

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

MARINA FALCÃO DE SOUZA CARTAXO

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

**Recife  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARINA FALCÃO DE SOUZA CARTAXO

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

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública (2007-2009) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

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

**Recife  
2009**

MARINA FALCÃO DE SOUZA CARTAXO

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

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública (2007-2009) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

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

---

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

---

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz e à Escola de Medicina Tropical de Liverpool pela infra-estrutura cedida que permitiu a execução deste trabalho.

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

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

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

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

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

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

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

A Américo pelo apoio e convivência ao longo destes anos.

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

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

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

Levis e Lewontin (1985)

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

## RESUMO

A cidade de Recife (nordeste do Brasil) é uma área endêmica de filariose linfática e, desde 2003, um programa de controle vem sendo realizado com o intuito de interromper a transmissão desta doença. As estratégias incluem ações para controle de populações de *Culex quinquefasciatus*, único vetor da filariose no Brasil, como a eliminação de criadouros de mosquitos e controle biológico através do tratamento bimestral com o *Bacillus sphaericus*. A diversidade genética da população de *Cx. quinquefasciatus* foi monitorada por 3 anos, em uma área tratada, a fim de avaliar os impactos de tais intervenções sobre a população vetora. Foram analisados dados referentes a um marcador neutro, microssatélite, e a um marcador sob possível pressão de seleção, gene *cqm1*, que codifica o receptor da toxina binária do *B. sphaericus*. Um pequeno decréscimo na diversidade genética, revelado pela técnica de microssatélites, foi detectado através do parâmetro riqueza de alelos. A emergência de alelos com baixas frequências e alguns crescimentos pontuais no parâmetro de heterozigosidade esperada, detectados ao longo do tempo, sugerem eventos de migração. Um leve aumento na frequência do alelo de resistência (*cqm1<sub>REC</sub>*) foi observado durante este estudo. A análise de ambos os marcadores não mostrou estruturação genética na população de *Cx. quinquefasciatus*. Os resultados indicaram que o programa de controle não impactou drasticamente a diversidade da população de *Cx. quinquefasciatus*. Nossos resultados sugerem ainda que, apesar das reduções nas densidades dos índices entomológicos, fornecidas pela Secretaria de Saúde de Recife, esta população de *Cx. quinquefasciatus* poderá recuperar suas densidades originais caso estas atividades sejam interrompidas. Eventos de migração, também sugeridos por este estudo, indicaram que este programa precisa expandir a sua área de cobertura.

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

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

## ABSTRACT

Recife (northeast Brazil) is a lymphatic filariasis endemic city and, since 2003, a control program has been accomplished to interrupt the transmission of the disease. Strategies include actions for controlling *Culex quinquefasciatus* populations, the unique filariasis vector in Brazil, such as elimination of mosquito breeding sites and biological control through bimonthly treatment using *Bacillus sphaericus*. To assess the impact of this intervention on the vector population, the genetic diversity of *Cx. quinquefasciatus* population was monitored for 3 years in a treated area. We have analyzed data from neutral marker, microsatellites, and a putative under selection pressure marker, *cqm1* gene, which codifies the *B. sphaericus* toxin receptor. A slight loss of genetic diversity, revealed by microsatellites data, was detected by allelic richness parameter. The emergence of low frequencies alleles as well as some point mutations in expected heterozygosity parameter, suggestive of immigration, were also detected along the time. An increasing in the resistance allele (*cqm1<sub>REC</sub>*) frequency was found in this study. The analysis of both markers detected no genetic structuring in *Cx. quinquefasciatus* population. Results showed that vector control program did not impact drastically the genetic diversity of *Cx. quinquefasciatus* population. Our results suggest that despite the reduction of annual entomological densities values, provided by Recife Department of Health, this *Cx. quinquefasciatus* population might recover its original densities if those activities were interrupted. Migration events, also suggested in this study, indicated that the program needs to enlarge its coverage area.

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

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Ciclo biológico do mosquito *Culex quinquefasciatus*, mostrando os quatro estágios distintos, ovo, larva, pupa e adulto. A) Fêmea realizando oviposição, B) larvas, C) pupas e D) fêmea adulta realizando a hematofagia. .... 19
- Figura 2** - Países e territórios que possuem regiões onde a filariose linfática é considerada como uma doença endêmica no ano de 2006. .... 22
- Figura 3** - Esquema da base genética dos marcadores de microssatélites bem como da detecção de seus polimorfismos. A: Genótipo de um indivíduo homozigoto [(CA)<sub>10</sub>/(CA)<sub>10</sub>]. B: Genótipo de um indivíduo heterozigoto [(CA)<sub>13</sub>/(CA)<sub>15</sub>]. C: Gel de eletroforese com os genótipos de diferentes indivíduos diplóides homozigotos (1 fragmento) e heterozigotos (2 fragmentos). .... 35
- Figura 4** - Mapa da área de intervenção piloto do programa de controle da filariose indicando a zona de avaliação (ZA), a zona de barreira (ZB) e o limite real escolhido como ZB. Na ZA, núcleo da área de intervenção piloto, estão indicadas as estações de capturas de *Culex quinquefasciatus* adultos, onde foram instaladas armadilhas luminosas. .... 38
- Figura 5** - Mapa da área de intervenção piloto do programa de controle da filariose indicando a zona de avaliação (ZA), a zona de barreira (ZB) e o limite real escolhido como ZB. Na ZA, núcleo da área de intervenção piloto, estão indicadas as estações de capturas de *Culex quinquefasciatus* adultos, onde foram instaladas armadilhas luminosas. Os círculos destacados em vermelho assinalam todos os 7 locais de coleta das formas jovens da espécie *Culex quinquefasciatus* ao longo dos diferentes momentos de estudo. .... 45
- Figura 6** - Eletroferogramas gerados para 4 indivíduos da espécie *Culex quinquefasciatus* através da análise de fragmentos para os *loci* CxqGT8 (picos azuis iniciais da esquerda para a direita), CxqCTG10 (picos verdes iniciais da esquerda para a direita), CQ29 (picos azuis centrais), CxqCAG101 (picos verdes centrais) e CxqATG9 (picos azuis finais da esquerda para a direita). .... 57
- Figura 7** - Média da riqueza de alelos para os cinco *locus* de microssatélites avaliados nos diferentes momentos de estudo, iniciado a partir do primeiro mês de coleta. .... 61
- Figura 8** - Média da heterozigosidade esperada obtida para os cinco *loci* de microssatélites avaliados nos diferentes momentos de estudo, iniciado a partir do primeiro mês de coleta. .... 62
- Figura 9** - Análise de regressão entre a diferenciação genética ( $F_{ST}$  corrigido) e o tempo de separação entre as coletas para os 5 *loci* de microssatélites. A: Comparações considerando

todos os momentos estudados, os pontos em vermelho destacam apenas as comparações par-a-par com a 2ª coleta, os que estão em verde destacam as comparações par-a-par com a 7ª coleta, o ponto cinza mostra a comparação entre a 2ª e a 7ª coleta e os pontos azuis mostram as comparações entre as coletas restantes. B: Comparações excluindo os 2º e o 7º momentos de coleta..... 63

**Figura 10** - Perfis dos produtos de PCR do gene *cqml*, visualizados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. Poços 2 a 4: indivíduos homozigotos sem deleção (genótipo susceptível). Poços 5 a 7: indivíduos homozigotos com deleção (genótipo resistente). Poços 8 a 10: indivíduos heterozigotos (genótipo susceptível). Poços 1 e 11: ladder 100 pb (New England Biolabs®). ..... 66

**Figura 11** - Heterozigosidade esperada obtida para gene *cqml* avaliada nos diferentes momentos de estudo, iniciados a partir do primeiro mês de coleta. .... 67

**Figura 12** - Análise de regressão entre a diferenciação genética ( $F_{ST}$  corrigido) e o tempo de separação entre as coletas, para o gene *cqml*. A: Comparações considerando todos os momentos estudados, os pontos vermelhos destacam apenas as comparações par - a - par com a 1ª coleta enquanto os pontos azuis mostram as comparações entre as coletas restantes. B: Comparações excluindo o 1º momento de coleta. .... 69

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> - Amplitude de variação nos tamanhos dos alelos, em pares de bases, encontrada para 11 <i>loci</i> de microssatélites na espécie <i>Culex quinquefasciatus</i> descritos por Edillo et al. (2007), Fonseca; Atkinson; Fleischer (1998), Fonseca; Lapointe; Fleischer (2000), Fonseca et al. (2006) e Smith et al. (2005).....	48
<b>Tabela 2</b> - <i>Loci</i> de microssatélites analisados no estudo, com as suas respectivas seqüências de <i>primers</i> , repetições dos microssatélites e concentrações de cada <i>primer</i> e do MgCl <sub>2</sub> utilizados nas amplificações. ....	49
<b>Tabela 3</b> - Matriz mostrando o tempo de separação, em meses, entre os diferentes momentos de estudo.....	51
<b>Tabela 4</b> - Amplitude de variação nos tamanhos dos alelos (cor preta), em pares de bases, encontrada para 11 <i>loci</i> de microssatélites na espécie <i>Culex quinquefasciatus</i> , descritos por Edillo et al. (2007), Fonseca; Atkinson; Fleischer (1998), Fonseca; Lapointe; Fleischer (2000), Fonseca et al. (2006) e Smith et al. (2005), e variação nos tamanhos dos alelos (cores cinza, azul e verde), em pares de bases, encontradas para as amostras provenientes de Água Fria nestes mesmos <i>loci</i> . As amplitudes de fragmentos em azul são relativas aos <i>loci</i> CQ29, CxqGT8 e CxqATG9, cujos <i>primers</i> foram marcados com o fluoróforo Cy5, enquanto que as verdes são referentes aos <i>loci</i> CxqCTG10 e CxqCAG101, cujos <i>primers</i> foram marcados com o fluoróforo Cy5.5. ....	56
<b>Tabela 5</b> - Número e freqüência de alelos encontrados para cada um dos 5 <i>loci</i> de microssatélite nos diferentes momentos de estudo. Os valores em negrito correspondem aos alelos raros e os sublinhados àqueles que foram encontrados em baixa freqüência. ....	59
<b>Tabela 6</b> - Riqueza de alelos obtida para cada <i>locus</i> de microssatélite e média da riqueza de alelos entre os cinco <i>locus</i> nos diferentes momentos de estudo, baseado no tamanho amostral mínimo de 9 indivíduos diplóides. ....	60
<b>Tabela 7</b> - Heterozigosidade esperada obtida para cada <i>locus</i> de microssatélite e média da heterozigosidade esperada entre os cinco <i>loci</i> nos diferentes momentos de estudo.....	61
<b>Tabela 8</b> - Valores de diferenciação genética ( $F_{ST}$ corrigido) entre os diversos momentos de coleta (diagonal inferior) e seus respectivos níveis de significância (p) (diagonal superior), obtidos através da estimativa total para os 5 <i>loci</i> de microssatélites. Os valores em negrito referem-se àqueles estatisticamente significantes. ....	63

<b>Tabela 9</b> - Valores do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), com seus respectivos níveis de significância (p), para cada um dos 5 <i>locus</i> de microssatélite nos diferentes momentos de estudo. Os valores em negrito referem-se àqueles estatisticamente significantes.....	64
<b>Tabela 10</b> - Comparações entre cada par de <i>locus</i> para detecção de desequilíbrio de ligação, considerando conjuntamente os 5 <i>loci</i> de microssatélites nos 8 momentos estudados, através do teste do qui-quadrado.....	65
<b>Tabela 11</b> - Frequências alélicas, número de alelos e heterozigosidade esperada obtidos para o gene <i>cqm1</i> nos diferentes momentos de estudo.....	67
<b>Tabela 12</b> - Valores de diferenciação genética ( $F_{ST}$ corrigido) entre os diversos momentos de coleta (diagonal esquerda abaixo) e seus respectivos níveis de significância (p) (diagonal direita acima), obtidos através da análise do gene <i>cqm1</i> . Os valores em negrito referem-se àqueles estatisticamente significantes. ....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Ace</i>	gene que codifica a enzima acetilcolinesterase
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
<i>cqml</i>	gene que codifica a enzima maltase 1 de <i>Culex quinquefasciatus</i>
<i>cqml</i> <sub>REC</sub>	gene que codifica a enzima maltase 1 de <i>Culex quinquefasciatus</i> com a deleção de 19 nucleotídeos
DDT	diclorodifeniltricloroetano
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
<i>Ester</i>	gene que codifica a enzima esterase
F <sub>ST</sub>	coeficiente de diferenciação genética
F <sub>IS</sub>	coeficiente de endocruzamento
GPI	glicosilfosfatidilinositol
h	hora
H <sub>E</sub>	heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (Nei, 1987)
H <sub>O</sub>	heterozigosidade observada
min	minutos
N	tamanho amostral
n <sub>a</sub>	número de alelos por <i>locus</i>
N <sub>E</sub>	tamanho efetivo da população
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PENFL	Plano de Eliminação Nacional da Filariose Linfática
RMR	Região Metropolitana de Recife
rpm	rotações por minuto
R <sub>S</sub>	riqueza de alelos
seg	segundos
U	unidades
V	volts

## SUMÁRIO

<b>1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA</b> .....	15
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	18
<b>2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i></b> .....	18
2.1.1 Distribuição geográfica.....	18
2.1.2 Biologia e ecologia .....	18
2.1.3 Importância na saúde pública .....	21
2.1.3.1 <i>Filariose linfática</i> .....	21
2.1.3.2 <i>Arboviroses</i> .....	25
<b>2.2 Controle biológico</b> .....	26
2.2.1 <i>Bacillus sphaericus</i> .....	27
2.2.2 Resistência à toxina binária do <i>Bacillus sphaericus</i> .....	28
<b>2.3 Genética de populações</b> .....	29
2.3.1 Medidas de variabilidade genética .....	31
2.3.2 Estrutura genética populacional .....	32
<b>2.4 Marcadores moleculares</b> .....	33
2.4.1 Microssatélites .....	34
<b>2.5 Programa de controle da filariose em Recife/PE</b> .....	36
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	40
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	41
<b>5 HIPÓTESE</b> .....	42
<b>6 OBJETIVOS</b> .....	43
<b>6.1 Objetivo geral</b> .....	43
<b>6.2 Objetivos específicos</b> .....	43
<b>7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	44
<b>7.1 Área de estudo</b> .....	44
<b>7.2 Amostragem</b> .....	44
<b>7.3 Extração de DNA total</b> .....	45
<b>7.4 Estudo com o marcador neutro</b> .....	46
7.4.1 Amplificação de microssatélites .....	46
7.4.2 Separação por tamanho de fragmentos e identificação dos alelos de microssatélites .....	49
7.4.3 Análise dos dados de microssatélites .....	50

<b>7.5 Estudo com o marcador sob pressão de seleção.....</b>	<b>51</b>
7.5.1 Amplificação do gene <i>cqm1</i> .....	52
7.5.2 Identificação dos alelos <i>cqm1</i> e <i>cqm1<sub>REC</sub></i> .....	52
7.5.3 Análise dos dados do gene <i>cqm1</i> .....	53
<b>7.6 Comparação entre os microssatélites e o gene <i>cqm1</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>8 RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>8.1 Estudo com microssatélites .....</b>	<b>55</b>
<b>8.2 Estudo com o gene <i>cqm1</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>8.3 Comparação entre os microssatélites e o gene <i>cqm1</i> .....</b>	<b>69</b>
<b>9 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>10 CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>93</b>
<b>Apêndice A – Artigo .....</b>	<b>93</b>
<b>Apêndice B – Parecer Comitê de Ética .....</b>	<b>113</b>

## 1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

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

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

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

Fria, um dos bairros mais populosos de Recife, o qual foi selecionado por apresentar um nível de prevalência significativa (6,21%) e ser considerado de alto risco sócio-ambiental (RECIFE, 2003).

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

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

MHARAKURWA; NORRIS, 2007; WONDJI et al., 2005). O presente trabalho objetivou avaliar se as ações no âmbito Programa de Controle da Filariose em Recife estão sendo capazes de reduzir a diversidade genética e causar uma estruturação genética na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria. Para tanto foram utilizados marcadores neutros (microsatélites) e sob pressão de ao *B. sphaericus* (gene *cqm1*).

---

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

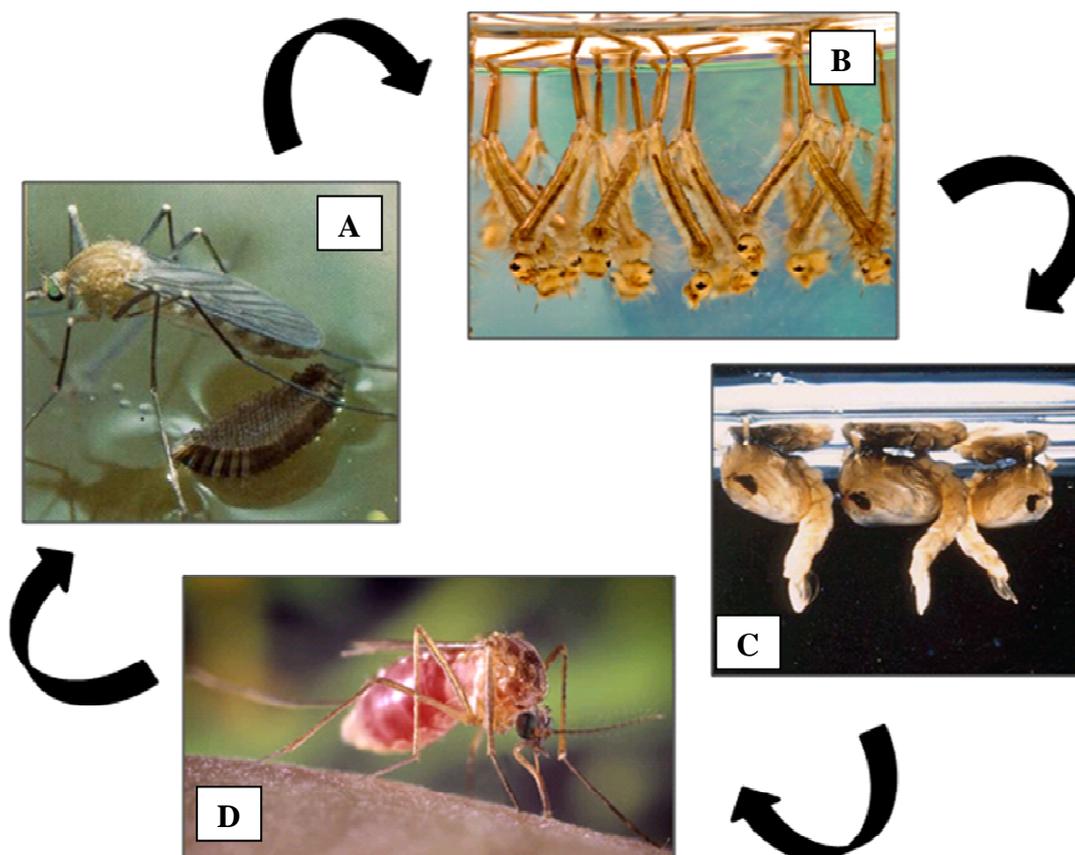
### 2.1 *Culex quinquefasciatus*

#### 2.1.1 Distribuição geográfica

*Culex quinquefasciatus* é uma espécie de inseto pertencente à ordem Diptera e à família Culicidae, popularmente conhecida no Brasil como muriçoca, pernilongo ou carapanã. Tal espécie apresenta distribuição trópico-cosmopolita, ocorrendo basicamente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. São encontrados principalmente na África, Américas, Oceania e em regiões meridionais da Ásia, estando ausentes apenas no extremo norte de algumas regiões temperadas. No Brasil, a espécie *Cx. quinquefasciatus* distribui-se por todo o território. Estes insetos têm sua ocorrência e abundância bastante influenciadas pela presença do homem, associando-se a aglomerados humanos tanto em áreas urbanas como em vilas rurais (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

#### 2.1.2 Biologia e ecologia

O *Culex quinquefasciatus* é um inseto holometábolo e seu ciclo de vida compreende quatro estágios distintos, ovo, larva, pupa e adulto (figura 1) A fase larval apresenta-se subdividida em quatro estádios (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub>). Durante a fase adulta habitam ambientes terrestres enquanto que nos estágios juvenis (ovo, larva e pupa) vivem em meio aquático. Apesar de serem encontrados durante todo o ano, estes mosquitos predominam nos períodos quentes e chuvosos, devido ao maior acúmulo de água o que promove a ampliação no número de seus criadouros (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Em condições laboratoriais, já se relatou que esta espécie foi capaz de produzir até 17 gerações no período de um ano (REGIS et al., 2000).



**Figura 1** - Ciclo biológico do mosquito *Culex quinquefasciatus*, mostrando os quatro estágios distintos, ovo, larva, pupa e adulto. A) Fêmea realizando oviposição, B) larvas, C) pupas e D) fêmea adulta realizando a hematofagia.

**Fonte:** CULEX (2006); GROSS (2006); CULEX (2008); GATHANY (2008).

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

Os insetos adultos são altamente endofílicos, ou seja, vivem no interior das habitações humanas e também podem ser localizados em abrigos no peridomicílio. Eles são capazes de se acasalar em pequenos espaços, o que os caracteriza como estenogâmicos. Embora se abrigue nas residências humanas durante todo o dia, esta espécie comumente têm hábito

noturno, uma vez que as fêmeas só estimular-se-ão a exercer hematofagia à noite, preferencialmente nos horários mais avançados e nos momentos que precedem o amanhecer. Apenas as fêmeas exercem hematofagia, devido à necessidade de sangue para a maturação de seus ovos. Este mosquito é altamente antropofílico, porém apresenta a capacidade de alimentar-se em outros animais, sendo que, secundariamente ao homem, as fêmeas buscam realizar a hematofagia em aves domésticas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

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

A partir dos ovos eclodem as larvas de 1º estágio ( $L_1$ ), as quais sofrem mudas e atingem os outros 3 estádios ( $L_2$ ,  $L_3$  e  $L_4$ ). As larvas de *Cx. quinquefasciatus* são aquáticas e demonstram bastante mobilidade. Elas são filtradoras e se alimentam ativamente de microorganismos como bactérias, fungos, algas ou partículas de materiais orgânicos presentes neste meio (FORATTINI, 1962). Estando ao seu alcance, qualquer partícula de tamanho viável espalhada no meio líquido, pode ser ingerida pela larva. Devido a esta incapacidade de seleção alimentar, a ingestão de larvicidas biológicos, eventualmente utilizados para controle do inseto, é bastante facilitada. O desenvolvimento destas larvas pode ocorrer em locais com pouca ou nenhuma luz, a exemplo de galerias de água e esgotos (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

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

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

---

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

### 2.1.3 Importância na saúde pública

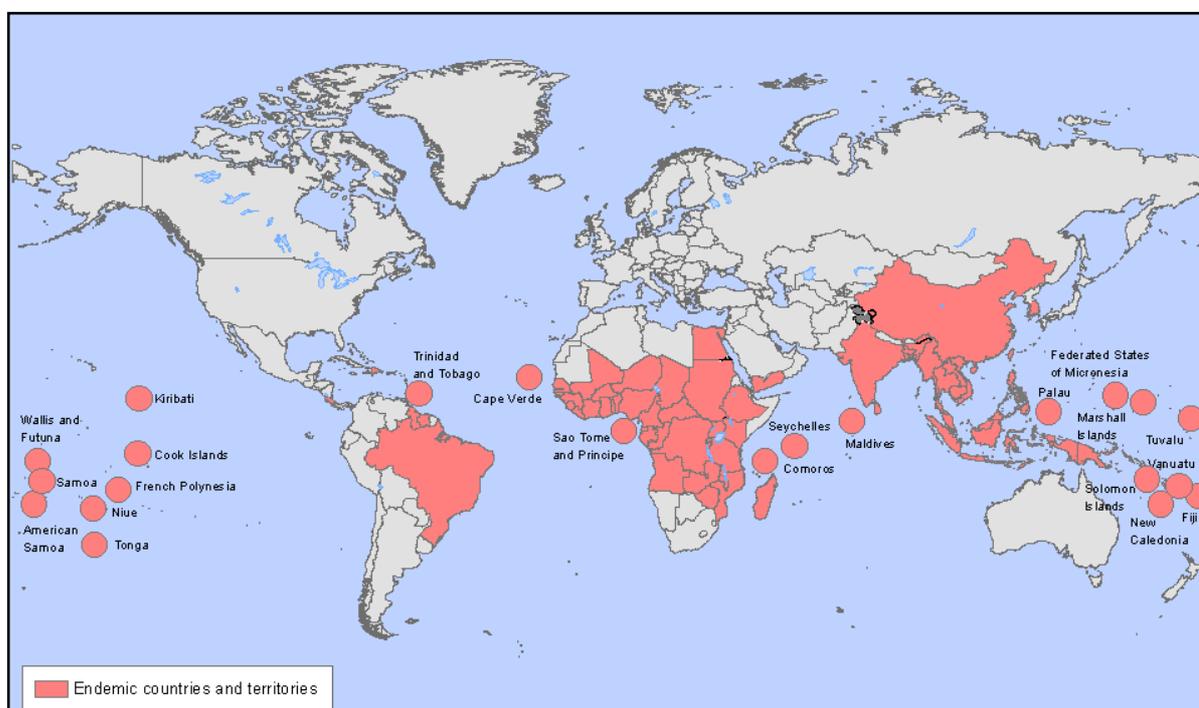
A espécie *Culex quinquefasciatus* têm uma grande importância médica uma vez que está implicada na transmissão de parasitas e patógenos, como nematóides e vírus, capazes de causar a filariose linfática e algumas arboviroses em seres humanos (ELDRIDGE, 2005). Devido ao seu comportamento hematofágico, os mosquitos estão aptos a adquirirem parasitas e patógenos de um hospedeiro infectado. Se sua fisiologia e ecologia forem apropriadas, os mosquitos também serão capazes de transmitir os agentes patogênicos a hospedeiros sadios (BECKER et al., 2003). Além disso, esta espécie *Cx. quinquefasciatus* ainda exerce um grande incômodo à população humana por provocar coceiras e alergias em resposta às suas picadas (VINOGRADOVA, 2000).

#### 2.1.3.1 Filariose linfática

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

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

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



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

**Fonte:** WHO (2006).

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

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

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

et al., 2003), Olinda/PE (BRAGA et al., 2005) e Recife/PE são considerados focos endêmicos importantes de transmissão (MACIEL et al., 1996; MEDEIROS et al., 2003).

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

O parasita *W. bancrofti* apresenta um ciclo biológico compreendido por estágios que se desenvolvem em hospedeiros humanos e mosquitos. Inicialmente o mosquito ingere as formas jovens do parasita (microfilárias) ao realizar a hematofagia em um hospedeiro infectado. As microfilárias transpõem as barreiras do sistema digestivo do inseto e atingem seus músculos torácicos, onde sofrem transformações morfológicas, passando por 3 estágios larvários. A larva de terceiro estágio (L<sub>3</sub>), considerada a forma infectiva, abandona os músculos torácicos e desloca-se até a probóscide do vetor (REY, 2002). Quando o inseto realiza novamente a hematofagia no homem, a L<sub>3</sub> do parasito é transferida, através da probóscide para a pele do indivíduo sadio, penetrando por movimento ativo. As L<sub>3</sub> da *W. bancrofti* encaminham-se aos vasos linfáticos e linfonodos, onde sofrem mais duas mudas (L<sub>4</sub> e adultos juvenis) e se transformam em adultos. A partir da reprodução sexuada destes parasitos é produzida uma grande quantidade de microfilárias, as quais são liberadas na circulação sangüínea através do ducto torácico. Desta maneira as microfilárias ficam disponíveis novamente para serem ingeridas pelos mosquitos no ato da hematofagia, reiniciando todo o ciclo (DREYER; NORÕES, 2001).

Ao longo do dia observa-se um acúmulo de microfilárias de *W. bancrofti* no interior da rede vascular sangüínea dos tecidos e órgãos mais internos, principalmente nos pulmões, o que impede a sua detecção na circulação periférica. Durante a noite, o fato é oposto, pois elas passam a migrar para a circulação sangüínea periférica permitindo a sua detecção no sangue. Este comportamento do parasito, observado na maioria dos territórios de ocorrência da filariose bancroftiana, é caracterizado como periodicidade noturna das microfilárias. A maior concentração de microfilárias no sangue periférico é encontrada entre as 23:00 e 01:00 horas. Em decorrência deste horário preferencial, nas áreas onde há periodicidade das microfilárias,

os mosquitos que se alimentam à noite estão implicados como os vetores primários da *W. bancrofti* (FONTES, 2002). Tal fato, juntamente com a grande antropofilia do *Culex quinquefasciatus*, facilita o contato das microfilárias com este vetor, o que o torna mais eficaz que outras espécies de mosquitos susceptíveis (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Em países do Sudeste asiático e do Pacífico Sul, existe ainda as formas subperiódicas ou aperiódicas, onde os principais transmissores do parasito, mosquitos do gênero *Aedes*, exercem hematofagia durante o dia (FONTES, 2002).

### 2.1.3.2 Arboviroses

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

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

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

pode produzir desde quadros clínicos assintomáticos até casos neuroinvasivos graves e fatais, caracterizados por encefalites e meningites (BLITVICH, 2008).

## 2.2 Controle biológico

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

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

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

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

### 2.2.1 *Bacillus sphaericus*

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

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

O modo de ação da toxina binária consiste em diversas etapas, desencadeadas após a ingestão do cristal protéico pela larva do mosquito. Inicialmente, o cristal é solubilizado em pH intestinal alcalino e a protoxina, liberada no lúmen, é clivada proteoliticamente

(DAVIDSON, 1988), atingindo a forma de toxina ativa ao originar os fragmentos menores BinA e BinB (BROADWELL; BAUMANN, 1987). Esta toxina ativa interage com as células do ceco gástrico e do intestino posterior da larva através da ligação a receptores específicos na membrana celular (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; CHARLES et al., 1997; SILVA-FILHA; CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1997). Tal interação resulta em diversos efeitos citopatológicos como o surgimento de vacúolos citoplasmáticos, expansões mitocondriais, destruição das microvilosidades intestinais e intumescimento celular (CHARLES, 1987; SINGH e GILL, 1988; PAUCHET et al., 2005; MELO et al. 2008).

Conforme descrito acima, a sensibilidade das larvas de mosquitos vetores ao *B. sphaericus* deve-se à ligação da toxina binária a receptores específicos presentes em seus epitélios intestinais (NIELSEN-LEROUX; CHARLES, 1992; CHARLES et al., 1997; SILVA-FILHA; CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1997). Nas espécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, indicadas como uma das mais susceptíveis a esta bactéria, o receptor da toxina binária foi apontado como sendo uma maltase do tipo  $\alpha$ -glicosidase ligada à membrana do epitélio intestinal destas larvas, através de uma âncora GPI (SILVA-FILHA; CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 1999; DARBOUX et al., 2001). A proteína receptora da toxina binária foi denominada de Cpm1 e Cqm1 nas espécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, respectivamente.

### 2.2.2 Resistência à toxina binária do *Bacillus sphaericus*

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

Recentemente foram elucidadas as bases moleculares de três diferentes mecanismos de resistência ao *B. sphaericus* nas espécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*. Em todos os três casos, a falha de ligação da toxina ao receptor  $\alpha$ -glicosidase foi apontada como o mecanismo

de resistência. Estes estudos foram realizados com duas colônias de laboratório, uma proveniente do Brasil (CqRL1/2362) (ROMÃO et al., 2006) e outra dos Estados Unidos (GEO) (DARBOUX et al., 2002), e com a uma população natural, proveniente da França (BP) (DARBOUX et al., 2007).

O estudo realizado por Romão et al. (2006) com a colônia CqRL1/2362, fundada a partir de amostras de *Cx. quinquefasciatus* provenientes do bairro do Coque em Recife, indicou uma deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1* como a responsável pelo mecanismo de resistência deste inseto à toxina do *B. sphaericus*. Esta deleção está implicada numa mudança da matriz de leitura (ORF), que leva à formação de um códon de terminação prematuro no RNA mensageiro, impedindo a síntese completa da proteína Cqm1. Como resultado, a proteína gerada perde mais de um quarto do seu tamanho original, incluindo a perda da âncora GPI, o que a impossibilita de desempenhar sua função como proteína de membrana. Tal processo conseqüentemente é responsável por impedir que a toxina binária se ligue às células do epitélio intestinal destes insetos, fazendo com que estes sejam resistentes à bactéria (ROMÃO et al., 2006). Mais recentemente Chalegre et al. (2009) detectaram esta deleção em populações naturais de *Cx. quinquefasciatus*, provenientes de três localidades no estado de Pernambuco, e o alelo com a deleção de 19 nucleotídeos passou a ser denominado de *cqm1<sub>REC</sub>* (CHALEGRE et al., 2009).

### 2.3 Genética de populações

A genética de populações é o ramo da genética que visa o estudar as variações genéticas nas populações naturais e as forças que determinam e alteram as composições destas populações. Seu principal objetivo é esclarecer os mecanismos capazes de manter a homogeneidade e quais as forças responsáveis por gerar diferenciação genética entre as populações no meio ambiente (BLACK; TABACHNICK, 2005). Para tanto, esta ciência agrupa a observação e a teoria com o intuito de compreender tanto as alterações genéticas intrapopulacionais como entre populações (HARTL, 1988). As abordagens da genética de populações permitem ainda diferenciar os efeitos específicos inerentes a certos *loci*, causados por processos de seleção, mutação ou recombinação, daqueles que afetam todo o genoma, provocados pela deriva, efeito de gargalo, fluxo gênico ou endocruzamento (BLACK;

TABACHNICK, 2005; LUIKARD et al., 2003). Os efeitos que afetam todo o genoma informam sobre a demografia da população e sobre sua história filogenética, ao passo que, os efeitos específicos de certos *loci* auxiliam apenas na identificação de genes que são importantes para o *fitness* e para a adaptação. Os *loci* neutros de um genoma são igualmente afetados pela demografia e história evolucionária da população enquanto que os *loci* sob pressão de seleção apresentam padrões de variações ou comportamentos extremamente diferentes do restante do genoma. *Loci* neutros são aqueles que não evoluem diretamente em resposta a uma pressão de seleção, uma vez que, a sua dinâmica está controlada principalmente pela deriva genética e pela migração. Conseqüentemente os *loci* neutros são herdados de acordo com as leis mendelianas e encontram-se nas proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg (LUIKART et al., 2003).

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

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

variabilidade enzimática como adaptativa, resultante de processos seletivos (SOLFERINI; SELIVON, 2004).

### 2.3.1 Medidas de variabilidade genética

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

O número de alelos por *locus* ( $n_a$ ) pode ser empregado para mensurar a variabilidade genética, entretanto há algumas desvantagens no que se refere a este parâmetro, uma vez que o número de alelos observados depende fortemente do tamanho amostral. Esta dependência ocorre devido aos inúmeros alelos encontrados com baixa frequência nas populações naturais. Assim, o aumento do tamanho amostral é acompanhado por um aumento na probabilidade de se encontrar estes alelos pouco frequentes. Então, as comparações de  $n_a$  entre diferentes amostras não serão significativas, ao menos que, os tamanhos amostrais sejam similares (NEI, 1987).

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

A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) corresponde à proporção observada de heterozigotos em uma população. Já a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), também denominada

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

### 2.3.2 Estrutura genética populacional

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

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

$H_E$  média do total de populações e, para a obtenção do  $F_{IT}$ , consideram-se a  $H_O$  média intrapopulacional e a  $H_E$  média do total de populações (NEI; KUMAR, 2000).

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

## 2.4 Marcadores moleculares

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

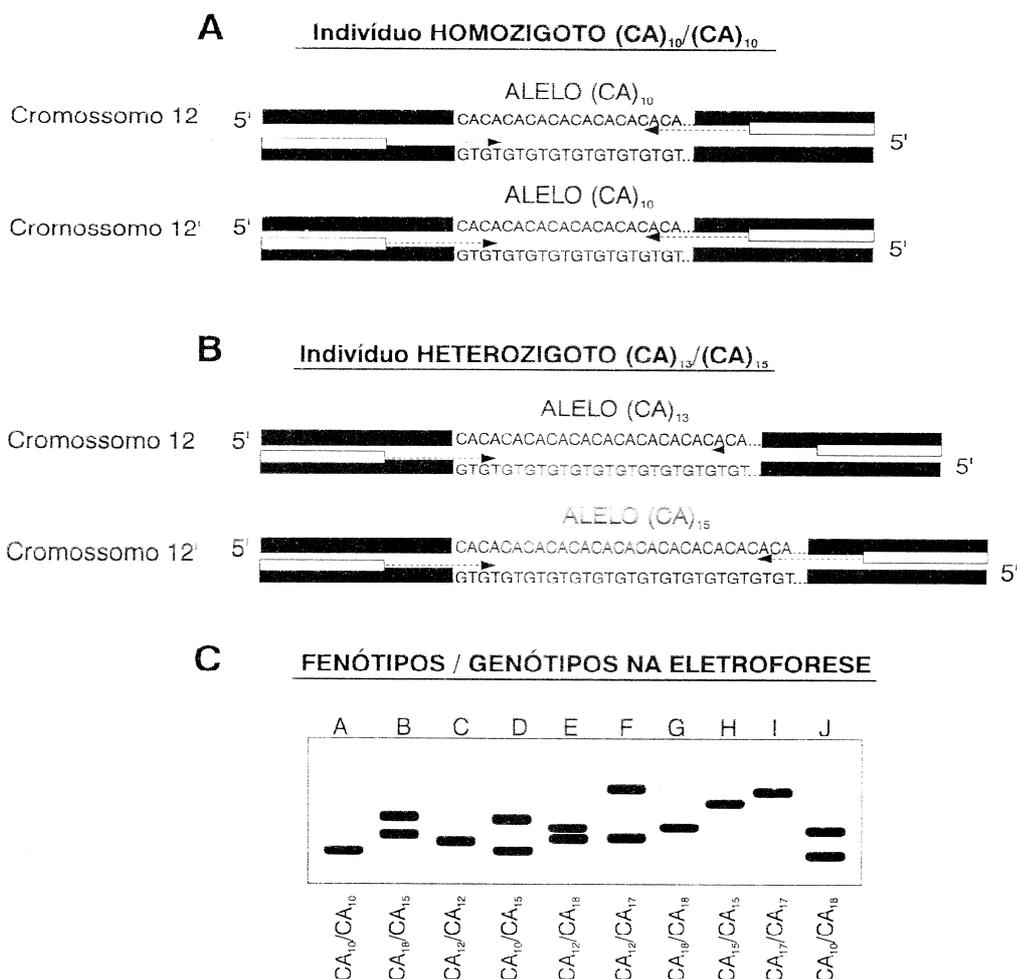
Atualmente diferentes técnicas moleculares vêm sendo freqüentemente empregadas em análises de genética de populações, podendo-se destacar dentre elas o RFLP (Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição), o RAPD (Polimorfismo de DNA

---

Amplificado Randomicamente), as Isoenzimas, os Microssatélites (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), o SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples) (BLACK; DUTEAU, 1997), PCRs e o seqüenciamento de genes ou regiões específicas do DNA mitocondrial e de RNA ribossomal (HOY, 2003).

#### 2.4.1 Microssatélites

Até o presente momento, os microssatélites são apontados como a classe de marcadores moleculares mais polimórfica disponível. Eles consistem de pequenas seqüências repetidas em tandem, compostas por 1 a 4 nucleotídeos de comprimento. São encontrados em genomas de diversos organismos eucariotos, geralmente com bastante frequência e apresentando distribuição ao acaso. A detecção destes marcadores é feita através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando pares de *primers* específicos e complementares à seqüência flanqueadora do microssatélite. Cada grupo de elementos repetidos de um único microssatélite representa um *locus* enquanto que cada segmento amplificado de tamanho diferente, variando desde poucos até algumas centenas de pares de bases, representa um alelo diferente para este mesmo *locus* (figura 3). A visualização dos produtos de PCR pode ser feita em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata, ou de agarose de alta resolução, corado com brometo de etídio, através de autoradiografia, quando se utiliza *primers* marcados com radioisótopos, (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) ou ainda através da genotipagem por análise de fragmentos com *primers* marcados por fluorescência, o que envolve a utilização de programas adequados para a visualização dos resultados.



**Figura 3** – Esquema da base genética dos marcadores de microsatélites bem como da detecção de seus polimorfismos. A: Genótipo de um indivíduo homocigoto [(CA)<sub>10</sub>/(CA)<sub>10</sub>]. B: Genótipo de um indivíduo heterocigoto [(CA)<sub>13</sub>/(CA)<sub>15</sub>]. C: Gel de eletroforese com os genótipos de diferentes indivíduos diplóides homocigotos (1 fragmento) e heterocigotos (2 fragmentos).

**Fonte:** FERREIRA; GRATTAPAGLIA (1998).

A técnica de microsatélites permite genotipar inúmeros *loci* em um grande tamanho amostral. Através deste marcador molecular é possível visualizar ambos os alelos, pertencentes a um determinado *locus* de microsatélite, de um indivíduo heterocigoto, exceto no caso em que houver alelos nulos. Por isso estes marcadores são denominados de co-dominantes. Associado à co-dominância, o fato destes marcadores também serem multialélicos faz com que eles sejam considerados como os que possuem o mais elevado conteúdo de polimorfismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores do tipo

microsatélite são bastante informativos para estudos de estruturação genética de populações naturais. Os *loci* mais adequados para estas análises devem atender aos seguintes critérios: apresentar herança Mendeliana co-dominante, ser polimórfico, não estar sujeito a pressão de seleção (seletivamente neutro), estar associado randomicamente, não apresentar alelos nulos e ser abrangente no genoma (EDILLO et al., 2007).

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

## 2.5 Programa de controle da filariose em Recife/PE

Durante os anos de 1999 e 2000, foi realizado um inquérito para estudar a prevalência da filariose por microrregião na cidade de Recife/PE, no intuito de definir as áreas prioritárias para consolidação do programa de controle de filariose em Recife/PE (PLANO, 2006). O Distrito Sanitário II foi o que apresentou a maior prevalência no município, com destaque para os bairros de Água Fria e Alto Santa Terezinha, localizados na microrregião 2. Estes apresentaram respectivamente prevalências de 6,21% e 10,37% (RECIFE, 2003).

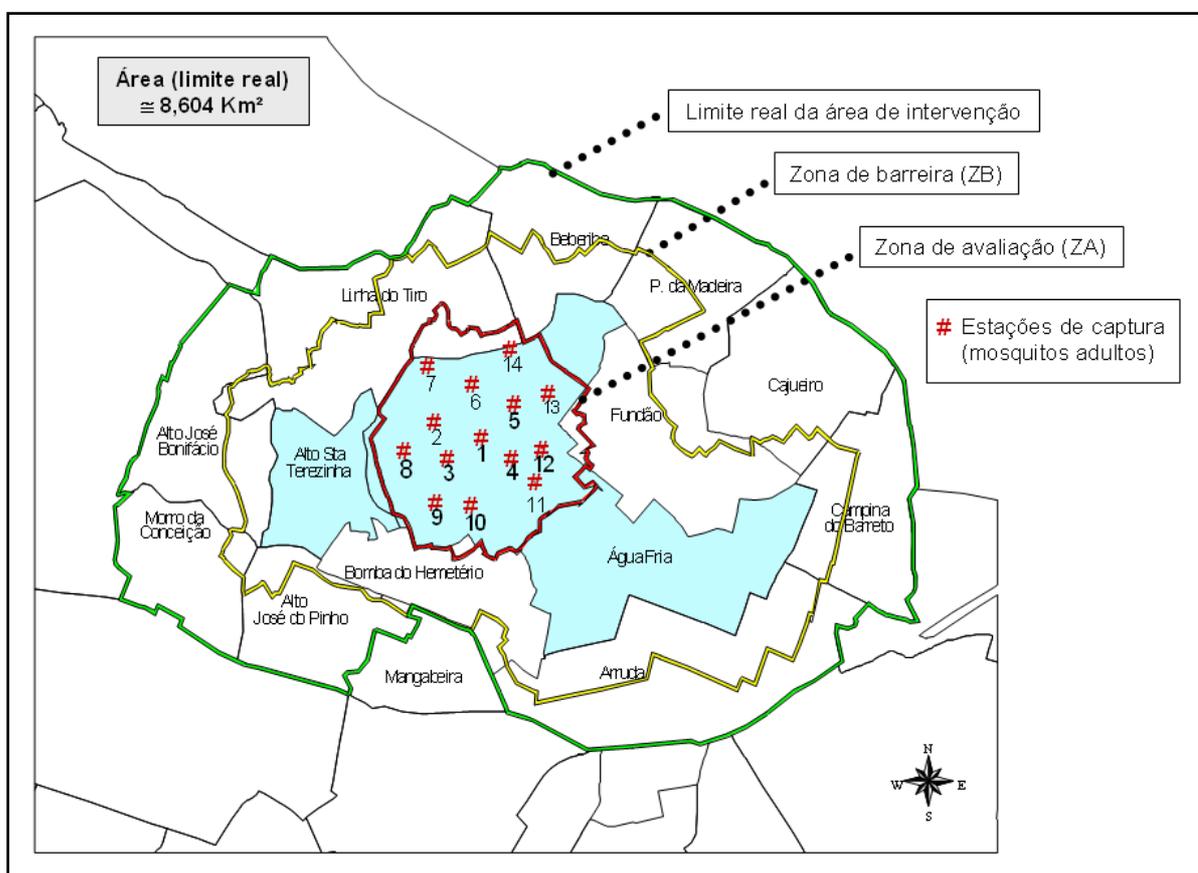
Em março de 2003, a Prefeitura de Recife iniciou um programa de controle da filariose visando a sua eliminação, no qual foram promovidas medidas de combate ao vetor *Culex quinquefasciatus* e o tratamento quimioterápico em massa da população humana com a dietilcarbamazina (DEC). Aqui serão detalhadas apenas as ações voltadas para o controle do

mosquito as quais são responsáveis pela diminuição do risco de transmissão desta doença. O programa integrou métodos mecânicos (reparo e/ou eliminação dos criadouros do vetor), métodos biológicos (aplicação bimestral de produtos à base do biolarvicida *Bacillus sphaericus*) e atividades de educação em saúde, com participação efetiva da comunidade, no intuito de garantir a continuidade das ações. Além disso, o programa buscou avaliar o impacto de suas atividades através de indicadores entomológicos (densidade de mosquitos adultos, densidade relativa de larvas e pupas, índice de imóveis com criadouros e índice de infecção vetorial) (RECIFE, 2003) e do monitoramento da susceptibilidade do *Cx. quinquefasciatus* ao *B. sphaericus* (ensaios *in vivo* de formas pré-imaginais do inseto, coletadas na área sob intervenção para cálculo das  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) (SILVA-FILHA et al., 2008).

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

A área de intervenção piloto foi subdividida em zona de avaliação (ZA) e zona de barreira (ZB). A ZA, localizada apenas em Água Fria, corresponde ao núcleo da área de intervenção de controle vetorial e foi selecionada para o monitoramento dos índices entomológicos, no intuito de avaliar o impacto das medidas de controle adotadas. A ZA corresponde à região de maior prevalência de filariose em todo o Distrito Sanitário II. A ZB, que circunda a ZA, apresenta uma extensão territorial que garante uma proteção contra a introdução de mosquitos de áreas circunvizinhas. Seiscentos metros a partir da ZA seriam suficientes para garantir a sua proteção. Esta distância representaria apenas uma parte dos bairros limítrofes referidos acima, entretanto, devido a razões operacionais, a delimitação foi feita considerando o limite de cada bairro, o que ampliou a extensão territorial da ZB (figura

4). Ambas as zonas foram submetidas às mesmas intervenções de controle vetorial, no entanto, a coleta dos dados entomológicos foi feita apenas na ZA (RECIFE, 2003).



**Figura 4** - Mapa da área de intervenção piloto do programa de controle da filariose indicando a zona de avaliação (ZA), a zona de barreira (ZB) e o limite real escolhido como ZB. Na ZA, núcleo da área de intervenção piloto, estão indicadas as estações de capturas de *Culex quinquefasciatus* adultos, onde foram instaladas armadilhas luminosas.

**Fonte:** RECIFE (2003).

Em 2003 foi firmada uma parceria entre o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz e a Secretaria de Saúde da Prefeitura de Recife, no âmbito deste programa, e o nosso grupo vem empregando ferramentas moleculares para monitorar o efeito das ações de controle vetorial em Água Fria. Através do diagnóstico molecular, Cartaxo et al. (2007) observaram redução no percentual de infecção pelo parasito nas populações do vetor. Em um estudo anterior, utilizando marcadores neutros, mostramos que variações temporais na diversidade genética intrapopulacional podem ser úteis como ferramenta para acompanhar flutuações na composição genética de uma população de *Cx. quinquefasciatus* sob intervenção de controle

---

vetorial. Entretanto, as técnicas empregadas (RFLP, SSCP e seqüenciamento do gene que codifica a citocromo oxidase II e RAPD) não revelaram um alto polimorfismo requerido a este tipo de abordagem (CARTAXO, 2006). Isto suscitou a necessidade de se utilizar outro marcador neutro mais sensível, uma vez que as densidades das populações de mosquitos são muito grandes. Apenas um marcador molecular bastante polimórfico seria capaz de apresentar a sensibilidade necessária para detectar uma diversidade representativa de uma população tão numerosa. A proposta do presente trabalho é, portanto, avaliar o impacto das intervenções de controle vetorial, que estão sendo realizadas em Água Fria, sobre a diversidade genética bem como verificar se elas estão resultando em uma estruturação genética da população de *Cx. quinquefasciatus*, ao longo de diferentes momentos. Para tal finalidade foram empregados um marcador neutro do tipo microssatélite e um marcador sob pressão de seleção ao *B. sphaericus*, gene *cqml*.

### 3 JUSTIFICATIVA

O contínuo monitoramento e a avaliação dos efeitos das estratégias adotadas destacam-se como pontos fundamentais nos programas de controle de mosquitos vetores de doenças (REGIS; NIELSEN-LEROUX, 2000). Após sofrerem reduções nas densidades, populações de mosquitos são capazes de restabelecerem-se rapidamente uma vez que as mesmas são r-estrategistas. De acordo com a OMS, a falta de um sistema de monitoramento eficiente é um dos principais responsáveis pelas falhas nos programas de controle da filariose (TDR, 2002).

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

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

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

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

## 5 HIPÓTESE

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

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo geral

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

### 6.2 Objetivos específicos

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

## 7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 7.1 Área de estudo

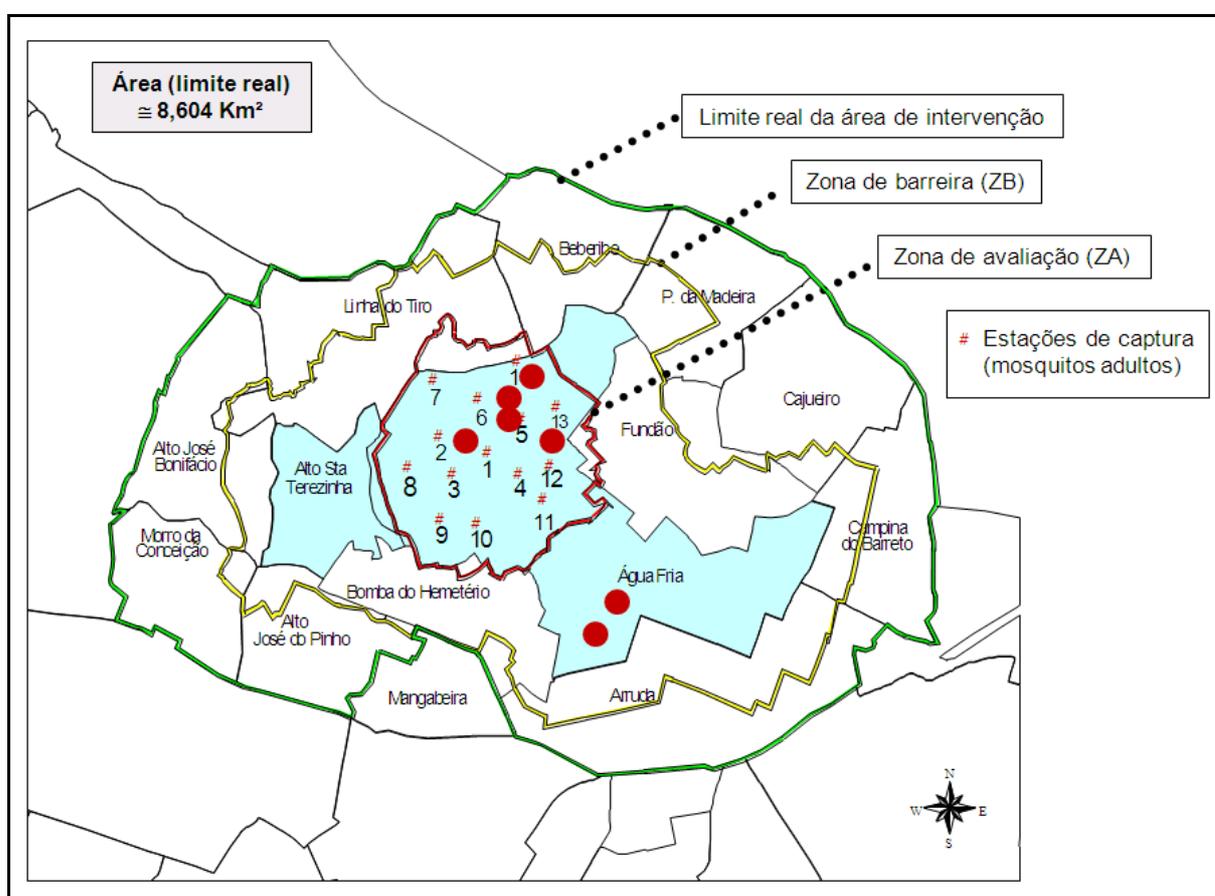
O estudo foi realizado com uma população do mosquito *Culex quinquefasciatus* proveniente do bairro de Água Fria (Recife/PE). Localizado no Distrito Sanitário II, este bairro é um dos mais populosos da cidade (PLANO, 2006), sendo composto por 44.020 habitantes e 10.900 domicílios (PREFEITURA DO RECIFE, 2006). O bairro de Água Fria foi selecionado para implantação do Programa de Controle da Filariose por apresentar uma significativa prevalência da doença (6,21%) e ser considerado de alto risco sócio-ambiental (RECIFE, 2003). Apenas na zona de avaliação do programa de controle, com área de aproximadamente 1,14 km<sup>2</sup>, foram contabilizados em torno de 3.000 criadouros de *Cx. quinquefasciatus* (SILVA-FILHA et al., 2008). Estes foram compostos principalmente por fossas, cisternas, canais, caixa de inspeção e caixas de passagens entre outros como canaletas, valetas e charcos (RECIFE, 2003).

As atividades relativas à redução da população vetora, no âmbito do programa, foram iniciadas em março de 2003. Estas incluíram o reparo e/ou eliminação dos criadouros do mosquito, aplicação bimestral do biolarvicida *Bacillus sphaericus* e monitoramento através de indicadores entomológicos (densidade relativa de larvas e pupas, densidade de mosquitos adultos e índice de imóveis com criadouros) (RECIFE, 2003). Em cada tratamento utilizou-se, por criadouro, de 3 a 5 g/m<sup>2</sup> do biolarvicida Vectolex G (Valent Biosciences<sup>®</sup>), baseado na cepa 2362 do *B. sphaericus* (SILVA-FILHA et al., 2008).

### 7.2 Amostragem

Agentes da prefeitura coletaram formas jovens (ovos, larvas e pupas) de *Culex quinquefasciatus* em fossas localizadas em 7 residências no bairro de Água Fria (figura 5). Tais coletas foram realizadas em 6 diferentes momentos: junho/2003, agosto/2003, dezembro/2003, abril/2004, junho/2004 e outubro/2004. Amostras de mais 2 coletas, relativas

aos meses de maio/2005 e setembro/2006, foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Helena Silva-Filha para este estudo, totalizando 8 diferentes momentos avaliados. A primeira coleta foi feita após três meses de início do tratamento com o agente *Bacillus sphaericus*. Todo o material foi enviado ao Laboratório de Controle de Vetores do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/ Fiocruz) e mantido, em temperatura de 27 °C e umidade 80%, até a emergência dos adultos. Estes foram armazenados a -20 °C para subsequente extração de DNA.



**Figura 5-** Mapa da área de intervenção piloto do programa de controle da filariose indicando a zona de avaliação (ZA), a zona de barreira (ZB) e o limite real escolhido como ZB. Na ZA, núcleo da área de intervenção piloto, estão indicadas as estações de capturas de *Culex quinquefasciatus* adultos, onde foram instaladas armadilhas luminosas. Os círculos destacados em vermelho assinalam todos os 7 locais de coleta das formas jovens da espécie *Culex quinquefasciatus* ao longo dos diferentes momentos de estudo.

**Fonte:** RECIFE (2003) adaptado.

### 7.3 Extração de DNA total

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

## 7.4 Estudo com o marcador neutro

### 7.4.1 Amplificação de microssatélites

Inicialmente foram testados 11 *loci* de microssatélites para o estudo: CQ29 (FONSECA; ATKINSON; FLEISCHER, 1998), CxqGA12, CxqGT4, CxqGT6b, CxqGT8, CxqGT17 (SMITH et al., 2005), CxqGT108, CxqCA118, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101 (EDILLO et al., 2007). A seleção destes *loci* para o teste foi feita considerando aqueles que estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não apresentaram desequilíbrio de ligação, não apresentaram alelos nulos e que foram descritos como bastante polimórficos. Apenas 4 (CxqGT6b, CxqCA118, CxqCTG10 e CxqCAG101) dos *loci* escolhidos não se

enquadravam nos critérios citados acima, entretanto, foram testados em virtude das amplitudes de tamanhos de seus alelos, as quais permitiam que eles fossem combinados aos outros *loci* selecionados (tabela 1). Os *loci* CxqGT6b e CxqCA118 não obedeceram aos critérios por apresentarem um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (SMITH et al., 2005; EDILLO et al., 2007) enquanto que os *loci* CxqCTG10 e CxqCAG101 foram apontados como pouco polimórficos (EDILLO et al., 2007) para a espécie *Culex quinquefasciatus*. As ampliações para a realização destes testes foram feitas com 12 amostras de DNA, referentes à espécie de mosquito supracitada proveniente de Água Fria, extraído conforme o item anterior.

Após os testes foram utilizados apenas 5 *loci* de microssatélites (CQ29, CxqGT8, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101) para o estudo e as razões para estas escolhas estão detalhadas no item resultados. As ampliações foram realizadas em 323 amostras utilizando os *primers* forward e reverso CQ29 (FONSECA; ATKINSON; FLEISCHER, 1998), CxqGT8 (SMITH et al., 2005), CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101 (EDILLO et al., 2007), sendo que apenas os forward foram marcados com fluoróforos. Os *primers* CQ29, CxqGT8 e CxqATG9 foram marcados com o fluoróforo Cy5 (fluorescência azul) enquanto os *primers* CxqCTG10 e CxqCAG101 foram marcados com o fluoróforo Cy5.5 (fluorescência verde). Cada reação foi feita para um volume final de 20 µl utilizando tampão NH<sub>4</sub> 1X [16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8) e estabilizador 0,01%] (Bioline<sup>®</sup>), 0,05 mM de cada dNTP (Bioline<sup>®</sup>), *primers* (Eurofins MWG Operon<sup>®</sup>) e MgCl<sub>2</sub> (Bioline<sup>®</sup>) com concentrações diversas (tabela 2), 0,15 mg/ml Albumina de Soro Bovino (BSA) (Promega<sup>®</sup>), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Bioline<sup>®</sup>) e 1µl do DNA molde. Vale salientar que não foi utilizada BSA apenas na amplificação do *locus* CQ29. Para cada grupo de reações foram feitos controles negativos, os quais eram constituídos de todos os reagentes supracitados com exceção do DNA molde, no intuito de checar a possibilidade de contaminação.

**Tabela 1** – Amplitude de variação nos tamanhos dos alelos, em pares de bases, encontrada para 11 *loci* de microsatélites na espécie *Culex quinquefasciatus* descritos por Edillo et al. (2007), Fonseca; Atkinson; Fleischer (1998), Fonseca; Lapointe; Fleischer (2000), Fonseca et al. (2006) e Smith et al. (2005).

<i>Locus</i>	Amplitude de tamanhos dos fragmentos (pb)																				
	77	89	91	100	114	122	126	128	136	141	145	161	164	170	174	184	188	214	249	262	282
CQ29													164				188				
CxqGA12			91								145										
CxqGT4										141		161									
CxqGT6b								128	136												
CxqGT8	77					122															
CxqGT17							126							170							
CxqGT108				100															214		
CxqCA118					114																282
CxqATG9																184				262	
CxqCTG10		89													174						
CxqCAG101														174					249		

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

Após cada reação de PCR, adicionou-se uma cauda poli-A aos produtos amplificados em decorrência de diferenças nos tamanhos dos fragmentos obtidos entre a extensão das fitas positivas e negativas do DNA. O procedimento consistiu na preparação de um solução com tampão NH<sub>4</sub> 0,33X [5,33 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 22,33 mM Tris-HCl (pH 8.8) e 0,003% estabilizador] (Bioline®), 0,07 mM de cada dNTP (Bioline®), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline®), 0,75 U de Taq DNA polimerase (Bioline®) e 20 µl do produto de PCR. A mistura foi submetida a uma etapa de extensão à temperatura de 72 °C por 30 min em um termociclador GeneAmp 2700 (Applied Biosystems®).

**Tabela 2** - *Locis* de microssatélites analisados no estudo, com as suas respectivas seqüências de *primers*, repetições dos microssatélites e concentrações de cada *primer* e do MgCl<sub>2</sub> utilizados nas ampliações.

<i>Locus</i>	Seqüências dos <i>primers</i>	Repeat amplificado	Concentração <i>primer</i> (µM)	Concentração MgCl <sub>2</sub> (mM)
CQ29	F: TGGGAGAGCATAGTTTCAGG R: TGCTCAGGAGACTCTACTGG	(GT) <sub>2</sub> GA(GT) <sub>10</sub>	0,2	1,5
Cxq GT8	F: TGTTGCATCTTCCCAGTAGC R: CCGCGCTAAATTACAAAATACAC	(GT) <sub>15</sub>	0,2	2
Cxq ATG9	F: CCACTCAAACATAAAACACCACA R: AATGCCATAACCATCGTCAT	(ATG) <sub>7</sub>	0,2	1,5
Cxq CTG10	F: CGTTCTCCAACCTGTCATCTTTC R: AACCGAAATCGGAAGGTATTAA	(CTG) <sub>4</sub> TTG(CTG) <sub>4</sub>	0,5	1,5
Cxq CAG101	F: CAATCAGGGAACCTCAATC R: GGGACTGGGTATTAGGAGAC	(CAG) <sub>6</sub>	0,5	2,5

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

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

#### 7.4.3 Análise dos dados de microssatélites

Os parâmetros de variabilidade genética avaliados no estudo foram número de alelos e suas frequências, riqueza de alelos e heterozigosidade esperada ou diversidade gênica (NEI, 1987). Todos foram estimados por *locus* nos 8 diferentes momentos de coleta através do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). A riqueza de alelos ( $R_S$ ) é uma medida do número de alelos independente do tamanho amostral. Assim, tal estimativa permite comparações entre amostras com diferentes tamanhos. Esta foi uma estratégia proposta por El Mousadik e Petit (1996) e Petit, El Mousadik e Pons (1998) para lidar com o problema, uma vez que a quantidade de alelos observados em uma amostra é fortemente influenciada pelo tamanho amostral. A heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), também denominada diversidade gênica (NEI, 1987), é uma medida de extensão de diversidade genética amplamente utilizada. Ela é calculada baseando-se na frequência dos alelos.

Além dos parâmetros supracitados, avaliou-se a diferenciação genética entre os momentos de coleta, estimada pelo índice de fixação  $F_{ST}$ . Este índice reflete a proporção de variabilidade genética encontrada entre populações devido à subdivisão populacional (estruturação genética) (SOLFERINI; SELIVON, 2004). Os valores de  $F_{ST}$  foram calculados segundo o método de Weir e Cockerham (1984) através do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). É importante destacar que, devido aos baixos valores de heterozigosidade

encontrados para o *locus* CxqCTG10 em comparação aos outros *loci*, foi necessário fazer uma correção dos índices  $F_{ST}$  utilizando o programa RecodData versão 0.1 (MEIRMANS, 2006). O cálculo da correção consistiu na divisão do  $F_{ST}$  obtido no programa FSTAT pelo valor gerado no programa RecodData. Isto resultou em um  $F_{ST}$  corrigido o qual foi utilizado em todas as comparações. A associação entre diferenciação genética e o tempo de separação entre as coletas foi verificada pelo teste de Mantel, considerando 5.000 permutações, através do suplemento POPTOOLS versão 3.0.6, acessório do Microsoft EXCEL (HOOD, 2008). O teste de Mantel foi realizado através da comparação entre uma matriz com o tempo de separação entre os diferentes momentos de estudo (tabela 3) e uma matriz com os valores do  $F_{ST}$  corrigido.

**Tabela 3** - Matriz mostrando o tempo de separação, em meses, entre os diferentes momentos de estudo.

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

O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para cada *locus* pelo índice de fixação  $F_{IS}$ , através do FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Valores negativos de  $F_{IS}$  apontam para um excesso de heterozigotos enquanto que valores positivos são indicativos de um déficit de heterozigotos. Testes para detecção de desequilíbrio de ligação foram realizados através do programa GENEPOP versão 4.0 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Para tanto, utilizou-se o algoritmo de cadeia de Markov, que faz uma comparação de todos os possíveis pares de *loci* em cada momento de coleta separadamente, e pelo método de Fisher, utilizando o teste do qui-quadrado, que compara todos os possíveis pares de *loci* na população total.

## 7.5 Estudo com o marcador sob pressão de seleção

### 7.5.1 Amplificação do gene *cqm1*

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

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µl, de acordo com Chalegre et al. (2009), utilizando 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen<sup>®</sup>), 1,6 µM de cada *primer* (Invitrogen<sup>®</sup>), 2 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), tampão 1X (KCl 50 mM e Tris-HCl 20 mM pH 8.4) (Invitrogen<sup>®</sup>), 1,4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen<sup>®</sup>) e 2 µl do DNA total do mosquito, extraído conforme citado no item 7.3. Foram feitos controles negativos para cada grupo de reações, onde se utilizou todos os reagentes necessários à PCR com exceção do DNA molde. As amplificações foram feitas num termociclador T3000 (Biometra<sup>®</sup>) programado para um ciclo inicial de 94 °C por 3 min, seguido de 34 ciclos a 94 °C por 50 seg, 55 °C por 50 seg e 72°C por 120 seg e, ao final, uma etapa de 72 °C durante 10 min (CHALEGRE et al., 2009). É importante destacar que as amplificações das amostras referentes aos meses de maio/2005 e setembro/2006 para o gene *cqm1* foram realizadas pelo aluno de doutorado Karlos Diogo Chalegre e que o resultado relativo a maio/2005 foi previamente publicado por Chalegre et al. (2009).

### 7.5.2 Identificação dos alelos *cqm1* e *cqm1<sub>REC</sub>*

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

### 7.5.3 Análise dos dados do gene *cqm1*

Após a identificação dos diferentes genótipos, determinou-se o número e as frequências dos alelos bem como a heterozigosidade esperada para cada momento de coleta. Estes parâmetros de variabilidade genética foram calculados através do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). A diferenciação genética entre as amostras para o gene *cqm1* foi obtida pelo índice de fixação  $F_{ST}$ , seguindo o modelo de Weir e Cockerham (1984). Os cálculos foram realizados pelo programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). A fim de permitir uma comparação com os dados de microssatélites, os índices de  $F_{ST}$  utilizados para o estudo do marcador sob pressão de seleção também foram corrigidos no programa RecodData versão 0.1 (MEIRMANS, 2006), de acordo com o procedimento supracitado. Também foi realizada uma análise de correlação com o propósito de comparar ambas as matrizes de distância (estimativa de  $F_{ST}$  para o gene *cqm1* e tempo de separação entre as coletas), pelo teste de Mantel com 5.000 permutações, utilizando o acessório POPTOOLS versão 3.0.6 (HOOD, 2008). Conforme já citado no estudo de microssatélites, o teste de Mantel baseou-se na comparação entre uma matriz com o tempo de separação entre os diferentes momentos de estudo (tabela 3) e uma matriz com os valores do  $F_{ST}$  corrigido.

### 7.6 Comparação entre os microssatélites e o gene *cqm1*

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

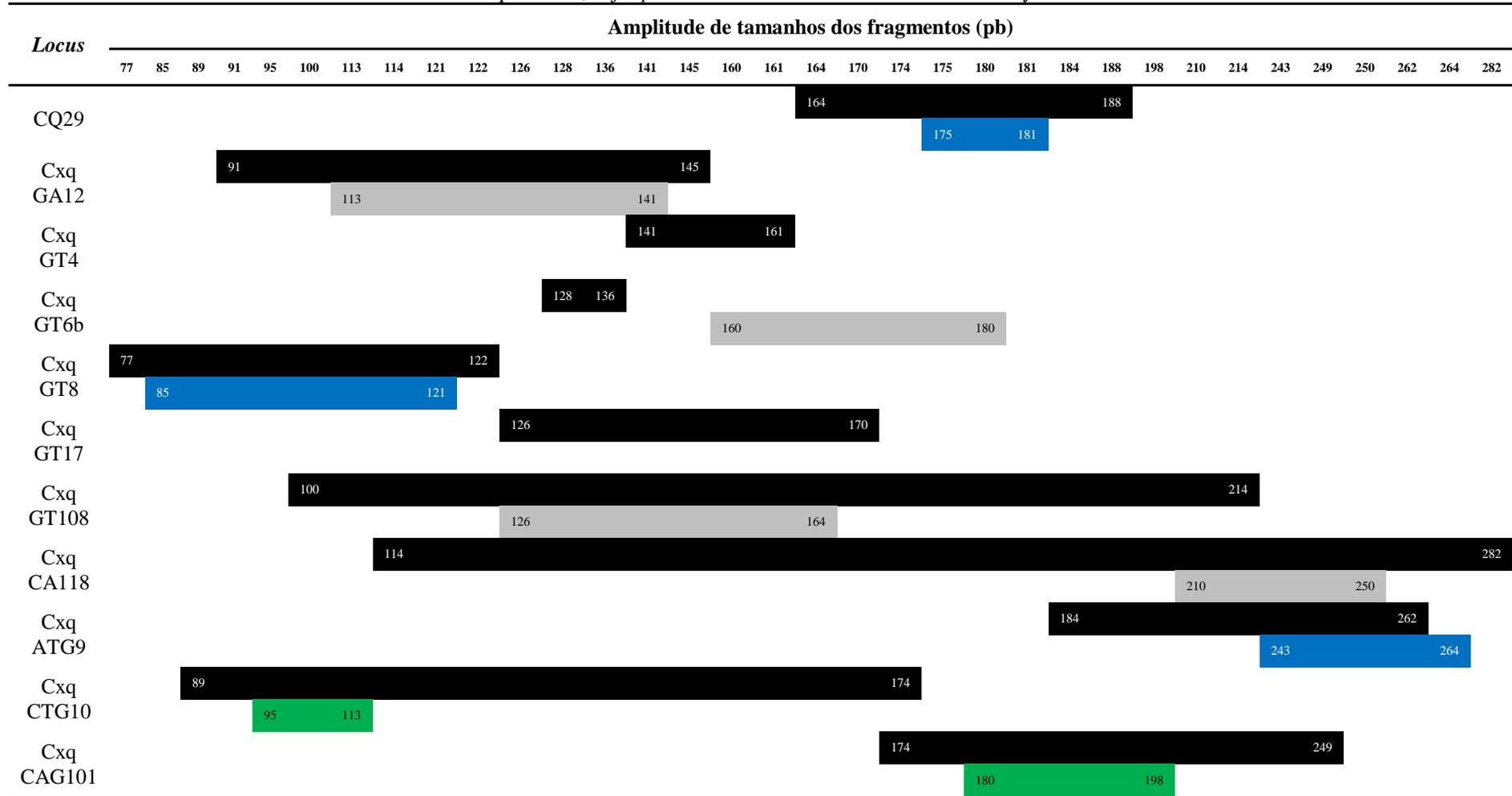
## 8 RESULTADOS

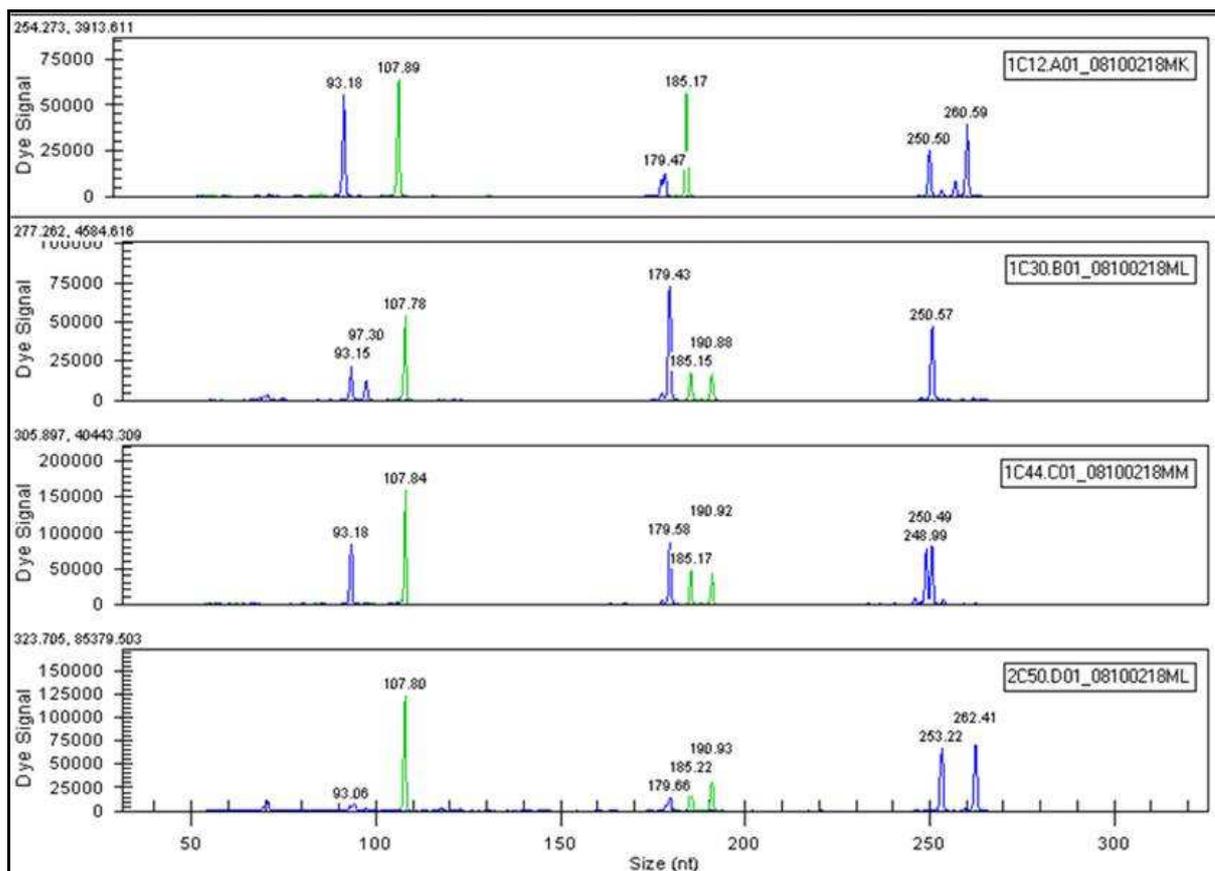
### 8.1 Estudo com microssatélites

A partir dos resultados gerados com os testes dos 11 *loci* de microssatélites, apenas 6 deles (CQ29, CxqGT8, CxqGT108, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101) mostraram-se apropriados para o estudo. Os *loci* CxqGA12 e CxqGT6b foram excluídos pois as suas ampliações geraram produtos com baixa concentração. Além disso, a amplitude dos alelos do *locus* CxqGT6b se sobrepôs a dos *loci* CQ29, CxqGT108 e CxqCAG101 (tabela 4), e como ele já havia apresentado previamente um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (SMITH et al., 2005), decidiu-se eliminá-lo do estudo. O *locus* CxqGT4 foi descartado uma vez que não foi possível amplificá-lo em nenhuma das 12 amostras testadas. A amplificação do *locus* CxqGT17 gerou 3 fragmentos de aproximadamente 190, 270 e 510 pares de bases. Possivelmente estes dois últimos foram fragmentos inespecíficos e por esta razão o *locus* CxqGT17 também foi excluído do estudo. Os tamanhos dos alelos do *locus* CxqCA118 se sobrepuseram aos do *locus* CxqATG9 (tabela 4), e como este primeiro foi descrito por Edillo et al. (2007) como apresentando um desequilíbrio de Hardy-Weinberg, o *locus* CxqATG9 foi utilizado em detrimento do *locus* CxqCA118.

Após a fase de testes, foi iniciada a etapa de análise dos alelos pertencentes a cada um dos 6 *loci* selecionados, através da genotipagem. Os resultados dos eletroferogramas mostraram que os picos gerados pelos produtos de PCR referentes ao *locus* CxqGT108 não apresentaram intensidades suficientes para compará-los com os picos gerados pelos outros 5 *loci*. A primeira causa para tal resultado foi porque o *primer* utilizado na amplificação do *locus* CxqGT108 foi marcado com um fluoróforo preto (WellRED D2 Sigma®), o qual apresenta uma fluorescência mais fraca em comparação ao azul e ao verde. A outra razão foi porque a concentração obtida para os produtos de PCR deste *locus* foi inferior aos dos outros 5 *loci*. Devido aos referidos problemas, o *locus* CxqGT108 também foi excluído, restando apenas os *loci* CQ29, CxqGT8, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101. A figura 6 mostra alguns dos eletroferogramas gerados pela análise de fragmentos dos 5 *loci* de microssatélite.

**Tabela 4** – Amplitude de variação nos tamanhos dos alelos (cor preta), em pares de bases, encontrada para 11 *loci* de microssatélites na espécie *Culex quinquefasciatus*, descritos por Edillo et al. (2007), Fonseca; Atkinson; Fleischer (1998), Fonseca; Lapointe; Fleischer (2000), Fonseca et al. (2006) e Smith et al. (2005), e variação nos tamanhos dos alelos (cores cinza, azul e verde), em pares de bases, encontradas para as amostras provenientes de Água Fria nestes mesmos *loci*. As amplitudes de fragmentos em azul são relativas aos *loci* CQ29, CxqGT8 e CxqATG9, cujos *primers* foram marcados com o fluoróforo Cy5, enquanto que as verdes são referentes aos *loci* CxqCTG10 e CxqCAG101, cujos *primers* foram marcados com o fluoróforo Cy5.5.





**Figura 6** – Eletroferogramas gerados para 4 indivíduos da espécie *Culex quinquefasciatus* através da análise de fragmentos para os *loci* CxqGT8 (picos azuis iniciais da esquerda para a direita), CxqCTG10 (picos verdes iniciais da esquerda para a direita), CQ29 (picos azuis centrais), CxqCAG101 (picos verdes centrais) e CxqATG9 (picos azuis finais da esquerda para a direita).

No total 323 amostras foram analisadas para cada um dos 5 diferentes *loci* (CQ29, CxqGT8, CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101). O número de alelos por *locus* (tabela 5) variou entre 3 (*locus* CxqCTG10) e 12 (*locus* CxqGT8). As frequências alélicas para cada um dos 5 diferentes *loci* de microssatélites estão mostradas na tabela 5. A maior frequência alélica obtida foi de 0,972 para o alelo 107 do *locus* CxqCTG10 e a mínima de 0,002 para os alelos 180 do *locus* CQ29, 85 do *locus* CxqGT8, 243, 245, 257, 264 do CxqATG9 e 180 do *locus* CxqCAG101 (tabela 5).

Ao longo do estudo foram observados 14 alelos raros (tabela 5) na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria que, de acordo com a definição de Kimura (1983), correspondem àqueles cujas frequências relativas são inferiores a 0,01. Foram detectados apenas 2 alelos raros na 1ª coleta (alelos 243 e 245 do *locus* CxqATG9), os quais foram encontrados exclusivamente neste momento, ambos com frequência total de 0,002. Um fato semelhante ocorreu no 2º momento de estudo, quando se observou apenas os alelos 261 do

*locus* CxqATG9 e 113 do *locus* CxqCTG10 como sendo raros, ambos com frequências totais de 0,003. Na 3ª coleta, o número de alelos raros detectados dobrou, com o surgimento de 4 novos alelos raros. Destes, apenas 1 (alelo 85 do *locus* CxqGT8) foi exclusivo da 3ª coleta, enquanto que os 3 restantes (alelos 181 do *locus* CQ29, 113 e 115 do *locus* CxqGT8) foram encontrados em outros momentos após esta coleta. A 4ª coleta também foi marcada pelo aumento no número de alelos raros. Nela foram observados 5 alelos raros, dos quais 1 havia sido previamente detectado na coleta anterior (alelo 115 do *locus* CxqGT8) e os outros 4 foram exclusivos deste momento (alelos 180 do *locus* CQ29, 257 e 264 do *locus* CxqATG9 e 180 do *locus* CxqCAG101).

A primeira redução no número de alelos raros só foi observada a partir do 5º momento, quando se relatou a ocorrência de apenas 1 alelo raro (113 do *locus* CxqGT8). Vale salientar que tal alelo foi provavelmente introduzido em Água Fria na 3ª coleta e que a sua frequência baixou de 0,03 para 0,01 na 5ª coleta. A partir deste momento ele não foi mais detectado nas coletas subsequentes. Na 6ª coleta, 2 alelos raros foram observados sendo um deles (alelo 198 do *locus* CxqCAG101) exclusivo deste momento e o outro já havia sido encontrado na 3ª coleta (alelo 181 do *locus* CQ29). O número de alelos raros voltou a ser reduzido na 7ª coleta, quando se detectou apenas 1 (alelo 116 do *locus* CxqGT8). Este provavelmente surgiu na população de Água Fria a partir do 7º momento, visto que o mesmo não havia sido detectado previamente. O alelo 116 do *locus* CxqGT8 também foi encontrado na 8ª coleta, sendo que a sua frequência reduziu de 0,1 para 0,067 quando comparado à coleta anterior. Apenas este único alelo raro foi descrito no 8º momento de estudo.

Além dos alelos raros, também foram detectados outros com frequências muito baixas, de 0,014 e 0,012, respectivamente, para os alelos 107 e 117 do *locus* CxqGT8 e de 0,013 para o alelo 249 do *locus* CxqATG9 (tabela 5). A queda mais brusca foi registrada para o alelo 107 do *locus* CxqGT8, cuja frequência foi reduzida de 0,05 na 1ª coleta para 0,01 na 4ª coleta, desaparecendo completamente no período subsequente. Já as frequências dos alelos 117 do *locus* CxqGT8 e 249 do *locus* CxqATG9 apresentaram um decréscimo mais brando de 0,02, na 1ª coleta, para 0,01, na 6ª coleta, desaparecendo nos momentos seguintes. As reduções na frequência e subsequentes desaparecimentos destes 3 alelos sugerem que o programa de controle está provocando uma redução na diversidade genética da população de mosquitos vetores de Água Fria.

**Tabela 5** - Número e frequência de alelos encontrados para cada um dos 5 loci de microssatélite nos diferentes momentos de estudo. Os valores em negrito correspondem aos alelos raros e os sublinhados àqueles que foram encontrados em baixa frequência.

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

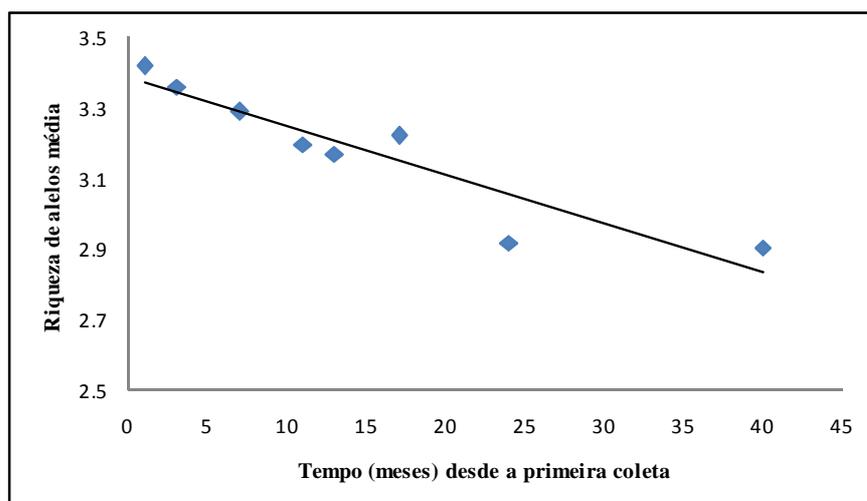
N	50	50	49	49	48	48	9	15	318
<b>CxqCTG10</b>									
95	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02	0,02	0	0,067	0,025
107	0,98	0,96	0,96	0,98	0,98	0,98	1	0,933	0,972
113	0	0,02	0	0	0	0	0	0	<b>0,003</b>
n <sub>a</sub>	2	3	2	2	2	2	1	2	3
N	50	50	50	49	50	49	10	15	323
<b>CxqCAG101</b>									
180	0	0	0	0,01	0	0	0	0	<b>0,002</b>
186	0,69	0,76	0,68	0,694	0,72	0,653	0,85	0,833	0,711
192	0,31	0,24	0,32	0,296	0,28	0,316	0,15	0,167	0,283
198	0	0	0	0	0	0,031	0	0	<b>0,005</b>
n <sub>a</sub>	2	2	2	3	2	3	2	2	4
N	50	50	50	49	50	49	10	15	323
<b>Média 5 loci</b>									
n <sub>a</sub>	4,8	4,6	4,8	5,2	4,4	4,6	3	3	7,2

\* n<sub>a</sub>, número de alelos por *locus*; N, tamanho amostral.

A média da riqueza de alelos (R<sub>S</sub>) entre os 5 diferentes *loci* de microssatélites apresentou um decréscimo ao longo do estudo. Este parâmetro variou entre um valor máximo de 3,42, registrado na primeira coleta, até atingir um valor mínimo de 2,90, no último momento de estudo (tabela 6). O parâmetro riqueza de alelos foi o único que apresentou uma associação estatisticamente significativa com o tempo ( $r = -0,930$  e  $p = 0,0008$ ), ou seja, a diversidade genética obtida através da média da riqueza de alelos para os 5 *loci* diminuiu significativamente ao longo do programa de controle (figura 7).

**Tabela 6** - Riqueza de alelos obtida para cada *locus* de microssatélite e média da riqueza de alelos entre os cinco *locus* nos diferentes momentos de estudo, baseado no tamanho amostral mínimo de 9 indivíduos diplóides.

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

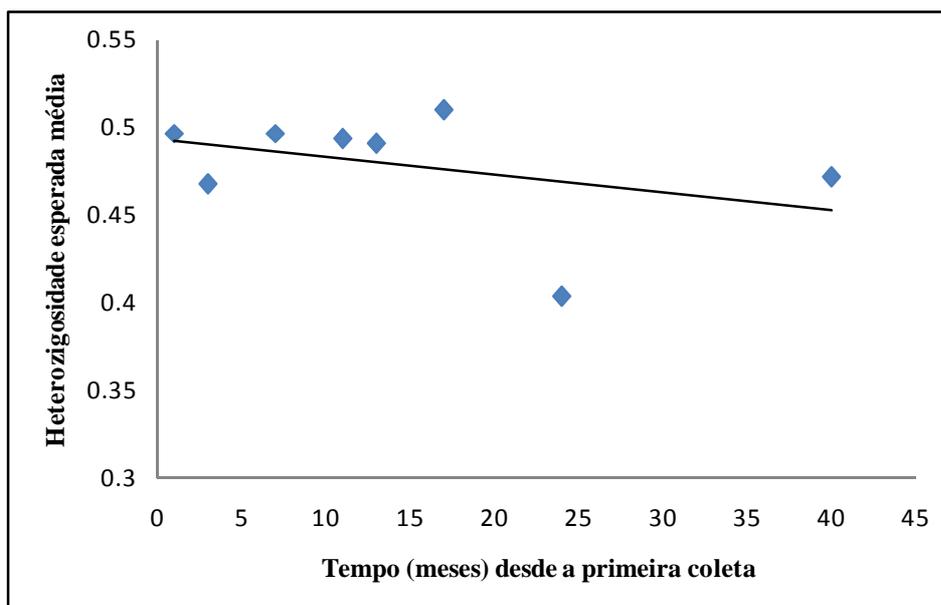


**Figura 7** - Média da riqueza de alelos para os cinco *locus* de microssatélites avaliados nos diferentes momentos de estudo, iniciado a partir do primeiro mês de coleta.

A média do parâmetro heterozigidade esperada ( $H_E$ ) entre os 5 *loci* de microssatélites apresentou flutuações no decorrer do programa de controle vetorial (tabela 7 e figura 8), intercalando momentos de decréscimos acentuados (2<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> coletas) com momentos de aumentos (3<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> coletas). O menor valor de heterozigidade esperada (0,4032) foi obtido na 7<sup>a</sup> coleta. Este foi bastante discrepante em relação ao restante dos momentos, os quais exibiram uma estreita amplitude, com variações de valores entre 0,4676, na 2<sup>a</sup> coleta, e 0,5094, na 6<sup>a</sup> coleta. Diferentemente do ocorrido com a riqueza de alelos, não foi observada uma correlação estatisticamente significativa ( $r = -0,388$  e  $p = 0,342$ ) entre a heterozigidade esperada e o tempo.

**Tabela 7** - Heterozigidade esperada obtida para cada *locus* de microssatélite e média da heterozigidade esperada entre os cinco *loci* nos diferentes momentos de estudo.

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

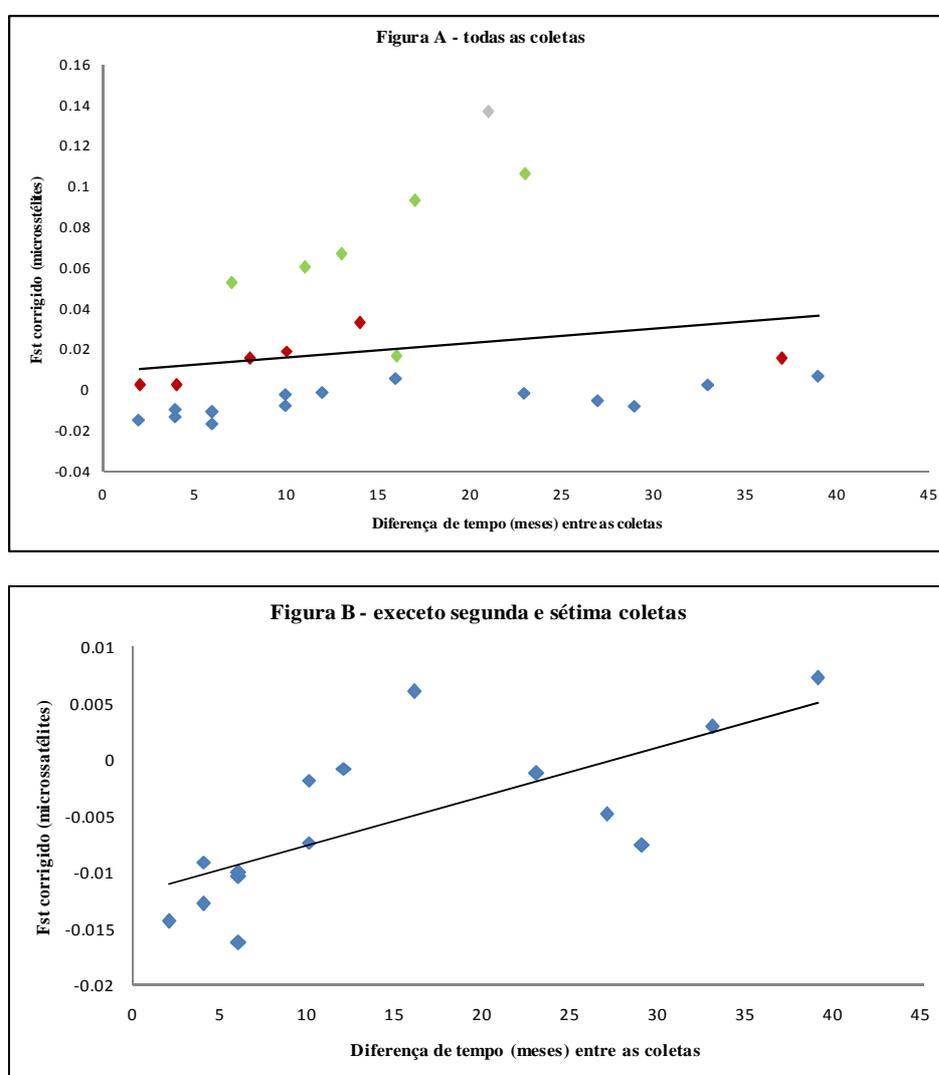


**Figura 8** - Média da heterozigosidade esperada obtida para os cinco *loci* de microssatélites avaliados nos diferentes momentos de estudo, iniciado a partir do primeiro mês de coleta.

As comparações par-a-par obtidas pelo índice de  $F_{ST}$  resultaram em 6 valores estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ). Destes valores, 5 envolveram comparações com a 7ª coleta, conforme mostrado na tabela 8. Após as correções de Bonferroni, entretanto, nenhum dos valores de  $F_{ST}$  apresentou diferença estatisticamente significativa. Não foi observada associação (teste de Mantel;  $r=0.190$ ,  $p=0.187$ ) entre os índices de  $F_{ST}$  e a distância temporal transcorrida entre os diversos momentos estudados. Tal resultado foi gerado pela comparação entre as matrizes de  $F_{ST}$  corrigido (tabela 8) e a do tempo de separação entre as coletas (tabela 3). A partir da análise de regressão, foi possível visualizar três distintos padrões de tendência para diferenciação genética, conforme a figura 9. Um deles referiu-se às comparações par-a-par entre o 2º momento com cada uma das outras coletas. O outro padrão foi relativo às comparações par-a-par entre a 7ª coleta e cada um dos outros momentos. O terceiro padrão compreendeu as comparações par-a-par das diferenciações de cada uma das coletas restantes, excluindo o 2º e o 7º momento. Quando se excluiu das análises os valores de  $F_{ST}$  relativos a todas as comparações par-a-par das 2ª e 7ª coletas com os outros momentos, passou a ser observada uma correlação positiva estatisticamente significante (teste de Mantel;  $r=0.719$ ,  $p=0.0008$ ) (figura 9) entre os índices de  $F_{ST}$  e a distância temporal.

**Tabela 8** – Valores de diferenciação genética ( $F_{ST}$  corrigido) entre os diversos momentos de coleta (diagonal inferior) e seus respectivos níveis de significância (p) (diagonal superior), obtidos através da estimativa total para os 5 loci de microssatélites. Os valores em negrito referem-se àqueles estatisticamente significantes.

	1ª Coleta (Jun/03)	2ª Coleta (Ago/03)	3ª Coleta (Dez/03)	4ª Coleta (Abr/04)	5ª Coleta (Jun/04)	6ª Coleta (Out/04)	7ª Coleta (Mai/05)	8ª Coleta (Set/06)
1ª Coleta (Jun/03)	-	0.56607	0.40179	0.81429	0.47857	0.25893	<b>0.00714</b>	0.10536
2ª Coleta (Ago/03)	0,002897	-	0.09107	0.39107	<b>0.04821</b>	0.05536	<b>0.00536</b>	0.09107
3ª Coleta (Dez/03)	-0,01033	0,002897	-	0.69107	0.88393	0.43214	<b>0.0125</b>	0.25179
4ª Coleta (Abr/04)	-0,00733	0,015787	-0,00911	-	0.92143	0.97321	0.07321	0.57857
5ª Coleta (Jun/04)	-0,00079	<b>0,019386</b>	-0,01007	-0,01437	-	0.76786	<b>0.01071</b>	0.10000
6ª Coleta (Out/04)	0,006039	0,033438	-0,00181	-0,01625	-0,0128	-	<b>0.03929</b>	0.26964
7ª Coleta (Mai/05)	<b>0,106231</b>	<b>0,136989</b>	<b>0,093281</b>	0,066853	<b>0,060358</b>	<b>0,052531</b>	-	0.19107
8ª Coleta (Set/06)	0,007229	0,015451	0,002931	-0,00759	-0,00485	-0,00119	0,017161	-



**Figura 9** - Análise de regressão entre a diferenciação genética ( $F_{ST}$  corrigido) e o tempo de separação entre as coletas para os 5 loci de microssatélites. A: Comparações considerando todos os momentos estudados, os pontos em vermelho destacam apenas as comparações par-a-par com a 2ª coleta, os que estão em verde destacam as comparações par-a-par com a 7ª coleta, o ponto cinza mostra a comparação entre a 2ª e a 7ª coleta e os pontos azuis mostram as comparações entre as coletas restantes. B: Comparações excluindo os 2º e o 7º momentos de coleta.

Os resultados dos índices de  $F_{IS}$ , referentes ao total de *loci* de microssatélites, apontaram para um significativo déficit de heterozigotos no 5º ( $F_{IS} = 0,103$ ;  $p=0,0215$ ) e no 6º ( $F_{IS} = 0,186$ ;  $p= 0,0003$ ) momento de coleta, visto que os valores significantes de  $F_{IS}$  foram positivos em ambas as coletas. O déficit de heterozigotos pode ser causado pela ocorrência de endocruzamento, efeito Wahlund ou pela existência de alelos nulos. Os dois primeiros efeitos influenciam todo o genoma ao passo que só os alelos nulos são capazes de afetar apenas *locus* individuais. Um alelo nulo é aquele resultante de mutações ocorridas nas regiões flangeadoras dos *primers* de microssatélites, as quais impossibilitam a amplificação deste alelo. Assim, apesar do alelo nulo existir, ele não é capaz de ser detectado.

Observou-se, no entanto, que as deficiências de heterozigotos foram causadas apenas pelo *locus* específico CQ29 (tabela 9). Esta constatação sugere, portanto, que tais déficits foram obtidos em decorrências de possíveis alelos nulos, pertencentes ao *locus* CQ29. Tal problema, entretanto, não foi previamente reportado em outros estudos que utilizaram este mesmo *locus* (FONSECA; ATKINSON; FLEISCHER, 1998; FONSECA; LAPOINTE; FLEISCHER, 2000; FONSECA et al., 2006). Estes resultados são indicativos de que a população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ao longo de todo o período avaliado, uma vez que, os déficits de heterozigotos foram decorrentes de alelos nulos e não das outras duas possíveis causas acima mencionadas.

**Tabela 9** – Valores do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ), com seus respectivos níveis de significância ( $p$ ), para cada um dos 5 *locus* de microssatélite nos diferentes momentos de estudo. Os valores em negrito referem-se àqueles estatisticamente significantes.

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

\* ND, resultados não disponíveis.

Os resultados das análises de desequilíbrio de ligação mostraram que apenas 4 das 80 comparações entre todos os possíveis pares de *loci*, realizadas considerando cada momento de estudo separadamente, apresentou valor significativo ( $p \leq 0,05$ ). As comparações entre cada par de *locus*, considerando conjuntamente todo o período estudado, mostraram que não houve desequilíbrio de ligação entre os *loci* estudados ( $p > 0,05$ ) (tabela 10). Os resultados obtidos pelas análises de desequilíbrio de ligação serviram ainda como suporte adicional para desconsiderar o endocruzamento e o efeito Wahlund como os responsáveis pelo déficit de heterozigotos, conforme observado pela análise do índice de  $F_{IS}$ . Tanto o endocruzamento como o efeito Wahlund podem causar desequilíbrio de ligação dentro de uma população, pois membros de populações diversas apresentam diferentes probabilidades de carregar certas combinações de alelos. Por outro lado, quando o déficit de heterozigotos é causado por alelos nulos, espera-se que haja um equilíbrio de ligação. Isto se deve ao fato de que todos os indivíduos têm a mesma probabilidade de carregar o alelo nulo e que, portanto, a distribuição entre os alelos de diferentes *loci* não é perturbada (WONDJI et al., 2005).

**Tabela 10** - Comparações entre cada par de *locus* para detecção de desequilíbrio de ligação, considerando conjuntamente os 5 *loci* de microssatélites nos 8 momentos estudados, através do teste do qui-quadrado.

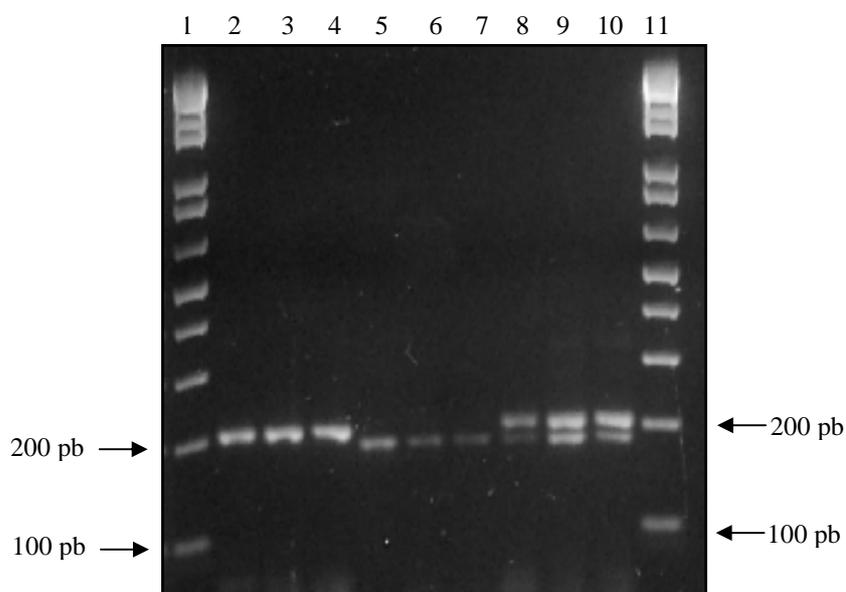
Pares de <i>locus</i>	$\chi^2$	g.l.	p
CTG10 e CAG101	12,318	14	0,581
CTG10 e GT8	13,708	14	0,472
CAG101 e GT8	20,179	16	0,212
CTG10 e CQ29	7,005	14	0,935
CAG101 e CQ29	19,302	16	0,253
GT8 e CQ29	19,001	16	0,269
CTG10 e ATG9	15,273	14	0,36
CAG101 e ATG9	17,215	16	0,372
GT8 e ATG9	16,38	16	0,427
CQ29 e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

\* p, nível de significância.

## 8.2 Estudo com o gene *cqm1*

A amplificação do gene *cqm1* foi realizada com as mesmas 323 amostras previamente empregadas nas análises de microssatélites. Como resultado foram detectados todos os 3

diferentes genótipos na população de Água Fria (figura 10). Ao longo do estudo foram observados 5 indivíduos homocigotos para o alelo *cqm1*<sub>REC</sub>, ou seja, apenas 5 amostras referiram-se a indivíduos resistentes ao *B. sphaericus*, dentre as quais 1, 2, 1 e 1 amostras foram provenientes, respectivamente, das 3<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> coletas. Já o número de heterocigotos susceptíveis foi de 20 indivíduos, observados na 2<sup>a</sup> (3 amostras), 3<sup>a</sup> (6 amostras), 4<sup>a</sup> (4 amostras), 5<sup>a</sup> (4 amostras) e 6<sup>a</sup> (3 amostras) coletas.



**Figura 10** - Perfis dos produtos de PCR do gene *cqm1*, visualizados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. Poços 2 a 4: indivíduos homocigotos sem deleção (genótipo susceptível). Poços 5 a 7: indivíduos homocigotos com deleção (genótipo resistente). Poços 8 a 10: indivíduos heterocigotos (genótipo susceptível). Poços 1 e 11: ladder 100 pb (New England Biolabs®).

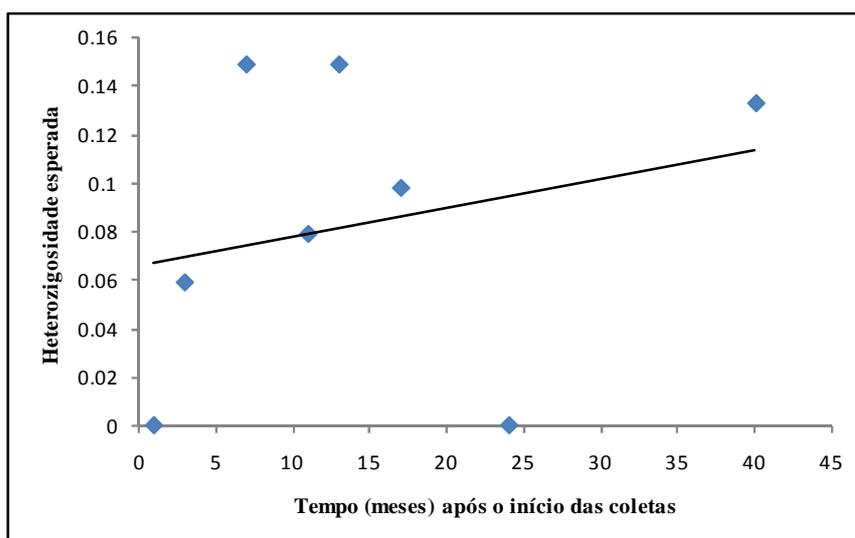
Após a identificação dos genótipos, foram calculadas as frequências dos alelos de resistência (*cqm1*<sub>REC</sub>) e susceptibilidade (*cqm1*) ao *B. sphaericus* bem como os valores de heterocigosidade esperada para cada um dos 8 momentos de estudo (tabela 11). A diversidade gênica ou heterocigosidade esperada (Nei, 1987) relativa ao gene *cqm1*, apresentou flutuações no decorrer do programa de controle, cuja faixa de valores variou de 0 (1<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> coletas) até 0,149 (3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> coletas). Valores discrepantes de heterocigosidade esperada foram percebidos na 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> coletas, quando seus valores praticamente dobraram em relação aos momentos imediatamente anteriores, e na 7<sup>a</sup> coleta, quando a heterocigosidade esperada voltou a ser nula, conforme ocorrido no início do estudo (tabela 11).

O parâmetro heterozigosidade esperada não apresentou uma correlação estatisticamente significativa ( $r=0,248$  e  $p=0,554$ ) com tempo transcorrido desde o início das coletas (figura 11). Entretanto quando os valores discrepantes de heterozigosidade esperada, relativos às 3ª, 5ª e 7ª coletas, foram excluídos das análises, observou-se uma associação ( $r=0,877$  e  $p=0,05$ ) entre este parâmetro de diversidade e o tempo transcorrido durante o estudo.

**Tabela 11** – Frequências alélicas, número de alelos e heterozigosidade esperada obtidos para o gene *cqm1* nos diferentes momentos de estudo.

Momentos de estudo	Frequência do alelo <i>cqm1</i> <sub>REC</sub>	Frequência do alelo <i>cqm1</i>	N	n <sub>a</sub>	Heterozigosidade esperada (H <sub>E</sub> )
1ª Coleta (Jun/03)	0	1	50	1	0
2ª Coleta (Ago/03)	0,03	0,97	50	2	0.059
3ª Coleta (Dez/03)	0,08	0,92	50	2	0.149
4ª Coleta (Abr/04)	0,041	0,959	49	2	0.079
5ª Coleta (Jun/04)	0,08	0,92	50	2	0.149
6ª Coleta (Out/04)	0,051	0,949	49	2	0.098
7ª Coleta (Mai/05)	0	1	10	1	0
8ª Coleta (Set/06)	0,067	0,933	15	2	0.133
Total	0,046	0,954	323	2	-

\* N, tamanho amostral; n<sub>a</sub>, número de alelos por *locus*.



**Figura 11** - Heterozigosidade esperada obtida para gene *cqm1* avaliada nos diferentes momentos de estudo, iniciados a partir do primeiro mês de coleta.

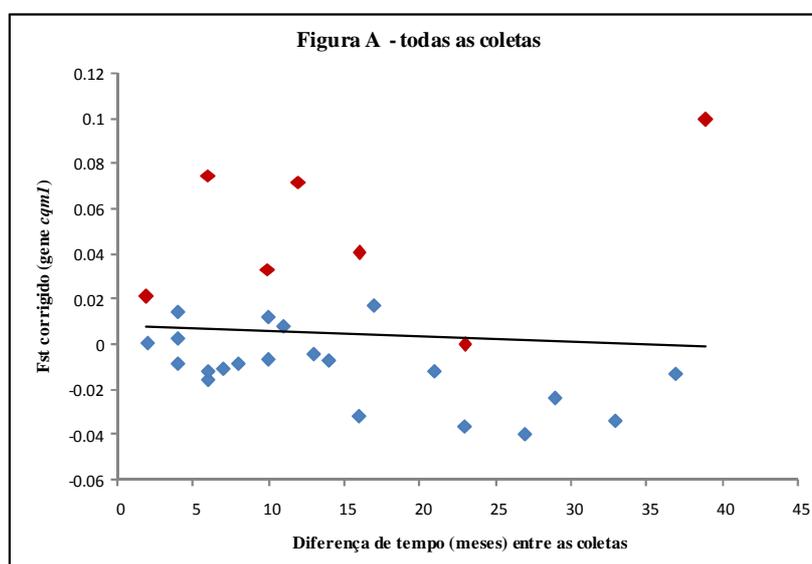
As comparações par-a-par realizadas pelo índice de  $F_{ST}$  resultaram em 2 valores estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) e todos eles envolveram comparações com a 1ª coleta

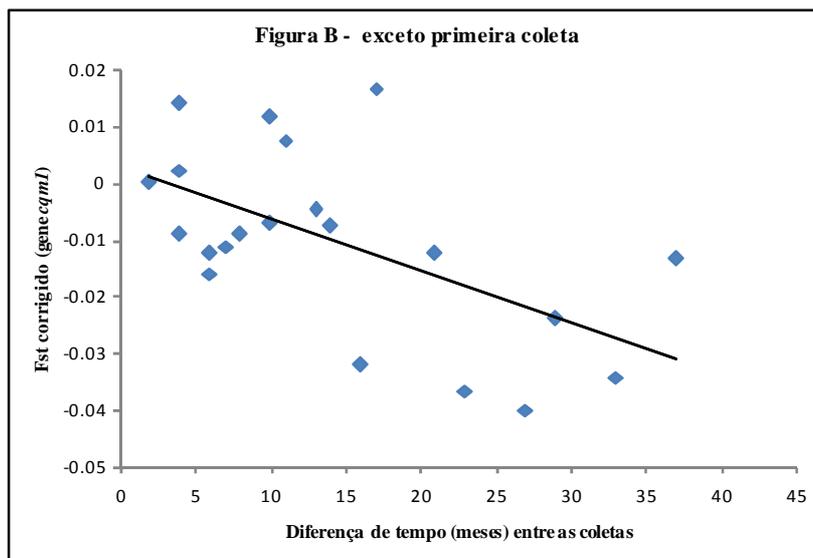
(tabela 12). Após as correções de Bonferroni, entretanto, nenhum dos valores de  $F_{ST}$  apresentou diferença estatisticamente significativa. Não foi observada associação significativa (teste de Mantel;  $r = -0.068$ ,  $p = 0.502$ ) entre os índices de  $F_{ST}$  para o gene *cqm1* e a distância temporal transcorrida entre os momentos estudados (figura 12). Como algumas comparações par-a-par com a 1ª coleta apresentaram altos valores de  $F_{ST}$ , foi realizado outro teste de Mantel entre os índices de  $F_{ST}$  e a distância temporal, excluindo as comparações com a 1ª coleta, a fim de determinar a correlação entre ambos. Ainda assim não foi observada uma associação significativa (teste de Mantel;  $r = -0.578$ ,  $p = 0.878$ ) (figura 12) entre os índices de  $F_{ST}$  e a distância temporal. Este resultado foi gerado pela comparação entre as matrizes de  $F_{ST}$  corrigido (tabela 12) e a do tempo de separação entre as coletas (tabela 3).

**Tabela 12** - Valores de diferenciação genética ( $F_{ST}$  corrigido) entre os diversos momentos de coleta (diagonal esquerda abaixo) e seus respectivos níveis de significância (p) (diagonal direita acima), obtidos através da análise do gene *cqm1*. Os valores em negrito referem-se àqueles estatisticamente significantes.

	1ª Coleta (Jun/03)	2ª Coleta (Ago/03)	3ª Coleta (Dez/03)	4ª Coleta (Abr/04)	5ª Coleta (Jun/04)	6ª Coleta (Out/04)	7ª Coleta (Mai/05)	8ª Coleta (Set/06)
1ª Coleta (Jun/03)	-	0.25714	<b>0.0125</b>	0.06429	<b>0.04286</b>	0.06071	ND	0.24821
2ª Coleta (Ago/03)	0.021018	-	0.27857	0.70179	0.26964	0.58036	0.65536	0.66964
3ª Coleta (Dez/03)	<b>0.074446</b>	0.014061	-	0.37321	ND	0.63214	0.26429	1
4ª Coleta (Abr/04)	0.033097	-0.00881	0.002371	-	0.40893	1	0.6	0.70714
5ª Coleta (Jun/04)	<b>0.071652</b>	0.011832	-0.01587	0.000339	-	0.625	0.41607	1
6ª Coleta (Out/04)	0.040046	-0.00738	-0.00685	-0.01218	-0.00879	-	0.55	1
7ª Coleta (Mai/05)	0	-0.01208	0.016922	-0.00449	0.007728	-0.01098	-	1
8ª Coleta (Set/06)	0.099453	-0.01332	-0.03401	-0.0239	-0.03987	-0.0365	-0.03196	-

\* ND, resultados não disponíveis.





**Figura 12** - Análise de regressão entre a diferenciação genética ( $F_{ST}$  corrigido) e o tempo de separação entre as coletas, para o gene *cqm1*. A: Comparações considerando todos os momentos estudados, os pontos vermelhos destacam apenas as comparações par - a - par com a 1ª coleta enquanto os pontos azuis mostram as comparações entre as coletas restantes. B: Comparações excluindo o 1º momento de coleta.

### 8.3 Comparação entre os microssatélites e o gene *cqm1*

Os resultados da comparação entre as matrizes de  $F_{ST}$  corrigido dos 5 *loci* de microssatélites e do gene *cqm1* sob interferência da matriz do tempo de separação entre as coletas, realizada através do teste parcial de Mantel, mostraram que não houve associação (teste parcial de Mantel= -0,05 ,  $p= 0,06$ ) entre o marcador neutro e o marcador sob pressão de seleção.

## 9 DISCUSSÃO

O presente trabalho forneceu evidências de que o programa de controle vetorial para combate da espécie *Culex quinquefasciatus*, realizado em Água Fria, ainda não foi capaz de impactar drasticamente a diversidade bem como de causar uma estruturação nesta população, apesar de alguns parâmetros terem apresentado correlação significativa com o tempo decorrido de estudo. Atividades voltadas para combate de mosquitos vetores de doenças, as quais podem englobar medidas de controle físico, químico e/ou biológico, quando bem sucedidas, ocasionam reduções na densidade populacional destes insetos. Regis et al. (1995) e Regis et al. (2000) demonstraram com clareza este fato ao avaliarem populações de *Cx. quinquefasciatus* que estiveram sujeitas, em ambos os estudos, a ações físicas voltadas para a eliminação de seus criadouros e que foram expostas ao agente biológico de controle *Bacillus sphaericus*. Os impactos sobre a densidade populacional podem resultar em alterações na composição genética de uma população. Tais mudanças podem ser percebidas pela perda de diversidade e aumento da diferenciação genética de genes neutros. Um exemplo do fato acima mencionado foi mostrado por Huber et al. (2002), em um estudo sobre a variação genética temporal de populações de *Aedes aegypti* no Vietnã. Através da análise de isoenzimas e microssatélites, eles demonstraram que durante as estações chuvosas, quando foram registradas altas densidades de mosquitos, também se observou uma redução de diferenciação genética, ao passo que, nas estações mais secas, foram registradas grandes depressões nestas populações, associadas a um aumento de diferenciação genética (HUBER et al., 2002).

Diante do que foi previamente exposto, seria possível encontrar, a partir dos resultados obtidos para o marcador neutro, uma redução nos valores dos parâmetros de diversidade genética e um aumento de diferenciação na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria ao longo do programa. No que diz respeito à análise de microssatélites, a riqueza de alelos ( $R_S$ ) apresentou uma associação estatisticamente significativa com o tempo ( $r = -0,930$  e  $p = 0,0008$ ), cuja relação foi inversamente proporcional. No entanto, esta correlação não foi corroborada pelo parâmetro de heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) ( $r = -0,388$  e  $p = 0,342$ ) e pelo o índice de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) ( $r = 0,190$ ,  $p = 0,187$ ). De acordo com Cornuet; Luikart (1996), quando uma população é submetida a eventos causadores de afunilamento, o número de alelos, principalmente os raros, decresce mais rapidamente do que as frequências alélicas. Como o cálculo da  $R_S$  é baseado no número de alelos e os de  $H_E$  e  $F_{ST}$  são baseados nas frequências alélicas, espera-se que as intervenções no âmbito do programa de controle de

Água Fria provoquem inicialmente uma diminuição nos valores de  $R_S$  para só depois reduzirem os valores de  $H_E$  e aumentarem os de  $F_{ST}$ . De fato, no presente trabalho, a  $R_S$  foi o único parâmetro que apresentou uma associação estatisticamente significativa com o tempo. O conjunto de resultados obtidos pelo marcador de microssatélite sugere que esteja ocorrendo um impacto sobre a diversidade genética da população de *Cx. quinquefasciatus*, porém ainda muito incipiente, uma vez que este ainda não pode ser percebido através dos parâmetros de  $H_E$  e  $F_{ST}$ .

Os resultados obtidos através do estudo de microssatélites possibilitaram também se fazer inferências sobre a ocorrência de possíveis eventos de migração em determinados momentos ao longo do programa de controle. Por exemplo, o intervalo entre a 2ª e 3ª coleta é sugestivo de ter sido influenciado pelo fenômeno de migração uma vez que, após ter sido precedido por uma redução da  $H_E$  para um valor de 0,4676 na 2ª coleta, a  $H_E$  subiu para 0,497 na 3ª coleta, recuperando o mesmo valor que tinha no início do estudo. Também houve um crescimento de 2 alelos raros na 2ª coleta para 4 alelos raros na 3ª coleta. Do total de alelos raros encontrados na 3ª coleta, 3 deles foram observados em momentos subsequentes sugerindo que os mesmos podem ter sido incorporados à população de Água Fria. Outro intervalo que sugere o evento de migração é o tempo compreendido entre a 5ª e a 6ª coleta. O parâmetro  $R_S$  apresentou uma queda constante e gradual desde o início do estudo, com exceção da 6ª coleta quando se observou um aumento sutil, atingindo um valor de 3,2228. O resultado obtido pelo parâmetro  $H_E$  também sugeriu o mesmo fato uma vez que o seu valor subiu de 0,4904 na 5ª coleta para 0,5094 na 6ª coleta, atingindo o maior valor de  $H_E$  de todo o período avaliado.

De acordo com as situações supracitadas, a migração foi considerada como uma provável causa para o aumento de diversidade genética do marcador microssatélite em alguns momentos de estudos, que estavam sendo antecidos pela redução de diversidade genética. Tais resultados sugerem que a área de cobertura do programa deve ser maior e que talvez as aplicações de *B. sphaericus* devem ser realizadas com um intervalo de tempo inferior a 2 meses. Diversos trabalhos utilizando marcadores moleculares neutros já relataram o papel da migração sobre a estruturação genética de populações de diferentes espécies de insetos vetores (RONGNOPARUT et al., 1999; HUBER et al., 2002; KENT; MHARAKURWA; NORRIS 2007). Um estudo, realizado com uma população africana de *Anopheles arabiensis* submetida a um programa de controle baseado no emprego de mosquiteiros impregnados com inseticida químico, também apontou a imigração como a causa para o aparecimento de alelos

raros quase um ano após o programa alcançar uma cobertura de 100% das residências (WONDJI et al., 2005).

Eventos de migração compreendem o fluxo de indivíduos entre diferentes bairros adjacentes à área de estudo. Além disso, outra questão importante, que já foi relatada, é a existência de refúgios, como criadouros não tratados e ativos no interior do próprio bairro em questão. O papel destes refúgios é crucial para limitar o êxito das atividades de controle vetorial, conforme mostrado por Regis et al. (2000), ao realizar um trabalho com uma população de *Cx. quinquefasciatus*, proveniente de Jardim Brasil (Olinda), a qual foi submetida a ações de controle com o uso do *B. sphaericus*. As reduções mais significativas nos índices de mosquitos foram alcançadas apenas quando o número de criadouros registrados e tratados subiu de aproximadamente 150 para 325, após um recadastramento, que permitiu a ampliação da área de cobertura tratada com o agente biológico de controle. Outra situação abordada neste mesmo trabalho foi o papel de uma lagoa existente em Jardim Brasil (Olinda) que, devido à falta de equipamentos, não pôde ser tratada adequadamente com o *B. sphaericus*, servindo como área de refúgio para postura dos ovos de *Cx. quinquefasciatus*. Nas áreas próximas à lagoa foram observadas flutuações sem reduções significativas no número de mosquitos ao passo que, nas estações de captura mais distantes da lagoa, ocorreu um decréscimo abrupto de 45 mosquitos por quarto por noite para um valor de apenas 10 no mês de coleta subsequente, chegando a atingir nos últimos momentos de tratamento valores inferiores a 5 mosquitos por quarto por noite (REGIS et al., 2000).

Paralelamente aos efeitos causados pela diminuição de densidade populacional, o emprego de inseticidas para controle químico e o uso de bactérias entomopatogênicas para controle biológico também são capazes de promover a seleção de indivíduos portadores de genes e/ou alelos envolvidos com mecanismos de resistência em resposta às perturbações sofridas. Com o passar do tempo, é possível que ocorram alterações na composição genética das populações, referentes aos genes sujeitos à pressão de seleção. Tais mudanças podem resultar no aumento das frequências de alelos de resistência e conseqüentemente da diversidade genética assim como no aumento da diferenciação genética. Chalegre et al. (2009), por exemplo, encontraram altas frequências do alelo *cqm1<sub>REC</sub>*, envolvido com a resistência ao *B. sphaericus*, em populações de *Cx. quinquefasciatus*, ao comparar áreas tratadas e não tratadas com tal agente biológico. Lenormand et al. (1999) também reportaram aumentos nas frequências de alelos envolvidos com mecanismo de resistência a inseticidas químicos durante a exposição de populações de *Cx. pipiens* a organofosforados (OPs).

De acordo com o exposto acima, era esperado encontrar, na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria, um aumento na frequência do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* e na diversidade genética, representada pelo parâmetro de heterozigosidade esperada, bem como o aumento de diferenciação genética medida pelo marcador submetido à pressão de seleção (gene *cqm1*). Em comparação com o 1º momento de coleta, houve um aumento tanto na frequência do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* como nos valores de heterozigosidade esperada, entretanto, este aumento não foi constante, apresentando flutuações no decorrer do programa de controle. É importante salientar que a queda na frequência do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* para o valor de zero na 7ª coleta foi decorrente do pequeno tamanho amostral avaliado, apenas 10 indivíduos, uma vez que Chalegre et al. (2009) detectou previamente uma frequência de 0,053, ao avaliar 325 amostras provenientes da mesma área neste mesmo mês de coleta. O parâmetro heterozigosidade esperada não apresentou uma correlação estatisticamente significativa ( $r = 0,248$  e  $p = 0,554$ ) com tempo transcorrido desde o início do estudo. Também não foi observada associação significativa (teste de Mantel;  $r = -0,068$ ,  $p = 0,502$ ) entre os índices de  $F_{ST}$  para o gene *cqm1* e a distância temporal transcorrida entre os momentos estudados. Os resultados obtidos pelo estudo do gene *cqm1* permitiram também se fazer inferências sobre a possível ocorrência de migração de indivíduos portadores do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* em determinados momentos durante o programa de controle. Exemplos sugestivos são os intervalos entre a 2ª e 3ª coleta e entre a 4ª e 5ª coleta, quando houve crescimentos abruptos nas heterozigosidades esperadas, cujos valores praticamente dobraram em relação à coleta anterior.

As flutuações dos valores de heterozigosidade, referentes no estudo com o gene *cqm1*, podem ser devidas à migração. A migração exerce um importante papel capaz de ameaçar as ações de controle vetorial nos casos em que os imigrantes sejam portadores de genes ou alelos capazes de conferir resistência aos mosquitos contra os inseticidas. Por outro lado, a introdução de indivíduos susceptíveis pode prevenir o desenvolvimento de resistência. Possíveis problemas relacionados à introdução de genes envolvidos com mecanismos de resistência a inseticidas químicos foram relatados por Lenormand et al. (1999). Eles focaram seu estudo na descrição dos papéis antagônicos da migração e da seleção, envolvidos na dinâmica local de 2 *loci* de resistência a inseticidas químicos (*Ace* e *Ester*), em populações de *Cx. pipiens* tratadas e não tratadas com OPs no sul da França. Os resultados mostraram que a seleção proporcionou um aumento na frequência de alelos de resistência, acompanhado por um custo biológico, que foi percebido após a interrupção das ações de controle vetorial. Já o fluxo gênico teve o efeito de reduzir as frequências dos alelos de resistência, em áreas expostas a inseticidas químicos, causando uma homogenização nas populações de *Cx. pipiens*

sujeitas à seleção, e de aumentar a frequência dos alelos de resistência em áreas não tratadas (LENORMAND et al., 1999). Recentemente, Chalegre et al. (2009) reportaram frequências relativas do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* de 0,0029 em Fazenda Nova e de 0,0061 em Peixinhos, ambas áreas não tratadas com *B. sphaericus*, sendo a primeira distando 180 km de Recife e a segunda com 3 km de proximidade a Água Fria. Além disso, na década passada, os bairros do Coque, em Recife, e o de Jardim Brasil, em Olinda, foram expostos por dois anos a um programa de controle do *Cx. quinquefasciatus*, no qual se utilizou o agente biológico *B. sphaericus* (REGIS et al., 1995; REGIS et al., 2000). Possivelmente, no decorrer deste período, o alelo *cqm1<sub>REC</sub>* foi sendo selecionado em ambas as áreas. O bairro de Jardim Brasil situa-se a aproximadamente 1,5 km de Peixinhos, o que permite que ocorra um fluxo gênico entre as populações destas duas áreas. Imigrações antigas do alelo *cqm1<sub>REC</sub>*, provenientes de Jardim Brasil, associado com imigrações recentes, a partir de Água Fria, pode ser umas das razões para a detecção de altas frequências de alelos de resistência em Peixinhos quando comparada às frequências em Fazenda Nova, conforme mostrado por Chalegre et al. (2009). Estas observações sugerem que é possível ocorrer fluxo gênico de indivíduos portadores de alelos de resistência de outras áreas em Recife para Água Fria assim como pode ocorrer o inverso.

Os resultados do presente trabalho sugerem que a área de cobertura do programa deve ser maior. A aplicação de *B. sphaericus* em intervalos inferiores a 2 meses também poderia ser uma alternativa no combate ao mosquito *Cx. quinquefasciatus*. No entanto, como foi observado o aumento da frequência do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* em Água Fria, uma solução plausível seria fazer um manejo destas estratégias através da rotação com *B. thuringiensis* a fim de evitar que esta população fique refratária ao *B. sphaericus* (REGIS et al., 2000; ZAHIRI; MULLA, 2003). O possível manejo não deverá ser considerado em curto prazo, uma vez que, o aumento da frequência do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* foi devido principalmente a 20 indivíduos heterozigotos susceptíveis e, como a herança deste alelo é recessiva, o status de susceptibilidade na população de Água Fria possivelmente continua. Chalegre et al. (2009) demonstrou tal fato, através de análises por bioensaios, ao relatar que os níveis de susceptibilidade foram similares entre uma colônia susceptível de laboratório (CqSF) e a população de Água Fria sob controle com o *B. sphaericus*.

Atualmente os índices entomológicos, empregados para estimar densidades das formas jovens e adultas, são amplamente utilizados na avaliação da eficácia de programas de controle de mosquitos vetores. Entretanto, a sensibilidade destes métodos pode apresentar limitações em decorrência das populações das diversas espécies de mosquitos vetores serem

muito grandes e r-estrategistas. Desta maneira, reduções observadas nos valores dos índices entomológicos podem não ser capazes de mensurar as diferenças estatísticas entre tais números, uma vez que, estas populações têm o potencial de se recuperarem rapidamente após sofrerem impactos sobre as suas densidades. Estudos com marcadores moleculares podem ser capazes de fornecer importantes informações a respeito da diversidade genética de populações mosquitos vetores. A manutenção da diversidade é importante para tais populações, uma vez que, alguns genes podem facilitar adaptações a novas condições ambientais ou a respostas contra o uso de inseticidas químicos e biológicos. Quanto maior for a perda de diversidade, menor é a chance de sobrevivência da população em resposta às alterações no meio em que vivem. Desta maneira, o emprego de estudos com marcadores moleculares, como ferramenta complementar aos índices entomológicos, pode colaborar na tentativa de se obter informações mais acuradas a respeito dos impactos provocados pelos programas de controle vetoriais.

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

Um terceiro trabalho, bastante semelhante ao presente estudo realizado em Água Fria, inclusive no que se refere aos resultados obtidos, foi desenvolvido por Wondji et al. (2003). Eles procuraram avaliar o impacto causado pelo uso de mosquiteiros, tratados com o

inseticida piretróide deltametrina, sobre a estrutura genética de uma população de *Anopheles arabiensis* em uma vila localizada em Camarões (África). Nenhum dos parâmetros de diversidade genética avaliados (heterozigosidades esperada e observada e número de alelos por *locus*) apresentou diferenças estatisticamente significantes antes e após a utilização dos mosquiteiros impregnados com o inseticida. Também foi observado o aparecimento de alelos raros nas amostras referentes ao último momento de estudo (WONDJI et al., 2005), assim como ocorreu com a população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria. Wondji et al. (2005) relataram que mesmo que o uso do inseticida tenha provocado uma alta taxa de mortalidade, o tamanho da população remanescente foi suficiente para manter a estabilidade dos parâmetros de variabilidade genética desta população. Provavelmente esta é a mesma situação que está acontecendo com a população de *Cx. quinquefasciatus* proveniente de Água Fria.

Além dos exemplos mencionados acima, no que se refere aos estudos genéticos com marcadores neutros, também são encontrados estudos que empregam marcadores submetidos à pressão de seleção para avaliar as conseqüências provocadas pelo uso de inseticidas químicos ou biológicos. Trabalhos já mencionados anteriormente, como os realizados por Lenormand et al. (1999) e Chalegre et al. (2009), cumprem tal objetivo. Outro exemplo interessante foi um estudo realizado por Chevillon et al. (1995), que visou a realização de análises sobre a estrutura e a dinâmica de genes sob pressão de seleção, comparando-os com marcadores neutros. A pesquisa foi feita com populações de *Cx. pipiens* provenientes do norte da Espanha e sul da França. Para o estudo avaliou-se a dinâmica do gene *Ester*, que codifica as esterases envolvidas com a degradação ou seqüestro de OPs, e do gene *Ace*, responsável por codificar acetilcolinesterases alteradas que perdem a sensibilidade ao inseticida químico. As análises do marcador neutro foram feitas por perfis eletroforéticos de 5 *locus* enzimáticos. As amostras foram coletadas intercalando-se pontos que haviam sido expostos ao tratamento com inseticidas OPs, desde o ano de 1970, com áreas nunca tratadas. Os resultados dos marcadores neutros apontaram uma homogenização entre estas populações, provavelmente decorrentes de um intenso fluxo gênico, ao longo de toda a área de estudo (850 km). Já no que se refere aos marcadores sob pressão de seleção, observou-se uma grande heterogeneidade, alguns alelos apresentaram-se amplamente dispersos geograficamente enquanto outros estiveram restritos ou com altas freqüências apenas nas áreas tratadas com OPs. A vasta distribuição de certos alelos envolvidos com mecanismos de resistência aos inseticidas químicos está correlacionada com o controle de mosquitos em larga escala que seleciona tais alelos e com o fenômeno de migração. Quando ocorrem altas taxas de migração, alelos de resistência são importados para áreas não tratadas e alelos de susceptibilidade são exportados

às áreas tratadas. Tal processo resulta em um decréscimo de susceptibilidade em ambientes não expostos aos inseticidas químicos, ao menos que, estes alelos de resistência tenham um custo, ou seja, se eles forem capazes de reduzir o *fitness* da população (CHEVILLON et al., 1995).

A cidade de Recife apresenta condições sócio-ambientais bastante favoráveis à reprodução e à expansão de populações de mosquitos. A urbanização de Recife gerou espaços intra-urbanos extremamente contrastantes, intercalando favelas com luxuosos edifícios situados muitas vezes no mesmo bairro da cidade. As favelas, formadas por aglomerados de casas mal construídas, geralmente em regiões alagadas, desprovidas de serviço de saneamento oferecem as condições adequadas à proliferação da espécie *Cx. quinquefasciatus*. Aliados a esta desorganização social, encontram-se os condicionantes ambientais. A cidade de Recife é cortada por rios e canais e em boa parte de seu território é constituído por aterros de mangue o que deixa esta cidade sujeita a alagamentos periódicos (ALBUQUERQUE, 1993). Altas temperaturas e umidade durante todo o ano também favorecem a reprodução desta espécie vetora. O regime pluviométrico, que consiste em um período constante de densa intensidade de chuvas, entre março e agosto, seguido por uma estação caracterizada por chuvas esparsas, também contribui para a situação (REGIS et al., 1995). A associação de todas estas condições dificulta a eliminação dos criadouros distribuídos ao longo da cidade bem como favorece a estabilidade das populações de *Cx. quinquefasciatus* e permitem manutenção de um fluxo gênico entre diferentes áreas de Recife.

Estudos realizados com populações de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de diferentes bairros de Recife, sujeitos ou não a ações de combate vetorial, já foram capazes de mostrar como tais populações estão bem adaptadas às condições sócio-ambientais desta cidade, o que permite a manutenção de elevadas densidades de mosquitos. Por exemplo, Silva et al. (1994), através de um estudo com sistemas aloenzimáticos, compararam amostras de 5 diferentes bairros em Recife e mostraram que a diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) entre as populações de *Cx. quinquefasciatus* na cidade não é significativa. Os canais, principalmente durante a estação chuvosa, e os meios de transportes foram apontados como possíveis facilitadores para a dispersão de ovos e mosquitos, respectivamente, ao longo da cidade de Recife (SILVA et al., 1994). Ao estudar uma população de *Cx. quinquefasciatus* no bairro do Coque (Recife), Regis et al. (1995) registraram valores entre 120 e 60 mosquitos por quarto por noite, o que reflete as condições ambientais existentes na área. Após o início das ações para controle físico e biológico (uso do *B. sphaericus*) da espécie *Cx. quinquefasciatus* no Coque, a densidade populacional só veio a reduzir drasticamente, para valores próximos a 20 mosquitos por

quarto por noite, após 12 tratamentos. Mesmo assim, ainda houve aumentos moderados neste índice entre o 27º e o 30º tratamentos, com valores próximos a até 50 mosquitos por quarto por noite (REGIS et al., 1995). Regis et al. (2000) realizaram um outro trabalho com uma população de *Cx. quinquefasciatus* também submetida a ações de controle com o uso do *B. sphaericus* coletada em Jardim Brasil (Olinda). Anteriormente ao uso da bactéria, foram registradas flutuações entre aproximadamente 20 a 50 mosquitos por quarto por noite. No início do tratamento com o agente entomopatogênico foi observado um valor de quase 40 mosquitos por quarto por noite com redução da densidade de adultos que chegou a alcançar valores mínimos inferiores a 10 mosquitos por quarto por noite nos últimos momentos de estudo. Conforme descrito no início da discussão, outro ponto importante do referido trabalho foi mostrar como o êxito das atividades de controle vetorial podem ser limitados em consequência da área de cobertura tratada não ser suficiente para eliminar os criadouros da espécie *Cx. quinquefasciatus*, possibilitando a existência de refúgios para postura de seus ovos (REGIS et al., 2000).

A densidade populacional do mosquito *Cx. quinquefasciatus* é um componente determinante na eficiência de transmissão da filariose e deve ser avaliada com cuidado em programas de erradicação desta doença, uma vez que, mais de 15.000 picadas por fêmeas do vetor infectadas são necessárias para estabelecer a infecção em um novo paciente (HAIRSTON; MEILLON, 1968). Isto sugere que em áreas com alta infestação vetorial, a interrupção da transmissão da doença será muito mais difícil. Portanto, a quantificação da densidade populacional do vetor de forma acurada é essencial no âmbito de programas de controle da filariose.

Os índices anuais de densidade das formas jovens de mosquitos obtidos em Água Fria, fornecidos pelo Centro de Vigilância Ambiental da Secretaria de Saúde do Recife, apresentaram um decréscimo em seus valores ao longo do programa, porém o nível de significância deste decréscimo ainda é desconhecido. Entretanto, de acordo com o conjunto de resultados obtidos no presente trabalho, observou-se que a diversidade genética desta população apresentou uma queda sutil durante o estudo e que as ações ainda não foram suficientes para causar uma estruturação da população em questão. Além disso, houve um aumento na frequência do alelo de resistência *cqm1<sub>REC</sub>*. Assim conclui-se que as ações no âmbito do programa de controle vetorial ainda não foram suficientes para causar reduções drásticas na composição genética da população de *Cx. quinquefasciatus* proveniente Água Fria. É importante salientar ainda que, se estas ações de controle forem interrompidas, a população de Água Fria irá provavelmente recuperar rapidamente a sua densidade inicial, uma

vez que pouca diversidade foi perdida, visualizada apenas através do parâmetro  $R_s$ , e ainda não houve uma estruturação genética nesta população. Também é necessário focar as atenções para um possível manejo da resistência, visto que houve um aumento na frequência do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* na população, entretanto este deve ser considerado em longo prazo, uma vez que, o crescimento foi devido principalmente aos indivíduos heterozigotos susceptíveis. Será necessário um tempo de estudo maior como esforço para mensurar o impacto causado pelas medidas de controle vetorial no âmbito do Programa de Controle da Filariose em Recife.

---

---

## 10 CONCLUSÕES

- O programa de controle vetorial para combate à espécie *Culex quinquefasciatus* ainda não foi capaz de impactar drasticamente a diversidade genética da população de Água Fria, uma vez que, apenas o parâmetro de riqueza de alelos apresentou uma correlação significativa com o tempo decorrido de estudo;
- O uso do *Bacillus sphaericus* provavelmente induziu o aumento na frequência do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* na população de *Cx. quinquefasciatus* de Água Fria, ocasionado principalmente pelos indivíduos heterozigotos não resistentes a tal bactéria, sugerindo que o status de susceptibilidade continua, uma vez que, a herança deste alelo é recessiva, entretanto, o seu monitoramento é importante a fim de se fazer um manejo da resistência no futuro;
- Alguns dos momentos avaliados no estudo sugerem que esteja havendo a ocorrência do fenômeno de migração, indicando que o programa necessita alcançar uma maior área de cobertura;
- Caso as intervenções voltadas para o controle da espécie *Cx. quinquefasciatus* em Água Fria sejam interrompidas, possivelmente haverá um restabelecimento da diversidade nesta população, uma vez que, apenas uma pequena quantidade de diversidade genética foi perdida;
- Ao longo dos 3 anos avaliados, pouca diversidade genética foi perdida para o marcador de microssatélites e o aumento na frequência do gene *cqm1<sub>REC</sub>* foi devido principalmente aos indivíduos heterozigotos susceptíveis, sugerindo que as abordagens com marcadores moleculares sejam mais adequadas para avaliar apenas os efeitos a longo prazo de programas de controle vetorial, o que implica estudar tais populações em intervalos de tempo mais longos.

---

---

## REFERÊNCIAS

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

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

ANDERSON, R. C. Order Spirurida-Suborder Spirurina. In: ANDERSON, R. C. (Ed.) Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2<sup>nd</sup> ed. Oxon: CABI Publishing, 2000. p. 383-590.

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

BARBOSA, R. M. R. et al. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Memórias do instituto oswaldo cruz, v. 102, n. 5, p. 523-529, 2007.

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

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

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

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

BLACK, W. C.; DUTEAU, N. M. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: CRAMPTON, J. M.; BEARD, C. B.; LOUIS, C. (Ed.). The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual. 1<sup>st</sup> ed. London: Chapman & Hall, 1997. p. 361-373.

---

BLACK, W. C.; TABACHNICK, W. J. Population genetics of disease vectors. In: MARQUARDT, W. C. et al. (Ed.). Biology of disease vectors. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 95-111.

BLITVICH, B. J. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. Animal health research reviews, v. 9, n. 1, p.71-86, 2008.

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

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

BRAGA, C. et al. Bancroftian filariasis in an endemic area of Brazil: differences between genders during puberty. Revista da sociedade brasileira de medicina tropical, v. 38, n. 3, p. 224-228, 2005.

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

CARTAXO, M. F. S. Abordagens moleculares aplicadas na avaliação de um programa de controle biológico do mosquito *Culex quinquefasciatus*. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

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

CHALEGRE, K. D. M. et al. An allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin is detected in *Culex quinquefasciatus* populations through molecular screening. Applied and environmental microbiology, v. 75, n. 4, p.1044-1049, 2009.

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

---

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

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

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

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

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. 20ª ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

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

CULEX. 2006. Altura: 285 pixels. Largura: 268 pixels. 29,31 Mb. Formato JPEG. Disponível em: <<http://centros.edu.xunta.es/iesaslagoas/slorenf/ins26.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2006.

CULEX. 2008. Altura: 551 pixels. Largura: 800 pixels. 12,9 Mb. Formato JPEG. Disponível em: <<http://www.ms mosquito.com/newsroom.html>>. Acesso em: 02 nov. 2008.

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

DARBOUX, I. et al. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america, v. 99, n. 9, p. 5830-5835, 2002.

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

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

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

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

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

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

ELDRIDGE, B. F. Mosquitoes, the Culicidae. In: MARQUARDT, W. C. et al. (Ed.). Biology of disease vectors. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 95-111.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3<sup>a</sup> ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.

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

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

FONSECA, D. M. et al. Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. American journal of tropical medicine hygiene, v. 72, n. 2, p. 284-289, 2006.

---

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

FONTES, G. et al. Filariose linfática em Belém, Estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. Revista da sociedade brasileira de medicina tropical, v. 38, n. 2, p. 131-136, 2005.

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

GATHANY, J. 2008. Altura: 244 pixels. Largura: 400 pixels. 18,153 Mb. Formato JPEG. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/wbt/resistance/vectors/index.htm>>. Acesso em: 02 nov. 2008.

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

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

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

GYAPONG, J. O; TWUM-DANSO, N. A. Y. Global elimination of lymphatic filariasis: fact or fantasy? Tropical medicine and international health, v. 11, n. 2, p. 125-128, 2006.

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

HARRIS, H. Enzyme polymorphism in man. Proceedings of the royal society of London, series B, v. 164, n. 995, p. 298-310, 1966.

HARTL, D. L. A primer for population genetics. 2<sup>nd</sup> edition. Massachusetts: Sinauer Associates, 1988.

---

HEMINGWAY, J. Biological control of mosquitoes. In: MARQUARDT, W. C. et al. (Ed.) Biology of disease vectors. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 649-660.

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

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

HOY, M. A. Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Academic Press of Elsevier Science, 2003.

HUANG, S.; MOLAEI, G.; ANDREADIS, T. G. Genetic insights into the population structure of *Culex pipiens* (Diptera: culicidae) in the northeastern United States by using microsatellite analysis. The american journal of tropical medicine and hygiene, v. 79, n. 4, p. 518-527, 2008.

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

KAHINDI, S. C. et al. Efficacy of vectobac DT and culinexcombi against mosquito larvae in unused swimming pools in Malindi, Kenya. Journal of the american mosquito control association, v. 24, n. 4, p. 538-542, 2008.

KENT, R. J.; MHARAKURWA, S.; NORRIS, D. E. Spatial and temporal; genetic structure of *Anopheles arabiensis* in Southern Zambia over consecutive wet and drought years. The american journal of tropical medicine and hygiene, v. 77, n. 2, p. 316-323, 2007.

KIMURA, M. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. Molecular biology and evolution, v. 1, n. 1, p. 84-94, 1983.

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

KUMAR, A. et al. Control of *Culex quinquefasciatus* with *Bacillus sphaericus* in Vasco City, Goa. Journal of the american mosquito control association, v. 12, n. 3, p. 409-413, 1996.

LAURENCE, B. R.; PICKETT, J. A. Erythro-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the major component of a mosquito oviposition attractant pheromone. Journal of the chemical society, chemical communications, v. 1, p. 59-60, 1982.

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

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

LINDBLADE, K. A. et al. Evaluation of long-lasting insecticidal nets after 2 years of household use. Tropical medicine & international health, v.10, n. 11, p.1141-1150, 2005.

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

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

MACIEL A. et al. Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, northeastern Brazil. Memórias do instituto oswaldo cruz, v. 91, n.4, p. 449-455, 1996.

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

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

MEDEIROS, Z. et al. A filariose bancroftiana no município de Moreno - Pernambuco, Brasil. Revista brasileira de epidemiologia, v. 7, n. 1, p. 73-79, 2004.

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

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

---

---

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

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

NEI, M. Molecular evolutionary genetics. 1<sup>st</sup> edition. New York: Columbia University Press, 1987.

NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolution and phylogenetics. 1<sup>st</sup> edition. New York: Oxford University Press, 2000.

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

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

OLIVEIRA, C. M. F. Condições ambientais e densidade populacional do *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), em áreas urbanas do Recife e Olinda. 1996. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

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

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

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

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

---

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

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

PLANO municipal de saúde 2006-2009: Recife saudável - Inclusão social e qualidade no SUS. Recife: Prefeitura do Recife, 2006. 102 p.

PREFEITURA DO RECIFE. Secretaria de planejamento participativo Disponível em: <<http://www.recife.pe.gov.br/pr/secplanejamento/infocrec/bairros.php>>. Acesso em: 23 ago. 2008.

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

RACHOU, R. G. Conceito e programa de profilaxia da filariose bancroftiana no Brasil. Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais, v. 12, n. 1, p. 11-40, 1960.

RAO, D. R. et al. Development of high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. Journal of the american mosquito control association, v. 11, n. 1, p. 1-5, 1995.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENETPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. The journal of heredity, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.

RECIFE. Prefeitura. Secretaria de Saúde. Projeto de controle integrado de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), vetor da filariose bancroftiana na cidade do Recife. Recife: [s.n], 2003. 39 f. (Programa de Saúde Ambiental).

REGIS, L. et al. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. Memórias do instituto oswaldo cruz, v. 90, n. 1, p. 115-119, 1995.

---

REGIS, L. et al. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene, v. 94, n. 5, p. 488-492, 2000.

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

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

REY, L. Filaríase linfática. In: REY, L. Bases da parasitologia médica. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 268-275.

ROCHA, E. M. M. et al. Filariose bancroftiana em áreas urbanas do Estado de Alagoas, nordeste do Brasil: estudo em população geral. Revista da sociedade brasileira de medicina tropical, v. 33, n. 6, p. 545-551, 2000.

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

RONGNOPARUT, P. et al. Estimates of gene flow among *Anopheles maculates* populations in Thailand using microsatellite analysis. American journal of tropical medicine hygiene, v. 60, n. 3, p.508-515, 1999.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TDR (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases). 2002. In: World Health Organization. Disponível em:

<<http://www.who.int/tdr/diseases/lymphfil/direction.htm>>. Acesso em: 28 fev. 2008.

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

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

WHO. 2000. In: World Health Organization. Disponível em:

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

---

WHO. 2006. Largura: 2027 pixels. Altura: 1358 pixels. 169,134 Mb. PNG. Disponível em: <[http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/World\\_endemic\(2\).png](http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/World_endemic(2).png)>. Acesso em: 20 ago. 2008.

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

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

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

ZAHIRI, N. S.; MULLA, M. S. Susceptibility profile of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* on selection with rotation and mixture of *B. sphaericus* and *B.thuringiensis israelensis*. Journal of Medical Entomology, v. 40, n. 5, p. 672-677, 2003.

---

---

## APÊNDICES

### Apêndice A – Artigo

#### **TEMPORAL GENETIC VARIABILITY IN A *Culex quinquefasciatus* POPULATION SUBJECTED TO A VECTOR CONTROL PROGRAM IN RECIFE, BRAZIL**

M. F. S. CARTAXO<sup>1</sup>; D. WEETMAN<sup>2</sup>; M. J. DONNELLY<sup>2</sup>; C. F. J. AYRES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP 50.670-420, Cidade Universitária, Recife/ PE, Brasil

<sup>2</sup> Vector Research Group, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK

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

Corresponding author: Constância Flávia Junqueira Ayres. Address: Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP 50.670-420, Cidade Universitária, Recife/ PE, Brasil. Tel: +55 81 21012549. E-mail: tans@cpqam.fiocruz.br

## ABSTRACT

Recife (northeast Brazil) is a lymphatic filariasis endemic city and, since 2003, a control program has been accomplished to interrupt the transmission of the disease. Strategies include actions for controlling *Culex quinquefasciatus* populations, the unique filariasis vector in Brazil, such as elimination of mosquito breeding sites and biological control through bimonthly treatment using *Bacillus sphaericus*. To assess the impact of this intervention on the vector population, the genetic diversity of *Cx. quinquefasciatus* population was monitored for 3 years in a treated area. We have analyzed data from neutral marker, microsatellites, and a putative under selection pressure marker, *cqm1* gene, which codifies the *B. sphaericus* toxin receptor. A slight loss of genetic diversity, revealed by microsatellites data, was detected by allelic richness parameter. The emergence of low frequency alleles as well as some point mutations in expected heterozygosity parameter, suggestive of immigration, were also detected along the time. An increasing in the resistance allele (*cqm1<sub>REC</sub>*) frequency was found in this study. The analysis of both markers detected no genetic structuring in *Cx. quinquefasciatus* population. Results showed that vector control program did not impact drastically the genetic diversity of *Cx. quinquefasciatus* population. Our results suggest that despite the reduction of annual entomological densities values, provided by Recife Department of Health, this *Cx. quinquefasciatus* population might recover its original densities if those activities were interrupted. Migration events, also suggested in this study, indicated that the program needs to enlarge its coverage area.

## INTRODUCTION

Recife is the major lymphatic filariasis endemic city in Brazil. The disease is caused by *Wuchereria bancrofti*, a nematode transmitted by culicidae mosquitoes, whose unique Brazilian vector is the species *Culex quinquefasciatus*. Filariasis was first reported in Recife by Azevedo & Dobbin (1952) who registered a high level of endemicity (prevalence rate of 9.7%). In the last survey, carried out in 21 different areas from Recife, the microfilaremia prevalence rate varied from 0.6% to 14.9%, with a mean of 6.5% (Maciel, Rocha, Marzochi et al. 1996). This parasitosis is distributed in 83 countries (Gyapong & Twum-Danso 2006) and affects about 120 million people over the planet, as pointed by World Health Organization (WHO).

A Global Program for the Elimination of Lymphatic Filariasis (GPELF), launched by WHO, aims to eradicate the disease all over the world until 2020 (Gyapong & Twum-Danso 2006). Taking this into account, Recife City Council has been carrying out a Filariasis Control Program, since March 2003, which aims to interrupt the disease transmission. Control strategies are focused currently on human population mass drug treatment with diethylcarbamazine (DEC) and some measures for reduction of *Cx. quinquefasciatus* populations through the elimination of mosquitoes breeding sites and bimonthly application of the entomopathogenic bacteria *Bacillus sphaericus*. These interventions started in Água Fria neighborhood which is one of the most populous area in Recife. This area was chosen because it presents a significant filariasis prevalence level (6.21%) and it was considered as a high socio-environmental risk site. Biological control has been the mainstay of *Cx. quinquefasciatus* control in Greater Recife since the last decade (Regis, Silva-Filha, Oliveira et al. 1995; Regis, Oliveira, Silva-Filha et al. 2000; Silva-Filha et al. 2001).

The *B. sphaericus* effectiveness against *Cx. quinquefasciatus* is due to a protein crystal produced during bacterial sporulation (Davidson & Myers 1981). The process initiates when a mosquito larvae ingests the crystal which is dissolved in insect midgut. Bacterium protoxin is composed by two peptides with 42 and 51 kDa (Baumann, Unterman, Baumann et al. 1985; Baumann et al. 1988) which undergo a proteolytic cleavage into two small active peptides (binary toxin) (Broadwell & Baumann 1987). One of these is responsible for recognition and binding to specific receptors while the other one is related with the production of toxic effects in the cells after binding (Nielsen-LeRoux & Charles 1992; Charles et al. 1997; Silva-Filha et al. 1997). Both of them act in synergism (Nicolas et al. 1993) promoting diverse cytopathological damage which leads to larvae death (Charles 1987; Singh & Gill 1988; Pauchet, Luton, Castella et al. 2005; Melo et al. 2008). The binary toxin receptor was characterized in *Cx. quinquefasciatus* as an  $\alpha$ -glucosidase, attached to the midgut cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, which is codified by *cqm1* gene (Silva-Filha et al. 1999; Darboux et al., 2001; Romão, Chalegre, Key et al. 2006).

The bacterium *B. sphaericus* is a very competent biological agent against *Cx. quinquefasciatus*. However, the development of resistant vector populations has already been reported in field populations (Rao, Mani, Rajendran et al. 1995; Silva-Filha et al. 1995; Yuan et al. 2000; Mulla et al. 2003) and in laboratory strains (Pei, Oliveira, Yuan et al. 2002; Oliveira, Silva-Filha, Nielsen-LeRoux et al. 2004; Amorim et al. 2007). Romão, Chalegre, Key et al. (2006) described a mechanism of resistance in a laboratory colony of *Cx. quinquefasciatus* (CqRL1/2362) derived from Recife. A deletion of 19 nucleotides in *cqm1* gene sequence was implicated as the responsible for the resistance mechanism against *B. sphaericus*. This deletion is responsible for modifying the reading frame leading to the formation of a premature stop codon. The resulting mRNA codes a truncated polypeptide lacking a significant segment, including the GPI anchor (Romão, Chalegre, Key et al. 2006). The allele which codifies the *cqm1* sequence with the deletion was named *cqm1<sub>REC</sub>*. Recently, Chalegre, Romão, Amorim et al. (2009) developed a PCR-based method to differentiate recessive resistant mosquitoes, which have only *cqm1<sub>REC</sub>* allele, from dominant homozygote and heterozygote susceptible individuals.

The immediate impact of vector control actions can be visualized by decreases in vector population densities (Regis, Silva-Filha, Oliveira et al. 1995; Regis, Oliveira, Silva-Filha et al., 2000). However, because mosquitoes are r-strategists and display high levels of genetic diversity, they can recover very easily from the impact caused by adverse environmental conditions, such as the use of insecticides, and its original population density levels could be recovered very quickly after the interruption of control activities. Therefore, measures of reduction in mosquito infestation levels should be as accurate as possible, to avoid incorrect conclusions about a successful vector control program. Besides, monitoring the frequency of putative alleles conferring resistance to insecticides could prevent the emerging of resistance in field populations. For that reason, the use of alternative ways to monitor and evaluate vector control programs is an important issue for achieving the world lymphatic filariasis elimination by 2020.

Microsatellites are among the group of the most informative and polymorphic molecular markers. Characteristics such as neutrality and co-dominance make them good markers for studies on population genetics. Microsatellites markers have already been analyzed in many vector species such as *Cx. quinquefasciatus* (Fonseca et al. 2000; Fonseca et al., 2006), *Cx. pipiens* (Huang et al. 2008), *Aedes aegypti* (Huber, Loan, Hoang et al. 2002), *Anopheles gambiae* (Pinto, Donnelly, Sousa et al. 2002; Pinto, Donnelly, Sousa et al. 2003) and *An. arabiensis* (Wondji, Simard, Lehmann et al. 2005).

The aim of this study was to investigate the short-term program's effect launched in Recife, in 2003, on *Cx. quinquefasciatus* population over a period of approximately three

years. To do so, we compared the genetic diversity and differentiation of mosquito samples collected at different time points. Genetic diversity indexes were obtained from microsatellite and *cqmI<sub>REC</sub>* frequencies data.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area, sample collection and DNA extraction

Recife (8°4'3" S, 34°55'00" W), the capital of Pernambuco State, is a coastal city in Brazil northeast, with an estimated population of approximately 1.5 million inhabitants. About only 42.9% of the households are connected to a proper piped sewerage system and about 49% of the houses are settled in slum areas. Climatic factors associated with unplanned urbanization in Recife are favourable for providing breeding conditions for the mosquito *Culex quinquefasciatus*. This study was conducted with a *Cx. quinquefasciatus* population from Água Fria neighborhood in Recife. Previously to the beginning of Filariasis Control Program, about 3,000 mosquito breeding sites were mapped in this area (1.14 Km<sup>2</sup>) which nearly 80% of them were septic tanks (Silva-Filha, Chalegre, Anastácio et al. 2008). As an assignment of Recife Filariasis Control Program, health agents applied *Bacillus sphaericus* based larvicide (3-5 g/m<sup>2</sup>) bimonthly in the breeding sites and eliminated many mosquito breeding places by physical control, when it was possible. Health staff collected *Cx. quinquefasciatus* eggs and larvae from septic tanks of 7 residences in Água Fria at 8 different moments (June 2003, August 2003, December 2003, April 2004, June 2004, October 2004, May 2005 and September 2006). The first collection was carried out 3 months after the first treatment with the biological agent. All samples were sent to Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM/Fiocruz) and reared to adults. Total genomic DNA was extracted from individual *Cx. quinquefasciatus* males and females adults according to Ayres et al. (2003).

### Microsatellite analysis (neutral marker study)

Samples were analyzed for 5 microsatellites loci: CQ29 (Fonseca et al. 1998), CxqGT8 (Smith et al. 2005), CxqATG9, CxqCTG10 e CxqCAG101 (Edillo, Tripet, McAbee et al. 2007). The reaction mixtures contained 1X NH<sub>4</sub> buffer [16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl pH 8.8 and 0.01% estabilizer], 0.05 mM of each dNTP (Bioline™), 0.2 μM of each primer (Eurofins MWG Operon™) and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mg/ml BSA (Promega™), except for CQ29 locus, 0.5 U of Taq polymerase (Bioline™) and 10 ng of template DNA. Only forward primers were labeled with fluorescent tags. PCRs were carried out in an Applied Biosystems™ thermocycler according to modifications from Fonseca et al. (1998), Smith et al. (2005) and Edillo, Tripet, McAbee et al. (2007). Reactions for CQ29 locus amplification were performed using the following conditions: an initial step at 96°C (5 min), followed by 30 cycles at 96°C (40 s), 60°C (1 min), 72°C (1 min) and a final step at 72°C (5 min). Locus CxqGT8 PCR were performed with 45 cycles at 96°C (30 s), 54°C (40 s), 72°C (40 s), preceded by 96°C (5 min) and succeeded by 72 °C (5 min). Amplifications for the others loci (CxqATG9, CxqCTG10 and CxqCAG101) were carried out in a step at 94°C (5 min), followed by 35 cycles at 94°C (40 s), 58°C (40 s), 72°C (30 s) and a last step at 72°C (15 min). After these procedures, all PCR products were A-tailed with 0.33X NH<sub>4</sub> buffer [5.33

mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 22.33 mM Tris-HCl (pH 8.8) and 0.003% estabilizer], 0.07 mM of each dNTP (Bioline™), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.75 U Taq polymerase (Bioline™). Solutions were submitted to an extension step at 72°C (30 min). All A-tailed PCR products were sized and analyzed on CEQ 8000 Series Genetic Analysis System (Beckman Coulter™).

Genetic variability parameters (number of alleles and their frequencies, allelic richness and expected heterozygosities) were estimated using Fstat version 2.9.3.2 (Goudet 1995). This program was also used to assess pairwise genetic differentiation among samples collections, by the fixation index  $F_{ST}$ , according to Weir & Cockerham (1984). A mantel test, with 5,000 permutations, was conducted to determine the association between  $F_{ST}$  values and time of separation between sample collections by POPTOOLS add-in for Microsoft EXCEL (Hood, 2008). It is important to highlight that  $F_{ST}$  values shown in the results were previously corrected by the RecodeData version 0.1 (Meirmans 2006). Those corrections were necessary due to the low heterozygosity values found for CxqCTG10 locus in comparison with the others loci. Tests for Hardy–Weinberg equilibrium were fulfilled by  $F_{IS}$  index, using Fstat version 2.9.3.2 (Goudet 1995). Negative  $F_{IS}$  indicate heterozygote excess whereas positive values point for heterozygote deficits. Linkage disequilibrium tests among loci pairs were conducted using Markov chain and Fisher methods with GENEPOP 3.4 (Raymond & Rousset 1995).

### ***cqm1* gene analysis (marker under selection pressure study)**

Amplifications of *cqm1* gene were fulfilled using the same samples referred above with Cpq2F and Cpq1R primers following Chalegre, Romão, Amorim et al. (2009). Each reaction was set up with 1X buffer (50 mM KCl and 20 mM Tris-HCl pH 8.4), 0.25 mM of each dNTP, 1.6 μM of each primer (Invitrogen™), 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) and 20 ng of template DNA. Reactions were performed in a Biometra™ thermocycler for a denaturation at 94°C (3 min), followed by 34 cycles at 94°C (50 s), 55°C (50 s), 72°C (2 min) and an extension at 72°C (10 min). PCR products were subjected to an electrophoresis in 1% (w/v) agarose gel and stained with ethidium bromide. Individuals were genotyped according to visualized allelic bands. Three genotypes were observed: one band 208 bp long, corresponding to homozygote individuals without deletion (susceptible genotype), another one with 189 bp, relative to homozygote with 19 nucleotides deletion (resistant genotype), and samples with both fragments, which were heterozygote individuals (susceptible genotype) (Chalegre, Romão, Amorim et al. 2009).

Genetic variability parameters (allelic frequency and expected heterozygosity),  $F_{ST}$  index and mantel test (to determine association between  $F_{ST}$  and time of separation between collections) were assessed in the same way as described above for microsatellites.  $F_{ST}$  values for *cqm1* gene were also corrected by RecodeData version 0.1 (Meirmans 2006) to be comparable with microsatellite  $F_{ST}$  values.

### **Comparison between microsatellites and *cqm1* gene study**

The comparative analysis between neutral marker (microsatellites) and molecular marker putatively under selection pressure (*cqm1* gene) along different time period was performed with a partial Mantel test using the ZT software (Bonnet & Van de Peer 2002).

Correlation was accessed by comparisons using the microsatellite and *cqm1*  $F_{ST}$  matrices with the time separation between sample collections matrix.

## RESULTS

### Microsatellite analysis

A total of 323 *Culex quinquefasciatus* samples from Água Fria were genotyped for 5 microsatellite loci. Numbers of alleles per locus ranged from 3 (CxqCTG10 locus) to 12 (CxqGT8 locus). During vector control program, some low frequency alleles were lost, for example 107 (CxqGT8 locus) and 249 (CxqATG9 locus) alleles, while novel alleles appeared, such as the 113 and 116 (CxqGT8 locus) (table 2), in Água Fria population. The other genetic variability parameter assessed in this study was allelic richness ( $R_S$ ) whose mean for all microsatellites loci, based in the minimum sample size of 9 diploid individuals, decreased from 3.42 in 1<sup>st</sup> moment to 2.90 in the last collection (table 3). Mean  $R_S$  was the only genetic variability parameters which presented a significant correlation ( $r = -0.930$ ,  $p = 0.0008$ ) with time (fig. 1). Mean expected heterozygosity ( $H_E$ ) values fluctuated along vector control program (table 3), interpolating accentuated decreases (2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> collections) with moments of increases (3<sup>rd</sup>, 6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> collections). However, no significant association was found between microsatellites mean  $H_E$  ( $r = -0.388$ ,  $p = 0.342$ ) and evaluated time (fig. 2).

Temporal genetic differentiation (corrected  $F_{ST}$ ), calculated for overall microsatellite loci, displayed 6 significant values ( $p < 0.05$ ) among 28 pairwise comparisons (table 1), however, after Bonferroni corrections, none pairwise values were statistically different. No association was observed by comparing microsatellites corrected  $F_{ST}$  values with time of separation between sample collections (Mantel test;  $r = 0.190$ ,  $p = 0.187$ ) (fig. 3a). From regression analysis, 3 distinct genetic differentiation patterns were observed (fig. 3a): one involving all pairwise comparisons with 2<sup>nd</sup> collection, another one relative to all 7<sup>th</sup> collection pairwise comparisons and the other one with the remaining collections pairwise comparisons. Nevertheless, when 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> collections data were excluded from analysis, a significant correlation was detected (Mantel test;  $r = 0.719$ ,  $p = 0.0008$ ) (fig. 3b).

Results of overall microsatellite  $F_{IS}$  index pointed a significant heterozygote deficit in 5<sup>th</sup> ( $F_{IS} = 0.103$ ,  $p = 0.0215$ ) and 6<sup>th</sup> ( $F_{IS} = 0.186$ ,  $p = 0.0003$ ) collections (table 3). Heterozygote deficits might be caused by inbreeding, Wahlund effect or null alleles. Both first effects influence the entire genome whereas null alleles affect only individuals loci. In this study, heterozygote deficits were caused only by CQ29 specific locus (table 3). Thus, heterozygote deficiencies resulted of null alleles related to CQ29 locus and Água Fria *Cx. quinquefasciatus* population is in Hardy-Weinberg equilibrium during all studied moments.

Pairwise comparisons for each moment separately, assessed by Markov chain method, provided only 4 significant linkage disequilibrium values ( $p \leq 0.05$ ) of 80 tests. Through Fisher method, using  $\chi^2$  test, none pairwisely microsatellite loci displayed linkage disequilibrium ( $0.935 \leq p \leq 0.212$ ) across all collections. It is important to highlight that in spite of CQ29 locus have presented heterozygote deficit, population genetic diversity parameters and genetic differentiation did not significantly differed when this locus was excluded from analysis. Thus, it was not excluded from the analysis.

### *cqm1* gene analysis

The same 323 *Culex quinquefasciatus* samples from Água Fria, analyzed for microsatellites, were genotyped for *cqm1* locus. Along those 8 different moments, a total of 5 resistant homozygote individuals were found among 3<sup>th</sup> (1 sample), 5<sup>th</sup> (2 samples), 6<sup>th</sup> (1 sample) and 8<sup>th</sup> (1 sample) collections and 20 susceptible heterozygote individuals, which 3 were from 2<sup>nd</sup> moment, 6 were from 3<sup>th</sup>, 4 were from 4<sup>th</sup>, 4 were from 5<sup>th</sup> and 3 were from 6<sup>th</sup> collection.

*Cqm1*<sub>REC</sub> allele frequency and expected heterozygosity ( $H_E$ ) displayed fluctuations during the treatment, whose maximum values reached up to 0.08 and 0.149, respectively, in both 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> collections (tables 2 and 3). Values related to these 2 genetic diversity parameters, in both above referred moments, practically doubled in comparisons with the immediately anterior moments (2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> collections). Another discrepancy was observed in the 7<sup>th</sup> collection when *cqm1*<sub>REC</sub> allele frequency and  $H_E$  dropped to null values as they were in the beginning of this study (1<sup>st</sup> collection). No significant correlation was found between *cqm1* gene  $H_E$  ( $r = 0.248$ ,  $p = 0.554$ ) and time (fig. 2). However, when discrepant values concerning 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> were excluded from analysis, an association between  $H_E$  ( $r = 0.877$ ,  $p = 0.05$ ) and time was observed.

Temporal genetic differentiation (corrected  $F_{ST}$ ) of *cqm1* locus displayed two significant values ( $p < 0.05$ ) for 28 pairwise comparisons (table 1), however, after Bonferroni corrections, none pairwise values were statistically different. No association was observed between *cqm1* corrected  $F_{ST}$  (Mantel test;  $r = -0.068$ ,  $p = 0.502$ ) and time of separation between sample collections (fig. 3c), even when data for 1<sup>st</sup> collection pairwise comparisons, which displayed the highest differentiation values, were excluded from analysis (Mantel test;  $r = -0.578$ ,  $p = 0.878$ ) (fig. 3d).

### Comparison between microsatellites and *cqm1* gene study

No association was detected in comparisons among microsatellites and *cqm1*  $F_{ST}$  matrices with the time separation between sample collections matrix (partial Mantel test;  $r = -0.05$ ,  $p = 0.06$ ).

## DISCUSSION

The present study evidenced that there was no remarkable genetic diversity reduction in *Culex quinquefasciatus* population from Água Fria caused by the vector control measures. Successful actions in vector mosquito control cause population densities reductions. This fact was demonstrated by Regis, Silva-Filha, Oliveira et al. (1995) and Regis, Oliveira, Silva-Filha et al. (2000) during the evaluation of *Cx. quinquefasciatus* populations subjected both to physical breeding sites elimination and to control with *Bacillus sphaericus*. Population density decreases might result in genetic composition modifications, perceived by neutral genes diversities losses and increases in genetic differentiation. Evaluating isoenzyme and microsatellites in *Aedes aegypti* populations from Vietnam, which is known to have their densities determined by seasonal variations, Huber, Loan, Hoang et al. (2002) reported that during rainy season, when high mosquitoes densities occur, genetic differentiation among

populations was reduced. On the other hand, when mosquitoes densities drop, during the dry season, significant genetic differentiation was observed.

As far as microsatellite (neutral marker) study concern, allelic richness ( $R_S$ ) was the only genetic variability parameter which presented significant reduction correlated with time along control program. Pairwise genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) presented a correlation with time difference between collections only after 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> collections data were excluded from analysis. Anyway,  $F_{ST}$  values were not significant after Bonferroni corrections. According to Cornuet & Luikart (1996), when a population is subjected to events causative of bottlenecks, allele number decreases faster than allele frequency.  $R_S$  calculation is based in allele number while expected heterozygosity ( $H_E$ ) and  $F_{ST}$  are based in allele frequency, therefore it was expected that vector control interventions in Água Fria had caused initially a reduction in  $R_S$ . Thus, microsatellites results suggested that only an incipient impact was caused by the control program in *Cx. quinquefasciatus* population, pointed by  $R_S$ , since  $H_E$  and  $F_{ST}$  were not correlate with time.

Some previous studies have already used neutral markers to measure impacts caused by combat activities against vector mosquitoes. Pinto, Donnelly, Sousa et al. (2002), for example, employed microsatellites to evaluate possible long-term effects of a DDT campaign, carried out in 1980s, on genetic structure of some African *Anopheles gambiae* populations. Samples were collected 16 years after control interventions terminus and results showed high effective population size ( $N_e$ ) values and no indication of recent bottlenecks. In spite of drastic densities reductions registered during the campaign, results showed that those populations were in equilibrium for approximately 276 years, indicating their stability since eradication campaign until the end of the survey. The ability to exploit outdoor resources was pointed as the explanation for such stability (Pinto, Donnelly, Sousa et al. 2002). Another study, carried out in São Tomé Island (Africa), corroborated that, despite *An. gambiae* population densities reductions, 1980s DDT campaign did not reduce  $N_e$  (Pinto, Donnelly, Sousa et al. 2003). Wondji, Simard, Lehmann et al. (2005), studying an *An. arabienses* population exposed to insecticide treated bed net with deltamethrin, reported similar results to the present study after founding no significant genetic diversity variation when they compared two moments before and two times after treatments. They reported that even if insecticide had caused a high mortality rate, the size of remaining population was enough to maintain almost all initial genetic diversity.

Microsatellites results also allowed inferences about the occurrence of feasible migration moments during control program in Água Fria. For example,  $H_E$  values increased from 0.4676 in the 2<sup>nd</sup> collection to 0.497 in the 3<sup>rd</sup> moment. In addition, 3 novel low frequency alleles (181 locus CQ29, 113 and 115 locus CxqGT8), which were first observed in the 3<sup>rd</sup> moment, were found in latter collections, suggesting a migration event in this interval. Another indication of migration was the interval between 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> collections when  $H_E$  values increased, respectively, from 0.4904 to 0.5094, reaching the highest value along the study, and  $R_S$  value presented the unique increase during the program to a 3.2228 value in 6<sup>th</sup> collection. Migration occurrence suggests that program coverage area should be expanded. Others molecular studies with neutral markers discussed the migration role in shaping the genetic diversity of some mosquitoes populations (Rongnparut et al. 1999; Huber, Loan, Hoang et al. 2002; Kent et al. 2007). The above referred study, carried out by Wondji, Simard, Lehmann et al. (2005), also pointed migration as the cause for novel rare alleles emergence in *An. arabienses* population almost 1 year after the deltamethrin based program covered 100% of the evaluated area.

Migration events comprise flow of individuals from Água Fria neighbouring areas. Besides, another important point, already reported, was the existence of refuges like non-treated active breeding sites. Refuge's existence limits the success of vector control activities,

according demonstrated by Regis, Oliveira, Silva-Filha et al. (2000), in a survey conducted with a *Cx. quinquefasciatus* population exposed to *B. sphaericus* in Jardim Brasil (Olinda city). More significant reductions in mosquito's densities were achieved only when the number of registered breeding sites treated with *B. sphaericus* increased from about 150 to 325, allowing the enlargement of the program control coverage. Other situation approached in this study was the role of a lagoon in Jardim Brasil (Olinda city), which was not successfully treated with *B. sphaericus*. It was used as a refuge for *Cx. quinquefasciatus* laying eggs. Fluctuations with none significant reductions was observed in mosquitoes number, near to lagoon area, while, in the far capture stations, the number of mosquitoes per room per night drooped from 45 to 10 in the subsequent collection after the first bacterium application, reaching minimum values lower than 5 mosquitoes per room per night (Regis, Oliveira, Silva-Filha et al. 2000).

Besides causing population densities reductions, the use of insecticides can select individuals bearing genes and/or alleles involved with resistance mechanisms as a response to the suffered disturbance. Along time, it is possible to occur changes in the genetic composition concerning under selection pressure genes, which can result in the increases of resistance alleles frequencies as well as genetic differentiation. For example, Chalegre, Romão, Amorim et al. (2009) reported significant high frequencies for *cqm1*<sub>REC</sub> allele in *Cx. quinquefasciatus* population, which is involved with *B. sphaericus* resistance, when comparing treated and non-treated areas. Lenormand et al. (1999) also observed growths in frequencies of alleles involved with resistance mechanisms to chemicals insecticides during organophosphate (OPs) exposition of *Cx. pipiens* populations.

With regard to *cqm1* gene diversity analysis, *cqm1*<sub>REC</sub> allele frequency and  $H_E$  values increased in comparison with 1<sup>st</sup> collection, however, their growths fluctuated during control program. It is important to highlight that the null *cqm1*<sub>REC</sub> allele frequency value in the 7<sup>th</sup> collection was due to small sample size (10 individuals), since, Chalegre, Romão, Amorim et al. (2009) described a frequency of 0.053, when they evaluated 325 *Cx. quinquefasciatus* samples, from the same area at this same collection month. Neither  $H_E$  nor  $F_{ST}$  *cqm1* gene values were correlated with time, so that, no impact was detected respecting the under selection pressure marker. The *cqm1* gene results suggested migration occurrences of individuals bearing *cqm1*<sub>REC</sub> allele in the gap between 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> collections and in the interval between 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> moments, when values doubled in respect to each anterior immediate collection.

The fluctuations in *cqm1*<sub>REC</sub> allele frequencies and in  $H_E$  values can be a result of migration events. Migration plays an important role capable to hamper vector control actions when immigrant individuals carry genes or alleles that confer resistance to insecticides. On the other hand, the introduction of susceptible mosquitoes would prevent the development of resistance. Problems related with introduction of alleles involved with mechanisms of resistance against chemicals were reported by Lenormand et al. (1999) when they studied the antagonistic migration and selection role in the local dynamic of 2 resistance loci (*Ace* and *Ester*) for treated and non-treated OPs *Cx. pipiens* populations in France. Results showed that selection increased resistance allele frequencies, joined with a biological cost. On the other hand, gene flow reduced those frequencies in exposed OPs areas, causing a homogenization in a previously impacted population, and increased resistance allele frequencies in non-treated areas (Lenormand et al. 1999). The impact of *cqm1*<sub>REC</sub> mutation on intervention has been recently evaluated by Chalegre, Romão, Amorim et al. (2009). They reported a higher *cqm1*<sub>REC</sub> frequency (0.053-0.055) in Agua Fria when compared to non treated areas: 0.0029 in Fazenda Nova and 0.0061 in Peixinhos, 180 km from Recife and 3 km near to Água Fria respectively. However, there was no difference between the two populations susceptibility status when the traditional bioassays were carried out. In the last decade, Coque

neighborhood, in Recife, and Jardim Brasil, in Greater Recife, were exposed for about 2 years to a vector control program, based in the use of *B. sphaericus* (Regis, Silva-Filha, Oliveira et al. 1995; Regis, Oliveira, Silva-Filha et al. 2000). Probably, during this period *cqm1*<sub>REC</sub> allele was selected in these two areas. Jardim Brasil is about 1.5 km from Peixinhos, so probably a gene flow was experienced between both areas. Previous *cqm1*<sub>REC</sub> allele migrations from Jardim Brasil associated with recently migrations from Água Fria could be the reason for finding higher frequencies for this allele in Peixinhos than in Fazenda Nova, according Chalegre, Romão, Amorim et al. (2009). Those findings indicate that it is possible to occur gene flow of individuals bearing resistance alleles from other areas in Recife to Água Fria as well as the opposite situation. Those results suggested that *cqm1*<sub>REC</sub> allele frequency is increasing in Água Fria *Cx. quinquefasciatus* population, therefore, management strategies should be considered. Rotations with *B. thuringiensis* could be a possible alternative to delay development of resistance to *B. sphaericus* (Zahiri & Mulla 2003).

In the present study none association was detected between microsatellites and *cqm1* results. Behavior antagonisms between neutral and under selection pressure markers were observed in a study with *Cx. pipiens* populations from Spain and France, which were collected in treated and non-treated areas with OPs insecticides (Chevillon et al. 1995). The neutral enzymatic loci electrophoretic profile evaluated pointed for a homogenization among all populations along an 850 Km transect. Whereas the resistance gene *Ace* and *Ester* results showed a large heterogeneity, with some spacious dispersed alleles and others restricted to some sites or even with high frequencies alleles found only in treated areas. The vast resistance allele's distribution was associated with vector control in large scale and with migration events. Migrations result in susceptibility decreases in environments never exposed to chemicals insecticides unless those resistance alleles are capable to reduce population fitness (Chevillon et al. 1995).

Recife has the ideal conditions to sustain breeding and expansion of mosquito populations. Besides hot (25.2°C) and humid climate, with a heavy rainy season between March and August, Recife is severed by lots of channels and rivers. Significant portion of its territory is formed by mangrove embankments which causes periodic inundations in the city. All of that, associated with poverty, disordered urbanization and a deficient sewerage system can act favoring mosquito reproduction and dispersion. Densities oscillations in *Cx. quinquefasciatus* populations from Recife occur along all year, with significant peaks in the rainy season (Regis, Silva-Filha, Oliveira et al. 1995). Studies with *Cx. quinquefasciatus* populations from different areas in Great Recife, subject or not to vector control, showed that they are well adapted to social and environmental conditions, which allow the maintenance of high mosquitoes densities throughout the year. Regis, Silva-Filha, Oliveira et al. (1995) registered values between 120 and 60 mosquito per room per night in a survey conducted in Coque neighborhood (Recife) before control measures implementation. After initiated physical and biological (*B. sphaericus*) control actions, drastic reductions, for about 20 mosquitoes per room per night, were observed after 12<sup>th</sup> treatment, even though, moderates increases in this index, for values of 50, were observed between 27<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> treatments (Regis, Silva-Filha, Oliveira et al. 1995). Another study, carried out in Jardim Brasil neighborhood (Olinda), located in Great Recife, registered fluctuations between 20 and 50 mosquitoes per room per night before biological control implementation. After *B. sphaericus* treatments, this index decreased for minimum values below 10 in the last collections moments (Regis, Oliveira, Silva-Filha et al. 2000).

Adult mosquitoes densities annual index values, provided by the Environment Vigilance Center (Recife Public Health Department), decreased between 2003 and 2006, pointing the efficacy of *Cx. quinquefasciatus* control program in Água Fria (unpublished data). On the other hand, the results obtained in the present study suggests that vector control

program was not able to disturb drastically the genetic diversity of Água Fria *Cx. quinquefasciatus* population, since genetic diversity had only a subtle decrease, pointed by  $R_S$  parameter. It is important to highlight that, if vector control actions were interrupted, this population would, very likely, recover its initial diversity. In addition, the use of *B. sphaericus* probably induced the increase in *cqm1<sub>REC</sub>* allele frequency along the program, caused mainly by susceptible heterozygote, suggesting that it is important to focus the attention for a possible resistance management. The results suggested that molecular approaches are more appropriate to evaluate long term effects caused by vector control measures, studying populations considering bigger time intervals.

## ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE Brazil, APQ0060-2.02/07). We are grateful to field teams from Environment Vigilance Center (Recife Public Health Secretary).

## REFERENCES

- Amorim LB et al. (2007) Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* strain IAB59 needs long term selection pressure. *Biological Control*, 42, 155-160.
- Ayres CFJ et al. (2003) Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 40, 430-435.
- Azevedo R, Dobbin JE (1952) Filariose (*Wuchereria bancrofti*) no grupo residencial do IAPB no bairro de Afogados (Recife). *Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães*, 1, 157-162.
- Baumann L et al. (1988) Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *Journal of Bacteriology*, 170, 2045-2050.
- Baumann P, Unterman BM, Baumann L et al. (1985) Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *Journal of Bacteriology*, 163, 738-747.
- Broadwell AH, Baumann P (1987). Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1333-1337.
- Bonnet E, Van de Peer Y (2002) Zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Statistical Software*, 7, 1-12.
- Chalegre KDM, Romão TP, Amorim LB et al. (2009) An allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin is detected in *Culex quinquefasciatus* populations through molecular screening. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1044-1049.

Charles JF (1987) Ultrastructural midgut events in Culicidae larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie*, 138, 471-484.

Charles JF et al (1997) Binding of the 51 and 42 kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 156, 153-159.

Chevillon C. et al. (1995) Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*, 49, 997-1007.

Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144, 2001-2014.

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

Davidson EW, Myers P (1981) Parasporal inclusions in *Bacillus sphaericus*. *FEMS Microbiology Letters*, 10, 261-265.

Edillo FE, Tripet F, McAbee RD et al. (2007). A set of broadly applicable microsatellite markers for analyzing the structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) populations. *Journal of Medical Entomology*, 44, 145-149.

Fonseca DM et al. (1998) Microsatellite primers for *Culex pipiens quinquefasciatus*, the vector of avian malaria in Hawaii. *Molecular Ecology*, 7, 1613-1621.

Fonseca DM et al. (2000) Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. *Molecular Ecology*, 9, 1803-1814.

Fonseca DM et al. (2006) Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, 284-289.

Goudet J (1995). FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *The Journal of Heredity*, 86, 485-486.

Gyaopong JO, Twum-Danso NAY (2006) Global elimination of lymphatic filariasis: fact or fantasy? *Tropical Medicine and International Health*, 11, 125-128.

HOOD G. PopTools. Version 3.0.6. Canberra: CSIRO, 2008. Disponível em: <<http://www.cse.csiro.au/poptools>>. Acesso em: 10 out. 2008.

Huang S et al (2008) Genetic insights into the population structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the northeastern United States by using microsatellite analysis. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 79, 518-527.

---

Huber K, Loan LL, Hoang TH et al. (2002) Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). *Heredity*, 89, 7-14.

Kent RJ et al. (2007) Spatial and temporal; genetic structure of *Anopheles arabiensis* in Southern Zambia over consecutive wet and drought years. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 316-323.

Lenormand T et al. (1999) Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature*, 400, 861-864.

Maciel A, Rocha A, Marzochi KB et al. (1996) Epidemiological study of bancroftian filariasis in Recife, northeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91, 449-455.

Meirmans PG (2006) Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 60, 2399-2402.

Melo JV et al. (2008) Ultrastructural analysis of midgut cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae resistant to *Bacillus sphaericus*. *Micron*, 39, 1342-1350.

Mulla MS et al. (2003) Emergence of resistance and resistance management in field populations in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19, 39-46.

Nicolas L et al (1993). Respective role of the 42- and 51-kDa component of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 106, 275-279.

Nielsen-LeRoux C, Charles JF (1992) Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *European Journal of Biochemistry*, 210, 585-590.

Oliveira CM, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C et al. (2004) Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 41, 58-64.

Pauchet Y, Luton F, Castella C et al. (2005) Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. *Cellular Microbiology*, 7, 1335-1344.

Pei G, Oliveira CMF, Yuan Z et al. (2002) A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3003-3009.

Pinto J, Donnelly MJ, Sousa CA et al. (2002) Genetic structure of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in São Tomé and Príncipe (West Africa): implications for malaria control. *Molecular Ecology*, 11, 2183-2187.

Pinto J, Donnelly MJ, Sousa CA et al. (2003) An island within an island: genetic differentiation of *Anopheles gambiae* in São Tomé, West Africa, and its relevance to malaria control. *Heredity*, 91, 407-414.

Rao DR, Mani TR, Rajendran R et al. (1995) Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. Journal of the American Mosquito Control Association, 11, 1-5.

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. The Journal of Heredity, 86, 248-249.

Regis L, Silva-Filha MHNL, Oliveira CMF et al. (1995) Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 90, 115-119.

Regis L, Oliveira CMF, Silva-Filha MH et al. (2000) Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 94, 488-492.

Romão TP, Chalegre KDM, Key S et al. (2006) A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its  $\alpha$ -glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. The FEBS Journal, 273, 1556-1568.

Rongnoparut P et al. (1999) Estimates of gene flow among *Anopheles maculates* populations in Thailand using microsatellite analysis. American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 60, 508-515.

Silva-Filha MH et al. (1995) Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Economic Entomology, 88, 525-530.

Silva-Filha MH et al. (1997) Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes of *Anopheles* and *Culex* sp mosquito larvae. European Journal of Biochemistry, 247, 754-761.

Silva-Filha MH et al. (1999) Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29, 711-721.

Silva-Filha MH et al. (2001) Impact of a 26-month *Bacillus sphaericus* trial on the pre-imaginal density of *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Recife, Brazil. Journal of the American Mosquito Control Association, 17, 45-50.

Silva-Filha MHNL, Chalegre KDM, Anastácio DB et al. (2008) *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. Biological Control, 44, 227-234.

Singh GJP, Gill SS (1988) An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 52, 237-247.

Smith JL et al. (2005) Cross-species comparison of microsatellite loci in the *Culex pipiens* complex and beyond. Molecular Ecology Notes, 5, 697-700.

Weir BS, Cockerham, CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.

Wondji C, Simard F, Lehmann T et al. (2005) Impact of insecticide-treated bed nets implementation on the genetic structure of *Anopheles arabiensis* in an area of irrigated rice fields in the Sahelian region of Cameroon. *Molecular Ecology*, 14, 3683-3693.

Yuan Z et al. (2000) High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. *Biocontrol Science and Technology* 10, 41–49.

Zahiri NS, Mulla MS (2003) Susceptibility profile of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* on selection with rotation and mixture of *B. sphaericus* and *B.thuringiensis israelensis*. *Journal of Medical Entomology*, 40, 672-677.

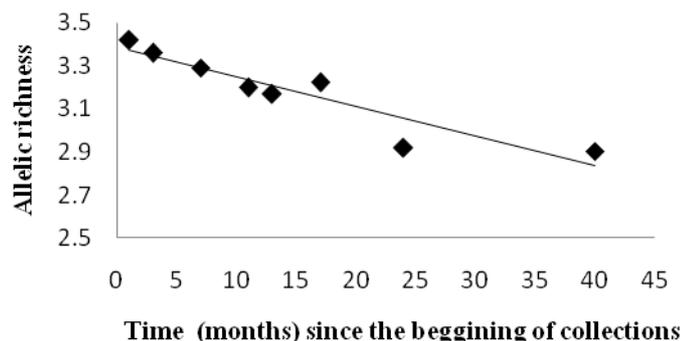


Figure.1 Microsatellites mean allelic richness for each collection moment (months) within Água Fria *Culex quinquefasciatus* population.

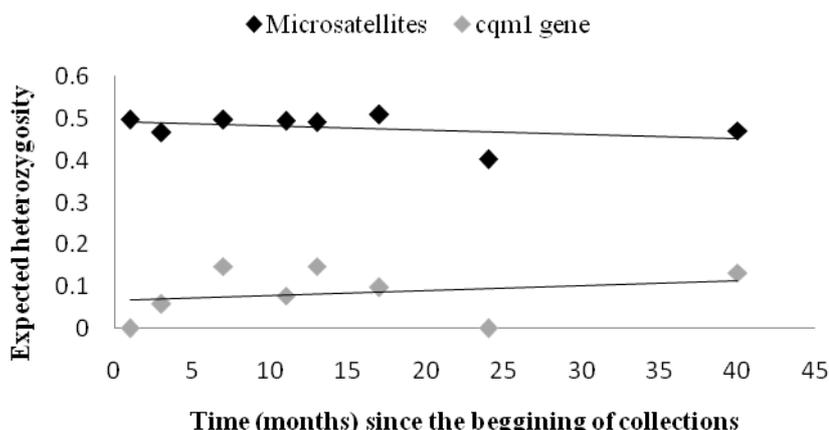


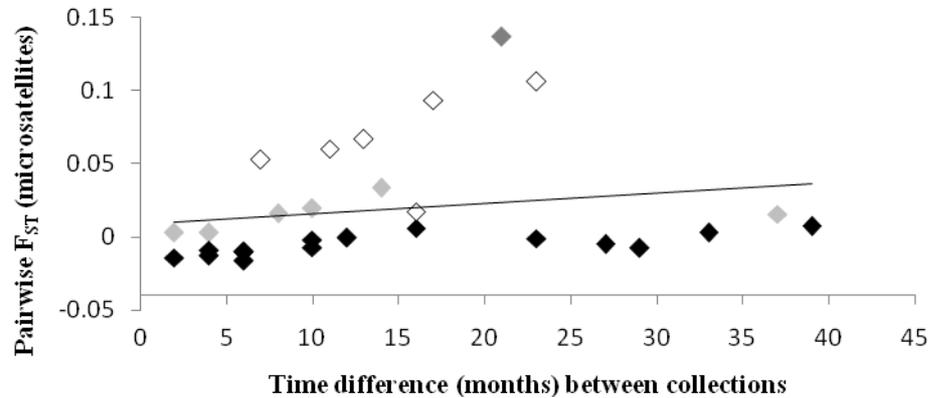
Figure.2 Microsatellites and *cqm1* mean expected heterozygosity for each collection moment (months) within Água Fria *Culex quinquefasciatus* population.

Table.1 Microsatellites (lower half diagonal) and *cqm1* gene (upper half diagonal) pairwise genetic differentiation (corrected  $F_{ST}$ ) between each collection moment within Água Fria *Culex quinquefasciatus* population.

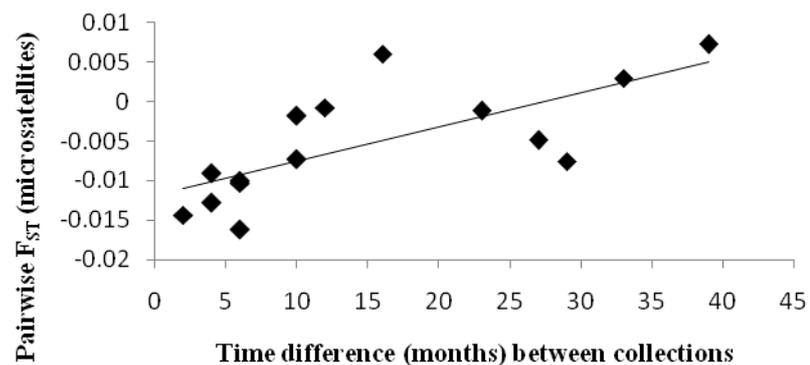
	1 <sup>st</sup> collection (jun/2003)	2 <sup>nd</sup> collection (aug/2003)	3 <sup>rd</sup> collection (dec/2003)	4 <sup>th</sup> collection (apr/2004)	5 <sup>th</sup> collection (jun/2004)	6 <sup>th</sup> collection (oct/2004)	7 <sup>th</sup> collection (may/2005)	8 <sup>th</sup> collection (sept/2006)
1 <sup>st</sup> collection (jun/2003)		0.021	<b>0.074</b>	0.033	<b>0.072</b>	0.040	0.000	0.099
2 <sup>nd</sup> collection (aug/2003)	0.003		0.014	-0.009	0.012	-0.007	-0.012	-0.013
3 <sup>rd</sup> collection (dec/2003)	-0.010	0.003		0.002	-0.016	-0.007	0.017	-0.034
4 <sup>th</sup> collection (apr/2004)	-0.007	0.016	-0.009		0.000	-0.012	-0.004	-0.024
5 <sup>th</sup> collection (jun/2004)	-0.001	<b>0.019</b>	-0.010	-0.014		-0.009	0.008	-0.040
6 <sup>th</sup> collection (oct/2004)	0.006	0.033	-0.002	-0.016	-0.013		-0.011	-0.036
7 <sup>th</sup> collection (may/2005)	<b>0.106</b>	<b>0.137</b>	<b>0.093</b>	0.067	<b>0.060</b>	<b>0.053</b>		-0.032
8 <sup>th</sup> collection (sept/2006)	0.007	0.015	0.003	-0.008	-0.005	-0.001	0.017	

Significant  $F_{ST}$  values ( $p < 0.05$ ) in bold.

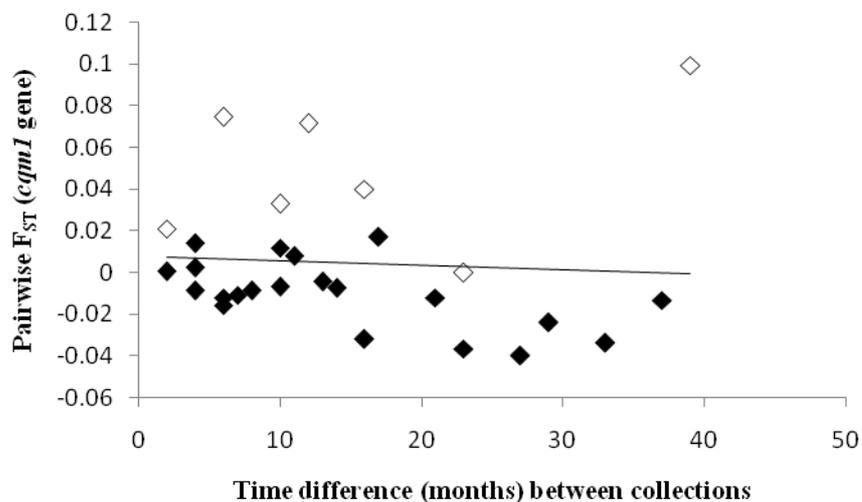
**Figure A - all collections**



**Figure B - except 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> collections**



**Figure C - all collections**



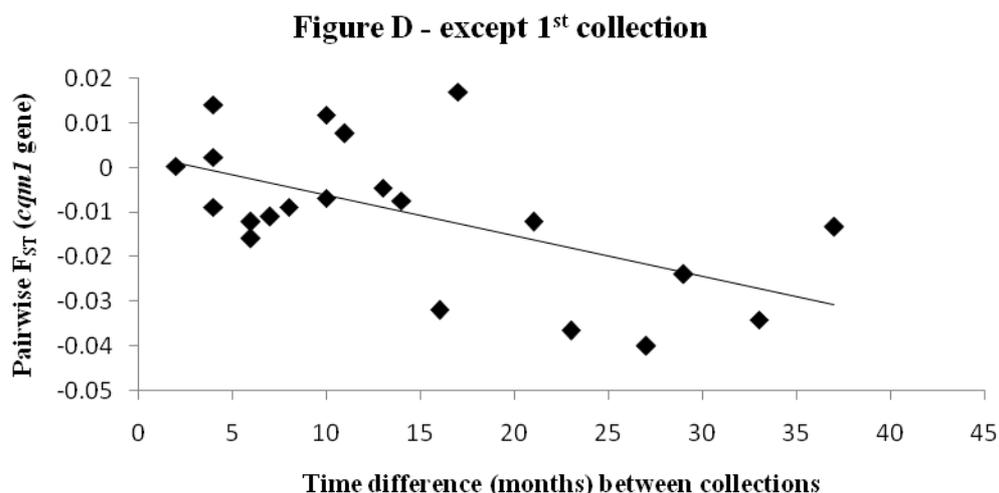


Figure.3 Pairwise microsatellite and *cqm1* gene temporal differentiation (corrected  $F_{ST}$ ) and time difference between collections moments (months) within Água Fria *Culex quinquefasciatus* population. In figure A, the white, bright and dark gray diamonds are comparisons with 7<sup>th</sup>, 2<sup>nd</sup> and between 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> collections, respectively, while, in figure C, white diamonds are comparisons with 1<sup>st</sup> collection.

Table. 2: Allelic frequency distributions in each collection within Água Fria *Culex quinquefasciatus* population assessed for 5 microsatellites loci and *cqm1* gene.

Loci / allele length (bp)	Collection moments							
	1 <sup>st</sup> (jun/03)	2 <sup>nd</sup> (aug/03)	3 <sup>rd</sup> (dec/03)	4 <sup>th</sup> (apr/04)	5 <sup>th</sup> (jun/04)	6 <sup>th</sup> (oct/04)	7 <sup>th</sup> (may/05)	8 <sup>th</sup> (sept/06)
<b>CQ29</b>								
175	0.255	0.213	0.276	0.357	0.367	0.408	0.45	0.286
176	0.041	0.043	0.051	0.051	0.031	0.051	0.05	0.143
178	0.051	0.043	0.031	0.02	0.041	0.02	0	0
179	0.653	0.702	0.633	0.561	0.561	0.5	0.5	0.571
180	0	0	0	0.01	0	0	0	0
181	0	0	0.01	0	0	0.02	0	0
N	49	47	49	49	49	49	10	14
<b>CxqGT8</b>								
85	0	0	0.01	0	0	0	0	0
93	0.43	0.48	0.49	0.5	0.49	0.49	0.75	0.567
95	0.03	0	0.03	0.01	0.07	0.02	0	0
97	0.28	0.25	0.26	0.296	0.29	0.276	0.05	0.3
105	0.12	0.15	0.11	0.122	0.09	0.153	0.05	0.067
107	0.05	0.03	0	0.01	0	0	0	0
113	0	0	0.03	0	0.01	0	0	0
115	0	0	0.01	0.01	0	0	0	0
116	0	0	0	0	0	0	0.1	0.067
117	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0	0
119	0.05	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0	0
121	0.02	0.03	0	0.02	0.01	0.031	0.05	0

N	50	50	50	49	50	49	10	15
C <sub>xq</sub> ATG9								
243	0.01	0	0	0	0	0	0	0
245	0.01	0	0	0	0	0	0	0
249	0.02	0.02	0.02	0	0.01	0.01	0	0
250	0.23	0.1	0.204	0.204	0.198	0.177	0.222	0.167
253	0.33	0.44	0.347	0.316	0.292	0.302	0.056	0.3
257	0	0	0	0.01	0	0	0	0
259	0.05	0.09	0.02	0.051	0.063	0.042	0	0
260	0.21	0.15	0.163	0.224	0.177	0.24	0.444	0.333
261	0	0.02	0	0	0	0	0	0
262	0.14	0.18	0.245	0.184	0.26	0.229	0.278	0.2
264	0	0	0	0.01	0	0	0	0
N	50	50	49	49	48	48	9	15
C <sub>xq</sub> CTG10								
95	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02	0	0.067
107	0.98	0.96	0.96	0.98	0.98	0.98	1	0.933
113	0	0.02	0	0	0	0	0	0
N	50	50	50	49	50	49	10	15
C <sub>xq</sub> CAG101								
180	0	0	0	0.01	0	0	0	0
186	0.69	0.76	0.68	0.694	0.72	0.653	0.85	0.833
192	0.31	0.24	0.32	0.296	0.28	0.316	0.15	0.167
198	0	0	0	0	0	0.031	0	0
N	50	50	50	49	50	49	10	15
<i>cqm1</i>								
<i>cqm1</i> <sub>REC</sub>	0	0.03	0.08	0.041	0.08	0.051	0	0.067
<i>cqm1</i>	1	0.97	0.92	0.959	0.92	0.949	1	0.933
N	50	50	50	49	50	49	10	15

N, sample size

Table. 3: Temporal genetic variability parameters and deviations from Hardy-Weinberg expectations (p-values for  $F_{IS}$  in bold) within Água Fria *Culex quinquefasciatus* population analyzed for 5 microsatellites loci and *cqm1* gene.

Locus	Collection moments							
	1 <sup>st</sup> (jun/03)	2 <sup>nd</sup> (aug/03)	3 <sup>rd</sup> (dec/03)	4 <sup>th</sup> (apr/04)	5 <sup>th</sup> (jun/04)	6 <sup>th</sup> (oct/04)	7 <sup>th</sup> (may/05)	8 <sup>th</sup> (sept/06)
CQ29								
N <sub>all</sub>	4	4	5	5	4	5	3	3
R <sub>S</sub>	3.205	3.15	3.288	3.165	3.022	3.316	2.9	2.99
H <sub>E</sub>	0.511	0.464	0.527	0.561	0.555	0.588	0.583	0.593
F <sub>IS</sub>	0.241	0.174	0.225	0.2	0.301	0.375	0.314	0.037
p(Fis)	<b>0.0233</b>	0.0843	<b>0.0338</b>	0.0575	<b>0.0103</b>	<b>0.0018</b>	0.214	0.5283
N	49	47	49	49	49	49	10	14

<b>CxqGT8</b>								
N <sub>all</sub>	8	7	9	9	8	7	5	4
R <sub>S</sub>	5.305	4.68	4.981	4.33	4.626	4.276	4.695	3.697
H <sub>E</sub>	0.722	0.686	0.683	0.652	0.669	0.666	0.444	0.593
F <sub>IS</sub>	-0.164	-0.166	0.033	-0.19	0.103	0.112	0.1	-0.349
p(F <sub>IS</sub> )	<b>0.0288</b>	<b>0.0278</b>	0.389	<b>0.0258</b>	0.1488	0.147	0.4873	0.0583
N	50	50	50	49	50	49	10	15
<b>CxqATG9</b>								
N <sub>all</sub>	8	7	6	7	6	6	4	4
R <sub>S</sub>	5.262	5.322	4.628	4.979	4.875	4.728	4	3.993
H <sub>E</sub>	0.78	0.74	0.758	0.78	0.78	0.775	0.722	0.755
F <sub>IS</sub>	0.077	0.055	-0.023	0.031	-0.041	0.14	0.231	-0.06
p(F <sub>IS</sub> )	0.1933	0.2785	0.4638	0.3863	0.3588	0.055	0.2345	0.4763
N	50	50	49	49	48	48	9	15
<b>CxqCTG10</b>								
N <sub>all</sub>	2	3	2	2	2	2	1	2
R <sub>S</sub>	1.329	1.658	1.554	1.335	1.329	1.335	1	1.848
H <sub>E</sub>	0.04	0.079	0.078	0.04	0.04	0.04	0	0.129
F <sub>IS</sub>	-0.01	0.492	-0.032	-0.011	-0.01	-0.011	NA	-0.037
p(F <sub>IS</sub> )	0.9883	0.0235	0.9428	0.9873	0.99	0.989	NA	0.9653
N	50	50	50	49	50	49	10	15
<b>CxqCAG101</b>								
N <sub>all</sub>	2	2	2	3	2	3	2	2
R <sub>S</sub>	1.999	1.996	2	2.183	1.999	2.459	2	1.994
H <sub>E</sub>	0.432	0.369	0.439	0.435	0.408	0.478	0.267	0.286
F <sub>IS</sub>	0.028	0.023	-0.093	-0.127	0.117	0.146	-0.125	-0.167
p(F <sub>IS</sub> )	0.556	0.5745	0.3623	0.259	0.308	0.1678	0.8413	0.661
N	50	50	50	49	50	49	10	15
<b>Mean over microsatellites loci</b>								
N <sub>all</sub>	4.8	4.6	4.8	5.2	4.4	4.6	3	3
R <sub>S</sub>	3.42	3.3612	3.2902	3.1984	3.1702	3.2228	2.919	2.9044
H <sub>E</sub>	0.497	0.4676	0.497	0.4936	0.4904	0.5094	0.4032	0.4712
F <sub>IS</sub>	0.031	0.023	0.032	-0.017	0.103	0.186	0.179	-0.12
p(F <sub>IS</sub> )	0.242	0.2855	0.2448	0.4078	<b>0.0215</b>	<b>0.0003</b>	0.0903	0.11
<b><i>cqm1</i></b>								
N <sub>all</sub>	1	2	2	2	2	2	1	2
H <sub>E</sub>	0	0.059	0.149	0.079	0.149	0.098	0	0.133
N	50	50	50	49	50	49	10	15

N<sub>all</sub>, number of alleles per locus; R<sub>S</sub>, allelic richness; H<sub>E</sub>, expected heterozygosity; F<sub>IS</sub>, inbreeding coefficient; p(F<sub>IS</sub>), p-values for F<sub>IS</sub>

## Apêndice B – Parecer do Comitê de Ética



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

**Pesquisador responsável:** Marina Falcão de Souza Cartaxo

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 17/06/2008

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 46/08

**Registro no CAAE:** 0045.0.095.000-08

### PARECER Nº 036/2008

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

Recife, 03 de julho de 2008.

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)