



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ - IGM
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA - PGBSMI

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

Dissertação de mestrado

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MOLECULARES PARA
VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA DO *Aedes (Stegomyia) aegypti*
(Linnaeus, 1762)**

KATHLEEN RIBEIRO SOUZA

Salvador – 2011

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MOLECULARES PARA VIGILÂNCIA
ENTOMOLÓGICA DO *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)**

KATHLEEN RIBEIRO SOUZA

Orientador: Dr. Luciano Kalabric Silva

Dissertação apresentada ao Curso da Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa da FIOCRUZ-BA para a obtenção do grau de mestre.

Salvador – Brasil

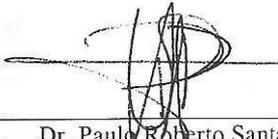
2011

**“CRIAÇÃO DE UM SISTEMA DE VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA MOLECULAR DO *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (LINNAEUS, 1762).”**

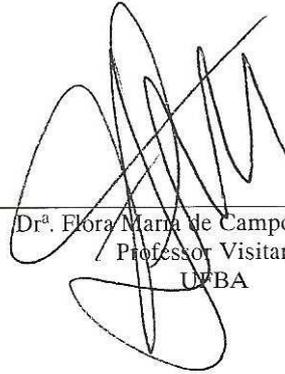
KATHLEEN RIBEIRO SOUZA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Paulo Roberto Santana de Melo
Professor Adjunto
UESC



Dr. Flora Maria de Campos Fernandes
Professor Visitante
UFBA

Dedico este trabalho

À minha mãe, Bethleem, minha avó, Dilza e meu avô, Elpídio (*in memoriam*) por terem proporcionado a minha chegada até aqui, com todo o seu sacrifício, preocupação, perseverança e esperança.

Agradecimentos

À minha mãe, Bethlehem e minha avó, Dilza, por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu pai, Ailton e minha madrasta, Fátima, por me proporcionarem os caminhos certos e essenciais para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, professor Luciano Kalabric, pelas orientações, ensinamentos, confiança, paciência para juntos construirmos este trabalho.

Ao professor Mitermayer Reis e Dr. Paulo Melo, pela contribuição inicial na produção deste trabalho, apoio e experiência partilhada ao longo do estudo.

Ao Dr. Ronald Blanton pela dedicação, experiência, confiança e preocupação.

À Dra. Maria de Lourdes da Graça Macoris, pesquisadora do Laboratório da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Marília-SP pela doação das larvas de *A. aegypti* da cepa Rockefeller utilizadas neste estudo.

Aos colegas do CCZ, Eliaci e Adelina, e da SESAB que apoiaram e ajudaram a construir e finalizar esse estudo.

Aos colegas Silvana Paz, Lúcio Barbosa e Gisele Lopes pela preocupação, dicas, ensinamento e ajuda sempre que solicitados.

Aos colegas Gilmar Ribeiro Gustavo Silva, Cida Rugieri, Carol Freitas e Isabel Magalhães, que estiveram produzindo esse trabalho junto comigo.

Pelo apoio de todos os companheiros de laboratório e equipe pela ajuda e companheirismo.

Às minhas amigas Janete, Flora, Lívia, Flávia, Cida, Leila e Karen pela compreensão por minha ausência, por meu temperamento, pelo colo e noites perdidas quando necessário e pela força que me deram durante esses dois anos de trabalho.

A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao
seu tamanho original

Albert Einstein

RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA

Apesar do combate recorrente ao mosquito vetor da dengue, o *Aedes aegypti*, mais de 80% dos estratos da cidade de Salvador-BA apresentam condição de alerta ou risco de surto de dengue. Visto que as abordagens tradicionais para controle do mosquito vetor da dengue não têm produzido os efeitos esperados, o presente estudo avaliou parâmetros moleculares para vigilância entomológica do *A. aegypti* utilizando ferramentas de geotecnologia e de genética de populações como forma de apoiar o trabalho de campo e ações integradas das instâncias responsáveis pelo controle da dengue. O desenho do estudo apresentou um componente transversal, descrevendo dados sobre a genética de população de larvas de *A. aegypti* coletadas em Salvador e amostras controle coletadas no ano de 2009 em Jacobina e Vitória da Conquista, além da cepa Rockefeller, e um longitudinal, sobre amostras de quatro áreas (Plataforma, Itapagipe, Tancredo Neves e Itapuã) durante quatro ciclos do LIRAA Salvador entre 2007 a 2009. O DNA de cada larva foi isolado pelo método DNAzol® e genotipado por 5 marcadores SSR através da técnica de PCR e eletroforese capilar. A distribuição espacial dos criadouros foi realizada utilizando-se ortofotos pelo programa Arcview v. 9.3. Para a análise da diferenciação populacional e teste de hipótese foram utilizados os programas GenePop, GenAlEx e Spade, e para inferência populacional utilizamos o programa *structure*. Os marcadores encontraram-se, em geral, em equilíbrio de H-W e comportaram-se como independentes. Quando utilizamos a estatística Φ_{pt} e R_{ST} foi possível discriminar significativamente ($p < 0,05$) populações geneticamente diferenciadas de *A. aegypti* a nível de município, áreas do município de Salvador e estratos pertencentes a estas áreas. O programa *structure* indicou K igual a 2 populações como ideal para representar os dados, considerando a população de Salvador uma miscigenação de populações de *A. aegypti* de outras regiões do estado. Os resultados do estudo longitudinal mostraram uma diferenciação entre os ciclos de 2008.3 e 2009.4. As medidas de N_e variaram consideravelmente por área e ciclo evidenciando o efeito de gargalo de garrafa em diferentes períodos em cada área, apesar de não haver correlação com o IIP. A partir dos resultados obtidos, concluímos que o controle vetorial produz alterações sobre a estrutura populacional do *A. aegypti*, mas que não são efetivas. O uso do georreferenciamento e de informações genéticas do vetor poderiam contribuir para a definição das áreas de abrangência das populações do *A. aegypti* e para a tomada de decisões a respeito do manejo do tratamento.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, microssatélites, vigilância entomológica, marcadores genéticos.

RESUMO EM LÍNGUA ESTRANGEIRA

Despite the recurring attempts to combat the mosquito vector of dengue, *Aedes aegypti*, more than 80% of the strata of the city of Salvador-BA show alert condition or risk of an outbreak of dengue. Since traditional approaches to control the mosquito vector of dengue have not produced the expected results, this study evaluated molecular parameters for entomological surveillance of *A. aegypti* using tools of geotechnology and population genetics as a way of supporting the fieldwork and integrating the actions of the authorities responsible for integrated dengue control. The design of the study had a transverse component, describing data on the population genetics of larvae of *A. aegypti* collected in Salvador and control samples collected in 2009 in Jacobina and Vitoria da Conquista, in addition to the Rockefeller strain, and a longitudinal samples from four areas (Plataforma, Itapagipe, Tancredo Neves and Itapuã) for four cycles LIRAA of Salvador between 2007 to 2009. The DNA of each larva was isolated by the DNazol® method and genotyped with five STR (short tandem repeat) markers by PCR and capillary electrophoresis. The spatial distribution of breeding sites was performed using ortophotos by the program ArcView v.9.3. For the analysis of population differentiation and hypothesis testing the programs GenePop, GenAlEx Spade were used, and for population inference the program structure was used. The markers were usually found to be in H-W equilibrium and behaved as independent. When we use the statistics Φ_{pt} and R_{ST} it was possible to discriminate ($p < 0.05$) genetically differentiated populations of *A. aegypti* at the municipal level, between areas of Salvador and strata within these areas. The program *structure* indicated K equal to 2 populations as ideal to represent the data, considering the population of Salvador is a mixture of populations of *A. aegypti* in other regions of the state. The results of the longitudinal study showed a difference between the cycles of 2008.3 and 2009.4 N_e measures varied considerably by area and cycle showing the effect of bottleneck in different periods in each area, although no correlation with the IIP. Given these results we conclude that the vector control produces changes on the population structure of *A. aegypti*, but are not effective. The use of georeferencing and vector's genetic information could help define the catchment areas of populations of *A. aegypti* and for making decisions about the management of treatment.

Keywords: *Aedes aegypti*, microsatellites, entomological surveillance, genetic markers.

Lista de ilustrações

- Figura 1.** Série histórica de incidências e casos notificados de dengue, Bahia, 1996 a 2010. 18
- Figura 2.** Fêmea de *A. aegypti* mostrando tarsos com marcações em forma de listras brancas e mesonoto com desenho em forma de lira. 21
- Figura 3.** Índice de infestação predial (IIP%) e incidência da dengue por 100.000 hab. em Salvador (CCZ e DIVEP/SESAB). 24
- Figura 4.** Áreas de coleta de larvas de *A. aegypti* no Estado da Bahia e no município de Salvador. 32
- Figura 5.** Eletroferograma dos alelos dos marcadores AAMS11 e AAMS42 de indivíduos heterozigotos (A e C) e homozigotos (B e D). 36
- Figura 6.** Locais focados por larvas de *Aedes aegypti* georeferenciadas em Salvador e das áreas de estudo durante o 4. LIRAA 2007, 3. LIRAA 2008, 4. LIRAA 2009 e 5. LIRAA 2009. 39
- Figura 7.** Tendência da média global do índice de infestação predial (IIP, %) por ciclo do LIRAA, Salvador, 2007 a 2009. 40
- Figura 8.** Número de larvas de *A. aegypti* coletas por estrato e área no município de Salvador (5. LIRAA 2009). 46
- Figura 9.** Diferentes parâmetros de K para cálculo da função de verossimilhança. 50
- Figura 10.** Estrutura “bar plot” populacional baseada em cinco locus SSR de *A. aegypti*. Cada linha vertical representa um indivíduo. Cada uma das cores

(vinho e azul) representa a frequência de ancestralidade de cada grupo definido pelo programa *structure*, $K=2$ 51

Figura 11. Frequência alélica para todos os *loci* entre os anos de 2007 e 2009. 52

Figura 12. Frequência alélica para todos os *loci* em todas as áreas do município de Salvador. 52

Quadro 1. Número de larvas de *A. aegypti* analisadas por ciclo do LIRAa e áreas, Salvador – BA, 2007 a 2009. 33

Quadro 2. Número de larvas de *A. aegypti* analisadas por ciclo do LIRAa e área de outros municípios do interior do estado da Bahia, 2009, e larvas da cepa Rockefeller, 2010. 34

Lista de tabelas

Tabela 1. Índice de infestação predial (IIP, %), médio por ciclo do LIRAA e área selecionada.	40
Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> utilizados na genotipagem dos SSR de <i>A. aegypti</i> (AAMS).	41
Tabela 3. Frequência alélica dos marcadores SSR por <i>locus</i> em Salvador (5. LIRAA 2009) e populações controles (N=244).	41
Tabela 4. Sequências representando os alelos sequenciados. Em destaque estão as regiões repetitivas de cada marcador SSR.	42
Tabela 5. Número de alelos (N_a), heterozigosidade observada (H_o), índice de fixação (F) e teste de equilíbrio de H-W dos marcadores SSR na população de Salvador (5. LIRAA 2009) e populações controles por <i>locus</i>	43
Tabela 6. Desequilíbrio de ligação para cada par de <i>locus</i> para população de Salvador (5. LIRAA 2009).	43
Tabela 7. Diferenciação alélica para cada par de populações em nível de município sobre todos os <i>loci</i> (método de Fisher).	44
Tabela 8. Diferenciação genotípica para cada par de populações em nível de município sobre todos os <i>loci</i> (método de Fisher).	46
Tabela 9. Diferentes medidas de diferenciação populacional (F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} e medida D) para análise das populações controles e de Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os <i>loci</i>	45

Tabela 10. Diferenciação alélica para cada par de populações das áreas selecionadas em Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os <i>loci</i> (método de Fisher).	45
Tabela 11. Diferenciação genotípica para cada par de populações das áreas selecionadas em Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os <i>loci</i> (método de Fisher).	45
Tabela 12. Diferentes medidas de diferenciação populacional (F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} e medida D) para análise das quatro áreas da população de Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os <i>loci</i>	46
Tabela 13. Diferentes medidas de diferenciação populacional (F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} e medida D) para análise dos diferentes estratos das áreas selecionadas na população de Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os <i>loci</i>	47
Tabela 14. Tamanho efetivo populacional (N_e) para análise das populações controles e de Salvador (5. LIRAA 2009).	49
Tabela 15. Tamanho efetivo populacional (N_e) para análise das quatro áreas da população de Salvador (5. LIRAA 2009).	49
Tabela 16. Diferentes medidas de diferenciação populacional (F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} e medida D) para análise das quatro áreas da população de Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os <i>loci</i>	53
Tabela 17. Tamanho efetivo populacional (N_e) das quatro áreas selecionadas da população de Salvador dos ciclos 2007.4, 2008.3, 2009.4 e 2009.5 do LIRAA.	53

Lista de abreviaturas e siglas

AAMS	Microssatélite do <i>Aedes aegypti</i>
ACE	Agente de Combate a Endemias
AMOVA	Análise de Variância Molecular
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
DENV	Vírus da Dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNAmt	DNA mitocondrial
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
F	Índice de fixação
FAD	Febre Amarela e Dengue
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
F_{ST}	Estatística F
g.l.	Grau de liberdade
GPS	Sistema de Posicionamento Global
H-W	Hardy-Weinberg
H_E	Heterozigosidade esperada
H_O	Heterozigosidade observada
IB	Índice de Breteau
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IIP	Índice de infestação predial
ITR	Índice por tipo de recipiente
LI	Levantamento de Índices
LIRAA	Levantamento de índice rápido de <i>Aedes aegypti</i>
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
N_a	Número de alelos efetivos
NaOH	Hidróxido de sódio
N_e	Número efetivo da população

OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEAa	Programa de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
RAPD	Amplificação Randômica de DNA Polimórfico
SCD	Síndrome de choque da dengue
SIG	Sistema de Informação Geográfica
SESAB	Secretaria de Saúde do Estado da Bahia
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SSa	Salvador
SSR	Sequências simples repetitivas

Sumário

RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA.....	6
RESUMO EM LÍNGUA ESTRANGEIRA	7
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 A dengue	17
2.2 Mosquito vetor da dengue	18
2.3 Controle vetorial e levantamento de índices	21
2.4 Marcadores genéticos.....	26
2.5 Variabilidade genética em populações de <i>Aedes aegypti</i>	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 Local de estudo.....	32
4.2 Coleta de dados e amostras	33
4.3 Georeferenciamento das larvas	34
4.4 Detecção de Marcadores SSR e desenho dos primers	35
4.5 Extração do DNA de larvas de <i>A. aegypti</i> e genotipagem das amostras.....	35
4.6 Sequenciamento	36
4.7 Análise dos dados.....	36
5. RESULTADOS	39
5.1 Georeferenciamento dos focos do <i>A. aegypti</i> e IIP das áreas selecionadas	39
5.2 Características dos marcadores SSR.....	40
5.3 Medidas de diferenciação populacional	44
5.3.1 Populações dos municípios	44
5.3.2 Áreas selecionadas em Salvador, 5. LIRAA 2009	45
5.3.3 Estratos das áreas selecionadas em Salvador, 5. LIRAA 2009.....	46
5.4 Tamanho efetivo da população.....	49
5.4.1 Entre populações dos municípios.....	49
5.4.2 Entre as áreas selecionadas em Salvador, 5. LIRAA 2009	49
5.5 Inferência populacional	50
5.6 Análises longitudinais	52
5.6.1 Frequências alélicas.....	52
5.6.2 Medidas de diferenciação genética	53
5.6.3 Tamanho efetivo da população	53
6. DISCUSSÃO	54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito de grande importância epidemiológica por ser o vetor primário do vírus da dengue (DENV), febre amarela (YFV), entre outras arboviroses. A dengue é um dos principais problemas de saúde pública que ocorrem no Brasil nas últimas décadas e é a arbovirose de maior incidência no mundo, sendo endêmica em todos os continentes, exceto na Europa (LIMA, 2010). Seu espectro clínico é muito amplo, variando de formas assintomáticas ou oligossintomáticas até formas graves e letais. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas encontram-se sob risco de se infectarem, particularmente em países tropicais onde a temperatura e a umidade favorecem a proliferação do mosquito vetor (TAUIL, 2002; WHO, 2009).

O *A. aegypti* é um mosquito de hábitos doméstico e diurno, utilizando-se preferencialmente de depósitos de água limpa para deposição dos ovos, os quais têm uma alta capacidade de resistir à dessecação. Atualmente, o único elo vulnerável na cadeia de transmissão da dengue a uma medida preventiva é o vetor que, por sua vez, tem revelado grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais desfavoráveis (TAUIL, 2002). Devido a falta de vacinas eficazes, a principal medida de controle disponível para a dengue depende dos programas de controle do mosquito vetor, que são caros e difíceis de manter (MARTÍN *et al.*, 2010). Os métodos mais utilizados nos últimos vinte anos são: o controle biológico do vetor, a aplicação de inseticidas, o uso doméstico de larvicidas químicos e as campanhas informativas buscando a colaboração da população para a eliminação dos focos de mosquitos; porém todas estas técnicas têm demonstrado eficiência limitada (CLARO, 2004).

Apesar do combate recorrente ao mosquito, os dados do Levantamento Rápido de Índice para *A. aegypti* (LIRAA) demonstram uma flutuação do IIP ao longo do tempo sem uma correlação clara com as taxas de incidência anual de dengue. Em virtude da falta de agentes de combate a endemias (ACEs) suficientes para o tratamento maciço, alguns municípios que realizam o LIRAA, como Salvador, adotam a política de priorizar o tratamento em áreas com maior risco de surto por dengue (IIP% > 3,9) deixando de tratar as demais áreas num mesmo ciclo. Como

consequência desta abordagem, o mosquito poderia proliferar-se nas áreas com intermitência do tratamento e ser re-introduzido nas áreas previamente tratadas.

Visto que as abordagens tradicionais, para o controle do mosquito vetor da dengue, não têm produzido os efeitos esperados, supõe-se que o conhecimento mais aprofundado da diversidade genética do *A. aegypti* e o entendimento do padrão de dispersão deste mosquito por georreferenciamento podem demonstrar como esta população está organizada, favorecendo o desenvolvimento de estratégias de controle efetivo para prevenção de epidemias da dengue (EISEN; LOZANO-FUENTES, 2009; GORROCHOTEGUI-ESCALANTE et al., 2002).

Atualmente, marcadores microssatélites ou sequências simples repetitivas (SSR) têm sido extensivamente utilizadas para o estudo de variação genética ou para detectar fluxo genético de populações de diferentes tipos de organismos. Os marcadores SSR são aparentemente neutros, codominantes e altamente polimórficos. Além disso, esse tipo de marcador pode potencialmente distinguir populações que podem ter divergido entre si recentemente (LANZARO *et al.*, 1995). Variações nos marcadores SSR entre populações de *A. aegypti* já foram utilizados para demonstrar evidências de que o armazenamento de água como hábitat e a densidade populacional humana podem afetar o nível de diferenciação genética destes vetores (HUBER *et al.*, 2002).

Neste estudo avaliamos a utilidade do georreferenciamento e da genética de populações para identificar a existência de estruturas populacionais do *A. aegypti* em áreas selecionadas na cidade de Salvador e áreas administrativas pré-definidas para o controle vetorial (estratos), bem como, para modelar a ocorrência de populações do *A. aegypti* isoladas geograficamente por diversos fatores, como por exemplo, o uso recorrente de larvicidas. Deste modo, poderemos criar um sistema de vigilância entomológica molecular do *A. aegypti*, baseado no estudo da variabilidade genética deste mosquito, como ferramenta de auxílio no trabalho de campo e ação integrada das instâncias responsáveis pelo controle da dengue. Através deste sistema, o tratamento poderia ser guiado por parâmetros técnicos que incluem a informação sobre a estruturação populacional do *A. aegypti* e sua dispersão no ambiente, independentemente de fronteiras político-administrativas, tais como, distrito sanitário, bairros, estratos ou quarteirões, como vem sendo empregado pelo sistema de controle atual.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A dengue

A dengue é uma doença infecciosa que se manifesta clinicamente sob duas formas principais: a dengue clássica, também conhecida como febre de dengue (FD), e a forma hemorrágica ou febre hemorrágica de dengue (FHD), podendo evoluir para uma forma ainda mais grave denominada síndrome de choque da dengue (FHD/SCD). A doença é causada pelo vírus da dengue (DENV), que é classificado em quatro sorotipos DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 (HAMMON; RUDNICK; SATHER, 1960), e pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem, a dengue constitui um grave problema de saúde pública mundial.

Os primeiros relatos da doença datam do final do século XVIII, no Sudoeste Africano e nos Estados Unidos, porém somente foi reconhecida como doença pela OMS no século XX. Nas Américas a dengue ocorre desde o século XIX, com período de silêncio epidemiológico no início do século XX, com reintrodução dos sorotipos 2 e 3 associados a formas clássicas de manifestação da doença na década de 1960 (TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999).

Atualmente, aproximadamente 40% da população mundial encontra-se sob risco de se infectarem com o DENV, particularmente em países tropicais da Ásia e da América (WHO, 2009), onde a prevalência da doença é mais alta, com uma estimativa de 50 a 100 milhões de casos de FD e 250.000 a 500.000 casos de FHD por ano, com taxa de letalidade de aproximadamente 5% (GUBLER, 2002).

Os casos notificados de dengue aumentaram 91% no Brasil, no ano de 2010, sendo que os estados de São Paulo e Minas Gerais foram responsáveis por cerca de 70% das notificações. No estado da Bahia a situação epidemiológica da dengue vem oscilando desde 2008. Até novembro de 2010, foram notificados 54.615 casos de dengue no estado, correspondendo a uma redução de 54,5% em relação ao mesmo período de 2009 (120.150), que por sua vez apresentou um aumento de 144,6% em relação ao mesmo período no ano de 2008 (48.585), em todo o estado da Bahia (Figura 1). Até a primeira semana do ano de 2011, foram notificados 409 casos de dengue na Bahia, 41,6% a menos que no mesmo período de 2010.

Quanto às formas graves da doença: dengue com complicações, FHD e SCD, registrou-se 2.493 casos suspeitos e confirmaram-se 1.766 casos graves e 66 óbitos

no estado da Bahia em 2009. Com uma redução drástica em 2010, foram registrados 782 casos suspeitos, com a confirmação de 692 casos graves, com registro da taxa de letalidade de 4,9% (SESAB, 2009; SESAB, 2010).

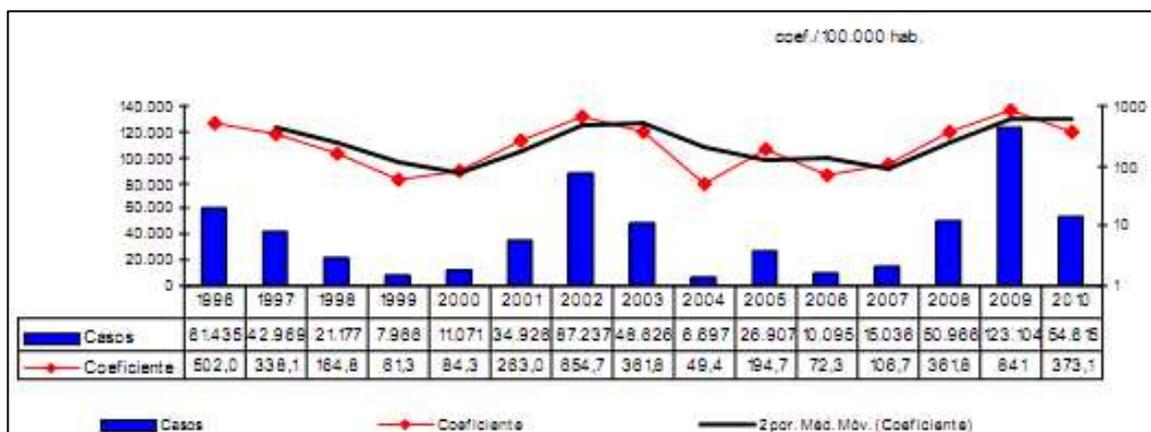


Figura 1. Série histórica de incidência e casos notificados de dengue, Bahia, 1996 a 2010.

O município de Salvador registrou 3.454 casos suspeitos de dengue em 2008 e mais de 6.500 casos em 2009. Até a 49ª semana epidemiológica do ano de 2010, em Salvador, houveram 7.799 casos notificados de dengue, revelando um aumento acentuado na incidência da doença ao longo dos anos e a co-circulação de três sorotipos do DENV (DEN-1, DEN-2 e DEN-3) no município (SESAB, 2010).

Em 2009, os sorotipos DENV1, DENV2 e DENV3 circularam simultaneamente com predominância expressiva do DENV2 (87%) durante os 12 meses. Em 2010, até o mês de julho, houve uma predominância do DENV2 representando 52% dos isolamentos virais. A partir de agosto de 2010, o DENV1 superou os demais sorotipos em número de isolamentos virais, representando um aumento do risco para epidemias por esse sorotipo em 2011 (SESAB, 2010).

2.2 Mosquito vetor da dengue

A fonte de infecção e hospedeiro vertebrado da dengue é o homem por ser susceptível aos quatro sorotipos do DENV. Todavia, a persistência do vírus na natureza depende do mosquito vetor do gênero *Aedes*, sobretudo da espécie *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), mediante o ciclo de transmissão **homem – A. aegypti – homem**. O *A. aegypti* é uma espécie nativa da África (região etiópica), onde também foi descrito um ciclo silvestre envolvendo o macaco.

O mosquito migrou para o continente americano através de navios escravos estabelecendo-se e espalhando pelo Novo Mundo entre os séculos XVII e XVIII, assim, em meados de 1950, quase todos os países da América já haviam registrado a presença do *A. aegypti* (FRANCO, 1961). Apesar de ter sido maciçamente combatido em épocas passadas, sobreviveu à erradicação e vem mantendo-se presente em ecossistemas urbanos (FORATTINI, 2002).

O *A. aegypti* é uma espécie tipicamente sinantrópica, tendo assim evoluído por milhares de anos associado aos seres humanos, ao seu habitat e hábitos (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994). Por ter se tornado um mosquito urbano e doméstico, o *A. aegypti* possui uma relação estreita com o homem e o acompanha em seus deslocamentos, principalmente na forma de transporte passivo (VIEIRA; LIMA, 2006). O desenvolvimento econômico, a urbanização e o transporte de pessoas e mercadorias facilitam a difusão tanto do mosquito quanto do vírus, por meio de pessoas infectadas, por todo o mundo. Contribuindo, desta forma, para o aumento da incidência da dengue e disseminação do vírus, predominante em áreas urbanas e suburbanas, favoráveis ao mosquito (HUBER *et al.*, 2004). A temperatura impõe limites à distribuição de dengue no mundo, pois o *A. aegypti* raramente sobrevive fora dos paralelos 45° N e 35° S. Projeções de elevação de 2°C da temperatura global para o final do século XXI, provavelmente aumentarão a extensão da latitude e longitude da distribuição da dengue na terra (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Sua distribuição é limitada também pela altitude de 1.000 metros, apesar de se ter registro de sua presença a 2.132 e 2.200 metros acima do nível do mar, na Índia e na Colômbia (FUNASA, 2001).

O *A. aegypti* apresenta duas fases distintas no seu ciclo de vida: uma aquática (ovos, larvas e pupas) e outra terrestre (mosquito adulto). No estágio larval o *A. aegypti* alimenta-se de partículas em suspensão e tem duração de quatro a oito dias e a pupa tem duração de dois dias (CÔNSOLI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Após o acasalamento a fêmea necessita de sangue para o desenvolvimento dos ovos, realizando a hematofagia. Sua oviposição ocorre em recipientes artificiais e naturais contendo água parada protegidos do sol, como tanques caixas d'água, cisternas, casca de cocos, bromélias e outros. Os ovos apresentam elevada resistência, podendo permanecer viáveis por cerca de um ano em ambientes desfavoráveis (FUNASA, 2001).

Em estudos de preferência por sítios de oviposição, demonstram que as fêmeas grávidas de *A. aegypti* respondem a estímulos visuais, olfativos e quimiotáteis para a realização da oviposição, e demonstraram maior atração para oviposição em águas residuais e de lagos quando estas apresentam coliformes fecais e totais, sugerindo que na verdade a atração pode estar sendo exercida por odores emanados por estes locais (NAVARRO; OLIVEIRA; BRITO, 2003). Águas que passaram por tratamento com cloro, como água encanada e piscina mostraram-se com ação repelente quanto a oviposição das fêmeas, revelando efeito negativo na produtividade dos sítios de oviposição (ALDSTADT et al., 2011; NAVARRO; OLIVEIRA; BRITO, 2003)

Mesmo percorrendo distâncias relativamente pequenas através de vôo, cerca de 50 a 100 metros, as fêmeas podem dispersar rapidamente à procura de locais para ovipositar quando estes não estão disponíveis. Assim a atividade ovipositora durante um único ciclo gonotrófico pode estender-se por dias e alcançar uma área de pelo menos 840m de diâmetro e a infestação das casas pode ser de quase 1 Km², partindo do foco inicial, independente de atividade humana como transporte e comércio (HONORIO et al., 2003; REITER et al., 1995).

Todo o período de desenvolvimento, da eclosão do ovo até a emergência do indivíduo adulto tem duração de aproximadamente dez dias, o que pode variar conforme condições ambientais de menores temperaturas (17°C), na qual o processo torna-se mais lento (10 – 17 dias), enquanto em temperaturas mais altas (30°C) o desenvolvimento pode ocorrer em períodos de 6 a 8 dias (HIEN, 1975).

O adulto é de coloração escura, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto e dois tufos de escamas branco-prateadas no clípeo (Figura 2). O macho se distingue essencialmente da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos (FUNASA, 2001).

Sua adaptação evolutiva à hematofagia, frequente e quase exclusiva em humanos, e a colonização de tipos infinitos de habitats, faz deste mosquito um transmissor extremamente eficiente de patógenos ao homem. Além do DENV, o *A. aegypti* também é capaz de transmitir no meio urbano outros arbovírus, tais como o vírus da febre amarela (YFV) e o vírus do Nilo ocidental (WNV) (FORATTINI, 2002). Deste modo, o controle efetivo do *A. aegypti* pode refletir não somente sobre a dengue, mas também sobre a emergência de outras arboviroses.



Figura 2. Fêmea de *A. aegypti* mostrando tarsos com marcações em forma de listras brancas e mesonoto com desenho em forma de lira. **FONTE:** <http://t2noticiasatuais.blogspot.com/>

Os mosquitos do gênero *Aedes* são simpátricos e outro representante desse gênero é o *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894), que nos dias de hoje é um vetor de importância secundária no Brasil, associado à transmissão de arboviroses semi-urbanas (SERUFO *et al.*, 1993). O *A. albopictus* teve sua origem no sudeste da Ásia, onde esses mosquitos são responsáveis pela transmissão endêmica do DENV. Foi introduzido no continente americano nos anos 80 do século passado, sendo que em 1986 foi observado em três regiões do Brasil (FIGUEIREDO, 2003).

Atualmente, a única medida de controle disponível, da dengue, depende dos programas de controle do mosquito vetor, que são caros e difíceis de manter (MARTÍN *et al.*, 2010). Portanto, é de extrema importância considerar os aspectos biológicos e as consequências de sua combinação com fatores ambientais e climáticos, assim como os hábitos antropogênicos que favorecem a proliferação do mosquito, para que se possa entender a expansão e intensificação da dengue, e finalmente escolher estratégias e métodos adequados para monitorar e controlar a população de *A. aegypti* (REGIS *et al.*, 2009).

2.3 Controle vetorial e levantamento de índices

A vigilância vetorial da dengue é importante para determinar onde e quando aplicar as ações de controle. O sistema de vigilância entomológica, apto para gerar informações quantitativas da densidade populacional do mosquito e ajudar a prever o crescimento populacional explosivo, é essencial para difundir ações que possam prevenir novas epidemias (REGIS *et al.*, 2009).

A ocorrência de epidemias de febre amarela levou ao combate do *A. aegypti* a partir de campanhas de erradicação em 1904. A espécie foi erradicada em 1955, voltando a ser detectada em 1967 no estado do Pará. Em 1973 ocorreu pela segunda vez sua erradicação. Em 1976 foi novamente detectado em Salvador, disseminando-se para outros estados como o Rio Grande do Norte e o Rio de Janeiro, não sendo mais possível sua eliminação total no país (TAUIL, 2002). Desde então nenhuma campanha foi eficaz na erradicação nem pôde conter seu avanço, em áreas no território nacional. Hoje a espécie é encontrada em todos os estados brasileiros, inclusive no Distrito Federal (CÔNSOLI; OLIVEIRA, 1994)

Desde o início dos anos 70, a Organização Mundial da Saúde (OMS) está envolvida, de maneira bastante ativa, no desenvolvimento e na promoção de estratégias de tratamento e controle vetorial como forma de eliminar a transmissão do DENV e, por conseguinte, da ocorrência da dengue em todo o mundo. Em 1996, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil propôs o Programa de Erradicação do *A. aegypti* (PEAa). Este programa foi uma estratégia comum aos programas de controle de doenças transmitidas por vetor em todo o mundo, contudo mostrou-se absolutamente incapaz de responder à complexidade epidemiológica da dengue. Em 2002, o MS implantou o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), com o objetivo de intensificar o conjunto de ações que vinham sendo realizadas e outras a serem implantadas. O PNCD é um sistema que fornece índices de maneira rápida e oportuna permitindo ao gestor do programa o direcionamento das ações de controle para as áreas apontadas como críticas, o que permitiu melhor organização do sistema de combate a dengue, com o objetivo de reduzir o impacto da doença no Brasil.

Com a municipalização dos serviços de saúde, de um modo geral a vigilância entomológica passou a ser de responsabilidade dos municípios através de órgãos tais como os CCZs. Conforme estabelecido pelo PNCD, algumas cidades do Brasil, capitais e municípios de regiões metropolitanas, municípios com mais de 100 mil habitantes e municípios com grande fluxo de turistas e de fronteira incluindo Salvador, capital do Estado da Bahia, vêm sendo monitoradas trimestralmente para o Levantamento Rápido de Índice para *A. aegypti* (LIRAA). Durante a realização do LIRAA, um grande número de ACEs e técnicos coletam dados larvários de forma sistemática e periódica.

Os dados consolidados do LIRAA produzem os índices de infestação predial (IIP) e índice de Breteau (IB) e por tipo de recipiente (ITR) para *A. aegypti* que auxiliam ao PNCD na avaliação do Programa. Os índices estimam de forma diferente a densidade larvária de *A. aegypti* e suas mensurações são feitas em uma amostra probabilística dos imóveis existentes na área urbana dos municípios infestados.

Os índices são calculados da seguinte forma:

IIP - relação entre o número de imóveis positivos e o número de imóveis pesquisados, assim: $IIP = \frac{\text{imóveis positivos}}{\text{imóveis pesquisados}} \times 100$;

IB - relação entre o número de recipientes (criadouros) positivos e número de imóveis pesquisados, assim: $IB = \frac{\text{criadouros positivos}}{\text{imóveis pesquisados}} \times 100$;

ITR - relação entre o número de recipientes positivos de um determinado tipo "x" e o número de recipientes positivos, assim: $ITR = \frac{\text{recipientes positivos "x"}}{\text{total de recipientes positivos}} \times 100$, onde "x" = tipo de recipiente (BRASIL, 2005).

Os parâmetros para a análise do IIP são classificados como condição satisfatória quando o IIP é inferior a 1%, situação de alerta quando o IIP está entre 1 e 3,9% e situação de risco de surto quando o IIP está acima de 3,9% (BRASIL, 2005).

O delineamento da amostragem para cada município é determinado em função de sua densidade populacional e do número de imóveis existentes. Em municípios de grande porte, como no caso de Salvador-Ba, é adotada amostragem por conglomerados em dois estágios: quarteirões e imóveis. O município é dividido em estratos, cada um com o mínimo de 8.100 imóveis e o máximo de 12.000 imóveis, independente dos bairros onde estão localizados. Essa estratificação possibilita um maior detalhamento dos indicadores, permitindo priorizar ações de controle para áreas de maior risco dentro do município de Salvador-Ba (BRASIL, 2005).

Apesar do combate recorrente ao mosquito, dados consolidados pelo CCZ da SMS de Salvador-BA (CCZ-SMS Salvador-BA) demonstram uma flutuação ao longo do tempo sem uma correlação clara com as taxas de incidência anual de dengue, como demonstrado na Figura 3. Sendo que estes índices médios não refletem o que ocorrem em certas áreas da cidade de Salvador, como alguns resultados do 3º ciclo do LIRAA realizado em 2008, que revelaram IIP de até 14,5%. Teixeira e colaboradores demonstraram que um IIP superior a 3% em Salvador já corresponde

à taxa de incidência máxima, que se torna constante. Os autores defendem que o controle da circulação viral só é possível quando se alcança um nível de infestação muito próximo de zero (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado em Recife, foi visto que flutuações na densidade populacional do mosquito são comuns ao longo do tempo, entretanto foi observado também que existem áreas onde a infestação vetorial é constantemente elevada (REGIS *et al.*, 2008). Este fenômeno pode ser explicado pela existência de caixas d'água abertas, coleta irregular de lixo, intermitência de distribuição de água, entre outras situações decorrentes de ações antrópicas no ambiente.

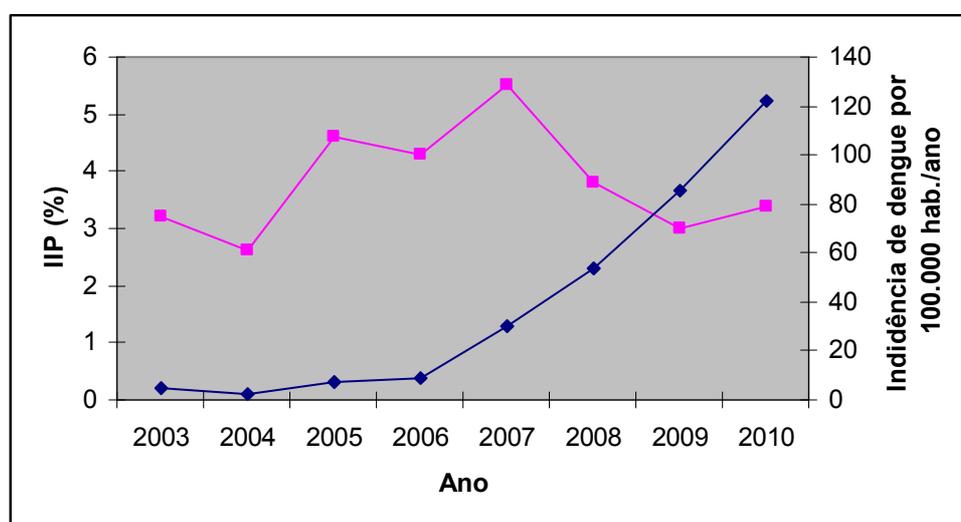


Figura 3. Índice de infestação predial (IIP%) e incidência da dengue por 100.000 hab. em Salvador (CCZ e DIVEP/SESAB).

No Brasil, uma atualização dos resultados do LIRAA em 2010, revela que, a maioria dos municípios do Sudeste, Centro-Oeste e Sul estão com índices satisfatórios. O oposto ocorre nos municípios das regiões Norte e Nordeste, onde a maioria está em situação de alerta (BRASIL, 2010a).

Nos municípios da região do Nordeste, que realizaram o LIRAA em 2010, cerca de 25% registraram índice de infestação predial satisfatório, 57,8% estavam em estado de alerta e 17,7% estavam em risco de surto, revelando uma leve diminuição da quantidade de municípios em estado satisfatório e de alerta quando comparado ao ano de 2009, e um aumento com relação ao risco de surto (8,7% dos municípios em 2009) (BRASIL, 2010b).

No estado da Bahia, em 2010, o LIRAA nacional foi realizado em 13 municípios prioritários. Dentre eles, três registraram índice de infestação predial satisfatório (Juazeiro, Lauro de Freitas e Vitória da Conquista), sete municípios estavam em situação de alerta (Alagoinhas, Camaçari, Feira de Santana, Jequié, Porto Seguro, Salvador e Teixeira de Freitas) e três em situação de risco de surto (Itabuna, Ilhéus e Simões Filho) (SESAB, 2011).

O município de Salvador vem realizando LIRAA desde 2003. Os IIP no município foram crescentes até 2007 quando a Secretaria Municipal de Saúde conseguiu contratar um maior número de ACEs e regularizar a rotina de tratamento e eliminação de criadouros no município (Figura 3). A partir daí o IIP vem apresentando uma tendência de redução, entretanto, o IIP em 2009 foi de aproximadamente 3%, que indica uma condição de alerta para dengue (CCZ/SEVTV/PMCD, 2009). Os primeiros dados de 2010 revelam um IIP de 3,2%. Apesar desses resultados não serem compatíveis com a incidência da dengue em Salvador nesse mesmo período (Figura 3), a elevada magnitude da transmissão da dengue requer atenção especial para a regularidade das ações de combate ao vetor, realizadas pelos municípios.

O principal tipo de criadouro do *A. aegypti* no Estado da Bahia foi representado pelos reservatórios utilizados para armazenamento de água ao nível do solo, que é explicado pela intermitência na distribuição de água nos municípios e a necessidade da população em armazenar água. Este tipo de criadouro possui grande capacidade de produção de larvas de *A. aegypti*, que pode manter o risco de epidemias em 2011 (SESAB, 2011).

Assim, a situação epidemiológica da dengue vem piorando pela deterioração do sistema de saúde e dos programas de controle do mosquito na maioria dos países endêmicos. Concomitantemente, o crescimento da população humana e os desequilíbrios por ela causados, por exemplo, o acúmulo de lixo produzido nas cidades, vem suprindo o mosquito vetor de condições ideais para sua proliferação, particularmente nos meses chuvosos do ano (CLARO, 2004). Contudo o controle do vetor ainda é uma estratégia possível, todavia novas abordagens devem ser desenvolvidas.

2.4 Marcadores genéticos

Nos últimos anos, ampliou-se a expectativa de que estratégias baseadas na genética de populações do *A. aegypti* e georreferenciamento possam apoiar os programas de combate ao *A. aegypti* (EISEN; LOZANO-FUENTES, 2009). Através da análise de marcadores genéticos é possível identificar sub-populações do *A. aegypti* no espaço urbano e avaliar a estabilidade genética destas sub-populações (OLIVEIRA; ARAGÃO, 1995). Conforme os resultados obtidos, seria possível rastrear minuciosamente os padrões de migração destas sub-populações na área, sua adaptação ecológica, o efeito do tratamento sobre a diversidade genética, os índices de infestação, a fertilidade e os níveis de resistência aos inseticidas aplicados. Estas características podem revelar como a pressão seletiva sobre o mosquito pode influenciar na transmissão do DENV e no surgimento de casos novos da doença (OCAMPO; WESSON, 2004). Em última análise, podem-se associar os padrões da doença a uma maior capacidade de transmissão do vírus pelo *A. aegypti*. Portanto, a análise molecular do *A. aegypti* é extremamente útil para testar hipóteses sobre a ecologia do vetor, a epidemiologia da doença e sobre as medidas de controle vetorial adotados atualmente.

Existe um elevado número de marcadores genéticos que vem sendo utilizados para estudos de genética de populações. Entre eles, destacam-se as isoenzimas (FRAGA, 2003), os polimorfismos localizados em DNA mitocondrial (DNAMt) (HERRERA et al., 2006), o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (AYRES et al., 2003) e as SSR (sequências simples repetitivas) (CHAMBERS et al., 2007). A análise destes marcadores tem facilitado tais estudos, porque permitem, em um curto espaço de tempo, analisar um número praticamente ilimitado de marcas de evolução neutra que podem caracterizar populações e indivíduos em uma área geográfica. A escolha do tipo de marcador a ser utilizado depende de vários fatores como a tecnologia disponível, o custo, a confiabilidade e o número de informações geradas.

Um dos trabalhos pioneiros com uso de marcadores isoenzimáticos em mosquitos foi realizado em Liverpool (TOWNSON, 1969). O uso de marcadores isoenzimáticos também foi importante na caracterização e diferenciação genética entre duas subespécies: *A. aegypti formosus* e *A. aegypti aegypti* (POWELL; TABACHNICK; ARNOLD, 1980; SCOTT; MCCLELLAND, 1975; TABACHNICK; POWELL, 1978; WALLIS; TABACHNICK, 1990; WALLIS; TABACHNICK; POWELL,

1983). Apesar da grande quantidade de marcadores existentes atualmente, os marcadores isoenzimáticos ainda são utilizados para inferir variabilidade genética de populações de mosquito, entre eles o *A. aegypti* (FRAGA, 2003). Paupy e colaboradores (2000) revelou que as duas populações das ilhas Tahiti e Moorea na Polinésia Francesa encontram-se estruturadas geneticamente e que tal estruturação está ligada diretamente à densidade populacional humana e as características ecológicas da espécie (PAUPY *et al.*, 2000). Porém, quando a investigação requer uma cobertura mais ampla do genoma, as isoenzimas apresentam limitações quanto ao número total de *locus* que podem ser detectados no genoma e ao número de alelos por *locus*, isto é, o nível de polimorfismo genético detectável ou poder discriminatório de cada *locus* (CASTIGLIONE, 2003)

O DNA mitocondrial (DNAm) tem sido extensivamente utilizado como marcador molecular em estudos de genética de populações, tais como fluxo gênico, tamanho efetivo da população e história evolutiva entre indivíduos, espécies e populações devido a características peculiares como a herança uniparental (materna), ausência de recombinação genética e as altas taxas evolutivas quando comparado com o genoma nuclear, assim como, à facilidade em isolá-lo, ao grande número de cópias por células, seu tamanho pequeno, sua organização simples (MEYER, 1993; VIANA, 2005). Diversos autores têm realizado estudos de genética de populações para *A. aegypti* utilizando o DNAm e observaram uma significativa diferenciação entre as populações e fortes evidências para um isolamento genético correlacionando com a distância geográfica entre as populações (HERRERA *et al.*, 2006). De qualquer forma, o padrão de herança não mendeliano deste marcador reduz seu valor informativo e a localização extra-cromossomal impede seu uso como marcador molecular para estudos de linhagem (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Outro marcador muito utilizado é o RAPD, que na verdade, é basicamente uma variação do protocolo da reação em cadeia da polimerase (PCR), onde o padrão de bandas produzido determina uma espécie de impressão digital do DNA do organismo (“DNA *fingerprinting*”). Dentre os diversos trabalhos que utilizaram o RAPD em populações de *A. aegypti*, destaca-se um extensivo estudo que avaliou a diversidade genética de populações de *A. aegypti* de cinco estados brasileiros. Os *loci* analisados revelaram elevado polimorfismo e diferenciações genéticas entre as populações deste vetor no Brasil (AYRES *et al.*, 2003). Pelo fato do método não requerer nenhum alvo específico, tornou-se popular em vários estudos, sobretudo

quando pouca ou nenhuma informação genética sobre o organismo estudado é conhecida. Neste método, a qualidade do DNA é fundamental para a reprodutibilidade dos resultados. Amostras de DNA degradadas ou quebras cromossômicas podem determinar variações indesejáveis no método. Além disso, o poder discriminatório do RAPD é menor que o de outros marcadores, tais como, os marcadores SSR. Diferentes padrões de variabilidade entre as classes de marcadores moleculares refletem um balanço entre o índice mutacional dos genes e os processos populacionais como fluxo genético.

Os marcadores SSR, também chamados de *Sequence Tagged Microsatellites* (STMS) ou *Single Sequence Length Polymorphisms* (SSLP), são sequências genômicas caracterizadas por um número variável de curtas repetições nucleotídicas (2-6 nucleotídeos cada), em *tandem*, os quais são amplamente distribuídos no genoma ou segmentos específicos de DNA que podem ou não representar um gene, onde as sequências podem diferir em números repetidos entre diferentes indivíduos e tem sido uma ferramenta efetiva para a detecção de estruturas genéticas em escalas de espaço limitado (LOUGHEED *et al.*, 2000). Sua taxa de mutação elevada varia de 10^{-6} a 10^{-2} por geração, sendo assim, mais significativa do que a taxa de substituição de bases (SCHLOTTERER, 2000). Apesar de suas altas taxas evolutivas, estas sequências são conservadas em suas regiões flangeadoras e podem persistir por um longo período sem modificações. A taxa de mutação é muito mais frequente em regiões de DNA repetitivo, do que em outras regiões, isso explica o fato dos marcadores SSR serem tão polimórficos.

Com o advento da tecnologia da PCR, essa propriedade de DNA microssatélite foi convertida em marcador genético altamente versátil, onde as regiões contendo sequências simples repetidas são amplificadas individualmente por meio da PCR, utilizando-se um par de *primers* específicos complementares as sequências únicas que flanqueiam os marcadores SSR (CHAMBERS *et al.*, 2007).

Quanto a sua estrutura molecular, os marcadores SSR podem ser: perfeitos ou puros, quando não apresentam interrupção em sua sequência de repetição (ex.: TATATATATA); interrompidos, quando possuem um par de bases ou uma pequena sequência interrompendo a série de repetição (ex.: TATATACGTCTATATATA); compostos, quando apresentam duas sequências de repetições distintas lado a lado (ex.: TATATATAGAGAGAGA).

Uma preocupação interessante da análise genética é se as conclusões derivadas de uma única classe de marcadores moleculares realmente representam o padrão de variação de um genoma (LOUGHEED *et al.*, 2000). Neste caso, os SSR apresentam características peculiares, tais como caráter polialélico e co-dominantes, promovendo maior quantidade de informação genética por *locus*. São neutros em relação a efeitos fenotípicos, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrópico, possuem alta frequência e distribuição aleatória no genoma, atributos que o tornam marcador de DNA com o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo entre os marcadores descritos previamente, além de ser o mais completo para cobertura de qualquer genoma eucariótico (CHAMBERS *et al.*, 2007; TAUTZ; RENZ, 1984).

2.5 Variabilidade genética em populações de *Aedes aegypti*

A variabilidade genética é um fenômeno biológico que ocorre naturalmente entre as populações e tem levado especialistas a desenvolver métodos para quantificar e explicar essa variabilidade em relação a sua origem, manutenção e importância para a evolução (HARTL, 1981). A variação genética entre e dentro das populações de uma espécie é mantida por mutação, deriva genética (ganho ou perda aleatória de variabilidade genética nas populações), seleção (variação na adaptabilidade de traços herdados), migração (importação ou exportação de genes entre as populações) e pelo sistema de reprodução da espécie.

Os índices de heterozigosidade e polimorfismo estimam a diversidade genética presentes nas populações naturais, enquanto que a diferenciação genética existente entre as populações pode ser medida pela estatística de F desenvolvida por Wright (1951) e suas derivações Φ_{pt} , R_{ST} e a pela medida de D de Jost (JOST, 2008), mostrando como a diversidade genética está distribuída dentro das populações. A determinação destas medidas a partir de resultados de genotipagem em marcadores SSR têm sido muito utilizadas entre populações de insetos e mosquitos vetores de doenças humanas e os fatores que controlam a estrutura genética dessas populações (ANTONIO-NKONDJIO *et al.*, 2008; GERTSCH; PAMILO; VARVIO, 1995; ZHENG *et al.*, 1996).

Alguns estudos com marcadores SSR têm sido realizados em populações de *A. aegypti*, na tentativa de conhecer melhor a dinâmica e estrutura genética de suas populações e entender os mecanismos envolvidos na capacidade vetorial dessa

espécie (BROWN et al., 2011; CHAMBERS et al., 2007; DA COSTA-RIBEIRO; LOURENCO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2006). Diversos trabalhos têm demonstrado que o genoma do *A. aegypti* é bem preenchido por marcadores SSR, adequados para genotipagem e esboço de estratégias eficientes para identificação, além de evidências de diferenciação populacional, mesmo entre distâncias geográficas relativamente curtas tanto no Haiti, quanto em Bouaké na África (LOVIN et al., 2009; RAVEL et al., 2002). Aqui no Brasil, tivemos algumas evidências da diferenciação populacional genética do *A. aegypti* envolvendo marcadores SSR no Rio de Janeiro, na Amazônia brasileira, Recife e no Paraná (DA COSTA-RIBEIRO; LOURENCO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2006; FANTINATTI, 2009; LIMA, 2007; LIMA, 2010).

As estimativas sobre o movimento das populações de mosquito fornecem informações sobre a capacidade de dispersão do vetor, permitindo a previsão do movimento de populações infectadas ou na dispersão dos genes de resistência a inseticidas químicos (MOUSSON et al., 2002). Vários estudos têm examinado a variabilidade genética presentes em diferentes populações relacionando-as com a competência vetorial do *A. aegypti* de várias regiões geográficas para arbovírus e outros patógenos (LAMBRECHTS, 2011). O entendimento do processo evolutivo que introduz e mantém a variabilidade genética de populações naturais de mosquito, especialmente com relação à definição da competência vetorial, pode ajudar na prevenção da transmissão de arboviroses (CHAPMAN et al., 1999).

Conhecer as diferenças entre as populações fornece subsídios para o controle do vetor, uma vez que cada população pode ser tratada de maneira independente. Tendo em vista a grande importância do gênero *Aedes* e fácil movimentação por meio de transporte humano, torna-se imprescindível o estudo do perfil genético de indivíduos da espécie *A. aegypti*, principalmente, em decorrência das epidemias de dengue e as dificuldades de controle, tornando-se necessários estudos relacionados ao ciclo de vida e informações genético-molecular do referido vetor (LIMA, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Avaliar parâmetros moleculares para a vigilância entomológica do *A. aegypti* como ferramenta de auxílio no trabalho de campo e ação integrada das instâncias responsáveis pelo controle da dengue a partir de estratégias inovadoras.

3.2 *Objetivos específicos*

- Apropriar informações e materiais do LIRAA e montar um sistema de georreferenciamento dos níveis de infestação vetorial em Salvador-BA;
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos marcadores e analisar a estruturação populacional do *A. aegypti* em Salvador;
- Determinar associação das sub-populações do *A. aegypti* com variáveis administrativas e ecológicas de interesse;
- Acompanhar longitudinalmente as sub-populações do *A. aegypti* buscando compreender os componentes dinâmicos da ecologia do mosquito, epidemiologia da dengue e controle vetorial.

4. METODOLOGIA

4.1 Local de estudo

Este estudo foi realizado em Salvador no período entre 2007 e 2009 e contou com amostras controles de Jacobina e Vitória da Conquista, coletadas em 2009, (Figura 4), bem como, amostras da cepa Rockefeller, (originária dos Estados Unidos e cedida pelo *Centers of Disease Control* de Porto Rico), que foram fornecidos pelo Laboratório da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Marília-SP em 2010. Em Salvador, estudamos quatro áreas de conveniência selecionadas como descritas a seguir (Figura 4).

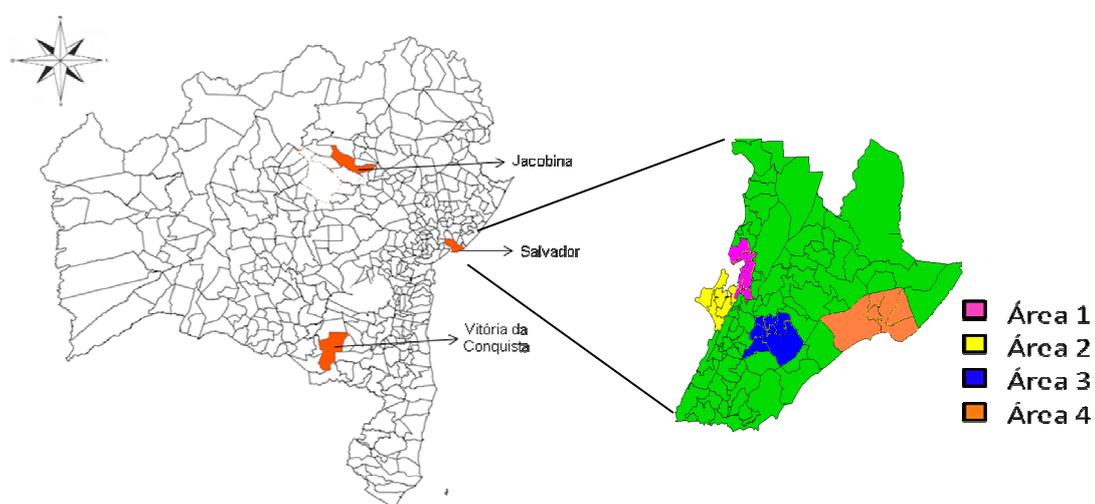


Figura 4. Áreas de coleta de larvas de *A. aegypti* no Estado da Bahia e no município de Salvador.

Entre as áreas selecionadas para o estudo em Salvador-Ba, duas foram selecionadas por estarem contíguas (áreas 1 e 2), enquanto que as outras duas foram selecionadas por estarem afastadas das áreas 1 e 2 e entre si (áreas 3 e 4). Abaixo segue uma breve caracterização de cada área:

- Área 1 - Plataforma: compreende os estratos 224, 296, 297 e 298 do LIRAa Salvador (SSa) e correspondem às áreas dos bairros de Plataforma, Lobato, São João do Cabrito, Boa Vista do Lobato, Boa Vista de São Caetano e Alto do Cabrito. Nesta região existe um importante corredor de tráfego de veículos limitado a leste pela falha geológica de Salvador que divide a cidade alta e a cidade baixa e a oeste pela baía de Todos os Santos.
- Área 2 – Itapagipe: compreende os estratos 218, 219, 220 e 221 do LIRAa SSa e correspondem às áreas dos bairros da região da Península de Itapagipe

(Uruguai, Ribeira, Mares, etc). É uma região de topografia plana, sem obstáculos naturais e edificações de até 4 pavimentos e está limitado a leste pela falha geológica de Salvador e a oeste pela baía de Todos os Santos.

- Área 3 – Tancredo Neves: compreende os estratos 272, 273, 274, 275, 276 e 277 do LIRAA SSa e correspondem às áreas dos bairros de Tancredo neves, Engomadeira, Arenoso, Novo Horizonte, São Gonçalo do Retiro, Arraial do Retiro, Estrada das Barreiras, Cabula VI e Nalandiba. Todos estes localizados no miolo central da cidade. Esta área dista de 9 Km das áreas 1 e 2 e é separada pela falha geológica de Salvador e inúmeras áreas densamente povoadas.
- Área 4 - Itapuã: compreende os estratos 263, 264, 265, 266 e 267 do LIRAA SSa e correspondem às áreas dos bairros de Itapuã, Alto do Coqueirinho, Nova Brasília e Bairro da Paz. Esta área localiza-se ao Norte da costa Atlântica da cidade, fora da baía de Todos os Santos. Esta área dista de aproximadamente 9 Km da área 3 e é separada pela Avenida Paralela e por a reserva natural do Parque de Pituacu que conta com um lago e vegetação, além inúmeras áreas densamente povoadas.

4.2 Coleta de dados e amostras

Foram incluídas neste estudo 641 larvas de *A. aegypti*, sendo 512 larvas coletadas longitudinalmente nas quatro diferentes áreas de Salvador durante a realização do 4. LIRAA 2007, 3. LIRAA 2008, 4. LIRAA 2009 e 5. LIRAA 2009 (quadro 1). Obtivemos 68 larvas controles no ano de 2009, provenientes dos municípios de Jacobina (JAC) e Vitória da Conquista (VC), localizados no interior do estado da Bahia e 44 larvas da cepa Rockfeller (ROCK), em 2010 (quadro 2).

Área	N. de larvas de <i>A. aegypti</i> por ciclo do LIRAA (período)				Total
	2007.4 (27 a 31/08)	2008.3 (20 a 24/10)	2009.4 (10 a 14/08)	2009.5 (19 a 23/10)	
1	34	29	29	26	118
2	16	42	28	31	117
3	32	36	36	42	146
4	35	34	29	33	131
Total	117	141	122	132	512

Quadro 1. Número de larvas de *A. aegypti* analisadas por ciclo do LIRAA e área, Salvador-BA, 2007 a 2009.

Controles	N. de larvas de <i>A. aegypti</i>
Jacobina (JAC)	36
Vitória da Conquista (VC)	32
Rockfeller (ROCK)	44
Total	112

Quadro 2. Número de larvas de *A. aegypti* analisadas por ciclo do LIRAA e área de outros municípios do interior do estado da Bahia, 2009, e larvas da cepa Rockfeller, 2010.

As amostras de Ssa, bem como, as amostras de JAC e VC foram coletadas pelos ACEs dos Centros de Controle de Zoonoses dos respectivos municípios seguindo-se a metodologia para o LIRAA. Resumidamente, foram realizadas visitas intra e peri-domiciliares em busca de larvas de *A. aegypti*. Conforme o número de larvas encontradas em cada criadouro, um número máximo de 10 larvas foi coletado e preservado em “tubitos” de vidro contendo álcool etílico 70%, e encaminhadas para identificação da espécie ao microscópio óptico segundo Cònsoli e Oliveira, 1994.

Uma larva de *A. aegypti* de cada tubito foi separada e congelada individualmente em freezer -70°C no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do IGM-FIOCRUZ/BA até a análise do DNA. Dados sobre a localização das larvas foram registrados a partir de formulários que acompanham cada tubito, chamados de Febre Amarela e Dengue 2 (FAD2).

4.3 Georeferenciamento das larvas

Para visualizar e mapear os padrões espaciais e longitudinais dos focos de larvas do *A. aegypti*, utilizamos o sistema de informação geográfica (SIG) do software Arcview versões 3.2 e 9.1 (ESRI, 1999). Para automatizar este processo, inicialmente, georreferenciamos as larvas no ponto médio da rua onde foram encontradas, conforme a localização contida no formulário FAD2. Posteriormente, realizamos visitas de campo com auxílio de um navegador GPS e ortofotos impressas em alta definição para localizar as casas focadas nas ruas e atualizamos o banco de dados no Arcview.

4.4 Detecção de Marcadores SSR e desenho dos primers

Sequências de marcadores SSR de *A. aegypti* foram pesquisadas no Genbank utilizando-se o programa RepeatMasker (SMIT; HUBLEY; GREEN, 1996-2010), que identifica padrões repetitivos em sequência de DNA. Os *primers* foram deduzidos das sequências flanqueadoras de cada microssatélite utilizando o programa PRIMER3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) e os seguintes parâmetros: comprimento do *primer* de 18-27 nt, teor de porcentagem de 50% para as bases G e C e uma temperatura de anelamento ideal de 60°C, com amplitude entre 45°C e 63°C. Quando possível, os *primers* foram desenhados para produzir fragmentos amplificados entre 150 e 300 pares de base (pb) (MELO, 2009).

Além dos marcadores SSR pesquisados, avaliamos outros marcadores previamente publicados na literatura (CHAMBERS *et al.*, 2007). Estes potenciais SSR foram validados por amplificação de amostras individuais de DNA de *A. aegypti* extraído de larvas da colônia de Salvador, mantida no insetário da FIOCRUZ/BA.

4.5 Extração do DNA de larvas de *A. aegypti* e genotipagem das amostras

Para a validação dos marcadores SSR, bem como, para análise das amostras do estudo, o DNA de cada larva foi isolado utilizando-se o método DNAzol® (Invitrogen, EUA) com ligeiras modificações. Cada larva de *A. aegypti* foi macerada em nitrogênio líquido em um tubo de 1,5 ml e foram adicionados 250µl do reagente DNAzol. O homogeneizado foi centrifugado por 10min. à 12.000 rpm à 4°C para sedimentação dos debris celulares. A fase sobrenadante viscosa foi transferida para um tubo novo contendo 125 µl de álcool P.A. A amostra foi misturada por inversão do tubo por alguns segundos e foi mantida no gelo por 5 min. O DNA foi precipitado do lisado/homogeneizado por centrifugação por 10min. à 12.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi removido do tubo por inversão, tomando-se cuidado para não perder o precipitado. O precipitado foi lavado pelo menos uma vez em 1 ml de etanol 75%. Durante a lavagem, o precipitado foi suspenso por inversão do tubo algumas vezes. Finalmente, a amostra foi centrifugada por 10min. à 12.000 rpm à 4°C, o sobrenadante alcoólico foi removido por inversão do tubo e o precipitado contendo o DNA foi solubilizado/hidratado em 30 µl de NaOH 8mM. A concentração final do DNA de cada amostra foi quantificada no espectrofotômetro Nanodrop-1000 (Nanodrop, EUA).

As amostras de DNA foram mantidas à -20°C até a genotipagem dos *loci* por PCR. O volume final da PCR foi de 25 μl contendo cerca de 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ do DNA, 0,5 mM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs, 1X do tampão da enzima, 5,0 % de DMSO, 1-1.5 mM de MgCl_2 e 1,5 U de enzima Taq DNA polimerase (Platinum Taq, Invitrogen, EUA). Os *primers* diretos foram marcados com diferentes cromógenos fluorescentes em sua região 5'-terminal (IRD 800, Li-Cor Inc., Lincoln, Holanda) para permitir a análise em sequenciador automatizado ABI3100 (*Applied Biosystems*; EUA) por eletroforese capilar (Figura 5).

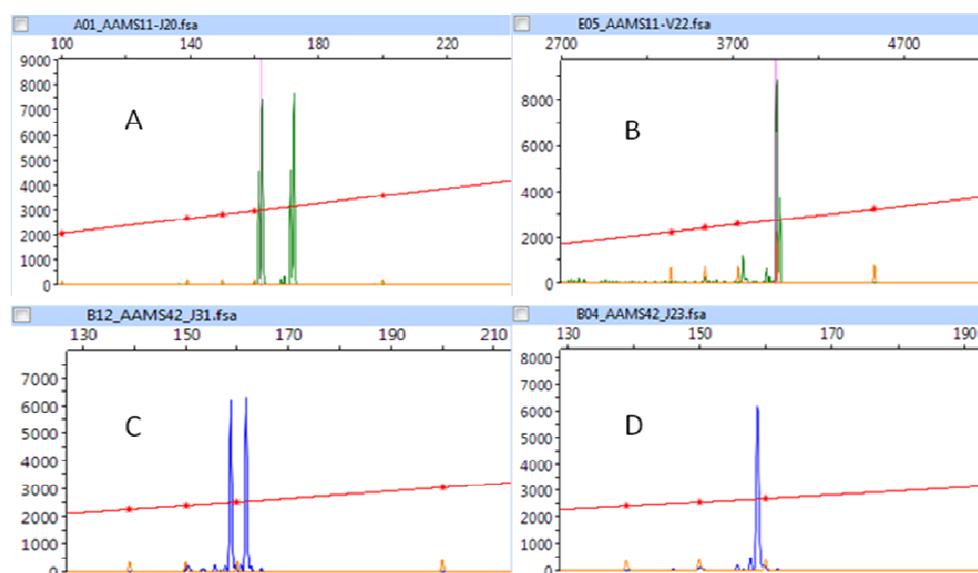


Figura 5. Eletroferograma dos alelos dos marcadores AAMS11 e AAMS42 de indivíduos heterozigotos (A e C) e homozigotos (B e D).

4.6 Sequenciamento

As amostras de indivíduos homozigotos para cada alelo foram sequenciadas para confirmar a natureza do marcador SSR e a especificidade das reações de amplificação. O sequenciamento foi realizado num sequenciador automatizado ABI3100 (*Applied Biosystems*; EUA) por eletroforese capilar na plataforma de sequenciamento do Centro de pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ).

4.7 Análise dos dados

A análise dos dados de IIP foi realizada utilizando-se o teste de χ^2 (qui-quadrado) para avaliar as proporções de imóveis infestados entre as áreas e ciclos estudados. O teste de χ^2 de tendência foi utilizado para avaliar a tendência do IIP

entre os anos de 2007 e 2009. Estas análises foram realizadas através do software estatístico EpilInfo versão 3.5.1.

As frequências alélicas, genotípicas, heterozigosidade observadas (H_o) e índice de fixação (F) por *locus* e por população foram calculados através do programa *GenAIEx* (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Alelos com frequência < 0,05 ou 5% foram considerados raros. As frequências genotípicas observadas foram comparadas com as proporções esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) pelo teste HWE disponível no programa *GenAIEx* (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Os dados da população SSa 09.5 foram utilizados para avaliar a independência entre todos os pares de *loci* através do teste de desequilíbrio de ligação disponível no programa via Web GENEPOP, opção 2, subopção 1, usando a estatística da razão de log-verossimilhança (*log likelihood ratio statistic*) (RAYMOND; ROUSETT, 1995; ROUSSET, 2008), bem como, para a análise da diferenciação populacional em nível de municípios, áreas selecionadas em Salvador e em um nível menor de agregação correspondente aos estratos trabalhados pelo CCZ (estudo transversal). A comparação entre estratos foi realizada apenas entre aqueles cujo número de larvas representantes foi igual ou superior a 10. Os pares de populações foram comparados através das frequências alélicas e genotípicas pelo programa via Web GENEPOP, opção 3, subopção 2 e 4, respectivamente (RAYMOND; ROUSETT, 1995; ROUSSET, 2008). Os valores de p foram computados pelo algoritmo da Cadeia de Markov utilizando-se os seguintes parâmetros: 1.000 dememorizações, 100 *batches* e 1.000 permutações. A estatística F de Wright (F_{ST}) e suas derivações Φ_{pt} , R_{ST} foram estimadas pelo método AMOVA, com 99 permutações, disponível no programa *GenAIEx* (PEAKALL; SMOUSE, 2006), e a medida D de Jost (JOST, 2008) pelo programa SPADE (CHAO *et al.*, 2008). Medidas de diferenciação inferiores a 0,05 indicaram pequena diferenciação, entre 0,05 e 0,15 moderada, entre 0,15 e 0,25 grande, e superiores a 0,25 muito grandes (Wright 1951; Wright 1965). Para testar significância nas comparações da diferenciação entre pares de populações utilizamos métodos, tais como o teste exato de Fisher e testes de permutação aleatória, quando disponíveis nos respectivos programas. O cálculo do tamanho efetivo das populações (N_e) que evidencia o efeito de “gargalo de garrafa” foi obtido a partir do método indireto baseado no desequilíbrio de ligação implementado no software Ne-Estimator setup (OVENDEN *et al.*, 2007).

Para avaliar padrões hierárquicos de estruturação populacional e testar a possibilidade de designar indivíduos para suas populações de origem (inferência populacional), utilizamos o método Bayesiano de agrupamento implementado no programa *structure* versão 2.3.1 (FALUSH; STEPHENS, 2007; FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2003; PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Resumidamente, utilizamos o modelo de miscigenação (*admixture model*), com os valores padrões descritos no manual do programa, mas avaliando diferentes parâmetros de corrida: “comprimento do aquecimento” (10.000 e 100.000) e repetições (10.000, 100.00 e 500.000). Para estimar o número de populações K testamos cada valor de K (1, 2, 3,..., 6) em triplicata. O valor de K mais provável foi definido a partir do valor médio máximo da função de verossimilhança $L(K)$ e também pelo método de ΔK descrito em outra publicação (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

Para avaliar a diferenciação genética longitudinal entre as áreas selecionadas de Salvador, utilizamos as frequências alélicas dos marcadores, as medidas de diferenciação populacional e o cálculo do tamanho efetivo das populações (N_e). O alelo de menor frequência não raro foi tomado como referência.

5. RESULTADOS

5.1 Georeferenciamento dos focos do *A. aegypti* e IIP das áreas selecionadas

Todos os locais com focos, ou seja, que continham criadouros positivos para larvas de *A. aegypti*, em Salvador, durante o período de 2007 a 2009, foram georeferenciadas (Figura 6). A Figura 6 apresenta os locais com focos de larvas de *A. aegypti* identificados durante a realização do LIRAA em Salvador nos ciclos 2007.4, 2008.3, 2009.4 e 2009.5 e destaca as áreas selecionadas para o estudo.

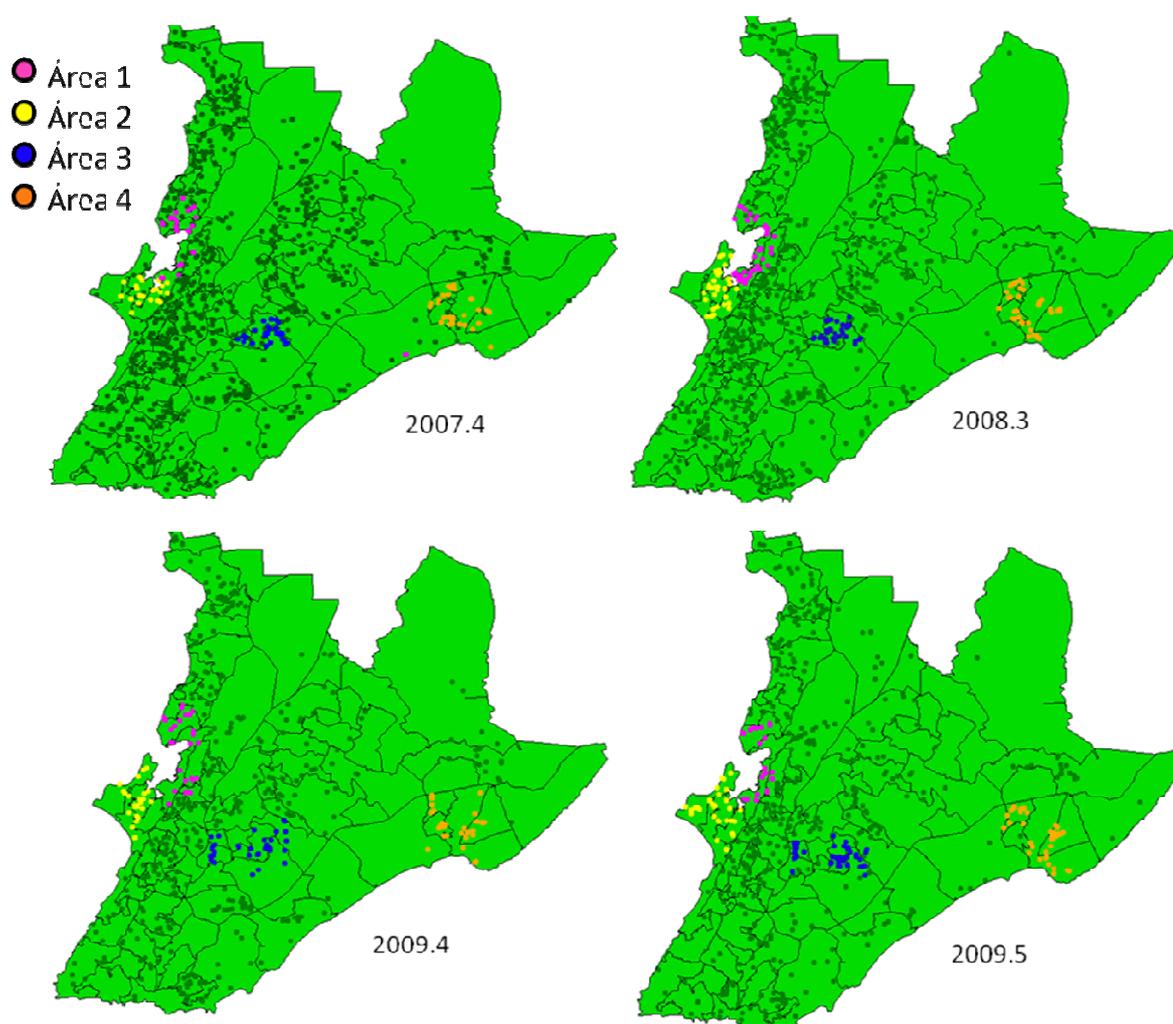


Figura 6. Locais com focos de larvas de *Aedes aegypti* georeferenciadas em Salvador e das áreas de estudo durante o 4. LIRAA 2007, 3. LIRAA 2008, 4. LIRAA 2009 e 5. LIRAA 2009.

A média global do IIP nas áreas em todo o período foi de 3,7%, sendo significativamente maior apenas na área 1, cujo IIP foi igual a 5,5%, quando comparado com as demais áreas ($p < 0,05$) (Tabela 1). O IIP médio por ciclo

apresentou uma tendência de redução nas áreas 1, 3 e 4 ($p < 0,05$; X^2 de tendência), que não foi observado na área 2. Em termos globais, pode-se verificar uma tendência de redução do IIP médio por ciclo (Figura 7).

Tabela 1. Índice de infestação predial (IIP, %), médio por ciclo do LIRAA e área selecionada.

Área	IIP médio por ciclo (período) e por área (%)				Média global IIP (%) por área	X^2 tendência Valor de p
	2007.4 (27 a 31/08)	2008.3 (20 a 24/10)	2009.4 (10 a 14/08)	2009.5 (19 a 23/10)		
1	7,7	9,9	2,2	2,5	5,5 [‡]	*
2	4,0	4,1	2,7	3,5	3,6	ns
3	5,3	2,9	1,8	3,2	3,3	*
4	4,4	3,6	2,0	2,2	3,1	*
Média global IIP (%) por ciclo	5,3	4,7	2,1	2,9	3,7	*

[‡] $P < 0,05$ no teste de X^2 (qui-quadrado). * $P < 0,05$ no teste de X^2 de tendência.

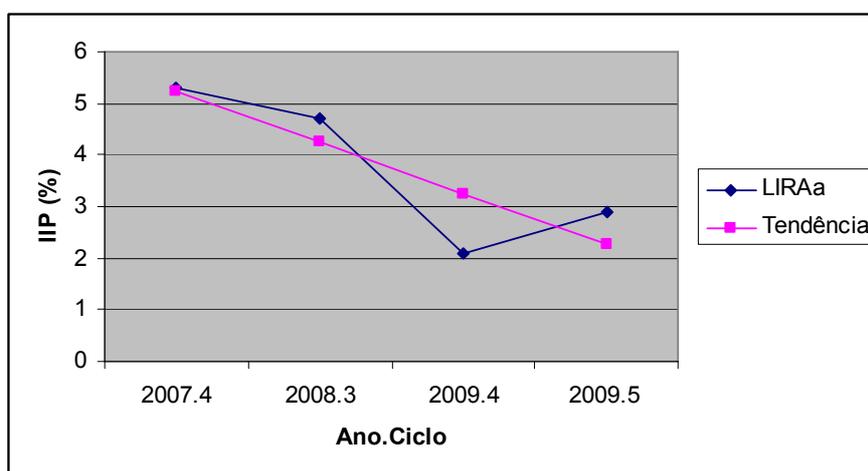


Figura 7. Tendência da média global do índice de infestação predial (IIP, %) por ciclo do LIRAA, Salvador, 2007 a 2009.

Quando comparamos a homogeneidade do IIP em cada área, estratificando os dados por estratos do LIRAA, observamos que o IIP médio variou significativamente entre 0,9% e 7,7% nas áreas 1, 3 e 4, enquanto na área 2 o IIP médio permaneceu em torno de sua média, 3,6%.

5.2 Características dos marcadores SSR

De um total de 45 potenciais marcadores SSR testados, apenas cinco apresentaram-se como *locus* único e foram polimórficos nas populações de *A. aegypti* selecionadas, quatro marcadores SSR novos AAMS11, AAMS20, AAMS31 e

AAMS42 e um H08 publicado previamente (CHAMBERS *et al.*, 2007). As características dos marcadores SSR, sequência e temperatura de anelamento dos *primers* estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados na genotipagem dos SSR de *A. aegypti* (AAMS).

<i>Locus</i> (Marcação)	Repetição (n.)	PRIMERS (5'-3')	Tamanho esperado (pb)	T _a (°C)	No. de acesso (Genbank)
AAMS11 (VIC)	CAT (6)	AAC AAC GTC CTC CAC AAC AC TTT GGA GGT CCC TGA GGA TC	175	55	cr937894a
AAMS20 (PET)	CAT (6)	GAA CAT CGC CAT CAA GC GAG ATC TAC CGA AGC GC	192	48	ay432600.1
AAMS31 (VIC)	CTT (9)	TGC TTG GAC TCT TCC GTC TT CAT TCC AAC CGT GTC AAG TG	217	55	aage02025228.1
AAMS42 (6FAM)	AAT (6)	AAG TGC TTC CGC GAG TGT AT GAG TGG AAC GAG GGT CAT TT	160	63	aage02020717.1
H08 (NED)	TCG (11)	AAA AAC CAC GAT CAC CGA AG CAT TTT CAG TGT GAT CGC GT	201	60	du169903.1

Os *loci* AAMS11, AAMS31 e AAMS42 apresentaram três alelos e os *loci* AAMS20 e H08 apresentaram quatro alelos, totalizando 17 alelos (média de 3,4 por locus). Destes, dois alelos (195 e 204) foram considerados raros devido à frequência genética menor do que 5% na população de SSa 09.5 e populações controles. Nenhum alelo privado foi encontrado nestas populações (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência alélica dos marcadores SSR por *locus* em Salvador (5. LIRAA 2009) e populações controles (N=244).

Alelo N [‡]	Frequência (%)				
	AAMS11	AAMS20	AAMS31	AAMS42	H08
155				0,057	
158				0,706	
161				0,237	
169	0,305				
175	0,638				
178	0,058				
189		0,385			
190			0,144		
192		0,494			
195		0,010			0,355
198		0,110			0,126
201					0,513
204					0,006
214			0,452		
217			0,404		

[‡] O número de amostras (N) variou conforme disponibilidade de material para genotipagem.

Tabela 5. Número de alelos (N_a), heterozigidade observada (H_o), índice de fixação (F) e teste de equilíbrio de H-W dos marcadores SSR na população de Salvador (5. LIRAA 2009) e populações controles por *locus*.

<i>Locus</i>	Parâmetros genéticos	Localidade e ciclo				Médias por <i>loci</i>
		SSa 09.5 (N=132)	JAC (N=36)	VC (N=32)	ROCK (N=44)	
AAMS11	N^{\ddagger}	131	36	32	44	60,8
	N_a	3	2	3	3	2,8
	H_o	0,389	0,417	0,500	0,364	0,4175
	F	0,169	0,134	0,056	0,095	0,091
	H-W	***	ns	ns	*	-
AAMS20	N^{\ddagger}	129	35	32	44	60,0
	N_a	4	2	4	2	3,0
	H_o	0,512	0,143	0,531	0,386	0,393
	F	0,033	0,461	0,211	-0,239	0,093
	H-W	ns	**	*	ns	-
AAMS31	N^{\ddagger}	128	36	32	43	59,8
	N_a	3	3	3	3	3,0
	H_o	0,672	0,694	0,625	0,767	0,6895
	F	-0,113	-0,101	-0,091	-0,215	-0,104
	H-W	ns	ns	ns	ns	-
AAMS42	N^{\ddagger}	125	36	25	42	57,0
	N_a	3	2	3	3	2,8
	H_o	0,336	0,417	0,280	0,524	0,3893
	F	0,218	-0,008	0,086	-0,007	0,058
	H-W	***	ns	ns	ns	-
H08	N^{\ddagger}	126	36	32	44	59,5
	N_a	4	4	4	3	3,8
	H_o	0,556	0,694	0,563	0,545	0,5895
	F	0,045	-0,135	0,009	0,024	-0,011
	H-W	ns	ns	ns	ns	-

SSa 09.5 = Salvador (5. LIRAA 2009), JAC = Jacobina, VC = Vitória da Conquista, ROCK = amostras controles da cepa Rockfeller. \ddagger O número de amostras (N) variou conforme disponibilidade de material para genotipagem. Significância para o teste de equilíbrio de H-W: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ns = não significante.

O teste de desequilíbrio de ligação para todos os pares de *loci* na população de SSa 09.5 não revelou ligação gênica entre eles (Tabela 6).

Tabela 6. Desequilíbrio de ligação para cada par de *locus* para população de Salvador (5. LIRAA 2009).

Pares de <i>loci</i>		X^2	g.l.	Valor de p
AAMS11	AAMS20	6.352997	8	ns
AAMS11	AAMS31	6.254438	8	ns
AAMS20	AAMS31	6.801978	8	ns
AAMS11	AAMS42	6.082792	8	ns
AAMS20	AAMS42	3.930945	8	ns
AAMS31	AAMS42	3.077587	8	ns
AAMS11	H08	2.901375	8	ns
AAMS20	H08	8.258425	8	ns
AAMS31	H08	3.109206	8	ns
AAMS42	H08	3.953928	8	ns

g.l. = grau de liberdade. ns = não significante.

5.3 Medidas de diferenciação populacional

As medidas de diferenciação populacional (frequência alélica, frequência genotípica, F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} , medida D) foram aplicadas para cada par de populações sobre todos os *loci* em nível de município, áreas e estratos em SSa 09.5.

5.3.1 Populações dos municípios

A diferenciação populacional avaliada pela frequência alélica (Tabela 7) e genotípica (Tabela 8) para cada par de populações em nível de município sobre todos os *loci* revelaram diferenças significantes ($p < 0,05$) entre todos os pares de populações.

Tabela 7. Diferenciação alélica para cada par de populações em nível de município sobre todos os *loci* (método de Fisher).

População	SSa 09.5 (N=132)	JAC (N=36)	VC (N=32)	ROCK (N=44)
SSa	-	**	***	***
JAC		-	***	***
VC			-	***
ROCK				-

SSa 09.5 = Salvador (5. LIRAA 2009), JAC = Jacobina, VC = Vitória da Conquista, ROCK = amostras controles da cepa Rockfeller. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Tabela 8. Diferenciação genotípica para cada par de populações em nível de município sobre todos os *loci* (método de Fisher).

População	SSa 09.5 (N=132)	JAC (N=36)	VC (N=32)	ROCK (N=44)
SSa	-	**	***	***
JAC		-	***	***
VC			-	***
ROCK				-

SSa 09.5 = Salvador (5. LIRAA 2009), JAC = Jacobina, VC = Vitória da Conquista, ROCK = amostras controles da cepa Rockfeller. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Também foi possível identificar diferenciação populacional entre todas as populações em nível de município quando comparadas pelo F_{ST} e suas derivações, exceto para o R_{ST} . De acordo com a classificação de Wright, as medidas de diferenciação F_{ST} e Φ_{pt} entre os municípios da Bahia foram pequenas a moderadas, enquanto as medidas de diferenciação pelos mesmos estimadores entre os municípios da Bahia e Rockfeller foram moderadas a muito grandes. A população de *A. aegypti* de SSa 09.5 e Jacobina (JAC) apresentaram medidas de diferenciação menores que as observadas em relação à população de Vitória da Conquista (VC),

que pode demonstrar uma maior distância genética entre estas populações (Tabela 9).

Tabela 9. Diferentes medidas de diferenciação populacional (F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} e medida D) para análise das populações controles e de Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os *loci*.

População 1	População 2	F_{ST}^a		Φ_{pt}^a		R_{ST}^a		Medida D^b	
		Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
SSa 09.5	JAC	0,014	*	0,025	*	0,002	ns	0,017	nd
SSa 09.5	VC	0,033	*	<u>0,056</u>	*	<u>0,061</u>	*	0,044	nd
JAC	VC	0,068	*	<u>0,116</u>	*	<u>0,173</u>	*	<u>0,073</u>	nd
SSa 09.5	ROCK	<u>0,131</u>	*	<u>0,214</u>	*	0,000	ns	<u>0,151</u>	nd
JAC	ROCK	<u>0,218</u>	*	<u>0,355</u>	*	<u>0,100</u>	ns	<u>0,213</u>	nd
VC	ROCK	<u>0,153</u>	*	<u>0,252</u>	*	<u>0,089</u>	*	<u>0,194</u>	nd

SSa 09.5 = Salvador, JAC = Jacobina, VC = Vitória da Conquista, ROCK = amostras controles da cepa Rockefeller.

Medidas de diferenciação moderadas, grandes e muito grandes foram sublinhadas.

^a Para o teste estatístico foram utilizadas 99 permutações, porém os resultados não diferiram em simulações com 999 e 9.999 permutações. * $P < 0,05$, ns = não significante.

^b Para o teste estatístico foram utilizadas 200 replicas. nd = não determinado.

5.3.2 Áreas selecionadas em Salvador (5. LIRAA 2009)

A diferenciação populacional avaliada pela frequência alélica (Tabela 10) e genotípica (Tabela 11) para cada par de populações das áreas selecionadas sobre todos os *loci* revelaram diferenças significantes ($p < 0,05$) apenas entre as áreas 1 (Plataforma) e 4 (Itapuã) e as áreas 2 (Itapagipe) e 4 (Itapuã).

Tabela 10. Diferenciação alélica para cada par de populações das áreas selecionadas em Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os *loci* (método de Fisher).

População	Área 1 (N=26)	Área 2 (N=31)	Área 3 (N=42)	Área 4 (N=33)
SSa 09.5				
Área 1	-	ns	ns	**
Área 2		-	ns	**
Área 3			-	ns
Área 4				-

** $P < 0,01$, ns = não significante.

Tabela 11. Diferenciação genotípica para cada par de populações das áreas selecionadas em Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os *loci* (método de Fisher).

População	Área 1 (N=26)	Área 2 (N=31)	Área 3 (N=42)	Área 4 (N=33)
SSa 09.5				
Área 1	-	ns	ns	*
Área 2		-	ns	*
Área 3			-	ns
Área 4				-

* $P < 0,05$, ns = não significante.

A diferenciação populacional medida pelo F_{ST} e suas derivação (Φ_{pt} , R_{ST} , medida D) apresentaram resultados variáveis, e apesar de significantes, a maioria das medidas de diferenciação populacional foi pequena. Contudo, foram capazes de diferenciar a área 2 (Itapagipe) das áreas 1, 3 e 4 (Plataforma, Tancredo Neves e Itapuã), com diferenciações moderadas evidenciadas apenas pelo R_{ST} . Observaram-se também diferenças pequenas a moderadas entre as áreas 1 e 4 (Plataforma, Itapuã), e diferenças pequenas entre as áreas 3 e 4 (Tancredo Neves e Itapuã). Todavia, as medidas não foram capazes de identificar diferenças entre as áreas 1 e 3 (Plataforma e Tancredo Neves) (Tabela 12).

Tabela 12. Diferentes medidas de diferenciação populacional (F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} e medida D) para análise das quatro áreas da população de Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os loci.

População 1	População 2	F_{ST}^a		Φ_{pt}^a		R_{ST}^a		Medida D^b	
		Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
Área 1	Área 2	0,020	*	0,032	0,05	<u>0,097</u>	*	0,012	nd
Área 1	Área 3	0,000	ns	0,000	ns	0,000	ns	0,002	nd
Área 1	Área 4	0,033	*	<u>0,060</u>	*	0,000	ns	0,038	nd
Área 2	Área 3	0,017	*	0,029	0,05	<u>0,109</u>	*	0,006	nd
Área 2	Área 4	0,031	*	0,049	*	<u>0,079</u>	*	0,033	nd
Área 3	Área 4	0,013	*	0,025	ns	0,000	ns	0,019	nd

Área 1 = Plataforma, Área 2 = Itapagipe, Área 3 = Tancredo Neves, Área 4 = Itapuã.

Medidas de diferenciação moderadas foram sublinhadas.

^a Para o teste estatístico foram utilizadas 99 permutações, porém os resultados não diferiram em simulações com 999 e 9.999 permutações. * $P < 0,05$, ns = não significativa.

^b Para o teste estatístico foram utilizadas 200 replicas. nd = não determinado.

5.3.3 Estratos das áreas selecionadas em Salvador (5. LIRAA 2009)

Conforme o critério adotado para análise em nível de estratos (número de larvas representadas ≥ 10), apenas dois estratos de cada área foram analisados (Figura 8).

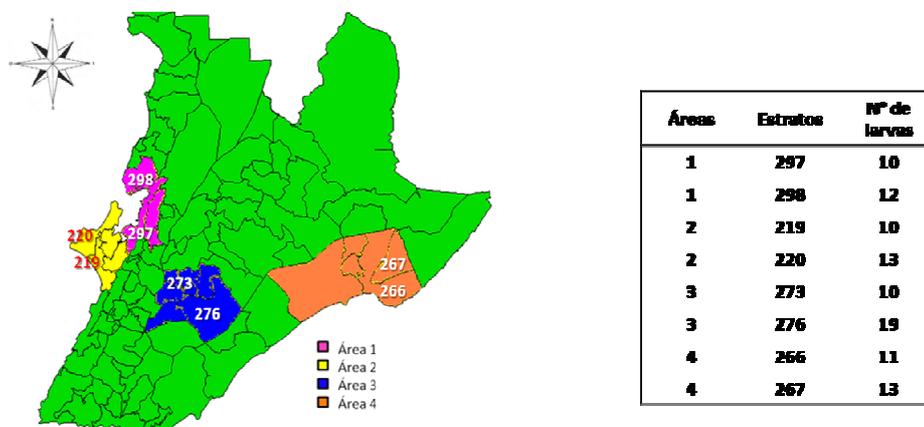


Figura 8. Número de larvas de *A. aegypti* coletas por estrato e área no município de Salvador (5. LIRAA 2009).

A diferenciação populacional avaliada pela frequência alélica e genotípica, para cada par de populações em nível de estratos das áreas selecionadas em SSa 09.5, sobre todos os *loci*, não revelou diferenças significantes ($p < 0,05$) (resultados não apresentados). A diferenciação populacional medida pelo F_{ST} e suas derivações (Φ_{pt} , R_{ST} , medida D) apresentaram resultados variáveis, com diferenciações de pequenas a muito grandes, principalmente, pela medida do R_{ST} (Tabela 13).

Tabela 13. Diferentes medidas de diferenciação populacional (F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} e medida D) para análise dos diferentes estratos das áreas selecionadas na população de Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os *loci*.

População 1	População 2	F_{ST}^a		Φ_{pt}^a		R_{ST}^a		Medida D ^b	
		Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
297	298	0,000	ns	0,000	ns	<u>0,082</u>	ns	0,000	nd
297	219	0,023	ns	0,036	ns	<u>0,165</u>	*	0,015	nd
298	219	0,024	ns	0,041	ns	<u>0,192</u>	*	0,015	nd
297	220	0,005	ns	0,007	ns	<u>0,064</u>	ns	0,005	nd
298	220	0,003	ns	0,005	ns	<u>0,079</u>	ns	0,004	nd
219	220	0,000	ns	0,000	ns	0,000	ns	0,034	nd
297	273	0,000	ns	0,000	ns	<u>0,100</u>	*	0,008	nd
298	273	0,000	ns	0,000	ns	0,000	ns	0,006	nd
219	273	0,017	ns	0,030	ns	<u>0,161</u>	*	0,042	nd
220	273	0,000	ns	0,000	ns	<u>0,058</u>	*	0,010	nd
297	276	0,000	ns	0,000	ns	<u>0,089</u>	ns	0,002	nd
298	276	0,000	ns	0,000	ns	0,000	ns	0,000	nd
219	276	0,033	ns	<u>0,060</u>	ns	<u>0,283</u>	*	0,016	nd
220	276	0,022	ns	0,039	ns	<u>0,131</u>	*	0,010	nd
273	276	0,000	ns	0,000	ns	0,000	ns	0,001	nd
297	266	0,003	ns	0,005	ns	0,012	ns	0,019	nd
298	266	0,005	ns	0,010	ns	0,027	ns	0,016	nd
219	266	0,026	ns	0,043	ns	<u>0,183</u>	*	0,041	nd
220	266	0,028	ns	0,045	ns	0,071	*	0,042	nd
273	266	0,000	ns	0,000	ns	0,018	ns	0,000	nd
276	266	0,000	ns	0,000	ns	0,037	ns	0,005	nd
297	267	0,014	ns	0,024	ns	0,000	ns	0,025	nd
298	267	0,012	ns	0,023	ns	0,000	ns	0,020	nd
219	267	0,031	ns	<u>0,052</u>	ns	<u>0,086</u>	ns	<u>0,064</u>	nd
220	267	0,019	ns	0,031	ns	0,031	ns	0,033	nd
273	267	0,000	ns	0,000	ns	0,000	ns	0,000	nd
276	267	0,002	ns	0,005	ns	0,021	ns	0,010	nd
266	267	0,000	ns	0,000	ns	0,002	ns	0,002	nd

Medidas de diferenciação moderadas foram sublinhadas. Rosa – área 1 (Plataforma); Amarelo – área 2 (Itapagipe); Azul – área 3 (Tancredo Neves); Laranja – área 4 (Itapuã).

^a Para o teste estatístico foram utilizadas 99 permutações, porém os resultados não diferiram em simulações com 999 e 9.999 permutações. * $P < 0,05$, ns = não significativa.

^b Para o teste estatístico foram utilizadas 200 replicas. nd = não determinado.

Entre estratos contíguos de uma mesma área (representados por cores iguais), apenas na área 1 encontramos diferenciação populacional moderada. Nas demais áreas, os estratos contíguos não apresentaram diferenciação populacional significativa (Tabela 13).

Entre estratos afastados geograficamente, o R_{ST} demonstrou diferenciação de moderada a muito grande entre todos os estratos das áreas 1 (297 e 298) e 2 (210 e 220). Apenas a população do estrato 297 apresenta diferenciação moderada, quando comparadas com as populações dos estratos da área 3 (273 e 276). Os estratos da área 2 (219 e 220) também diferenciaram dos estratos das áreas 3 e 4 (Tabela 13). No entanto, não foi demonstrada diferenciação em nível de estrato entre as áreas 1 (297 e 298), 3 (273 e 276) e 4 (266 e 267).

5.4 Tamanho efetivo da população

5.4.1 Entre populações dos municípios

Houve uma grande diferença do N_e entre a população de Salvador e as populações controle. A população de SSa 09.5 apresentou resultados para N_e infinito, indicando uma grande variabilidade genética, enquanto as populações controle demonstraram valores de N_e mais baixos. O menor valor de N_e foi encontrado na população controle de Rockefeller (Tabela 14).

Tabela 14. Tamanho efetivo populacional (N_e) para análise das populações controles e de Salvador (5. LIRAa 2009).

População Municípios	N_e	IC 95%
SSa 09.5	∞	∞
JAC	30,7	11,7 – 921,2
VIC	15,2	8,4 – 34,1
ROCK	11,8	6,8 – 21,8

IC 95% = intervalo de confiança 95%. ∞ = infinito.

5.4.2 Entre as áreas selecionadas em Salvador, 5. LIRAa 2009

O N_e foi computado também para as áreas de SSa 09.5. Apesar de Salvador ter apresentado um N_e infinito, a área 2 apresentou N_e igual a 30,3 que pode significar o efeito de gargalo de garrafa nesta área (Tabela 15).

Tabela15. Tamanho efetivo populacional (N_e) para análise das quatro áreas da população de Salvador (5. LIRAa 2009).

População Municípios	N_e	IC 95%
Área 1	∞	∞
Área 2	30,3	11,0 - ∞
Área 3	∞	∞
Área 4	∞	∞

IC 95% = intervalo de confiança. ∞ = infinito.

5.5 Inferência populacional

Análises preliminares foram realizadas no programa *structure* para testar as condições de corrida utilizando-se os dados em nível de municípios.

Em nível de municípios, encontramos $K=3$ sempre que utilizamos número de repetições igual a 10.000 e $K=2$ quando utilizamos número de repetições maiores, independentemente do comprimento de aquecimento escolhido (Figura 9).

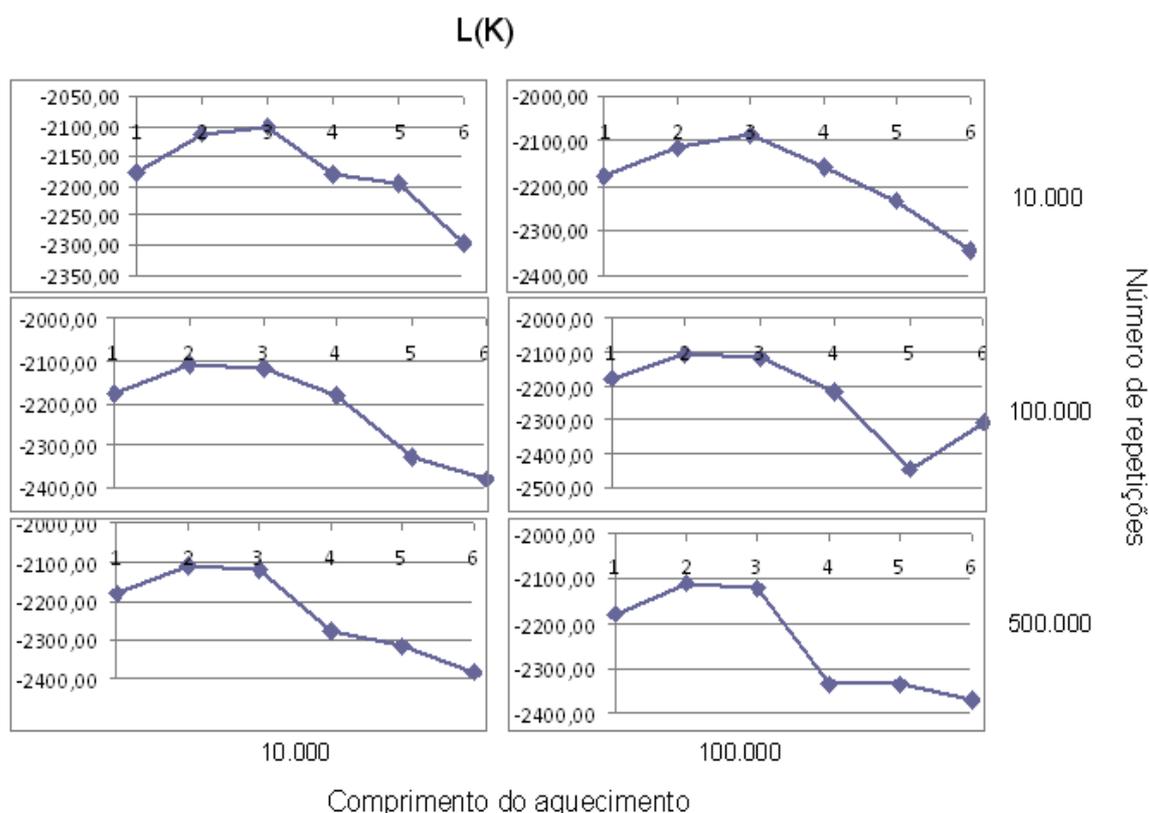


Figura 9. Diferentes parâmetros de K para cálculo da função de verossimilhança.

Tomando-se os dados de maior esforço computacional, em que o parâmetro para o comprimento de aquecimento foi de 100.000 e para o número de repetições foi de 500.000, O $L(K)$ foi máximo quando $K=2$. A estrutura populacional de cada população foi traçada em um gráfico de barras (“bar-plot”) revelando as quatro localidades identificadas dentro de um grande agrupamento, com combinação entre os cluster vinho e o cluster azul, observando-se uma grande representação no cluster vinho para as localidades de SSa 09.5, Jacobina e Vitória da Conquista (Figura 10).

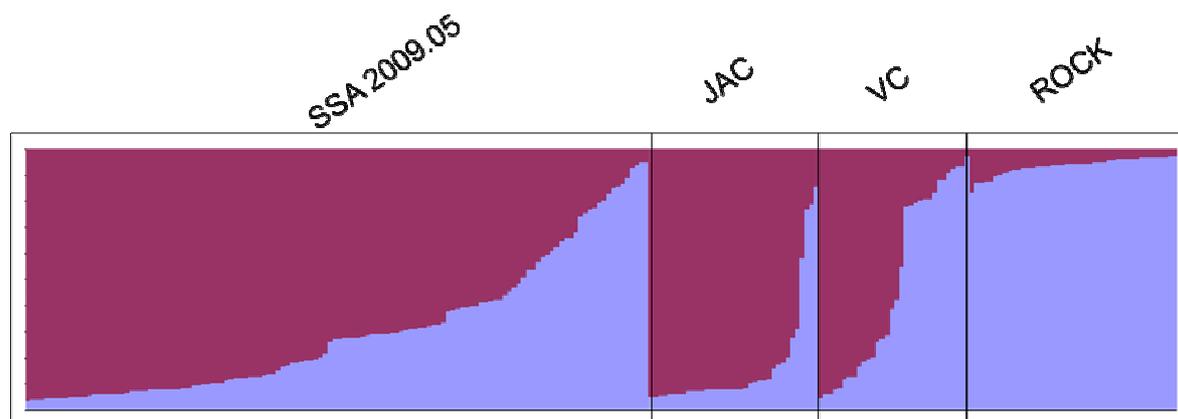


Figura 10. Estrutura “bar plot” populacional baseada em cinco locus SSR de *A. aegypti*. Cada linha vertical representa um indivíduo. Cada uma das cores (vinho e azul) representa a frequência de ancestralidade de cada grupo definido pelo programa *structure*, K=2.

5.6 Análises longitudinais

A estabilidade populacional de *A. aegypti* ao longo tempo (2007-2009) foi analisada para a população de Salvador como um todo e para as populações das áreas selecionadas.

5.6.1 Frequências alélicas

As frequências alélicas na população global de Salvador por *locus* revelaram uma estabilidade populacional entre o período de 2007 e 2009 (Figura 11).

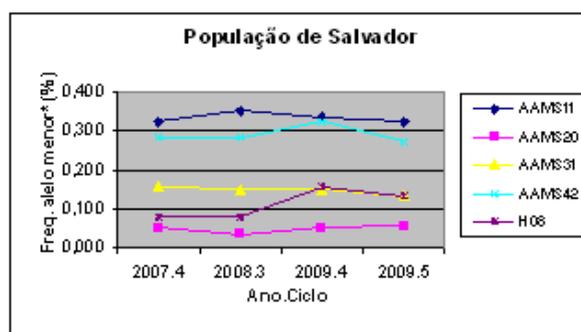


Figura 11. Frequência alélica para todos os *loci* entre os anos de 2007 e 2009.
* O alelo de menor frequência não raro foi tomado como referência.

O mesmo não ocorreu em relação às frequências alélicas por área selecionada de Salvador e por *locus* (Figura 12).

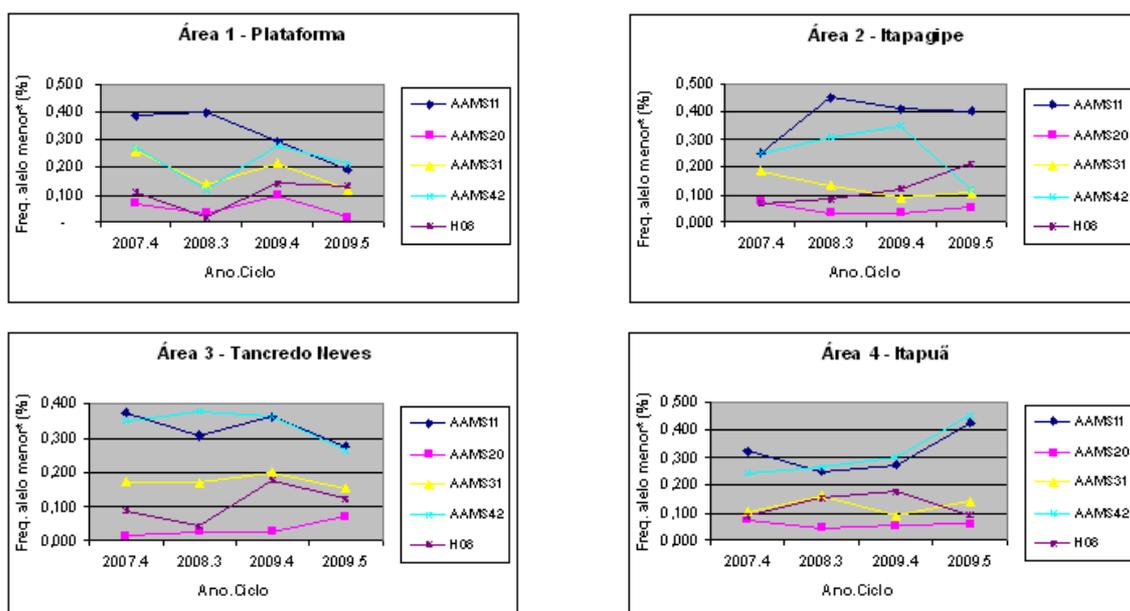


Figura 12. Frequência alélica para todos os *loci* em todas as áreas do município de Salvador
* O alelo de menor frequência não raro foi tomado como referência.

5.6.2 Medidas de diferenciação genética

As medidas de diferenciação na população global de Salvador evidenciaram uma estabilidade entre o período de 2007 e 2009. Apesar da significância estatística encontrada entre os ciclos de 2008.3 e 2009.4, as medidas de diferenciação foram pequenas (Tabela 16). O mesmo foi observado quando analisamos os dados das áreas selecionadas de Salvador (dados não apresentados).

Tabela 16. Diferentes medidas de diferenciação populacional (F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} e medida D) para análise das quatro áreas da população de Salvador (5. LIRAA 2009) sobre todos os loci.

População 1	População 2	F_{ST}^a		Φ_{pt}^a		R_{ST}^a		Medida D ^b	
		Valor	p	Valor	p	Valor	p	Valor	p
2007.4	2008.3	0,000	ns	0,000	ns	0,014	*	0,001	nd
2008.3	2009.4	0,006	*	0,011	*	0,021	*	0,007	nd
2009.4	2009.5	0,000	ns	0,000	ns	0,003	ns	0,000	nd

Medidas de diferenciação moderadas foram sublinhadas.

^a Para o teste estatístico foram utilizadas 99 permutações, porém os resultados não diferiram em simulações com 999 e 9.999 permutações. * $P < 0,05$, ns = não significante.

^b Para o teste estatístico foram utilizadas 200 replicas. nd = não determinado.

5.6.3 Tamanho efetivo da população

As medidas de N_e variaram consideravelmente por área e ciclo evidenciando o efeito de gargalo de garrafa em diferentes períodos em cada área, apesar de não haver correlação com o IIP (dados não apresentados). O N_e foi menor nos ciclos 2008.3 na área 1, nos ciclos 2008.3 e 2009.4 na área 3 e nos ciclos 2007.4 e 2009.4 na área 4. O N_e apresentou um tendência de crescimento na área 2, porém manteve-se inferior ao das demais áreas no último ciclo, 2009.5 (Tabela 17).

Tabela 17. Tamanho efetivo populacional (N_e) das quatro áreas selecionadas da população de Salvador dos ciclos 2007.4, 2008.3, 2009.4 e 2009.5 do LIRAA.

Ciclo	2007.4		2008.3		2009.4		2009.5	
	N_e	IC 95%	N_e	IC 95%	N_e	IC 95%	N_e	IC 95%
Populações								
Área 1	354,8	22 - ∞	69,9	17 - ∞	∞	∞	∞	∞
Área 2	2	1,2 - 3,2	19,8	9,1 - 64,7	21,5	8,3 - 1929,4	30,3	11,0 - ∞
Área 3	∞	∞	13,7	7,8 - 27,3	13,0	6,9 - 28,7	∞	∞
Área 4	10,4	6,2 - 19,6	∞	85,9 - ∞	23,8	10,3 - 149,5	∞	∞
Total	59,8	31,8-147,9	300,9	81,8 - ∞	100	42,4-772,2	∞	∞

IC 95% = intervalo de confiança. ∞ = infinito

6. DISCUSSÃO

A importância da vigilância entomológica e do uso de novas abordagens para o controle operacional do vetor transmissor da dengue, o *A. aegypti*, tem sido destacada recentemente (EISEN; LOZANO-FUENTES, 2009). Sobretudo, devido aos resultados do combate ao *A. aegypti* demonstrarem-se ineficientes com surtos de dengue cada vez maiores nas principais capitais do país. Neste trabalho, propomos a utilização de georeferenciamento e genética de populações para mapear as populações do *A. aegypti* como forma de apoiar as ações locais. Segundo Regis e cols. (2009), para a vigilância do *A. aegypti* é importante determinar quando e onde aplicar as ações de controle (REGIS *et al.*, 2009).

Durante o trabalho de campo, os dados sobre a localização dos domicílios com foco por *A. aegypti* são anotados pelos ACEs no FAD2. Entretanto, pela ausência de temas para georeferenciamento em nível de domicílio disponíveis, foram utilizados dados do logradouro e ruas. Num estudo descritivo, esta abordagem pode ser útil para apresentar os dados mais gerais em nível de Município. Entretanto, para estudos analíticos que visam comparar a distribuição dos focos e dados administrativos, demográficos e ecológicos de interesse, esta metodologia não seria recomendada pela perda de precisão da distribuição dos pontos. Em alguns municípios, os ACEs já dispõem de GPS, porém esta iniciativa é incipiente e não atende a todos os trabalhos realizados. No município de Salvador-BA, o GPS foi utilizado para georeferenciar os imóveis em que foi feita a cobertura com telas dos tanques das casas, mas o número de aparelhos não permitiria acompanhar o LIRAA, por exemplo. Alternativamente, os ACEs poderiam portar consigo mapas com imagens aéreas dos logradouros, marcar os pontos nos mapas e trazer os dados para o georeferenciamento posterior. Em nosso estudo, retornamos nos logradouros utilizando carro com navegador GPS e marcamos todos os pontos nos mapas para assegurar o georeferenciamento em nível de casa, rua, quarteirão e estrado.

Outro problema enfrentado foi a falta de tema para georeferenciamento em nível de estrato disponível. Os estratos e quarteirões utilizados para a realização do LIRAA em Salvador são demarcados por croquis feitos à mão. Estes croquis poderiam ser georeferenciados, porém falta tecnologia e pessoal no município para executar esta tarefa. Além disso, os estratos não correspondem a outras divisões político-administrativas, tais como, zona de informação, setores censitários, bairros e

distritos sanitários que permitam o cruzamento com outras bases de dados. A própria divisão dos bairros em Salvador não é clara. Finalmente, a definição de estrato é dependente do número de domicílios e sua demarcação pode mudar com o passar do tempo. Deste modo, os dados coletados sobre um estrato não podem ser comparados longitudinalmente com precisão. Para a utilização do georeferenciamento como apoio ao sistema de vigilância entomológica seria necessária a construção de temas de quarteirões, estratos e bairros e sua constante atualização. Finalmente, seria importante a compatibilização destas bases com outras contendo informações relevantes para as questões de saúde, tais como bases demográficas e ambientais.

A fim de avaliar parâmetros moleculares para a vigilância entomológica do *A. aegypti* selecionamos quatro áreas da cidade de Salvador com características peculiares: duas áreas adjacentes (área 1 e 2) interligadas por um importante corredor de tráfego de veículos e 2 áreas afastadas mais de 9 Km das anteriores e entre si (áreas 3 e 4), além de estarem separada por obstáculos naturais. Após a coleta de dados no 4. ciclo de 2007, tivemos uma interrupção na obtenção de larvas nos primeiros ciclos de 2008. Isto impossibilitou acompanhar de forma contínua os resultados do LIRAA e avaliar o efeito da sazonalidade sobre as populações do *A. aegypti*. Como já se sabe, a densidade da população de *A. aegypti* varia ao longo do tempo, devido provavelmente a disponibilidade dos criadouros no ambiente em cada época (SERPA et al., 2006). Entretanto, alguns estudos têm relatado uma sazonalidade na distribuição do *A. aegypti*, com maior dispersão nos meses quentes do verão e uma acentuada redução do tamanho absoluto da população ao longo dos demais meses, apesar de estar presente durante todo o ano (HUBER; LOAN, 2002; SERPA et al., 2006).

Um dos aspectos que foi avaliado inicialmente em nosso estudo foi a espacialização dos domicílios com foco de *A. aegypti* e a análise do IIP nas respectivas áreas. Para permitir a comparação longitudinal do IIP, utilizamos os dados de 4. ciclo de 2007 e de outros ciclos no mesmo período do ano, ou seja, no fim do inverno início da primavera. O IIP médio nas áreas 2, 3 e 4 foram superiores a 1,0% e inferiores a 3,9%, que indica situação de alerta e a área 1 apresentou IIP acima de 3,9% que indica risco de surto. Esta classificação segue a preconizada pelo MS e parâmetros do LIRAA. O IIP médio por ciclo (período) e por área (%) demonstrou uma tendência de redução ao longo do tempo nas áreas 1, 3 e 4,

enquanto foi constante na área 2. Isto demonstra que as ações conjuntas promovidas dentro do Programa Municipal de Controle da Dengue (PMCD) tem auxiliado na redução do IIP, porém o problema permanece longe de ser resolvido. Dados sobre incidência de dengue demonstram uma dissociação entre a redução do IIP e a ocorrência da doença no município. Em parte, isto é decorrente da complexidade da doença no espaço urbano, tais como, transição demográfica, tipo de habitações inadequadas, ausência de saneamento básico, intermitência da distribuição de água. Além disso, a falta de políticas contínuas que causam a interrupção do tratamento e eliminação dos criadouros, tais como, falta ACEs e paralisações por questões trabalhistas.

Um estudo similar, realizado aqui no Brasil no estado de Minas Gerais, demonstra a estabilidade do IIP ao longo do tempo, porém com resultados também elevados, indicando a necessidade de novas abordagens, mudanças políticas com relação à saúde e adoção de novas estratégias, afim de que os recursos disponíveis sejam melhores direcionados objetivando a otimização dos resultados pretendidos (VIEIRA; LIMA, 2006). Além disso, propõe a participação da comunidade como forma de prevenir o aparecimento de criadouros, uma vez que os mesmos são encontrados no domicílio ou seu entorno.

Através da análise de marcadores genéticos é possível identificar sub-populações do *A. aegypti* no espaço urbano e avaliar a estabilidade genética destas sub-populações, suas áreas de abrangência ou suas “fronteiras” (OLIVEIRA; ARAGÃO, 1995). A média de alelos em cada população indica a variabilidade genética das populações estudadas.

Em nosso estudo, a análise dos marcadores em amostras de 2009 demonstrou que os mesmos alelos ocorreram nas diferentes populações presumidas (municípios, áreas e estratos). Devido à natureza dos marcadores SSR, esperávamos um número bem maior de alelos por *locus* e, eventualmente, a ocorrência de alelos exclusivos. Houve um menor número de alelos nos loci SSR na população de *A. aegypti* de Salvador e populações controle quando comparados a populações de outros continentes (HUBER; LOAN, 2002; LOVIN et al., 2009; RAVEL et al., 2002). Contudo, o número de alelos foi semelhante ao de um trabalho realizado no Rio de Janeiro (DA COSTA-RIBEIRO; LOURENCO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2006). Esta baixa riqueza alélica pode estar relacionada com o tratamento maciço e recorrente do *A. aegypti* na cidade de Salvador, decorrente do

efeito de gargalo de garrafa e deriva genética nesta população. Alguns autores têm relatado a baixa riqueza alélica de marcadores SSR para *A. aegypti* quando comparadas com de outros culicídeos (FAGERBERG; FULTON; BLACK, 2001; RAVEL et al., 2002).

Para a maioria das populações, as frequências genótípicas de cada *loci* encontraram-se em equilíbrio de H-W, não demonstrando haver presença de forças evolutivas que alterem as frequências alélicas nas áreas estudadas. As exceções para os *loci* AAMS11, AAMS20 e AAMS42, em algumas populações, foram causadas devido a um déficit de heterozigotos. Isto pode ser devido a alguns fatores, tais como, neutralidade dos marcadores, endogamia e a existência de subdivisões dentro da população o que levaria ao efeito Wahlund, que é o resultado de cruzamento entre indivíduos de populações isoladas (DA COSTA-RIBEIRO; LOURENCO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2006; MCMANUS et al., 2011). Apesar de marcadores SSR normalmente representarem marcadores neutros, a falta de dados genômicos do *A. aegypti* não excluem a possibilidade de alguns de nossos marcadores sofrem seleção. Para garantir a independência das amostras de campo e evitar o efeito da endogamia, apenas uma larva de cada criadouro foi coletada. O mesmo não poderia ser aplicado para a cepa referência ROCK. Em relação ao efeito Wahlund, isto era esperado na população de Salvador uma vez que representamos esta população pela união de quatro áreas distintas separadas geograficamente e diferenciadas geneticamente.

O genoma do *A. aegypti* é constituído por três cromossomos e apesar dos esforços para o seu sequenciamento, não foi possível mapearmos fisicamente os marcadores escolhidos. Como trabalhamos com cinco marcadores, certamente alguns deles devem ser sintênicos. Entretanto, todos os marcadores SSR validados comportarem-se como não-ligados, pois nenhum dos marcadores apresentaram-se em desequilíbrio de ligação (ARDLIE; KRUGLYAK; SEIELSTAD, 2002). Alguns autores têm relatado que os SSR são sub-representados no genoma do *A. aegypti* e os que existem estão, muitas vezes, próximos uns dos outros (CHAMBERS et al., 2007). Deste modo, antecipamos a dificuldade em encontrar novos marcadores com as mesmas características dos marcadores validados. A independência dos marcadores é uma condição necessária para utilizarmos as medidas de diferenciação genéticas (FALUSH; STEPHENS, 2007; FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2003; PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

Neste estudo comparamos diversas medidas de diferenciação genética a fim de verificar sua utilidade em identificar estruturação populacional em níveis de municípios e unidades administrativas menores (diferenciação alélica, genotípica, F_{ST} , Φ_{pt} , R_{ST} e medida D). Através do AMOVA foi possível corrigir alguns vieses para o cálculo do F_{ST} e ϕ_{PT} (Φ_{pt}) para marcadores polialélicos, uma vez que estes estimadores tradicionalmente são aplicados para avaliar marcadores de *locus* bialélico (HEDRICK, 2005). O R_{ST} corresponde a um estimador específico para marcadores SSR, que assume o modelo de mutação *stepwise* para todos os locos e não apresenta restrições quanto ao número de alelos (SLATKIN, 1995). A medida de D apresenta como desvantagem a análise de marcadores em único *locus*, pois a teoria para análise de dados multilocus ainda encontra-se em desenvolvimento (JOST, 2008; RYMAN; LEIMAR, 2009). Todavia, a medida de D inclui na análise a distinção de alelos exclusivos que não é considerada pelos demais estimadores. Estas diferenças teóricas podem ser importantes para a escolha de cada estimador na prática.

Os resultados em nível de município demonstram diferenciações populacionais significativas entre a população de SSa 09.5 e as populações controle em todas as medidas de diferenciação genética demonstrando que elas podem produzir resultados equivalentes, sobretudo entre as populações de municípios da Bahia a cepa referência ROCK. Interessantemente, a diferenciação populacional entre Salvador e Jacobina, e Salvador e Vitória da Conquista, localizadas à cerca de 340 Km e 520 Km de Salvador, respectivamente, foram menores que a diferenciação populacional entre Jacobina e Vitoria da Conquista distantes entre si cerca de 590 de Km. Isto demonstra a importância da distância geográfica como uma barreira física para a troca gênica, mas também pode decorrer do fluxo de pessoas e veículos que é mais intenso entre a capital e as cidades do interior, que entre estes municípios entre si. Os resultados do AMOVA, evidenciados principalmente pelas medidas de F_{ST} e ϕ_{PT} (Φ_{pt}), indicam diferenciações populações pequenas a grandes entre os municípios e diferenciações populações pequenas a muito grandes entre os municípios e a cepa laboratorial ROCK. Medidas de diferenciação populacional grande podem ser resultado do efeito fundador durante eventos de recolonização, do tempo entre estes eventos e um restrito fluxo gênico após a recolonização (JULIO et al., 2009; SOLIANI et al., 2010). As medidas

pelo F_{ST} e $phiPT$ (Φ_{pt}) não foram maiores que as obtidas pela medida D , demonstrando que estes estimadores podem ser utilizados alternativamente.

Em que pese a redução do tamanho amostral, não foi possível interpretar os resultados através da diferenciação alélica e genotípica em nível das áreas da população SSa 09.5. As medidas de diferenciação foram menores e os testes estatísticos foram menos significativos que aqueles obtidos em nível de municípios, mas os resultados demonstraram estruturação da população da área 2 em relação às demais áreas. Este resultado foi confirmado com a análise em nível dos estratos que será discutido a seguir. A área 2 corresponde a uma área plana situada na Baía de Todos os Santos e limita a leste pela falha que divide a cidade de Salvador em cidade “Baixa” e cidade “Alta”. A diferenciação populacional em relação às outras áreas pode estar relacionada com a intensidade do tratamento para o controle vetorial ocorrido nas áreas, à existência de obstáculos naturais (relevos, zonas de vegetação densa ou lagoas) e demográficos (densidade populacional humana e à quantidade de reservatórios de água) que favorecem a diferenciação populacional do *A. aegypti* como relatado em estudos na Argentina e na Tailândia (JULIO et al., 2009; MOUSSON et al., 2002).

Semelhante ao que foi observado em relação às análises das áreas de população SSa 09.5, as análises das frequências alélicas e genotípicas não permitiram evidenciar diferenciação populacional a nível dos estratos. Entretanto, algumas medidas de diferenciação em nível de estrato foram até maiores que aquelas calculadas para as áreas, notadamente o R_{ST} , tanto em estratos não contíguos como em estratos contíguos de uma das áreas. As análises em nível de estrato revelaram diferenciação moderada a grande entre alguns estratos não contíguos, sobretudo, entre os estratos da área 2 e das demais áreas. Este resultado confirma o que foi encontrado em nível das áreas de população SSa 09.5. Por outro lado, a análise de outros pares de estratos não contíguos não apresentou qualquer diferenciação entre si. Isto indica que em nível de estratos ou áreas menores, como quarteirão ou ruas, talvez seja necessário um maior número de marcadores para aumentar o poder discriminatório da análise. De qualquer forma, diversos fatores extrínsecos poderiam impedir o isolamento por distância das populações de *A. aegypti*, como por exemplo, o transporte humano de larvas, ovos ou o próprio mosquito adulto através das rotas comerciais. Assim, pode transformar

populações distantes geograficamente, em geneticamente similares (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE *et al.*, 2002).

Alguns estratos contíguos não apresentaram qualquer diferenciação populacional (estratos das áreas 2, 3 e 4). Esse resultado tem implicações diretas sobre o controle do vetor devido à possibilidade de áreas não tratadas poderem recolonizar as áreas tratadas. Em Salvador, o tratamento é realizado ciclicamente em cada estrato de maneira diferenciada de acordo com os resultados de cada LIRAA dando prioridade às áreas com o IIP mais elevados sem considerar a área de abrangência das sub-populações do *A. aegypti*. Considerando que o mosquito não respeita fronteiras político-administrativas, a metodologia padrão adotada não deve ser a mais adequada e isso poderia justificar o insucesso no controle vetorial no município como um todo. Por outro lado, os estratos contíguos da área 1 apresentaram diferenciação populacional moderada. Neste caso, seria interessante avaliarmos se o tratamento destes estratos poderia ser realizado de forma independente. A partir dos dados obtidos, seria importante definir as áreas de abrangência das sub-populações do *A. aegypti* independentemente dos estratos para auxiliar na tomada de decisões a respeito do manejo do tratamento. Na ausência de dados moleculares, outras estratégias devem ser tentadas. Por exemplo, o tratamento poderia ocorrer nos estratos com risco de surto da doença e todos os seus circunvizinhos. Ampliando-se a abrangência da área tratada poderíamos bloquear a livre circulação do mosquito vetor de um estrato crítico tratado para um estrato não tratados no mesmo período.

Foram obtidas também algumas estimativas indiretas sobre N_e a partir de dados dos marcadores SSR. Esta estatística permite identificar o número de indivíduos necessários para reconstruir a diversidade genética da população total e mostra-se extremamente útil para descrever níveis esperados de diversidade genética e na avaliação dos efeitos de fatores diferentes na eficiência da seleção. Contudo, certos aspectos da variabilidade genética, como redução causada por efeito gargalo ou limpeza seletiva podem estar associados a diversas variantes na distribuição da frequência não podendo ser descritas por uma simples redução do N_e (CHARLESWORTH, 2009)

No presente estudo, as estimativas de N_e em geral tiveram amplo intervalo de confiança, com valores que variaram de 11,8 a infinito, para as análises entre municípios. O menor valor foi evidenciado para linhagem Rockfeller, como esperado

por ser uma população laboratorial e possuir um alto coeficiente de endogamia que resulta numa menor diversidade genética que as populações de campo. Em termos práticos para o controle vetorial, o N_e mais baixo pode representar o sucesso no controle do *A. aegypti* uma vez que esta medida relaciona-se como o tamanho absoluto da população. As populações de *A. aegypti* de Jacobina e Vitória da Conquista também apresentaram N_e relativamente baixo quando comparado com Salvador. O maior valor do N_e na população de Salvador pode ser explicado pelo insucesso no controle vetorial devido a maior complexidade do espaço urbano deste município, maior número e tipo de criadouros, maior densidade populacional humana, intermitência na distribuição de água e a necessidade da comunidade em armazenar água, tratamento descontínuo e irregular por parte dos órgãos responsáveis pelo controle da dengue, entre outros.

Quando os dados do N_e , foram analisados em nível de áreas de Ssa 09.5, apenas a área 2 (Itapagipe) apresentou resultados mais baixos evidenciando que a população de *A. aegypti* nesta área tem uma menor diversidade genética. Talvez essa população de *A. aegypti* possa estar sendo mantida por um menor número de mosquitos que as demais áreas. O controle vetorial nesta área parece ser mais regular (vide Tabela 1), com IIP constante e mais baixo que a área 1, por exemplo. O tratamento maciço e sucessivo pode produzir um evento evolucionário importante, o “efeito de gargalo de garrafa” que em última análise pode produzir um efeito fundador com repercussão sobre a redução na diversidade genética dos *A. aegypti*. Num estudo realizado no México, foi possível evidenciar que a diferenciação populacional do *A. aegypti* e N_e mais baixo na região nordeste do país foi decorrente de questões climáticas, por esta região ser mais árida do que as outras regiões do pacífico (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE *et al.*, 2002).

Para complementar os dados populacionais, foi realizada a análise Bayesiana implementada no programa *structure*, o qual faz inferência populacional a partir da frequência de ancestralidade dos indivíduos. A análise indicou K igual a 2 populações como ideal para representar os dados, resultado que possivelmente não se aplica a estas populações. As larvas da cepa Rockfeller e Jacobina apresentam-se fortemente agrupadas em um “grupo ancestral”, enquanto as populações de Salvador e Vitória da Conquista apresentaram frequência de ancestralidade intermediária entre estas duas. De certo modo, foi observada neste estudo uma menor diferenciação populacional entre as populações de *A. aegypti* de Salvador e

Jacobina e Salvador e Vitória da Conquista e uma maior diferenciação populacional entre as populações de *A. aegypti* de Jacobina e Vitória da Conquista. Deste modo, a população de Salvador pode ser considerada uma miscigenação de populações de *A. aegypti* de outras regiões do estado. Isso pode estar relacionado com próprio fluxo de veículos, bens e mercadorias entre as cidades do interior e a capital auxiliando na disseminação de ovos do inseto. Outro estudo realizado aqui no Brasil revela que o programa *structure* conseguiu inferir populações geneticamente diferenciadas com certa detecção de mistura entre as populações de *A. aegypti* da Amazônia brasileira (LIMA, 2010). Apesar de outros estudos não conseguirem demonstrar a utilidade do programa *structure* para inferência populacional de *A. aegypti*, um trabalho na Ásia/Oceania demonstrou resultados onde populações de *A. aegypti* procedentes da Tailândia e Vietnã revelam maior variação genética do que a população da Austrália. No entanto, as amostras da Austrália mostraram uma mistura de duas populações, evidenciando a relação de parentesco entre essas populações (ENDERSBY *et al.*, 2009). Paupy e cols., analisando populações de *A. aegypti* oriundas de Camarões, encontraram três grupos misturados, pois, não conseguiram detectar um agrupamento claro nas populações. Contudo, os resultados sugerem duas linhagens distintas, coexistindo dentro de uma mesma população, o que seria indicativo de uma plasticidade ecológica do mosquito vetor na região norte de Camarões, permitindo colonização em áreas silvestres (PAUPY *et al.*, 2008). Outro estudo envolvendo amostras *A. aegypti* obtidas de 24 países, incluindo amostras silvestres e urbanas da África, demonstrou ser possível inferir as populações do *A. aegypti* entre as populações africanas e não africanas (K=2), agrupar razoavelmente as amostras africanas (K=4) e diferenciar doze (K=12) grupos pantropicais conforme o país de origem dos mosquitos (BROWN *et al.*, 2011).

A avaliação temporal dos dados possibilitou identificar diferenciação populacional de *A. aegypti* longitudinalmente no município de Salvador. Os resultados a partir das frequências alélicas e das medidas de diferenciação populacional foram similares, sendo que ambas foram capazes de demonstrar diferenciação entre os ciclos de 2008.3 e 2009.4. Os dados coletados corresponderam aos meses de agosto e outubro de cada ano, portanto não refletem diferenças associadas com a sazonalidade. Todavia, Hemme e cols., num trabalho realizado na Índia, também demonstraram diferença temporal na população de *A.*

aegypti entre 2006 e 2007, e essa diferença pôde ser associada ao sucesso no controle vetorial, mas também a flutuações sazonais da população do próprio vetor (HEMME *et al.*, 2010). A diferenciação populacional através das estações pode ser decorrente de mudanças na densidade do mosquito, viabilidade dos sítios de oviposições e o tipo de ambiente (DA COSTA-RIBEIRO; LOURENCO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2006; HUBER; LOAN, 2002; PAUPY *et al.*, 2003). Sem a ocorrência de qualquer força evolucionária não seria esperada qualquer diferenciação entre os ciclos.

Com relação à avaliação longitudinal do *Ne* para a população de *A. aegypti* de Salvador, demonstrou efeito de gargalo de garrafa em diferentes períodos em cada área. Medidas de *Ne* decrescentes indicam uma retração da população que pode estar relacionado com o sucesso no controle vetorial. Por outro lado, medidas de *Ne* flutuantes ou crescentes indicam ineficácia no controle vetorial da área, apesar de não haver correlação com o IIP (dados não apresentados).

Finalmente, diversos fatores podem determinar a viabilidade de sítios de oviposição e a distribuição e dispersão do *A. aegypti* no meio urbano, tais como, fatores demográficos (densidade populacional humana, condições habitacionais, fluxo de veículos, acesso das pessoas a água tratada), topográficos, vegetação, clima, entre outros. A importância de cada um destes fatores ainda não está muito bem esclarecida, embora alguns trabalhos demonstrem que a presença de edifícios, por exemplo, não são impeditivos para a dispersão do *A. aegypti* (REITER *et al.*, 1995). Outros estudos mostram que as características das paisagens urbanas como uma grande avenida ou uma rodovia pode constituir-se numa barreira capaz de afetar a estrutura populacional do mosquito (HEMME *et al.*, 2010). A partir dos resultados obtidos, concluímos que o controle vetorial produz alterações sobre a estrutura populacional do *A. aegypti*, mas que não são efetivas. O uso do georeferenciamento e de informações genéticas do vetor poderiam contribuir com informações valiosas sobre a definição das áreas de abrangência das populações do *A. aegypti* no espaço urbano, uma vez que o mosquito não respeita fronteiras político-administrativas, e para a tomada de decisões a respeito do manejo do tratamento.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dengue é uma doença endêmica no Brasil e as medidas de vigilância e controle não têm sido eficazes. A cada ano existe a expectativa de novos surtos com uma magnitude cada vez maior. Na ausência de uma vacina eficaz, o controle vetorial tem sido utilizado como uma das principais medidas para o controle da dengue.

Este trabalho demonstrou que o IIP em Salvador tem estado elevado (média > 3%). Apesar de apresentar uma tendência de redução no período estudado, entre 2007 e 2009, houve uma clara dissociação com a taxa de incidência da doença que aumentou no mesmo período.

Os cinco marcadores moleculares SSR utilizados foram polimórficos, com alta heterozigosidade, demonstraram ser neutros e independentes, além disso, demonstraram-se capaz de analisar a variabilidade e diferenciação genética das populações de *A. aegypti* de Salvador e outros municípios, áreas contendo bairros e estratos.

As diferenciações populacionais foram melhor determinadas pelas medida de diferenciação Φ_{pt} e F_{ST} entre populações pertencentes a localidades com distâncias geográficas de aproximadamente 300-500 Km (municípios), já a medida de R_{ST} foi mais eficiente em determinar estruturas populacionais entre populações de distâncias menores áreas e “micro-áreas”, com cerca de 1 Km de distância (estratos). Talvez essa diferença tenha ocorrido devido a baixa quantidade de amostras disponíveis para as análises deste trabalho.

A partir dos resultados obtidos pelo programa *structure*, foi possível observar dois clusters divergentes, fortemente agrupados em um grupo ancestral, representado pela cepa Rockefeller e as populações dos municípios do estado da Bahia.

É necessário um novo enfoque com relação aos programas de controle vetorial, que pode ser mais bem direcionado e, portanto mais eficiente, se o sistema de controle do *A. aegypti* levar em consideração não apenas os limites de divisões políticas da cidade de Salvador, mas também as características ambientais e ecológicas, como a biologia do mosquito vetor, o fluxo gênico entre populações de áreas diferentes, a existência de bolsões de isolamento, o padrão de dispersão do mosquito, redução e reposição de populações do *A. aegypti*. Outras particularidades

devem ser testadas num estudo futuro, como associações entre fatores antropogênicos, epidemiológicos e fatores de competência e infectividade vetorial, para o desenvolvimento de estratégias de controles mais efetivos.

Além destes, existem outros problemas relacionados ao próprio hospedeiro, como habitações com infra-estruturas inadequadas, ausência de saneamento básico, intermitência de água, falta de equipe permanente em campo e ausência de políticas contínuas. Nesse ponto, devemos nos atentar para aspectos culturais da população, pois por ser uma doença complexa, ou seja, dependente de diversos fatores, é necessário enfatizar que a diminuição do número de casos da dengue depende da ação de todos.

Concluimos que o uso do georreferenciamento e de informações genéticas do vetor podem contribuir substancialmente para a definição das áreas de abrangência das populações do *A. aegypti* no espaço urbano, uma vez que o mosquito não respeita fronteiras político-administrativas. O tratamento intermitente de estratos tem permitido que o *A. aegypti* repovoe as mesmas áreas previamente tratadas sem alteração significativa de sua estrutura populacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDSTADT, J. et al. **Ecological modeling of *Aedes aegypti* (L.) pupal production in rural Kamphaeng Phet, Thailand.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 5, n. 1, p. 940, 2011.

ANTONIO-NKONDJIO, C. et al. **Population structure of the malaria vector *Anopheles moucheti* in the equatorial forest region of Africa.** Malaria Journal, v. 7, p. 120, 2008.

ARDLIE, K. G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. **Patterns of linkage disequilibrium in the human genome.** Nature Reviews Genetics, v. 3, n. 4, p. 299-309, 2002.

AYRES, C. F. et al. **Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil.** Journal of Medical Entomology, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.

BRASIL. **Brasil tem 24 cidades em risco de surto de dengue e 154 em alerta, incluindo 14 capitais.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11951. Acesso em: 14/03/2011.

BRASIL. **Campanha e LIRAA 2010.** Disponível em: http://www.saude.ba.gov.br/dipro/cdgr/download/mostra_01/CAMPANHA%20E%20LIRAA%202010%20-%20CARAVANA%20NORDESTE.pdf. Acesso em: 18/07/2011.

BRASIL. **Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil - LIRAA.** Brasília: Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde, 2005. 60 p.

BROWN, J. E. et al. **Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases.** Proceedings Biological Sciences, v. 278, n. 1717, p. 2446-2454, 2011.

CASTIGLIONE, L. **A técnica de RAPD (random Amplified Polymorphic DNA) e suas aplicações para estudos em genética molecular.** Revista UNORP, v. 3, n. 2, p. 63-77, 2003.

CCZ/SEVTV/PMCD. **Resultados do 4º levantamento de índice rápido para o *Aedes aegypti* - LIRAA /09.** SMS-Salvador: Salvador. 2009

CHAMBERS, E. W. et al. **Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*.** The Journal of Heredity, v. 98, n. 3, p. 202-210, 2007.

CHAO, A. et al. **A Two-stage probabilistic approach to multiple-community similarity indices.** Biometrics, n. 64, p. 1178-1186, 2008.

CHAPMAN, H. F. et al. **Population structure and dispersal of the saltmarsh mosquito *Aedes vigilax* in Queensland, Australia.** Medical and Veterinary Entomology, v. 13, n. 4, p. 423-430, 1999.

CHARLESWORTH, B. **Fundamental concepts in genetics: effective population size and patterns of molecular evolution and variation.** Nature Reviews. Genetics, v. 10, n. 3, p. 195-205, 2009.

CLARO, L. B. L. **Dengue prevention and control: a review of studies on knowledge, beliefs, and practices.** Cadernos de Saúde Pública, v. 20, n. 6, 2004.

CÔNSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 228 p.

DA COSTA-RIBEIRO, M. C.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. **Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 8, p. 917-921, 2006.

EISEN, L.; LOZANO-FUENTES, S. **Use of mapping and spatial and space-time modeling approaches in operational control of *Aedes aegypti* and dengue.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 3, n. 4, p. 411, 2009.

ENDERSBY, N. M. et al. **Genetic structure of *Aedes aegypti* in Australia and Vietnam revealed by microsatellite and exon primed intron crossing markers suggests feasibility of local control options.** Journal of Medical Entomological, v. 46, n. 5, p. 1074-1083, 2009.

ESRI. **ArcView GIS 3.2a.** Enviromental Systems Research Institute. 1999.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. **Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study.** Molecular Ecology, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

FAGERBERG, A. J.; FULTON, R. E.; BLACK, W. C. **Microsatellite loci are not abundant in all arthropod genomes: analyses in the hard tick, *Ixodes scapularis* and the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*.** Insect Molecular Biology, v. 10, n. 3, p. 225-236, 2001.

FALUSH, D.; STEPHENS, M. **Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles.** Molecular Ecology Notes, v. 7, n. 4, p. 574-578, 2007.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. **Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies.** Genetics, v. 164, n. 4, p. 1567-1587, 2003.

FANTINATTI, E. C. D. S. **RELAÇÕES GENÉTICAS DE POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 DO ESTADO DO PARANÁ.** 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FIGUEIREDO, M. T. L. **Dengue in Brazil: past, present and future perspective.** Dengue Bulletin, v. 27, p. 25-33, 2003.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. 860 p.

FRAGA, E. D. C. **Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Manaus-AM, Brazil** Genetics and Molecular Biology, v. 26, n. 2, 2003.

FRANCO, O. **[The eradication of *Aedes aegypti* in Brazil.]** Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, v. 13, p. 43-48, 1961.

FUNASA. **Dengue instruções para o pessoal de combate ao vetor.** Brasília, p.84. 2001

GERTSCH, P.; PAMILO, P.; VARVIO, S. L. **Microsatellites reveal high genetic diversity within colonies of *Camponotus* ants.** Molecular Ecology, v. 4, n. 2, p. 257-260, 1995.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N. et al. **Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 66, n. 2, p. 213-222, 2002.

GUBLER, D. J. **The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems.** Archives of Medical Research, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. **Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand.** Science, v. 131, p. 1102-1103, 1960.

HARTL, D. L. **A primer of population genetics.** Sinauer Associates, Inc publishers, v. Sunderland, Massachussts, p. 191, 1981.

HEDRICK, P. W. **A standardized genetic differentiation measure.** Evolution, v. 59, n. 8, p. 1633-1638, 2005.

HEMME, R. R. et al. **Influence of urban landscapes on population dynamics in a short-distance migrant mosquito: evidence for the dengue vector *Aedes aegypti*.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 4, n. 3, p. e634, 2010.

HERRERA, F. et al. **Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 6, p. 625-633, 2006.

HIEN, S. D. **Biology of *Aedes aegypti* (L., 1792) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae). III Effect of certain environmental controls on the development of larvae and pupae.** Acta Parasitologica Polonica, v. 23, n. 46, p. 553-568, 1975.

HONORIO, N. A. et al. **Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, n. 2, p. 191-198, 2003.

HUBER, K. et al. **Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers.** Molecular Ecology, v. 11, n. 9, p. 1629-1635, 2002.

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

HUBER, K. et al. **Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia.** Acta Tropica, v. 90, n. 1, p. 23-29, 2004.

JOST, L. **G(ST) and its relatives do not measure differentiation.** Molecular Ecology, v. 17, n. 18, p. 4015-4026, 2008.

JULIO, N. B. et al. **Genetic structure of *Aedes aegypti* in the city of Cordoba (Argentina), a recently reinfested area.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. 4, p. 626-631, 2009.

LAMBRECHTS, L. **Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm?** Trends in Parasitology, v. 27, n. 3, p. 111-114, 2011.

LANZARO, G. C. et al. **Microsatellite DNA and isozyme variability in a west African population of *Anopheles gambiae*.** Insect Molecular Biology, v. 4, n. 2, p. 105-112, 1995.

LIMA, R. S. **Estimativas de variação genética do gene ND4 do DNA mitocondrial em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da Amazônia, Brasil.** 2007. f. - INPA, UFAM, Manaus - AM, 2007.

LIMA, S. F. D. A. **Variabilidade genética em populações de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) da Amazônia brasileira, por meio de marcadores microssatélites.** 2010. 75 f. - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA, MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA-MCT, Manaus - Amazonas, 2010.

LOUGHEED, S. C. et al. **A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the massasauga rattlesnake.** The Journal of Heredity, v. 91, n. 6, p. 458-463, 2000.

LOVIN, D. D. et al. **Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti.** BMC Genomics, v. 10, p. 590, 2009.

MARTÍN, J. L. S. et al. **The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: A worrisome reality.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 82, n. 1, p. 128-135, 2010.

MCMANUS, C. et al. **Estatística para descrever genética de populações.** Disponível em: http://animal.unb.br/imagens/Serie_tecnica_genetica_populacoes.pdf. Acesso em: 14/07/2011.

MELO, P. R. S. **Aspectos epidemiológicos e moleculares da transmissão da dengue no estado da Bahia.** 2009. 123 f. Tese (Doutorado em Patologia) - Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

MEYER, A. **Evolution of mitochondrial DNA in fishes.** Biochemistry and Molecular Biology of fishes, v. 2, p. 1-38, 1993.

MOUSSON, L. et al. **Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Chiang Mai (Thailand) and relation with dengue transmission.** Tropical Medicine & International Health, v. 7, n. 10, p. 865-872, 2002.

NAVARRO, A. D. M.; OLIVEIRA, S. E. P.; BRITO, J. P. R. **The potential attractant or repellent effects of different water tyupes on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt.: Culicidae).** Journal os Applied Entomology, v. 127, p. 46-50, 2003.

OCAMPO, C. B.; WESSON, D. M. **Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 71, n. 4, p. 506-513, 2004.

OLIVEIRA, C. L. et al. **Incidência da dengue relacionada as condições climáticas no município de Toledo-PR.** Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, v. 11, n. 3, p. 211-216, 2007.

OLIVEIRA, S. J.; ARAGÃO, M. B. **Algumas Sugestões para o Controle dos Mosquitos do Gênero *Aedes* no Brasil.** Cadernos de Saúde Pública, v. 11, n. 4, p. 629-630, 1995.

OVENDEN, J. R. et al. **The genetic effective and adult census size of an Australian population of tiger prawns (*Penaeus esculentus*).** Mol Ecol, v. 16, n. 1, p. 127-138, 2007.

PAUPY, C. et al. **Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon.** Journal of Medical Entomology, v. 45, n. 3, p. 391-400, 2008.

PAUPY, C. et al. **Variation over space and time of *Aedes aegypti* in Phnom Penh (Cambodia): genetic structure and oral susceptibility to a dengue virus.** *Genetical Research*, v. 82, n. 3, p. 171-182, 2003.

PAUPY, C. et al. ***Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population density.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 62, n. 2, p. 217-224, 2000.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. **GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.** *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 288-295, 2006.

PONTES, R. J.; RUFFINO-NETTO, A. **Dengue in a urban locality of southeastern Brazil: epidemiological aspects.** *Revista de Saude Publica*, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J.; ARNOLD, J. **Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study.** *Science*, v. 208, n. 4450, p. 1385-1387, 1980.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. **Inference of population structure using multilocus genotype data.** *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

RAVEL, S. et al. **Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouake.** *Acta Tropical*, v. 82, n. 1, p. 39-49, 2002.

RAYMOND, M.; ROUSETT, F. **GENEPOP (version 1.2).** *Journal of Heredity*, v. 86, p. 248-249, 1995.

REGIS, L. et al. **Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 1, p. 50-59, 2008.

REGIS, L. et al. **An entomological surveillance system based on open spatial information for participative dengue control.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 81, n. 4, p. 655-662, 2009.

REITER, P. et al. **Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 52, n. 2, p. 177-179, 1995.

RODRIGUES, N. B. et al. **Populational structure of *Schistosoma mansoni* assessed by DNA microsatellites.** *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 7, p. 843-851, 2002.

ROUSSET, F. **Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux**. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, p. 103-106, 2008.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers**. *Methods in Molecular Biology*, v. 132, p. 365-386, 2000.

RYMAN, N.; LEIMAR, O. **G(ST) is still a useful measure of genetic differentiation - a comment on Jost's D**. *Molecular Ecology*, v. 18, n. 10, p. 2084-2087; discussion 2088-2091, 2009.

SCHLOTTERER, C. **Evolutionary dynamics of microsatellite DNA**. *Chromosoma*, v. 109, n. 6, p. 365-371, 2000.

SCOTT, J. A.; MCCLELLAND, G. A. **Electrophoretic differences between sympatric ecotypes**. *Nature*, v. 256, n. 5516, p. 405-406, 1975.

SERPA, L. L. et al. **[Seasonal variation of Aedes aegypti and Aedes albopictus in a city of Southeastern Brazil]**. *Revista de Saude Publica*, v. 40, n. 6, p. 1101-1105, 2006.

SERUFO, J. C. et al. **Isolation of dengue virus type 1 from larvae of Aedes albopictus in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 88, n. 3, p. 503-504, 1993.

SESAB, S. D. S. D. E. B. **Situação epidemiológica da dengue**. Bahia, 2009.

SESAB, S. D. S. D. E. D. B. **Situação epidemiológica da Dengue**. Bahia, 2010.

SESAB, S. D. S. E. D. B. **Situação epidemiológica da dengue**. Bahia, 2011.

SLATKIN, M. **A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies**. *Genetics*, v. 139, n. 1, p. 457-462, 1995.

SMIT, A.; HUBLEY, R.; GREEN, P. **RepeatMasker Open-3.0**. open-3.3.0 (RMLib: 20110419). 1996-2010.

SOLIANI, C. et al. **Genetic relationships among populations of Aedes aegypti from Uruguay and northeastern Argentina inferred from ISSR-PCR data**. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 24, n. 3, p. 316-323, 2010.

TABACHNICK, W. J.; POWELL, J. R. **Genetic structure of the East African domestic populations of Aedes aegypti**. *Nature*, v. 272, n. 5653, p. 535-537, 1978.

TAUIL, P. L. **[Critical aspects of dengue control in Brazil]**. *Caderno de Saude Publica*, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TAUTZ, D.; RENZ, M. **Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes**. *Nucleic Acids Research*, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.

TEIXEIRA, M. D. G. et al. **Dinâmica de circulação do vírus da dengue em uma área metropolitana do Brasil**. Epidemiologia e Serviços de Saúde v. 12, n. 2 p. 87-97, 2003.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. **Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue**. Informe Epidemiológico do SUS, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TOWNSON, H. **Esterase isozymes of individual Aedes aegypti**. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v. 63, n. 4, p. 413-418, 1969.

VIANA, M. D. N. S. **Ecologia molecular de quelônios do gênero *Podocnemis* (Pleurodira: Pelomedusidade) da Amazônia brasileira**. 2005. f. (Tese de doutorado) - Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Genética, Universidade Federal do Pará - UFPA, Belém, 2005.

VIEIRA, G. S. S.; LIMA, S. C. **Distribuição geográfica da dengue e índice de infestação de aedes aegypti em Uberlândia (MG), 2000 a 2002**. Caminhos de Geografia, v. 7, n. 17, p. 107-122, 2006.

WALLIS, G. P.; TABACHNICK, W. J. **Genetic analysis of rock hole and domestic Aedes aegypti on the Caribbean island of Anguilla**. Journal of the American Mosquito Control Association, v. 6, n. 4, p. 625-630, 1990.

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

WHO. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>. Acesso em: 16 de Julho de 2011.

ZHENG, L. et al. **An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, Anopheles gambiae**. Genetics, v. 143, n. 2, p. 941-952, 1996.