99 Rock					
					RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅	slope		AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2003	NE	PB	Boqueirão		11				Beserra et al 2007						
2003	NE	PB	Brejo dos Santos		14				Beserra et al 2007						
2003	NE	PB	Campina Grande		5.8				Beserra et al 2007						
2003	NE	PB	Itaporanga		11.5				Beserra et al 2007						
2009	NE	PB	João Pessoa		5.8		11.7		Araujo AP et al 2013						
2003	NE	PB	Remígio		6.3				Beserra et al 2007						
2009	NE	PE	A. da Ingazeira		84.4		120.6		Araujo AP et al 2013						
2009	NE	PE	Agrestina		69		212.6		Araujo AP et al 2013						
2003	NE	PE	Araripina		8.8		11.2		Moyes et al 2017						
2009	NE	PE	Araripina		224.3		252.7		Araujo AP et al 2013						
2011	NE	PE	Arcoverde				222.6		Diniz FAD et al 2015						
2003	NE	PE	Cabo do Santo Agostinho		2.5		3.4		Moyes et al 2017						
2009	NE	PE	Fernando de Noronha		2.4		2.4		Araujo AP et al 2013						
2009	NE	PE	G. do Goiatá		19.3		72		Araujo AP et al 2013						
2000	NE	PE	Jaboatão dos Guararapes		4.5		4.7		Moyes et al 2017						
2003	NE	PE	Jaboatão dos Guararapes		3.6		7.3		Moyes et al 2017						
2000	NE	PE	Recife		3.4		3.8		Moyes et al 2017						
2003	NE	PE	Recife		5.1		9.0		Moyes et al 2017						
2009	NE	PE	Recife		4.7		7.1		Araujo AP et al 2013						
2009	NE	PE	Salgueiro		12.8		60		Araujo AP et al 2013						
2009	NE	PE	S. C. Capibiribe		56.2		142.4		Araujo AP et al 2013						
2009	NE	PE	S. J Egito		75		124.7		Araujo AP et al 2013						
2004	NE	PE	Tamandaré		7.4		9.5		Moyes et al 2017						
2000	NE	AL	Arapiraca		4.4		4.3		Moyes et al 2017						
2003	NE	AL	Arapiraca				8.7		Montella et al 2007						
2008	NE	AL	Arapiraca	F1	6.9	12.2		2.8	presente estudo						
2000	NE	AL	Maceió		4.8		5.6		Moyes et al 2017						
2001	NE	AL	Maceió		8.6	9.4			Braga et al 2004						
2003	NE	AL	Maceió				10.8		Montella et al 2007						
2005	NE	AL	Maceió				10.3		Belinato et al 2013						
2007	NE	AL	Maceió*	F1	15.8	16.9		4.8	presente estudo						
2009	NE	AL	Maceió	F1	11.4	12.2		5.5	presente estudo	1	14	54	0	1	0
2010	NE	AL	Santana do Ipanema	F2	88.8	111.8	119.1	4.2	presente estudo	0	1	27	6	6	16

ano	região	estado	população	geração	bioensaio dose-resposta temephos				referência	mecanismos de resistência, % > p99 Rock					
					RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅	slope		AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2000	NE	SE	Aracaju		4.1		5.3		Moyes et al 2017						
2001	NE	SE	Aracaju		5.8	6.1			Braga IA et al 2004						
2003	NE	SE	Aracaju				6.6		Montella IR et al 2007						
2005	NE	SE	Aracaju				19.3		Belinato TA et al 2013						
2007	NE	SE	Aracaju*	F1	12.1	11.4		7.2	presente estudo						
2010	NE	SE	Aracaju	F1	11.0	9.6	9.3	8.5	presente estudo	6	3	6	34	50	2
2012	NE	SE	Aracaju	F1	11.2	12.5	12.9	4.2	Viana-Medeiros et al 2017	4	9	20	30	39	55
2000	NE	SE	Barra dos Coqueiros		2.5		3.2		Moyes et al 2017						
2001	NE	SE	Barra dos Coqueiros		9.4	11.2			Braga IA et al 2004						
2004	NE	SE	Barra dos Coqueiros				23.5		Montella IR et al 2007						
2000	NE	SE	Itabaiana		5.7		8.5		Moyes et al 2017						
2004	NE	SE	Itabaiana				25.8		Montella IR et al 2007						
2007	NE	SE	Itabaiana	F1	16.9	22.1		3.8	presente estudo						
2008	NE	BA	Barreiras		3.4		5.2		Andrighetti et al 2008						
2009	NE	BA	Barreiras		3.9		5.0		Moyes et al 2017						
2012	NE	BA	Barreiras		3.5		5.3		Moyes et al 2017						
2011	NE	BA	Eunápolis		34.1		139.2		Moyes et al 2017						
2012	NE	BA	Eunápolis		37.8		139.2		Moyes et al 2017						
2012	NE	BA	Ibotirama		9.5		10.4		Moyes et al 2017						
2009	NE	BA	Ilhéus		10.0		14.2		Moyes et al 2017						
2004	NE	BA	Itabuna		16.3		18.6		Moyes et al 2017						
2013	NE	BA	Itabuna		20.6		55.8		Moyes et al 2017						
2008	NE	BA	Jacobina		8.8		9.8		Moyes et al 2017						
2009	NE	BA	Jacobina		29.4		104.2		Moyes et al 2017						
2013	NE	BA	Jacobina		45.7		228.8		Moyes et al 2017						
2009	NE	BA	Jequié		38.7		64.6		Moyes et al 2017						
2012	NE	BA	Jequié		59.5		162.7		Moyes et al 2017						
2013	NE	BA	Juazeiro		14.6		33.9		Moyes et al 2017						
2011	NE	BA	Paulo Afonso		36.6		121.6		Moyes et al 2017						
2012	NE	BA	Paulo Afonso		40.5		121.6		Moyes et al 2017						
2004	NE	BA	Salvador		10.2		14.8		Moyes et al 2017						
2008	NE	BA	Salvador		8.8		10.6		Andrighetti et al 2008						
2011	NE	BA	Salvador		12.1		23.5		Moyes et al 2017						
2012	NE	BA	Serrinha		137.8		254.9		Moyes et al 2017						
2007	NE	BA	Sobradinho		3.5		3.8		Moyes et al 2017						
2009	NE	BA	Sobradinho		2.6		3.3		Moyes et al 2017						

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidasas de função mista, GST: glutiona-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. %>p99: para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). **GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)**

* para alguns municípios a RR₉₀ está informada no lugar da RR₉₅

cores RRs:

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

Tabela 13 - Histórico da distribuição de larvicidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Nordeste.

estado	inseticida	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
MA	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
PI	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
CE	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
RN	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
PB	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
PE	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
AL	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
SE	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											
BA	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]											

Legenda: Estados - MA: Maranhão; PI: Piauí; CE: Ceará; RN: Rio Grande do Norte; PB: Paraíba; PE: Pernambuco; AL: Alagoas; SE: Sergipe; e BA: Bahia. Inseticidas - PI: piretroides; e OP: organofosforado - malathion.

Tabela 14 - Resistência de populações de *A. aegypti* da Região Nordeste ao aduldica deltametrina, ensaios qualitativos e 'bioquímicos'. Para os bioensaios qualitativos estão indicadas a porcentagem de mortalidade após 24 horas de exposição para as metodologias 'CDC', 'WHO' e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas.

ano	estado	população	bioensaios dose-diagnóstica com deltametrina				referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99 Rock						GAB	
			CDC, garrafa impregnada		WHO, papel impregnado				AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST		
			geração	% mort 24 horas	geração	% mort 24 horas										
2006	MA	São Luís				68.9	Moyes et al 2017									
2010	PI	Florião				93.3	Moyes et al 2017									
2012	PI	Teresina				77.2	Moyes et al 2017									
2013	PI	Teresina				86.5	Moyes et al 2017									
2006	CE	Fortaleza				38.4	Moyes et al 2017									
2007	CE	Fortaleza		46.9			Martins et al 2009									
2008	RN	Caicó	F2	95.6	F2	50	presente estudo	F2	3	0	12	18	0	7	7	
2009	RN	Caicó	F1			46.7	presente estudo		1	9	80	44	32	9	29	
2007	RN	Natal	F1	100	F1/F2	70.4	presente estudo	F2	0	0	58	3	0	27	15	
2013	RB	Natal				71	Moyes et al 2017									
2008	RN	Pau dos Ferros	F2	94.2	F2	54.4	presente estudo	F2	0	1	12	32	2	12	10	
2009	RN	Pau dos Ferros	F1	97.8	F1	85.96	presente estudo		66	65	31	3	0	31	33	
2010	PE	Araripina				91	Moyes et al 2017									
2010	PE	Recife				73.7	Moyes et al 2017									
2008	AL	Arapiraca	F1	100	F1	63	presente estudo	F1	0	11	20	63	5	29	21	
2005	AL	Maceió	F2	62.9	F2	58.2	Belinato et al 2013/presente estudo	F2 (&)	11	6	81	1	1	8	18	
2007	AL	Maceió	F2	91.1	F1	55.6	presente estudo	F1	0	0	38	12	0	9	10	
2005	SE	Aracaju	F2	88.1	F2	80.3	Belinato et al 2013/presente estudo	F2 (&)	3	2	87	23	3	26	24	
2007	SE	Aracaju				59.3	presente estudo	F1	0		34	3	0	12	10	
2008	SE	Aracaju	F1	91.9	F1	71.1	presente estudo									
2007	SE	Itabaiana				63.8	presente estudo									
2008	BA	Barreiras		100		67.3	Moyes et al 2017									
2009	BA	Barreiras				93.7	Moyes et al 2017									
2012	BA	Barreiras				86.4	Moyes et al 2017									
2012	BA	Eunapólis				76.7	Moyes et al 2017									
2012	BA	Ibotirama				74.7	Moyes et al 2017									
2009	BA	Ilhéus				72.1	Moyes et al 2017									
2013	BA	Itabuna				65.2	Moyes et al 2017									
2008	BA	Jacobina		96.3		52.7	Moyes et al 2017									
2009	BA	Jacobina				86.7	Moyes et al 2017									
2013	BA	Jacobina				72.7	Moyes et al 2017									
2009	BA	Jequié				50.4	Moyes et al 2017									
2012	BA	Jequié				46.1	Moyes et al 2017									
2013	BA	Juazeiro				87.8	Moyes et al 2017									
2012	BA	Paulo Afonso				84.9	Moyes et al 2017									
2008	BA	Salvador		96.6		91.9	Moyes et al 2017									
2011	BA	Salvador				89.3	Moyes et al 2017									
2012	BA	Serrinha				53.5	Moyes et al 2017									
2007	BA	Sobradinho		95.2		63.5	Moyes et al 2017									
2009	BA	Sobradinho				88.5	Moyes et al 2017									

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutatona-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)

legenda cores enzimas
vermelho: mortalidade menor que 80% %> p99Rock menor que 15
laranja: mortalidade entre 80 e 98% %> p99Rock entre 15 e 50
verde: mortalidade maior que 98% %> p99Rock maior que 50

(&) dados de mecanismos de resistência: presente estudo

Tabela 15 - Consolidado da resistência de populações de *A. aegypti* da Região Nordeste ao adulticida deltametrina. Para os bioensaios estão indicadas as Razões de Resistência (RR), o 'slope' (uma medida de heterogeneidade das populações) e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas e a frequência do alelo *ldr*.

ano	estado	população	geração	bioensaios dose-resposta deltametrina				referência	Frequência alelos AaNa _v			geração	mecanismos de resistência, % > p99					
				RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope		S	R1	R2		ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2013	CE	Crato	F3	37		51.6		Viana-Medeiros et al 2017	0.446	0.393	0.161	F2	34	0	26	17	0	23
2010	RN	Caicó	F2	6.0	11.0	13.1	2.51	Bellinato et al 2016	0.917	0.067	0.017	F2	3	0	11	63	22	6
2009	RN	Mossoró	F1	7.7	9.4	10.0	3.83	presente estudo	0.783	0.217	0.000	F1	2	54	88	49	60	42
2011	RN	Mossoró	F1	16.0	24.1	27.1	2.79	presente estudo	0.383	0.583	0.033							
2010	RN	Natal	F1	8.4	11.8		3.27	presente estudo				F1	0	19	49	45	8	8
2010	RN	Pau dos Ferros	F2	7.4	9.5	10.2	3.60	presente estudo				F2	1	19	29	82	14	0
2009	AL	Maceió	F1	5.6	7.1	7.6	3.68	presente estudo				F1	3	2	74	23	12	18
2010	AL	Santana do Ipanema	F2	7.5	10.5	11.6	3.27	presente estudo	0.717	0.250	0.033	F2	2	5	58	87	46	15
2010	SE	Aracaju	F1	7.5	10.2	11.1	3.39	presente estudo	0.442	0.019	0.538	F1	8	16	22	45	3	8
2012	SE	Aracaju	F1	14.3	17.0	17.8	3.59	Viana-Medeiros et al 2017	0.383	0.100	0.517	F1	1	87	36	75	8	32

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutatona-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). **GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)**

cores RRs:

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

*RR80 informada

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

alelos AaNa_v

S = suscetível a piretróides

R1 = resistente, mutação na posição 1534

R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534

Tabela 16 - Consolidado das informações sobre resistência de populações de *A. aegypti* da Região Nordeste, larvas e adultos a temefos e deltametrina, e mecanismos relacionados. Estão apresentados apenas os 'municípios/ano' para os quais há alguma avaliação de mecanismos de resistência ('bioquímicos' e/ou AaNa_v). Legendas como nas Tabelas 12, 14 e 15).

Item	ano	estado	população	estágio	geração	temefos, dose-resposta				delta, DD		deltametrina, dose-resposta				estágio	mecanismos de resistência, % > p99							Frequência alelos AaNa _v			
						RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅	slope	garrafa%T	papel, %T	RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope		AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB	GAB-AChE	S	R1	R2
Ltem	2013	CE	Crato	larva		23.2		64.8							L	0	2	13	4	1	22	7	8				
ARRdelta	2013	CE	Crato	adulto							37		51.6		A	34	0	26	17	0	23	17	13	0.446	0.393	0.161	
ADDdelta	2008	RN	Caicó	adulto	F2					95.6	50				A	3	0	12	18	0	7	7	7				
Ltem	2009	RN	Caicó*	larva	F1	10.8	11.1								L	8	8	50	14	3	2	14	15				
ADDdelta	2009	RN	Caicó	adulto	F1						46.7				A	1	9	80	44	32	9	29	35				
Ltem	2010	RN	Caicó	larva	F2	8.4	9.3	9.6	5.1						L	0	15	14	58	70	6	27	33				
ARRdelta	2010	RN	Caicó	adulto								6.0	11.0	13.1		A	3	0	11	63	22	6	18	20	0.917	0.067	0.017
Ltem	2009	RN	Mossoró	larva	F1	8.9	14.9		3.0						L	4	2	13	10	10	1	7	7				
ARRdelta	2009	RN	Mossoró	adulto	F1							7.7	9.4	10.0	3.83	A	2	54	88	49	60	42	49	59	0.783	0.217	0.000
ARRdelta	2011	RN	Mossoró	adulto	F1							16.0	24.1	27.1	2.79	A									0.383	0.583	0.033
ARRdelta	2007	RN	Natal	adulto	F1					100	70.4				A	0	0	58	3	0	27	15	18				
Ltem	2010	RN	Natal	larva	F1	7.8	11.0	12.2	3.6						L	0	49	13	26	41	1	22	26				
ARRdelta	2010	RN	Natal	adulto	F1							8.4	11.8		3.27	A	0	19	49	45	8	8	22	26			
ADDdelta	2008	RN	Pau dos Ferros	adulto	F2					94.2	54.4				A	0	1	12	32	0	7	9	10				
ADDdelta	2009	RN	Pau dos Ferros	adulto	F1					97.81	85.96				A	66	65	31	3	0	31	33	26				
Ltem	2010	RN	Pau dos Ferros	larva	F2	8.5	11.1	12.0	4.0						L	0	5	16	0	0	1	4	4				
ARRdelta	2010	RN	Pau dos Ferros	adulto	F2							7.4	9.5	10.2	3.60	A	1	19	29	82	14	0	24	29			
ADDdelta	2008	AL	Arapiraca	adulto	F1					100	63				A	0	11	20	63	5	29	21	26				
ADDdelta	2005	AL	Maceió	adulto	F2					62.9	58.2				A	11	6	81	1	1	8	18	19				
ADDdelta	2007	AL	Maceió	adulto	F2					91.1	55.6				A	0	0	38	12	0	9	10	12				
Ltem	2009	AL	Maceió	larva	F1	11.4	12.2		5.5						L	12	37	19	6	1	7	14	14				
ARRdelta	2009	AL	Maceió	adulto	F1							5.6	7.1	7.6	3.68	A	3	2	74	23	12	18	22	26			
Ltem	2010	AL	Santana do Ipanema	larva	F2	88.8	111.8	119.1	4.2						L	0	1	27	6	6	16	9	11				
ARRdelta	2010	AL	Santana do Ipanema	adulto	F2							7.5	10.5	11.6	3.27	A	2	5	58	87	46	15	36	42	0.717	0.250	0.033
ADDdelta	2005	SE	Aracaju	adulto	F2					88.1	80.3				A	3	2	87	23	3	26	24	28	0.867	0.033	0.100	
ADDdelta	2007	SE	Aracaju	adulto							59.3				A	0		34	3	0	12	10	12				
Ltem	2010	SE	Aracaju	larva	F1	11.0	9.6	9.3	8.5						L	6	3	6	34	50	2	17	19				
ARRdelta	2010	SE	Aracaju	adulto	F1							7.5	10.2	11.1	3.39	A	8	16	22	45	3	8	17	19	0.442	0.019	0.538
Ltem	2012	SE	Aracaju	larva	F1	11.2	12.5	12.9	4.2						L	4	9	20	30	39	55	26	31				
ARRdelta	2012	SE	Aracaju	adulto	F1							14.3	17.0	17.8	3.59	A	1	87	36	75	8	32	40	48	0.383	0.100	0.517

cores RRs (temefos e deltametrina):

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

cores ensaios DD

vermelho: mortalidade menor que 80%

laranja: mortalidade entre 80 e 98%

verde: mortalidade maior que 98%

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

GAB: avaliação bioquímica 'global' (média das alterações de Ace, MFO, GST e EST)

GAB - AChE: avaliação bioquímica 'global', apenas resistência metabólica

alelos AaNa_v

S = suscetível a piretróides

R1 = resistente, mutação na posição 1534

R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534

Tabela 17 - taxa de incidência de dengue/ 100 mil habitantes, região Sudeste.

UF	UF (município)	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
MG	Belo Horizonte	210	187	70	18	6	31	216	533	563	2.181	72	23
	Coronel Fabricio	1.496	1.409	293	687	620	77	437	1.196	3.040	988	861	1.459
	Governador Valadares	1.873	487	73	1.086	3	10	143	244	685	498	693	958
	Montes Claros	46	452	10	4	55	239	249	470	114	1.890	117	246
	Ubá	300	439	38	99	3	399	186	588	26	1.095	106	1.287
	Uberaba	333	283	49	66	554	1.474	37	48	56	305	106	72
	Uberlândia	99	130	66	25	675	1.877	75	26	175	818	506	921
ES	Cachoeiro de Itapemirim	173	5.558	20	3	11	117	150	3.323	7	799	770	314
	Cariacica	159	476	1.431	145	30	404	66	224	624	288	825	850
	Colatina	464	849	781	380	149	49	140	1.223	95	3.272	2.824	99
	Vila Velha	391	585	1.514	72	26	496	29	887	1.902	321	889	282
	Vitória	628	1.450	2.032	106	89	239	72	423	1.615	694	1.741	574
RJ	Cabo Frio	678	1.496	53	15	9	191	431	288	17	910	2.825	1.557
	Campos dos Goytacazes	4	3	1	0	1	18	503	1.907	61	437	865	260
	Duque de Caxias	34	1.361	5	2	1	17	71	1.606	22	144	1.084	321
	Itaperuna	1.342	817	77	15	15	120	1.800	131	29	1.370	853	378
	Niterói	2.700	4.283	117	48	24	151	1.525	1.276	152	265	1.039	1.303
	Nova Iguaçu	38	132	2	1	2	45	186	1.677	13	29	394	333
	Rio de Janeiro	472	2.461	25	9	15	230	413	1.709	45	45	1.188	2.086
	São Gonçalo	547	1.374	21	14	7	42	305	263	24	148	460	946
	São João de Meriti	227	503	4	2	2	21	56	1.257	15	53	670	328
	São José do Vale do Rio Preto	5	138	0	0	0	5	20	163	0	257	469	40
	Três Rios	912	183	4	4	4	1	35	76	10	14	136	17
Volta Redonda	101	1.885	312	6	4	160	101	437	44	62	2.338	382	

Tabela 17 - taxa de incidência de dengue/ 100 mil habitantes, região Sudeste.

UF	UF (município)	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
SP	Araçatuba	322	461	1.713	2	13	1.311	1.372	7	341	6.620	43	312
	Barretos	3.194	29	6	26	55	287	445	201	93	971	1.035	338
	Bauru	69	36	42	1	10	15	579	46	8	184	1.263	10
	Botucatu	1	12	6	1	1	5	20	5	3	19	22	4
	Campinas	1	1	0	0	1	78	1.386	37	22	261	316	100
	Itapevi	0	418	743	0	0	22	134	104	8	14	49	7
	Itu	6	67	32	1	0	12	114	12	65	69	226	21
	Jandira	3	162	296	0	1	36	239	78	14	19	32	32
	Marília	14	56	2	0	0	10	1.219	4	8	430	33	12
	Presidente Prudente	0	0	0	0	0	137	120	5	14	180	98	126
	Registro	2	18	4	0	2	2	7	0	2	1.546	88	6
	Ribeirão Preto	528	58	132	8	106	1.071	457	152	296	4.921	4.570	55
	Santana do Parnaíba	20	6	10	0	1	17	29	23	25	51	352	6
	Santos	2.833	2.432	206	98	306	641	205	25	36	1.875	32	273
	São Carlos	19	20	13	3	5	15	36	24	8	130	64	12
	São José do Rio Preto	1.696	238	111	15	96	3.200	2.571	71	321	5.920	222	101
	São José dos Campos	0	1	0	0	0	10	104	40	5	166	419	24
	São Sebastião	7	26	15	1	3	17	39	6	7	76	51	16
	São Paulo	1.113	2.272	20	60	16	991	331	130	165	2.333	522	112
	Sorocaba	3	11	5	1	1	18	57	6	16	71	303	4

Legenda: Incidência de dengue a partir de 300 casos por 100 mil habitantes já é indicativo de epidemia, de acordo com o MS. Levando isto em conta, valores de incidência anual de dengue até 300 estão apresentadas em fundo verde. Em azul e fonte maior, os municípios avaliados para temephos e/ou deltametrina.

Tabela 18 - Histórico da distribuição de larvicidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Sudeste.



Legenda: Estados - MG: Minas Gerais; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; e SP: São Paulo. Inseticidas - tem: temephos; Bti: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; e IGR: *Insect Growth Regulators* .

Tabela 19 - Consolidado da resistência de populações de *A. aegypti* da Região Sudeste ao larvicida temephos. Para os bioensaios quantitativos estão indicadas as Razões de Resistência (RR), o 'slope' (uma medida de heterogeneidade das populações) e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas, que tratam de mecanismos de resistência metabólica, e do sítio alvo de organofosforados, acetilcolinesterase.

ano	estado	população	bioensaio dose-resposta temephos					referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99 Rock					
			geração	RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅	slope			AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2005	MG	Belo Horizonte				5.4		Belinato et al 2013							
2008	MG	Belo Horizonte	F1	7.4	10.8		3.49	presente estudo							
2011	MG	Governador Valadares	F1	19.2	19.5	19.5	4.92	presente estudo							
2005	MG	Montes Claros				13.6		Belinato et al 2013							
2010	MG	Ubá	F2	10.8	13.2		4.31	presente estudo							
2005	MG	Uberaba				9.6		Martins et al 2012							
2005	MG	Uberlândia	F1	7.3	8.6	9.0	3.25	presente estudo							
2007	ES	Cachoeiro de Itapemirim	F2	14.5	19.7	21.5	3.63	presente estudo							
2009	ES	Cachoeiro de Itapemirim	F1	8.9	17.5		2.55	presente estudo	F1	3	18	75	19	8	1
2011	ES	Cachoeiro de Itapemirim	F1	18.4	17.4	17.1	5.57	Bellinato et al 2016							
2007	ES	Colatina	F2	12.7	17.4	19.1	3.57	presente estudo							
2009	ES	Colatina	F1	11.0	14.4	15.5	3.95	presente estudo	F2	0	6	47	0	0	0
2005	ES	Vila Velha	F1	6.4	7.5	7.8	3.25	presente estudo							
2008	ES	Vila Velha	F1	6.8	10.1	11.3	3.36	presente estudo							
2010	ES	Vila Velha	F1	6.3	8.5	9.3	3.77	presente estudo	F1	0	0	27	0	0	0
2005	ES	Vitória	F1	6.0	6.3	6.4	3.72	presente estudo							
2008	ES	Vitória	F1	7.9	10.6	11.5	3.83	presente estudo							
2010	ES	Vitória	F1	6.0	8.0		3.88	presente estudo	F1	0	1	12	0	0	2
2003	RJ	Cabo Frio				5.5		Montella et al 2007							
2008	RJ	Cabo Frio	F1	6.9	10.1	11.2	3.44	presente estudo		22	0	66	0	0	0
2001	RJ	Campos dos Goytacazes		8.5	7.8			Braga et al 2004							
2003	RJ	Campos dos Goytacazes				4.2		Montella et al 2007							
1999	RJ	Duque de Caxias		5.2	8.7			Lima et al 2003							
2001	RJ	Duque de Caxias		7.5	8.5			Braga et al 2004							
2003	RJ	Itaperuna				16.8		Montella et al 2007							
2011	RJ	Itaperuna	F2	12.7	21.9	25.6	2.61	presente estudo							
2001	RJ	Niterói		13.5	14.4			Braga et al 2004							
2003	RJ	Niterói				11.7		Montella et al 2007							
2001	RJ	Nova Iguaçu		8	8.2			Braga et al 2004							
2003	RJ	Nova Iguaçu				12.8		Montella et al 2007							
2008	RJ	Nova Iguaçu*	F1	9.3	10.1		3.51	presente estudo		45	0	77	0	0	1
2001	RJ	Rio de Janeiro		12.2	11.8			Braga et al 2004							
2002	RJ	Rio de Janeiro		13.2	15.8			Braga et al 2005							
2003	RJ	Rio de Janeiro				6.5		Montella et al 2007							
2004	RJ	Rio de Janeiro				12.5		Montella et al 2007							
2011	RJ	Rio de Janeiro	F1	7.1	8.5	9.0	3.86	presente estudo	F1	0	0	12	0	0	0
1999	RJ	São Gonçalo		7.6	12.4			Lima et al 2003							
2001	RJ	São Gonçalo		15.5	16.8			Braga et al 2004							
2008	RJ	São Gonçalo	F2	7.5	10.8	12.0	3.50	presente estudo		25	0	30	0	0	0
1999	RJ	São João de Meriti		3.0	3.6			Lima et al 2003							
2001	RJ	São João de Meriti		5.8	7.5			Braga et al 2004							
2002	RJ	São José do Vale do Rio Preto				3.0		Montella et al 2007							
2002	RJ	Três Rios				8.2		Montella et al 2007							
2003	RJ	Volta Redonda				5.2		Montella et al 2007							
2008	RJ	Volta Redonda	F2	6.4	7.0	7.1	5.22	presente estudo							

ano	estado	população	bioensaio dose-resposta temephos				referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99 Rock						
			geração	RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅			slope	AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
1998	SP	Araçatuba		2.1			Macoris et al 1999								
1999	SP	Araçatuba				2.2	Macoris et al 2003								
2000	SP	Araçatuba		2.1		2.2	Moyes et al 2017								
2001	SP	Araçatuba		1.7		2.2	Moyes et al 2017								
2002	SP	Araçatuba		2.2		2.5	Moyes et al 2017								
2003	SP	Araçatuba		1.9		2.6	Moyes et al 2017								
2004	SP	Araçatuba		2.3		3.4	Moyes et al 2017								
2005	SP	Araçatuba		2.2		3.1	Macoris et al 2006								
2006	SP	Araçatuba		3.4		3.5	Moyes et al 2017								
2007	SP	Araçatuba		3.8		4.7	Moyes et al 2017								
2008	SP	Araçatuba		2.9		4.0	Moyes et al 2017								
2009	SP	Araçatuba		2.5		3.3	Moyes et al 2017								
2010	SP	Araçatuba		2.2		3.2	Moyes et al 2017								
2011	SP	Araçatuba		3.2		4.9	Moyes et al 2017								
2013	SP	Araçatuba		3.7		4.6	Moyes et al 2017								
2015	SP	Araçatuba		2.5		2.8	Moyes et al 2017								
1998	SP	Barretos		2.4			Moyes et al 2017								
1999	SP	Barretos				2.4	Macoris et al 2003								
1999	SP	Barretos		3.6			Moyes et al 2017								
2000	SP	Barretos		1.7		2.4	Macoris et al 2007								
2001	SP	Barretos		2.3		2.8	Moyes et al 2017								
2002	SP	Barretos		2.3		3.1	Moyes et al 2017								
2003	SP	Barretos		2.2		3.4	Moyes et al 2017								
2004	SP	Barretos		1.9		2.7	Moyes et al 2017								
2005	SP	Barretos		1.7		2.7	Macoris et al 2006								
2006	SP	Barretos		3.8		3.9	Moyes et al 2017								
2008	SP	Barretos		2.8		3.6	Moyes et al 2017								
2009	SP	Barretos		3.0		5.2	Moyes et al 2017								
2010	SP	Barretos		4.3		5.2	Moyes et al 2017								
2012	SP	Barretos		3.2		4.7	Moyes et al 2017								
2014	SP	Barretos		3.2		4.3	Moyes et al 2017								
2015	SP	Barretos		3.1		3.3	Moyes et al 2017								
1998	SP	Bauru		1.5			Macoris et al 1999								
1999	SP	Bauru				1.5	Macoris et al 2003								
1999	SP	Bauru		2.1			Moyes et al 2017								
2000	SP	Bauru		1.3		1.5	Macoris et al 2007								
2001	SP	Bauru		1.4		1.8	Moyes et al 2017								
2002	SP	Bauru		1.6		1.8	Moyes et al 2017								
2003	SP	Bauru		1.4		2.0	Moyes et al 2017								
2004	SP	Bauru		1.7		2.2	Moyes et al 2017								
2006	SP	Bauru		2.6		2.7	Moyes et al 2017								
2008	SP	Bauru		2.8		5.0	Moyes et al 2017								
2009	SP	Bauru		2.2		3.8	Moyes et al 2017								
2010	SP	Bauru		2.4		3.0	Moyes et al 2017								
2011	SP	Bauru		2.7		6.5	Moyes et al 2017								
2012	SP	Bauru		2.7		3.9	Moyes et al 2017								
2013	SP	Bauru		3.4		5.0	Moyes et al 2017								
2015	SP	Bauru		2.1		3.3	Moyes et al 2017								

ano	estado	população	bioensaio dose-resposta temephos				referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99 Rock						
			geração	RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅			slope	AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2004	SP	Botucatu		1.6		2.2		Moyes et al 2017							
2006	SP	Botucatu		2.1		2.2		Moyes et al 2017							
2008	SP	Botucatu		1.6		1.8		Moyes et al 2017							
2010	SP	Botucatu		2.0		2.2		Moyes et al 2017							
2012	SP	Botucatu		1.9		2.2		Moyes et al 2017							
2014	SP	Botucatu		2.0		2.8		Moyes et al 2017							
1998	SP	Campinas		2.7				Macoris et al 1999							
1999	SP	Campinas				2.6		Macoris et al 2003							
1999	SP	Campinas		3.7				Moyes et al 2017							
2000	SP	Campinas		1.8		2.6		Macoris et al 2007							
2001	SP	Campinas		2.1		2.9		Moyes et al 2017							
2002	SP	Campinas		1.7		1.9		Moyes et al 2017							
2003	SP	Campinas		2.1		2.8		Moyes et al 2017							
2004	SP	Campinas		1.3		2.5		Moyes et al 2017							
2005	SP	Campinas		1.4		2.2		Moyes et al 2017							
2007	SP	Campinas		2.8		3.6		Moyes et al 2017							
2009	SP	Campinas		2.3		3.1		Moyes et al 2017							
2011	SP	Campinas		2.9		5.5		Moyes et al 2017							
2013	SP	Campinas		2.4		3.5		Moyes et al 2017							
2015	SP	Campinas		1.8		1.8		Moyes et al 2017							
2004	SP	Itapevi		5.2		7.3		Moyes et al 2017							
2006	SP	Itapevi		3.8		4.6		Moyes et al 2017							
2009	SP	Itapevi		3.0		5.2		Moyes et al 2017							
2012	SP	Itapevi		2.7		4.5		Moyes et al 2017							
2014	SP	Itapevi		2.9		4.5		Moyes et al 2017							
2008	SP	Itu		2.8		3.4		Moyes et al 2017							
2010	SP	Itu		2.6		3.0		Moyes et al 2017							
2003	SP	Itu		2.2		3.3		Moyes et al 2017							
2005	SP	Itu		2.0		3.3		Moyes et al 2017							
2006	SP	Jandira		3.5		4.4		Moyes et al 2017							
1998	SP	Marília		1.6				Macoris et al 1999							
1999	SP	Marília				1.7		Macoris et al 2003							
2000	SP	Marília		1.6		1.7		Macoris et al 2007							
2001	SP	Marília		1.7		1.9		Moyes et al 2017							
2002	SP	Marília		1.6		1.8		Moyes et al 2017							
2003	SP	Marília		1.4		1.8		Moyes et al 2017							
2004	SP	Marília		1.6		2.1		Moyes et al 2017							
2005	SP	Marília		1.2		1.8		Moyes et al 2017							
2007	SP	Marília		2.6		3.3		Moyes et al 2017							
2009	SP	Marília		2.0		2.7		Moyes et al 2017							
2010	SP	Marília		2.3		3.2		Moyes et al 2017							
2011	SP	Marília		2.7		4.9		Moyes et al 2017							
2012	SP	Marília		2.2		3.3		Moyes et al 2017							
2013	SP	Marília		2.5		3.5		Moyes et al 2017							
2015	SP	Marília		2.1		2.8		Moyes et al 2017							

ano	estado	população	bioensaio dose-resposta temephos				referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99 Rock					
			geração	RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅			slope	AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST
1998	SP	Presidente Prudente		1.7				Macoris et al 1999						
1999	SP	Presidente Prudente					1.2	Macoris et al 2003						
1999	SP	Presidente Prudente		2.3				Moyes et al 2017						
2000	SP	Presidente Prudente		1.2			1.2	Macoris et al 2007						
2001	SP	Presidente Prudente		1.4			1.5	Moyes et al 2017						
2002	SP	Presidente Prudente		1.7			2.4	Moyes et al 2017						
2002	SP	Presidente Prudente		1.8	1.8			Braga IA et al 2005						
2003	SP	Presidente Prudente		1.6			2.1	Moyes et al 2017						
2004	SP	Presidente Prudente		1.5			1.7	Moyes et al 2017						
2006	SP	Presidente Prudente		2.3			2.5	Moyes et al 2017						
2007	SP	Presidente Prudente		3.3			3.8	Moyes et al 2017						
2008	SP	Presidente Prudente		2.6			4.1	Moyes et al 2017						
2009	SP	Presidente Prudente		3.5			4.2	Moyes et al 2017						
2010	SP	Presidente Prudente		2.8			3.2	Moyes et al 2017						
2011	SP	Presidente Prudente		2.9			4.1	Moyes et al 2017						
2015	SP	Registro		2.3			2.3	Moyes et al 2017						
1999	SP	Ribeirão Preto					2.8	Macoris et al 2003						
2000	SP	Ribeirão Preto		2.3			2.8	Macoris et al 2007						
2001	SP	Ribeirão Preto		2.3			2.9	Moyes et al 2017						
2002	SP	Ribeirão Preto		2.2			2.5	Moyes et al 2017						
2003	SP	Ribeirão Preto		2.6			3.8	Moyes et al 2017						
2004	SP	Ribeirão Preto		2.0			2.8	Moyes et al 2017						
2005	SP	Ribeirão Preto		2.4			3.5	Macoris et al 2006						
2006	SP	Ribeirão Preto		4.1			3.4	Moyes et al 2017						
2007	SP	Ribeirão Preto		3.2			4.2	Moyes et al 2017						
2008	SP	Ribeirão Preto		3.1			3.4	Moyes et al 2017						
2009	SP	Ribeirão Preto		2.6			3.1	Moyes et al 2017						
2010	SP	Ribeirão Preto		2.9			4.1	Moyes et al 2017						
2011	SP	Ribeirão Preto		2.4			3.3	Moyes et al 2017						
2013	SP	Ribeirão Preto		3.1			4.2	Moyes et al 2017						
2015	SP	Ribeirão Preto		2.4			3.0	Moyes et al 2017						
2001	SP	Santana do Parnaíba		2.3			3.1	Moyes et al 2017						
2003	SP	Santana do Parnaíba		1.7			2.0	Moyes et al 2017						
2005	SP	Santana do Parnaíba		2.1			2.9	Moyes et al 2017						
2008	SP	Santana do Parnaíba		2.1			3.0	Moyes et al 2017						
2010	SP	Santana do Parnaíba		3.3			4.2	Moyes et al 2017						
2012	SP	Santana do Parnaíba		2.4			3.5	Moyes et al 2017						
2014	SP	Santana do Parnaíba		3.3			3.7	Moyes et al 2017						

ano	estado	população	bioensaio dose-resposta temephos				referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99 Rock					
			geração	RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅			slope	AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST
1998	SP	Santos		6.3				Macoris et al 1999						
1999	SP	Santos				2.9		Macoris et al 2003						
1999	SP	Santos		1.9				Moyes et al 2017						
2000	SP	Santos		2.7		2.9		Macoris et al 2007						
2001	SP	Santos		3.9		4.8		Moyes et al 2017						
2002	SP	Santos		3.6		4.1		Moyes et al 2017						
2003	SP	Santos		4.1		4.7		Moyes et al 2017						
2004	SP	Santos		3.6		4.1		Moyes et al 2017						
2005	SP	Santos		3.4		10.6		Macoris et al 2006						
2006	SP	Santos		4.7		6.8		Moyes et al 2017						
2007	SP	Santos		5.2		4.3		Moyes et al 2017						
2008	SP	Santos		3.8		4.8		Moyes et al 2017						
2009	SP	Santos		3.9		5.0		Moyes et al 2017						
2010	SP	Santos		3.3		3.6		Moyes et al 2017						
2011	SP	Santos		3.2		4.5		Moyes et al 2017						
2012	SP	Santos		5.0		4.3		Moyes et al 2017						
2013	SP	Santos		3.4		3.8		Moyes et al 2017						
2015	SP	Santos		2.5		3.0		Moyes et al 2017						
2004	SP	São Carlos		1.3		1.8		Moyes et al 2017						
2005	SP	São Carlos		1.6		2.5		Moyes et al 2017						
2006	SP	São Carlos		2.1		2.7		Moyes et al 2017						
2008	SP	São Carlos		2.2		2.8		Moyes et al 2017						
2010	SP	São Carlos		2.6		3.2		Moyes et al 2017						
1998	SP	São José do Rio Preto		2.5				Macoris et al 1999						
1999	SP	São José do Rio Preto				2.4		Macoris et al 2003						
1999	SP	São José do Rio Preto		4.2				Moyes et al 2017						
2000	SP	São José do Rio Preto		1.8		2.4		Macoris et al 2007						
2001	SP	São José do Rio Preto		2.1		3.0		Moyes et al 2017						
2002	SP	São José do Rio Preto		2.6		4.3		Moyes et al 2017						
2003	SP	São José do Rio Preto		2.8		5.1		Moyes et al 2017						
2004	SP	São José do Rio Preto		2.3		3.5		Moyes et al 2017						
2005	SP	São José do Rio Preto		2.2		3.1		Macoris et al 2006						
2006	SP	São José do Rio Preto		4.1		5.1		Moyes et al 2017						
2007	SP	São José do Rio Preto		4.4		6.2		Moyes et al 2017						
2008	SP	São José do Rio Preto		3.0		5.6		Moyes et al 2017						
2009	SP	São José do Rio Preto		3.2		5.4		Moyes et al 2017						
2010	SP	São José do Rio Preto		3.2		5.2		Moyes et al 2017						
2012	SP	São José do Rio Preto		2.7		4.1		Moyes et al 2017						
2013	SP	São José do Rio Preto		3.4		4.8		Moyes et al 2017						
2015	SP	São José do Rio Preto		2.8		3.5		Moyes et al 2017						
2015	SP	São José dos Campos		2.6		2.8		Moyes et al 2017						

ano	estado	população	bioensaio dose-resposta temephos				referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99 Rock						
			geração	RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅			slope	ACHe	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
1999	SP	São Paulo				2.5	Macoris et al 2003								
2003	SP	São Paulo (Ipiranga)		3.3		5.5	Moyes et al 2017								
2004	SP	São Paulo (Ipiranga)		4.1		9.2	Moyes et al 2017								
2005	SP	São Paulo (Nova Europa)		2.2		3.1	Moyes et al 2017								
2000	SP	São Paulo (Pirituba)		1.5		2.5	Macoris et al 2007								
2001	SP	São Paulo (Pirituba)		2.1		2.7	Moyes et al 2017								
2003	SP	São Paulo (Pirituba)		2.4		3.1	Moyes et al 2017								
2005	SP	São Paulo (Pirituba)		1.9		3.1	Moyes et al 2017								
2008	SP	São Paulo (Pirituba)		2.4		3.0	Moyes et al 2017								
2010	SP	São Paulo (Pirituba)		2.4		3.8	Moyes et al 2017								
2011	SP	São Paulo (Pirituba)		3.2		5.5	Moyes et al 2017								
2013	SP	São Paulo (Pirituba)		2.8		3.8	Moyes et al 2017								
2015	SP	São Paulo (Pirituba)		1.8		2.2	Moyes et al 2017								
2001	SP	São Sebastião		3.2		3.4	Moyes et al 2017								
2003	SP	São Sebastião		3.6		4.1	Moyes et al 2017								
2004	SP	São Sebastião		8.1		10.5	Moyes et al 2017								
2005	SP	São Sebastião		2.4		2.8	Moyes et al 2017								
2006	SP	São Sebastião		4.9		4.5	Moyes et al 2017								
2007	SP	São Sebastião		4.8		4.8	Moyes et al 2017								
2008	SP	São Sebastião		3.4		3.4	Moyes et al 2017								
2009	SP	São Sebastião		3.5		4.8	Moyes et al 2017								
2010	SP	São Sebastião		5.7		5.0	Moyes et al 2017								
2011	SP	São Sebastião		3.7		4.1	Moyes et al 2017								
2013	SP	São Sebastião		3.6		5.1	Moyes et al 2017								
2015	SP	São Sebastião		2.8		2.7	Moyes et al 2017								
2003	SP	Sorocaba		2.0		3.3	Moyes et al 2017								
2004	SP	Sorocaba		2.0		3.8	Moyes et al 2017								
2005	SP	Sorocaba		2.4		3.3	Moyes et al 2017								
2007	SP	Sorocaba		4.0		4.5	Moyes et al 2017								
2009	SP	Sorocaba		2.6		4.1	Moyes et al 2017								
2011	SP	Sorocaba		2.7		4.2	Moyes et al 2017								
2013	SP	Sorocaba		3.3		4.2	Moyes et al 2017								
2015	SP	Sorocaba		2.1		2.2	Moyes et al 2017								

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutationa-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). **GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as**

cores RRs:

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

Tabela 20 - Histórico da distribuição de adulticidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Sudeste.

estado	inseticida	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
MG	PI	[Barra cinza]												
	OP	[Barra cinza]					[Barra escura]							
ES	PI	[Barra cinza]											[Barra cinza]	
	OP	[Barra cinza]									[Barra escura]			
RJ	PI	[Barra cinza]										[Barra cinza]	[Barra cinza]	
	OP	[Barra cinza]				[Barra escura]								
SP	PI	[Barra cinza]				[Barra cinza]								
	OP	[Barra escura]												

Legenda: Estados - MG: Minas Gerais; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; e SP: São Paulo. Inseticidas - PI: piretroides; e OP: organofosforado - malathion.

Tabela 21 - Resistência de populações de *A. aegypti* da Região Sudeste ao adulticida deltametrina, ensaios qualitativos e 'bioquímicos'. Para os bioensaios qualitativos estão indicadas a porcentagem de mortalidade após 24 horas de exposição para as metodologias 'CDC', 'WHO' e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas.

		bioensaios dose-diagnóstica com deltametrina						mecanismos de resistência, % > p99						
ano	estado	população	CDC, garrafa impregnada		OMS, papel impregnado		referência	geração	AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
			geração	% mort 24 horas	geração	% mort 24 horas								
2005	MG	Belo Horizonte	F2	74.5	F2	84.0	Belinato et al 2013/presente estudo	(&)		8	72	64	44	81
2008	MG	Belo Horizonte	F1	47.4	F1	57.0	presente estudo	-	3	7	32	15	3	5
2005	MG	Montes Claros	F2	62.7	F2	82.2	Belinato et al 2013	F2 (&)	0	0	98	38	0	47
2005	MG	Uberaba	F1	55.3	F1/F2	61.3	Martins et al 2009	F1 (&)	1	2	86	52	23	29
2005	MG	Uberlândia	F1	72.7	F1	68.2	presente estudo	F1	0	4	87	47	42	51
2007	ES	Cachoeiro de Itapemirim	F2	93.3	F2	31.5	presente estudo		77	76	35	89	51	46
2007	ES	Colatina	F2	82.3	F2	35.2	presente estudo		24	78	6	54	6	2
2005	ES	Vila Velha	F1	58.9			presente estudo	F1	37	7	95	53	13	48
2008	ES	Vila Velha	F1	21.7	F1	52.6	presente estudo	-	61	52	18	57	18	14
2005	ES	Vitória	F1	63.2	F1	69.0	presente estudo	F1		30	96	61	38	78
2008	ES	Vitória	F1	53.3	F1	44.4	presente estudo	-	15	38	20	70	23	22
2008	RJ	Cabo Frio	F1	39.3	F1	35.6	presente estudo	F1	8	0	76	45	37	76
2008	RJ	São Gonçalo	F2	67.8	F2	49.7	presente estudo	F2	8	1	65	0	0	65
2008	RJ	Nova Iguaçu	F1	87.4	F1	33.4	presente estudo	F1	12	29	80	8	0	80
2008	RJ	Volta Redonda	F2	92.0			presente estudo							
2006	SP	Araçatuba				45.1	Moyes et al 2017							
2007	SP	Araçatuba		77.8		26.6	Moyes et al 2017							
2008	SP	Araçatuba		87.8		5.6	Moyes et al 2017							
2009	SP	Araçatuba		74.6		38.1	Moyes et al 2017							
2010	SP	Araçatuba				42.5	Moyes et al 2017							
2011	SP	Araçatuba				64.3	Macoris et al 2014							
2012	SP	Araçatuba				48.2	Moyes et al 2017							
2013	SP	Araçatuba				49.3	Moyes et al 2017							
2014	SP	Araçatuba				12.7	Moyes et al 2017							
2015	SP	Araçatuba		27.7			Moyes et al 2017							
2016	SP	Araçatuba		34.4			Moyes et al 2017							
2006	SP	Barretos				39.8	Moyes et al 2017							
2008	SP	Barretos		87.3		1.8	Moyes et al 2017							
2009	SP	Barretos		67.8		55.9	Moyes et al 2017							
2010	SP	Barretos				69.6	Moyes et al 2017							
2012	SP	Barretos				46.3	Moyes et al 2017							
2014	SP	Barretos				38.5	Moyes et al 2017							
2015	SP	Barretos		54.4			Moyes et al 2017							
2016	SP	Barretos		41.0			Moyes et al 2017							

bioensaios dose-diagnóstica com deltametrina

ano	estado	população	CDC, garrafa impregnada		OMS, papel impregnado		referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99						
			geração	% mort 24 horas	geração	% mort 24 horas			AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	
2006	SP	Bauru				64.5	Moyes et al 2017								
2008	SP	Bauru		93.3		44.5	Moyes et al 2017								
2009	SP	Bauru		90.7		83.0	Moyes et al 2017								
2010	SP	Bauru				78.2	Moyes et al 2017								
2011	SP	Bauru				81.2	Moyes et al 2017								
2012	SP	Bauru				70.7	Moyes et al 2017								
2013	SP	Bauru				66.0	Moyes et al 2017								
2014	SP	Bauru				59.4	Moyes et al 2017								
2015	SP	Bauru		43.4			Moyes et al 2017								
2016	SP	Bauru		59.9			Moyes et al 2017								
2007	SP	Campinas		80.0		56.3	Moyes et al 2017								
2009	SP	Campinas		76.5		53.6	Moyes et al 2017								
2011	SP	Campinas				65.5	Moyes et al 2017								
2012	SP	Campinas				69.9	Moyes et al 2017								
2013	SP	Campinas				80.2	Moyes et al 2017								
2014	SP	Campinas				51.2	Moyes et al 2017								
2015	SP	Campinas		32.4			Moyes et al 2017								
2016	SP	Campinas		35.5			Moyes et al 2017								
2006	SP	Itapevi				68.9	Moyes et al 2017								
2009	SP	Itapevi		78.7		63.9	Moyes et al 2017								
2012	SP	Itapevi				82.2	Moyes et al 2017								
2014	SP	Itapevi				50.8	Moyes et al 2017								
2016	SP	Itapevi		31.0			Moyes et al 2017								
2008	SP	Itu		87.4		62.5	Moyes et al 2017								
2010	SP	Itu				68.7	Moyes et al 2017								
2006	SP	Jandira				57.2	Moyes et al 2017								
2007	SP	Marília		97.0		68.8	Moyes et al 2017								
2009	SP	Marília		79.1		81.3	Moyes et al 2017								
2010	SP	Marília				84.3	Moyes et al 2017								
2011	SP	Marília				73.5	Moyes et al 2017								
2012	SP	Marília				65.6	Moyes et al 2017								
2013	SP	Marília				57.8	Moyes et al 2017								
2014	SP	Marília				57.5	Moyes et al 2017								
2015	SP	Marília		44.4			Moyes et al 2017								
2016	SP	Marília		88.1			Moyes et al 2017								

bioensaios dose-diagnóstica com deltametrina

ano	estado	população	CDC, garrafa impregnada		OMS, papel impregnado		referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99						
			geração	% mort 24 horas	geração	% mort 24 horas			AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	
2006	SP	Presidente Prudente				53.4	Moyes et al 2017								
2007	SP	Presidente Prudente		74.1		49.1	Moyes et al 2017								
2008	SP	Presidente Prudente		76.5		32.7	Moyes et al 2017								
2009	SP	Presidente Prudente		44.7		46.0	Moyes et al 2017								
2010	SP	Presidente Prudente				59.4	Moyes et al 2017								
2011	SP	Presidente Prudente				40.5	Moyes et al 2017								
2012	SP	Presidente Prudente				73.3	Moyes et al 2017								
2013	SP	Presidente Prudente				44.5	Moyes et al 2017								
2014	SP	Presidente Prudente				61.7	Moyes et al 2017								
2015	SP	Presidente Prudente		27.3			Moyes et al 2017								
2016	SP	Presidente Prudente		56.9			Moyes et al 2017								
2015	SP	Registro		70.8			Moyes et al 2017								
2016	SP	Registro		27.9			Moyes et al 2017								
2006	SP	Ribeirão Preto				38.8	Moyes et al 2017								
2007	SP	Ribeirão Preto		73.1		39.0	Moyes et al 2017								
2008	SP	Ribeirão Preto		82.0		17.6	Moyes et al 2017								
2009	SP	Ribeirão Preto		68.2		49.1	Moyes et al 2017								
2010	SP	Ribeirão Preto				55.1	Moyes et al 2017								
2011	SP	Ribeirão Preto				69.7	Moyes et al 2017								
2012	SP	Ribeirão Preto				48.6	Moyes et al 2017								
2013	SP	Ribeirão Preto				46.5	Moyes et al 2017								
2014	SP	Ribeirão Preto				51.0	Moyes et al 2017								
2015	SP	Ribeirão Preto		46.4			Moyes et al 2017								
2016	SP	Ribeirão Preto		40.8			Moyes et al 2017								
2008	SP	Santana do Parnaíba		86.2		18.5	Moyes et al 2017								
2010	SP	Santana do Parnaíba				70.2	Moyes et al 2017								
2012	SP	Santana do Parnaíba				42.5	Moyes et al 2017								
2014	SP	Santana do Parnaíba				32.8	Moyes et al 2017								
2016	SP	Santana do Parnaíba		53.5			Moyes et al 2017								
2006	SP	Santos				25.4	Moyes et al 2017								
2007	SP	Santos		81.4		24.3	Moyes et al 2017								
2008	SP	Santos		87.9		5.5	Moyes et al 2017								
2009	SP	Santos		63.4		58.0	Moyes et al 2017								
2010	SP	Santos				50.5	Moyes et al 2017								
2011	SP	Santos				49.6	Macoris et al 2014								
2012	SP	Santos				28.3	Moyes et al 2017								
2013	SP	Santos				36.8	Moyes et al 2017								
2014	SP	Santos				40.4	Moyes et al 2017								
2015	SP	Santos		23.2			Moyes et al 2017								
2016	SP	Santos		37.7			Moyes et al 2017								

bioensaios dose-diagnóstica com deltametrina

ano	estado	população	CDC, garrafa impregnada		OMS, papel impregnado		referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99											
			geração	% mort 24 horas	geração	% mort 24 horas			AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST						
2006	SP	São Carlos				71.8														
2008	SP	São Carlos		89.7		57.7														
2010	SP	São Carlos				77.8														
2006	SP	São José do Rio Preto				65.6														
2007	SP	São José do Rio Preto		90.9		57.0														
2008	SP	São José do Rio Preto		88.7		13.2														
2009	SP	São José do Rio Preto		49.9		47.4														
2010	SP	São José do Rio Preto				58.8														
2012	SP	São José do Rio Preto				51.8														
2013	SP	São José do Rio Preto				36.3														
2014	SP	São José do Rio Preto				44.7														
2015	SP	São José do Rio Preto		40.4																
2016	SP	São José do Rio Preto		65.1																
2016	SP	São José dos Campos		12.7																
2008	SP	São Paulo (Pirituba)		85.9		32.5														
2010	SP	São Paulo (Pirituba)				65.0														
2011	SP	São Paulo (Pirituba)				49.0														
2013	SP	São Paulo (Pirituba)				56.0														
2015	SP	São Paulo (Pirituba)		57.2																
2006	SP	São Sebastião				30.1														
2007	SP	São Sebastião		86.4		46.7														
2008	SP	São Sebastião		78.9		2.7														
2009	SP	São Sebastião		76.9		55.7														
2010	SP	São Sebastião				54.9														
2011	SP	São Sebastião				27.9														
2012	SP	São Sebastião				39.7														
2013	SP	São Sebastião				34.0														
2014	SP	São Sebastião				43.3														
2015	SP	São Sebastião		11.0																
2016	SP	São Sebastião		16.6																
2007	SP	Sorocaba		71.4		48.8														
2009	SP	Sorocaba		73.9		68.1														
2011	SP	Sorocaba				55.5														
2013	SP	Sorocaba				82.0														
2015	SP	Sorocaba		51.4																

legenda

vermelho: mortalidade menor que 80%

laranja: mortalidade entre 80 e 98%

verde: mortalidade maior que 98%

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

(&) dados de mecanismos de resistência: presente estudo

Tabela 22 - Resistência de populações de *A. aegypti* da Região Sudeste ao adjuvante deltametrina, bioensaios quantitativos, frequência de mutações no AaNa_v e ensaios 'bioquímicos'. Legendas dos bioensaios e 'bioquímicos' como na Tabela 19. Indicações sobre os alelos de AaNa_v são apresentadas no texto e abaixo da figura.

ano	estado	população	geração	bioensaios dose-resposta deltametrina				referência	Frequência alelos AaNa _v			mecanismos de resistência, % > p99							
				RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅	slope		S	R1	R2	geração	AChE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	
2011	SE	MG	Governador Valadares	F1	19.4	34.5		2.41	presente estudo	0.117	0.317	0.567							
2010	SE	MG	Ubá	F2	25.6	35.7	39.4	3.27	presente estudo				F2	30	3	62	84	17	95
2009	SE	ES	Cachoeiro de Itapemirim	F1	33.8	42.6	45.6	3.71	presente estudo				F1	0	26	60	46	12	60
2011	SE	ES	Cachoeiro de Itapemirim*	F1	49.0	78.6		2.16	Bellinato et al 2016	0.103	0.224	0.672	F1	0	0	98	20	3	99
2009	SE	ES	Colatina	F1	9.8	13.4	14.7	3.36	presente estudo				F1	8	9	70	86	43	70
2010	SE	ES	Vila Velha	F3	35.9	47.1	51.0	3.52	presente estudo				F1	51	0	27	90	36	12
2010	SE	ES	Vitória	F1	28.6	46.7		3.59	presente estudo	0.083	0.033	0.883	F1	1	14	3	44	14	25
2008	SE	RJ	São Gonçalo	F1	5.7	9.1		2.84	presente estudo	0.462	0.288	0.250	F2	8	1	65	0	0	65
2011	SE	RJ	Itaperuna	F2	17.4	29.7	34.6	2.50	presente estudo	0.333	0.167	0.500							
2011	SE	RJ	Rio de Janeiro	F1	26.1	34.2		3.21	presente estudo				F1	54	5	42	75	35	7
2011	SE	SP	Araçatuba				72		Macoris et al 2014										
2011	SE	SP	Marília				40.9		Macoris et al 2014										
2011	SE	SP	Santos				95		Macoris et al 2014										

cores RR:

verde - RR95 menor ou igual a 3
 vermelho - RR95 maior que 3

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15
 %> p99Rock entre 15 e 50
 %> p99Rock maior que 50

alelos AaNa_v

S = suscetível a piretróides
 R1 = resistente, mutação na posição 1534
 R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534

Tabela 23 - Consolidado das informações sobre resistência de populações de *A. aegypti* da Região Sudeste, larvas e adultos a temefos e deltametrina, e mecanismos relacionados. Estão apresentados apenas os 'municípios/ano' para os quais há alguma avaliação de mecanismos de resistência ('bioquímicos' e/ou *AaNa_v*). Legendas como nas Tabelas 19, 21, 22).

ano	estado	população	estágio	geração	temefos, dose-resposta				delta, DD		deltametrina, dose-resposta				mecanismos de resistência, % > p99								Frequência alelos <i>AaNa_v</i>		
					RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope	garrafa%T	papel, %T	RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope	ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB	GAB-AChE	S	R1	R2
2005	MG	Belo Horizonte	adulto	F2					74.5	84.0						8	72	64	44	81	54	54			
2008	MG	Belo Horizonte	adulto	F1					47.4	57.0					3	7	32	15	3	5	11	12			
2005	MG	Montes Claros	adulto	F2					62.7	82.2					0	0	98	38	0	47	31	37			
2010	MG	Ubá	adulto	F2							25.6	35.7	39.4	3.27	30	3	62	84	17	95	49	52			
2005	MG	Uberaba	adulto	F1					55.3	61.3					1	2	86	52	23	29	32	38			
2005	MG	Uberlândia	adulto	F1					72.7	68.2					0	4	87	47	42	51	39	46			
2007	ES	Cachoeiro de Itapemirim	adulto	F2					93.3	31.5					77	76	35	89	51	46	62	59			
2009	ES	Cachoeiro de Itapemirim	larva	F1	8.9	17.5		2.55							3	18	75	19	8	1	21	24			
2009	ES	Cachoeiro de Itapemirim	adulto	F1							33.8	42.6	45.6	3.71	0	26	60	46	12	60	34	41			
2011	ES	Cachoeiro de Itapemirim*	adulto	F1							49.0	78.6		2.16	0	0	98	20	3	99	37	44	0.103	0.224	0.672
2007	ES	Colatina	adulto	F2					82.3	35.2					24	78	6	54	6	2	28	29			
2009	ES	Colatina	larva	F1	11.0	14.4	15.5	3.95							0	6	47	0	0	0	9	11			
2009	ES	Colatina	adulto	F1							9.8	13.4	14.7	3.36	8	9	70	86	43	70	48	56			
2005	ES	Vila Velha	adulto	F1					58.9						37	7	95	53	13	48	42	43			
2008	ES	Vila Velha	adulto	F1					21.7	52.6					61	52	18	57	18	14	37	32			
2010	ES	Vila Velha	larva	F1	6.3	8.5	9.3	3.77							0	0	27	0	0	0	5	5			
2010	ES	Vila Velha	adulto	F3							35.9	47.1	51.0	3.52	51	0	27	90	36	12	36	33			
2005	ES	Vitória	adulto	F1					63.2	69.0						30	96	61	38	78	61	61			
2008	ES	Vitória	adulto	F1					53.3	44.4					15	38	20	70	23	22	31	35			
2010	ES	Vitória	larva	F1	6.0	8.0		3.88							0	1	12	0	0	2	3	3			
2010	ES	Vitória	adulto	F1							28.6	46.7		3.59	1	14	3	44	14	25	17	20	0.083	0.033	0.883
2008	RJ	Cabo Frio	larva	F1	6.9	10.1	11.2	3.44							22	0	66	0	0	0	15	13			
2008	RJ	Cabo Frio	adulto	F1					39.3	35.6					8	0	76	45	37	76	40	47			
2008	RJ	Nova Iguaçu	larva	F1	9.3	10.1		3.51							45	0	77	0	0	1	21	16			
2008	RJ	Nova Iguaçu	adulto	F1					87.4	33.4					12	29	80	8	0	80	35	39			
2008	RJ	São Gonçalo	larva	F2	7.5	10.8	12.0	3.50							25	0	30	0	0	0	9	6			
2008	RJ	São Gonçalo	adulto	F2					67.8	49.7	5.7	9.1		2.84	8	1	65	0	0	65	23	26	0.462	0.288	0.250
2011	RJ	Rio de Janeiro	larva	F1	7.1	8.5	9.0	3.86							0	0	12	0	0	0	2	2			
2011	RJ	Rio de Janeiro	adulto	F1							26.1	34.2		3.21	54	5	42	75	35	7	36	33			

cores RRs (temefos e deltametrina):

verde - RR95 menor ou igual a 3
 vermelho - RR95 maior que 3

cores ensaios DD

vermelho: mortalidade menor que 80%
 laranja: mortalidade entre 80 e 98%
 verde: mortalidade maior que 98%

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15
 %> p99Rock entre 15 e 50
 %> p99Rock maior que 50

GAB: avaliação bioquímica 'global' (média das alterações de Ace, MFO, GST e EST)

GAB - AChE: avaliação bioquímica 'global', apenas resistência metabólica

alelos *AaNa_v*

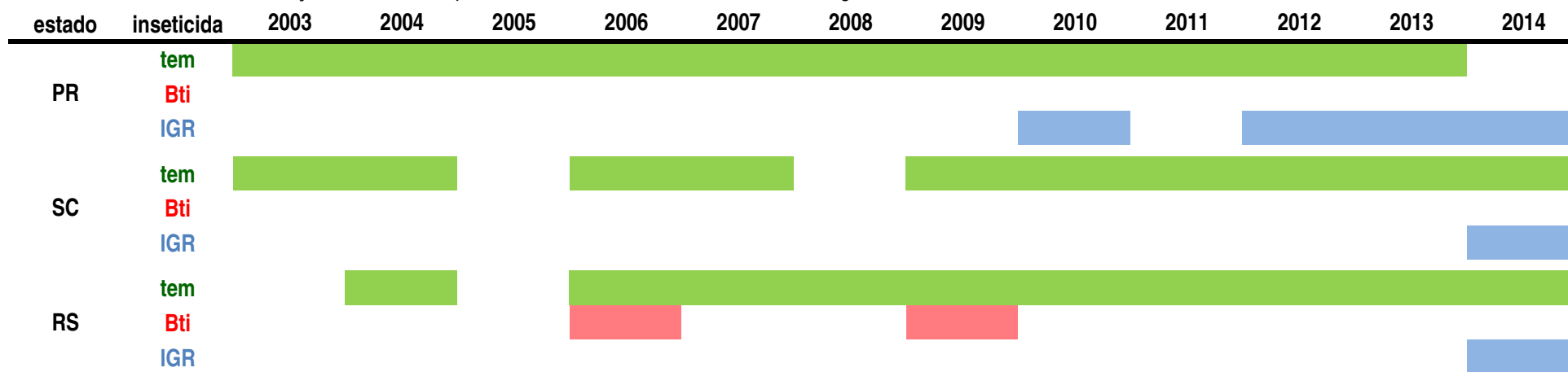
S = suscetível a piretróides
 R1 = resistente, mutação na posição 1534
 R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534

Tabela 24 - taxa de incidência de dengue/ 100 mil habitantes, região Sul

UF	UF (município)	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
PR	Cambé	158	160	823	3	6	7	459	24	29	353	348	29
	Curitiba	16	91	13	4	5	6	46	24	50	59	40	16
	Foz do Iguaçu	53	893	275	4	165	85	1.203	184	100	3.636	1.069	53
	Ibiporã	2	62	664	0	4	4	71	60	21	158	1.550	25
	Jacarezinho	0	5	5	0	0	0	8	5	3	1.948	9.537	8
	Londrina	38	149	1.426	3	2	18	166	30	25	389	1.445	21
	Maringá	46	179	129	1	32	27	1.614	17	21	1.039	50	21
	Paranavaí	16	175	55	2	154	26	891	23	22	380	121	130
	Santa Helena	4	201	51	0	111	13	3.114	13	26	269	47	64
	Ubiratã	0	116	19	0	19	0	6.675	9	9	121	23	19
RS	Ijuí	0	4	3	3	3	0	1	5	1	3.723	1	5
	Santa Rosa	2	6	2	0	3	3	10	4	3	242	236	22
SC	Tubarão	1	4	0	0	1	0	3	1	2	2	4	1

Legenda: Incidência de dengue a partir de 300 casos por 100 mil habitantes já é indicativo de epidemia, de acordo com o MS. Levando isto em conta, valores de incidência anual de dengue até 300 estão apresentadas em fundo verde. Em azul e fonte maior, os municípios avaliados para temephos e/ou deltametrina.

Tabela 25 - Histórico da distribuição de larvicidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Sul.



Legenda: Estados - PR: Paraná; SC: Santa Catarina; e RS: Rio Grande do Sul. Inseticidas - tem: temephos; Bti: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; e IGR: *Insect Growth Regulators* .

Tabela 26 - Consolidado da resistência de populações de *A. aegypti* da Região Sul ao larvicida temephos. Para os bioensaios quantitativos estão indicadas as Razões de Resistência (RR), o 'slope' (uma medida de heterogeneidade das populações) e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas, que tratam de mecanismos de resistência metabólica, e do sítio alvo de organofosforados, acetilcolinesterase.

ano	estado	população	geração	bioensaio dose-resposta temephos				referência	mecanismos de resistência, % > p99 Rock							
				RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅	slope		ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB	
2006	PR	Cambé		2.3		2.6		Duquel JE et al 2015								
2003	PR	Curitiba		1.7		4.7		Luna DJE et al 2004								
2001	PR	Foz do Iguaçu		1.3		2.3		Moyes et al 2017								
2002	PR	Foz do Iguaçu		2.2		3.1		Moyes et al 2017								
2003	PR	Foz do Iguaçu		1.6		2.2		Moyes et al 2017								
2005	PR	Foz do Iguaçu		2.8		3.9		Duquel JE et al 2015								
2006	PR	Foz do Iguaçu		2.3		3.4		Prophiro JS et al 2011								
2006	PR	Foz do Iguaçu		2.8		3.1		Moyes et al 2017								
2008	PR	Foz do Iguaçu		2.9		3.4		Moyes et al 2017								
2009	PR	Foz do Iguaçu		2.4		4.0		Moyes et al 2017								
2006	PR	Ibiporã		3.1		6.6		Duquel JE et al 2015								
2006	PR	Jacarezinho		1.6		3		Duquel JE et al 2015								
2011	PR	Jacarezinho		3		3.6		Aguirre-Obando et al 2016								
2012	PR	Jacarezinho		1.9		2.5		Aguirre-Obando et al 2016								
2002	PR	Londrina		1.7		1.8		Moyes et al 2017								
2006	PR	Londrina		2.9		3.1		Moyes et al 2017								
2002	PR	Maringá		1.9		2.1		Moyes et al 2017								
2003	PR	Maringá		1.9		2.7		Moyes et al 2017								
2005	PR	Maringá		3.2		6.9		Duquel JE et al 2015								
2006	PR	Maringá		3.1		3.6		Moyes et al 2017								
2008	PR	Maringá		2.4		4.4		Moyes et al 2017								
2009	PR	Maringá		1.7		5.2		Moyes et al 2017								
2005	PR	Paranavaí		1.6		2.0		Moyes et al 2017								
2005	PR	Paranavaí		3.2		3.4		Duquel JE et al 2015								
2006	PR	Santa Helena		1.6		1.7		Prophiro JS et al 2011								
2006	PR	Ubirata		1.7		1.7		Prophiro JS et al 2011								
2004	RS	Ijuí				1.4		Montella IR et al 2007								
2004	RS	Santa Rosa				1.7		Montella IR et al 2007								
2011	RS	Santa Rosa	F1	2.2	2.3	2.3	4.71	presente estudo	0	0	12	0	0	0	0	2

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutationa-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). **GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)**

* para alguns municípios a RR₉₀ está informada no lugar da RR₉₀

cores RRs:

verde - RR₉₅ menor ou igual a 3

vermelho - RR₉₅ maior que 3

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

Tabela 27 - Histórico da distribuição de larvicidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Sul.

estado	inseticida	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
PR	PI	█					█						
	OP								█				
SC	PI		█						█				
	OP												
RS	PI	█							█				
	OP												

Legenda: Estados - PR: Paraná; SC: Santa Catarina; e RS: Rio Grande do Sul. Inseticidas - Inseticidas - PI: piretroides; e OP: organofosforado - malathion.

Tabela 28 - Resistência de populações de *A. aegypti* da Região Sul ao aduicida deltametrina, ensaios qualitativos e 'bioquímicos'. Para os bioensaios qualitativos estão indicadas a porcentagem de mortalidade após 24 horas de exposição para as metodologias 'CDC', 'WHO' e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas. Legendas dos 'bioquímicos' como na Tabela 26 e critério de classificação de mortalidade estão apresentadas no texto e abaixo da figura.

ano	estado	população	bioensaios dose-diagnóstica com deltametrina				referência	ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB
			CDC, garrafa impregnada		WHO, papel impregnado									
			geração	% mort 24 horas	geração	% mort 24 horas								
2006	PR	Foz do Iguaçú				84.6	Moyes et al 2017							
2008	PR	Foz do Iguaçú		82.8		53.1	Moyes et al 2017							
2008	PR	Foz do Iguaçú				57	Bona et al 2012							
2009	PR	Foz do Iguaçú		68.6		57	Moyes et al 2017							
2006	PR	Londrina				59.6	Moyes et al 2017							
2006	PR	Maringá				70.9	Moyes et al 2017							
2008	PR	Maringá		90.4		27.5	Moyes et al 2017							
2009	PR	Maringá		74.9		80.9	Moyes et al 2017							

Legenda: atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutationa-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). **GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)**

legenda

vermelho: mortalidade menor que 80%

laranja: mortalidade entre 80 e 98%

verde: mortalidade maior que 98%

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

Tabela 29 - Resistência de população de *A. aegypti* da Região Sul ao adjuvante deltametrina, bioensaios quantitativos, frequência de mutações no *AaNaV* e ensaios 'bioquímicos'. Legendas dos bioensaios e 'bioquímicos' como na Tabela 26. Indicações sobre os alelos de *AaNaV* estão apresentadas no texto e abaixo da figura.

ano	estado	população	geração	bioensaios dose-resposta deltametrina				referência	Frequência alelos <i>AaNa_v</i>				mecanismos de resistência, % > p99						
				RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope		S	R1	R2	geração	ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB
2011	RS	Santa Rosa	F1	15.0	27.9	33.3	2.32	presente estudo	0.537	0.167	0.296	F2	25	4	6	56	21	68	30.0

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutationa-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). **GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)**

cores RRs:

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

*RR80 informada

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

alelos *AaNa_v*

S = suscetível a piretróides

R1 = resistente, mutação na posição 1534

R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534

Tabela 30 - Consolidado das informações sobre resistência de população de *A. aegypti* da Região Sul, larvas e adultos a temephos e deltametrina, e mecanismos relacionados. Estão apresentados apenas os 'municípios/ano' para os quais há alguma avaliação de mecanismos de resistência ('bioquímicos' e/ou AaNaV). Legendas como nas Tabelas 26, 28, 29).

	ano	estado	população	estágio	geração	temephos, dose-resposta			delta, DD		deltametrina, dose-resposta				estágio	mecanismos de resistência, % > p99						Frequência alelos AaNa _v					
						RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope	garrafa%T	papel, %T	RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅		slope	ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB	GAB-AChE	S	R1	R2
ARRdelta	2011	RS	Santa Rosa	adulto	F1							15.0	27.9	33.3	2.3	A	25	4	6	56	21	68	30	31	0.537	0.167	0.296
Ltem	2011	RS	Santa Rosa	larva	F1	2.2	2.3	2.3	4.7						L	0	0	12	0	0	0	2	2				

cores RRs (temephos e deltametrina):

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

cores ensaios DD

vermelho: mortalidade menor que 80%

laranja: mortalidade entre 80 e 98%

verde: mortalidade maior que 98%

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

alelos AaNa_v

S = suscetível a piretróides

R1 = resistente, mutação na posição 1534

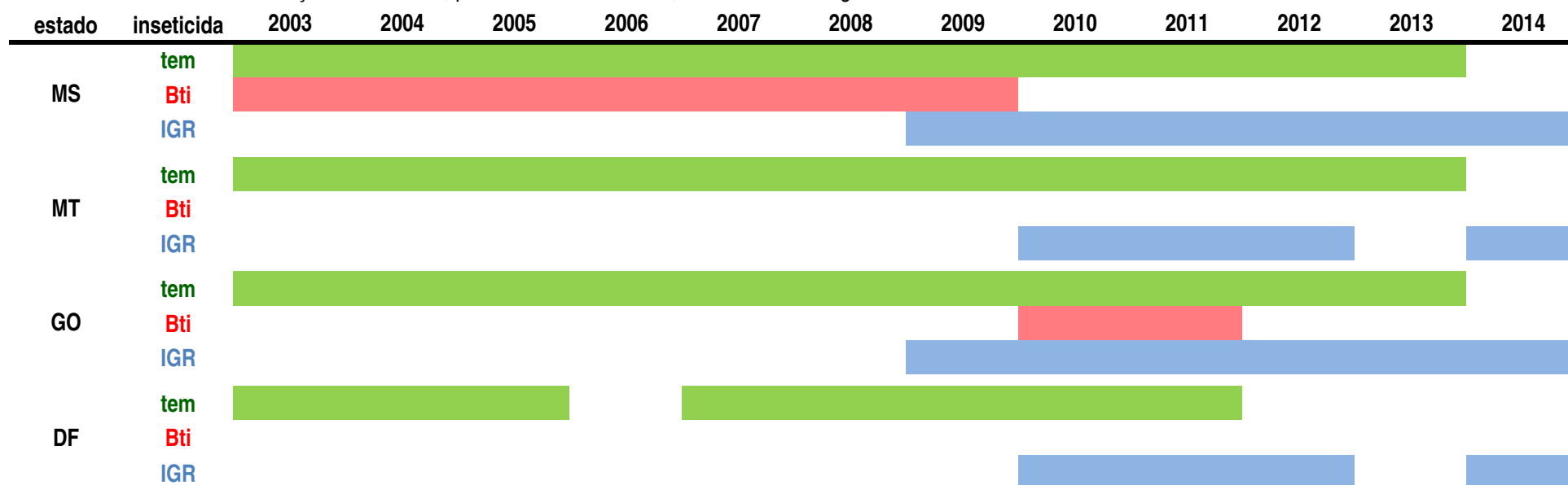
R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534

Tabela 31 - taxa de incidência de dengue/ 100 mil habitantes, região Centro-Oeste.

UF	UF (município)	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
MS	Campo Grande	1.381	1.659	199	2	14	396	6.338	30	398	3.794	234	483
	Corumbá	6	95	3	0	0	15	220	48	5.544	1.097	122	996
	Coxim	218	1.141	134	168	12	1.626	3.016	159	261	815	267	25
	Dourados	158	463	68	0	39	897	2.230	19	493	3.669	35	20
	Ponta Porã	23	125	26	1	17	31	2.424	49	184	850	42	73
	Três Lagoas	848	70	3	1	20	2.226	3.373	14	16	1.540	294	1.031
MT	Cuiabá	25	403	558	4	4	97	172	95	2.218	783	172	1.508
GO	Aparecida de Goiânia	420	702	343	262	1.432	1.341	846	1.366	1.906	2.156	1.149	1.460
	Campos Belos	52	277	264	11	147	202	72	221	1.685	4.356	92	5
	Goiânia	509	1.355	525	294	756	952	506	1.586	1.950	3.225	471	756
	Luziânia	82	221	38	5	10	16	27	84	27	682	1.413	104
	Planaltina	5	29	11	11	6	4	18	20	13	456	87	16
	Rio Verde	27	62	48	246	885	1.089	512	822	209	1.721	243	301
	São Miguel do Araguaia	145	22	9	4	27	520	816	331	1.513	592	117	95
	São Simão	43	274	14	200	437	1.474	106	18	1.643	2.388	97	56
	Uruaçu	517	269	9	14	366	604	209	66	1.615	141	110	74
DF	Brasília	61	123	34	10	15	19	45	45	34	582	56	55

Legenda: Incidência de dengue a partir de 300 casos por 100 mil habitantes já é indicativo de epidemia, de acordo com o MS. Levando isto em conta, valores de incidência anual de dengue até 300 estão apresentadas em fundo verde. Em azul e fonte maior, os municípios avaliados para temephos e/ou deltametrina.

Tabela 32 - Histórico da distribuição de larvicidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Centro-Oeste.



Legenda: Estados - MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; GO: Goiás; e DF: Distrito Federal. Inseticidas - tem: temephos; Bti: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; e IGR: *Insect Growth Regulators*.

Tabela 33 - Consolidado da resistência de populações de *A. aegypti* da Região Centro-Oeste ao larvicida temephos. Para os bioensaios quantitativos estão indicadas as Razões de Resistência (RR), o 'slope' (uma medida de heterogeneidade das populações) e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas, que tratam de mecanismos de resistência metabólica, e do sítio alvo de organofosforados, acetilcolinesterase.

ano	região	estado	população	geração	bioensaio dose-resposta temephos				referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99 Rock					
					RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅	slope			ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2005	CO	MS	Campo Grande	F1	7.6	7.0	6.8	4.51	presente estudo							
2011	CO	MS	Campo Grande		2.7		4.5		Moyes et al 2017							
2011	CO	MS	Corumbá		3.5		4.7		Moyes et al 2017							
2011	CO	MS	Coxim		4.4		7.6		Moyes et al 2017							
2005	CO	MS	Dourados				5.7		Belinato et al 2013							
2011	CO	MS	Dourados		3.4		5.3		Moyes et al 2017							
2011	CO	MS	Ponta Porã		3.7		6.1		Moyes et al 2017							
2011	CO	MS	Três Lagoas		4.6		7.5		Moyes et al 2017							
2005	CO	MT	Cuiabá				4.0		Belinato et al 2013							
2005	CO	GO	Aparecida de Goiânia				11.2		Martins et al 2012							
2008	CO	GO	Aparecida de Goiânia		15.7		19.2		Belinato et al 2012	(&)	20	20	46	9	0	4
2012	CO	GO	Aparecida de Goiânia	F1	17.9	16.9	16.6	5.59	Bellinato et al 2016	F1	5	31	85	8	54	63
2011	CO	GO	Campos Belos	F2	9.1	11.3	12.0	3.68	Bellinato et al 2016	F2	1	15	9	1	5	0
2003	CO	GO	Goiânia				3.3		Montella et al 2007							
2007	CO	GO	Goiânia*	F1	9.5	12.0		3.42	presente estudo							
2009	CO	GO	Goiânia	F1	8.6	14.0		3.06	presente estudo	F1	2	4	88	0	0	0
2011	CO	GO	Goiânia	F2	7.9	8.4	8.6	4.56	Bellinato et al 2016	F2	3	6	49	5	34	36
2008	CO	GO	Luziânia	F1	5.7	8.9	10.1	3.18	presente estudo		0	4	20	10	0	3
2011	CO	GO	Luziânia	F2	7.0	8.3	8.7	3.92	Bellinato et al 2016							
2009	CO	GO	Planaltina		3.1		4.2		Moyes et al 2017							
2008	CO	GO	Rio Verde	F1	6.0	10.4	9.1	2.85	presente estudo		0	1	25	21	0	15
2011	CO	GO	Rio Verde	F2	11.5	14.0	14.8	3.77	Bellinato et al 2016	F2	1	0	40	19	38	8
2012	CO	GO	São Miguel do Araguaia	F1	21.1	25.7	27.1	3.77	Bellinato et al 2016	F1	0	0	20	28	21	59
2011	CO	GO	São Simão	F2	12.1	14.2	14.8	3.98	Bellinato et al 2016	F2	1	0	40	35	33	32
2008	CO	GO	Uruaçu	F1	7.6	11.7	13.1	3.28	presente estudo							
2011	CO	GO	Uruaçu	F2	10.5	12.0	12.5	4.08	Bellinato et al 2016							
2007	CO	DF	Brasília		3.6		4.0		Moyes et al 2017							
2009	CO	DF	Brasília		3.3		4.3		Moyes et al 2017							
2010	CO	DF	Brasília		4.5		4.9		Moyes et al 2017							
2012	CO	DF	Brasília		3.5		5.3		Moyes et al 2017							
2008	CO	DF	Brasília (Gama Sul)		2.3		2.8		Moyes et al 2017							
2009	CO	DF	Brasília (Gama Sul)		2.9		4.6		Moyes et al 2017							

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutationa-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). **GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)**

* para alguns municípios a RR₉₀ está informada no lugar da RR₉₅

cores RRs:

verde - RR95 menor ou igual a 3

vermelho - RR95 maior que 3

cores enzimas

% > p99Rock menor que 15

% > p99Rock entre 15 e 50

% > p99Rock maior que 50

(&) dados de mecanismos de resistência: presente estudo

Tabela 34 - Histórico da distribuição de larvicidas, pelo Ministério da Saúde, aos estados da região Centro-Oeste.

estado	inseticida	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
MS	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]								[Barra escura]			
MT	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]										[Barra escura]	
GO	PI	[Barra cinza]											
	OP	[Barra cinza]							[Barra escura]				
DF	PI	[Barra cinza]											[Barra escura]
	OP	[Barra cinza]										[Barra escura]	

Legenda: Estados - MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; GO; Goiás; e DF: Distrito Federal. Inseticidas - PI: piretroides; e OP: organofosforado - malathion.

Tabela 35 - Resistência de populações de *A. aegypti* da Região Norte ao aduldica deltametrina, ensaios qualitativos e 'bioquímicos'. Para os bioensaios qualitativos estão indicadas a porcentagem de mortalidade após 24 horas de exposição para as metodologias 'CDC', 'WHO' e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas.

ano	estado	população	bioensaios dose-diagnóstica com deltametrina				referência	geração	mecanismos de resistência, % > p99					
			CDC, garrafa impregnada		OMS, papel impregnado				ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
			geração	% mort 24 horas	geração	% mort 24 horas								
2005	MS	Campo Grande	F2	63.8	F2	57.2	presente estudo	F2	0	89	15	9	80	
2011	MS	Campo Grande				43.9	Moyes et al 2017							
2012	MS	Corumbá				11.0	Moyes et al 2017							
2011	MS	Coxim				47.4	Moyes et al 2017							
2005	MS	Dourados	F2	74.9	F2	72.8	Belinato et al 2013/presente estudo	(&)	8	2	89	55	38	64
2011	MS	Dourados				51.6	Moyes et al 2017							
2005	MT	Cuiabá	F1	89.2	F1	84.0	Belinato et al 2013/presente estudo	F1 (&)		1	88	45	14	67
2005	GO	Aparecida de Goiânia	F2	64.6	F2	61.3	Martins et al 2009/presente estudo	F1 (&)	0	1	75	20	9	75
2008	GO	Aparecida de Goiânia	F1	67.9	F1	11.7	Belinato et al 2012/presente estudo	F1 (&)	0	1	19	35	0	41
2007	GO	Goiânia	F1	92.8	F1	21.8	presente estudo		24	78	6	54	6	2
2013	GO	Goiânia				23.8	Moyes et al 2017							
2008	GO	Luziânia	F1	98.5	F1	65.5	presente estudo		8	8	16	24	8	7
2008	GO	Rio Verde	F1	88.3	F1	8.1	presente estudo		12	9	10	2	4	5
2008	GO	Uruaçu	F1	64.0	F1	15.5	presente estudo		10	37	22	23	1	24
2007	DF	Brasília		100		71.9	Moyes et al 2017							
2009	DF	Brasília				83.3	Moyes et al 2017							
2010	DF	Brasília				26.6	Moyes et al 2017							
2012	DF	Brasília				28.6	Moyes et al 2017							
2008	DF	Gama Sul		85.6		40.9	Moyes et al 2017							
2009	DF	Gama Sul				15.9	Moyes et al 2017							

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutiona-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). **GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)**

legenda

vermelho: mortalidade menor que 80%
laranja: mortalidade entre 80 e 98%
verde: mortalidade maior que 98%

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15
%> p99Rock entre 15 e 50
%> p99Rock maior que 50

(&) dados de mecanismos de resistência: presente estudo

Tabela 36 - Consolidado da resistência de populações de *A. aegypti* da Região Norte ao adulticida deltametrina. Para os bioensaios estão indicadas as Razões de Resistência (RR), o 'slope' (uma medida de heterogeneidade das populações) e as fontes dos dados. Estão também apresentados, quando disponíveis, os resultados das avaliações bioquímicas e a frequência do alelo *ksr*.

ano	estado	população	geração	bioensaios dose-resposta deltametrina				referência	Frequência alelos AaNa _v			geração	mecanismos de resistência, % > p99					
				RR ₅₀	RR ₉₀ *	RR ₉₅	slope		S	R1	R2		ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST
2012	GO	Aparecida de Goiânia	F1	33.0	50.7	57.2	2.74	Bellinato et al 2016	0.207	0.362	0.463	F1	1	57	94	70	10	73
2011	GO	Campos Belos	F2	25.3	44.5	52.3	2.43	Bellinato et al 2016	0.310	0.086	0.603	F2	0	8	65	14	1	6
2009	GO	Goiânia	F1	12.9	19.3	21.7	3.04	presente estudo				F1	0	17	62	22	36	62
2011	GO	Goiânia	F2	47.6	46.7	46.5	4.68	Bellinato et al 2016	0.074	0.222	0.704	F2	0	99	78	55	5	38
2011	GO	Luziânia*	F2	71.1	166.9		1.96	presente estudo	0.467	0.283	0.250							
2011	GO	Rio Verde	F2	32.5	49.8	56.2	2.74	Bellinato et al 2016	0.241	0.207	0.552	F2	13	74	4	81	8	13
2012	GO	São Miguel do Araguaia	F1	39.6	47.1	49.4	3.59	Bellinato et al 2016	0.414	0.293	0.293	F1	4	97	8	46	0	8
2011	GO	São Simão	F2	30.4	45.9	51.6	2.78	Bellinato et al 2016	0.083	0.383	0.533	F2	21	9	59	58	14	15
2011	GO	Uruaçu	F2	38.6	48.4	51.6	3.37	Bellinato et al 2016	0.450	0.117	0.433							

Legenda: 'RR': Razão de Resistência, 'slope': medida de heterogeneidade; atividades de ACE: acetilcolinesterase (atividade total), MFO: oxidases de função mista, GST: glutatona-S-transferases, A-EST: Esterases quantificadas com o substrato acetato de alfa-naftil, B-EST: idem, com o substrato acetato de beta-naftil, PNPA-EST: idem, acetato de para-nitro-fenil. '%>p99': para cada enzima, percentual da população com valores de atividade acima do percentil 99 da cepa suscetível (Rockefeller). **GAB: avaliação global dos ensaios bioquímicos (média das alterações observadas nas avaliações de todas as enzimas)**

* para alguns municípios a RR₉₀ está informada no lugar da RR₉₀

cores RRs:

verde - RR₉₅ menor ou igual a 3

vermelho - RR₉₅ maior que 3

*RR₈₀ informada

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15

%> p99Rock entre 15 e 50

%> p99Rock maior que 50

alelos AaNa_v

S = suscetível a piretróides

R1 = resistente, mutação na posição 1534

R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534

Tabela 37 - Consolidado das informações sobre resistência de populações de *A. aegypti* da Região Norte, larvas e adultos a temephos e deltametrina, e mecanismos relacionados. Estão apresentados apenas os 'municípios/ano' para os quais há alguma avaliação de mecanismos de resistência (bioquímicos e/ou AaNa_v). Legendas como nas Tabelas Norte 33, 35, 36).

ano	estado	população	estágio	geração	temephos, dose-resposta				delta, DD		deltametrina, dose-resposta				estágio	mecanismos de resistência, % > p99						Frequência alelos AaNa _v				
					RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope	garrata%T	papel, %T	RR ₅₀	RR ₉₀	RR ₉₅	slope		ACE	MFO	GST	A-EST	B-EST	PNPA-EST	GAB	GAB - AChE	S	R1	R2
2005	MS	Campo Grande	adulto	F1				4.5	63.8	57.2					A	0	89	15	9	80	38.6	38.6				
2005	MS	Dourados	adulto	F2					74.9	72.8				A	8	2	89	55	38	64	42.6	49.5				
2005	MT	Cuiabá	adulto	F1					89.2	84.0				A	1	88	45	14	67	43.0	43.0					
2005	GO	Aparecida de Goiânia	adulto						64.6	61.3				A	0	1	75	20	9	75	30.0	36.0				
2008	GO	Aparecida de Goiânia	larva		15.7		19.2							L	20	20	46	9	0	4	16.5	15.8				
2008	GO	Aparecida de Goiânia	adulto						67.9	11.7				A	0	1	19	35	0	41	16.0	19.2				
2012	GO	Aparecida de Goiânia	larva	F1	17.9	16.9	16.6							L	5	31	85	8	54	63	41.0	48.2				
2012	GO	Aparecida de Goiânia	adulto	F1							33.0	50.7	57.2	2.74	A	1	57	94	70	10	73	50.8	60.8	0.21	0.36	0.46
2011	GO	Campos Belos	larva	F2	9.1	11.3	12.0	3.68						L	1	15	9	1	5	0	5.2	6.0				
2011	GO	Campos Belos	adulto	F2							25.3	44.5	52.3	2.43	A	0	8	65	14	1	6	15.7	18.8	0.31	0.09	0.60
2007	GO	Goiânia	adulto	F1					92.8	21.8				A	24	78	6	54	6	2	28.3	29.2				
2009	GO	Goiânia	larva	F1	8.6	14.0		3.06						L	2	4	88	0	0	0	15.7	18.4				
2009	GO	Goiânia	adulto	F1							12.9	19.3	21.7	3.04	A	0	17	62	22	36	62	33.2	39.8			
2011	GO	Goiânia	larva	F2	7.9	8.4	8.6	4.56						L	3	6	49	5	34	36	22.2	26.0				
2011	GO	Goiânia	adulto	F2							47.6	46.7	46.5	4.68	A	0	99	78	55	5	38	45.8	55.0			
2008	GO	Luziânia	larva	F1	5.7	8.9	10.1	3.18						L	0	4	20	10	0	3	6.2	7.4				
2008	GO	Luziânia	adulto	F1					98.5	65.5				A	8	8	16	24	8	7	11.8	12.6				
2008	GO	Rio Verde	larva	F1	6.0	10.4	9.1	2.85						L	0	1	25	21	0	15	10.3	12.4				
2008	GO	Rio Verde	adulto	F1					88.3	8.1				A	12	9	10	2	4	5	7.0	6.0				
2011	GO	Rio Verde	larva	F2	11.5	14.0	14.8	3.77						L	1	0	40	19	38	8	17.7	21.0				
2011	GO	Rio Verde	adulto	F2							32.5	49.8	56.2	2.74	A	13	74	4	81	8	13	32.2	36.0	0.24	0.21	0.55
2012	GO	São Miguel do Araguaia	larva	F1	21.1	25.7	27.1	3.77						L	0	0	20	28	21	59	21.3	25.6				
2012	GO	São Miguel do Araguaia	adulto	F1							39.6	47.1	49.4	3.59	A	4	97	8	46	0	8	27.2	31.8	0.41	0.29	0.29
2011	GO	São Simão	larva	F2	12.1	14.2	14.8	3.98						L	1	0	40	35	33	32	23.5	28.0				
2011	GO	São Simão	adulto	F2							30.4	45.9	51.6	2.78	A	3	0	63	34	14	52	27.7	32.6	0.08	0.38	0.53
2008	GO	Uruaçu	adulto	F1					64.0	15.5				A	10	37	22	23	1	24	19.5	21.4				

cores RRs (temephos e deltametrina):

verde - RR95 menor ou igual a 3
 vermelho - RR95 maior que 3

cores ensaios DD

vermelho: mortalidade menor que 80%
 laranja: mortalidade entre 80 e 98%
 verde: mortalidade maior que 98%

cores enzimas

%> p99Rock menor que 15
 %> p99Rock entre 15 e 50
 %> p99Rock maior que 50

GAB: avaliação bioquímica 'global' (média das alterações de Ace, MFO, GST e EST)

GAB - AChE: avaliação bioquímica 'global', apenas resistência metabólica

alelos AaNa_v

S = suscetível a piretróides
 R1 = resistente, mutação na posição 1534
 R2 = resistente, mutação nas posições 1016 e 1534