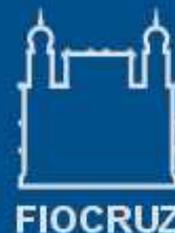




FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública



Marina Falcão de Souza Cartaxo

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA
DE UMA POPULAÇÃO DE *Culex*
quinquefasciatus PROVENIENTE DE ÁREA SOB
INTERVENÇÃO PARA CONTROLE VETORIAL**

RECIFE
2009

MARINA FALCÃO DE SOUZA CARTAXO

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Culex*
quinquefasciatus PROVENIENTE DE ÁREA SOB INTERVENÇÃO PARA
CONTROLE VETORIAL**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Co-orientadora: Dra. Tereza Magalhães

RECIFE
2009

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C322a Cartaxo, Marina Falcão de Souza.

Avaliação da diversidade genética de uma população de *Culex quinquefasciatus* proveniente de área sob intervenção para controle vetorial / Marina Falcão de Souza Cartaxo. — Recife: M. F. S. Cartaxo, 2009.
95 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres, Co-orientadora: Dra. Tereza Magalhães.

1. *Culex*. 2. Elefantíase Filarial. 3. Variação. 3. Controle Biológico de Vetores. 4. Repetições de Microsatélites. 4. Bacillus. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Magalhães, Tereza. III. Título.

CDU 616.9

MARINA FALCÃO DE SOUZA CARTAXO

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Culex quinquefasciatus* PROVENIENTE DE ÁREA SOB INTERVENÇÃO PARA CONTROLE VETORIAL

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Data de aprovação: 29/04/2009

BANCA EXAMINADORA

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/ Fiocruz
(Orientadora)

Dra. Leda Narcisa Regis
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/ Fiocruz
(Membro Titular Interno)

Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
(Membro Titular Externo)

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/ Fiocruz
(Membro Suplente Interno)

Dra. Maria Raquel Moura Coimbra
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
(Membro Suplente Externo)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Constância Ayres pelo apoio e pelos ensinamentos desde a minha iniciação científica, por ter viabilizado a minha ida à Universidade de Liverpool e por ter me proporcionado a experiência de realizar uma parte do meu trabalho em uma instituição de referência no exterior.

Ao Dr. David Weetman pela orientação e auxílio desde a execução da técnica de microssatélites até a análise dos resultados.

Ao Dr. Martin Donnelly por ter permitido a execução do estudo de microssatélites em seu laboratório na Escola de Medicina Tropical de Liverpool.

À Dra. Tereza Magalhães pela co-orientação e apoio durante a ausência da minha orientadora.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz e à Escola de Medicina Tropical de Liverpool pelas infra-estruturas cedidas que permitiram a execução deste trabalho.

Ao Centro de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde da Prefeitura de Recife pelo fornecimento das amostras utilizadas nesta pesquisa.

À FACEPE e à CAPES pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

À Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha por ter resolvido os tramites junto à FACEPE para a compra dos reagentes utilizados nos experimentos que foram realizados na Universidade de Liverpool.

Ao MSc. Karlos Diogo Chalegre pelo fornecimento das amostras utilizadas nos 2 últimos momentos de estudo bem como pelos dados relativos ao gene *cqm1* referentes a estes mesmos momentos.

A todos os integrantes do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz pelos ensinamentos e pela boa convivência ao longo dos anos.

À Dra. Cássia Docena do NPT do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz pelas constantes conversas e ensinamentos sobre as técnicas para genotipagem.

A minha família (Aucélia, Mauro, Bruno, Nara, Adinha, Zito, Denise e Ada Cecília) pelo papel fundamental que têm na minha vida.

A Américo pelo apoio e boa convivência ao longo destes anos.

Às minhas amigas (Anita, as 2 Janines, Manuella, Rachellen, Renata) pelo companheirismo.

A todos que não foram mencionados acima, mas contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização e conclusão deste trabalho.

“As coisas são semelhantes: isto faz a ciência possível; as coisas são diferentes: isto faz a ciência necessária.”

(Levis e Lewontin, 1985)

CARTAXO, Marina Falcão de Souza. **Avaliação da diversidade genética de uma população de *Culex quinquefasciatus* proveniente de área sob intervenção para controle vetorial**. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

RESUMO

A cidade de Recife (nordeste do Brasil) é uma área endêmica de filariose linfática e, desde 2003, um programa de controle vem sendo realizado com o intuito de interromper a transmissão desta doença. As estratégias incluem ações para controle de populações de *Culex quinquefasciatus*, único vetor da filariose no Brasil, como a eliminação de criadouros de mosquitos e o controle biológico através do tratamento bimestral com o *Bacillus sphaericus*. A diversidade genética da população de *Cx. quinquefasciatus* foi monitorada por três anos, em uma área tratada, a fim de avaliar os impactos de tais intervenções sobre a população vetora. Foram analisados dados referentes a um marcador neutro, microssatélite, e a um marcador sob possível pressão de seleção, gene *cqm1*, que codifica o receptor da toxina binária do *B. sphaericus*. Como resultados, foram detectados um declínio gradual e significativo na diversidade genética e uma sutil estruturação genética temporal, os quais são consistentes com um substancial impacto causado pelo programa de controle sobre a população vetora. Aumentos nos valores dos parâmetros de diversidade genética, detectados em alguns momentos avaliados, sugerem que pode estar havendo eventos de imigração a partir de refúgios não tratados e/ou provenientes de áreas circunvizinhas. Não foi observada tendência temporal evidente para a frequência do alelo de resistência (*cqm1_{REC}*), assim como, não houve correlação entre a diferenciação obtida por este marcador e pelo marcador de microssatélites. Desta maneira, a seleção relativa ao alelo *cqm1_{REC}* não parece estar envolvida com a perda de diversidade neutral nesta população. No entanto, o monitoramento da resistência deve ser continuado, uma vez que, o alelo *cqm1_{REC}* pode estar presente na fase lag, esperada para alelos recessivos. Após a superação desta fase lag, a resistência poderá se desenvolver rapidamente na população.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus* - *Bacillus sphaericus* - diversidade genética - microssatélite - gene receptor *cqm1* - pressão de seleção.

CARTAXO, Marina Falcão de Souza. **Genetic diversity evaluation of a *Culex quinquefasciatus* population from an under vector control area.** 2009. Dissertation (Master of Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

ABSTRACT

Recife (northeast Brazil) is a lymphatic filariasis endemic city and, since 2003, a control program has been conducted with the aim of interrupting the transmission of the disease. Strategies include actions for controlling *Culex quinquefasciatus* populations, the unique filariasis vector in Brazil, such as elimination of mosquito breeding sites and biological control through bimonthly treatment using *Bacillus sphaericus*. To assess the impact of this intervention on a local vector population, the genetic diversity of *Cx. quinquefasciatus* population was monitored for three years in a treated area. We have analyzed data from neutral marker, microsatellites, and a putative under selection pressure marker, *cqm1* gene, which codifies the *B. sphaericus* toxin receptor. A gradual but significant decline in allelic diversity coupled with subtle temporal genetic structure was detected. These results were consistent with a substantial impact of the control program on the vector population. Point growths in genetic diversity parameters values, detected in some evaluated moments, are suggestive of immigration from non treated refugees and/or from surrounding areas. No clear temporal trend was found in the frequency of the resistance-associated allele (*cqm1_{REC}*), variation of which was uncorrelated with differentiation measured by microsatellites. Thus selection on *cqm1_{REC}* does not appear to be involved with loss of neutral diversity from the population. However, it is important that monitoring should continue because *cqm1_{REC}* may at present be in the time lag-phase expected for a recessive allele, following which resistance could develop very rapidly in the population.

Keywords: *Culex quinquefasciatus* - *Bacillus sphaericus* - genetic diversity - microsatellite - receptor gene *cqm1* - selection pressure.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ciclo biológico do mosquito *Culex quinquefasciatus*, com indicação para os quatro estágios de vida distintos (ovo, larva, pupa e adulto).....3
- Figura 2** - Países e territórios que possuem regiões onde a filariose linfática é considerada como uma doença endêmica no ano de 2006.3
- Figura 3** – Esquema da base genética dos marcadores de microssatélites bem como da detecção de seus polimorfismos.3
- Figura 4** - Mapa da área de intervenção piloto do programa de controle da filariose indicando a zona de avaliação (ZA), a zona de barreira (ZB), distando 600 metros a partir da ZA, e o limite real escolhido como ZB.....3
- Figura 5** – Mapas do Brasil, da cidade de Recife e do bairro de Água Fria, sendo que, neste último, encontram-se destacados todos os sete locais de coleta das formas jovens da espécie *Culex quinquefasciatus* ao longo dos diferentes momentos de estudo.....3
- Figura 6** - Amplitude de variação nos tamanhos dos alelos, em pares de bases, descrita para 11 *loci* de microssatélites na espécie *Culex quinquefasciatus*.....3
- Figura 7** – Amplitude de variação nos tamanhos dos alelos (cor preta), em pares de bases, descrita para 11 *loci* de microssatélites na espécie *Culex quinquefasciatus* e variação nos tamanhos dos alelos (cores cinza, azul e verde), em pares de bases, encontradas para as amostras provenientes de Água Fria nestes mesmos *loci*.....3
- Figura 8** – Eletroferogramas gerados para quatro indivíduos da espécie *Culex quinquefasciatus* através da análise de fragmentos para os *loci* CxqGT8 (picos azuis iniciais da esquerda para a direita), CxqCTG10 (picos verdes iniciais da esquerda para a direita), CQ29 (picos azuis centrais), CxqCAG101 (picos verdes centrais) e CxqATG9 (picos azuis finais da esquerda para a direita).3
- Figura 9** - Média da riqueza de alelos (R_S) para os cinco *locus* de microssatélites avaliados nos diferentes momentos de estudo, iniciado a partir do primeiro mês de coleta.3
- Figura 10** - Média da heterozigosidade esperada (H_E) obtida para os cinco *loci* de microssatélites avaliados nos diferentes momentos de estudo, iniciado a partir do primeiro mês de coleta.3
- Figura 11** - Diferenciação genética temporal em Água Fria, representada por uma árvore que foi construída pelo método de *neighbour-joining*, baseada nos valores de F_{ST}3

Figura 12 - Análise de regressão entre a diferenciação genética média (F_{ST} corrigido), para os cinco <i>loci</i> de microssatélites, e o tempo de separação entre as coletas.	3
Figura 13 - Perfis dos produtos de PCR do gene <i>cqm1</i> , visualizados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio.....	3
Figura 14 – Variação temporal na frequência do alelo de resistência <i>cqm1_{REC}</i>	3
Figura 15 - Heterozigosidade esperada obtida para gene <i>cqm1</i> avaliada nos diferentes momentos de estudo, iniciados a partir do primeiro mês de coleta.	3
Figura 16 - Análise de regressão entre a diferenciação genética (F_{ST} corrigido) e o tempo de separação entre as coletas para o gene <i>cqm1</i>	3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Loci</i> de microssatélites analisados no estudo, com as suas respectivas seqüências de <i>primers</i> , repetições dos microssatélites e concentrações de cada <i>primer</i> e do $MgCl_2$ utilizados nas amplificações.	3
Tabela 2 - Matriz mostrando o tempo de separação, em meses, entre os diferentes momentos de estudo.	3
Tabela 3 - Número e freqüência de alelos encontrados para cada um dos cinco <i>loci</i> de microssatélite avaliados.	3
Tabela 4 - Riqueza de alelos medida para cada <i>locus</i> de microssatélite e média da riqueza de alelos entre os cinco <i>locus</i> nos diferentes momentos de estudo, baseado no tamanho amostral mínimo de nove indivíduos diplóides.	3
Tabela 5 - Heterozigosidade esperada obtida para cada <i>locus</i> de microssatélite e média da heterozigosidade esperada entre os cinco <i>loci</i> nos diferentes momentos de estudo.	3
Tabela 6 – Valores de diferenciação genética (F_{ST} corrigido) entre os diversos momentos de coleta (diagonal inferior) e seus respectivos níveis de significância (p) (diagonal superior), obtidos através da estimativa total para os cinco <i>loci</i> de microssatélites.	3
Tabela 7 – Valores do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}), com seus respectivos níveis de significância (p), para cada um dos cinco <i>loci</i> de microssatélite nos diferentes momentos de estudo.	3
Tabela 8 - Comparações entre cada par de <i>locus</i> para detecção de desequilíbrio de ligação, considerando conjuntamente os cinco <i>loci</i> de microssatélites nos 8 momentos estudados, através do teste do qui-quadrado.	3
Tabela 9 – Freqüências alélicas, número de alelos e heterozigosidade esperada obtidos para o gene <i>cqm1</i> nos diferentes momentos de estudo.	3
Tabela 10 - Valores de diferenciação genética (F_{ST} corrigido) entre os diversos momentos de coleta (diagonal esquerda abaixo) e seus respectivos níveis de significância (p) (diagonal direita acima), obtidos através da análise do gene <i>cqm1</i>	3

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	albumina sérica bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CPqAM/ Fiocruz	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz
DDT	dicloro-difenil-tricloro-etano
DEC	dietilcarbamazina
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
GPI	glicosilfosfatidilinositol
h	hora
kDa	quilodáton
min	minuto
OMS	Organização Mundial de Saúde
OP	inseticida organofosforado
ORF	quadro aberto de leitura (<i>open reading frame</i>)
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PENFL	Plano de Eliminação Nacional da Filariose Linfática
PGEFL	Programa Global para Eliminação da Filariose Linfática
RAPD	polimorfismo de DNA amplificado randomicamente
RFLP	polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição
RMR	Região Metropolitana de Recife
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
seg	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSCP	polimorfismo de conformação de fita simples
TBE	tris-borato- EDTA
U	unidade
V	volts

VNO

vírus do Nilo Ocidental

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>Ace</i>	gene que codifica a enzima acetilcolinesterase
CL_{50}	concentração letal para 50% da amostra avaliada
CL_{90}	concentração letal para 90% da amostra avaliada
<i>Cpm1</i>	enzima maltase 1 de <i>Culex pipiens</i>
<i>Cqm1</i>	enzima maltase 1 de <i>Culex quinquefasciatus</i>
<i>cqm1</i>	gene que codifica a enzima maltase 1 de <i>Culex quinquefasciatus</i>
<i>cqm1_{REC}</i>	gene que codifica a enzima maltase 1 de <i>Culex quinquefasciatus</i> com a deleção de 19 nucleotídeos
<i>Ester</i>	gene que codifica a enzima esterase
F_{IS}	coeficiente de endocruzamento
F_{ST}	coeficiente de diferenciação genética
H_E	heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (NEI, 1987)
H_O	heterozigosidade observada
N	tamanho amostral
n_a	número de alelos por <i>locus</i>
N_e	tamanho efetivo da população
R_S	riqueza de alelos

SUMÁRIO

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	3
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i>	3
2.1.1 Distribuição geográfica.....	3
2.1.2 Biologia e ecologia	3
2.1.3 Importância na saúde pública	3
2.1.3.1 <i>Filariose linfática</i>	3
2.1.3.2 <i>Arboviroses</i>	3
2.2 Controle biológico	3
2.2.1 <i>Bacillus sphaericus</i>	3
2.2.2 Resistência à toxina binária do <i>Bacillus sphaericus</i>	3
2.3 Genética de populações	3
2.3.1 Medidas de variabilidade genética	3
2.3.2 Estrutura genética populacional.....	3
2.4 Marcadores moleculares	3
2.4.1 Microssatélites	3
2.5 Programa de controle da filariose em Recife/PE	3
3 JUSTIFICATIVA	3
4 PERGUNTA CONDUTORA	3
5 HIPÓTESE	3
6 OBJETIVOS	3
6.1 Objetivo geral	3
6.2 Objetivos específicos	3
7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	3
7.1 Área de estudo	3
7.2 Amostragem	3
7.3 Extração de DNA total	3
7.4 Estudo com marcador neutro	3
7.4.1 Amplificação de microssatélites	3
7.4.2 Separação por tamanho de fragmentos e identificação dos alelos de microssatélites	3
7.4.3 Análise dos dados de microssatélites.....	3

7.5 Estudo com marcador sob pressão de seleção	3
7.5.1 Amplificação do fragmento do gene <i>cqm1</i>	3
7.5.2 Identificação dos alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1_{REC}</i>	3
7.5.3 Análise dos dados do gene <i>cqm1</i>	3
7.6 Comparação entre os microssatélites e o gene <i>cqm1</i>	3
8 RESULTADOS	3
8.1 Estudo com microssatélites	3
8.2 Estudo com o gene <i>cqm1</i>	3
8.3 Comparação entre os microssatélites e o gene <i>cqm1</i>	3
9 DISCUSSÃO	3
10 CONCLUSÕES	3
REFERÊNCIAS	3
APÊNDICE	3
Apêndice A – Parecer do Comitê de Ética	3

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Um estudo realizado por Regis et al. (1995) demonstrou que populações do mosquito *Culex quinquefasciatus* apresentam grandes densidades ao longo de todo o ano na cidade de Recife, Pernambuco, especialmente durante o período de chuvas (março-agosto), quando foram descritas densidades relativas de até 120 mosquitos/quarto/noite. A pobreza e a urbanização desordenada, associadas a altas temperaturas (média de 25,2 °C), pluviosidades e umidades (até 85%), foram apontadas como os principais fatores para a expansão das populações de *Cx. quinquefasciatus* na cidade de Recife (REGIS et al., 1995). No Brasil, esta espécie de mosquito apresenta importância médica por ser a principal vetora da filariose linfática (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Esta parasitose encontra-se distribuída em 83 países endêmicos e afeta aproximadamente 120 milhões de pessoas no planeta (GYAPONG; TWUM-DANSO, 2006).

No Brasil, os primeiros dados oficiais apontaram a filariose como doença endêmica em 11 municípios brasileiros (RACHOU, 1960). Após inúmeras campanhas, esta doença foi eliminada da maior parte destas áreas, ficando restrita apenas às cidades de Belém (Pará), Maceió (Alagoas) e Recife (Pernambuco) até o início de 1990 (MEDEIROS et al., 2003). Atualmente há evidências de uma recente interrupção da transmissão da filariose em Belém (FONTES et al., 2005) e a situação de Maceió é apontada como em “controle iminente” (ROCHA et al., 2000). Desta maneira, Recife e sua Região Metropolitana são as únicas áreas no Brasil onde esta doença continua sendo um problema de saúde pública (BONFIM et al., 2003; MACIEL et al., 1996; MEDEIROS et al., 2004, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou o Programa Global para Eliminação da Filariose Linfática (PGEFL), o qual visa a erradicação desta parasitose de todo o planeta até o ano de 2020 (GYAPONG; TWUM-DANSO, 2006). Neste contexto, a Prefeitura de Recife vem realizando, desde março de 2003, um Programa de Controle da Filariose cuja intenção é interromper a transmissão da doença. Tal programa inclui o tratamento em massa da população humana residente em bairros com alta endemicidade, utilizando o medicamento dietilcarbamazina (DEC), associado a medidas voltadas para a redução das populações de *Cx. quinquefasciatus*. As estratégias adotadas para controle das populações vetoras foram a eliminação dos criadouros dos mosquitos bem como aplicações bimestrais da bactéria entomopatogênica *Bacillus sphaericus* em criadouros que não puderam ser destruídos. As intervenções foram iniciadas em Água Fria, um dos bairros mais populosos de Recife, o qual

foi selecionado por apresentar um nível de prevalência significativa (6,21%) e ser considerado de alto risco sócio-ambiental (RECIFE, 2003).

Apesar do *B. sphaericus* ser um agente de controle eficiente contra o *Cx. quinquefasciatus*, foram relatados alguns casos de populações vetoras resistentes a este larvicida, as quais estiveram sujeitas a diferentes pressões de seleção com esta bactéria (MULLA et al., 2003; PEI et al., 2002; RAO et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 1995). Utilizando uma colônia de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório (CqRL1/2362), estabelecida a partir de amostras coletadas em Recife, Romão et al. (2006) identificaram uma deleção de 19 nucleotídeos na seqüência do gene *cqm1* como a causa para a resistência desta colônia ao *B. sphaericus*. Tal deleção é responsável por alterar o código de leitura que culmina com a formação de um códon de parada prematuro. O RNA mensageiro resultante codifica um polipeptídeo truncado, sem uma porção significativa de seu segmento, a qual inclui a perda da âncora GPI (ROMÃO et al., 2006). O alelo que codifica o gene *cqm1* com a deleção foi denominado de *cqm1_{REC}*. Recentemente, Chalegre et al. (2009) publicaram um estudo descrevendo uma PCR capaz de diferenciar mosquitos resistentes recessivos, que têm apenas o alelo *cqm1_{REC}*, dos indivíduos susceptíveis, homozigotos dominantes e heterozigotos.

Os efeitos de ações de controle vetoriais contra mosquitos podem ser visualizados pelo decréscimo na densidade populacional de acordo com o que foi mostrado em diversos trabalhos (REGIS et al., 1995, 2000). Com o término destas atividades, caso as ações de controle não tenham sido capazes de reduzir significativamente o tamanho populacional, as densidades originais poderão ser recuperadas rapidamente uma vez que mosquitos são espécies r-estrategistas. Assim, a utilização de caminhos e alternativas empregadas na avaliação e monitoramento de programas de controle vetorial são questões importantes para atingir a eliminação da filariose até o ano de 2020. Os microssatélites estão incluídos no grupo dos marcadores moleculares mais informativos e polimórficos. Outras características como neutralidade e co-dominância fazem deles ferramentas adequadas para estudos de genética de populações. Os marcadores de microssatélites vêm sendo empregados com frequência em estudos temporais e espaciais sobre variabilidade e estruturação genética de populações de mosquitos vetores de diferentes espécies como *Cx. quinquefasciatus* (FONSECA et al., 2006; FONSECA; LAPOINTE; FLEISCHER, 2000), *Cx. pipiens* (HUANG; MOLAEI; ANDREADIS, 2008), *Aedes aegypti* (HUBER et al., 2002), *Anopheles gambiae* (PINTO et al., 2002, 2003) e *An. arabiensis* (KENT; MHARAKURWA; NORRIS, 2007; WONDJI et al., 2005). O presente trabalho objetivou avaliar se as ações no âmbito do Programa de Controle da Filariose em Recife estão sendo capazes de reduzir a diversidade

genética, aumentar a frequência do alelo *cqm1_{REC}* e causar uma estruturação genética na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria. Para tanto foram utilizados marcadores neutros (microsatélites) e sob pressão de seleção ao *B. sphaericus* (gene *cqm1*).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Culex quinquefasciatus*

Culex quinquefasciatus é uma espécie de inseto pertencente à ordem Diptera e à família Culicidae. No Brasil, esta espécie é popularmente conhecida como muriçoca, pernilingo ou carapanã (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

2.1.1 Distribuição geográfica

A espécie *Culex quinquefasciatus* apresenta distribuição trópico-cosmopolita, ocorrendo basicamente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Este mosquito é encontrado principalmente na África, Américas, Oceania e em regiões meridionais da Ásia, estando ausentes apenas no extremo norte de algumas regiões temperadas. No Brasil, a espécie *Cx. quinquefasciatus* distribui-se por todo o território. Este inseto tem sua ocorrência e abundância bastante influenciadas pela presença do homem, associando-se a aglomerados humanos tanto em áreas urbanas como em vilas rurais (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

2.1.2 Biologia e ecologia

Culex quinquefasciatus é um inseto holometábolo e seu ciclo de vida compreende quatro estágios distintos, ovo, larva, pupa e adulto (figura 1). A fase larval apresenta-se subdividida em quatro estádios (L₁, L₂, L₃ e L₄). Durante a fase adulta, esta espécie habita ambientes terrestres enquanto que, nos estágios juvenis (ovo, larva e pupa), ela vive em meio aquático. Apesar de ser encontrado durante todo o ano, este mosquito predomina nos períodos quentes e chuvosos, devido ao maior acúmulo de água o que promove a ampliação no número de seus criadouros (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Em condições laboratoriais, já se relatou

que esta espécie foi capaz de produzir até 17 gerações no período de um ano (REGIS et al., 2000).

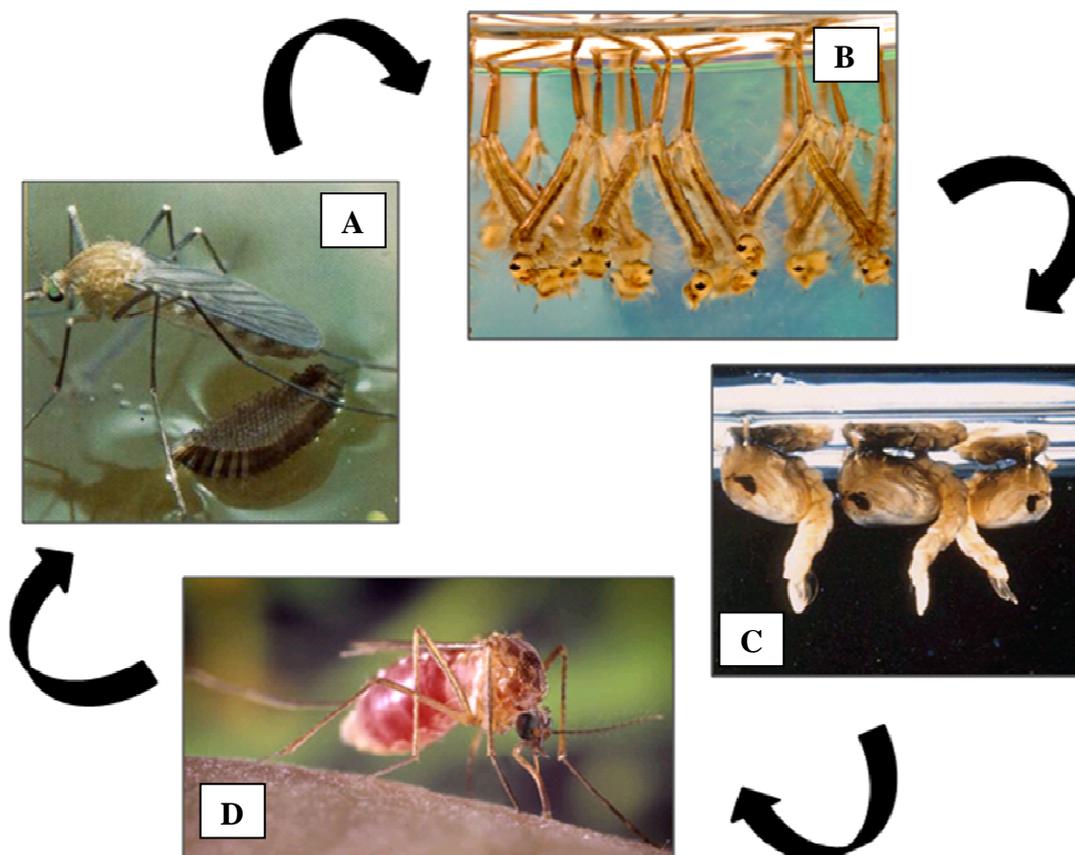


Figura 1 - Ciclo biológico do mosquito *Culex quinquefasciatus*, com indicação para os quatro estágios de vida distintos (ovo, larva, pupa e adulto).

Fonte: Culex (2006); Gross (2006); Sequeira (2008); Gathany (2002).

Nota: A) Fêmea realizando oviposição, B) larvas, C) pupas e D) fêmea adulta realizando a hematofagia.

Os criadouros utilizados pela espécie *Cx. quinquefasciatus* para oviposição são locais contendo água estagnada ou com pouca movimentação, rica em detritos e matéria orgânica em decomposição, com aspecto sujo e mal cheiroso. Estes compreendem valas no solo com água poluída, canais, fossas, ralos, poços, cisternas, vasilhames, latões, bebedouros de animais, entre outros. A seleção do local de oviposição pelas fêmeas é o principal fator responsável pela distribuição dos mosquitos nos criadouros e é de grande relevância para a distribuição das espécies no ambiente natural (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Os insetos adultos são altamente endofílicos, ou seja, vivem no interior das habitações humanas e também podem ser localizados em abrigos no peridomicílio. Eles são capazes de

se acasalar em pequenos espaços, o que os caracteriza como estenogâmicos. Embora se abrigue nas residências humanas durante todo o dia, esta espécie comumente têm hábito noturno, uma vez que as fêmeas só estimular-se-ão a exercer hematofagia à noite, preferencialmente nos horários mais avançados e nos momentos que precedem o amanhecer. Apenas as fêmeas exercem hematofagia, devido à necessidade de sangue para a maturação de seus ovos. Este mosquito é altamente antropofílico, porém apresenta a capacidade de alimentar-se em outros animais, sendo que, secundariamente ao homem, as fêmeas buscam realizar a hematofagia em aves domésticas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

As fêmeas realizam a postura de seus ovos diretamente sobre a superfície líquida dos criadouros, na qual estes flutuam. Os ovos são depositados agrupados num formato que lembra uma jangada e cada uma pode ser constituída por dezenas de ovos, os quais não são resistentes à dessecação (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). As fêmeas produzem um feromônio de oviposição, o qual é depositado no pólo apical de cada ovo, que têm a função de atrair outras fêmeas para fazerem a oviposição em criadouros previamente colonizados (LAURENCE; PICKETT, 1982). Em alta concentração, este feromônio tem efeito repelente, uma vez que serve para indicar a uma fêmea que a colonização do criadouro em questão acarretará em competição por recursos após a eclosão das larvas (BARBOSA et al., 2007).

A partir dos ovos eclodem as larvas de 1º estágio (L_1), as quais sofrem mudas e atingem os outros três estádios (L_2 , L_3 e L_4). As larvas de *Cx. quinquefasciatus* são aquáticas e demonstram bastante mobilidade. Elas são filtradoras e se alimentam ativamente de microorganismos como bactérias, fungos, algas ou partículas de materiais orgânicos presentes no meio aquático (FORATTINI, 1962). Estando ao seu alcance, qualquer partícula de tamanho viável espalhada no meio líquido, pode ser ingerida pela larva. Devido a esta incapacidade de seleção alimentar, a ingestão de larvicidas biológicos, eventualmente utilizados para controle do inseto, é bastante facilitada. O desenvolvimento destas larvas pode ocorrer em locais com pouca ou nenhuma luz, a exemplo de galerias de água e esgotos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

As pupas resultam da metamorfose sofrida pela L_4 e, durante este período, não necessitam mais de alimentação. Elas são encontradas imóveis em contato com a superfície da água, mas se perturbadas passam a apresentar bastante movimentação. Nesta fase ocorrem profundas transformações nos indivíduos, as quais resultam na formação de adultos, e conseqüente troca do hábitat aquático para o terrestre (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Os adultos emergentes a partir da metamorfose sofrida pela pupa, ao trocarem de hábitat, necessitarão utilizar-se da exúvia pupal como um local de repouso temporário para, a

partir dela, iniciarem seu primeiro vôo. Finalizado este processo, eles se dirigem ou permanecem no domicílio ou peridomicílio, buscando locais com pouca luz, nos quais possam abrigar-se e repousar antes de iniciarem suas atividades (FORATTINI, 1962). Fatores biológicos como o curto ciclo de vida, a alta fecundidade e as diferenças de hábitos alimentares entre as formas jovens e adultas, proporcionam a manutenção de elevadas densidades populacionais nesta espécie (OLIVEIRA, 1996).

2.1.3 Importância na saúde pública

A espécie *Culex quinquefasciatus* tem uma grande importância na saúde pública, uma vez que, está implicada na transmissão de parasitas e patógenos, como nematóides e vírus, capazes de causar a filariose linfática e algumas arboviroses em seres humanos (ELDRIDGE, 2005). Devido ao seu comportamento hematofágico, os mosquitos tornam-se vulneráveis a adquirirem parasitas e patógenos a partir de hospedeiros infectados. Caso sua fisiologia e ecologia sejam favoráveis, estes mosquitos serão capazes ainda de desenvolver e transmitir os agentes patogênicos a hospedeiros saudáveis (BECKER et al., 2003). Além disso, a espécie *Cx. quinquefasciatus* ainda exerce um grande incômodo à população humana por provocar coceiras e alergias em resposta às picadas realizadas durante o repasto sanguíneo (VINOGRADOVA, 2000).

2.1.3.1 Filariose linfática

No Brasil, a espécie *Culex quinquefasciatus* está implicada como principal vetora da filariose linfática. Quando causada pelo nemátodo *Wuchereria bancrofti*, esta parasitose também é denominada de filariose bancroftiana (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Em outros países, esta doença pode ser causada ainda pelos parasitas nematóides *Brugia malayi* e *B. timori*, porém em frequências muito baixas, que correspondem a aproximadamente 10% dos casos. Dos hospedeiros vertebrados, o homem é o único que pode ser parasitado pela *W. bancrofti*, ao passo que, as espécies *B. malayi* e *B. timori* são capazes de infectar tanto

humanos como outros hospedeiros definitivos, a exemplo de alguns felinos e de certas espécies de macacos (ANDERSON, 2000).

A filariose linfática encontra-se bem estabelecida nas regiões tropicais e subtropicais do planeta devido, principalmente, ao crescimento rápido e não planejado dos centros urbanos. Isto cria condições ideais que propiciam um aumento no número dos criadouros e proliferação do mosquito vetor (ROCHA et al., 2000). Aproximadamente 120 milhões de pessoas no planeta, distribuídas em 83 países endêmicos, encontram-se parasitadas pelas filárias (GYAPONG; TWUM-DANSO, 2006). Dos infectados, 40 milhões encontram-se seriamente incapacitados ou desfigurados pela doença. Estima-se ainda que 1,2 bilhões de pessoas, o equivalente a aproximadamente 20% da população mundial, esteja sob o risco de adquirir tal parasitose (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000). Atualmente a filariose linfática é endêmica em alguns países da Ásia e África. Focos de infecção também são encontrados na América do Sul, América Central, algumas ilhas do Caribe e grande parte das ilhas do Pacífico (figura 2) (ALBUQUERQUE, 1993; FONTES, 2002).

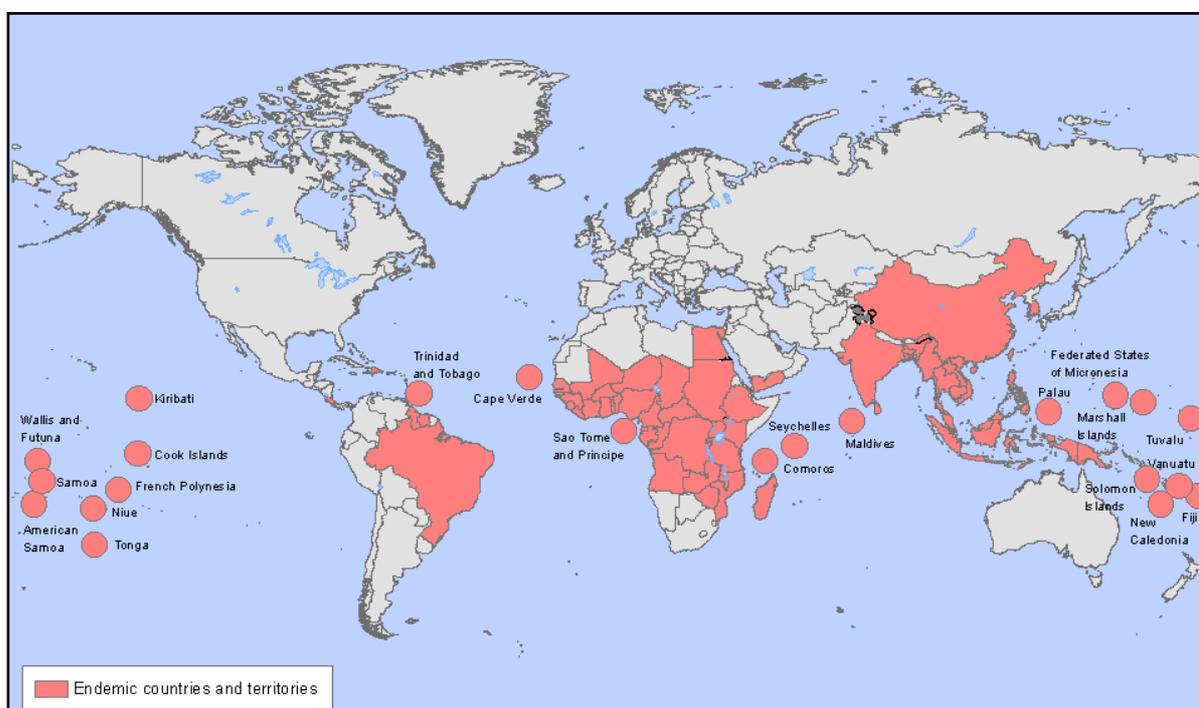


Figura 2 - Países e territórios que possuem regiões onde a filariose linfática é considerada como uma doença endêmica no ano de 2006.

Fonte: Organização Mundial de Saúde (2006).

A filariose linfática já foi prevalente no Brasil, fato apontado a partir do ano de 1952, quando o Ministério da Saúde promoveu a realização do primeiro inquérito nacional, com o intuito de obter um panorama da situação da endemia no país bem como identificar seus vetores (MEDEIROS et al., 2003). Durante aquela década, 11 municípios com focos autóctones da doença foram identificados, os quais estiveram localizados nos estados de Alagoas, Amazonas, Bahia, Maranhão, Pará, Pernambuco, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (RACHOU, 1960). Nas décadas seguintes, foram realizadas diversas campanhas e programas ora voltados apenas para o tratamento dos pacientes, ora associando-os com ações para controle vetorial (MEDEIROS et al., 2003).

As grandes mudanças de estratégias destas atividades só vieram a partir da década 90, quando começou a se tentar readequar o controle das endemias em uma lógica descentralizadora. Componentes de informação, educação e comunicação tornaram-se importantes ferramentas de mobilização das comunidades afetadas para contribuir com os programas. Em 1996, foram definidas as diretrizes do Plano de Eliminação Nacional da Filariose Linfática (PENFL), seguindo a proposta da OMS que incluiu a filariose como uma das seis doenças infecciosas potencialmente erradicáveis do planeta e estabeleceu a meta de eliminá-la até 2020. As estratégias do PENFL incluíram interrupção da transmissão da filariose nos focos endêmicos (quimioterapia e controle vetorial), esgotamento das fontes de infecção, assistência integral aos portadores de morbidade filarial e eliminação da endemia no país. No âmbito deste plano foram feitas reavaliações dos focos ativos e, como houve redução na prevalência dos casos, o Ministério da Saúde considerou a filariose sob controle. Isso possibilitou o aumento do número de casos e expansão para outras áreas conforme ocorrido na Região Metropolitana de Recife. A redução das ações de controle vetorial, a ausência de ações integradas de saneamento e de educação sanitária aliadas ao crescimento urbano desordenado foram fatores adicionais que contribuíram para este aumento (MEDEIROS et al., 2003).

Atualmente, no Brasil, a situação da filariose é a seguinte: há evidências de interrupção recente da transmissão da doença em Belém/PA (FONTES et al., 2005); a parasitose está em status de controle iminente e baixa transmissão em Maceió/AL (ROCHA et al., 2000); Cabo de Santo Agostinho/PE (MEDEIROS et al., 2006), Moreno/PE (MEDEIROS et al., 2004), Camaragibe/PE e Itamaracá/PE são locais onde tem ocorrido introdução e/ou transmissão da filariose (MEDEIROS et al., 2003) e Jaboatão dos Guararapes/PE (BONFIM et al., 2003), Olinda/PE (BRAGA et al., 2005) e Recife/PE são considerados focos endêmicos importantes de transmissão (MACIEL et al., 1996; MEDEIROS et al., 2003).

Em geral, a infecção pelas filárias não leva o paciente à morte, mas é responsável por causar significativa morbidade. Estes parasitas podem provocar danos aos vasos linfáticos humanos devido à obstrução e dilatação dos mesmos. As manifestações clínicas da parasitose variam desde quadros assintomáticos, passando por formas agudas (linfadenite, linfangite, mal-estar e febre) até culminar nas formas crônicas (hidrocele, linfedema, quilúria e quilocele). Durante esta última fase, as freqüentes infecções fúngicas e bacterianas são responsáveis pelo agravamento da situação do paciente. Geralmente, os sintomas da doença só se manifestam muitos anos após a infecção (DREYER; NORÕES, 2001; FONTES, 2002).

O parasita *W. bancrofti* apresenta um ciclo biológico compreendido por estágios que se desenvolvem em hospedeiros humanos e mosquitos. Inicialmente o mosquito ingere as formas jovens do parasita (microfilárias) ao realizar a hematofagia em um hospedeiro infectado. As microfilárias transpõem as barreiras do sistema digestivo do inseto e atingem seus músculos torácicos, onde sofrem transformações morfológicas, passando por três estágios larvários. A larva de terceiro estágio (L₃), considerada a forma infectiva, abandona os músculos torácicos e desloca-se até a probóscide do vetor (REY, 2002). Quando o inseto realiza novamente a hematofagia no homem, a L₃ do parasito é transferida, através da probóscide para a pele do indivíduo sadio, penetrando por movimento ativo. As L₃ da *W. bancrofti* encaminham-se aos vasos linfáticos e linfonodos, onde sofrem mais duas mudas (L₄ e adultos juvenis) e se transformam em adultos. A partir da reprodução sexuada destes parasitos é produzida uma grande quantidade de microfilárias, as quais são liberadas na circulação sangüínea através do ducto torácico. Desta maneira as microfilárias ficam disponíveis novamente para serem ingeridas pelos mosquitos no ato da hematofagia, reiniciando todo o ciclo (DREYER; NORÕES, 2001).

Ao longo do dia observa-se um acúmulo de microfilárias de *W. bancrofti* no interior da rede vascular sangüínea dos tecidos e órgãos mais internos, principalmente nos pulmões, o que impede a sua detecção na circulação periférica. Durante a noite, ocorre o oposto, ou seja, as microfilárias migram para a circulação sangüínea periférica, o que permite a sua detecção no sangue. Este comportamento do parasito, observado na maioria dos territórios de ocorrência da filariose bancroftiana, é caracterizado como periodicidade noturna das microfilárias. A maior concentração de microfilárias no sangue periférico é encontrada entre as 23:00 e 01:00 horas. Em decorrência deste horário preferencial, nas áreas onde há periodicidade das microfilárias, os mosquitos que apresentam hábito noturno estão implicados como vetores primários da *W. bancrofti* (FONTES, 2002). Tal fato, juntamente com a grande antropofilia do *Cx. quinquefasciatus*, facilita o contato das microfilárias com este vetor, o que

o torna mais eficaz que outras espécies de mosquitos susceptíveis (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Em países do Sudeste asiático e do Pacífico Sul, existe ainda as formas subperiódicas ou aperiódicas, onde os principais transmissores do parasito, mosquitos do gênero *Aedes*, exercem hematofagia durante o dia (FONTES, 2002).

2.1.3.2 Arboviroses

A espécie *Culex quinquefasciatus* também está incriminada na transmissão de arbovírus a hospedeiros humanos, a exemplo do vírus de Saint Louis, que circula nos Estados Unidos, o vírus do Oropouche, que ocorre no norte do Brasil (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994), e o vírus do Nilo Ocidental (BLITVICH, 2008). Diante do atual cenário, esta última arbovirose merece destaque uma vez que a sua área de transmissão encontra-se em expansão nas Américas, com possibilidade de ser introduzida no território brasileiro (LUNA; PEREIRA; SOUZA, 2003).

O vírus do Nilo Ocidental (VNO) foi introduzido nas Américas em 1999, na cidade de Nova Iorque, Estados Unidos. A sua circulação expandiu-se para diversos estados americanos resultando em uma epidemia no país (KRAMER; STYER; EBEL, 2008). Apesar do VNO ser capaz de infectar humanos e eqüinos, as aves são seus hospedeiros e reservatórios naturais (LUNA; PEREIRA; SOUZA, 2003). Já foi relatada também a susceptibilidade de outros mamíferos à infecção por este vírus, a exemplo de bovinos, cães, gatos, camelos e morcegos (BLITVICH, 2008).

O fato das aves serem os reservatórios e hospedeiros naturais do VNO facilita bastante a sua disseminação pelas Américas através das rotas utilizadas pelas aves migratórias. Isso pode ser constatado devido à rápida disseminação do vírus, a partir dos Estados Unidos no ano de 1999, para o Canadá, Caribe (LUNA; PEREIRA; SOUZA, 2003), Cuba e México (BLITVICH, 2008), onde foram observados casos humanos autóctones, e para a Colômbia (BERROCAL et al., 2006) e Argentina (MORALES et al., 2006), onde foram isolados vírus em eqüinos. Nos hospedeiros humanos, a infecção pelo vírus do Nilo Ocidental pode produzir desde quadros clínicos assintomáticos até casos neuroinvasivos graves e fatais, caracterizados por encefalites e meningites (BLITVICH, 2008).

2.2 Controle biológico

O controle biológico consiste na redução de uma população alvo de pragas e/ou vetores de doenças através da utilização de agentes biológicos, os quais compreendem predadores, patógenos, parasitos, competidores ou toxinas produzidas por microorganismos. Suas vantagens devem-se ao fato deste apresentar uma grande especificidade de alvo e não causar danos ao meio ambiente. Além disto, alguns agentes de controle biológico apresentam eficácia em longo prazo, mesmo após uma única introdução. Quando comparados aos pesticidas químicos, os agentes biológicos de controle ainda possuem um menor potencial de provocar seleção e de promover o desenvolvimento de resistência (HEMINGWAY, 2005).

A partir do ano de 1900, o controle biológico voltado para redução das populações de mosquitos vetores de doenças tornou-se popular através da utilização de peixes da espécie *Gambusia affinis* no combate às larvas destes insetos. Com o advento do inseticida químico dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT), durante as décadas de 1940 e 1950, as práticas incipientes de controle biológico foram substituídas pelo uso intenso deste inseticida sintético com intuito de combater as formas jovens e adultas de diversas espécies de insetos. Na medida em que as populações alvo começaram a desenvolver resistência ao DDT, por volta de 1960, aliado à identificação de sua alta toxicidade e persistência no ambiente, ressurgiu a necessidade da busca por medidas de controle biológico (HEMINGWAY, 2005).

Atualmente duas espécies de bactérias entomopatogênicas, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* (Bt), vêm ganhando notoriedade nos meios científicos e industrial para controle biológico. Elas são empregadas como princípio ativo de preparações industrializadas como inseticidas de pragas agrícolas e de vetores de doenças (RABINOVITH; SILVA; ALVES, 2000). Mais recentemente, foram criadas plantas e organismos transgênicos portadores de genes capazes de produzir as toxinas do Bt (HEMINGWAY, 2005).

A bactéria *B. sphaericus* apresenta uma boa persistência em ambientes com águas poluídas além de ser capaz, quando usada adequadamente, de causar reduções drásticas em populações de inúmeras espécies de culicídeos vetores, fazendo com que este agente seja utilizado de forma eficaz no combate a mosquitos em áreas urbanas (REGIS et al., 2001). Testes de campo já comprovaram a eficácia do *B. sphaericus* no controle de insetos vetores de doenças em diversos países (BARBAZAN et al., 1997; HOUGARD et al., 1993; KAHINDI et al., 2008; KUMAR et al., 1996; YADAV; SHARMA; UPADHYAY, 1997), inclusive no Brasil (REGIS et al., 1995, 2000; SILVA-FILHA et al., 2001).

2.2.1 *Bacillus sphaericus*

A espécie *Bacillus sphaericus* é uma bactéria aeróbia, gram-positiva e esporulante que pode ser naturalmente encontrada tanto em ambientes aquáticos como no solo. Esta bactéria apresenta uma ação tóxica contra diferentes mosquitos vetores, pertencentes à família Culicidae, principalmente às espécies representantes dos gêneros *Culex* e *Anopheles*. O espectro de sua atividade larvicida restringe-se à fase larvária do ciclo de vida destes insetos (REGIS et al., 2001).

Estudos indicaram que a toxicidade das cepas de *B. sphaericus* deve-se à toxina binária, a qual está contida nos cristais produzidos durante a fase de esporulação. Ela é sintetizada na forma de protoxina, composta por dois polipeptídeos de massa molecular de 42 e 51 kDa (BAUMANN et al., 1985; BAUMANN; BROADWELL; BAUMANN, 1988). Através de uma ativação proteolítica, ambos os polipeptídeos são clivados em fragmentos menores de 39 (BinA) e 43 (BinB) kDa (BROADWELL; BAUMANN, 1987). Os componentes BinA e BinB agem em sinergia, o que levou a denominar este conjunto de toxina binária (NICOLAS et al., 1993). Posteriormente, atribuiu-se ao componente BinA a função tóxica, enquanto que, o componente BinB foi apontado como o responsável pelo reconhecimento e a ligação a receptores específicos da membrana do epitélio intestinal das larvas dos mosquitos (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1996; NICOLAS et al., 1993).

O modo de ação da toxina binária consiste em diversas etapas, desencadeadas após a ingestão do cristal protéico pela larva do mosquito. Inicialmente, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino e a protoxina, liberada no lúmen, é clivada proteoliticamente (DAVIDSON, 1988), atingindo a forma de toxina ativa ao originar os fragmentos menores BinA e BinB (BROADWELL; BAUMANN, 1987). Esta toxina ativa interage com as células do ceco gástrico e do intestino posterior da larva através da ligação a receptores específicos na membrana celular (CHARLES et al., 1997; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; SILVA-FILHA; CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1997). Tal interação resulta em diversos efeitos citopatológicos como o surgimento de vacúolos citoplasmáticos, expansões mitocondriais, destruição das microvilosidades intestinais e intumescimento celular (CHARLES, 1987; MELO et al., 2008; PAUCHET et al., 2005; SINGH; GILL, 1988).

Conforme descrito acima, a sensibilidade das larvas de mosquitos vetores ao *B. sphaericus* deve-se à ligação da toxina binária a receptores específicos presentes em seus epitélios intestinais (CHARLES et al., 1997; NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992;

SILVA-FILHA; CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1997). Nas espécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, indicadas como uma das mais susceptíveis a esta bactéria, o receptor da toxina binária foi apontado como sendo uma maltase do tipo α -glicosidase ligada à membrana do epitélio intestinal destas larvas, através de uma âncora GPI (DARBOUX et al., 2001; SILVA-FILHA; CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1999). A proteína receptora da toxina binária foi denominada de Cpm1 e Cqm1 nas espécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, respectivamente.

2.2.2 Resistência à toxina binária do *Bacillus sphaericus*

Apesar do *Bacillus sphaericus* ser considerado um larvicida eficaz contra mosquitos do gênero *Culex*, foi observado que populações destes insetos, submetidas a constantes pressões de seleção, estão sujeitas ao aparecimento da resistência a esta bactéria. Diferentes níveis de resistência foram detectados em populações de *Culex pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* sob condições laboratoriais (AMORIM et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004; PEI et al., 2002) e de campo (MULLA et al., 2003; RAO et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 1995; YUAN et al., 2000).

Recentemente foram elucidadas as bases moleculares de três diferentes mecanismos de resistência ao *B. sphaericus* nas espécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*. Em todos os três casos, a falha de ligação da toxina ao receptor α -glicosidase foi apontada como o mecanismo de resistência. Estes estudos foram realizados com duas colônias de laboratório, uma proveniente do Brasil (CqRL1/2362) (ROMÃO et al., 2006) e outra dos Estados Unidos (GEO) (DARBOUX et al., 2002), e com a uma população natural, proveniente da França (BP) (DARBOUX et al., 2007).

O estudo realizado por Romão et al. (2006) com a colônia CqRL1/2362, estabelecida a partir de amostras de *Cx. quinquefasciatus* provenientes do bairro do Coque em Recife, indicou uma deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* como a responsável pelo mecanismo de resistência deste inseto à toxina do *B. sphaericus*. Esta deleção está implicada numa mudança da matriz de leitura (ORF), que leva à formação de um códon de terminação prematuro no RNA mensageiro, impedindo a síntese completa da proteína Cqm1. Como resultado, a proteína gerada perde mais de um quarto do seu tamanho original, incluindo a perda da âncora GPI, o que a impossibilita de desempenhar sua função como proteína de

membrana. Tal processo conseqüentemente é responsável por impedir que a toxina binária se ligue às células do epitélio intestinal destes mosquitos, fazendo com que estes sejam resistentes à bactéria (ROMÃO et al., 2006). Mais recentemente Chalegre et al. (2009) detectaram esta deleção em populações naturais de *Cx. quinquefasciatus*, provenientes de três localidades no estado de Pernambuco, e o alelo com a deleção de 19 nucleotídeos passou a ser denominado de *cqm1_{REC}* (CHALEGRE et al., 2009).

2.3 Genética de populações

A genética de populações é o ramo da genética que visa estudar as variações genéticas nas populações naturais e as forças que determinam e alteram as composições destas populações. Seu principal objetivo é esclarecer os mecanismos capazes de manter a homogeneidade e quais as forças responsáveis por gerar diferenciação genética entre as populações no meio ambiente (BLACK; TABACHNICK, 2005). Para tanto, esta ciência agrupa a observação e a teoria com o intuito de compreender tanto as alterações genéticas intrapopulacionais como entre populações (HARTL, 1988). As abordagens da genética de populações permitem ainda diferenciar os efeitos específicos inerentes a certos *loci*, causados por processos de seleção, mutação ou recombinação, daqueles que afetam todo o genoma, provocados pela deriva, efeito de gargalo, fluxo gênico ou endocruzamento (BLACK; TABACHNICK, 2005; LUIKARD et al., 2003). Os efeitos que afetam todo o genoma informam sobre a demografia da população e sobre sua história filogenética, ao passo que, os efeitos específicos de certos *loci* auxiliam apenas na identificação de genes que são importantes para o *fitness* e para a adaptação. Os *loci* neutros de um genoma são igualmente afetados pela demografia e história evolucionária da população enquanto que os *loci* sob pressão de seleção apresentam padrões de variações ou comportamentos extremamente diferentes do restante do genoma. *Loci* neutros são aqueles que não evoluem diretamente em resposta a uma pressão de seleção, uma vez que, a sua dinâmica está controlada principalmente pela deriva genética e pela migração. Conseqüentemente os *loci* neutros são herdados de acordo com as leis mendelianas e encontram-se nas proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg (LUIKART et al., 2003).

Um dos principais objetivos da genética de populações é descrever a quantidade de variação genética nas populações bem como os mecanismos capazes de manter esta variação

(NEI, 1987). A introdução da técnica de eletroforese de proteínas, no ano de 1966 (HARRIS, 1966; LEWONTIN; HUBBY, 1966), proporcionou um grande avanço com relação à aquisição de tais dados, uma vez que, foi possível se ter acesso a um enorme número de *loci* de organismos de qualquer espécie, provenientes de diferentes ambientes, utilizando apenas pequenas amostras de tecido. Desta maneira, pode-se considerar, portanto, que a eletroforese de isoenzimas (enzimas que atuam sobre o mesmo substrato), empregada em escala populacional, representou uma revolução para os estudos de genética de populações (SOLFERINI; SELIVON, 2004).

Nos anos subseqüentes ao advento desta técnica, foram publicados inúmeros trabalhos descrevendo os padrões eletroforéticos de proteínas em diferentes espécies. A sistematização da aplicação deste método molecular revelou uma extensa variação genética na maioria das populações naturais (HARTL, 1988). Neste contexto, Kimura (1968) propôs o modelo neutralista de evolução molecular, segundo o qual considera que a grande maioria da variação genética, em nível molecular dentro das populações, é seletivamente neutra e que a extensão desta variação é determinada primariamente pela taxa de mutação e deriva genética aleatória. Ao longo da primeira metade da década de 70, houve constantes discussões entre os defensores da teoria neutralista e entre os selecionistas. Enquanto os primeiros tratavam os padrões de diversidade segundo modelos neutros, defendendo que seria improvável que a seleção fosse capaz de manter tamanha diversidade, os selecionistas consideravam a variabilidade enzimática como adaptativa, resultante de processos seletivos (SOLFERINI; SELIVON, 2004).

2.3.1 Medidas de variabilidade genética

As estimativas de variabilidade genética são freqüentemente utilizadas para se fazer inferências sobre eventos históricos que tenham influenciado a estrutura genética das populações (SOLFERINI; SELIVON, 2004). Variados parâmetros de diversidade genética, os quais estão definidos a seguir, podem ser empregados para quantificar a variabilidade das populações, como por exemplo, os números de alelos por *locus* e suas freqüências, freqüências genotípicas, riqueza de alelos, heterozigosidades observada e esperada.

O número de alelos por *locus* (n_a) pode ser empregado para mensurar a variabilidade genética, entretanto há algumas desvantagens no que se refere a este parâmetro, uma vez que

o número de alelos observados depende fortemente do tamanho amostral. Esta dependência ocorre devido aos inúmeros alelos encontrados com baixa frequência nas populações naturais. Assim, o aumento do tamanho amostral é acompanhado por um aumento na probabilidade de se encontrar estes alelos pouco frequentes. Então, as comparações de n_a entre diferentes amostras não serão significativas, ao menos que, os tamanhos amostrais sejam similares (NEI, 1987).

O parâmetro frequência de alelos corresponde à frequência relativa de um alelo em particular em uma determinada população. Os genótipos são formados pela união de gametas masculinos e femininos, que ocorre geralmente ao acaso, e as frequências genótípicas são, portanto, as frequências relativas destes genótipos em uma população (NEI, 1987; NEI; KUMAR, 2000). A riqueza de alelos (R_S) é uma estimativa do número de alelos por *locus* independentemente do tamanho da amostra estudada, o que possibilita a realização de comparações entre populações com diferentes tamanhos amostrais (GOUDET, 1995). Conforme referido acima, em decorrência do número de alelos ser amplamente dependente do tamanho amostral, El Mousadik e Petit (1996) e Petit, El Mousadik e Pons (1998) propuseram o parâmetro de R_S com a finalidade de contornar tal problema.

A heterozigosidade observada (H_O) corresponde à proporção observada de heterozigotos em uma população. Já a heterozigosidade esperada (H_E), também denominada diversidade gênica, se refere à proporção esperada de heterozigotos supondo que a população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg e o cálculo do valor de H_E é baseado na frequência de alelos. O parâmetro de H_E é mais apropriado para mensurar a variação genética uma vez que ele pode ser usado independentemente do sistema de reprodução da população, da ploidia do organismo estudado e nos casos em que os genes encontram-se em cromossomos responsáveis pela determinação do sexo. Assim, a H_E pode ser utilizada em estudos com organismos haplóides, diplóides ou poliplóides que tenham reprodução assexuada, acasalamentos aleatórios ou auto-fecundação, o que faz com que este parâmetro seja denominado de maneira mais adequada de diversidade gênica. Assim como o parâmetro de n_a , a H_E também pode ser afetada pelo tamanho amostral, entretanto, este efeito é ínfimo uma vez que os alelos com baixas frequências dificilmente contribuem para tal quantificação (NEI, 1987; NEI; KUMAR, 2000).

2.3.2 Estrutura genética populacional

A estruturação genética é resultante de uma subdivisão populacional, provocada pela ausência de panmixia. A não ocorrência de panmixia dificulta a dispersão de mutações, que surgiram em certas áreas, para o restante das populações, aumenta o endocruzamento das subpopulações, acarretando uma diminuição de variabilidade genética, e eventos como a deriva genética e mutações poderão ocasionar uma divergência entre os diversos pontos (SOLÉ-CAVA, 2004). Populações subdivididas apresentam diferenças nas frequências alélicas as quais podem causar uma deficiência de heterozigotos (NEI, 1987).

A verificação da existência e dos níveis de estruturação genética nas populações naturais é realizada através dos índices de fixação F_{IS} (coeficiente de endocruzamento intrapopulacional), F_{ST} (coeficiente de diferenciação genética) e F_{IT} (coeficiente de endocruzamento total de uma população) (GOUDET, 1995; HARTL, 1988). Tais índices são calculados de acordo com os valores das heterozigosidades observadas (H_O) e esperadas (diversidade gênica, H_E), podendo ser utilizados em situações onde esteja havendo seleção ou não (NEI, 1987; NEI; KUMAR, 2000). Os índices de F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} medem, respectivamente, o déficit de heterozigotos dentro de uma população, entre populações e o déficit total das populações (GOUDET, 1995). O cálculo de F_{IS} é realizado considerando a H_O média e H_E média dentro de uma população, o F_{ST} é calculado através da H_E média intrapopulacional e da H_E média do total de populações e, para a obtenção do F_{IT} , consideram-se a H_O média intrapopulacional e a H_E média do total de populações (NEI; KUMAR, 2000).

Através dos níveis de heterozigosidades, representados pelos índices de fixação, conforme mostrado acima, é possível se fazer inferências sobre eventos que influenciam a estruturação genética das populações. Inúmeros eventos podem resultar na diferenciação genética entre populações, como por exemplo, colonização de um novo habitat ou de um novo território (efeito do fundador), afunilamento populacional (efeito gargalo), mudanças genéticas devido a eventos estocásticos (deriva genética e mutação) e seleção natural (direcional e disruptiva). Os estudos genéticos também podem mostrar que a deficiência de heterozigotos pode ser consequência do endocruzamento ou de efeito Wahlund (SOLFERINI; SELIVON, 2004). Este último ocorre quando uma população encontra-se subdividida em várias unidades de reprodução, ou seja, em subpopulações, fazendo com que as frequências de indivíduos homozigotos seja maior do que aquelas em equilíbrio de Hardy-Weinberg (NEI, 1987; NEI; KUMAR, 2000). Informações a respeito da estrutura genética das populações

naturais podem ser utilizadas em estudos evolutivos e como apoio em programas de manejo de espécies ameaçadas de extinção (SOLFERINI; SELIVON, 2004).

2.4 Marcadores moleculares

Estudos para a detecção de variabilidade genética em populações naturais podem ser realizados empregando-se uma variedade de técnicas de biologia molecular, através das quais é possível se obter inúmeros marcadores moleculares. Um marcador molecular é todo fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, sem que este último deva, necessariamente, corresponder a regiões expressas do genoma. Com relação aos marcadores moleculares, não há uma obrigatoriedade de se conhecer a seqüência de nucleotídeos ou de sua função. Caso estes marcadores se comportem de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, eles também podem ser denominados de marcadores genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Atualmente diferentes técnicas moleculares vêm sendo freqüentemente empregadas em análises de genética de populações, podendo-se destacar dentre elas o Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP), o Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente (RAPD), as isoenzimas, os microssatélites (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), o Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP) (BLACK; DUTEAU, 1997), a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o seqüenciamento de genes ou regiões específicas do DNA mitocondrial e de RNA ribossomal (HOY, 2003).

2.4.1 Microssatélites

Até o presente momento, os microssatélites são apontados como a classe de marcadores moleculares mais polimórfica disponível. Eles consistem de pequenas seqüências repetidas em tandem, compostas por 1 a 4 nucleotídeos de comprimento. São encontrados em genomas de diversos organismos eucariotos, geralmente com bastante freqüência e apresentando distribuição ao acaso. A detecção destes marcadores é feita através da técnica de PCR, utilizando pares de *primers* específicos e complementares à seqüência flanqueadora do

microsatélite. Cada grupo de elementos repetidos de um único microsatélite representa um *locus* enquanto que cada segmento amplificado de tamanho diferente, variando desde poucos até algumas centenas de pares de bases, representa um alelo diferente para este mesmo *locus* (figura 3). A visualização dos produtos de PCR pode ser feita em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, ou de agarose de alta resolução, corado com brometo de etídio, através de autoradiografia, quando se utiliza *primers* marcados com radioisótopos, (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) ou ainda através da genotipagem por análise de fragmentos com *primers* marcados por fluorescência, o que envolve a utilização de programas específicos para a visualização dos resultados.

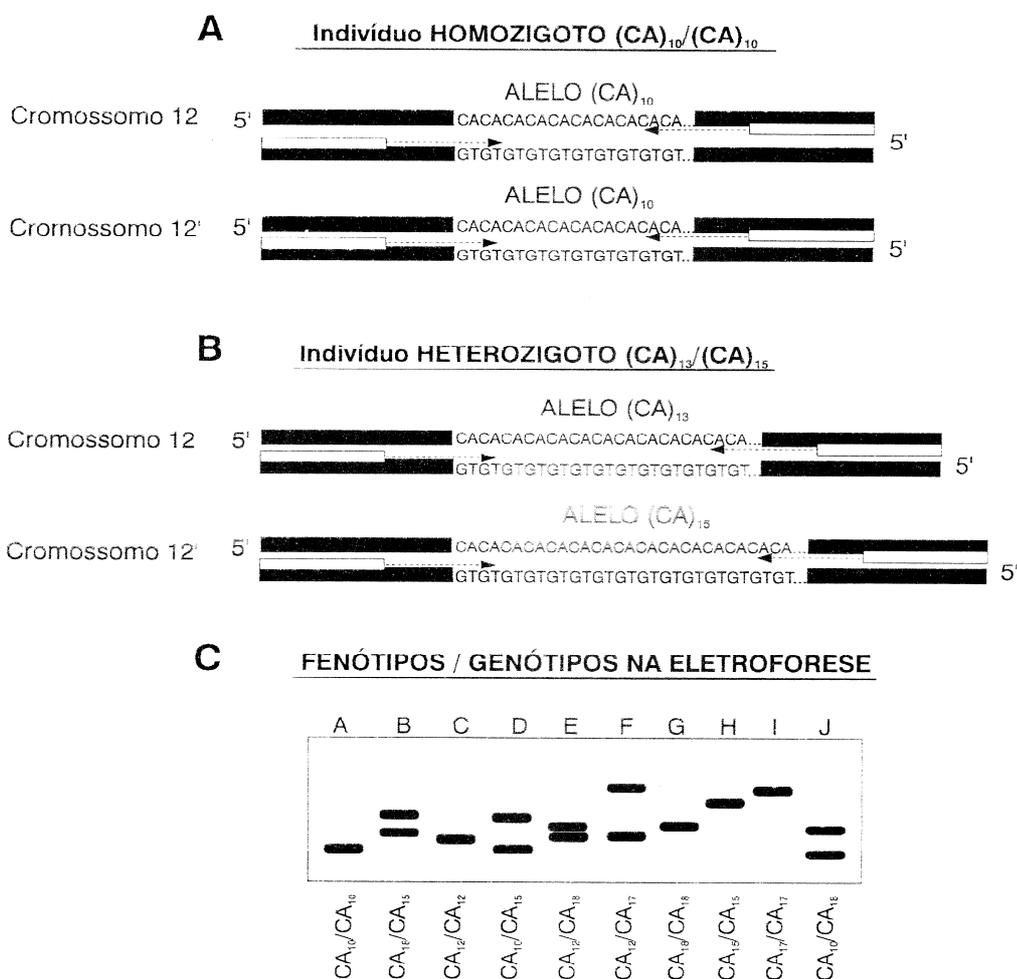


Figura 3 – Esquema da base genética dos marcadores de microsatélites bem como da detecção de seus polimorfismos.

Fonte: Ferreira; Grattapaglia (1998).

Nota: A: Genótipo de um indivíduo homocigoto [(CA)₁₀/(CA)₁₀]. B: Genótipo de um indivíduo heterocigoto [(CA)₁₃/(CA)₁₅]. C: Gel de eletroforese com os genótipos de diferentes indivíduos diplóides homocigotos (1 fragmento) e heterocigotos (2 fragmentos).

A técnica de microssatélites permite genotipar inúmeros *loci* em um grande tamanho amostral. Através deste marcador molecular é possível visualizar ambos os alelos pertencentes a um determinado *locus* de microssatélite de um indivíduo heterozigoto, exceto no caso em que houver alelos nulos. Por isso estes marcadores são denominados de co-dominantes. Associado à co-dominância, o fato destes marcadores também serem multialélicos faz com que eles sejam considerados como os que possuem o mais elevado conteúdo de polimorfismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores do tipo microssatélite são bastante informativos para estudos de estruturação genética de populações naturais. Os *loci* mais adequados para estas análises devem atender aos seguintes critérios: apresentar herança Mendeliana co-dominante, ser polimórfico, não estar sujeito a pressão de seleção (seletivamente neutro), estar associado randomicamente, não apresentar alelos nulos e ser abrangente no genoma (EDILLO et al., 2007).

Os microssatélites podem ser utilizados com inúmeros propósitos inclusive em estudos espaciais e temporais sobre variabilidade e estruturação genética de populações de mosquitos vetores de doenças. Tais estudos já foram realizados com diferentes populações de espécies vetoras como *Culex quinquefasciatus* (FONSECA et al., 2006; FONSECA; LAPOINTE; FLEISCHER, 2000), *Cx. pipiens* (HUANG; MOLAEI; ANDREADIS, 2008), *Aedes aegypti* (HUBER et al., 2002), *Anopheles gambiae* (PINTO et al., 2002, 2003) e *An. arabiensis* (KENT; MHARAKURWA; NORRIS, 2007; WONDJI et al., 2005;). Atualmente 24 *loci* de microssatélites estão descritos para a espécie *Cx. quinquefasciatus* (EDILLO et al., 2007; FONSECA; ATKINSON; FLEISCHER, 1998; SMITH et al., 2005), entretanto apenas 12 deles obedeceram aos seis critérios referidos no parágrafo anterior, o que os torna úteis para análises de estruturação genética em populações naturais (EDILLO et al., 2007; FONSECA et al., 2006; FONSECA; LAPOINTE; FLEISCHER, 2000; SMITH et al., 2005).

2.5 Programa de controle da filariose em Recife/PE

Durante os anos de 1999 e 2000, foi realizado um inquérito para estudar a prevalência da filariose por microrregião na cidade de Recife/PE, no intuito de definir as áreas prioritárias para consolidação do programa de controle de filariose em Recife/PE (RECIFE, 2005). O Distrito Sanitário II foi o que apresentou a maior prevalência no município, com destaque

para os bairros de Água Fria e Alto Santa Terezinha, localizados na microrregião 2. Estes apresentaram respectivamente prevalências de 6,21% e 10,37% (RECIFE, 2003).

Em março de 2003, a Prefeitura de Recife iniciou um programa de controle da filariose visando a sua eliminação, no qual foram promovidas medidas de combate ao vetor *Culex quinquefasciatus* e o tratamento quimioterápico em massa da população humana com a DEC. Aqui serão detalhadas apenas as ações voltadas para o controle do mosquito as quais são responsáveis pela diminuição do risco de transmissão desta doença. O programa integrou métodos mecânicos (reparo e/ou eliminação dos criadouros do vetor), métodos biológicos (aplicação bimestral de produtos à base do biolarvicida *Bacillus sphaericus*) e atividades de educação em saúde, com participação efetiva da comunidade, no intuito de garantir a continuidade das ações. Além disso, o programa buscou avaliar o impacto de suas atividades através de indicadores entomológicos (densidade de mosquitos adultos, densidade relativa de larvas e pupas, índice de imóveis com criadouros e índice de infecção vetorial) (RECIFE, 2003) e do monitoramento da susceptibilidade do *Cx. quinquefasciatus* ao *B. sphaericus* (ensaios *in vivo* de formas pré-imaginais do inseto, coletadas na área sob intervenção para cálculo das CL_{50} e CL_{90}) (SILVA-FILHA et al., 2008).

Entre os anos de 2001 e 2002, previamente ao início do Programa de Controle da Filariose, foram realizadas atividades como o cadastramento de criadouros, delimitação e zoneamento da área, estabelecimento de indicadores, seleção de estações de captura de alados e levantamento de dados entomológicos na microrregião 2 do Distrito Sanitário II. O objetivo desta etapa foi selecionar o local de implantação e execução das ações do programa bem como suas formas de avaliação e monitoramento no Distrito Sanitário II, anteriormente apontado como local de maior prevalência na cidade. As áreas selecionadas para intervenção piloto do programa foram Água Fria, Alto Santa Terezinha e outros 11 bairros circunvizinhos (Linha do Tiro, Beberibe, Porto da Madeira, Fundão, Cajueiro, Campina do Barreto, Arruda, Bomba do Hemetério, Alto José do Pinho, Morro da Conceição e Alto José Bonifácio). Estes locais foram eleitos para a realização do inquérito epidemiológico, do tratamento quimioterápico da população humana com a DEC e para as ações de controle vetorial (RECIFE, 2003).

A área de intervenção piloto foi subdivida em zona de avaliação (ZA) e zona de barreira (ZB). A ZA, localizada apenas em Água Fria, corresponde ao núcleo da área de intervenção de controle vetorial e foi selecionada para o monitoramento dos índices entomológicos, no intuito de avaliar o impacto das medidas de controle adotadas. A ZA corresponde à região de maior prevalência de filariose em todo o Distrito Sanitário II. A ZB,

que circunda a ZA, apresenta uma extensão territorial que garante uma proteção contra a introdução de mosquitos de áreas circunvizinhas. Seiscentos metros a partir da ZA seriam suficientes para garantir a sua proteção. Esta distância representaria apenas uma parte dos bairros limítrofes referidos acima, entretanto, devido a razões operacionais, a delimitação foi feita considerando o limite de cada bairro, o que ampliou a extensão territorial da ZB (figura 4). Ambas as zonas foram submetidas às mesmas intervenções de controle vetorial, no entanto, a coleta dos dados entomológicos foi feita apenas na ZA (RECIFE, 2003).

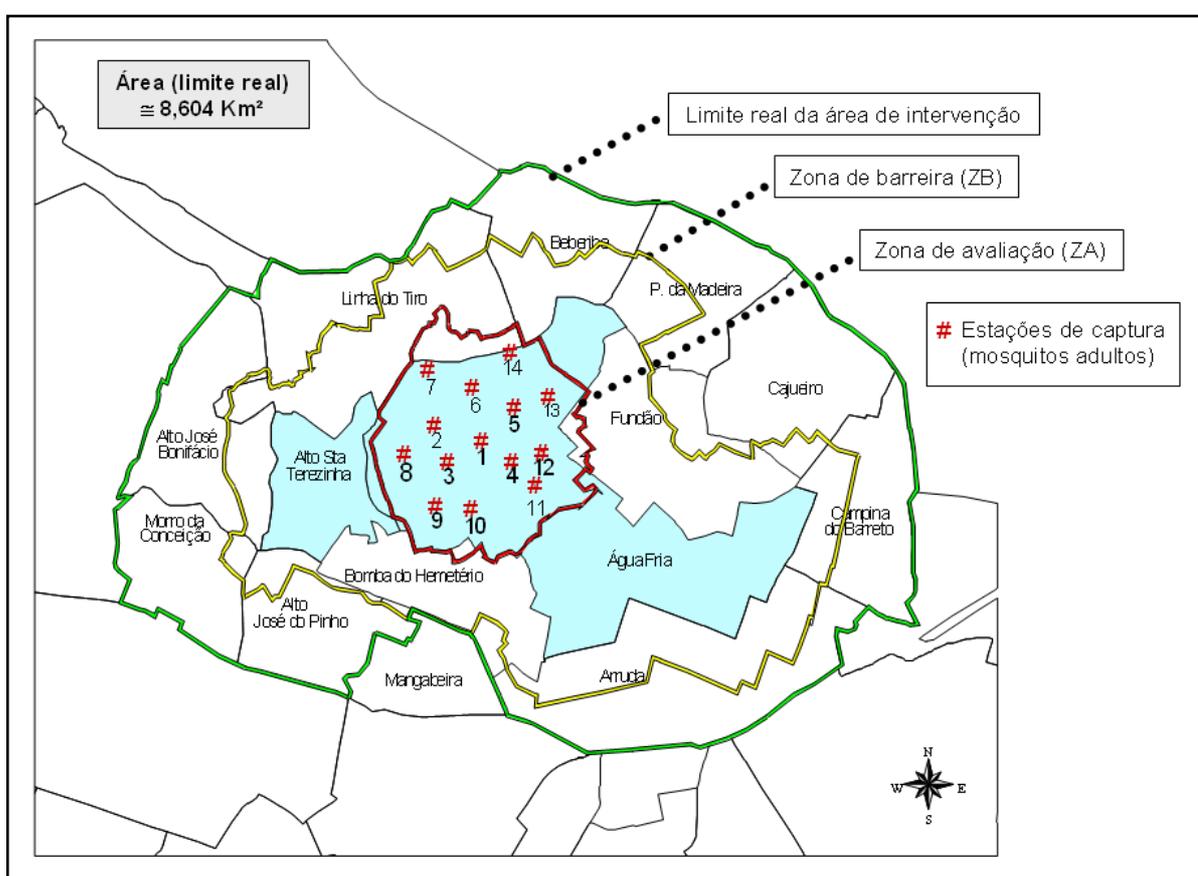


Figura 4 - Mapa da área de intervenção piloto do programa de controle da filariose indicando a zona de avaliação (ZA), a zona de barreira (ZB), a distância de 600 metros a partir da ZA, e o limite real escolhido como ZB.

Fonte: Recife (2003).

Nota: Na ZA, núcleo da área de intervenção piloto, estão indicadas as estações onde foram instaladas as armadilhas luminosas para captura de mosquitos *Culex quinquefasciatus* adultos.

Em 2003 foi firmada uma parceria entre o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz e a Secretaria de Saúde da Prefeitura de Recife, no âmbito deste programa, e o nosso grupo vem empregando ferramentas moleculares para monitorar o efeito das ações de controle vetorial em Água Fria. Através do diagnóstico molecular, Cartaxo et al. (2007) observaram

redução no percentual de infecção pelo parasito nas populações do vetor. Em um estudo anterior, utilizando marcadores neutros, mostramos que variações temporais na diversidade genética intrapopulacional podem ser úteis como ferramenta para acompanhar flutuações na composição genética de uma população de *Cx. quinquefasciatus* sob intervenção de controle vetorial. Entretanto, as técnicas empregadas (RFLP, SSCP e seqüenciamento do gene que codifica a citocromo oxidase II e RAPD) não revelaram um alto polimorfismo requerido a este tipo de abordagem (CARTAXO, 2006). Isto suscitou a necessidade de utilizar outro marcador neutro mais sensível, uma vez que as densidades das populações de mosquitos são muito grandes. Apenas um marcador molecular bastante polimórfico seria capaz de apresentar a sensibilidade necessária para detectar uma diversidade representativa de uma população tão numerosa. A proposta do presente trabalho é, portanto, avaliar o impacto das intervenções de controle vetorial, que estão sendo realizadas em Água Fria, sobre a diversidade genética bem como verificar se elas estão resultando em uma estruturação genética da população de *Cx. quinquefasciatus*, ao longo de diferentes momentos. Para tal finalidade foram empregados um marcador neutro do tipo microssatélite e um marcador sob pressão de seleção ao *B. sphaericus*, gene *cqm1*.

3 JUSTIFICATIVA

Populações de mosquitos são capazes de se restabelecerem rapidamente após sofrerem reduções nas suas densidades, uma vez que as mesmas são r-estrategistas. Por isso, o contínuo monitoramento e a avaliação dos efeitos das estratégias adotadas destacam-se como pontos fundamentais nos programas de controle de mosquitos vetores de doenças (REGIS; NIELSEN-LEROUX, 2000). De acordo com a OMS, a falta de um sistema de monitoramento eficiente é um dos principais responsáveis pelas falhas nos programas de controle da filariose (SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES, 2002).

Geralmente, os impactos causados pelas intervenções de controle sobre populações de mosquitos são avaliados e monitorados através dos índices entomológicos, capazes de mensurar as densidades das formas jovens e/ou adultas (GOMES, 2002; REGIS et al., 1995, 2000). Análises voltadas para a detecção do desenvolvimento de resistência, tanto a inseticidas químicos (COLEMAN et al., 2008; LINDBLADE et al., 2005) como biológicos (RAO et al., 1995; SILVA-FILHA et al., 1995), realizadas geralmente através de bioensaios, também são amplamente utilizadas para monitorar tais programas. Alguns autores têm empregado ainda ferramentas moleculares em estudos de genética de populações, a fim de avaliar a diversidade e estruturação genética em populações de diferentes espécies de insetos vetores expostas a inseticidas (CHEVILLON et al., 1995; LENORMAND et al., 1999; PINTO et al., 2002, 2003; WONDJI et al., 2005).

A proposta do presente trabalho é utilizar uma abordagem alternativa, através do emprego de ferramentas moleculares, com a finalidade de avaliar os efeitos causados pelo programa de combate vetorial em Água Fria. Este estudo visa, portanto, verificar se tais ações foram capazes de impactar a diversidade genética da população de *Culex quinquefasciatus*. Desta maneira, estudos moleculares poderão ser úteis como ferramentas auxiliares aos métodos convencionais na avaliação do desempenho destes programas.

4 PERGUNTA CONDUTORA

As ações no âmbito do programa de controle vetorial estão sendo capazes de impactar a diversidade genética da população de *Culex quinquefasciatus* de Água Fria?

5 HIPÓTESE

As ações de controle vetorial estão causando a redução da diversidade genética, o aumento da frequência de um marcador sob pressão de seleção e contribuindo para o aumento da diferenciação genética da população de *Culex quinquefasciatus* de Água Fria ao longo do tempo.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto das ações no âmbito do programa de controle vetorial sobre a diversidade genética da população de *Culex quinquefasciatus* de Água Fria no decorrer do programa, de junho de 2003 a setembro de 2006.

6.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os parâmetros de diversidade genética, através da análise de microssatélites, na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria, ao longo do programa de controle;
- b) Avaliar os parâmetros de diversidade genética do gene *cqm1* na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria, ao longo do programa de controle;
- c) Determinar a correlação entre o marcador neutro (microssatélites) e marcador sob pressão de seleção (gene *cqm1*) ao longo do programa de combate ao *Cx. quinquefasciatus* em Água Fria.

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

7.1 Área de estudo

O estudo foi realizado com amostras de uma população de mosquito *Culex quinquefasciatus* provenientes do bairro de Água Fria (Recife/PE) (08°04'03" Sul; 34°55'00" Oeste). Este bairro, localizado no Distrito Sanitário II, é um dos mais populosos da cidade (RECIFE, 2005), sendo composto por 44.020 habitantes e 10.900 domicílios (RECIFE, 2008). O bairro de Água Fria foi selecionado para implantação do Programa de Controle da Filariose por apresentar uma significativa prevalência de microfilaremia (6,21%) e ser considerado de alto risco sócio-ambiental (RECIFE, 2003). Apenas na zona de avaliação do programa de controle, com área de aproximadamente 1,14 km², foram contabilizados em torno de 3.000 criadouros de *Cx. quinquefasciatus* (SILVA-FILHA et al., 2008). Este conjunto de criadouros era composto principalmente por fossas, cisternas, canais, caixa de inspeção e caixas de passagens entre outros como canaletas, valetas e charcos (RECIFE, 2003).

As intervenções para redução da população vetora, no âmbito do programa, foram iniciadas em março de 2003. Estas incluíram o reparo e/ou eliminação dos criadouros do mosquito, aplicação bimestral do biolarvicida *Bacillus sphaericus* e monitoramento através de indicadores entomológicos (densidade relativa de larvas e pupas, densidade de mosquitos adultos e índice de imóveis com criadouros) (RECIFE, 2003). Em cada tratamento utilizou-se, por criadouro, de 3 a 5 g/m² do biolarvicida Vectolex G (Valent Biosciences[®]), produto a base de *B. sphaericus*, cepa 2362 (SILVA-FILHA et al., 2008).

7.2 Amostragem

Agentes de Saúde da Prefeitura de Recife coletaram ovos, larvas e pupas de *Culex quinquefasciatus* em fossas localizadas em sete diferentes residências no bairro de Água Fria (figura 5), cuja distância mínima entre elas foi de 36 metros e a distância máxima foi de 865 metros. Tais coletas foram realizadas em seis diferentes momentos: junho/2003, agosto/2003, dezembro/2003, abril/2004, junho/2004 e outubro/2004. Amostras de mais duas coletas,

relativas aos meses de maio/2005 e setembro/2006, foram gentilmente cedidas pelo grupo da Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha para este estudo, totalizando oito diferentes momentos avaliados. A primeira coleta foi feita após três meses do início do tratamento com o agente *Bacillus sphaericus*. Todo o material foi enviado ao Laboratório de Controle de Vetores do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/ Fiocruz) e mantido, em temperatura de 27 °C e umidade 80%, até a emergência dos adultos. Estes foram armazenados a -20 °C para subsequente extração de DNA.

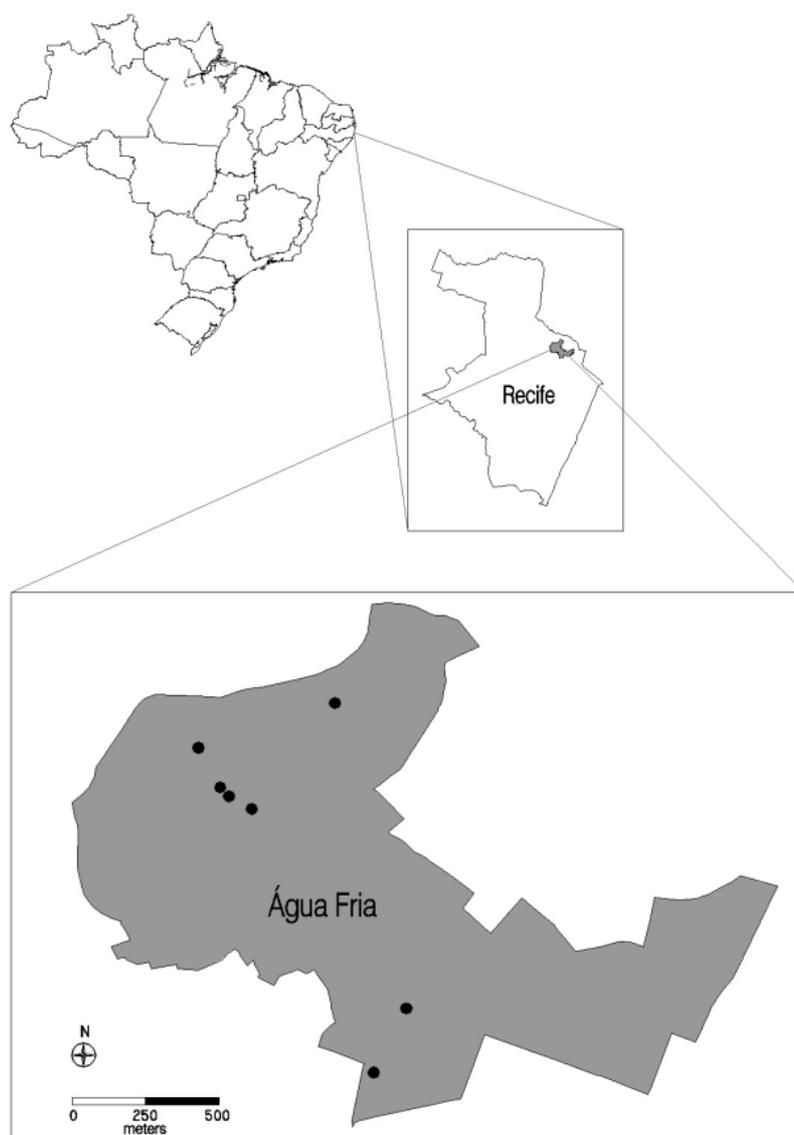


Figura 5 – Mapas do Brasil, da cidade de Recife e do bairro de Água Fria, sendo que, neste último, encontram-se destacados todos os sete locais de coleta das formas jovens da espécie *Culex quinquefasciatus* ao longo dos diferentes momentos de estudo.

Além das amostras já referidas acima, 20 amostras provenientes do município de Fazenda Nova também foram utilizadas como *out group* para a construção da árvore de F_{ST} , através do método de *neighbor-joining*, conforme descrito adiante para a análise de microsatélite. Fazenda Nova é um distrito rural, localizado no estado de Pernambuco, que está situado a aproximadamente 180 km de Recife. Esta área nunca foi exposta a um programa a um programa de controle vetorial utilizando a bactéria entomopatogênica *Bacillus sphaericus*.

7.3 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada utilizando tanto indivíduos adultos machos como fêmeas. Os mosquitos foram macerados individualmente em uma solução preparada com 400 μ l de tampão de lise (NaCl 0.4 M, EDTA 2 mM e Tris-HCl 10 mM pH 8.0), 72 μ l de SDS 10% e 7 μ l de proteinase K (10 mg/mL). Posteriormente, incubou-se o homogenato a 65 °C por aproximadamente 8 h e, após este período, foi feita suspensão do DNA adicionando-se 420 μ L de NaCl 5 M. A mistura foi homogeneizada rapidamente num agitador seguida por uma centrifugação a 14.000 rpm por 20 min. Ao final descartou-se o *pellet*. Após estes procedimentos, o DNA foi precipitado pela adição de isopropanol e incubado a -20 °C durante 1 h. Passado este tempo, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm durante 20 min e o sobrenadante foi descartado, restando apenas o *pellet*. Este foi lavado com etanol 70%, e posteriormente seco num liofilizador (Eppendorf®). Após os procedimentos descritos anteriormente, o sedimento foi recuperado em 300 μ L de tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM). Ao final do procedimento, preparou-se um gel de agarose 0,8% a fim de se visualizar a qualidade das amostras processadas. Estas foram coradas com brometo de etídio, submetidas à eletroforese por 50 minutos a 120 V, em um tampão TBE (Tris 45mM, ácido bórico 45mM e EDTA 1mM pH 8,0), e visualizadas em um transiluminador ultravioleta (Vilber Lourmat®).

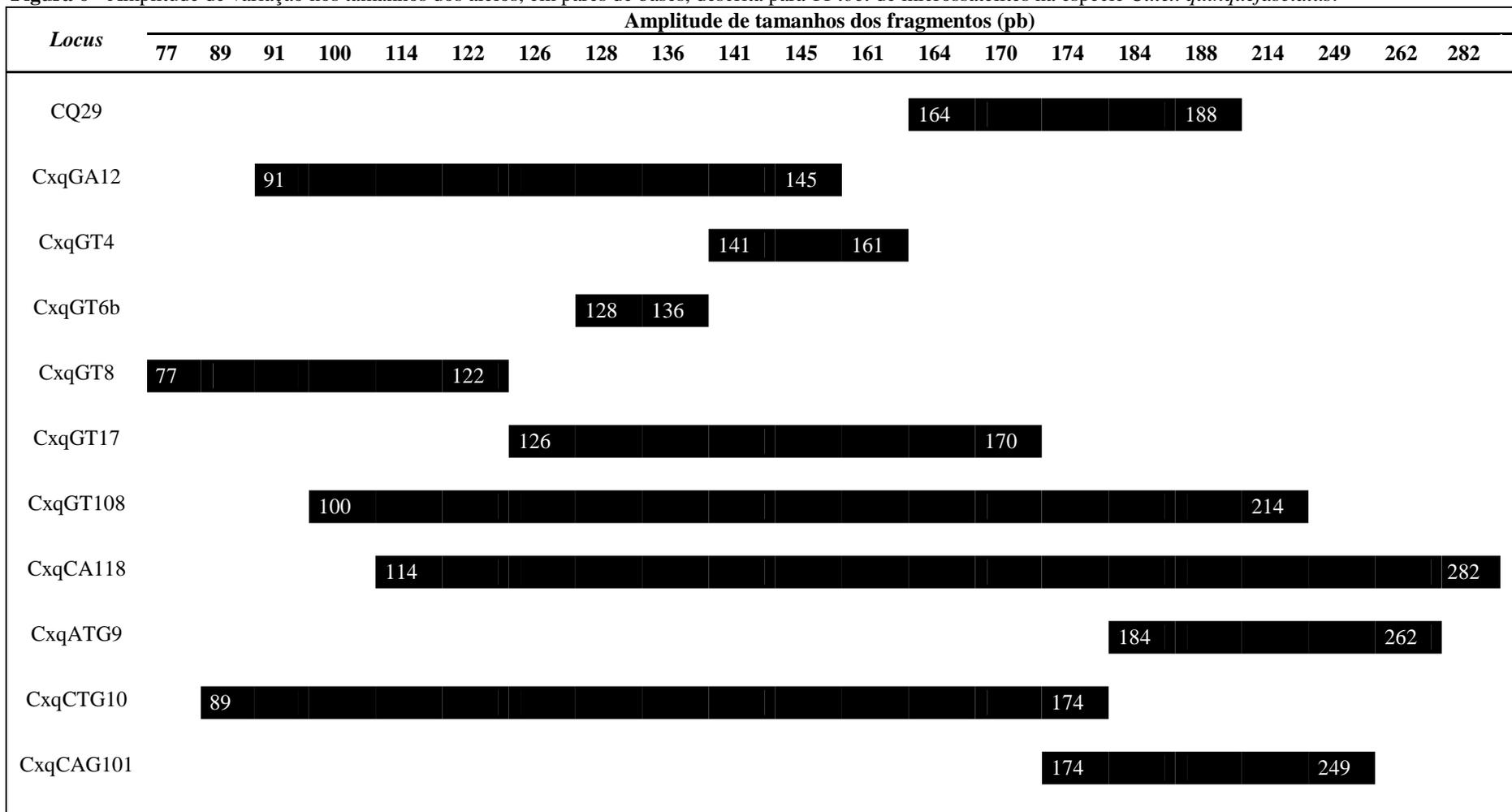
7.4 Estudo com marcador neutro

7.4.1 Amplificação de microssatélites

Inicialmente foram testados 11 *loci* de microssatélites para o estudo: CQ29 (FONSECA; ATKINSON; FLEISCHER, 1998), CxqGA12, CxqGT4, CxqGT6b, CxqGT8, CxqGT17 (SMITH et al., 2005), CxqGT108, CxqCA118, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101 (EDILLO et al., 2007). A seleção destes *loci* para o teste foi feita considerando aqueles que estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não apresentaram desequilíbrio de ligação, não apresentaram alelos nulos e que foram descritos como bastante polimórficos. Apenas quatro (CxqGT6b, CxqCA118, CxqCTG10 e CxqCAG101) dos *loci* escolhidos não se enquadravam nos critérios acima, entretanto, foram testados em virtude das amplitudes de tamanhos de seus alelos, as quais permitiam que eles fossem combinados aos outros *loci* selecionados (figura 6). Os *loci* CxqGT6b e CxqCA118 não obedeceram aos critérios por apresentarem um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EDILLO et al., 2007; SMITH et al., 2005) enquanto que os *loci* CxqCTG10 e CxqCAG101 foram apontados como pouco polimórficos (EDILLO et al., 2007) para a espécie *Culex quinquefasciatus*. Os testes foram feitos com 12 amostras desta espécie, proveniente de Água Fria.

Após os testes foram utilizados apenas 5 *loci* de microssatélites (CQ29, CxqGT8, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101) para o estudo e as razões para estas escolhas estão detalhadas no item resultados. As amplificações foram realizadas em 323 amostras utilizando os *primers forward* e *reverse* CQ29 (FONSECA; ATKINSON; FLEISCHER, 1998), CxqGT8 (SMITH et al., 2005), CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101 (EDILLO et al., 2007), sendo que apenas os *forward* foram marcados com fluoróforos. Os *primers* CQ29, CxqGT8 e CxqATG9 foram marcados com o fluoróforo Cy5 (fluorescência azul) enquanto os *primers* CxqCTG10 e CxqCAG101 foram marcados com o fluoróforo Cy5.5 (fluorescência verde). Cada reação foi feita para um volume final de 20 μ l utilizando tampão NH₄ 1X [16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8) e estabilizador 0,01%] (Bioline[®]), 0,05 mM de cada dNTP (Bioline[®]), *primers* (Eurofins MWG Operon[®]) e MgCl₂ (Bioline[®]) com concentrações diversas (tabela 1), 0,15 mg/ml Albumina sérica bovina (BSA) (Promega[®]), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Bioline[®]) e 1 μ l do DNA molde. Vale salientar que não foi utilizada BSA apenas na amplificação do *locus* CQ29. Para cada grupo de reações foram feitos controles negativos, os quais eram constituídos de todos os reagentes supracitados com exceção do DNA molde, no intuito de checar a possibilidade de contaminação.

Figura 6 - Amplitude de variação nos tamanhos dos alelos, em pares de bases, descrita para 11 *loci* de microsatélites na espécie *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: adaptado de Edillo et al. (2007), Fonseca et al. (2006), Fonseca; Atkinson; Fleischer (1998), Fonseca; Lapointe; Fleischer (2000) e Smith et al. (2005).

Tabela 1 - *Loci* de microssatélites analisados no estudo, com as suas respectivas seqüências de *primers*, repetições dos microssatélites e concentrações de cada *primer* e do MgCl₂ utilizados nas amplificações.

<i>Locus</i>	Seqüências dos <i>primers</i>	<i>Repeat amplificado</i>	Concentração <i>primer</i> (µM)	Concentração MgCl ₂ (mM)
CQ29	F TGGGAGAGCATAGTTTCAGG R TGCTCAGGAGACTCTACTGG	(GT) ₂ GA(GT) ₁₀	0,2	1,5
CxqGT8	F TGTTCATCTTCCCAGTAGC R CCGCGCTAAATTACAAAATACAC	(GT) ₁₅	0,2	2
CxqATG9	F CCACTCAAACATAAACACACACA R AATGCCATAACCATCGTCAT	(ATG) ₇	0,2	1,5
CxqCTG10	F CGTTCTCCAACCTGTCATCTTTC R AACCGAAATCGGAAGGTATTAA	(CTG) ₄ TTG(CTG) ₄	0,5	1,5
CxqCAG101	F CAATCAGGGAACCTCAATC R GGGACTGGGTATTAGGAGAC	(CAG) ₆	0,5	2,5

Nota: F, *primer forward* e R, *primer reverse*.

As soluções foram amplificadas em um termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems[®]) programado para diferentes condições conforme adaptações dos procedimentos descritos por Fonseca, Atkinson e Fleischer (1998), Smith et al. (2005) e Edillo et al. (2007). Para o *locus* CQ29 as reações foram feitas em 30 ciclos de 96 °C por 40 seg, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, precedidos por uma etapa de 96 °C por 5 min e sucedidos por outra etapa a 72 °C por 5 min. As condições de amplificação para o *locus* CxqGT8 foram: uma fase inicial de 96 °C por 5 min, seguida por 45 ciclos de 96 °C por 30 seg, 54 °C por 40 seg e 72 °C por 40 seg e, por fim, uma extensão final de 72 °C por 5 min. Para os *loci* CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101 a fase inicial foi de 94 °C por 5 min seguida por 35 ciclos de 94 °C por 40 seg, 58 °C por 40 seg e 72 °C por 30 seg e uma fase final de 72 °C por 15 min.

Após cada reação de PCR, adicionou-se uma cauda poli-A aos produtos amplificados em decorrência de diferenças nos tamanhos dos fragmentos obtidos entre a extensão das fitas positivas e negativas do DNA. O procedimento consistiu na preparação de um solução com tampão NH₄ 0,33X [5,33 mM (NH₄)₂SO₄, 22,33 mM Tris-HCl (pH 8.8) e 0,003% estabilizador] (Bioline[®]), 0,07 mM de cada dNTP (Bioline[®]), 2,5 mM de MgCl₂ (Bioline[®]), 0,75 U de Taq DNA polimerase (Bioline[®]) e 20 µl do produto de PCR. A mistura foi submetida a uma etapa de extensão à temperatura de 72 °C por 30 min em um termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems[®]).

7.4.2 Separação por tamanho de fragmentos e identificação dos alelos de microssatélites

Após a adição da cauda poli-A, foi preparada uma mistura para cada amostra separadamente contendo alíquotas dos produtos de PCR referentes a cada um dos cinco *loci* de microssatélites. De cada mistura retirou-se 4 μ l, os quais foram adicionadas a 35,5 μ l de *GenomeLab Sample Loading Solution* (Beckman Coulter®) e a 0,5 μ l de *GenomeLab DNA Size Standard Kit-400* (Beckman Coulter®), resultando em uma solução final de 40 μ l, relativa a cada amostra específica. Após tais procedimentos, foi realizada a genotipagem, através da separação por tamanho de fragmentos dos diferentes alelos de cada *locus* e detecção de suas fluorescências, utilizando o seqüenciador CEQ 8000 (Beckman Coulter®). As análises dos eletroferogramas gerados foram feitas no programa CEQ 8000 *Series Genetic Analysis System* (Beckman Coulter®).

7.4.3 Análise dos dados de microssatélites

Os parâmetros de variabilidade genética avaliados no estudo foram número de alelos e suas freqüências, riqueza de alelos e heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (NEI, 1987). Todos foram estimados por *locus* nos oito diferentes momentos de coleta através do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). A riqueza de alelos (R_S) é uma medida do número de alelos independente do tamanho amostral. Assim, tal estimativa permite comparações entre amostras com diferentes tamanhos. Esta foi uma estratégia proposta por El Mousadik e Petit (1996) e Petit, El Mousadik e Pons (1998) para lidar com o problema, uma vez que a quantidade de alelos observados em uma amostra é fortemente influenciada pelo tamanho amostral. A heterozigosidade esperada (H_E), também denominada diversidade gênica (NEI, 1987), é uma medida de extensão de diversidade genética amplamente utilizada. Ela é calculada baseando-se na freqüência dos alelos.

Além dos parâmetros supracitados, avaliou-se a diferenciação genética entre os momentos de coleta, estimada pelo índice de fixação F_{ST} . Este índice reflete a proporção de variabilidade genética encontrada entre populações devido à subdivisão populacional (estruturação genética) (SOLFERINI; SELIVON, 2004). Os valores de F_{ST} foram calculados segundo o método de Weir e Cockerham (1984) através do programa FSTAT versão 2.9.3.2

(GOUDET, 1995). É importante destacar que, devido aos baixos valores de heterozigosidade encontrados para o *locus* CxqCTG10 em comparação aos outros *loci*, foi necessário fazer uma correção dos índices F_{ST} utilizando o programa RecodData versão 0.1 (MEIRMANS, 2006). O cálculo da correção consistiu na divisão do F_{ST} obtido no programa FSTAT pelo valor gerado no programa RecodData. Isto resultou em um F_{ST} corrigido o qual foi utilizado em todas as comparações. A associação entre diferenciação genética e o tempo de separação entre as coletas foi verificada pelo teste de Mantel, considerando 5.000 permutações, através do suplemento POPTOOLS versão 3.0.6, acessório do Microsoft EXCEL (HOOD, 2008). O teste de Mantel foi realizado através da comparação entre uma matriz com o tempo de separação entre os diferentes momentos de estudo (tabela 2) e uma matriz com os valores do F_{ST} corrigido. Além disso, foi construída uma árvore através do método de *neighbor-joining*, utilizando o programa Phylip versão 3.68 (FELSENSTEIN, 2008) e a sua visualização foi realizada pelo programa TreeView versão 1.6.6 (PAGE, 1996). Esta árvore foi construída utilizando os valores de F_{ST} e a mesma serviu para mostrar, através de uma representação gráfica, a ocorrência ou não de agrupamentos entre os momentos de coleta.

Tabela 2 - Matriz mostrando o tempo de separação, em meses, entre os diferentes momentos de estudo.

	1 ^a Coleta (Jun/03)	2 ^a Coleta (Ago/03)	3 ^a Coleta (Dez/03)	4 ^a Coleta (Abr/04)	5 ^a Coleta (Jun/04)	6 ^a Coleta (Out/04)	7 ^a Coleta (Mai/05)	8 ^a Coleta (Set/06)
1 ^a Coleta (Jun/03)								
2 ^a Coleta (Ago/03)	2							
3 ^a Coleta (Dez/03)	6	4						
4 ^a Coleta (Abr/04)	10	8	4					
5 ^a Coleta (Jun/04)	12	10	6	2				
6 ^a Coleta (Out/04)	16	14	10	6	4			
7 ^a Coleta (Mai/05)	23	21	17	13	11	7		
8 ^a Coleta (Set/06)	39	37	33	29	27	23	16	

O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para cada *locus* pelo índice de fixação F_{IS} , através do FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Valores negativos de F_{IS} apontam para um excesso de heterozigotos enquanto que valores positivos são indicativos de um déficit de heterozigotos. Testes para detecção de desequilíbrio de ligação foram realizados

através do programa GENEPOP versão 4.0 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Para tanto, utilizou-se o algoritmo de cadeia de Markov, que faz uma comparação de todos os possíveis pares de *loci* em cada momento de coleta separadamente, e pelo método de Fisher, utilizando o teste do qui-quadrado, que compara todos os possíveis pares de *loci* na população total.

7.5 Estudo com marcador sob pressão de seleção

7.5.1 Amplificação do fragmento do gene *cqm1*

O estudo utilizando o marcador sob pressão de seleção foi feito pela amplificação de um fragmento do gene *cqm1*, para detecção dos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}*. Este último codifica o receptor com a deleção de 19 nucleotídeos, descrito por Romão et al. (2006). Nesta etapa do estudo foram utilizadas as mesmas 323 amostras previamente empregadas nas análises de microssatélites. Os *primers* Cpq2F (5'-CGAGAATTCATGCAGGACTTCAAAGAG-3') e Cpq1R (5'-GCACTGCAGGGAAGTGGTGGGAAGGTAC-3'), descritos por Chalegre et al. (2009), foram utilizados para amplificar uma porção do gene sob pressão de seleção. Estes anelam nas regiões flangeadoras da deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* e foram desenhados a partir da seqüência do alelo *cqm1_{REC}* da colônia resistente CqRL1/2362, descrita por Romão et al. (2006).

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µl, de acordo com Chalegre et al. (2009), utilizando 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen[®]), 1,6 µM de cada *primer* (Invitrogen[®]), 2 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen[®]), tampão 1X (KCl 50 mM e Tris-HCl 20 mM pH 8.4) (Invitrogen[®]), 1,4 mM de MgCl₂ (Invitrogen[®]) e 2 µl do DNA total do mosquito, extraído conforme citado no item 7.3. Foram feitos controles negativos para cada grupo de reações, onde se utilizou todos os reagentes necessários à PCR com exceção do DNA molde. As amplificações foram feitas num termociclador T3000 (Biometra[®]) programado para um ciclo inicial de 94 °C por 3 min, seguido de 34 ciclos a 94 °C por 50 seg, 55 °C por 50 seg e 72°C por 120 seg e, ao final, uma etapa de 72 °C durante 10 min (CHALEGRE et al., 2009). As amplificações das amostras referentes aos meses de maio/2005 e setembro/2006 para o gene *cqm1* foram realizadas pelo grupo da Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha segundo Chalegre et al. (2009).

7.5.2 Identificação dos alelos *cqm1* e *cqm1_{REC}*

A análise dos produtos de PCR do gene *cqm1* foi feita de acordo com as diferenças de tamanho, em pares de bases, para identificação dos genótipos susceptíveis e resistentes. Assim, os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese sob potência de 120 V, durante 120 minutos, em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, e visualizados em um transiluminador ultravioleta (UVP[®]). Há possibilidade de serem encontrados 3 diferentes genótipos: um fragmento de 208 pb correspondente aos indivíduos homocigotos sem deleção (genótipo susceptível), um de 189 pb que corresponde aos indivíduos homocigotos com a deleção (genótipo resistente) e amostras com ambos os fragmentos referentes aos indivíduos heterocigotos (genótipo susceptível).

7.5.3 Análise dos dados do gene *cqm1*

Após a identificação dos diferentes genótipos, determinou-se o número e as frequências dos alelos bem como a heterocigosidade esperada para cada momento de coleta. Estes parâmetros de variabilidade genética foram calculados através do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). A diferenciação genética entre as amostras para o gene *cqm1* foi obtida pelo índice de fixação F_{ST} , seguindo o modelo de Weir e Cockerham (1984). Os cálculos foram realizados pelo programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). A fim de permitir uma comparação com os dados de microssatélites, os índices de F_{ST} utilizados para o estudo do marcador sob pressão de seleção também foram corrigidos no programa RecodData versão 0.1 (MEIRMANS, 2006), de acordo com o procedimento supracitado. Também foi realizada uma análise de correlação com o propósito de comparar ambas as matrizes de distância (estimativa de F_{ST} para o gene *cqm1* e tempo de separação entre as coletas), pelo teste de Mantel com 5.000 permutações, utilizando o acessório POPTOOLS versão 3.0.6 (HOOD, 2008). Conforme já citado no estudo de microssatélites, o teste de Mantel baseou-se na comparação entre uma matriz com o tempo de separação entre os diferentes momentos de estudo (tabela 2) e uma matriz com os valores do F_{ST} corrigido.

7.6 Comparação entre os microssatélites e o gene *cqm1*

O estudo comparativo entre o marcador neutro (microssatélite) e o marcador sob pressão de seleção (gene *cqm1*), ao longo dos diversos períodos de tempo considerados, foi realizado por um teste parcial de Mantel. Este se baseia no uso de três matrizes e seu objetivo é testar a correlação entre duas delas sob a interferência de uma terceira matriz. Tal correlação foi estimada pelo programa ZT (BONNET; VAN DE PEER, 2002) através da comparação entre as matrizes de F_{ST} do microssatélite e do gene *cqm1* sob interferência da matriz do tempo de separação entre as coletas.

8 RESULTADOS

8.1 Estudo com microssatélites

A partir dos resultados gerados com os testes dos 11 *loci* de microssatélites, apenas seis deles (CQ29, CxqGT8, CxqGT108, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101) mostraram-se apropriados para o estudo. Os *loci* CxqGA12 e CxqGT6b foram excluídos pois as suas amplificações geraram produtos com baixa concentração. Além disso, a amplitude dos alelos do *locus* CxqGT6b se sobrepôs à dos *loci* CQ29, CxqGT108 e CxqCAG101 (figura 7), e como ele já havia apresentado previamente um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (SMITH et al., 2005), decidiu-se eliminá-lo do estudo. O *locus* CxqGT4 foi descartado uma vez que não foi possível amplificá-lo em nenhuma das 12 amostras testadas. A amplificação do *locus* CxqGT17 gerou três fragmentos de aproximadamente 190, 270 e 510 pares de bases. Possivelmente estes dois últimos foram fragmentos inespecíficos e por esta razão o *locus* CxqGT17 também foi excluído do estudo. Os tamanhos dos alelos do *locus* CxqCA118 se sobrepuseram aos do *locus* CxqATG9 (figura 7), e como este primeiro foi descrito por Edillo et al. (2007) como apresentando um desequilíbrio de Hardy-Weinberg, o *locus* CxqATG9 foi utilizado em detrimento do *locus* CxqCA118.

Após a fase de testes, foi iniciada a etapa de análise dos alelos pertencentes a cada um dos seis *loci* selecionados, através da genotipagem. Os resultados dos eletroferogramas mostraram que os picos gerados pelos produtos de PCR referentes ao *locus* CxqGT108 não apresentaram intensidades suficientes para compará-los com os picos gerados pelos outros cinco *loci*. A primeira causa para tal resultado foi porque o *primer* utilizado na amplificação do *locus* CxqGT108 foi marcado com um fluoróforo preto (WellRED D2 Sigma[®]), o qual apresenta uma fluorescência mais fraca em comparação ao azul e ao verde. A outra razão foi porque a concentração obtida para os produtos de PCR deste *locus* foi inferior aos dos outros cinco *loci*. Devido aos referidos problemas, o *locus* CxqGT108 também foi excluído, restando apenas os *loci* CQ29, CxqGT8, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101. A figura 8 mostra alguns dos eletroferogramas gerados pela análise de fragmentos dos cinco *loci* de microssatélite.

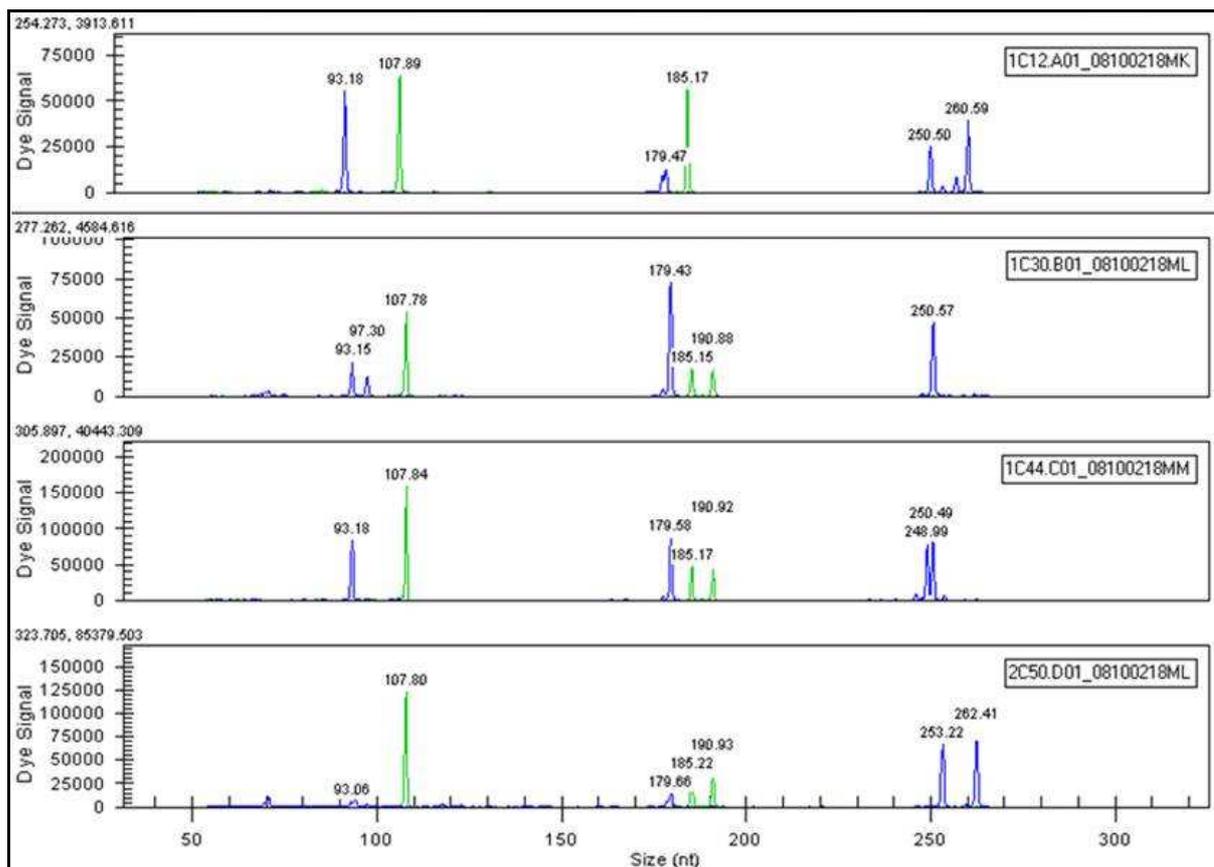


Figura 8 – Eletroferogramas gerados para quatro indivíduos da espécie *Culex quinquefasciatus* através da análise de fragmentos para os *loci* CxqGT8 (picos azuis iniciais da esquerda para a direita), CxqCTG10 (picos verdes iniciais da esquerda para a direita), CQ29 (picos azuis centrais), CxqCAG101 (picos verdes centrais) e CxqATG9 (picos azuis finais da esquerda para a direita).

No total 323 amostras foram analisadas para cada um dos cinco diferentes *loci* (CQ29, CxqGT8, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101). O número de alelos por *locus* (tabela 3) variou entre três (*locus* CxqCTG10) e 12 (*locus* CxqGT8). As frequências alélicas para cada um dos cinco diferentes *loci* de microsatélites estão mostradas na tabela 3. A maior frequência alélica obtida foi de 0,972 para o alelo 107 do *locus* CxqCTG10 e a mínima de 0,002 para os alelos 180 do *locus* CQ29, 85 do *locus* CxqGT8, 243, 245, 257, 264 do CxqATG9 e 180 do *locus* CxqCAG101 (tabela 3).

Ao longo do estudo foram observados 14 alelos raros (tabela 3) na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria que, de acordo com a definição de Kimura (1983), correspondem àqueles cujas frequências relativas são inferiores a 0,01. Foram detectados apenas dois alelos raros na 1ª coleta (alelos 243 e 245 do *locus* CxqATG9), os quais foram encontrados exclusivamente neste momento, ambos com frequência total de 0,002. Um fato semelhante ocorreu no 2º momento de estudo, quando se observou apenas os alelos 261 do

locus CxqATG9 e 113 do *locus* CxqCTG10 como sendo raros, ambos com frequências totais de 0,003. Na 3ª coleta, o número de alelos raros detectados dobrou, com o surgimento de quatro novos alelos raros. Destes, apenas um (alelo 85 do *locus* CxqGT8) foi exclusivo da 3ª coleta, enquanto que os três restantes (alelos 181 do *locus* CQ29, 113 e 115 do *locus* CxqGT8) foram encontrados em outros momentos após esta coleta. A 4ª coleta também foi marcada pelo aumento no número de alelos raros. Nela foram observados cinco alelos raros, dos quais um havia sido previamente detectado na coleta anterior (alelo 115 do *locus* CxqGT8) e os outros quatro foram exclusivos deste momento (alelos 180 do *locus* CQ29, 257 e 264 do *locus* CxqATG9 e 180 do *locus* CxqCAG101).

A primeira redução no número de alelos raros só foi observada a partir do 5º momento, quando se relatou a ocorrência de apenas um alelo raro (113 do *locus* CxqGT8). Este alelo foi detectado em Água Fria pela primeira vez na 3ª coleta e a sua frequência baixou de 0,03 para 0,01 na 5ª coleta. A partir deste momento ele não foi mais detectado nas coletas subsequentes. Na 6ª coleta, dois alelos raros foram observados sendo um deles (alelo 198 do *locus* CxqCAG101) exclusivo deste momento e o outro já havia sido encontrado na 3ª coleta (alelo 181 do *locus* CQ29). O número de alelos raros voltou a ser reduzido na 7ª coleta, quando se detectou apenas um (alelo 116 do *locus* CxqGT8). Este provavelmente surgiu na população de Água Fria a partir do 7º momento, visto que o mesmo não havia sido detectado previamente. O alelo 116 do *locus* CxqGT8 também foi encontrado na 8ª coleta, sendo que a sua frequência reduziu de 0,1 para 0,067 quando comparado à coleta anterior. Apenas este único alelo raro foi descrito no 8º momento de estudo.

Além dos alelos raros, também foram detectados outros com frequências muito baixas, de 0,014 e 0,012, respectivamente, para os alelos 107 e 117 do *locus* CxqGT8 e de 0,013 para o alelo 249 do *locus* CxqATG9 (tabela 3). A queda mais brusca foi registrada para o alelo 107 do *locus* CxqGT8, cuja frequência foi reduzida de 0,05 na 1ª coleta para 0,01 na 4ª coleta, desaparecendo completamente no período subsequente. Já as frequências dos alelos 117 do *locus* CxqGT8 e 249 do *locus* CxqATG9 apresentaram um decréscimo mais brando de 0,02, na 1ª coleta, para 0,01, na 6ª coleta, desaparecendo nos momentos seguintes. As reduções na frequência e subsequentes desaparecimentos destes três alelos sugerem que o programa de controle está provocando uma redução na diversidade genética da população de mosquitos vetores de Água Fria.

Tabela 3 - Número e frequência de alelos encontrados para cada um dos cinco *loci* de microsatélite avaliados.

(continua)

<i>Locus</i> e alelos	Frequência dos alelos								Total
	1 ^a Coleta (Jun/03)	2 ^a Coleta (Ago/03)	3 ^a Coleta (Dez/03)	4 ^a Coleta (Abr/04)	5 ^a Coleta (Jun/04)	6 ^a Coleta (Out/04)	7 ^a Coleta (Mai/05)	8 ^a Coleta (Set/06)	
CQ29									
175	0,255	0,213	0,276	0,357	0,367	0,408	0,45	0,286	0,316
176	0,041	0,043	0,051	0,051	0,031	0,051	0,05	0,143	0,049
178	0,051	0,043	0,031	0,02	0,041	0,02	0	0	0,032
179	0,653	0,702	0,633	0,561	0,561	0,5	0,5	0,571	0,597
180	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0,002
181	0	0	0,01	0	0	0,02	0	0	0,005
n _a	4	4	5	5	4	5	3	3	6
N	49	47	49	49	49	49	10	14	316
CxqGT8									
85	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0,002
93	0,43	0,48	0,49	0,5	0,49	0,49	0,75	0,567	0,492
95	0,03	0	0,03	0,01	0,07	0,02	0	0	0,025
97	0,28	0,25	0,26	0,296	0,29	0,276	0,05	0,3	0,269
105	0,12	0,15	0,11	0,122	0,09	0,153	0,05	0,067	0,119
107	0,05	0,03	0	0,01	0	0	0	0	<u>0,014</u>
113	0	0	0,03	0	0,01	0	0	0	0,006
115	0	0	0,01	0,01	0	0	0	0	0,003
116	0	0	0	0	0	0	0,1	0,067	0,006
117	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0	0	<u>0,012</u>
119	0,05	0,05	0,05	0,02	0,02	0,02	0	0	0,033
121	0,02	0,03	0	0,02	0,01	0,031	0,05	0	0,019
n _a	8	7	9	9	8	7	5	4	12
N	50	50	50	49	50	49	10	15	323
CxqATG9									
243	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0,002
245	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0,002
249	0,02	0,02	0,02	0	0,01	0,01	0	0	<u>0,013</u>
250	0,23	0,1	0,204	0,204	0,198	0,177	0,222	0,167	0,186
253	0,33	0,44	0,347	0,316	0,292	0,302	0,056	0,3	0,329
257	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0,002
259	0,05	0,09	0,02	0,051	0,063	0,042	0	0	0,049
260	0,21	0,15	0,163	0,224	0,177	0,24	0,444	0,333	0,208
261	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0,003
262	0,14	0,18	0,245	0,184	0,26	0,229	0,278	0,2	0,208
264	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0,002
n _a	8	7	6	7	6	6	4	4	11
N	50	50	49	49	48	48	9	15	318

Tabela 3 - Número e frequência de alelos encontrados para cada um dos cinco *loci* de microssatélite avaliados. (conclusão)

<i>Locus e alelos</i>	Frequência dos alelos								Total
	1 ^a Coleta (Jun/03)	2 ^a Coleta (Ago/03)	3 ^a Coleta (Dez/03)	4 ^a Coleta (Abr/04)	5 ^a Coleta (Jun/04)	6 ^a Coleta (Out/04)	7 ^a Coleta (Mai/05)	8 ^a Coleta (Set/06)	
CxqCTG10									
95	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02	0,02	0	0,067	0,025
107	0,98	0,96	0,96	0,98	0,98	0,98	1	0,933	0,972
113	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0,003
<i>n_a</i>	2	3	2	2	2	2	1	2	3
N	50	50	50	49	50	49	10	15	323
CxqCAG101									
180	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0,002
186	0,69	0,76	0,68	0,694	0,72	0,653	0,85	0,833	0,711
192	0,31	0,24	0,32	0,296	0,28	0,316	0,15	0,167	0,283
198	0	0	0	0	0	0,031	0	0	0,005
<i>n_a</i>	2	2	2	3	2	3	2	2	4
N	50	50	50	49	50	49	10	15	323
Média 5 loci									
<i>n_a</i>	4,8	4,6	4,8	5,2	4,4	4,6	3	3	7,2

Nota: *n_a*, número de alelos por *locus*; N, tamanho amostral.

Os valores em negrito correspondem aos alelos raros e os sublinhados àqueles que foram encontrados em baixa frequência.

Os valores da média da riqueza de alelos (R_S) entre os cinco diferentes *loci* de microssatélites apresentaram um declínio gradual significativo ao longo do programa de controle vetorial. Este parâmetro decresceu de um valor máximo de 3,42, registrado na primeira coleta, até atingir um valor mínimo de 2,90, no último momento de estudo (tabela 4). Este declínio nos valores do parâmetro R_S apresentou uma forte correlação (Pearson; $r = -0,930$, $p = 0,0008$) com o tempo decorrido no estudo (figura 9).

Tabela 4 - Riqueza de alelos medida para cada *locus* de microssatélite e média da riqueza de alelos entre os cinco *locus* nos diferentes momentos de estudo, baseado no tamanho amostral mínimo de nove indivíduos diplóides.

<i>Locus</i>	Riqueza de alelos (R_S)							
	1 ^a Coleta (Jun/03)	2 ^a Coleta (Ago/03)	3 ^a Coleta (Dez/03)	4 ^a Coleta (Abr/04)	5 ^a Coleta (Jun/04)	6 ^a Coleta (Out/04)	7 ^a Coleta (Mai/05)	8 ^a Coleta (Set/06)
CxqCTG10	1,329	1,658	1,554	1,335	1,329	1,335	1	1,848
CxqCAG101	1,999	1,996	2	2,183	1,999	2,459	2	1,994
CxqGT8	5,305	4,68	4,981	4,33	4,626	4,276	4,695	3,697
CQ29	3,205	3,15	3,288	3,165	3,022	3,316	2,9	2,99
CxqATG9	5,262	5,322	4,628	4,979	4,875	4,728	4	3,993
Média 5 <i>loci</i>	3,42	3,3612	3,2902	3,1984	3,1702	3,2228	2,919	2,9044

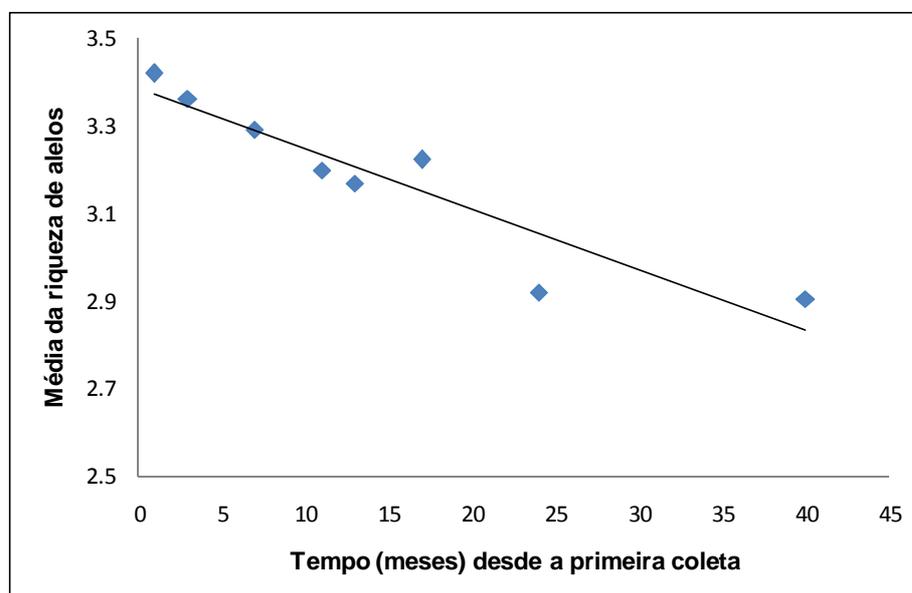
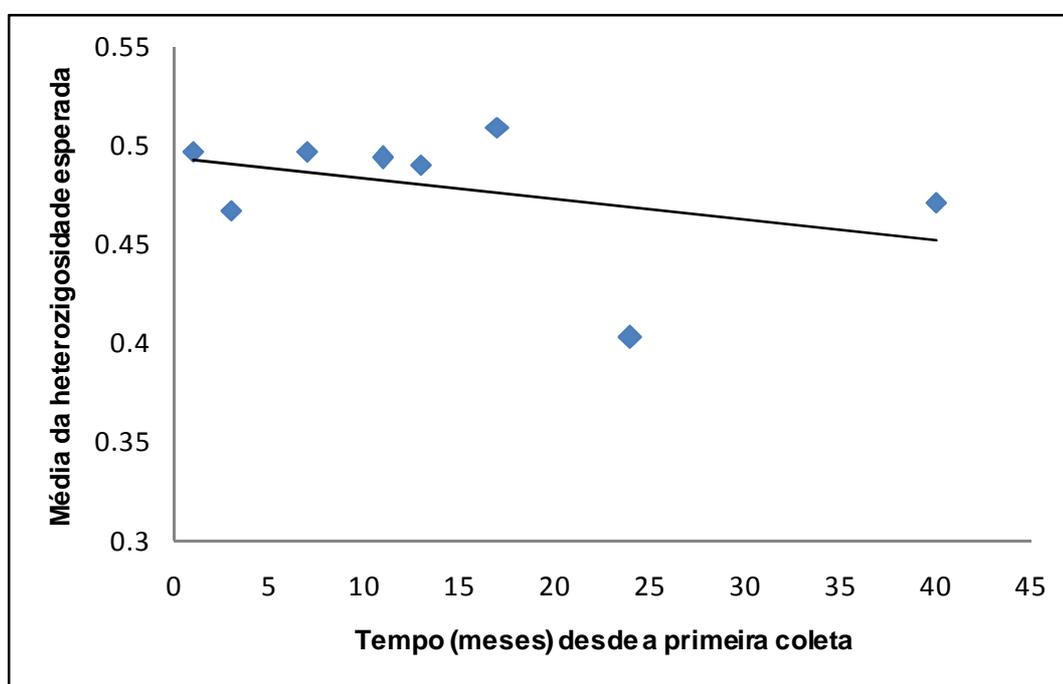


Figura 9 - Média da riqueza de alelos (R_S) para os cinco *locus* de microssatélites avaliados nos diferentes momentos de estudo, iniciado a partir do primeiro mês de coleta.

A média do parâmetro heterozigosidade esperada (H_E) entre os cinco *loci* de microssatélites apresentou uma leve evidência de declínio no decorrer do programa de controle vetorial. Foram observadas flutuações nos valores de H_E (tabela 5), intercalando momentos de decréscimos acentuados (2^a e 7^a coletas) com momentos de aumentos (3^a, 6^a e 8^a coletas). O menor valor de H_E (0,4032) foi obtido na 7^a coleta, o qual foi bastante discrepante em relação ao restante dos momentos avaliados, os quais exibiram uma estreita amplitude, com variações de valores entre 0,4676, na 2^a coleta, e 0,5094, na 6^a coleta. Apesar do leve declínio observado para o parâmetro H_E (figura 10), não foi constatada uma correlação estatisticamente significativa (Pearson; $r = -0,388$, $p = 0,342$) com o tempo.

Tabela 5 - Heterozigosidade esperada obtida para cada *locus* de microssatélite e média da heterozigosidade esperada entre os cinco *loci* nos diferentes momentos de estudo.

<i>Locus</i>	Heterozigosidade esperada (H_E)							
	1ª Coleta (Jun/03)	2ª Coleta (Ago/03)	3ª Coleta (Dez/03)	4ª Coleta (Abr/04)	5ª Coleta (Jun/04)	6ª Coleta (Out/04)	7ª Coleta (Mai/05)	8ª Coleta (Set/06)
CxqCTG10	0,04	0,079	0,078	0,04	0,04	0,04	0	0,129
CxqCAG101	0,432	0,369	0,439	0,435	0,408	0,478	0,267	0,286
CxqGT8	0,722	0,686	0,683	0,652	0,669	0,666	0,444	0,593
CQ29	0,511	0,464	0,527	0,561	0,555	0,588	0,583	0,593
CxqATG9	0,78	0,74	0,758	0,78	0,78	0,775	0,722	0,755
Média 5 <i>loci</i>	0,497	0,4676	0,497	0,4936	0,4904	0,5094	0,4032	0,4712

**Figura 10** - Média da heterozigosidade esperada (H_E) obtida para os cinco *loci* de microssatélites avaliados nos diferentes momentos de estudo, iniciado a partir do primeiro mês de coleta.

A diferenciação genética temporal, obtida pelas comparações par-a-par através do índice de F_{ST} , foi muito baixa, uma vez que, estas resultaram em apenas seis valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$). Destes valores, cinco envolveram comparações com a 7ª coleta, conforme mostrado na tabela 6. Após as correções de Bonferroni, entretanto, nenhum dos valores de F_{ST} apresentou diferença estatisticamente significativa. A partir da visualização da árvore, obtida pelo método de *neighbor-joining*, foi possível perceber uma relação, embora imperfeita, entre a diferenciação genética e o tempo, uma vez que, foi obtido um agrupamento entre amostras adjacentes no tempo e as maiores diferenciações foram referentes às 2ª e 7ª coletas (figura 11). Também foi possível observar que, apesar das amostras referentes às duas

últimas coletas estarem agrupadas (maio/ 2005 e setembro/ 2006), o nível de diferenciação relativo à 7ª coleta (maio/ 2005) em relação às outras coletas de Água Fria é comparável ao das amostras do *out group*, proveniente de Fazenda Nova, as quais foram coletadas a aproximadamente 200 km de Recife (figura 11).

Não foi observada correlação (Mantel; $r = 0,190$, $p = 0,187$) entre os índices de F_{ST} e a distância temporal transcorrida entre os diversos momentos estudados. Tal resultado foi gerado pela comparação entre as matrizes de F_{ST} corrigido (tabela 6) e a do tempo de separação entre as coletas (tabela 2). Apesar da não ocorrência de associação entre a diferenciação genética e o tempo, a partir da análise de regressão, foi possível visualizar dois padrões de tendência em destaque relativos às comparações envolvendo a 2ª e a 7ª coleta (figura 12).

Tabela 6 – Valores de diferenciação genética (F_{ST} corrigido) entre os diversos momentos de coleta (diagonal inferior) e seus respectivos níveis de significância (p) (diagonal superior), obtidos através da estimativa total para os cinco *loci* de microssatélites.

	1ª Coleta (Jun/03)	2ª Coleta (Ago/03)	3ª Coleta (Dez/03)	4ª Coleta (Abr/04)	5ª Coleta (Jun/04)	6ª Coleta (Out/04)	7ª Coleta (Mai/05)	8ª Coleta (Set/06)
1ª Coleta (Jun/03)	-	0,56607	0,40179	0,81429	0,47857	0,25893	0,00714	0,10536
2ª Coleta (Ago/03)	0,002897	-	0,09107	0,39107	0,04821	0,05536	0,00536	0,09107
3ª Coleta (Dez/03)	-0,01033	0,002897	-	0,69107	0,88393	0,43214	0,0125	0,25179
4ª Coleta (Abr/04)	-0,00733	0,015787	-0,00911	-	0,92143	0,97321	0,07321	0,57857
5ª Coleta (Jun/04)	-0,00079	0,019386	-0,01007	-0,01437	-	0,76786	0,01071	0,10000
6ª Coleta (Out/04)	0,006039	0,033438	-0,00181	-0,01625	-0,0128	-	0,03929	0,26964
7ª Coleta (Mai/05)	0,106231	0,136989	0,093281	0,066853	0,060358	0,052531	-	0,19107
8ª Coleta (Set/06)	0,007229	0,015451	0,002931	-0,00759	-0,00485	-0,00119	0,017161	-

Nota: Os valores em negrito referem-se àqueles estatisticamente significantes.

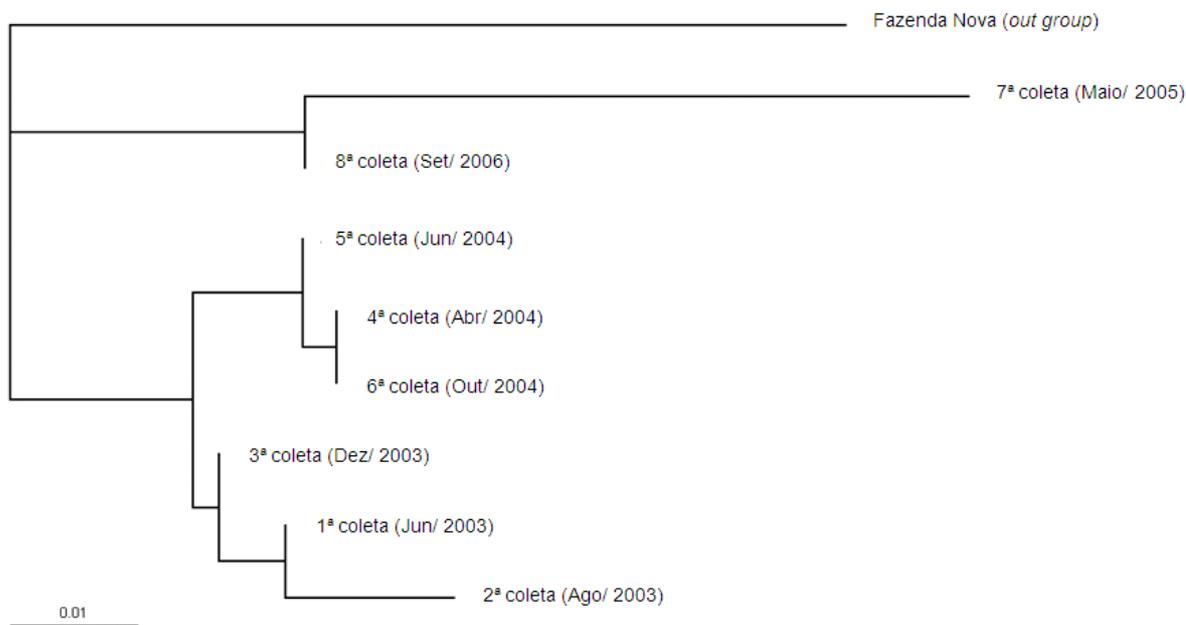


Figura 11 - Diferenciação genética temporal em Água Fria, representada por uma árvore que foi construída pelo método de *neighbour-joining*, baseada nos valores de F_{ST} .

Nota: As amostras procedentes do município de Fazenda Nova, localizado aproximadamente a 200 km de Recife, foram utilizadas como *out group*.

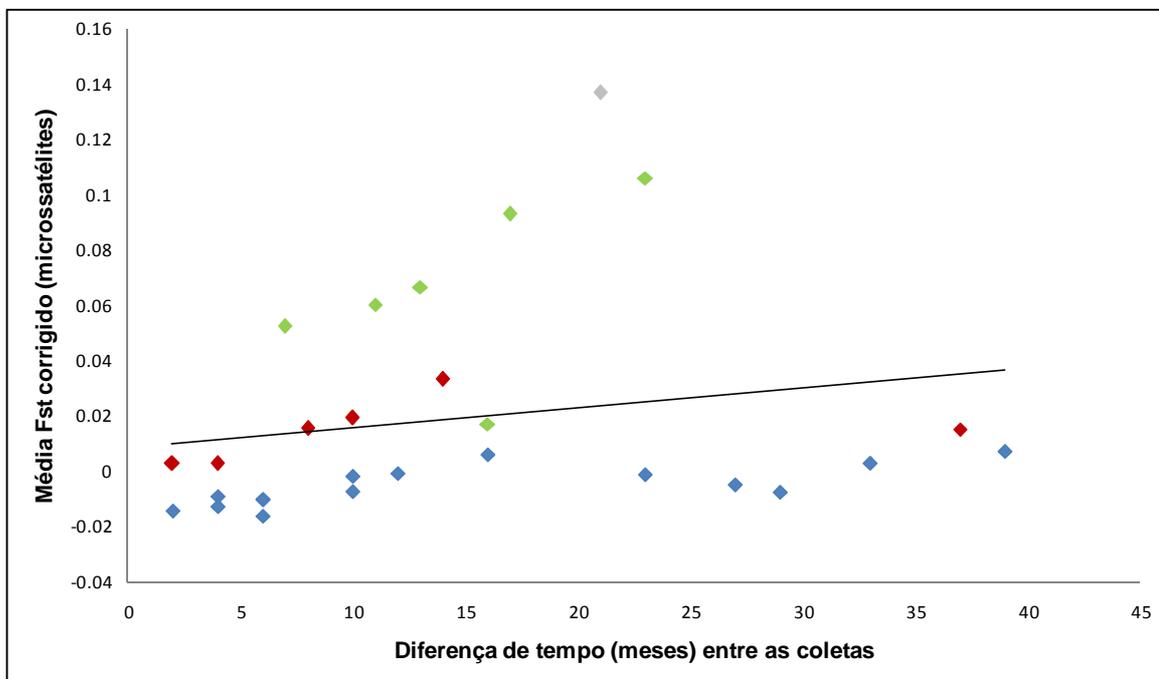


Figura 12 - Análise de regressão entre a diferenciação genética média (F_{ST} corrigido), para os cinco *loci* de microsatélites, e o tempo de separação entre as coletas.

Nota: Os pontos em vermelho destacam apenas as comparações par-a-par com a 2ª coleta, os que estão em verde destacam as comparações par-a-par com a 7ª coleta, o ponto cinza mostra a comparação entre a 2ª e a 7ª coleta e os pontos azuis mostram as comparações entre as coletas restantes.

Os resultados dos índices de F_{IS} , referentes ao total de *loci* de microssatélites, apontaram para um significativo déficit de heterozigotos nos 5º ($F_{IS}= 0,103$, $p= 0,0215$) e 6º ($F_{IS}= 0,186$, $p= 0,0003$) momentos de coletas, visto que os valores significantes de F_{IS} foram positivos em ambas as coletas (tabela 7). O déficit de heterozigotos pode ser causado pela ocorrência de endocruzamento, efeito Wahlund ou pela existência de alelos nulos. Os dois primeiros efeitos influenciam todo o genoma, ao passo que, só os alelos nulos são capazes de afetar apenas *locus* individuais. Um alelo nulo é aquele resultante de mutações ocorridas nas regiões flangeadoras dos *primers* de microssatélites, as quais impossibilitam a amplificação deste alelo. Assim, apesar do alelo nulo existir, ele não é capaz de ser detectado.

Observou-se, no entanto, que as deficiências de heterozigotos foram causadas apenas pelo *locus* específico CQ29 (tabela 7). Esta constatação sugere, portanto, que tais déficits foram obtidos em decorrências de possíveis alelos nulos, pertencentes ao *locus* CQ29. Tal problema, entretanto, não foi previamente reportado em outros estudos que utilizaram este mesmo *locus* (FONSECA et al., 2006; FONSECA; ATKINSON; FLEISCHER, 1998; FONSECA; LAPOINTE; FLEISCHER, 2000). Estes resultados são indicativos de que a população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ao longo de todo o período avaliado, uma vez que, os déficits de heterozigotos foram decorrentes de alelos nulos e não das outras duas possíveis causas acima mencionadas.

Tabela 7 – Valores do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}), com seus respectivos níveis de significância (p), para cada um dos cinco *loci* de microssatélite nos diferentes momentos de estudo.

<i>Locus</i>	Coeficiente de endocruzamento (F_{IS})							
	1ª Coleta (Jun/03)	2ª Coleta (Ago/03)	3ª Coleta (Dez/03)	4ª Coleta (Abr/04)	5ª Coleta (Jun/04)	6ª Coleta (Out/04)	7ª Coleta (Mai/05)	8ª Coleta (Set/06)
CxqCTG10	-0,01	0,492	-0,032	-0,011	-0,01	-0,011	ND	-0,037
p	0,9883	0,0235	0,9428	0,9873	0,99	0,989	ND	0,9653
CxqCAG101	0,028	0,023	-0,093	-0,127	0,117	0,146	-0,125	-0,167
p	0,556	0,5745	0,3623	0,259	0,308	0,1678	0,8413	0,661
CxqGT8	-0,164	-0,166	0,033	-0,19	0,103	0,112	0,1	-0,349
p	0,0288	0,0278	0,389	0,0258	0,1488	0,147	0,4873	0,0583
CQ29	0,241	0,174	0,225	0,2	0,301	0,375	0,314	0,037
p	0,0233	0,0843	0,0338	0,0575	0,0103	0,0018	0,214	0,5283
CxqATG9	0,077	0,055	-0,023	0,031	-0,041	0,14	0,231	-0,06
p	0,1933	0,2785	0,4638	0,3863	0,3588	0,055	0,2345	0,4763
Média 5 <i>loci</i>	0,031	0,023	0,032	-0,017	0,103	0,186	0,179	-0,12
p	0,242	0,2855	0,2448	0,4078	0,0215	0,0003	0,0903	0,4763

Nota: ND, resultados não disponíveis.

Os valores em negrito referem-se àqueles estatisticamente significantes.

Os resultados das análises de desequilíbrio de ligação mostraram que apenas 4 das 80 comparações entre todos os possíveis pares de *loci*, realizadas considerando cada momento de estudo separadamente, apresentaram valor significativo ($p \leq 0,05$). As comparações entre cada par de *locus*, considerando conjuntamente todo o período estudado, mostraram que não houve desequilíbrio de ligação entre os *loci* estudados ($p > 0,05$) (tabela 8), ou seja, os resultados indicaram que estes *loci* têm segregação independente. Os resultados obtidos pelas análises de desequilíbrio de ligação serviram ainda como suporte adicional para desconsiderar o endocruzamento e o efeito Wahlund como os responsáveis pelo déficit de heterozigotos, conforme observado pela análise do índice de F_{IS} . Tanto o endocruzamento como o efeito Wahlund podem causar desequilíbrio de ligação dentro de uma população, pois membros de populações diversas apresentam diferentes probabilidades de carregar certas combinações de alelos. Por outro lado, quando o déficit de heterozigotos é causado por alelos nulos, espera-se que haja um equilíbrio de ligação. Isto se deve ao fato de que todos os indivíduos têm a mesma probabilidade de carregar o alelo nulo e que, portanto, a distribuição entre os alelos de diferentes *loci* não é perturbada (WONDJI et al., 2005).

Tabela 8 - Comparações entre cada par de *locus* para detecção de desequilíbrio de ligação, considerando conjuntamente os cinco *loci* de microssatélites nos 8 momentos estudados, através do teste do qui-quadrado.

Pares de <i>locus</i>	χ^2	g.l.	p
CTG10 e CAG101	12,318	14	0,581
CTG10 e GT8	13,708	14	0,472
CAG101 e GT8	20,179	16	0,212
CTG10 e CQ29	7,005	14	0,935
CAG101 e CQ29	19,302	16	0,253
GT8 e CQ29	19,001	16	0,269
CTG10 e ATG9	15,273	14	0,36
CAG101 e ATG9	17,215	16	0,372
GT8 e ATG9	16,38	16	0,427
CQ29 e ATG9	13,037	16	0,67

Nota: p, nível de significância.

8.2 Estudo com o gene *cqm1*

A amplificação do fragmento do gene *cqm1* foi realizada com as mesmas 323 amostras previamente empregadas nas análises de microssatélites. Como resultado, foram detectados todos os três possíveis genótipos na população de Água Fria (figura 13). Ao longo dos oito momentos estudados, foram observados apenas cinco indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1*_{REC}, ou seja, apenas cinco amostras referiram-se a indivíduos resistentes ao *B. sphaericus*, dentre as quais uma, duas, uma e uma amostras foram provenientes, respectivamente, das 3^a, 5^a, 6^a e 8^a coletas. Além disso, foram observados 20 indivíduos heterozigotos susceptíveis, portadores do alelo *cqm1*_{REC}, os quais foram pertencentes às 2^a (três amostras), 3^a (seis amostras), 4^a (quatro amostras), 5^a (quatro amostras) e 6^a (três amostras) coletas.

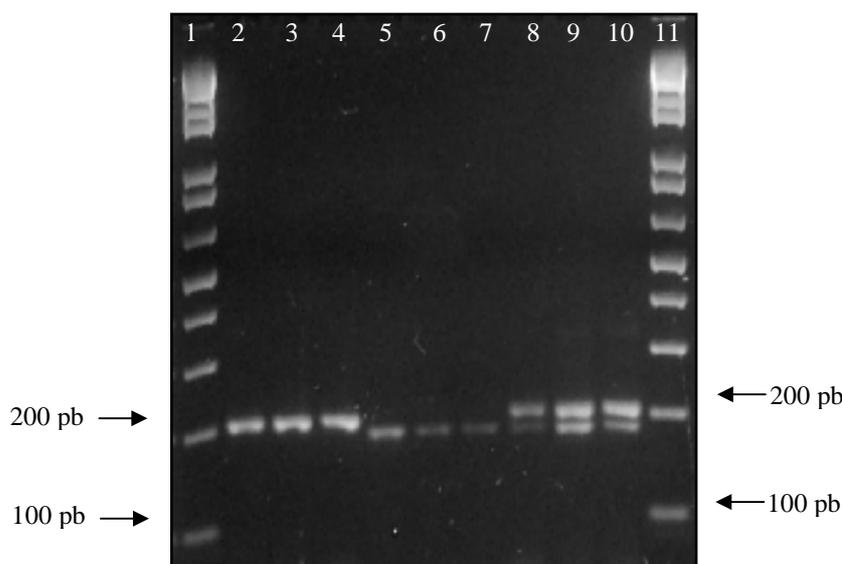


Figura 13 - Perfis dos produtos de PCR do gene *cqm1*, visualizados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio.

Nota: Poços 2 a 4: indivíduos homozigotos sem deleção (genótipo susceptível). Poços 5 a 7: indivíduos homozigotos com deleção (genótipo resistente). Poços 8 a 10: indivíduos heterozigotos (genótipo susceptível). Poços 1 e 11: ladder 100 pb (New England Biolabs®).

Após a identificação dos genótipos, foram calculadas as frequências dos alelos de resistência (*cqm1*_{REC}) e de susceptibilidade (*cqm1*) na população de *Culex quinquefasciatus* de Água Fria, a qual esteve exposta ao tratamento com *B. sphaericus*. A frequência do alelo *cqm1*_{REC} flutuou sem apresentar um padrão evidente durante todo o período avaliado (tabela

9). Em decorrência do amplo intervalo de confiança obtido para as frequências deste alelo, é possível concluir, entretanto, que não houve uma mudança estatisticamente significativa na frequência do alelo *cqm1_{REC}* durante todo o período avaliado (figura 14).

Tabela 9 – Frequências alélicas, número de alelos e heterozigidade esperada obtidos para o gene *cqm1* nos diferentes momentos de estudo.

Momentos de estudo	Frequência do alelo <i>cqm1_{REC}</i>	Frequência do alelo <i>cqm1</i>	N	n _a	Heterozigidade esperada (H _E)
1ª Coleta (Jun/03)	0	1	50	1	0
2ª Coleta (Ago/03)	0,03	0,97	50	2	0,059
3ª Coleta (Dez/03)	0,08	0,92	50	2	0,149
4ª Coleta (Abr/04)	0,041	0,959	49	2	0,079
5ª Coleta (Jun/04)	0,08	0,92	50	2	0,149
6ª Coleta (Out/04)	0,051	0,949	49	2	0,098
7ª Coleta (Mai/05)	0	1	10	1	0
8ª Coleta (Set/06)	0,067	0,933	15	2	0,133
Total	0,046	0,954	323	2	-

Nota: N, tamanho amostral; n_a, número de alelos por *locus*.

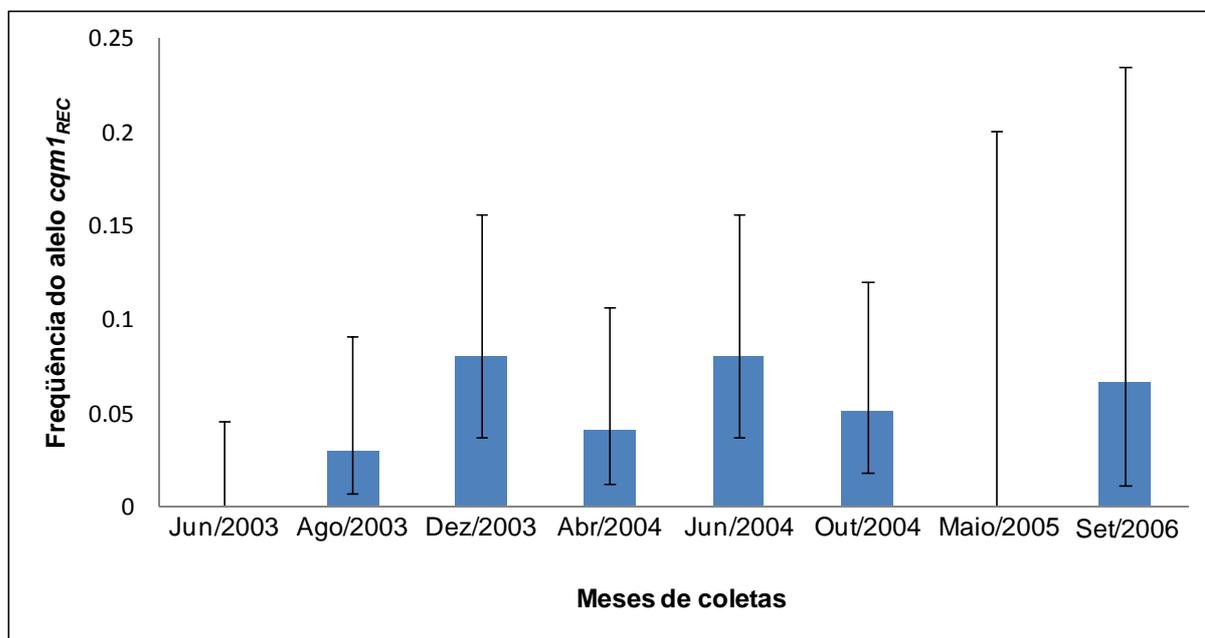


Figura 14 – Variação temporal na frequência do alelo de resistência *cqm1_{REC}*.

Nota: As barras de erros são referentes a um intervalo de confiança de 95%.

A heterozigidade esperada (H_E) relativa ao gene *cqm1* também apresentou flutuações sem um padrão claro no decorrer do programa de controle, cuja faixa de valores

variou entre 0 (1ª e 7ª coletas) e 0,149 (3ª e 5ª coletas). Valores discrepantes de heterozigidade esperada foram percebidos na 3ª e 5ª coletas, quando seus valores praticamente dobraram em relação aos momentos imediatamente anteriores, e na 7ª coleta, quando a heterozigidade esperada voltou a ser nula, conforme ocorrido no início do estudo (tabela 9). O parâmetro heterozigidade esperada não apresentou uma correlação estatisticamente significativa (Pearson; $r= 0,248$, $p= 0,554$) com tempo transcorrido desde o início das coletas (figura 15).

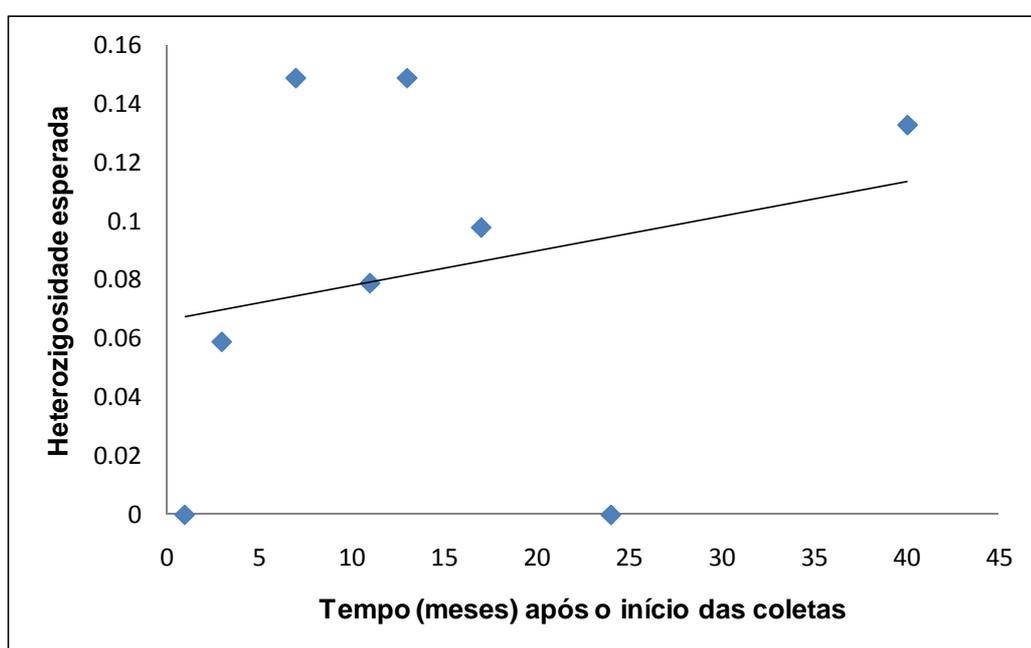


Figura 15 - Heterozigidade esperada obtida para gene *cqm1* avaliada nos diferentes momentos de estudo, iniciados a partir do primeiro mês de coleta.

As comparações par-a-par realizadas pelo índice de F_{ST} resultaram em apenas dois valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), todos eles envolvendo comparações com a 1ª coleta, o que mostra que a diferenciação genética temporal foi muito baixa (tabela 10). Após as correções de Bonferroni, entretanto, nenhum dos valores de F_{ST} apresentou diferença estatisticamente significativa. Não foi observada associação significativa (Mantel; $r= -0,068$, $p= 0,502$) entre os índices de F_{ST} para o gene *cqm1* e a distância temporal transcorrida entre os momentos estudados (figura 16). Tal resultado foi gerado pela comparação entre as matrizes de F_{ST} corrigido (tabela 10) e a do tempo de separação entre as coletas (tabela 2).

Tabela 10 - Valores de diferenciação genética (F_{ST} corrigido) entre os diversos momentos de coleta (diagonal esquerda abaixo) e seus respectivos níveis de significância (p) (diagonal direita acima), obtidos através da análise do gene *cqm1*.

	1ª Coleta (Jun/03)	2ª Coleta (Ago/03)	3ª Coleta (Dez/03)	4ª Coleta (Abr/04)	5ª Coleta (Jun/04)	6ª Coleta (Out/04)	7ª Coleta (Mai/05)	8ª Coleta (Set/06)
1ª Coleta (Jun/03)	-	0,25714	0,0125	0,06429	0,04286	0,06071	ND	0,24821
2ª Coleta (Ago/03)	0,021018	-	0,27857	0,70179	0,26964	0,58036	0,65536	0,66964
3ª Coleta (Dez/03)	0,074446	0,014061	-	0,37321	ND	0,63214	0,26429	1
4ª Coleta (Abr/04)	0,033097	-0,00881	0,002371	-	0,40893	1	0,6	0,70714
5ª Coleta (Jun/04)	0,071652	0,011832	-0,01587	0,000339	-	0,625	0,41607	1
6ª Coleta (Out/04)	0,040046	-0,00738	-0,00685	-0,01218	-0,00879	-	0,55	1
7ª Coleta (Mai/05)	0	-0,01208	0,016922	-0,00449	0,007728	-0,01098	-	1
8ª Coleta (Set/06)	0,099453	-0,01332	-0,03401	-0,0239	-0,03987	-0,0365	-0,03196	-

Nota: ND, resultados não disponíveis.

Os valores em negrito referem-se àqueles estatisticamente significantes.

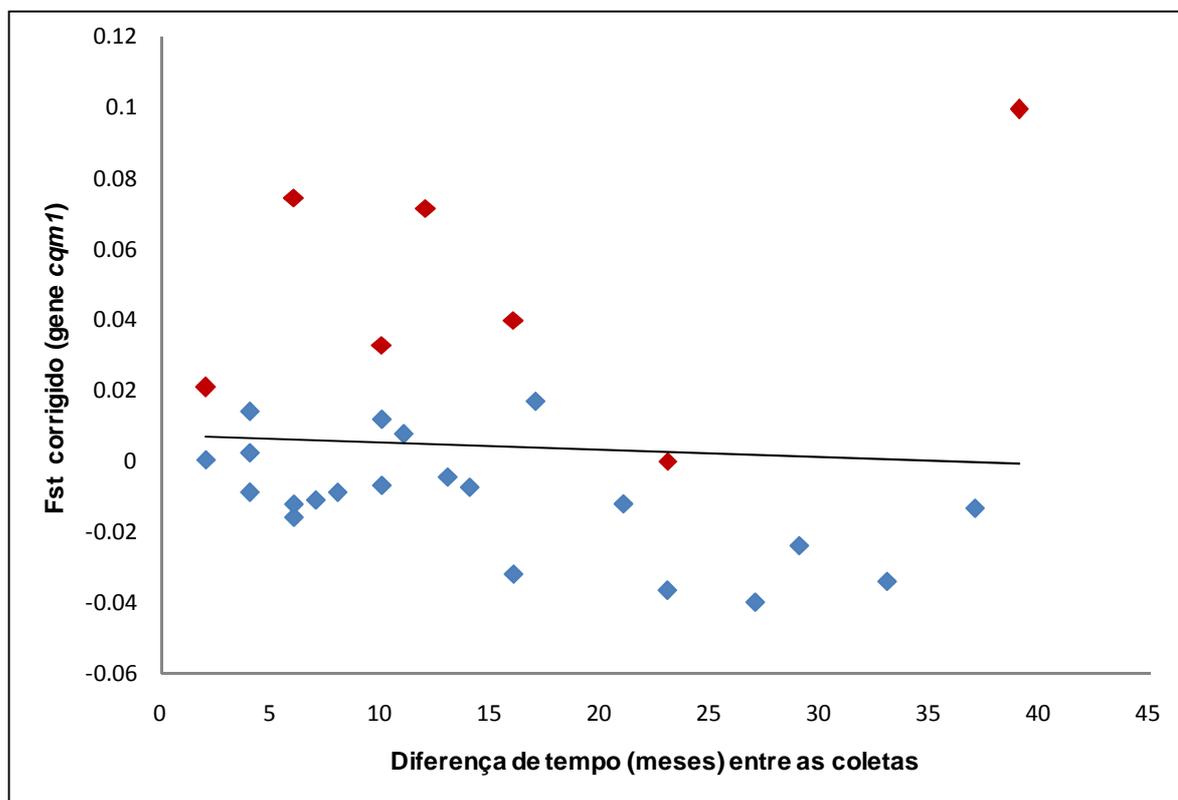


Figura 16 - Análise de regressão entre a diferenciação genética (F_{ST} corrigido) e o tempo de separação entre as coletas para o gene *cqm1*.

Nota: Os pontos vermelhos destacam apenas as comparações par-a-par com a 1ª coleta e os pontos azuis mostram as comparações entre as coletas restantes.

8.3 Comparação entre os microssatélites e o gene *cqm1*

Os resultados da comparação entre as matrizes de F_{ST} corrigido dos cinco *loci* de microssatélites e do gene *cqm1* sob interferência da matriz do tempo de separação entre as coletas, realizada através do teste parcial de Mantel, mostraram que não houve associação (teste parcial de Mantel; $r = -0,05$, $p = 0,06$) entre o marcador neutro e o marcador sob pressão de seleção. Estes resultados indicam que a seleção do alelo *cqm1*_{REC} não está direcionando a perda de diversidade do marcador neutro, visualizada através dos microssatélites.

9 DISCUSSÃO

O presente trabalho forneceu evidências de que o programa de controle vetorial realizado em Água Fria causou uma perda de diversidade genética na população de *Culex quinquefasciatus*, durante os anos de 2003 e 2006, entretanto, esta redução na diversidade foi gradual e não dramática. Apenas uma sutil estruturação genética temporal foi observada na população de Água Fria, ou seja, não foi observado um aumento significativo na diferenciação genética durante todo o período avaliado. Além disso, não houve evidência de que a utilização do *Bacillus sphaericus* em Água Fria estivesse selecionando o alelo de resistência *cqmI_{REC}*, uma vez que, não se observou uma tendência temporal em sua frequência. Desta maneira, o conjunto de resultados observados permite concluir que os mesmos são consistentes com um substancial impacto causado pelo programa de controle sobre a população vetora de Água Fria.

Atividades voltadas para o combate de mosquitos vetores, que podem incluir medidas de controle físico, químico e/ou biológico, quando bem sucedidas, ocasionam reduções na densidade populacional destes insetos. Regis et al. (1995, 2000) demonstraram com clareza este fato ao avaliarem populações de *Cx. quinquefasciatus*, as quais estiveram sujeitas às mesmas ações de controle que vêm sendo atualmente empregadas no combate à população vetora de Água Fria. Os impactos sobre a densidade populacional podem resultar em alterações na composição genética de uma população. Tais mudanças podem ser percebidas pela perda de diversidade e aumento da diferenciação genética de genes neutros. Um exemplo do fato mencionado acima foi mostrado por Huber et al. (2002), em um estudo sobre a variação genética temporal de populações de *Aedes aegypti* no Vietnã. Através da análise de isoenzimas e microssatélites, eles demonstraram que durante as estações chuvosas, quando foram registradas altas densidades de mosquitos, também se observou uma redução de diferenciação genética, ao passo que, nas estações mais secas, foram registradas grandes depressões nestas populações, associadas a um aumento de diferenciação genética (HUBER et al., 2002).

Diante do que foi previamente exposto, teria sido possível detectar, a partir dos resultados obtidos para o marcador neutro, uma redução nos valores dos parâmetros de diversidade genética e um aumento de diferenciação na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria ao longo do programa. No que diz respeito à análise de microssatélites, foi observado, entre 2003 e 2006, um declínio gradual significativo nos valores do parâmetro

riqueza de alelos (R_S), o qual apresentou também uma correlação estatisticamente significativa com o tempo (Pearson; $r = -0,930$, $p = 0,0008$). Os valores do parâmetro de heterozigidade esperada (H_E) apresentaram um declínio sutil, entretanto, não houve uma correlação temporal significativa (Pearson; $r = -0,388$, $p = 0,342$) para este parâmetro. Tais resultados foram possivelmente decorrentes do impacto causado pelo programa sobre a diversidade genética da população de Água Fria.

A diferenciação genética temporal do marcador neutro, obtida pelo índice F_{ST} , foi muito baixa, apresentando apenas seis valores estatisticamente diferentes. No entanto, a partir da visualização da árvore de F_{ST} foi possível perceber uma relação, embora imperfeita, entre a diferenciação genética e o tempo, uma vez que, foi obtido um agrupamento entre amostras adjacentes no tempo. As amostras mais diferenciadas foram aquelas referentes às 2ª e 7ª coletas. Este resultado indica que, possivelmente, o 2º momento foi o mais impactado pelas ações do programa. Além disso, a grande diferenciação genética observada no 7º momento, comparável com as amostras de Fazenda Nova, que foram coletadas a aproximadamente 200 km de Recife, sugere que esta coleta tenha sido influenciada pelo pequeno tamanho amostral avaliado. Apesar destas constatações não foi observada correlação (Mantel; $r = 0,190$, $p = 0,187$) estatisticamente significativa entre os índices de F_{ST} e a distância temporal transcorrida entre os momentos avaliados.

De acordo com Cornuet; Luikart (1996), quando uma população é submetida a eventos causadores de afunilamento, o número de alelos, principalmente os raros, decresce mais rapidamente do que as frequências alélicas. Como o cálculo da R_S é baseado no número de alelos e os de H_E e F_{ST} são baseados nas frequências alélicas, espera-se que as intervenções no âmbito do programa de controle em Água Fria provoquem, inicialmente, uma diminuição nos valores de R_S para, em seguida, aumentarem os de F_{ST} e depois reduzirem os valores de H_E . De fato, no presente trabalho, a R_S foi o único parâmetro que apresentou uma associação temporal evidente estatisticamente. O parâmetro H_E não chegou a apresentar uma correlação com o tempo e o índice F_{ST} demonstrou apenas uma estruturação sutil. O conjunto de resultados obtidos pelo marcador de microssatélite sugere que esteja ocorrendo um impacto sobre a diversidade genética da população de *Cx. quinquefasciatus* ao longo do tempo, porém tal impacto ainda não é drástico, uma vez que, este não pôde ser percebido com evidência através dos parâmetros de H_E e F_{ST} .

Os resultados obtidos através do estudo de microssatélites possibilitaram também se fazer inferências sobre a ocorrência de possíveis eventos de migração em determinados momentos ao longo do programa de controle. Por exemplo, o intervalo entre a 2ª e 3ª coleta é

sugestivo de ter sido influenciado pelo fenômeno de migração, uma vez que, após ter sido precedido por uma redução da H_E para um valor de 0,4676 na 2ª coleta, a H_E subiu para 0,497 na 3ª coleta, recuperando o mesmo valor que tinha no início do estudo. Também houve um crescimento de dois alelos raros na 2ª coleta para quatro alelos raros na 3ª coleta. Do total de alelos raros encontrados na 3ª coleta, três deles foram observados em momentos subseqüentes sugerindo que os mesmos podem ter sido incorporados à população de Água Fria. Outro intervalo que sugere o evento de migração é o tempo compreendido entre a 5ª e a 6ª coleta. O parâmetro R_S apresentou uma queda constante e gradual desde o início do estudo, com exceção da 6ª coleta, quando se observou um aumento sutil, atingindo um valor de 3,2228. O resultado obtido pelo parâmetro H_E também sugeriu o mesmo fato, uma vez que, o seu valor subiu de 0,4904 na 5ª coleta para 0,5094 na 6ª coleta, atingindo o maior valor de H_E de todo o período avaliado.

De acordo com as situações supracitadas, a migração foi considerada como uma provável causa para o aumento de diversidade genética do marcador microsatélite em alguns momentos do estudo, que estavam sendo antecidos por redução de diversidade genética. Tais resultados sugerem a ocorrência de quebra na pressão de controle do programa vetorial e apontam a necessidade de se expandir as ações do programa para outras áreas na cidade de Recife. Diversos trabalhos utilizando marcadores moleculares neutros já relataram o papel da migração sobre a estruturação genética de populações de diferentes espécies de insetos vetores (HUBER et al., 2002; KENT; MHARAKURWA; NORRIS, 2007; RONGNOPARUT et al., 1999). Um estudo, realizado com uma população africana de *Anopheles arabiensis* submetida a um programa de controle baseado no emprego de mosquiteiros impregnados com inseticida químico, também apontou a imigração como a causa para o aparecimento de alelos raros quase um ano após o programa alcançar uma cobertura de 100% das residências (WONDJI et al., 2005).

Eventos de migração compreendem o fluxo de indivíduos entre áreas adjacentes à região de estudo. Além disso, outra questão importante já relatada é a existência de refúgios, que são criadouros reais e potenciais, existentes na área de intervenção, os quais não são tratados pelas ações dos programas. O papel dos refúgios é crucial para limitar o êxito das atividades de controle vetorial, conforme mostrado por Regis et al. (2000), ao realizar um estudo com uma população de *Cx. quinquefasciatus*, em Jardim Brasil (Olinda), também submetida a ações de controle com o uso do *B. sphaericus*. Naquela população, as reduções mais significativas observadas nos índices de mosquitos foram alcançadas apenas quando o número de criadouros registrados e tratados foi ampliado, de aproximadamente 150 para 325,

após um recadastramento, que duplicou a área de cobertura tratada com o agente biológico de controle. Outra situação abordada neste mesmo trabalho foi o papel de uma lagoa existente em Jardim Brasil (Olinda) que, devido à falta de equipamentos, não pôde ser tratada adequadamente com o *B. sphaericus*, servindo como área de refúgio para o desenvolvimento dos ovos de *Cx. quinquefasciatus*. Nas áreas próximas à lagoa, foram observadas flutuações sem reduções significativas no número de mosquitos, ao passo que, nas estações de captura mais distantes da lagoa, ocorreu um decréscimo abrupto de 45 mosquitos/quarto/noite para um valor de apenas 10 mosquitos/quarto/noite no mês de coleta subsequente, chegando a atingir nos últimos momentos de tratamento valores inferiores a cinco mosquitos/quarto/noite (REGIS et al., 2000).

Paralelamente aos efeitos causados pela diminuição na densidade populacional, o emprego de inseticidas químicos e biológicos também é capaz de promover a seleção de indivíduos portadores de genes e/ou alelos envolvidos com mecanismos de resistência, em resposta às perturbações sofridas. Com o passar do tempo, é possível que ocorram alterações na composição genética das populações, referentes aos genes sujeitos à pressão de seleção. Tais mudanças podem resultar no aumento das freqüências de alelos de resistência e, conseqüentemente, da diversidade genética, assim como, no aumento da diferenciação genética. Chalegre et al. (2009), por exemplo, encontraram altas freqüências do alelo *cqm1_{REC}*, envolvido com a resistência ao *B. sphaericus*, em populações de *Cx. quinquefasciatus*, ao comparar áreas tratadas e não tratadas com tal agente biológico. Lenormand et al. (1999) também reportaram aumentos nas freqüências de alelos envolvidos com mecanismo de resistência a inseticidas químicos durante a exposição de populações de *Cx. pipiens* a organofosforados (OPs).

De acordo com o exposto acima, seria esperado encontrar, na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria, um aumento na freqüência do alelo *cqm1_{REC}* e na diversidade genética, representada pelo parâmetro de heterozigosidade esperada, bem como o aumento da diferenciação genética, mensurada pelo marcador submetido à pressão de seleção (gene *cqm1*). A partir dos resultados, observou-se que a freqüência do alelo de resistência *cqm1_{REC}* flutuou sem apresentar um padrão evidente, entretanto, seus valores não foram considerados como estatisticamente diferentes, ou seja, conclui-se que, em decorrência do amplo intervalo de confiança obtido, a freqüência do alelo *cqm1_{REC}* foi constante ao longo dos três anos avaliados. Assim, não foi detectada evidência de que o alelo *cqm1_{REC}* estivesse sendo selecionado na população de Água Fria, uma vez que, não se observou tendência temporal na freqüência deste alelo. É importante salientar ainda que o valor de zero, referente à freqüência

do alelo *cqmI_{REC}*, obtido na 7ª coleta, foi devido ao tamanho amostral avaliado, uma vez que, Chalegre et al. (2009) detectaram, anteriormente, uma frequência de 0,053, ao avaliar 325 amostras, provenientes da mesma área e coletadas no mesmo mês (maio/2005). Também não foram observadas tendências temporais relativas ao parâmetro heterozigosidade esperada (Pearson; $r= 0,248$, $p= 0,554$) e à diferenciação genética (Mantel; $r= -0,068$, $p= 0,502$) para o marcador *cqmI*.

Chalegre et al. (2009) demonstraram, através de análises por bioensaios, que a população de Água Fria continua susceptível ao *B. sphaericus*, uma vez que, os níveis de susceptibilidade foram similares entre uma colônia susceptível de laboratório (CqSF) e a população de Água Fria sob controle com o *B. sphaericus*. Os resultados do presente trabalho também apontam para esta direção, uma vez que, os maiores valores da frequência do alelo *cqmI_{REC}* foram devidos principalmente aos 20 indivíduos heterozigotos susceptíveis (a herança deste alelo é recessiva). Apesar disso, o monitoramento da frequência deste alelo é importante, uma vez que, ele pode estar na fase lag, ou seja, naquele período em que o crescimento é muito lento, praticamente imperceptível, causado principalmente pelos indivíduos heterozigotos que são portadores de apenas uma cópia do alelo de resistência *cqmI_{REC}*. Assim, a resistência na população de Água Fria deverá ser alcançada apenas quando a frequência do alelo *cqmI_{REC}* atingir um crescimento exponencial, ao superar a sua fase lag, causado principalmente pelo surgimento de um número suficiente de indivíduos homozigotos resistentes, portadores de duas cópias do alelo de resistência *cqmI_{REC}*.

Uma importante questão, que já foi relatada em diferentes estudos, no que diz respeito a genes envolvidos com mecanismos de resistência, é a ocorrência de eventos de migração. A migração exerce um importante papel capaz de ameaçar as ações de controle vetorial nos casos em que os imigrantes sejam portadores de genes ou alelos capazes de conferir resistência aos mosquitos contra os inseticidas. Por outro lado, a introdução de indivíduos susceptíveis pode prevenir ou retardar o desenvolvimento de resistência. Possíveis problemas relacionados à introdução de genes envolvidos com mecanismos de resistência a inseticidas químicos foram relatados por Lenormand et al. (1999). Eles focaram seu estudo na descrição dos papéis antagônicos da migração e da seleção, envolvidos na dinâmica local de 2 *loci* de resistência a inseticidas químicos (*Ace* e *Ester*), em populações de *Cx. pipiens* tratadas e não tratadas com OPs no sul da França. Os resultados mostraram que a seleção proporcionou um aumento na frequência de alelos de resistência, acompanhado por um custo biológico, que foi percebido após a interrupção das ações de controle vetorial. Já o fluxo gênico teve o efeito de reduzir as frequências dos alelos de resistência em áreas expostas a inseticidas químicos,

causando uma homogenização nas populações de *Cx. pipiens* sujeitas à seleção, e de aumentar a frequência dos alelos de resistência em áreas não tratadas (LENORMAND et al., 1999). Recentemente, Chalegre et al. (2009) reportaram frequências relativas do alelo *cqm1_{REC}* de 0,0029 em Fazenda Nova e de 0,0061 em Peixinhos, ambas áreas não tratadas com *B. sphaericus*, sendo a primeira situada a 180 km de Recife e a segunda a 3 km de proximidade de Água Fria. A migração foi apontada como a provável explicação para detecção de maiores frequências de alelos de resistência em Peixinhos quando comparada às frequências em Fazenda Nova (CHALEGRE et al., 2009). Estas observações sugerem que é possível ocorrer fluxo gênico de indivíduos portadores de alelos de susceptibilidade de diferentes áreas em Recife para o bairro de Água Fria. Este fenômeno pode, portanto, retardar o desenvolvimento da resistência na população, prevenindo o aparecimento de indivíduos homozigotos para o alelo *cqm1_{REC}*. Além da ocorrência de migração a partir de áreas circunvizinhas, outro fator importante é a existência de criadouros não submetidos a pressão de seleção no interior da área de intervenção do programa, uma vez que, estes servem de refúgios para os indivíduos susceptíveis ao agente de controle empregado.

Atualmente, os índices entomológicos, empregados para estimar densidades das formas jovens e adultas, são amplamente utilizados na avaliação da eficácia de programas de controle de mosquitos vetores. Entretanto, a sensibilidade destes métodos pode apresentar limitações em decorrência das populações das diversas espécies de mosquitos vetores serem muito grandes e r-estrategistas. Desta maneira, reduções observadas nos valores dos índices entomológicos podem não ser capazes de mensurar as diferenças estatísticas entre as condições anteriores, no decorrer e posteriores às ações de controle utilizadas, uma vez que, estas populações têm o potencial de se recuperarem rapidamente após sofrerem impactos sobre as suas densidades. Estudos com marcadores moleculares podem ser capazes de fornecer importantes informações a respeito da diversidade genética de populações de mosquitos vetores. A manutenção da diversidade é importante para tais populações, uma vez que, alguns genes podem facilitar adaptações a novas condições ambientais ou a respostas contra o uso de inseticidas químicos e biológicos. Quanto maior for a perda de diversidade, menor é a chance de sobrevivência da população em resposta às alterações no meio em que vivem. Desta maneira, o emprego de estudos com marcadores moleculares, como ferramenta complementar aos índices entomológicos, pode colaborar na tentativa de se obter informações mais acuradas a respeito dos impactos provocados pelos programas de controle vetoriais.

Algumas tentativas já foram realizadas no intuito de mensurar o impacto causado por atividades de combate a insetos vetores de doenças através de estudos genéticos com

marcadores neutros. Pinto et al. (2002), por exemplo, utilizaram estudos de microsatélites para avaliar os possíveis efeitos a longo prazo de uma campanha, que empregou o inseticida químico DDT, sobre a estrutura genética de populações de *Anopheles gambiae* nos arquipélagos de Príncipe e de São Tomé, na África. Foram registradas drásticas reduções sobre as densidades do vetor no interior das residências durante a borrifação intradomiciliar de DDT, entre 1980 e 1982. As amostras empregadas no estudo foram coletadas 16 anos após o término das intervenções de controle, em ambos os países, e estas populações apresentaram altos valores de tamanho efetivo da população (N_e) e não foram confirmados efeitos de gargalos recentes. Os resultados também mostraram que estas populações aparentaram estar em equilíbrio a pelo menos 3.316 gerações, aproximadamente 276 anos, indicando que elas estiveram estáveis desde a época da campanha de erradicação até o final do período avaliado naquele estudo. A habilidade em explorar recursos externos foi apontada como suposição para explicar a estabilidade durante a campanha de erradicação do *An. gambiae* nestes países (PINTO et al., 2002). Outro estudo realizado por Pinto et al. (2003), considerando seis diferentes localidades dentro do arquipélago de São Tomé (África), corroborou que a aplicação do DDT, entre 1980 e 1982, apesar de ter reduzido a densidade populacional do *An. gambiae* no país, não foi suficiente para reduzir o seu N_e (PINTO et al., 2003).

Um terceiro trabalho, semelhante ao presente estudo realizado em Água Fria, foi desenvolvido por Wondji et al. (2003). Eles procuraram avaliar o impacto causado pelo uso de mosquiteiros tratados com o inseticida piretróide deltametrina sobre a estrutura genética de uma população de *Anopheles arabiensis* em uma vila localizada em Camarões (África). Nenhum dos parâmetros de diversidade genética avaliados (heterozigosidades esperada e observada e número de alelos por *locus*) apresentou diferenças estatisticamente significantes antes e após a utilização dos mosquiteiros impregnados com o inseticida. Também foi observado o aparecimento de alelos raros nas amostras referentes ao último momento de estudo (WONDJI et al., 2005), assim como ocorreu com a população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria. Wondji et al. (2005) relataram que, mesmo que o uso do inseticida tenha provocado uma alta taxa de mortalidade, o tamanho da população remanescente foi suficiente para manter a estabilidade dos parâmetros de variabilidade genética desta população.

Além dos exemplos mencionados acima, no que se refere aos estudos genéticos com marcadores neutros, também são encontrados estudos que empregam marcadores submetidos à pressão de seleção para avaliar as conseqüências provocadas pelo uso de inseticidas químicos ou biológicos. Trabalhos já mencionados anteriormente, como os realizados por Lenormand et al. (1999) e Chalegre et al. (2009), cumprem tal objetivo. Outro exemplo

interessante foi um estudo realizado por Chevillon et al. (1995), que analisou a estrutura e a dinâmica de genes sob pressão de seleção, comparando-os com marcadores neutros. A pesquisa foi feita com populações de *Cx. pipiens* provenientes do norte da Espanha e sul da França. Para o estudo avaliou-se a dinâmica do gene *Ester*, que codifica as esterases envolvidas com a degradação ou seqüestro de OPs, e do gene *Ace*, responsável por codificar acetilcolinesterases alteradas que perdem a sensibilidade ao inseticida químico. As análises do marcador neutro foram feitas por perfis eletroforéticos de cinco *locus* enzimáticos. As amostras foram coletadas intercalando-se pontos que haviam sido expostos ao tratamento com inseticidas OPs, desde o ano de 1970, com áreas nunca tratadas. Os resultados dos marcadores neutros apontaram uma homogeneização entre estas populações, provavelmente decorrentes de um intenso fluxo gênico, ao longo de toda a área de estudo (extensão de 850 km). Já no que se refere aos marcadores sob pressão de seleção, observou-se uma grande heterogeneidade, alguns alelos apresentaram-se amplamente dispersos geograficamente enquanto outros estiveram restritos ou com altas frequências apenas nas áreas tratadas com OPs. A vasta distribuição de certos alelos envolvidos com mecanismos de resistência aos inseticidas químicos está correlacionada com o controle de mosquitos em larga escala, que seleciona tais alelos, e com o fenômeno de migração. Quando ocorrem altas taxas de migração, alelos de resistência são importados para áreas não tratadas e alelos de susceptibilidade são exportados às áreas tratadas. Tal processo resulta em um decréscimo de susceptibilidade em ambientes não expostos aos inseticidas químicos, a menos que estes alelos de resistência tenham um custo, ou seja, se eles forem capazes de reduzir o *fitness* da população (CHEVILLON et al., 1995).

A cidade de Recife apresenta condições sócio-ambientais bastante favoráveis à reprodução e à expansão de populações de mosquitos. A urbanização de Recife gerou espaços intra-urbanos extremamente contrastantes, intercalando favelas com luxuosos edifícios situados muitas vezes no mesmo bairro da cidade. As favelas, formadas por aglomerados de casas mal construídas, geralmente em regiões alagadas, desprovidas de serviço de saneamento oferecem as condições adequadas à proliferação da espécie *Cx. quinquefasciatus*. Aliados a esta desorganização social, encontram-se os condicionantes ambientais. A cidade de Recife é cortada por rios e canais e boa parte de seu território é constituído por aterros de mangue, o que deixa esta cidade sujeita a alagamentos periódicos (ALBUQUERQUE, 1993). Altas temperaturas e umidade durante todo o ano também favorecem a reprodução desta espécie vetora. O regime pluviométrico, que consiste em um período constante de densa intensidade de chuvas entre março e agosto, seguido por uma estação caracterizada por chuvas esparsas,

também contribui para a situação (REGIS et al., 1995). A associação de todas estas condições dificulta a eliminação dos criadouros distribuídos ao longo da cidade bem como favorece a estabilidade das populações de *Cx. quinquefasciatus* e permitem manutenção de um fluxo gênico entre diferentes áreas de Recife.

Estudos realizados com populações de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de diferentes bairros de Recife, sujeitos ou não a ações de combate vetorial, já foram capazes de mostrar como tais populações estão bem adaptadas às condições sócio-ambientais desta cidade, o que permite a manutenção de elevadas densidades de mosquitos. Por exemplo, Silva et al. (1994), através de um estudo com sistemas aloenzimáticos, compararam amostras de 5 diferentes bairros em Recife e mostraram que a diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações de *Cx. quinquefasciatus* na cidade não é significativa. Os canais, principalmente durante a estação chuvosa, e os meios de transportes foram apontados como possíveis facilitadores para a dispersão de ovos e mosquitos adultos, respectivamente, ao longo da cidade de Recife (SILVA et al., 1994). Ao estudar uma população de *Cx. quinquefasciatus* no bairro do Coque (Recife), Regis et al. (1995) registraram valores entre 120 e 60 mosquitos/quarto/noite, o que reflete as condições ambientais existentes na área. Após o início das ações para controle físico e biológico (uso do *B. sphaericus*) da espécie *Cx. quinquefasciatus* no Coque, a densidade populacional só veio a reduzir drasticamente, para valores próximos a 20 mosquitos/quarto/noite, após 12 tratamentos. Mesmo assim, ainda houve aumentos moderados neste índice entre o 27º e o 30º tratamentos, com valores próximos a 50 mosquitos/quarto/noite (REGIS et al., 1995). Regis et al. (2000) realizaram um outro trabalho com uma população de *Cx. quinquefasciatus* também submetida a ações de controle com o uso do *B. sphaericus* em Jardim Brasil (Olinda). Anteriormente ao uso da bactéria, foram registradas flutuações na densidade entre aproximadamente 20 a 50 mosquitos/quarto/noite. No início do tratamento com o agente entomopatogênico foi observado um valor de quase 40 mosquitos/quarto/noite com redução da densidade de adultos que chegou a alcançar valores mínimos inferiores a 10 mosquitos/quarto/noite nos últimos momentos de estudo. Conforme descrito no início da discussão, outro ponto importante do referido trabalho foi mostrar como o êxito das atividades de controle vetorial podem ser limitados em consequência da cobertura da área tratada não ser suficiente para eliminar os criadouros da espécie *Cx. quinquefasciatus*, possibilitando a existência de refúgios para postura de seus ovos (REGIS et al., 2000).

A densidade populacional do mosquito *Cx. quinquefasciatus* é um componente determinante na eficiência de transmissão da filariose e deve ser avaliada com cuidado em programas de erradicação desta doença, uma vez que, mais de 15.000 picadas por fêmeas do

vetor infectadas são necessárias para estabelecer a infecção em um novo paciente (HAIRSTON; MEILLON, 1968). Isto sugere que em áreas com alta infestação vetorial, a interrupção da transmissão da doença será muito mais difícil. Portanto, a quantificação estimada da densidade populacional do vetor de forma acurada é essencial no âmbito de programas de controle da filariose.

Os índices anuais de densidade de adultos, observados a partir dos mosquitos coletados nas estações de captura que foram instaladas na zona de avaliação em Água Fria, apresentaram um decréscimo ao longo do programa, porém o nível de magnitude deste decréscimo ainda é desconhecido. No ano anterior ao início do programa (2002), o índice anual de densidade de adultos foi de 11,51 mosquitos/quarto/noite. Este número foi reduzido para 8,43 mosquitos/quarto/noite em 2003, ano inicial do programa, e chegou a atingir um valor de mínimo de 2,48 mosquitos/quarto/noite no ano de 2007. O índice anual de densidade de mosquitos/quarto/noite apresentou ainda valores de 4,87, 3,84 e 8,88, respectivamente, para os anos de 2004, 2005 e 2006 (MELO-SANTOS et al., 2007). De acordo com o conjunto de resultados obtidos no presente trabalho, observou-se que a diversidade genética da população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria apresentou uma queda gradual significativa para o parâmetro R_S durante os três anos do estudo e que as ações ainda não foram suficientes para causar uma estruturação evidente na população em questão. Além disso, não houve um aumento significativo na frequência do alelo de resistência *cqmI_{REC}*. Assim, conclui-se que, apesar das reduções nas densidade de adultos, as ações no âmbito do programa de controle vetorial ainda não foram suficientes para causar reduções drásticas na composição genética da população de *Cx. quinquefasciatus* em Água Fria. Os resultados deste trabalho também apontam para a necessidade de se continuar o monitoramento da frequência do alelo *cqmI_{REC}* nesta população, uma vez que o mesmo pode estar no período lag. Será necessário um tempo de estudo maior como esforço para mensurar os impactos mais drásticos causados pelas medidas de controle vetorial no âmbito do Programa de Controle da Filariose em Recife.

10 CONCLUSÕES

a) As ações do programa de controle vetorial causaram um declínio gradual significativo na diversidade genética, observado através do parâmetro riqueza de alelos (R_S), e uma estruturação sutil, através do índice de diferenciação genética (F_{ST}), na população de *Culex quinquefasciatus* de Água Fria, os quais são consistentes com o impacto causado pelo programa de controle sobre a população vetora;

b) A exposição da população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria ao *Bacillus sphaericus* induziu uma flutuação, sem diferença estatisticamente significativa, nos valores da frequência do alelo *cqm1_{REC}*, devida principalmente aos indivíduos heterozigotos susceptíveis, o que sugere que o status de susceptibilidade continua, uma vez que a herança deste alelo é recessiva, entretanto, o seu monitoramento é importante pois tal alelo pode estar na fase lag esperada para alelos recessivos;

c) Aumentos nos valores dos parâmetros de diversidade genética, detectados em alguns momentos avaliados, sugerem que pode estar havendo fluxo gênico na população de Água Fria, através de eventos de migração de áreas circunvizinhas e/ou a partir de refúgios não tratados, o que aponta para ocorrência de quebra na pressão de controle, além de sugerir a necessidade de se expandir o programa para outras áreas de Recife;

d) Os resultados sugerem que as abordagens com marcadores moleculares são mais adequadas para avaliar os efeitos em longo prazo de programas de controle vetorial, uma vez que, durante os três anos avaliados, nem todos os parâmetros de diversidade genética foram drasticamente impactados (H_E e F_{ST}) para o marcador microssatélites e aumento na frequência do alelo *cqm1_{REC}* foi devido principalmente aos indivíduos heterozigotos susceptíveis.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. F. P. M. Urbanização, favelas e endemias: a produção da filariose no Recife, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p. 487-497, 1993.

AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. **Biological Control**, San Diego, v. 42, n. 2, p. 155-160, 2007.

ANDERSON, R. C. Order Spirurida-Suborder Spirurina. In: ANDERSON, R. C. (Ed.) **Nematode Parasites of Vertebrates: their development and transmission**. 2. ed. Oxon: CABI Publishing, 2000. p. 383-590.

BARBAZAN, P. et al. Control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) with *Bacillus sphaericus* in Maroua, Cameroon. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 13, n. 3, p. 263-269, 1997.

BARBOSA, R. M. R. et al. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 523-529, 2007.

BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 170, n. 5, p. 2045-2050, 1988.

BAUMANN, P. et al. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 163, n. 2, p. 738-747, 1985.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and their Control**. New York: Kluwer Academic: Plenum Publishers, 2003.

BERROCAL, L. et al. West Nile virus: ecology, and epidemiology of an emerging pathogen in Colombia. **Revista de Salud Pública**, Santafé de Bogotá, v. 8, n. 2, p. 218-228, 2006.

BLACK, W. C.; DUTEAU, N. M. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: CRAMPTON, J. M.; BEARD, C. B.; LOUIS, C. (Ed.). **The Molecular**

Biology of Insect Disease Vectors: a methods manual. 1. ed. London: Chapman & Hall, 1997. p. 361-373.

BLACK, W. C.; TABACHNICK, W. J. Population genetics of disease vectors. In: MARQUARDT, W. C. et al. (Ed.). **Biology of Disease Vectors.** 2. ed. Amsterdam: Elsevier Academic, 2005. p. 95-111.

BLITVICH, B. J. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 9, n. 1, p.71-86, 2008.

BONFIM, C. et al. Situação da filariose bancroftiana na Região Metropolitana do Recife: estudo em uma área endêmica no Município de Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1497-1505, 2003.

BONNET, E.; VAN DE PEER, Y. Zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 7, n. 10, p. 1-12, 2002.

BRAGA, C. et al. Bancroftian filariasis in an endemic area of Brazil: differences between genders during puberty. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 224-228, 2005.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 6, p. 1333-1337, 1987.

CARTAXO, M. F. S. **Abordagens Moleculares Aplicadas na Avaliação de um Programa de Controle Biológico do Mosquito *Culex quinquefasciatus*.** 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

CARTAXO, M. F. S. et al. Diagnóstico da infecção por *Wuchereria bancrofti* em amostras de *Culex quinquefasciatus*, provenientes de área sob intervenção. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 20., 2007, Recife. **Resumos ...** Recife: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 2007. 1 CD-ROM.

CHALEGRE, K. D. M. et al. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p.1044-1049, 2009.

CHARLES, J. F. Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. **Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie**, Amsterdam, v. 138, n. 4, p. 471-484, 1987.

CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C. Les bactéries entomopathogènes: mode d'action sur les larves de moustiques et phénomènes de résistance. **Annales de l'Institut Pasteur/Actualités**, Paris, v. 7, n. 4, p. 233-245, 1996.

CHARLES, J. F. et al. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 153-159, 1997.

CHEVILLON, C. et al. Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. **Evolution**, Lancaster, v. 49, n. 5, p. 997-1007, 1995.

COLEMAN, M. et al. Operational impact of DDT reintroduction for malaria control on *Anopheles arabiensis* in Mozambique. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 45, n. 5, p. 885-890, 2008.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 20. ed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1994.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, 1996.

CULEX. [Imagem de uma fêmea de *Culex* realizando oviposição]. Disponível em: <<http://centros.edu.xunta.es/iesaslagoas/slorenf/ins26.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2006.

DARBOUX, I. et al. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 981-990, 2001.

DARBOUX, I. et al. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 9, p. 5830-5835, 2002.

DARBOUX, I. et al. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 2022-2029, 2007.

DAVIDSON, E. W.; MYERS, P. Parasporal inclusions in *Bacillus sphaericus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 261-265, 1981.

DAVIDSON, E. W. Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 25, n. 3, p. 151-157, 1988.

DREYER, G; NORÕES, J. Filariose bancroftiana. In: BATISTA, R. S. et al. (Ed.). **Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. 1 v., p. 291-312.

EDILLO, F. E. et al. A set of broadly applicable microsatellite markers for analyzing the structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) populations. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 1, p. 145-149, 2007.

EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, n. 7, p. 832-839, 1996.

ELDRIDGE, B. F. Mosquitoes, the Culicidae. In: MARQUARDT, W. C. et al. (Ed.). **Biology of Disease Vectors**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Academic, 2005. p. 95-111.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP**. Version 3.68. Seattle: University of Washington, 2008. Disponível em: <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>. Acesso em: 02 out. 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.

FONSECA, D. M.; ATKINSON, C. T.; FLEISCHER, R. C. Microsatellite *primers* for *Culex pipiens quinquefasciatus*, the vector of avian malaria in Hawaii. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 11, p. 1613-1621, 1998.

FONSECA, D. M.; LAPOINTE, D. A.; FLEISCHER, R. C. Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 11, p. 1803-1814, 2000.

FONSECA, D. M. et al. Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 72, n. 2, p. 284-289, 2006.

FONTES, G. Filariídea: *Wuchereria bancrofti* – filariose linfática. In: NEVES, D. P. (Ed.) **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 269-277.

FONTES, G. et al. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 131-136, 2005.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública. 1962. 2 v.

GATHANY, J. **Disease Vectors**. [Imagem de uma fêmea adulta da espécie *Culex quinquefasciatus* realizando hematofagia]. Atlanta, 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/vectors/index.htm>>. Acesso em: 02 nov. 2008.

GOMES, A. C. Vigilância Entomológica. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 79-90, 2002.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. **The Journal of Heredity**, New York, v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.

GROSS, L. A new model for predicting outbreaks of West Nile Virus. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 4, n. 4, p. 476-477, 2006.

GYAPONG, J. O.; TWUM-DANSO, N. A. Y. Global elimination of lymphatic filariasis: fact or fantasy? **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 125-128, 2006.

HAIRSTON, N. G.; MEILLON, B. On the inefficiency of transmission of *Wuchereria bancrofti* from mosquito to human host. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 38, n. 6, p. 935-941, 1968.

HARRIS, H. Enzyme polymorphism in man. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**, London, v. 164, n. 995, p. 298-310, 1966.

HARTL, D. L. **A Primer for Population Genetics**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1988.

HEMINGWAY, J. Biological control of mosquitoes. In: MARQUARDT, W. C. et al. (Ed.) **Biology of Disease Vectors**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier Academic, 2005. p. 649-660.

HOOD, G. **PopTools**. Version 3.0.6. Canberra : CSIRO, 2008. Disponível em: <<http://www.cse.csiro.au/poptools>>. Acesso em: 02 out. 2008.

HOUGARD, J. M. et al. Campaign against *Culex quinquefasciatus* using *Bacillus sphaericus*: results of a pilot project in a large urban area of equatorial Africa. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 71, n. 3, p. 367-375, 1993.

HOY, M. A. **Insect Molecular Genetics**: an introduction to principles and applications. 2. ed. Amsterdam: Academic of Elsevier Science, 2003.

HUANG, S.; MOLAEI, G.; ANDREADIS, T. G. Genetic insights into the population structure of *Culex pipiens* (Diptera: culicidae) in the northeastern United States by using microsatellite analysis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n. 4, p. 518-527, 2008.

HUBER, K. et al. Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). **Heredity**, London, v. 89, n.1, p. 7-14, 2002.

KAHINDI, S. C. et al. Efficacy of vectobac DT and culinexcombi against mosquito larvae in unused swimming pools in Malindi, Kenya. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 24, n. 4, p. 538-542, 2008.

KENT, R. J.; MHARAKURWA, S.; NORRIS, D. E. Spatial and temporal; genetic structure of *Anopheles arabiensis* in Southern Zambia over consecutive wet and drought years. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 2, p. 316-323, 2007.

KIMURA, M. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 1, n. 1, p. 84-94, 1983.

KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 53, p. 61-81, 2008.

KUMAR, A. et al. Control of *Culex quinquefasciatus* with *Bacillus sphaericus* in Vasco City, Goa. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 12, n. 3, p. 409-413, 1996.

LAURENCE, B. R.; PICKETT, J. A. Erythro-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the major component of a mosquito oviposition attractant pheromone. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, London, v. 1, p. 59-60, 1982.

LENORMAND, T. et al. Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. **Nature**, London, v. 400, n. 6747, p. 861-864, 1999.

LEWONTIN, R. C.; HUBBY, J. L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, Baltimore, v. 54, n. 2, p. 595-609, 1966.

LINDBLADE, K. A. et al. Evaluation of long-lasting insecticidal nets after 2 years of household use. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v.10, n. 11, p.1141-1150, 2005.

LUIKART, G. et al. The power and promise of populations genomics: from genotyping to genome typing. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, n. 12, p. 981-994, 2003.

LUNA, E. J. A.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 7-19, 2003.

MACIEL A. et al. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n.4, p. 449-455, 1996.

MEIRMANS, P. G. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, Lancaster, v. 60, n. 11, p. 2399-2402, 2006.

MEDEIROS, Z. et al. Controle da filariose linfática no Brasil, 1951- 2000. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 77-86, 2003.

MEDEIROS, Z. et al. A filariose bancroftiana no município de Moreno - Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 73-79, 2004.

MEDEIROS, Z. et al. The present situation regarding lymphatic filariasis in Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 263-267, 2006.

MELO, J. V. et al. Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. **Micron: the International Research and Review Journal for Microscopy**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1342-1350, 2008.

MELO-SANTOS, M. A. V. et al. Controle de *Culex quinquefasciatus* no Programa Nacional de Eliminação da Filariose: a experiência de Recife. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10., 2007, Brasília. **Resumos...** Brasília: Sociedade Entomológica do Brasil, 2007. 1 CD-ROM.

MORALES, M. A. et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 10, p. 1559-1561, 2006.

MULLA, M. S. et al. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n.1, p. 39-46, 2003.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. 1. ed. New York: Columbia University, 1987.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. 1. ed. New York: Oxford University, 2000.

NICOLAS, L. et al. Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 275-279, 1993.

NIELSEN-LEROUX, C.; CHARLES, J. F. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 210, n. 2, p. 585-590, 1992.

OLIVEIRA, C. M. F. **Condições Ambientais e Densidade Populacional do *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), em Áreas Urbanas do Recife e Olinda**. 1996. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

OLIVEIRA, C. M. et al. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 41, n.1, p. 58-64, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis**. Genebra, 2000.

Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>>. Acesso em: 20 ago. 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Lymphatic filariasis endemic countries and territories**. [Mapa mundial da endemicidade da filariose linfática]. Genebra, 2006.

Disponível em:

<[http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/World_endemic\(2\).png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/World_endemic(2).png)>. Acesso em: 20 ago. 2008.

PAGE, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 357-358, 1996.

PAUCHET, Y et al. Effects of a mosquitocidal toxin on mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 1335-1344, 2005.

PEI, G. et al. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3003-3009, 2002.

PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, Boston, v. 12, n. 4, p. 844-855, 1998.

PINTO, J. et al. Genetic structure of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in São Tomé and Príncipe (West Africa): implications for malaria control. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 2183-2187, 2002.

PINTO, J. et al. An island within an island: genetic differentiation of *Anopheles gambiae* in São Tomé, West Africa, and its relevance to malaria control. **Heredity**, London, v. 91, n. 4, p. 407-414, 2003.

RABINOVITH, L.; SILVA, C. M. B.; ALVES, R. S. A. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. São Paulo: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p.17-90.

RACHOU, R. G. Conceito e programa de profilaxia da filariose bancroftiana no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 11-40, 1960.

RAO, D. R. et al. Development of high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 11, n. 1, p. 1-5, 1995.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **The Journal of Heredity**, New York, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.

RECIFE. Secretaria de Saúde. **Projeto de Controle Integrado do *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), Vetor da Filariose Bancroftiana na Cidade do Recife**. Recife, 2003. Programa de Saúde Ambiental.

RECIFE. Secretaria de Saúde. **Plano municipal de saúde 2006-2009: Recife saudável - Inclusão social e qualidade no SUS**. Recife, 2005.

RECIFE. Secretaria de Planejamento Participativo, Obras e Desenvolvimento Urbano e Ambiental. **Perfil dos Bairros do Recife**. Disponível em: <<http://www.recife.pe.gov.br/pr/secplanejamento/infoc/bairros.php>>. Acesso em: 23 ago. 2008.

REGIS, L. et al. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 115-119, 1995.

REGIS, L. et al. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, n. 5, p. 488-492, 2000.

REGIS, L. N.; NIELSEN-LEROUX, C. Management of resistance to bacterial vector control. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 419-439.

REGIS, L. N. et al. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 377-380, 2001.

REY, L. Filariase linfática. In: REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 268-275.

ROCHA, E. M. M. et al. Filariose bancroftiana em áreas urbanas do Estado de Alagoas, nordeste do Brasil: estudo em população geral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 6, p. 545-551, 2000.

ROMÃO, T. P. et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its α -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 273, n. 7, p. 1556-1568, 2006.

RONGNOPARUT, P. et al. Estimates of gene flow among *Anopheles maculates* populations in Thailand using microsatellite analysis. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 60, n. 3, p.508-515, 1999.

SEQUEIRA, N. **Marin / Sonoma Mosquito & Vector Control District**. [Imagem da fase de pupa do mosquito *Culex*]. Cotati, 2008. Disponível em: <<http://www.msмосquito.com/newsroom.html>>. Acesso em: 02 nov. 2008.

SILVA, L. M. et al. Low levels of genetic differentiation in mosquito (*Culex quinquefasciatus*) populations from Recife, Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 145-147, 1994.

SILVA-FILHA, M. H. et al. Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 88, n. 3, p. 525-530, 1995.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp mosquito larvae. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 247, n. 3, p. 754-761, 1997.

SILVA-FILHA, M. H.; CHARLES, J. F.; NIELSEN-LEROUX, C. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 711-721, 1999.

SILVA-FILHA, M. H. et al. Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the preimaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 17, n. 1, p. 45-50, 2001.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. **Biological Control**, San Diego, v. 44, n. 2, p. 227-234, 2008.

SINGH, G. J.; GILL, S. S. An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 52, n. 2, p. 237-247, 1988.

SMITH, J. L. et al. Cross-species comparison of microsatellite *loci* in the *Culex pipiens* complex and beyond. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 697-700, 2005.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 172-186.

SOLFERINI, V. N.; SELIVON, D. Polimorfismos de isoenzimas. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 137-142.

SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES. **Current Control Strategy**. Geneva, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/lymphfil/direction.htm>>. Acesso em: 28 fev. 2008.

VINOGRADOVA, E. B. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Moscow: Pensoft Publishers, 2000.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WONDJI, C et al. Impact of insecticide-treated bed nets implementation on the genetic structure of *Anopheles arabiensis* in an area of irrigated rice fields in the Sahelian region of Cameroon. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 12, p. 3683-3693, 2005.

YADAV, R. S.; SHARMA, V. P.; UPADHYAY, A. K. Field trial of *Bacillus sphaericus* strain B-101 (serotype H5a, 5b) against filariasis and Japanese encephalitis vectors in India. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 13, n. 2, p. 158-163, 1997.

YUAN, Z. M. et al. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 10, n. 1, p. 41-49, 2000.

APÊNDICE

Apêndice A – Parecer do Comitê de Ética



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: Avaliação da diversidade genética de uma população de *Culex quinquefasciatus* proveniente de área sob intervenção para controle vetorial

Pesquisador responsável: Marina Falcão de Souza Cartaxo

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 17/06/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 46/08

Registro no CAAE: 0045.0.095.000-08

PARECER Nº 036/2008

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 03 de julho de 2008.


Dr. Zilma Maria de Medeiros
Biomédica
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ