

ANA PAULA MIRANDA MUNDIM POMBO

Aedes aegypti: morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo

São Paulo

2016

ANA PAULA MIRANDA MUNDIM POMBO

Aedes aegypti: morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof^{da}. Dr^a. Maria Angélica Miglino

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3421
FMVZ

Pombo, Ana Paula Miranda Mundim

Aedes aegypti: Morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo / Ana Paula Miranda Mundim Pombo. -- 2016.

133 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profª. Drª Maria Angélica Miglino.

Co-orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

1. *Aedes aegypti*. 2. Vigilância entomológica. 3. Morfometria. 4. Morfologia.
5. Desenvolvimento embrionário. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aedes aegypti : Morfologia, morfometria, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo", protocolado sob o nº 2889/2013, utilizando ~600 (seiscentos) ovos embrionados de Aedes Aegypti, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: POMBO. Ana Paula Miranda Mundim

Título: *Aedes aegypti*: morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha
família, onde encontro amor
incondicional*

AGRADECIMENTOS

Ao concluir uma etapa particularmente importante em minha vida, não haveria como deixar de expressar o mais profundo agradecimento:

Primeiramente à Deus, pai de infinito amor e bondade, pelo que tenho de mais precioso, a vida. Apesar de todas as dificuldades ao longo desta trajetória sei que não estou sozinha.

Aos meus pais Altamir Mundim e Marlene Miranda pelo apoio, incentivo e amor, elementos fundamentais para que eu tivesse condições de vencer os obstáculos ao longo da caminhada e conseguisse vencer mais esta etapa em meu processo de aprendizado, em especial à minha mãe, origem de todo meu interesse pela ciência e vida acadêmica;

Ao meu esposo Adriano Rodrigues Pombo pela paciência e por renunciar ao período que teríamos juntos para que eu pudesse me dedicar a este estudo.

Às minhas irmãs Silmara Miranda Mundim e Fabiana Lafontaine, por compartilharmos tantos momentos de bênçãos e provações ao longo de período de desenvolvimento de estudo e aos meus amados sobrinhos Bruno Miranda Mundim Alves e Emanuela Lafontaine.

À Profa Dra. Maria Angélica Miglino, minha orientadora, a quem serei sempre grata pela oportunidade concedida e por acreditar em meu potencial.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, meu co-orientador, pelos ensinamentos, disponibilidade e apoio incondicional.

À Profa Dra. Glaucia Maria Machado-Santelli e Dra. Paula Rezende serei sempre grata pela forma como fui acolhida e pela maneira como decidiram abraçar comigo o desafio de avançar diante do principal obstáculo identificado na pesquisa no âmbito do desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti*, muito obrigada ainda seria muito pouco para agradecer,

À Profa Dra. Margareth de Lara Capurro-Guimarães por disponibilizar todo o material biológico oriundo de São Paulo, sem o qual grande parte desta pesquisa não seria possível e ao Dr. Danilo de Oliveira Carvalho pela contribuição para a coleta deste material,

À Profa Dra. Valéria Soares Pinheiro por disponibilizar todo o material biológico oriundo do Maranhão, sua colaboração foi muito importante,

À Dra. Marta Maria Antoniazzi e Dr. Carlos Jared por viabilizar as análises em Microscopia de Varredura no laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, esta parceria viabilizou parte importante desta pesquisa, e também à Técnica de laboratório e mestrande Beatriz Maurício por sua disposição em ajudar tanto na execução do processamento do material biológico quanto na obtenção das imagens em microscopia de varredura e por toda a atenção e carinho com que sempre fui recebida,

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres por doarem um pouco de si pela construção de conhecimento.

À Dra Anaiá Paixão, pelos ensinamentos, disponibilidade e amizade, sem sua ajuda toda a análise espacial do capítulo de vigilância entomológica seria muito mais difícil, e Dra Camila Martins pela contribuição na análise estatística do referido capítulo,

Ao Prof. Dr. Breno Henrique Shumaker cujo apoio e incentivo foram fundamentais para me encorajar a ingressar neste Programa de Pós-Graduação e abraçar este grande desafio,

À professora Dra. Milena Soares pelo apoio e disponibilidade em contribuir para este estudo em diferentes momentos,

Aos colegas docentes Victoria Guedes, Carlos Jordão Paz, Daniele, Fábio Silva, Raquel Lisboa, Everton Ferreira pelo carinho e apoio apesar da distância que nos separa,

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação Joseleide Teixeira, Lara Carolina, Renan Olio, Caio Carniatto, Valdir Pavanello Jr., Márcio Rodrigues, Rafael Cardoso, Bruno, Amanda, Luciano Leonel, Dayane Alcântara, Fernanda Menezes, Amilton Santos e Jéssica Borghesi, pela amizade e disposição em ajudar em qualquer situação,

Aos profissionais com atuação nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Dra Rose Eli Rici por toda a paciência e contribuição durante o desenvolvimento desta pesquisa e técnico Ronaldo Agostinho, por ajudar em cada uma das vezes que utilizei o laboratório,

Às médicas veterinárias Silene Rocha, Luciana Hardt Gomes e Adriana Vieira, pessoas que aprendi a admirar e respeitar pela paixão e dedicação à Medicina Veterinária.

Aos funcionários do departamento de Anatomia pela atenção e carinho para com todos os alunos sempre, em especial à Jaqueline Santana,

Às bibliotecárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em especial à Elza Faquim por toda a atenção e dedicação.

À Secretaria de Saúde do Município de São Paulo pelo auxílio prestado em disponibilizar os dados para a pesquisa,

À FAPEAM, pela concessão da bolsa de pesquisa que possibilitou o afastamento das atividades profissionais para dedicação integral ao projeto de pesquisa.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

Ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria

(Coríntios, 13:2)

RESUMO

MUNDIM-POMBO, A. P. M. *Aedes aegypti*: morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo. [*Aedes aegypti*: morphology, morphometry of eggs, embryonic development, and aspects related to entomological surveillance in the municipality of São Paulo]. 2016. 138f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

São preocupantes as doenças que tem o *Aedes aegypti* como vetor. A elevada competência vetorial deste mosquito, bem como sua antropofilia e adaptação ao ambiente urbano, geram *habitats* favoráveis e torna sua prevenção uma árdua tarefa considerando os recursos disponíveis. O controle atual enfatiza o mosquito, mas ainda há espaço para o aprimoramento da sua efetividade e sucesso, o que torna fundamental o maior conhecimento sobre este inseto. O Brasil apresenta condições favoráveis para a disseminação do mosquito. Diante do exposto este estudo visa estudar a vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Município de São Paulo no ano de 2013, bem como descrever as características morfológicas, morfométricas da fase de ovo e seu desenvolvimento embrionário. A análise da vigilância entomológica no Município de São Paulo, foi realizada a partir de dados secundários oriundos da Secretaria de Saúde do município. Já a etapa envolvendo a descrição morfológica, morfométrica e o desenvolvimento embrionário foi realizada a partir do material biológico cedido pelo Instituto de Ciências Biomédicas-USP utilizando recursos, tais como a Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Confocal. Os indicadores entomológicos Índice de Breteau (IB), Índice de Infestação Predial (IP) e Índice por Tipos de Recipientes Positivos (ITR), tiveram comportamento similares entre si nos anos estudados. Já o ITR revelou que o principal tipo de recipiente positivo para presença do vetor foi o prato/pingadeira para planta, seguido do vaso de planta, ou seja, os principais recipientes positivos encontram-se no ambiente domiciliar. Na avaliação do padrão morfológico e da mensuração acerca do comprimento, largura, razão comprimento/largura (índice) e diâmetro da micrópila constatou-se diferenças significantes entre as duas populações de ovos estudados, para cada um dos atributos morfométricos avaliados. Já a morfologia e o desenvolvimento embrionário apontam exocóxon de grande resistência e de difícil permeabilidade, dificultando o acesso ao embrião. Considera-se fundamental a avaliação integrada dos dados oriundos do levantamento entomológico e de pesquisas quanto a características deste vetor nas diversas fases do ciclo biológico, pois somente desta maneira é possível investir em áreas específicas e promissoras para elaboração de políticas públicas efetivas e com poder transformador da realidade.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Vigilância entomológica. Morfometria. Morfologia.
Desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

MUNDIM-POMBO, A. P. M. *Aedes aegypti*: morphology, morphometry of eggs, embryonic development, and aspects related to entomological surveillance in the municipality of São Paulo. [*Aedes aegypti*: morfologia, morfometria do ovo, desenvolvimento embrionário e aspectos relacionados à vigilância entomológica no Município de São Paulo]. 2016. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The diseases that have *Aedes aegypti* as a vector are worrisome. The high vectorial competence of this mosquito, as well as its anthropophilia and adaptation to the urban environment, generate favorable habitats and makes its prevention an arduous task considering the available resources. The current control emphasizes the mosquito, but its effectiveness and success in containing its dispersion still needs to improve, which makes fundamental the greater knowledge about this insect. Brazil presents highly favorable conditions for the spread of the mosquito. In view of the above, this study aims to study the entomological surveillance of *Aedes aegypti* in the city of São Paulo in 2013, as well as the morphological, morphometric characteristics of the egg phase and its embryonic development. The analysis of entomological surveillance was based on secondary data from health secretariats. The morphology, morphometry and embryonic development stages were performed using the biological material provided by the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo using resources such as Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission and Confocal. The entomological indicators Breteau Index (IB), Infestation Index (PI) and Index by Types of Positive Containers (ITR), had similar behavior among themselves in the years studied, since the ITR revealed that the main type of positive container for presence of the vector was dish / drip tray for plant followed by plant pot, the main positive containers are in the home environment. In the evaluation of the morphological pattern and measurement on length, width, length / width ratio (index) and diameter of the micropyle, it was observed significant differences between the two egg populations for each of the evaluated morphometric attributes. The morphology and embryonic development point to exochorion of big resistance and of difficult permeability, making difficult the access to the embryo. It is considered fundamental the integrated evaluation of data from the entomological survey and research on the characteristics of this vector in the various phases of the biological cycle, since only in this way is it possible to invest in specific and

promising areas for the elaboration of effective public policies with transformative power of reality.

Keywords: *Aedes aegypti*. Entomology surveillance. Morphometry. Morphology. Embryo Development.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3	HIPÓTESE	35
4	OBJETIVO	36
5	MATERIAL E MÉTODO	37
5.1	Aspectos Entomológicos no Âmbito da Vigilância em Saúde	37
5.2	Análise Microscópica	43
5.2.2	Análise Morfológica	44
5.2.2.2	Microscopia Óptica: Confocal de Varredura a Laser	44
5.2.2.3	Microscopia Eletronica de Transmissão	45
5.2.2.4	Microscopia Eletronica de Varredura	45
5.2.3	Análise morfométrica	46
5.2.4	Desenvolvimento embrionário.....	46
6	RESULTADO	47
7	CAPÍTULO 1: VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO EM 2013 E 2014	48
7.1	INTRODUÇÃO	50
7.2	METODOLOGIA.....	54
7.3	RESULTADOS	58
7.4	DISCUSSÃO	68
	REFERÊNCIAS	72
8	CAPÍTULO II: MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE OVOS DE <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae)	76
8.1	INTRODUÇÃO.....	77
8.2	MATERIAL E MÉTODO	80
8.3	RESULTADOS	81
8.4	DISCUSSÃO	86
	REFERÊNCIAS	89

9	CAPÍTULO III: ANÁLISE MICROSCÓPICA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO <i>Aedes aegypti</i>	92
9.1	INTRODUÇÃO.....	94
9.2	METODOLOGIA.....	97
9.2.1	Microscopia Óptica: Luz	97
9.2.2	Microscopia Óptica: Confocal de Fluorescência por Varredura laser.....	98
9.2.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	98
9.2.4	Microscopia Eletronica de transmissão	99
9.3	RESULTADOS	99
9.4	DISCUSSÃO	114
	REFERÊNCIAS	117
10	CONCLUSÃO.....	119
	REFERÊNCIAS	120

1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti*, foco de atenção desta pesquisa, apresenta grande importância em saúde pública em função do seu envolvimento, principalmente, na transmissão das arboviroses como Chikungunya, Zika e Dengue.

A saúde pública mundial já encontrava no controle da Dengue um dos seus principais desafios, e, a partir de 2015 esta questão tornou-se ainda mais preocupante, com a circulação simultânea dos agentes etiológicos não somente da Dengue, mas também da Chikungunya e Zika em vários países incluindo o Brasil.

Ambas são doenças virais, causadas por RNA vírus, o qual ao infectar um susceptível pode desencadear sinais clínicos semelhantes entre si. Sabe-se que a dengue se destaca pelas dores no corpo e possíveis complicações neurológicas, cardiorrespiratórias e hepáticas com risco de ter óbito como desfecho se não identificada em tempo hábil. Já Chikungunya é caracterizada por artralgia, edema nas articulações acompanhado de dor intensa que pode persistir por meses, dificultando a retomada das atividades profissionais. Já a Zika, apresenta-se clinicamente por febre mais baixa ou mesmo a ausência dela, exantema, prurido, além de poder estar associada com microcefalia em recém-nascidos, e de apresentar complicações de ordem neurológica também em adultos. Tratam-se de doenças com sérias consequências humanas, sociais além dos encargos cada vez maiores para os serviços de saúde. A dimensão do problema é grande. Somente a taxa de incidência de dengue, em nível mundial, aumentou cerca de 30 vezes nos últimos 30 anos, e, atualmente, cada vez, em número maior de países identificam-se surtos tanto da dengue quanto de Zika e Chikungunya.

Fatores tais como a inexistência de vacina efetiva disponível, ou tratamento específico mantém o controle da doença voltada para o vetor, parte mais frágil da cadeia epidemiológica.

Não há como abordar o controle da doença ignorando o controle do seu vetor, o *Aedes aegypti*. Sabe-se também nada pode ser feito em vigilância epidemiológica ou mesmo em vigilância entomológica sem a obtenção da informação, daí a clássica expressão “informação para ação”. Por exemplo, o monitoramento dos índices de infestação do *Aedes aegypti* é fundamental, uma vez que possibilita subsidiar a execução de ações coerentes com a realidade para a eliminação de criadouros do mosquito.

Faz-se necessário, estudar desde a morfologia das diferentes fases do ciclo biológico do vetor, envolvendo seus aspectos macroscópicos, microscópicos e fisiológicos incluindo alta

tecnologia, com vistas à identificação dos pontos vulneráveis, ou da resistência do inseto para o desenvolvimento de novas alternativas de controle.

No que se refere à morfologia, e, mais especificamente a avaliação da ultra estrutura dos ovos de insetos de maneira geral, sabe-se que a microscopia eletrônica de varredura tem sido aplicada de maneira cada vez mais frequente, em várias ordens de insetos. A descrição morfológica dos ovos por micrografias de varredura, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura tem possibilitado a caracterização ultra estrutural da superfície dos ovos de culicídeos de interesse médico, além de permitir identificar caracteres de potencial uso taxonômico e filogenético.

Como a fase de ovo do *Aedes aegypti* tem grande importância por se manter viável no ambiente por grande período de tempo, o presente estudo propõe identificar seus aspectos morfológicos e morfométricos além do desenvolvimento embrionário do mosquito no período inicial, intermediário e final de seu desenvolvimento. Já a magnitude da dengue, chikungunya, zika, associadas às possibilidades de sequelas principalmente da Zika, bem como a problemática vulnerabilidade à medidas profiláticas, requerem critérios que poderão determinar a implementação de métodos de controle, os quais por sua vez deverão estar concentradas no vetor. Diante do exposto, esta pesquisa descreve os aspectos entomológicos no âmbito da vigilância em saúde, relacionados ao *Aedes aegypti*, com ênfase na capital do Estado de São Paulo.

Os dados gerados a partir deste trabalho, tanto no contexto da vigilância entomológica, quanto na descrição dos aspectos morfológicos, morfométricos e de desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti* poderão produzir informações com vistas a subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias de controle, além da melhor compreensão dos seus aspectos entomoepidemiológicos no Município de São Paulo, onde estas arboviroses representam grande importância em saúde pública.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O mosquito *Aedes aegypti* apresenta grande importância em saúde pública, a nível mundial, em função do seu envolvimento na transmissão de arboviroses (*Arthropod-borne-viruses*) como a dengue (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; ARAÚJO, 2009; WHO, 2009; AMARAL; PETETSKI, 2012; GOMES; NOBRE; CRUZ, 2012; PEREIRA et al., 2013; SAMPAIO et al., 2016), Chikungunya (CHARREL et al., 2014; PINTO JUNIOR, 2014; BRASIL, 2014b; BRASIL, 2015a; SAMPAIO et al., 2016) e Zika (MARCONDES; XIMENES, 2015; FAUCI; MORENS, 2016), este último, confirmado no Brasil pela primeira vez em maio de 2015 (BRASIL, 2015a; CARDOSO et al., 2015; HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016).

O cenário epidemiológico envolvendo a Dengue, Chikungunya e Zika é caracterizado pela circulação simultânea de seus agentes etiológicos em várias localidades (RODRIGUEZ-MORALES; VILLAMIL-GOMES; FRANCO-PAREDES, 2016), envolvendo o risco de dispersão além da possibilidade de co-infecção (PESSOA et al., 2016; VILLAMIL-GOMEZ et al., 2016). Esta questão potencializa a relevância deste vetor (BRASIL, 2015b), ainda que ambas as enfermidades possam também ser transmitidas, em menor proporção, por outras espécies do gênero *Aedes* (YADAV et al., 2003) e existam evidências de transmissão de Chikungunya por outros gêneros, como o *Anopheles stephensi* segundo estudos indianos (YADAV et al., 2003) ou mesmo relatos de transmissão vertical do Zika vírus (ZIKV) (BRASIL, 2014), assim como identificação deste vírus em sêmen (MUSSO et al., 2015a; ATKINSON et al., 2016; MANSUY et al., 2016) saliva (MUSSO et al., 2015b; BARZON et al., 2016; BONALDO et al., 2016) urina (GOURINAT et al., 2015; BONALDO et al., 2016), e possibilidade de transmissão por via sexual (FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015a; D'ORTEZIO et al., 2016; HILL et al., 2016).

Entre as arboviroses citadas, a Zika chegou ao Brasil, mais recentemente (BRASIL, 2015a; CARDOSO et al., 2015; HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). Trata-se de uma doença viral, cujo agente causal é pertencente ao gênero *Flavivirus*, patógeno inicialmente isolada de macaco *Rhesus* sentinela, na floresta Zika, em Uganda no ano de 1947 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952) e que possui 2 genótipos distintos, sendo um deles africano e o outro asiático (FAYE et al., 2013). O isolamento do ZIKV em humanos foi confirmado, em

anos subsequentes, em alguns países africanos (Nigéria, Egito, Tanzânia, Gabão, Serra Leoa), países asiáticos (Índia, Malásia, Tailândia e Indonésia) (LIMA-CAMARA, 2016). Surto afetaram ilhas do Pacífico em 2007 e novamente em 2013 e 2014, seguido do ingresso do vírus nas Américas, onde vem se disseminando de maneira gradativa e mantém o seu potencial de dispersão (WHO, 2016).

Estima-se que, no Brasil, a introdução do Zika vírus - ZIKV e sua consequente circulação viral tenha ocorrido muito antes da identificação do primeiro caso, em maio de 2015. A data estimada coincide com o momento em que a frequência de passageiros oriundos de áreas endêmicas para o ZIKV aumentou (FARIA et al., 2016) e justamente no período em que ocorreram várias epidemias em países como Polinésia Francesa (CAO- LORMEAU et al., 2014), Nova Caledônia (DUPONT-ROUZEIROL et al., 2015), Ilhas Cook (PYKE, 2014), Ilha de Páscoa (TOGNARELLI et al., 2014) e Tahiti (WAEHRE et al., 2014).

Em relação a entrada do ZIKV no Brasil tem-se três hipóteses, sendo que todas elas estão relacionadas com viagens internacionais. A primeira delas consiste na visita do Papa Francisco ao Brasil, devido realização do dia mundial da juventude em julho de 2013; a segunda hipótese seria decorrente do Campeonato Mundial de Canoagem, cuja realização foi em agosto de 2014. Entre os competidores estava a equipe procedente da Polinésia Francesa, região onde estava ocorrendo um surto, naquele período (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI., 2015; FARIA et al., 2015), e então a Copa do Mundo em 2014 (FARIA et al., 2015).

Diferente da estimativa apresentada acima, o Ministério da Saúde, considera a possibilidade de que o vírus possa ter sido introduzido no Brasil a partir da segunda metade de 2014 e então consideraria somente duas últimas hipóteses citadas (BRASIL, 2015c).

Os primeiros casos foram registrados na Bahia e Rio Grande do Norte e segundo Campos; Bandeira; Sardi. (2015). Apesar do primeiro caso ser registrado em maio de 2015, o Ministério da Saúde começou a monitorar os casos de doenças exantemáticas de causas mal definidas, nos Estados da Bahia, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Paraíba, em fevereiro do mesmo ano (BRASIL, 2015c).

Sabe-se que o pico epidêmico no ano de 2015, ocorreu em julho do mesmo ano (FARIA et al., 2016). Entretanto, não é possível conhecer de maneira precisa a frequência real de infecções por ZIKV, uma vez que em 80% dos acometidos não manifestarão sinais ou sintomas da doença e por dificuldade de acesso aos serviços de saúde ou outras possíveis razões não procurarão os serviços de saúde, dificultando a compreensão quanto a magnitude da doença. O que se tem é uma estimativa da infecção por ZIKV para 2015 no território Nacional, onde acredita-se que esteja entre 497.593 a 1.482.701 casos autóctones (BRASIL, 2015c).

Os estados do Nordeste apresentaram a maior frequência de casos, Estados como Rio de Janeiro e São Paulo tiveram respectivamente entre 15.918 a 143.985 e 236.494 a 386.249 casos de infecção por ZIKV.

A infecção causada pelo ZIKV quando sintomático, determina quadros clínicos geralmente associadas à resposta exacerbada do sistema imune e tem como sintomatologia clínica febre, cefaléia, mialgia, artralgia, lesões maculopapulares e petéquias na pele, necessitando diagnóstico diferencial (MO; SALADA; TAMBYAH, 2016). Apesar de ser considerada como doença autolimitante, manifestações neurológicas e síndrome de Guillain-Barré foram descritas na Polinésia Francesa durante epidemia do ZIKV (LOOS et al., 2014), e a suspeita envolvendo a associação entre ZIKV e a microcefalia no recém-nascido obteve confirmação (CUGOLA et al., 2016).

No Brasil, ainda em julho de 2015, foram identificados casos de Síndrome Guillain Barré (GBS) associada ao ZKV em adultos (OPAS; WHO, 2015) e no mês de outubro, já havia relato de microcefalia em recém-nascidos associada ao ZKIV (OPAS; WHO, 2015; LAKAR et al., 2016). Até dezembro de 2015 foram registrados 2.782 casos suspeitos de microcefalia devido infecção por Zika, distribuídos em 618 municípios de 20 estados do território nacional (BRASIL, 2015a).

Em 2016, ainda no primeiro semestre do ano, foram confirmados 101.851 casos de infecção pelo vírus Zika no Brasil (coeficiente de incidência de 96,3 casos /100.000 habitantes) distribuídos por 2.277 cidades. Em relação às gestantes, foram notificados 8.904 casos. Não somente a microcefalia, mas os óbitos em recém-nascidos, natimortos e abortamento resultantes da infecção por Zika, passaram a ser acompanhados pelo Informe Epidemiológico sobre o Monitoramento dos casos de Microcefalia no Brasil (BRASIL, 2016a).

A partir da publicação do “Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia relacionada à infecção pelo Vírus Zika” todos os municípios de cada unidade federativa passam a trabalhar na investigação de casos conforme definições padronizadas. Neste contexto, o Ministério da Saúde reforçou a investigação, ao promover a capacitação de 11 laboratórios Centrais (Lacen) para realização deste diagnóstico (BRASIL, 2015a). Entretanto estas ações, entre outras relacionadas a infecção por Zika e microcefalia, segundo Alfaro e Murilo (2016), envolvem custo financeiro elevado, no entanto justifica o investimento para seu controle. Para cada caso de microcefalia e síndrome de Guillan Barré incorre no envolvimento de 29,95 anos de vida ajustados pela incapacidade (DALYs) e 1,25 DALYs por caso, bem como os custos médicos diretos de US \$ 91.102,00 e US \$ 28.818,00 respectivamente, calculados para América Latina e Caribe.

Diante do exposto, a ocorrência de casos de microcefalia associados à Zika foi um fator determinante para que a situação fosse declarada como emergência nacional. Diante deste contexto foi implementado o Plano Nacional de Enfrentamento da Microcefalia no Brasil (SAMPAIO et al., 2016). A Organização Pan-Americana de Saúde (2016) emitiu um alerta epidemiológico sobre a associação de infecção pelo ZIKV e a síndrome neurológica e malformação congênita. A Organização Mundial de Saúde (2016) declarou esta doença como uma emergência em saúde pública de preocupação internacional.

O Brasil já se antecipando à entrada destes agentes no país, em sua publicação no ano de 2014, sobre a preparação e resposta da Vigilância em Saúde para a Copa do Mundo, já citava não somente a Zika, mas também a Chikungunya, como duas entre as principais doenças de âmbito internacional de interesse para a Saúde pública a ser monitorada quanto ao risco de introdução no Brasil e entre as doenças de âmbito nacional estava a Dengue. Visando implementar ações de vigilância contra o mosquito transmissor destas enfermidades, o governo federal rapassou em dezembro de 2013 recurso adicional de 363 milhões para todos os municípios do país (BRASIL, 2014a).

Mesmo com os esforços para evitar entrada de agentes infecciosos em eventos de massa como os citados, a Chikungunya, teve o primeiro caso de transmissão autóctone registrada no Brasil em setembro de 2014, no Município de Oiapoque-Amapá (BRASIL, 2014b; HONÓRIO; CAMARA, BRASIL, 2015a), após investigação realizada por equipe técnica da CGPNCD/MS, Secretaria Estadual de Saúde do Amapá e Secretaria Municipal de Saúde de Oiapoque (BRASIL, 2014 b). É possível que a introdução do vírus seja decorrente da epidemia identificada no Caribe no ano de 2013 (WEAVER; LECUIT, 2015), uma vez que entre as 4 linhagens de vírus existentes, a identificada no Amapá foi compatível com o genótipo Asiático, o responsável pela epidemia na Ilha de Sant Martin, no Caribe (FARIA et al., 2016b).

Até 28 de dezembro de 2014 foram registrados 3.189 casos autóctones de febre de Chikungunya. Destes, 1.264 são oriundos da cidade de Oiapoque, Estado do Amapá; 1.444, do Município de Feira de Santana; 437 de Riachão de Jacuípe, Bahia, um registro em Matozinho em Minas Gerais e 44 casos em Campo Grande, Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2015b). Neste mesmo período foram confirmados casos importados no Estado do Amazonas, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (BRASIL, 2015b).

Em 2015, até o final do ano, foram notificados 17.765 casos autóctones suspeitos de febre de Chikungunya e destes, 6.784 foram confirmados. Foram registrados três óbitos por febre de Chikungunya no Brasil, dois no estado da Bahia e um em Sergipe, estes indivíduos

tinham idade avançada, 85, 83 e 75 anos, além de histórico de doenças crônicas preexistentes. (BRASIL, 2015b).

Entre as ações relacionadas à vigilância epidemiológica, diante do risco identificado, foi apresentado o Plano de Contingência Nacional de resposta ao Vírus Chikungunya e Procedimento Operacional Padrão (POP) visando orientação aos estados, capitais e municípios quanto aos planos de contingência a ser executado principalmente pelas Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde. Foi também elaborado o manual “Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil”. Não existia ficha específica para notificação e investigação para febre Chikungunya, ela foi elaborada e passou então a integrar o Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Diante do contexto foi também organizado um seminário internacional intulado “Febre de Chikungunya” visando discutir a situação (BRASIL, 2014b).

Historicamente a Chikungunya não foi considerada como uma infecção com alto coeficiente de letalidade, no entanto evidências epidemiológicas sugerem que esta taxa seria de 0,1% e a população mais vulnerável, como os idosos, apresentariam maior risco de apresentar este desfecho (PIALOUX, 2007; SIMON et al., 2007; FURUYA-KANAMARI, 2016). Segundo Brasil (2014b), o risco de morte em pessoas maiores de 65 anos é 50 vezes maior quando comparado aos adultos jovens, acredita-se que seja devido à frequência de comorbidades ou resposta imunológica diminuída.

Febre de Chikungunya, tem como agente causal um arbovírus originário da África, da família Togaviridae e gênero *Alphavirus* (CHIKV) com três genótipos: África Ocidental, Leste; Central; Sul da África e Asiático. Trata-se de um RNA vírus que inicialmente se replica na pele, difunde para o fígado, músculo, articulações e tecido linfóide, presumivelmente através do sangue (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; LO PRESTI et al., 2014; HONÓRIO; CAMARA; BRASIL, 2015b). A sintomatologia é caracterizada por febre na fase aguda seguida por artralgia intensa e debilitante, mialgia além de cefaléia. O termo Chikungunya tem como significado “tornar-se contorcido ou aquele que se curva” caracterizando então o aspecto observado, entre os acometidos, devido artralgia intensa (DONALISIO; FREITAS, 2015).

Sinais como poliartrite e artralgia simétrica (principalmente em punhos, cotovelos e tornozelos) geralmente apresentam melhora em 10 dias, no entanto estes sinais podem persistir por meses após a fase febril (POWERS; LOGUE, 2007; DONALISIO; FREITAS, 2015). Esta persistência do quadro clínico por longos períodos pode ocasionar intenso e sério impacto social e econômico (POWERS; LOGUE, 2007). Não se pode descartar também a possibilidade de aparecimento de manifestações atípicas decorrente tanto dos efeitos diretos do vírus quanto da própria resposta imunológica (BRASIL, 2014b).

Em relação a Dengue, estima-se que, por ano, 500.000 pessoas sejam atingidas pela forma grave da doença em todo o mundo (WHO, 2016), predominantemente crianças (BHATT et al., 2013; WHO, 2016), das quais cerca de 2,5% resultam em óbito (WHO, 2016).

Apenas nove países eram afetados por casos de Dengue grave até 1970. Atualmente, existem casos em mais de 100 países localizados em regiões da África, América, Mediterrâneo Oriental, Ásia e Pacífico Ocidental, sendo que as Américas Ásia e Pacífico são os mais afetados. Só em 2008 nestes países mais afetados, houveram registros de 1,2 milhões de casos e em 2015 já eram 3,2 milhões de acometidos pela doença (WHO, 2016).

Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas, ou seja, 40% da população mundial estão sob risco de contrair a doença por viverem em países endêmicos. Devido este cenário, a dengue tornou-se um problema de saúde pública digno de preocupação internacional (WHO, 2009; GUEDES, 2012).

Especificamente nas Américas, ainda no ano de 2015, foram notificados 2.35 milhões de casos, destes 10.200 casos foram classificados como dengue grave e provocaram 1.181 mortes (WHO, 2016).

No Brasil, as primeiras epidemias de dengue foram relatadas no período de 1846 a 1853, em São Paulo e Rio de Janeiro. No entanto as primeiras citações na literatura científica datam de 1916 em São Paulo e 1923 no Rio de Janeiro (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). O período que envolve este momento até a década de 1980, não foram registradas novas ocorrências da doença no Brasil, no entanto em 1981 a doença voltou a atingir o país (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Em 1986 foram notificados no Rio de Janeiro cerca de 33.500 casos notificados e em 1987 cerca de 60 mil casos, e as taxas de incidência atingiram cerca de 276 e 490 por cem mil habitantes respectivamente, no entanto nos anos subsequentes houve uma baixa endemicidade da doença. Na década de 1990 houve aumento da transmissão da DENV1 e introdução do DENV2. Com a entrada do DENV2 foram realizados os primeiros diagnósticos de Febre Hemorrágica do Dengue – FHD (classificação utilizada até 2014) num momento em que foram confirmados 462 casos e oito óbitos por esta forma da doença. Nos dois primeiros anos da década de 1990, a dengue se manteve quase que inteiramente restrita aos municípios dos Estados do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas e poucas notificações em Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Nos anos subsequentes, a circulação viral (DENV1 e DENV2) se expandiu para outras regiões do Brasil muito rapidamente, acompanhando a expansão do mosquito vetor e com circulação simultânea dos dois sorotipos. Em 2001 foi confirmada a introdução no país do sorotipo DENV3, e este foi o sorotipo responsável pela epidemia do ano subsequente, neste ano

o Brasil concentrou cerca de 80% dos casos de todo o continente americano (TEIXEIRA et al., 1999).

Levanta-se a hipótese de que os rígidos critérios diagnósticos para confirmação dos casos preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e adotados no Brasil, poderiam estar subestimando a incidência das formas graves da doença (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; WHO, 2016).

Em 2011 foi notificado o primeiro isolamento do vírus Dengue 4 (DENV4) no Estado de São Paulo e com a introdução deste sorotipo viral, aumenta a possibilidade de ocorrência de casos mais graves da doença, pois passam a circular os 4 sorotipos virais (ROCCO et al., 2012).

Entre 2002 a 2012, no Brasil, houve um aumento de 705% e 974% respectivamente de casos graves e mortes pela doença, quando comparado com a década anterior (BRASIL, 2012). A região sudeste concentra a maior frequência de casos (BRASIL, 2014).

No período compreendido entre 2000 e 2010 foram notificados no Brasil aproximadamente 4 milhões de casos de dengue (BRASIL, 2010). Já em 2012, somente nos meses de janeiro a abril de 2012 foram notificados 286.11 casos de dengue, sendo 41,7% oriundas da região sudeste. Sabe-se que não somente a febre do dengue, mas também as suas formas graves estão presentes em todos os estados do Brasil (BRASIL, 2012).

Uma epidemia de grande importância no Brasil ocorreu no ano de 2013, pois foram notificados 1.470.487 casos prováveis configurando-se um pico da doença desde a sua introdução no território brasileiro, na década de 80. A região sudeste concentrou a maior frequência de casos (BRASIL, 2014a).

Em 2013, o Estado de São Paulo, apresentou taxa de incidência de 480,87 casos por 100.000 habitantes e ocorreram óbitos por dengue em 35 municípios deste estado (PEREIRA et al., 2013).

Em 2014 foram notificados 591.080 casos prováveis, cuja taxa de incidência representa 291,5 casos por 100.000 habitantes. A partir da análise espacial, foi identificada a participação do Estado de São Paulo com cerca de 40% das notificações de dengue, e neste mesmo ano, o estado superou qualquer casuística anterior. Este aumento na taxa de incidência teve início no ano anterior em 2013 e existe ainda a possibilidade de que a seca e a crise de abastecimento de água enfrentado pelo estado neste período teriam colaborado para esta casuística (BRASIL, 2015b).

Em uma única semana, no período de 28/12/2014 a 03/01/2015, foram registrados no Brasil 591.080 casos. A região sudeste concentrou, mais uma vez, a maior parte dos registros 312,318 casos 52,8% em relação ao total do país, seguido então pelas regiões centro oeste (114,814

casos, 19,4%); nordeste (90,192 casos; 15,3%); norte 49, 534 casos; 8,4%) e o sul (24,222 casos, 4,1%). (BRASIL, 2015b).

Em 2016, dos 1.426.005 casos notificados até o mês de agosto, 841.286 casos, ou seja 59% são oriundos da região sudeste. A taxa de incidência de dengue para o Estado de São Paulo em 2015 e 2016 até o mês de agosto, foi respectivamente de 1.603,5/100.000 habitantes e 455,1/100.000 habitantes. A região sudeste é a região onde o maior número de casos graves e com sinais de alarme de dengue é notificado no Brasil. Somente em 2016 foram 3.410 casos (BRASIL, 2016b).

De acordo com os dados oficiais do Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE do Estado de São Paulo, no ano de 2015 foram confirmados 536.455 casos autóctones entre os 888.564 notificados, a maior concentração se deu na grande São Paulo e Campinas (SÃO PAULO, 2016).

É uma enfermidade considerada grave e de grande importância epidemiológica. Apresenta inclusive amplo impacto no contexto econômico, social e na saúde da população (BASTOS, 2004; NASCIMENTO 2011; AMARAL; PETETSKI, 2012).

A dengue é causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, cujo genoma é constituído por fita simples de RNA (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Até 2014 estavam identificados quatro sorotipos antígenicamente distintos Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4 (TAUIL, 2001; BRASIL, 2008; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008), e em outubro de 2015 foi identificado sorotipo DEN-5 na Malásia (MUSTAFA et al., 2015), porém este último, ainda não foi identificado no Brasil (VALLE et al., 2016).

Uma vez infectado por este vírus, um amplo espectro clínico pode ser determinado, incluindo desde formas oligossintomáticas até quadros graves podendo evoluir para o óbito (BRASIL, 2005, 2011). A partir de 2014 o Brasil passou a adotar a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) para os casos de dengue, passando a ser classificado como dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Anteriormente eram adotadas a seguinte classificação: febre hemorrágica da dengue (FHD), síndrome do choque da dengue (SCD) e dengue com complicações (DCC) (BRASIL, 2014).

Considerando a nova classificação, um caso de dengue envolve sintomas como náusea, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaléia, dor retroorbital, petéquias ou prova do laço positiva e leucopenia. Já os casos classificados como dengue com sinais de alarme apresentam como sinais e sintomas, dor abdominal intensa e contínua ou dor a palpação, vômitos persistentes, acumulação de líquidos (ascite, derrame pleural e pericárdio), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural (lipotímia), hepatomegalia maior que 2

cm e aumento progressivo do hematócrito. Os casos considerados graves apresentam pelo menos dois entre os sintomas de choque devido extravasamento do plasma, sangramento grave e comprometimento grave dos órgãos, tais como dano hepático grave (BRASIL, 2015a)

A dengue traz consigo uma carga social de difícil mensuração, é considerada grande a demanda por atendimento médico, há o comprometimento laboral e de estudo, além do impacto negativo na qualidade de vida das pessoas e familiares acometidos (SUAYA et al., 2009). Estudos avaliaram que o ônus econômico da dengue é superior ao encontrado em outras doenças virais nas Américas e especificamente o Brasil concentra 40,9% do custo total desta doença em todo o continente americano (SHEPARD et al., 2011) A literatura sinaliza que, com as mudanças climáticas, a dengue deve impor um impacto ainda maior sobre a população, com aumento nas complicações decorrentes da doença e aumento do número de óbitos (SHEFFIELD et al., 2011).

Acrescenta-se a esta questão, a possibilidade real de co infecção, daí a necessidade de diferenciar, por exemplo a CHIKV da dengue, a qual tem um potencial para resultados muito piores, incluindo a morte. Estas duas enfermidades podem ocorrer juntas no mesmo indivíduo (BRASIL, 2014b). Foi identificada também co-infecção das enfermidades Dengue e Chikungunya em pelo menos 13 países do mundo, além de surtos simultâneos (CARDOSO, 2015).

Diante magnitude dos casos, expressos pela casuística destas doenças e fatores como patogenicidade dos agentes infecciosos, alta competência do principal vetor, o *Aedes aegypti*, sua antropofilia e boa adaptação ao ambiente urbano, gera um contexto que poderia ser classificado como *habitats* ideais para o mosquito (DIAS, 2006; LIMA-CAMARA, 2016) e torna sua prevenção uma tarefa de extrema dificuldade para ser atingida com os atuais recursos disponíveis. As formas de controle preconizadas visam eliminar o mosquito nas suas diferentes fases do ciclo biológico, no entanto a efetividade dessas ações tem sido baixa e sem sucesso na contenção da dispersão do vírus da dengue (DIAS, 2006; GUBLER, 2012) e outras arboviroses (HONÓRIO; CAMARA; BRASIL, 2015c).

As atividades como busca e identificação de focos de proliferação do vetor faz parte da vigilância entomológica e constitui importante etapa para seu controle e eliminação (BONADIO, 2010), no entanto fatores como a alta resistência dos ovos, que por sua vez podem se manter viáveis por aproximadamente um ano, é um importante limitador no controle e erradicação do mosquito (BRASIL, 2009).

Outro importante elemento seria controle da doença a partir da vacinação, e neste sentido, os Institutos de pesquisa brasileiros como FIOCRUZ/BioManguinhos, Butantan e seus

parceiros, concentraram esforços e avançam para conclusão de ensaios clínicos para a produção da vacina contra dengue (BRASIL, 2015c). Os resultados destas pesquisas estão sendo acompanhadas a partir de critérios específicos, pré determinados e cientificamente válidos, pelo Ministério da Saúde, a partir do Programa Nacional de Imunização, que por sua vez, estabeleceu um grupo de Trabalho visando, entre outros aspectos, subsidiar decisão quanto a pertinência da introdução da vacina contra dengue no Calendário Nacional de Imunização (BRASIL, 2016b). Entre os laboratórios envolvidos na busca pela vacina contra dengue e cujo trabalho vem sendo analisado pelo GT, o laboratório Sanofi foi o que avançou mais rapidamente em direção à conclusão da pesquisa clínica e obteve em 2016 o licenciamento para uso em vários países, e entre eles o Brasil (FERGUNSON et al., 2016).

A eficácia positiva, porém, parcial da vacina contra dengue retoma, mais uma vez, a importância da manutenção do controle de vetores em paralelo a imunização (FERGUNSON et al., 2016). Acrescenta-se a esta questão a inexistência de vacina disponível para o controle de infecção por CHIKV (MDEFFO-MBAH et al., 2016) e por ZIKV (ALFARO-MURILLO et al., 2016; LAROCCA et al., 2016; SAXENA et al., 2016) ainda que a pesquisa clínica relacionada, principalmente ao ZIKV ainda seja um grande desafio (LIPSITCH; COWLING, 2016). Esta questão reforça a necessidade de manutenção do controle da doença voltada para o vetor e importância da integração de uma vigilância entomológica e epidemiológica contínua deve ser mantida (ABE et al., 2011; SILVA, 2012; BRASIL, 2015c; LIMA-CAMARA, 2016; MDEFFO-MBAH et al., 2016).

Diante da necessidade de implementação das políticas relacionadas inicialmente ao controle da dengue, o Brasil conta desde 2002, com o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) que por sua vez fundamenta-se em aspectos como: desenvolvimento de campanhas de informação; mobilização das pessoas, de maneira a se criar uma maior responsabilização de cada família na manutenção do ambiente doméstico livre de potenciais criadouros do vetor; fortalecimento da vigilância epidemiológica e entomológica para ampliar a capacidade de predição e de detecção precoce de surtos da doença; melhoria da qualidade do trabalho de campo de combate ao vetor; integração das ações de controle da dengue na atenção primária à saúde, mobilização do Programa de Agente Comunitário de Saúde PACS e da Estratégia de Saúde da Família ESF; utilização dos instrumentos legais que facilitam o trabalho do poder público na eliminação de criadouros em imóveis comerciais, casas abandonadas; atuação multissetorial, por meio do fomento à destinação adequada de resíduos sólidos e à utilização de recipientes seguros para armazenagem de água, e desenvolvimento de instrumentos mais

eficazes de acompanhamento e supervisão das ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde, estados e municípios (MAFRA; LEMOS, 2009).

Entre as ações e as estratégias de controle do vetor, faz parte do programa de controle da dengue, o uso de inseticidas químicos, principalmente o organofosforado temefós e o piretróide cipermetrina. No entanto o uso indiscriminado desses inseticidas vem sendo questionado quanto à sua real eficiência e quanto aos danos ambientais que podem causar. Além disso, o uso freqüente de inseticidas tem levado ao desenvolvimento de resistência do mosquito a estes compostos. Neste sentido várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca de novas alternativas para o controle do *Aedes aegypti* (VALLOTO, 2009).

O Programa de Controle da Dengue surgiu de uma reavaliação por parte do Ministério da saúde acerca do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) em função do insucesso e inviabilidade técnica de erradicação do mosquito no Brasil. O programa foi concentrado no fortalecimento das ações de combate ao vetor e com significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades e ações de prevenção focadas, quase que exclusivamente, nas atividades de combate ao vetor com uso de inseticidas. Desde a reintrodução deste vetor no Brasil em 1976 busca-se o seu controle, assim como a eliminação do avanço das doenças em que transmite (BRASIL, 2007).

Concomitantemente às ações direcionadas ao mosquito, a atuação na vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por ele, e entre elas a dengue, é tratada como uma enfermidade de notificação compulsória. Diante do exposto, todo caso suspeito e/ou confirmado deve ser comunicado ao serviço de vigilância epidemiológica (BRASIL, 2005). Esta notificação é realizada em um formulário padrão que é constituído pela Ficha Individual de Notificação (FIN) e a Ficha Individual de Investigação (FII) que devem ser preenchidas pelos profissionais da unidade de saúde e responsáveis pela investigação e dessa forma inserida no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, no caso de óbito, a declaração de óbito alimenta o Sistema de Informação de Mortalidade –SIM, sendo o sistema responsável pela normalização dos instrumentos utilizados para a notificação compulsória, fluxo e periodicidade (BRASIL, 2008).

Em São Paulo, a portaria municipal n° 2286/2014 determina que a dengue além de ser doença de notificação obrigatória passou ser também de notificação imediata, portanto deve ser realizada em até 24 horas (SÃO PAULO, 2014).

Chikungunya também tem sua notificação obrigatória, e, em relação à febre pelo vírus Zika sabe-se que também se trata de uma doença de notificação compulsória, presente na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública, anexo I

da Portaria nº 204, de 17/02/2016, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016c), de acordo com as classificações: “Doença aguda pelo vírus Zika”, “Doença aguda pelo vírus Zika em gestante” e “Óbito com suspeita de doença pelo vírus Zika”.

Além destes instrumentos a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) tem estimulado a adoção de métodos simplificados de amostragem para coleta de formas imaturas do vetor da dengue, o *Aedes aegypti* para permitir facilidade de obtenção de informações entomoepidemiológicas que contribuam para a avaliação de programas mediante realização de pesquisas periódicas (BRASIL, 2011).

Com objetivo de monitorar a população de *Aedes aegypti* nas atividades de vigilância entomológica, apesar de diversas estratégias propostas, utiliza-se, por exemplo, a produtividade de adultos a partir dos recipientes que lhe servem de criadouros. Trata-se de proceder a contagem do número de larvas, especialmente as de quarto estágio além das pupas, relacionar o número de criadouros positivos. Estes dados produzem indicadores como o Índice de Breteau e equivale ao número de 100 casas ou edifícios visitados, costuma-se utilizar também o índice de infestação predial, correspondendo ao percentual de habitações com recipientes positivos e o índice de recipientes positivos, significando o mesmo valor relativo sobre o total de criadouros potenciais examinados (BRASIL, 2013).

Além da necessidade de localizar o inseto vetor e identificar o seu criadouro, torna-se relevante obter maiores conhecimentos acerca das características e fragilidades inerentes ao inseto nas diferentes fases do seu ciclo biológico. O *Aedes aegypti* é um inseto holometábolo, ou seja, apresenta desenvolvimento completo, pois seu ciclo biológico envolve as fases de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto (GUIMARÃES et al., 2001; FORATTINI, 2002).

Sobre os ovos, eles apresentam especial importância, pois são muito resistentes à dessecação, podendo permanecer viáveis por mais de um ano. Esta resistência tem-se apresentado como um dos principais obstáculos para o controle do *Aedes aegypti*, pois ela possibilita a dispersão passiva da espécie (NEVES, 2005).

No momento da ovoposição, o ovo apresenta-se revestido por uma estrutura similar a um invólucro inicialmente elástico, e em seguida torna-se rígido, proporcionando assim suporte e proteção mecânica ao embrião nele contido. Esta estrutura é a casca, denominada córion, e tem além de função protetora, a função de permitir trocas gasosas e minimizar a perda de água. Ainda no córion, existe um orifício, denominado micrópila, por onde ocorre a penetração dos espermatozóides, este pode ser reconhecido ao exame, a partir da estrutura do aparelho micropilar. Comumente se identifica a área elevada circundando a micrópila, denominado, disco da micrópila ou disco micropilar. Internamente constata-se o tampo da micrópila, estrutura

que possibilita o fechamento da micrópila. A micrópila, corresponde à cabeça do embrião e torna-se o ponto de referência, sendo então designada extremidade anterior, aquela que ostenta o aparelho micropilar, já a extremidade posterior será aquela oposta ao aparelho micropilar. É considerada superfície dorsal àquela corresponde ao corpo do embrião ou a que entra em contato com o substrato onde o ovo foi depositado, conseqüentemente a face oposta seria a superfície ventral (FORATTINI, 2002).

As camadas do córion denominadas endocóron e exocóron, são camadas distintas, decorrentes da produção da proteína corionica em momentos diferentes (CLEMENTS, 1992). São as células foliculares (células somáticas da mãe e que envolvem cada folículo ovariano do inseto), as responsáveis por sua produção e secreção (LI; LI, 2006; FONSECA, 2012). O grande desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso e acúmulo de vesículas e grânulos na região apical observada na ultraestrutura de células foliculares são sugestivos da sua responsabilidade na síntese de proteínas coriônicas (CARDOSO, 2009).

O exocóron, geralmente apresenta ornamentações que possibilitam identificação da espécie. Trata-se de um excelente parâmetro de comparação entre espécies, pois tem a capacidade de revelar significativas diferenças (LINLEY, 1989; SERVICE, 2000; SANTOS-MALLET, 2010; SUMAN et al., 2011).

Suman et al. (2011) compararam aspectos morfológicos e morfométricos utilizando microscopia eletrônica de varredura entre ovos de diferentes espécies do gênero *Aedes* originários de Gwalior, Índia. Os autores demonstraram que além do *Aedes aegypti*, outros culicídeos do mesmo gênero, apresentam aspectos semelhantes no que se refere à características das células do exocóron.

A avaliação da estrutura externa de ovos (exocóron) de insetos de maneira geral, valendo-se da Microscopia Eletrônica de Varredura tem sido aplicada de maneira cada vez mais frequente, em várias ordens de insetos. A descrição morfológica dos ovos e por micrografias de varredura tem possibilitado a caracterização ultraestrutural da superfície dos ovos de culicídeos de interesse médico além de permitir identificar caracteres de potencial uso taxonômico e filogenético (FORATTINI, 2002; REINERT, 2005; DUJARDIN, 2008). Os insetos, principalmente os considerados de importância médica, quando submetidos a várias estratégias para seu controle associados a mudanças na paisagem, pode apresentar variação fenotípica e passa a ser fonte de muitas perguntas epidemiológicas e taxonômicas. Atualmente discute-se amplamente o significado evolutivo de assimilação genética e epigenética. Achados morfométricos também podem fornecer informações necessárias, visando mapeamento

preliminar apontando para áreas onde se poderia investir na maquinaria molecular (DUJARDIN, 2008).

Moratore (2009) comparou populações de outro culicídeo, o *Culex quinquefasciatus*, onde avaliou a presença de variação populacional indicativa de microevolução, um dos parâmetros utilizados foi a micrografia do exocóron dos ovos. O polimorfismo evidenciado neste tipo de análise pode significar diferenciação genética ou plasticidade relacionada ao local onde as populações estão inseridas.

Os ovos têm se prestado a mensurações, objetivando serem utilizados como caracteres taxonômicos. Desta forma, utiliza-se também calcular o índice do ovo (L/W ratio) estabelecendo a razão entre comprimento e largura. O comprimento é medido pela distância entre as duas extremidades, enquanto a largura corresponde ao valor máximo perpendicular a anterior (FORATINI, 2002; MOTOKI, 2012).

Em condições ambientais favoráveis, os ovos se desenvolvem e logo após imersão em água, eclodem. Quando submetido a situações adversas como é o caso das baixas temperaturas, dá-se a diapausa, e assim, este estado de quiescência poderá se prolongar por seis meses ou mais tempo até o encontro com água em situação ambiental favorável (CONSOLINI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; LACOUR et al., 2014).

Farnesi et al. (2009), verificaram em seu estudo que quando submetido a temperatura de 16°C a embriogênese se completa em 489,3±0,6 horas, em temperatura de 22°C a embriogênese é finalizada em 98,3 horas, já em temperatura de 25°C a sua finalização ocorre em 77,4 horas, em temperatura de 28°C o desenvolvimento é finalizado em 61,6±1,2 horas, já em 36°C, não foi observada eclosão dos ovos.

No momento da eclosão, a casca do ovo é rompida em virtude de atividade muscular da larva, ao qual aumenta de volume e conseqüentemente aumenta a pressão exercida a partir principalmente da espícula, estrutura especializada conhecida como órgão rompedor de ovo (*egg-breaker*, *egg burster*). A eclosão do ovo se faz a partir de estímulos variados e a partir daí ocorre o rompimento do córion, em que se observa a formação de uma fenda que rompe a parte correspondente a este revestimento (FORATTINI, 2002).

As larvas resultantes da eclosão dos ovos, são sempre aquáticas, apresentam aspecto vermiforme, seu corpo está dividido em cabeça, torax e abdome. Os dois primeiros são mais volumosos quando comparado com o abdome, que por sua vez tem aspecto semicilíndrico e seu último segmento é diferenciado em lobo anal. Ainda no primeiro estágio, a larva é provida de um “dente” quitinoso que a auxilia no processo de eclosão. No corpo da fase larval do mosquito encontra-se 222 pares de cerdas aproximadamente disposto de forma simétrica variando em

relação ao tamanho e ao número de ramificações. Apresentam função sensorial e auxiliar na flutuação. (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

As larvas possuem aparelho bucal do tipo mastigador raspador; as peças bucais consistem em epifaringe, mandíbulas, maxilas, hipofaringe e lábio. Na cabeça (face ventral) encontram-se as escovas orais ou palatais, constituídas de um par de escovas laterais e um de escovas medianas (ventrais). Estas escovas, quando em movimento, promovem correntes hídricas que trazem para a boca da larva as partículas que serão mastigadas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A forma pupal, a partir da qual emerge o inseto adulto, é adéctica e obtecta, ou seja, destituída de mandíbulas funcionais e com apêndices justapostos ao corpo. Trata-se de uma fase em que se identifica apreciável mobilidade em meio aquático e apresenta um contorno geral que lembra uma vírgula. Em seu corpo é possível distinguir o cefalotorax e abdome. O cefalotorax tem forma globosa e nele se fixa o abdome, constituído de 10 segmentos aparentes e seus movimentos rápidos permitem sua locomoção (FORATTINI, 2002).

Cientes de que é a fase adulta que transmite as arbovíroses, não se pode desconsiderar que são as fases imaturas conseguem nos ajudar a entender o grau de adaptabilidade que esta espécie conquistou no que tange as suas relações com a espécie humana (NATAL, 2002).

Diante do exposto, sobre a fase adulta, torna-se preocupante a sua capacidade de dispersão, pois trata-se de um inseto em constante processo de expansão geográfica, quer seja em áreas urbanas, ou mesmo em áreas peri urbanas e rurais (GUAGLIARDO, 2015).

Os representantes adultos da espécie *Aedes aegypti* tem sua identificação facilitada por apresentarem o tórax é recoberto por escamas claras e escuras, em que se destacam escamas prateadas dispostas em linhas longitudinais formando, em conjunto, desenho classicamente comparado à “lira” passível de observação a olho nú. Encontram-se manchas brancas alternando-se com manchas escuras na região posterior da cabeça, nos seguimentos abdominais, estas manchas brancas formam cintos junto à base de cada perna, apresentando anéis brancos contrastando com sua cor escura (REY, 2001; FORATTINI, 2002).

No que se refere ao hábito alimentar, somente a fêmea é hematófaga, portanto, está estrutural e fisiologicamente adaptada para esta forma de alimentação, seu aparelho bucal é alongado, do tipo picador sugador. Já os machos apresentam aparelho bucal reduzido, sem potencial para romper a integridade da pele, sua alimentação é composta de néctar e seiva oriundo das plantas (GUIMARÃES, 2001; FORATTINI, 2002).

A capacidade de vôo é limitada, a fêmea não alcança grandes distâncias e dificilmente ultrapassaria muito o quarteirão onde iniciou suas atividades de postura de ovos. O que indica

que esta espécie dificilmente sairia do quarteirão ou de uma cidade, a não ser, mediante transporte passivo como ônibus, automóveis, aviões. A fêmea grávida deposita parceladamente os ovos da postura e em ocasiões sucessivas (oviposição em saltos) (EDMAN et al., 1998). A capacidade de vôo das fêmeas, ainda que limitada é superior ao dos machos (SOARES, 2015).

Na pesquisa desenvolvida por Guagliardo (2015), a expansão do *Aedes Aegypti*, está associada a diversas atividades de transportes de pessoas. Ao avaliar infestação de diferentes tipos de meios de transportes na amazonia peruana, identificou 71,9% das grandes embarcações e 39,4% das embarcações médias infestadas por este inseto. O que demonstra que os barcos podem ter papel importante na expansão do mosquito.

Em estudo avaliando a dispersão das fêmeas grávidas de *Aedes aegypti* a partir da metodologia de soltura e captura destes insetos em um local presumidamente sem barreiras para o vôo, na cidade do Rio de Janeiro, Freitas e Oliveira (2009), identificaram que a dispersão das fêmeas foi em média 288,12 m do ponto de soltura e o deslocamento máximo 690 m.

Considerando a relação entre a capacidade de dispersão deste inseto com o aumento do risco de dengue, Soares et al. (2015), analisaram a fisiologia mitocondrial dos músculos do vôo existentes no tórax de adultos machos e fêmeas, isto foi realizado a partir da avaliação das enzimas mitocondriais após alimentação dos insetos, um dos importantes achados foi a de que a respiração mediada por oxidação prolina, um dos metabólitos da hemolinfa (análogo ao sangue para os insetos) foi notadamente maior para as fêmeas. De acordo com a pesquisa a compreensão dos processos mitocondriais são fundamentais e tem implicações potenciais para a fisiologia e capacidade vetorial do inseto.

Em relação ao número de postura de ovos, este dependerá essencialmente da disponibilidade de sangue ingerido para o desenvolvimento ovariano, sendo que o repasto sanguíneo completo envolve cerca de 3,0 a 3,5 mg de sangue. Em média cada fêmea produz cerca de 120 ovos. Como nos recipientes positivos para ovos tem sido encontrada quantidade muito superior a capacidade de uma fêmea, subentende-se que o mesmo recipiente é visitado por várias delas (REITER, 1996). As fêmeas não realizam ovoposição diretamente em água, elas o fazem em recipientes ou áreas com potencial para se tornarem criadouros (FORATTINI, 2002).

A atividade de hematofagia geralmente é diurna e ao após a ingestão de um repasto sanguíneo infectante, os vírus infectam e se replicam no intestino do inseto e depois quando estão na hemolinfa, outros órgãos também podem ser infectados, como é o caso dos ovários. Campanelli (2009), estudou a capacidade de transmissão do vírus da fêmea para a sua progênie, e foi identificado que após a primeira ovoposição 100% transmitiram o vírus verticalmente,

mas numa segunda ovoposição que 25% das fêmeas positivas não transmitiam o vírus para sua progênie.

Existem aspectos importantes do mosquito a se esclarecer no sentido de estabelecer novas perspectivas de controle. Sendo assim, o estudo do desenvolvimento embrionário dos ovos de *Aedes aegypti*, pode ser uma possibilidade importante para um novo caminho no controle efetivo das arboviroses em que este inseto atua como vetor.

Ao estudar a fase jovem do ciclo biológico, não há como desconsiderar o local onde as demais fases podem ser encontradas, um dos objetos de atenção da vigilância entomológica. Não há como abordar o controle da doença ignorando o controle do seu vetor, o *Aedes aegypti*, parte mais frágil da cadeia epidemiológica e muito vulnerável a medidas profiláticas e, portanto, alvo de pesquisas visando o controle das doenças em que atua como vetor.

Diante do exposto o presente estudo se justifica pela necessidade de compreender os aspectos morfológicos, morfométricos e de desenvolvimento embrionário deste inseto vetor, bem como os aspectos relacionados à vigilância entomológica com vistas a gerar subsídios que possam contribuir para o seu controle.

As informações geradas pelos estudos entomoepidemiológicos fundamentam as decisões de intervenção em saúde para que sejam coerentes com a realidade local e tenham verdadeiro poder transformador. Nada pode ser feito em vigilância epidemiológica ou mesmo em vigilância entomológica sem a obtenção da informação, é necessário conhecer o que se tem para que a partir daí possa haver planejamento de estratégias coerentes com essa realidade de modo a permitir a execução da ação e obtenção de resultados positivos e de caráter efetivo (PEREIRA, 2008).

Existe necessidade de novas pesquisas acerca desta fase do ciclo biológico do mosquito, pois a partir destas pesquisas seria possível mais avanços quanto a descoberta de novas alternativas para o controle deste vetor, entende-se como fundamental a investigação do desenvolvimento embrionário deste inseto.

O ovo do mosquito tem especial importância por sua resistência, e, portanto, sua manutenção no ambiente, uma vez infectado, faz com que o risco de novos casos dessas doenças persista. Ele tem sido considerado como “uma fortaleza resistente e impermeável”, o que dificulta as ações de controle. A compreensão dos destes fatores ou dos processos relacionados a ele podem trazer luz aos estudos sobre controle do inseto vetor.

Apesar da extrema importância vetor pouca atenção ainda é dada ao desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti*. Sabe-se que o conhecimento da cinética embrionária tem grande

potencial para auxiliar no desenvolvimento de novas tecnologias de controle vetorial e consequentemente no controle das doenças em que ele atua como vetor.

Desta forma, o presente estudo se propõe a avaliar aspectos morfológicos, morfométricos do ovo, desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti* bem como os aspectos entomológicos, no âmbito da vigilância, no Município de São Paulo no ano de 2013.

3 HIPÓTESE

Sabendo da área de risco para proliferação do vetor, o conhecimento sobre o desenvolvimento embrionário do ovo do *Aedes aegypti* poderá contribuir para o controle do mosquito ao identificar pontos de fragilidades e/ou resistência na estrutura deste ovo e/ou em seu desenvolvimento embrionário.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os aspectos entomológicos no âmbito da vigilância em saúde além dos aspectos morfológicos e morfométricos do ovo do *Aedes aegypti*.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Identificar áreas do Município de São Paulo em que os indicadores resultantes do monitoramento entomológico, revelam maior presença do *Aedes aegypti* e consequentemente maior risco de aparecimento de novos casos das arboviroses em que este inseto atua como vetor, com ênfase para a dengue, no ano de 2013.
- Analisar o aspecto morfológico pela microscopia de luz e eletrônica do ovo do *Aedes aegypti*.
- Apresentar morfometria do ovo de *Aedes aegypti* oriundos do Município de São Paulo
- Analisar o desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti* em suas fases: inicial, intermediária e final.

5 MATERIAL E MÉTODO

Considerando que não basta conhecer os aspectos morfológicos do mosquito *Aedes aegypti* sem que se identifique o local onde pode ser encontrado, para que então seja possível combatê-lo de maneira efetiva, esta pesquisa se preocupa num primeiro momento em apresentar os aspectos inerentes à vigilância entomológica seguido da morfometria do ovo e aspectos relacionados à morfologia da fase embrionária deste importante vetor.

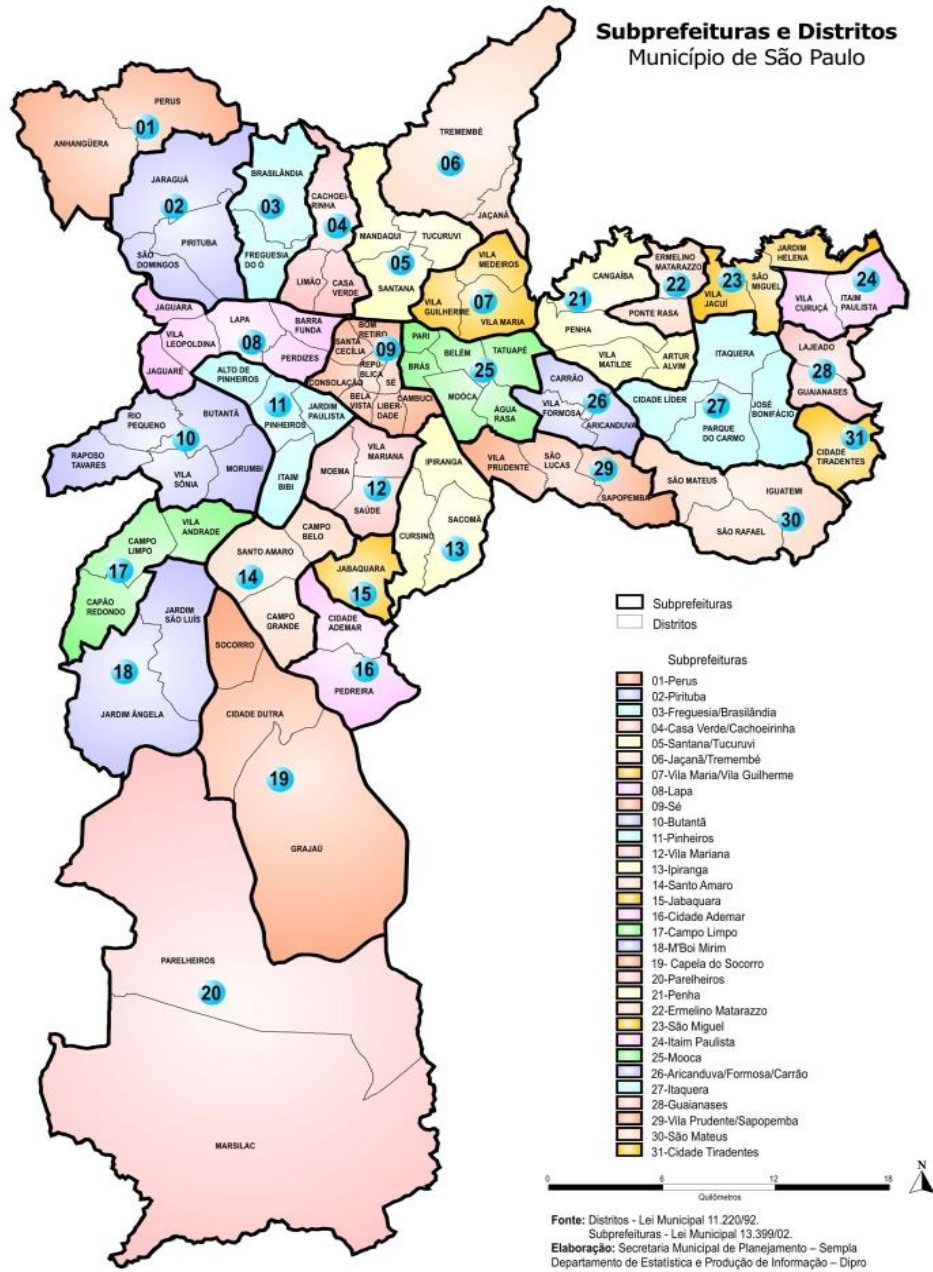
5.1 ASPECTOS ENTOMOLÓGICOS NO ÂMBITO DA VIGILÂNCIA EM SAÚDE

O delineamento de estudo que envolve análise dos aspectos entomológicos, no âmbito da vigilância em saúde no ano de 2013, classifica-se como observacional descritivo e foi realizado a partir de dados secundários oriundos da Coordenação de Vigilância em Saúde - COVISA, órgão subordinado a Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo - Município de São Paulo, que por sua vez consideram a divisão do referido município em distritos administrativos (Figura 1), conforme a lei 11.220 de 20 de maio de 1992 .

Foram obtidos os indicadores entomológicos relacionados aos diferentes distritos administrativos do município. Os Distritos Administrativos do município são:

Água Rasa, Alto de Pinheiros, Anhanguera, Aricanduva, Arthur Alvim, Barra Funda, Bela Vista, Belém, Bom Retiro, Brás, Brasilândia, Butantã, Cachoeirinha, Cambuci, Campo Belo, Campo Grande, Campo Limpo, Cangaíba, Capão Redondo, Carrão, Casa Verde, Cidade Ademar, Cidade Dutra, Cidade Líder, Cidade Tiradentes, Consolação, Cursino, Ermelino Matarazzo, Freguesia do Ó, Grajaú, Guaianases, Iguatemi, Ipiranga, Itaim Bibi, Itaim Paulista, Itaquera, Jabaquara, Jaçanã, Jaguará, Jaguaré, Jaraguá, Jardim Ângela, Jardim Helena, Jardim Paulista, Jardim São Luís, José Bonifácio, Lajeado, Lapa, Liberdade, Limão, Mandaqui, Marsilac, Moema, Moóca, Morumbi, Parelheiros, Pari, Parque do Carmo, Pedreira, Penha, Perdizes, Perus, Pinheiros, Pirituba, Ponte Rasa, Raposo Tavares, República, Rio Pequeno, Sacomã, Santa Cecília, Santana, Santo Amaro, São Domingos, São Lucas, São Mateus, São Miguel, São Rafael, Sapopemba, Saúde, Sé, Socorro, Tatuapé, Tremembé, Tucuruvi, Vila Andrade, Vila Curuçá, Vila Formosa, Vila Guilherme, Vila Jacuí, Vila Leopoldina, Vila Maria, Vila Mariana, Vila Matilde, Vila Medeiros, Vila Prudente e Vila Sônia.

Figura 1 - Distritos Administrativos organizados de acordo com a Subprefeitura ao qual pertencem no Município de São Paulo de acordo com lei municipal 11.220/1992



Fonte: Secretaria Municipal de Planejamento – SEMPLA (1992)
Cada Distrito Administrativo (DA) está vinculado a uma supervisão de saúde que por sua vez faz parte de uma coordenadoria regional de saúde (Quadros 1 a 5).

Quadro 1 - Coordenadoria Regional de Saúde Centro Oeste e a distribuição das Supervisões de Saúde a ela vinculadas e seus respectivos Distritos administrativos e área ocupada

COORDENADORIA REGIONAL DE SAÚDE	SUPERVISÃO DE SAÚDE	DISTRITO ADMINISTRATIVO	ÁREA Km ²
CENTRO-OESTE	BUTANTÃ	BUTANTÃ	12.50
		MORUMBI	11.40
		RAPOSO TAVARES	12.60
		RIO PEQUENO	9.70
		VILA SÔNIA	9.90
	LAPA/PINHEIROS	ALTO DE PINHEIROS	7.70
		BARRA FUNDA	5.60
		ITAIM BIBI	9.90
		JAGUARA	4.60
		JAGUARÉ	6.60
		JARDIM PAULISTA	6.10
		LAPA	10.00
		PERDIZES	6.10
		PINHEIROS	8.00
		VILA LEOPOLDINA	7.20
	SÉ	BELA VISTA	2.60
		BOM RETIRO	4.00
		CAMBUCI	3.90
		CONSOLAÇÃO	3.70
		LIBERDADE	3.70
REPÚBLICA		2.30	
SANTA CECÍLIA		3.90	
SÉ		2.10	

Fonte: SEMPLA SMS/CEInfo/GISA, Fev 06

Quadro 2 - Coordenadoria Regional de Saúde Leste e a distribuição das Supervisões de Saúde a ela vinculadas e seus respectivos Distritos administrativos e área ocupada

COORDENADORIA REGIONAL DE SAÚDE	SUPERVISÃO DE SAÚDE	DISTRITO ADMINISTRATIVO	ÁREA Km ²
LESTE	CIDADE TIRADENTES	CIDADE TIRADENTES	15.00
	ERMELINO MATARAZZO/SÃO MIGUEL	ERMELINO MATARAZZO	8.70
		JARDIM HELENA	9.10
		PONTE RASA	6.40
		SÃO MIGUEL	7.50
		VILA JACUÍ	7.70
	GUAIANASES	GUAIANASES	8.60
		LAJEADO	9.20
	ITAIM PAULISTA	ITAIM PAULISTA	12.00
	ITAQUERA	CIDADE LÍDER	10.20
		ITAQUERA	14.60
		JOSÉ BONIFÁCIO	14.10
		PARQUE DO CARMO	15.40
	SÃO MATEUS	IGUATEMI	19.60
		SÃO MATEUS	13.00
SÃO RAFAEL		13.20	

Fonte: SEMPLA/SMS/CEInfo/GISA, Fev 06

Quadro 3 - Coordenadoria Regional de Saúde Norte e a distribuição das Supervisões de Saúde a ela vinculadas e seus respectivos Distritos administrativos e área ocupada

COORDENADORIA REGIONAL DE SAÚDE	SUPERVISÃO DE SAÚDE	DISTRITO ADMINISTRATIVO	ÁREA Km ²
NORTE	CASA VERDE / CACHOEIRINHA	CACHOEIRINHA	13.30
		CASA VERDE	7.10
		LIMÃO	6.30
	FREGUESIA / BRASILÂNDIA	BRASILÂNDIA	21.00
		FREGUESIA DO Ó	10.50
	PIRITUBA/PERUS	ANHANGUERA	33.30
		JARAGUÁ	27.60
		PERUS	23.90
		PIRITUBA	17.10
	SANTANA / TUCURUVI/JAÇANÃ / TREMEMBÉ	SÃO DOMINGOS	10.00
		JACANÃ	7.80
		MANDAQUI	13.10
		SANTANA	12.60
		TREMEMBÉ	56.30
	VILA MARIA / VILA GUILHERME	TUCURUVI	9.00
		VILA GUILHERME	6.90
		VILA MARIA	11.80
	VILA MEDEIROS	7.70	

Fonte: SEMPLA/SMS/CEInfo/GISA, Fev 06

Quadro 4 - Coordenadoria Regional de Saúde Sul e a distribuição das Supervisões de Saúde a ela vinculadas e seus respectivos Distritos administrativos e área ocupada

COORDENADORIA REGIONAL DE SAÚDE	SUPERVISÃO DE SAÚDE	DISTRITO ADMINISTRATIVO	ÁREA Km ²
SUL	CAMPO LIMPO	CAMPO LIMPO	12.80
		CAPÃO REDONDO	13.60
		VILA ANDRADE	10.30
	CAPELA DO SOCORRO	CIDADE DUTRA	29.30
		GRAJAÚ	92.00
		SOCORRO	12.90
	M'BOI MIRIM	JARDIM ANGELA	37.40
		JARDIM SÃO LUIZ	24.70
	PARELHEIROS	MARSILAC	200.00
		PARELHEIROS	153.50
	SANTO AMARO/CIDADE ADEMAR	CAMPO BELO	8.80
		CAMPO GRANDE	13.10
		CIDADE ADEMAR	12.00
		PEDREIRA	18.70
		SANTO AMARO	15.60

Fonte: SEMPLA
ELABORAÇÃO: SMS/CEInfo/GISA, Fev 06

Quadro 5 - Coordenadoria Regional de Saúde Sudeste e a distribuição das Supervisões de Saúde a ela vinculadas e seus respectivos Distritos administrativos e área ocupada

COORDENADORIA REGIONAL DE SAÚDE	SUPERVISÃO DE SAÚDE	DISTRITO ADMINISTRATIVO	ÁREA Km ²
SUDESTE	IPIRANGA	CURSINO	12.80
		IPIRANGA	10.50
		SACOMÃ	14.20
	MOOCA/ARICANDUVA / FORMOSA / CARRÃO	ÁGUA RASA	6.90
		ARICANDUVA	6.60
		BELÉM	6.00
		BRÁS	3.50
		CARRÃO	7.50
		MOOCA	7.70
		PARI	2.90
		TATUAPÉ	8.20
		VILA FORMOSA	7.40
		PENHA	ARTUR ALVIM
	CANGAÍBA		16.00
	PENHA		11.30
	VILA MATILDE		8.90
	VILA MARIANA/JABAQUARA	JABAQUARA	14.10
		MOEMA	9.00
		SAÚDE	8.90
		VILA MARIANA	8.60
	VILA PRUDENTE / SAPOPEMBA	SÃO LUCAS	9.90
SAPOPEMBA		13.50	
VILA PRUDENTE		9.90	

Fonte: SEMPLA

ELABORAÇÃO: SMS/CEInfo/GISA, Fev 06

Diante do exposto, considerando os diferentes Distritos Administrativos, foram coletadas às variáveis:

Imóveis positivos, número de imóveis pesquisados, número de recipientes positivos, tipo de recipientes positivos, tipos de recipientes positivos, pontos estratégicos no município, pontos estratégicos visitados, pontos estratégicos positivos, imóveis especiais positivos e imóveis especiais no município e imóveis especiais visitados. Todas as variáveis foram coletadas considerando o ano de interesse para a pesquisa, no caso, o ano de 2013 e ampliando-se também para 2014.

Todas as variáveis coletadas referem-se aos anos de 2013 e 2014, considerando que a pesquisa entomológica é realizada três momentos ao ano (fevereiro, julho e outubro), os resultados obtidos foram correspondentes a estes momentos. Entretanto a não foi possível resgatar junto à Secretaria de Saúde, os dados envolvendo o Índice por tipos de recipientes positivos segundo distrito administrativo (ITR) de fevereiro/2014.

A existência de um banco de dados contendo estas variáveis somente é possível em função da execução, por parte do Município de São Paulo, das atividades previstas no Plano Nacional e Estadual de Controle da Dengue e preconizadas pela Superintendência de Controle de endemias (SUCEN) da Secretaria de Estado da Saúde, em que os agentes de campo, visitam diferentes imóveis em todos os distritos administrativos do município identificando, registrando e coletando as formas jovens do *Aedes aegypti* especialmente as larvas para fins de monitoramento entomológico.

Foram então obtidos os indicadores:

1. Índice de Infestação predial segundo distrito administrativo (IP)

$$\text{IP} = \frac{\text{Número de imóveis positivos}}{\text{Número de imóveis pesquisados}} \times 100$$

2. Índice de “Breteau” segundo distrito administrativo (IB),

$$\text{IB} = \frac{\text{Número de recipientes positivos}}{\text{Número de imóveis pesquisados}} \times 100$$

3. Índice por tipos de recipientes positivos segundo distrito administrativo (ITR),

$$\text{ITR} = \frac{\text{Número de recipientes positivos por tipo}}{\text{Número total de recipientes positivos}} \times 100$$

4. Positividade por pontos estratégicos,

$$\text{PEE} = \frac{\text{Número de pontos estratégicos positivos}}{\text{Número de pontos estratégicos pesquisados}} \times 100$$

Os pontos estratégicos são aqueles de maior importância na geração e dispersão do vetor. São eles: depósito de ferro velho e pneus usados, oficinas de desmanche de veículos, borracharias, cemitérios, estação rodoviária, estação ferroviária, portos e aeroportos.

5. Positividade segundo imóveis especiais no Município de São Paulo

$$\text{PIE} = \frac{\text{Número de imóveis especiais positivos} \times 100}{\text{Número de imóveis especiais pesquisados}}$$

São considerados imóveis especiais, aqueles relevantes na propagação do vírus da dengue, devido alto fluxo e ou permanência de indivíduos. São eles: serviços de saúde, instituições de ensino, indústrias, penitenciárias, selecionados por avaliação cadastral. A necessidade do cadastro se dá em função das dificuldades para a operacionalização de ações de vigilância e controle vetorial, que nestes locais são mais trabalhosas e complexas.

As análises estatísticas necessárias foram realizadas utilizando-se do Software *Statistical Analyses Software SAS*. Considerou-se o Intervalo de Confiança de 95%. Foi utilizado, também para a análise espacial dos resultados o software *Quantum GIS (QGIS)*.

O Ministério da Saúde preconiza como satisfatório, os índices de infestação inferiores a 1%. Aqueles cujos resultados estão entre 1 a 3,9% são classificados como em situação de alerta, já os resultados superiores a 4% são áreas em que já risco de surto de dengue. Para a avaliação proposta neste estudo foi obedecida esta classificação.

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

5.2.1 Obtenção do material biológico

Os ovos de *A. aegypti* foram disponibilizados pelo insetário mantido pelo Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo- Campus Capital.

5.2.2 Análise Morfológica

A análise morfológica será realizada utilizando-se de recursos como microscopia óptica (luz e confocal de varredura a laser) e microscopia eletrônica (varredura e transmissão).

5.2.2.1 Microscopia Óptica: Luz

As amostras foram fixadas em solução de formaldeído 10%. Após completa fixação foram desidratadas em série de etanóis em concentrações crescentes (70 a 100%) e diafanizadas em xilol, com posterior inclusão em parafina histológica. Cortes de 3 μ m de espessura foram realizados no micrótomo (Leika, German) e corados com Hematoxilina-Eosina. As imagens foram obtidas através do microscópio de luz Nikon Eclipse E- 800 no no Centro Avançado de Diagnóstico por Imagem/ FMVZ-USP.

5.2.2.2 Microscopia Óptica: Confocal de Varredura a Laser

Os ovos foram processados inicialmente com lavagem em água, seguida da imersão em hipoclorito de sódio 3% até sua clarificação (aproximadamente 30 minutos), com posterior lavagem em PBS, triton 0,02% por 5 minutos e novamente lavagem em PBS, o material então foi fixado em formoldeido 3,7% por 20 minutos, após este procedimento foi realizada nova sequência de lavagem com PBS, permeabilização com uso do triton 1% em temperatura ambiente e lavagem com PBS por duas vezes. A incubação foi realizada em câmara escura por 60 minutos e foi utilizada faloidina (FITC). A RNase foi adicionada nos 30 minutos finais da incubação. Após esse tratamento os embriões foram novamente lavados com PBS e os núcleos foram corados com Iodeto de Propídio. Foram obtidas imagens fluorescentes por microscopia confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510) no laboratório de Biologia Celular e Molecular (BioCeM) do Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

5.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2%, pós-fixada em uma solução de tetróxido de ósmio a 1% a 4° C e uma solução aquosa de 5% de acetato de uranilo à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol, concentração crescente, imerso em óxido de propileno e embebido em resina Spurr. Para a microscopia de luz seções semi-finas foram cortadas em uma Cut Ultra Reichert[®] ultramicrotomo e corados com uma solução a 1% de azul de toluidina. As seções finas de 90 nm, foram cortadas e recolhidos em 200 mesh (Sigma[®]) e contrastadas com uma solução de acetato de uranila a 4% e uma solução aquosa 0,4% de citrato de chumbo. As grades foram examinadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão, no Centro Avançado de Diagnóstico por Imagem/ FMVZ-USP.

Especificamente para as análises do corte semi fino, os ovos foram submetidos a um processamento prévio com lavagem em água, seguida da imersão em hipoclorito de sódio 3% até sua clarificação (aproximadamente 30 minutos), com posterior lavagem em PBS, triton 0,02% por 5 minutos e novamente lavagem em PBS, só então foram fixadas em glutaraldeído dando sequência ao processamento.

5.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

O material biológico foi fixado em solução Karnovsky modificado (glutaraldeído 5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2), seguida de lavagem em tampão Cacodilato de sódio, pH 7,2 e fixação posterior em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M. Após realização de nova série de lavagem e controle da limpeza, os ovos foram desidratados em série crescente de etanol até o etanol absoluto (50%, 75%, 90% e 100%). Após passar em ponto crítico, foi realizada montagem do material sobre Stubs utilizando-se fita adesiva dupla face de carbono seguida da cobertura com banho de ouro, usando o sistema de *sputtering*, e para a análise do material foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250 no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. – SP, Capital no qual foram fotomicrografados para posterior análise

A terminologia considerada para descrição das estruturas considerou Harbach & Knight (1978).

5.2.3 Análise morfométrica

A análise morfométrica foi realizada a partir das mensurações das imagens obtidas em Microscopia Eletrônica de Varredura. Foram consideradas para esta análise as dimensões lineares do ovo:

- Comprimento - distância entre a micrópila e a extremidade oposta,
- Largura – maior distância perpendicular ao comprimento,
- Índice do ovo - razão entre comprimento/largura,
- Diâmetro do disco micropilar – diâmetro da estrutura anterior no ovo

Estas mensurações foram obtidas para análise das medidas de tendência central (média) e medidas de dispersão (desvio padrão, valor máximo e valor mínimo). As análises estatísticas serão realizadas utilizando-se do *software Graph Prism*. Foi considerado o Intervalo de Confiança de 95%.

5.2.4 Desenvolvimento embrionário

A análise do desenvolvimento embrionário foi realizada por microscopia óptica (luz e confocal), microscopia eletrônica de varredura e microscopia de transmissão conforme metodologia descrita neste capítulo.

6 RESULTADO

Os resultados acerca da vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Município de São Paulo, morfologia e morfometria dos ovos e desenvolvimento embrionário deste vetor encontram-se organizados nos capítulos 7, 8 e 9 em formato artigo e encontram-se submetidos ou em processo de submissão para publicação.

7 CAPÍTULO 1: VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO EM 2013 E 2014

RESUMO

As informações obtidas a partir dos dados da vigilância entomológica fundamentam as decisões de intervenções de controle de vetores, como o *Aedes aegypti*, mosquito de grande importância em saúde pública, em função do seu envolvimento na transmissão de arboviroses, e entre elas, a dengue. Desta forma, o presente estudo se propôs a avaliar aspectos entomológicos do *Aedes aegypti*, no âmbito da vigilância em saúde, no Município de São Paulo no ano de 2013 e 2014. Trata-se de um estudo observacional descritivo, realizado a partir de dados secundários oriundos da Secretaria Municipal de Saúde do Município de São Paulo, onde as unidades de análise dos dados consideram o município como um todo e também sua divisão em Distritos Administrativos (DA). Foram analisados os indicadores: Índice de Breteau (IB), Índice de Infestação Predial (IP), Índice por Tipos de Recipientes Positivos (ITR), Positividade por Pontos Estratégicos e Imóveis Especiais. Nos anos de estudo, os indicadores IB, IP e ITR tiveram comportamento similares entre si, já o ITR revelou que o principal tipo de recipiente positivo para presença do vetor foi prato/pingadeira para planta seguido do vaso de planta, ou seja, os principais recipientes positivos encontram-se no ambiente domiciliar. Entre os Pontos Estratégicos e Imóveis Especiais, constatou-se maior positividade no verão, em ambos os anos de avaliação. Considera-se fundamental a avaliação dos dados oriundos do levantamento entomológico, pois somente desta maneira é possível elaborar políticas públicas efetivas e com poder transformador da realidade, por exemplo, ao identificar a residência como local de grande importância para presença de criadouros, não há como não trabalhar a responsabilização da população.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Vigilância entomológica. Dengue.

7.1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* apresenta grande importância em saúde pública, em nível mundial, em função do seu envolvimento na transmissão de arboviroses (*Arthropod-borne viruses*) como a dengue (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; ARAÚJO, 2009; WHO 2009; AMARAL; PETETSKI, 2012; GOMES; NOBRE; CRUZ, 2012; PEREIRA et al., 2013, SAMPAIO et al., 2016), Chikungunya (BRASIL, 2014b; CHARREL et al., 2014; PINTO JUNIOR, 2014; BRASIL, 2015; SAMPAIO et al., 2016) cujo primeiro caso de transmissão autóctone foi registrada no Brasil em setembro de 2014 (BRASIL, 2014; HONÓRIO; CAMARA; BRASIL, 2015) e Zika (MARCONDES; XIMENES, 2015; FAUCI; MORENS, 2016), este último, confirmado no Brasil pela primeira vez em maio de 2015 (BRASIL, 2015; CARDOSO et al., 2015; HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016).

No entanto, a espécie *Aedes aegypti* exibe relevância médica a nível mundial principalmente por se tratar do principal vetor da dengue (ARAÚJO, 2009; AMARAL; PETETSKI, 2012; GOMES; NOBRE; CRUZ, 2012). Estima-se que, anualmente, 500.000 pessoas sejam atingidas pela forma grave da doença em todo o mundo (WHO, 2016), predominantemente crianças (BHATT et al., 2013; WHO, 2016), das quais cerca de 2,5% resultam em óbito (WHO, 2016).

Especificamente nas Américas, em 2015, foram notificados 2.35 milhões de casos, destes 10.200 casos foram classificados como dengue grave e provocaram 1.181 mortes (WHO, 2016).

Uma epidemia de grande importância no Brasil ocorreu no ano de 2013, quando foram notificados 1.470.487 casos prováveis configurando-se um pico da doença desde a sua introdução no território brasileiro, na década de 80. A região sudeste concentrou a maior frequência de casos (BRASIL, 2014).

Em 2013, o Estado de São Paulo, apresentou taxa de incidência de 480,87 casos por 100.000 habitantes e ocorreram óbitos por dengue em 35 municípios deste estado (PEREIRA et al., 2013).

Em 2014 foram notificados 591.080 casos prováveis, cuja taxa de incidência representa 291,5 casos por 100.000 habitantes. A participação do Estado de São Paulo consistiu em cerca de 40% das notificações de dengue, e neste mesmo ano, o estado superou qualquer casuística anterior. Este aumento na taxa de incidência teve início no ano anterior em 2013 e considera-

se ainda que a seca e a crise de abastecimento de água enfrentado pelo estado de São Paulo neste período teriam contribuído para esta casuística (BRASIL, 2015).

Em 2016, dos 1.426.005 casos notificados até o mês de agosto, 841.286 casos, ou seja 59% são oriundos da região sudeste. A taxa de incidência de dengue para o Estado de São Paulo em 2015 e 2016 até o mês de agosto, foi respectivamente de 1.603,5/100.000 habitantes e 455,1/100.000 habitantes. A região sudeste é a região onde o maior número de casos graves e com sinais de alarme de dengue é notificado no Brasil, somente em 2016 foram 3.410 casos (BRASIL, 2016a)

A dengue traz consigo uma carga social de difícil mensuração, é considerada grande a demanda por atendimento médico, há o comprometimento laboral e de estudo, além do impacto negativo na qualidade de vida das pessoas e familiares acometidos (SUAYA et al., 2009). Estudos avaliaram que o ônus econômico da dengue é superior ao encontrado em outras doenças virais nas Américas e especificamente o Brasil concentra 40,9% do custo total desta doença em todo o continente americano (SHEPARD et al., 2011) A literatura sinaliza que, com as mudanças climáticas, a dengue deve impor um impacto ainda maior sobre a população, com aumento nas complicações decorrentes da doença e aumento do número de óbitos (SHEFFIELD et al., 2011).

A magnitude dos casos, expressos pela casuística da dengue, o cenário epidemiológico atual envolvendo não somente a dengue, mas também Chikungunya e Zika (RODRIGUEZ-MORALES; VILLAMIL-GOMES; FRANCO-PAREDES, 2016), o risco de dispersão e possibilidade de co-infecção destes agentes infecciosos (PESSOA et al., 2016; VILLAMIL-GOMEZ et al., 2016), associados a fatores como patogenicidade destes agentes infecciosos, alta competência do principal vetor, o *Aedes aegypti*, sua antropofilia e boa adaptação ao ambiente urbano, gera um contexto que poderia ser classificado como *habitats* ideais para o mosquito (DIAS, 2006; LIMA-CAMARA, 2016) e torna sua prevenção uma tarefa de extrema dificuldade para ser atingida com os atuais recursos disponíveis. As formas de controle preconizadas visam eliminar o mosquito nas suas diferentes fases do ciclo biológico, no entanto a efetividade dessas ações tem sido baixa e sem sucesso na contenção da dispersão do vírus da dengue (DIAS, 2006; GUBLER, 2012) e outras arboviroses (HONÓRIO; CAMARA; BRASIL, 2015).

As atividades como busca e identificação de focos de proliferação do vetor faz parte da vigilância entomológica e constitui importante etapa para seu controle e eliminação (BONADIO, 2010). Entende-se por vigilância entomológica, a contínua observação e avaliação dos dados e informações oriundas de características biológicas e ecológicas de vetores em nível

de sua interação com hospedeiros humanos bem como reservatórios não humanos, considerando o contexto de interferência dos fatores ambientais, que permitam o conhecimento e possibilitando a detecção de mudanças, ainda que discreta, no perfil de transmissão de doenças (GOMES; NOBRE; CRUZ, 2012).

A eficácia positiva, porém, parcial da vacina contra dengue retoma, mais uma vez, a importância da manutenção do controle de vetores de maneira simultânea à imunização (FERGUNSON et al., 2016).

Diante da necessidade de implementação das políticas relacionadas ao controle da dengue, desde 2002 o Brasil conta com o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) que por sua vez fundamenta-se em aspectos como: desenvolvimento de campanhas de informação; mobilização das pessoas, de maneira a se criar uma maior responsabilização de cada família na manutenção do ambiente doméstico livre de potenciais criadouros do vetor; fortalecimento da vigilância epidemiológica e entomológica para ampliar a capacidade de predição e de detecção precoce de surtos da doença; melhoria da qualidade do trabalho de campo de combate ao vetor; integração das ações de controle da dengue na atenção primária à saúde, mobilização do Programa de Agente Comunitário de Saúde PACS e da Estratégia de Saúde da Família ESF; utilização dos instrumentos legais que facilitam o trabalho do poder público na eliminação de criadouros em imóveis comerciais, casas abandonadas; atuação multissetorial, por meio do fomento à destinação adequada de resíduos sólidos e à utilização de recipientes seguros para armazenagem de água, e desenvolvimento de instrumentos mais eficazes de acompanhamento e supervisão das ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde, estados e municípios (MAFRA; LEMOS, 2009).

O Programa Nacional de Controle da Dengue surgiu de uma reavaliação por parte do Ministério da saúde acerca do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) em função do insucesso e inviabilidade técnica de erradicação do mosquito no Brasil. O programa foi concentrado no fortalecimento das ações de combate ao vetor e com significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades e ações de prevenção focadas, quase que exclusivamente, nas atividades de combate ao vetor com uso de inseticidas. Desde a reintrodução deste vetor no Brasil em 1976 busca-se seu controle, assim como a eliminação do avanço das doenças em que atua como vetor (BRASIL, 2007).

Além destes instrumentos a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) estimula a adoção de métodos simplificados de amostragem para coleta de formas imaturas do vetor da dengue, o *Aedes aegypti* para permitir facilidade de obtenção de informações entomoepidemiológicas que contribuam para a avaliação de

programas mediante realização de pesquisas periódicas. O método usado no Programa Nacional de Controle da Dengue é o Levantamento Rápido dos Índices de Infestação por *Aedes aegypti* - LIRAA (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011).

O LIRAA apresenta um recurso metodológico de amostragem por conglomerados onde o quarteirão é a unidade primária de amostragem e o imóvel é a unidade secundária. Neste plano amostral, em cada grupo ou estrato de 9 mil a 12 mil imóveis com características semelhantes, são sorteados quarteirões, e nestes quarteirões são sorteados imóveis para visita do agente que identificará e registrará a presença do vetor *Aedes aegypti* (Brasil, 2005). Este recurso possibilita levantar dados que possibilitam a produção de indicadores como: o Índice de Breteau (IB) com capacidade de obter a densidade larvária; o índice de infestação predial (IIP), corresponde ao percentual de habitações com recipientes positivos, ou seja, obtido a partir da razão entre recipientes positivos nos imóveis pesquisados, e o índice de recipientes positivos (IR), significando o valor, em porcentagem, dos criadouros de uma determinada classificação em relação ao total de criadouros identificados (BRASIL, 2013).

A avaliação destes indicadores em conjunto, permite avaliação satisfatória da densidade vetorial e atua como parâmetro para indicação do risco de transmissão de doenças em que o inseto seja vetor, desde sejam adequadamente interpretados (BRASIL, 2005).

A partir de 2015, devido identificação no país, de outras arboviroses transmitida pelo *Aedes aegypti* como Chikungunya e Zika bem como suas consequências, foram implementadas ações de fortalecimento de combate ao vetor e em nível nacional foi instalada a Sala Nacional de Coordenação e Controle nas três esferas de governo, visando o gerenciamento além do monitoramento, a intensificação das ações de mobilização e combate ao mosquito *Aedes aegypti* para o enfrentamento da Dengue, do vírus Chikungunya e o vírus do Zika (BRASIL, 2016a).

Para que os indicadores entomológicos se mantenham baixos (Índice de Infestação Predial, Índice de Breteau, Tipos de Recipientes Positivos, Imóveis Especiais e Pontos Estratégicos) é recomendado a manutenção de ações para diminuir e eliminar criadouros presentes nos imóveis. No período que compreende a janeiro de 2011 a abril de 2016 os principais recipientes positivos para presença do vetor em sua fase aquática, são aqueles considerados “móveis”, ou seja, recipientes que podem atuar como criadouro, mas haveria como alterar esta condição ao deixar de acumular água, como é o caso do prato de vaso de planta, por exemplo. Entre os recipientes considerados passíveis de remoção há predominância dos inservíveis, o lixo. Mesmo após a ampliação das ações contra o *Aedes* para os sábados, entre dezembro de 2015 e maio de 2016, persistiu a necessidade de diminuir o elevado

percentual de imóveis fechados, o que indica que melhores estratégias de acesso ao morador ainda precisam ser discutidas e implementadas (SAMPAIO et al., 2016)

O reconhecimento de que a maioria dos criadouros permanece no ambiente domiciliar, fez com que a sociedade fosse responsabilizada e desta forma ela passou a fazer parte do esforço coletivo para eliminar os criadouros. Isso em contrapartida, tirou foco das questões primordiais como saneamento, água encanada, coleta de resíduos, promoção e prevenção em saúde e cidadania (VALLE, 2016)

Padrões sobre a densidade mínima de *Aedes aegypti* que permite a transmissão de patógenos em que ele atua como vetor tem sido amplamente discutido. Em Quito, no Equador, o Índice de Infestação Predial de 5%, foi o estabelecido para o controle da febre amarela urbana. Em Singapura, a dengue manteve sua ocorrência apesar de Índices de Infestação Predial inferiores a 1%. Isto indica que índices de Infestação Predial podem minimizar o risco de transmissão, no entanto não o exclui (TAUIL, 2002)

Em relação aos pontos estratégicos e imóveis especiais, estes veem mantendo ao longo dos anos, taxas de infestação superiores àqueles identificados nos imóveis residenciais. Neste caso é importante considerar a maior complexidade para realização de ações de controle preconizadas (SAMPAIO, 2016).

As informações geradas pelos estudos entomoepidemiológicos fundamentam as decisões de intervenção em saúde para que sejam coerentes com a realidade local e tenham verdadeiro poder transformador. Nada pode ser feito em vigilância epidemiológica ou mesmo em vigilância entomológica sem a obtenção da informação, é necessário conhecer o que se tem para que a partir daí possa haver planejamento de estratégias coerentes com essa realidade de modo a permitir a execução da ação e obtenção de resultados positivos e de caráter efetivo (PEREIRA, 2008).

Desta forma, o presente estudo se propôs a avaliar aspectos entomológicos, no âmbito da vigilância, no Município de São Paulo no ano de 2013 e 2014.

7.2 METODOLOGIA

O delineamento de estudo que envolve análise dos aspectos entomológicos, no âmbito da vigilância em saúde no ano de 2013, classifica-se como observacional descritivo e foi realizado a partir de dados secundários oriundos da Coordenação de Vigilância em Saúde -

COVISA, órgão subordinado a Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo - Município de São Paulo.

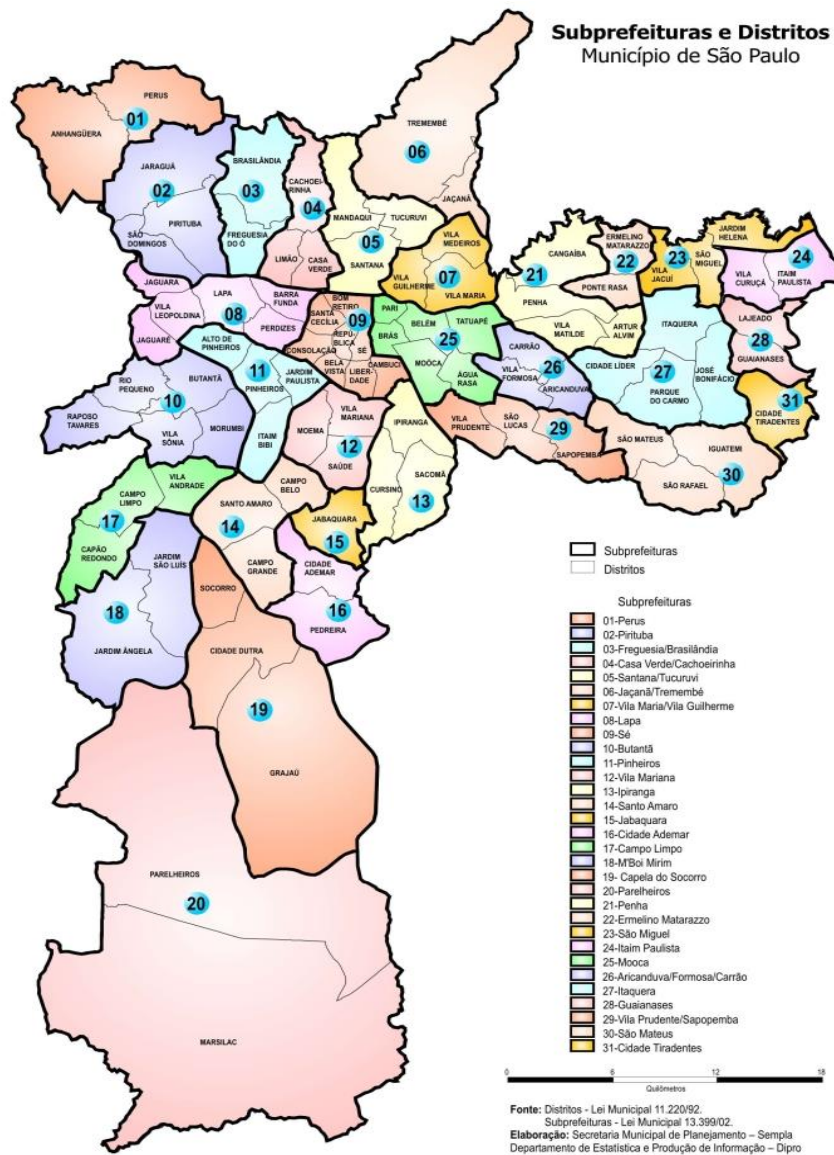
A área de estudo consiste no Município de São Paulo (latitude 23 32'51" e longitude 46 38'10"), a cidade ocupa área de 1.521.110 km², e apresenta densidade demográfica de 7.349.26 hab/km², sua população estimada em 2016 em 12.038.175 habitantes IBGE, 2016). O clima, segundo a classificação de Koeppen é Tropical de altitude, caracterizado por chuvas no verão e seca no inverno.

A unidade de análise para os dados de interesse de estudo consideraram a divisão do referido município em Distritos Administrativos-DA (Figura 2), estabelecida mediante lei 11.220 de 20 de maio de 1992.

Foram obtidos os indicadores entomológicos relacionados aos diferentes distritos administrativos do município. Os diferentes distritos administrativos do município são:

Água Rasa, Alto de Pinheiros, Anhanguera, Aricanduva, Arthur Alvim, Barra Funda, Bela Vista, Belém, Bom Retiro, Brás, Brasilândia, Butantã, Cachoeirinha, Cambuci, Campo Belo, Campo Grande, Campo Limpo, Cangaíba, Capão Redondo, Carrão, Casa Verde, Cidade Ademar, Cidade Dutra, Cidade Líder, Cidade Tiradentes, Consolação, Cursino, Ermelino Matarazzo, Freguesia do Ó, Grajaú, Guaianases, Iguatemi, Ipiranga, Itaim Bibi, Itaim Paulista, Itaquera, Jabaquara, Jaçanã, Jaguará, Jaguaré, Jaraguá, Jardim Ângela, Jardim Helena, Jardim Paulista, Jardim São Luís, José Bonifácio, Lajeado, Lapa, Liberdade, Limão, Mandaqui, Marsilac, Moema, Moóca, Morumbi, Parelheiros, Pari, Parque do Carmo, Pedreira, Penha, Perdizes, Perus, Pinheiros, Pirituba, Ponte Rasa, Raposo Tavares, República, Rio Pequeno, Sacomã, Santa Cecília, Santana, Santo Amaro, São Domingos, São Lucas, São Mateus, São Miguel, São Rafael, Sapopemba, Saúde, Sé, Socorro, Tatuapé, Tremembé, Tucuruvi, Vila Andrade, Vila Curuçá, Vila Formosa, Vila Guilherme, Vila Jacuí, Vila Leopoldina, Vila Maria, Vila Mariana, Vila Matilde, Vila Medeiros, Vila Prudente e Vila Sônia.

Figura 2 - Distritos administrativos de Município de São Paulo conforme lei municipal 11.220/1990



Fonte: Secretaria Municipal de Planejamento (1992)

Foram coletadas às variáveis:

Imóveis positivos, número de imóveis pesquisados, número de recipientes positivos, tipo de recipientes positivos, tipos de recipientes positivos, pontos estratégicos no município, pontos estratégicos visitados, pontos estratégicos positivos, imóveis especiais positivos e imóveis especiais no município e imóveis especiais visitados.

Todas as variáveis coletadas referem-se aos anos de 2013 e 2014, considerando que a pesquisa entomológica é realizada três momentos ao ano (fevereiro, julho e outubro), os resultados obtidos foram correspondentes a estes momentos. Entretanto a não foi possível

resgatar junto à Secretaria de Saúde, os dados envolvendo o Índice por tipos de recipientes positivos segundo distrito administrativo (ITR) de fevereiro/2014.

A existência de um banco de dados contendo estes dados somente é possível em função da execução, por parte do Município de São Paulo, das atividades previstas no Plano Nacional e Estadual de Controle da Dengue e preconizadas pela Superintendência de Controle de endemias (SUCEN) da Secretaria de Estado da Saúde, em que os agentes de campo, visitam diferentes imóveis em todos os distritos administrativos do município identificando, registrando e coletando as formas jovens do *Aedes aegypti* especialmente as larvas para fins de monitoramento entomológico.

Foram obtidos os indicadores:

1. Índice de Infestação predial segundo distrito administrativo (IP)

$$\text{IP} = \frac{\text{Número de imóveis positivos}}{\text{Número de imóveis pesquisados}} \times 100$$

2. Índice de Breteau segundo distrito administrativo (IB),

$$\text{IB} = \frac{\text{Número de recipientes positivos}}{\text{Número de imóveis pesquisados}} \times 100$$

3. Índice por tipos de recipientes positivos segundo distrito administrativo (ITR),

$$\text{ITR} = \frac{\text{Número de recipientes positivos por tipo}}{\text{Número total de recipientes positivos}} \times 100$$

4. Positividade por pontos estratégicos,

$$\text{PEE} = \frac{\text{Número de pontos estratégicos positivos}}{\text{Número de pontos estratégicos pesquisados}} \times 100$$

Os pontos estratégicos são aqueles de maior importância na geração e dispersão do vetor. São eles: depósito de ferro velho e pneus usados, recauchutadoras, oficinas de desmanche de veículos, oficina mecânica, borracharias, postos de gasolina e troca de óleo, cemitérios, estação rodoviária, estação ferroviária, portos, aeroportos, armazéns, silos, depósito de containers, construções, canteiros de obras e obras paradas.

5. Positividade segundo imóveis especiais no Município de São Paulo

$$\text{PIE} = \frac{\text{Número de imóveis especiais positivos}}{\text{Número de imóveis especiais pesquisados}} \times 100$$

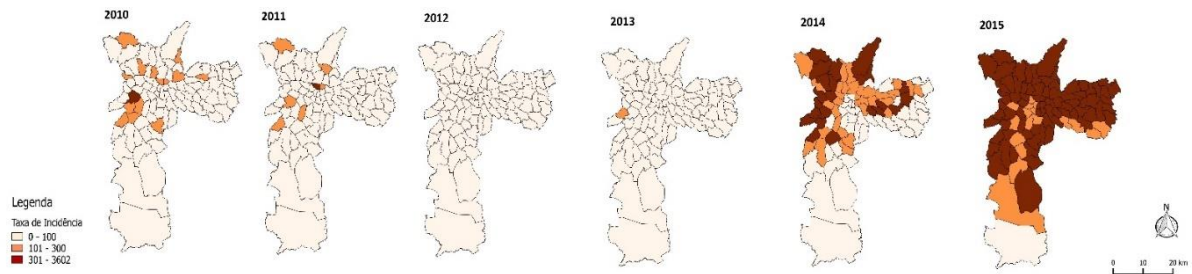
São considerados imóveis especiais, aqueles relevantes na propagação do vírus da dengue, devido alto fluxo e ou permanência de indivíduos. Correspondem a imóveis como serviços de saúde, instituições de ensino dos diferentes níveis, indústrias, penitenciárias, hospitais, serviços de pronto atendimento, ambulatórios, unidades básicas de saúde, asilos, campos de futebol, zoológicos, hotéis, shopping centers, hipermercados, clubes e cidades universitárias, todos selecionados considerando uma avaliação cadastral. A necessidade do cadastro se dá em função das dificuldades para a operacionalização de ações de vigilância e controle vetorial, que nestes locais são mais trabalhosas e complexas. Diante do exposto, a positividade nos imóveis especiais pode ser expressa estabelecendo a relação entre aqueles imóveis em que foi identificado presença do vetor e o total trabalhado.

As análises estatísticas necessárias foram realizadas utilizando-se do *Statistical Analyses Software SAS*. O Intervalo de Confiança considerado foi de 95%. Para a análise dos resultados também foi utilizado o software Quantum GIS (QGIS). O Ministério da Saúde utiliza a classificação de índices de infestação que considera valores inferiores a 1% como satisfatórios. Aqueles cujos resultados estão entre 1 a 3,9% representam situação de alerta, já os resultados superiores a 4% indicam risco de surto de dengue. Para a avaliação proposta neste estudo foi obedecida esta classificação.

7.3 RESULTADOS

Ao abordar a frequência do *Aedes aegypti* no ambiente, faz-se necessário apresentar a casuística da dengue, principal doença em que este vetor atuou, no período do estudo, 2013 a 2014, bem como a contextualização em relação aos anos anteriores e ano subsequente (Figura 3).

Figura 3 - Taxa de incidência de dengue por 100.000 habitantes no Município de São Paulo segundo Distrito Administrativo no período de 2010 a 2015



Fonte: Mundim-Pombo, 2016

No período de 2010 a 2015 chama a atenção a taxa de incidência de dengue em 2012 no município, pois a taxa de incidência obtida foi inferior a 100.000 casos/habitante de maneira homogênea por todo o município.

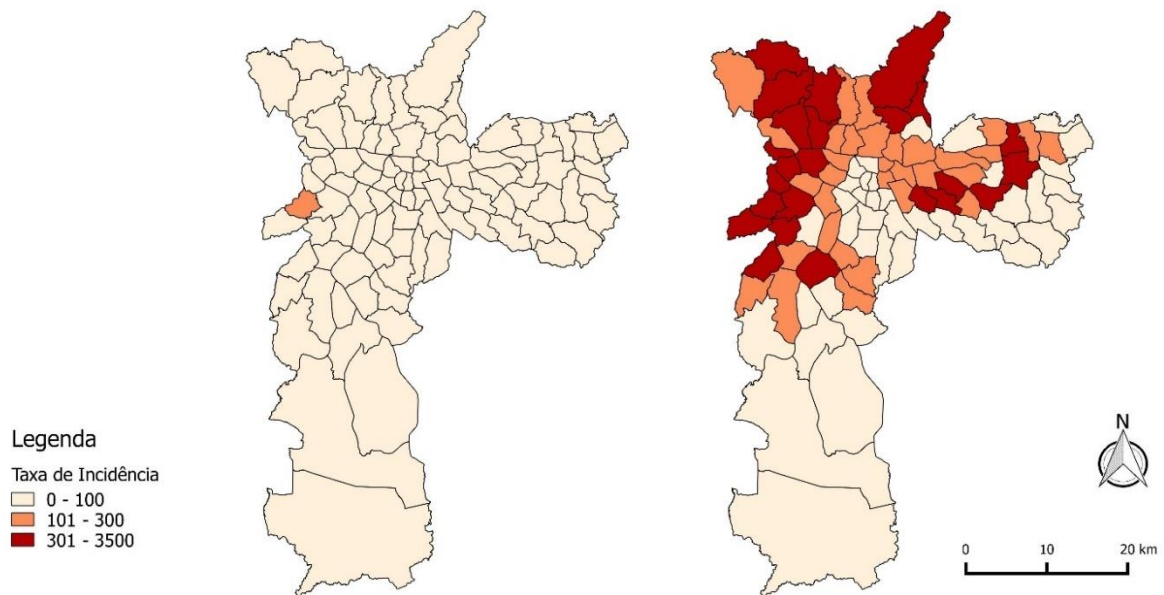
Não foi identificado nenhum distrito administrativo em que houvesse manutenção de casuística elevada em todos os anos da série histórica apresentada, no entanto constatou-se que no ano de 2013 o DA Rio Pequeno, foi o único a apresentar coeficiente de incidência moderada, e no ano seguinte, em 2014 passou para a faixa superior a 300 casos por 100.000 habitantes.

De modo geral a partir do ano de 2014 a zona norte do município apresentou maior frequência de distritos administrativos predominantemente afetados.

Ainda em 2014 os DAs Aricanduva, Ponte Rasa, São Miguel, Vila Curuca, Penha, Vila Matilde, Cachoeirinha, Mandaqui, Limão, Casa Verde, Santana, Vila Guilherme, Vila Maria, Penha, Pari, Belém, Brás, Tatuapé, Mooca, Barra Funda, Perdizes, Alto de Pinheiros, Pinheiros, Itaim Bibi, Vila Andrade, Campo Belo, Capão Redondo, Jardim São Luís, Jabaquara e Cidade Ademar passaram ser considerados como tendo média incidência (100 a 300 casos por 100.000 habitantes). Os DAs Perus, Jaraguá, Pirituba, Brasilândia, Freguesia do Ó, Lapa, Tremembé, Jaçanã, Tucuruvi, Vila Jacuí, Itaquera, Cidade Líder, Vila Carrão, Vila Formosa, Vila Leopoldina, Água Rasa, Rio Pequeno, Butantã, Raposo Tavares, Vila Sonia, Santo Amaro, Jaguaré, Jaguará e Campo Limpo passaram a ser considerados como tendo alta incidência.

Nos anos de interesse para o estudo, 2013 e 2014 (Figura 4) constatou-se que 2013 foi o último ano em que as taxas de incidência estiveram predominantemente inferiores a 100 casos por 100.00 habitantes, e 2014 trata-se do momento em que ocorre aumento expressivo na taxa de incidência de dengue.

Figura 4 - Taxa de Incidência de dengue no Município de São Paulo no período de 2013 e 2014

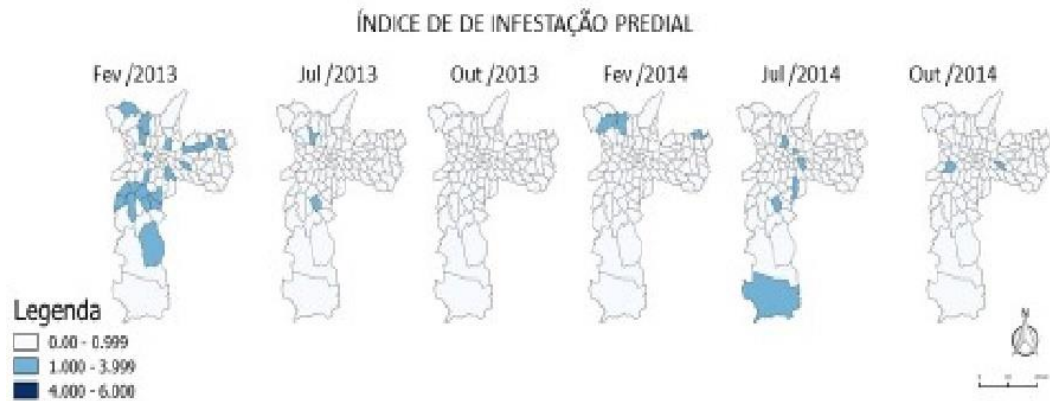


Fonte: Mundim-Pombo, 2016

O aumento de casos de dengue geralmente é acompanhado do aumento da transmissão vetorial, cabe então apresentar a distribuição quanto a presença do vetor no Município, utilizando-se indicadores específicos, o índice de Breteau e Índice de Infestação Predial, para o período de estudo, 2013 e 2014 (Figura 5 e 6).

Considerando que a pesquisa entomológica é realizada a partir do Levantamento Rápido de Índices de Infestação do *Aedes aegypti*–LIRAA, e seu procedimento metodológico consiste na realização de coletas em 3 momentos ao ano (fevereiro, julho e outubro), estas informações são correspondentes a estes 3 momentos em cada ano de estudo.

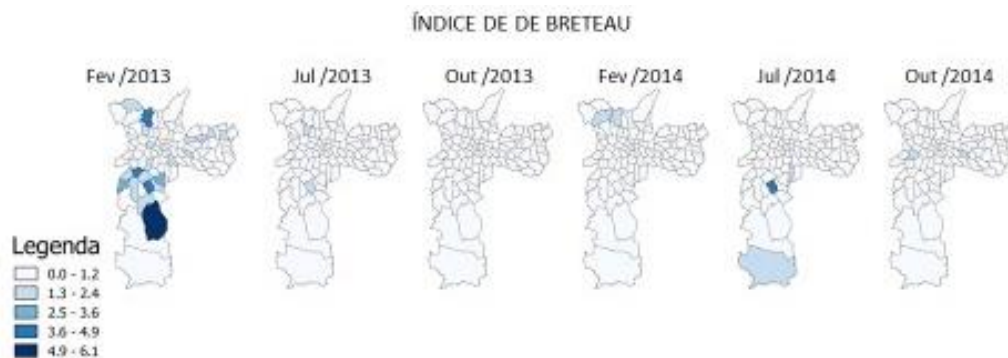
Figura 5 - Índice de Infestação Predial no período de 2013 a 2014 no Município de São Paulo



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

No que se refere à relação entre Índice de Infestação Predial Médio e a Taxa de Incidência de Dengue, os dados não apresentaram significância aos seguintes modelos de regressão: linear (variável bruta, elevada ao quadrado e sua raiz quadrada), Poisson e Poisson inflada por zeros.

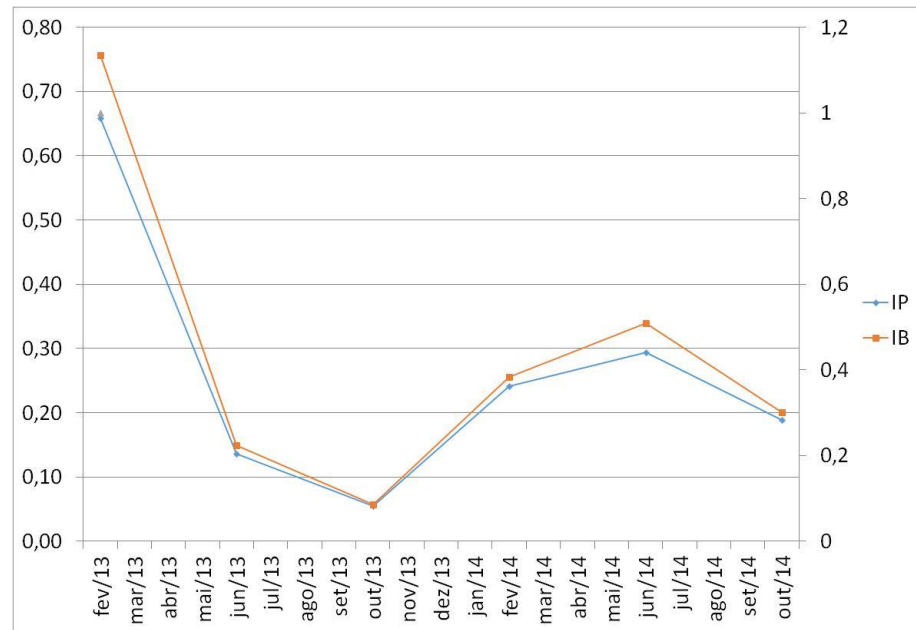
Figura 6 - Índice de Breteau no período de 2013 a 2014 no Município de São Paulo



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

O Índice de “Breteau” e casos de dengue não apresentaram significância aos seguintes modelos de regressão: linear (variável bruta, elevada ao quadrado e sua raiz quadrada), Poisson e Poisson inflada por zeros. No entanto, a relação entre Índice de Infestação Predial médio e Índice Breteau médio considerando a unidade de tempo apresentaram correlação linear significativa e um modelo de regressão linear aplicado, significativo e válido.

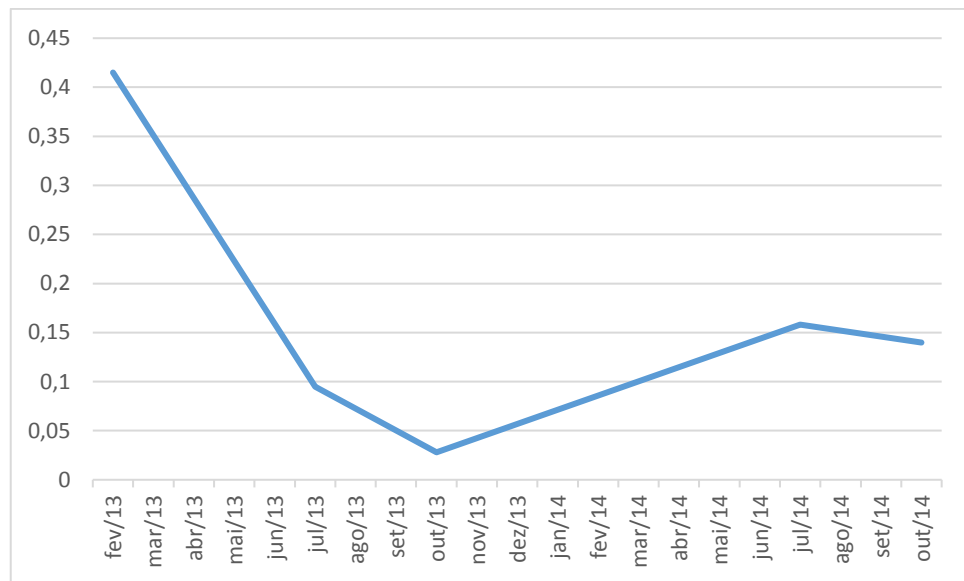
Gráfico 1 - Índice de “Breteau” e Índice de Infestação Predial em São Paulo, 2013 e 2014



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Em relação ao índice por tipos de recipientes positivos (ITR), apesar da ausência dos dados referentes ao levantamento de fevereiro de 2014, pode-se constatar coerência entre o comportamento do Índice de recipientes positivos (Gráfico 2) com o Índice de Infestação Predial e Índice de “Breteau” (Gráfico 1), ou seja, no período em que aumentaram os imóveis positivos, e recipientes positivos nos imóveis pesquisados, constatou-se o aumento da positividade nos diferentes tipos de recipientes pesquisados.

Gráfico 2 - Distribuição do Índice por Recipientes Positivos no período de 2013 a 2014



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Sobre a classificação dos tipos de depósitos, sabe-se que segundo o preconizado (BRASIL, 2013), eles estão classificados em cinco categorias (A, B, C, D e E):

Grupo A- Refere-se ao grupo cujos recipientes tem a função de armazenamento de água. Possuem a subdivisão A1 e A2 justificada pela importância que apresentam. O Grupo A1 representa depósitos elevados, ligados à rede pública e ou sistema de captação mecânica de água para abastecimento e A2 representa depósito posicionado ao nível do solo para armazenamento doméstico, por exemplo tonel, tambor, barril e cisterna.

Grupo B – São os depósitos móveis, por exemplos, vasos ou frascos com água, prato/pingadeira, garrafas, piscina desmontável, recipiente de degelo utilizados em geladeiras, bebedouros, materiais de construção em depósitos como, sanitários estocados, betoneiras, canos, objetos utilizados para fins religiosos entre outros;

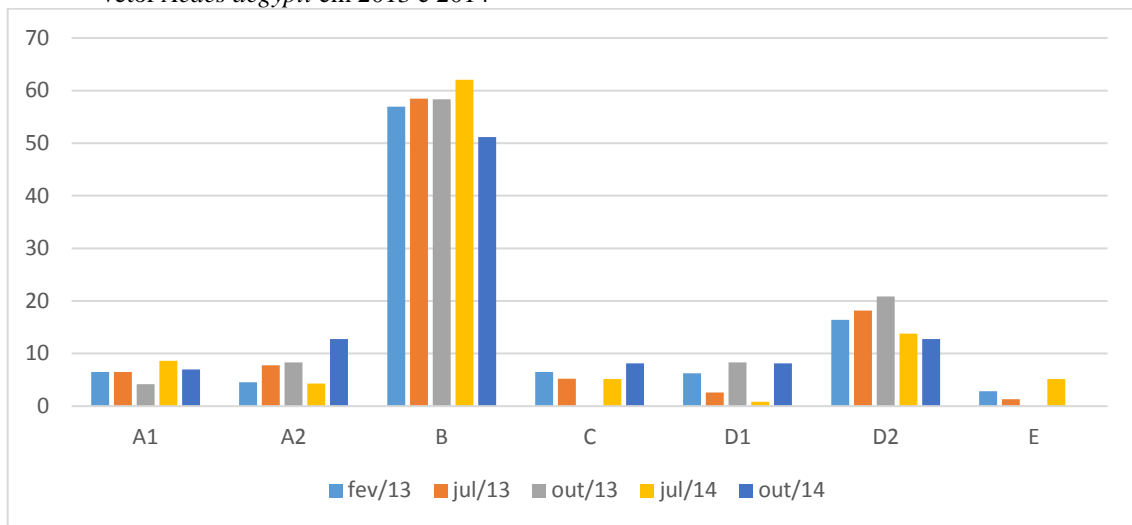
Grupo C – são os depósitos fixos e compreendem as calhas, lajes e toldos, ralos, sanitários em desuso, piscinas não tratadas, floreiras ou vasos em cemitérios, cacos de vidro em muros;

Grupo D – são aqueles passíveis de remoção e subdividem-se em D1 - pneus e outros materiais rodantes como câmaras de ar, manchões; D2 - lixos, como recipientes plásticos, garrafas e latas, sucatas em pátios e ferro velhos e entulhos de construção;

Grupo E – São os depósitos naturais, são exemplos: bromélias, buracos em árvores e em rochas, restos de animais como carapaças.

Constatou-se que o recipiente classificado como Grupo B, foi o principal tipo de recipiente identificado na pesquisa entomológica (Gráfico 3). Em todo o período de estudo, este grupo de recipiente esteve positivo para presença do vetor *Aedes aegypti* em mais que 50% quando comparado aos demais tipos de recipientes. Em seguida, com 20 a 30% dos recipientes identificados como positivo está o lixo, são os recipientes plásticos, garrafas e latas, sucatas em pátios e ferro velhos e entulhos de construção (Gráfico 3)

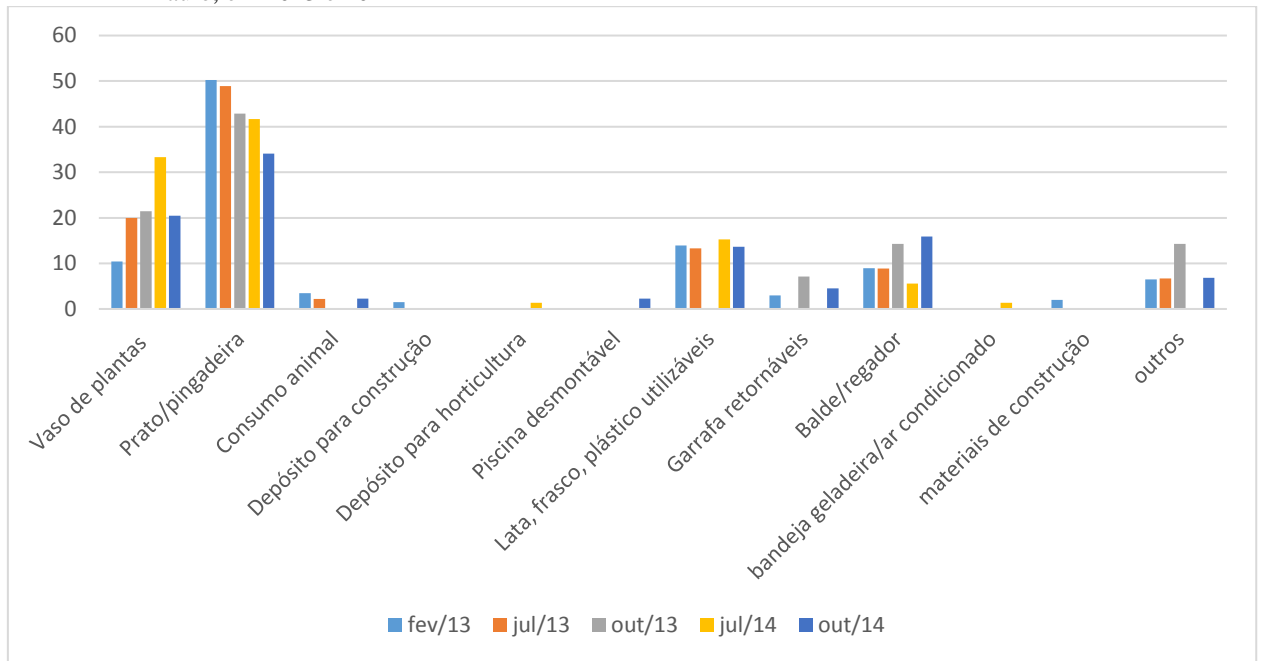
Gráfico 3 - Distribuição, em porcentagem, dos tipos de recipientes por grupos identificados como positivos para o vetor *Aedes aegypti* em 2013 e 2014



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

O principal recipiente positivo foi o prato/pingadeira utilizado para captar a água das plantas ou chuva, contribuindo com 30 a 50% do total de recipientes positivos para *Aedes aegypti* no Município de São Paulo, entre 2013 a 2014. Seguido do vaso de plantas, recipiente com 10 a 30% de participação entre os recipientes positivos.

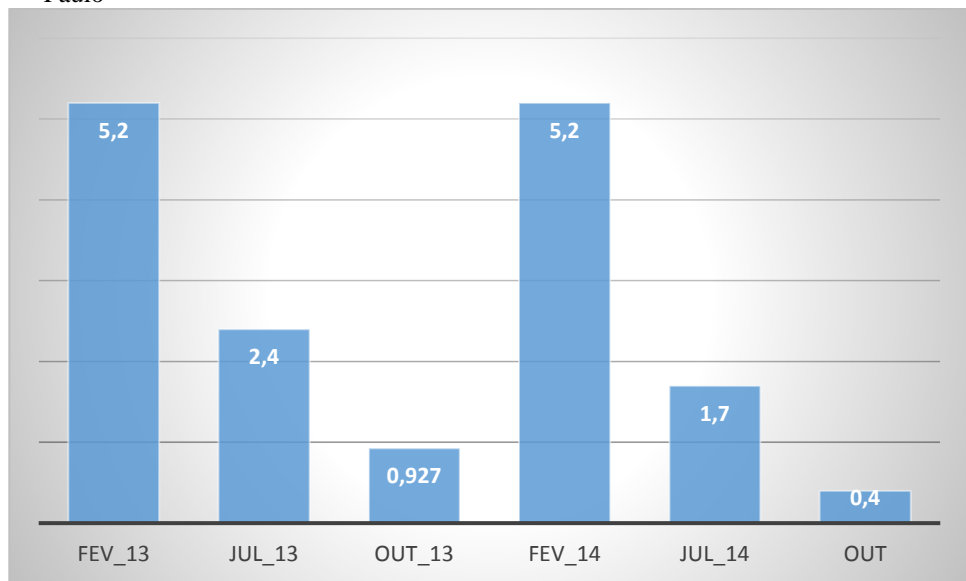
Gráfico 4 - Estratificação dos tipos de recipientes do Grupo B positivo para *Aedes aegypti* no Município de São Paulo, em 2013 e 2014



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Em relação aos Pontos Estratégicos no município, a positividade identificada teve comportamento semelhante nos dois anos de estudo, ou seja, no verão ocorreu aumento no indicador denominado Índice de Positividade por Pontos Estratégicos (PE), e a redução deste indicador ocorreu de forma gradativa nos períodos de avaliação subsequentes (Gráfico 5).

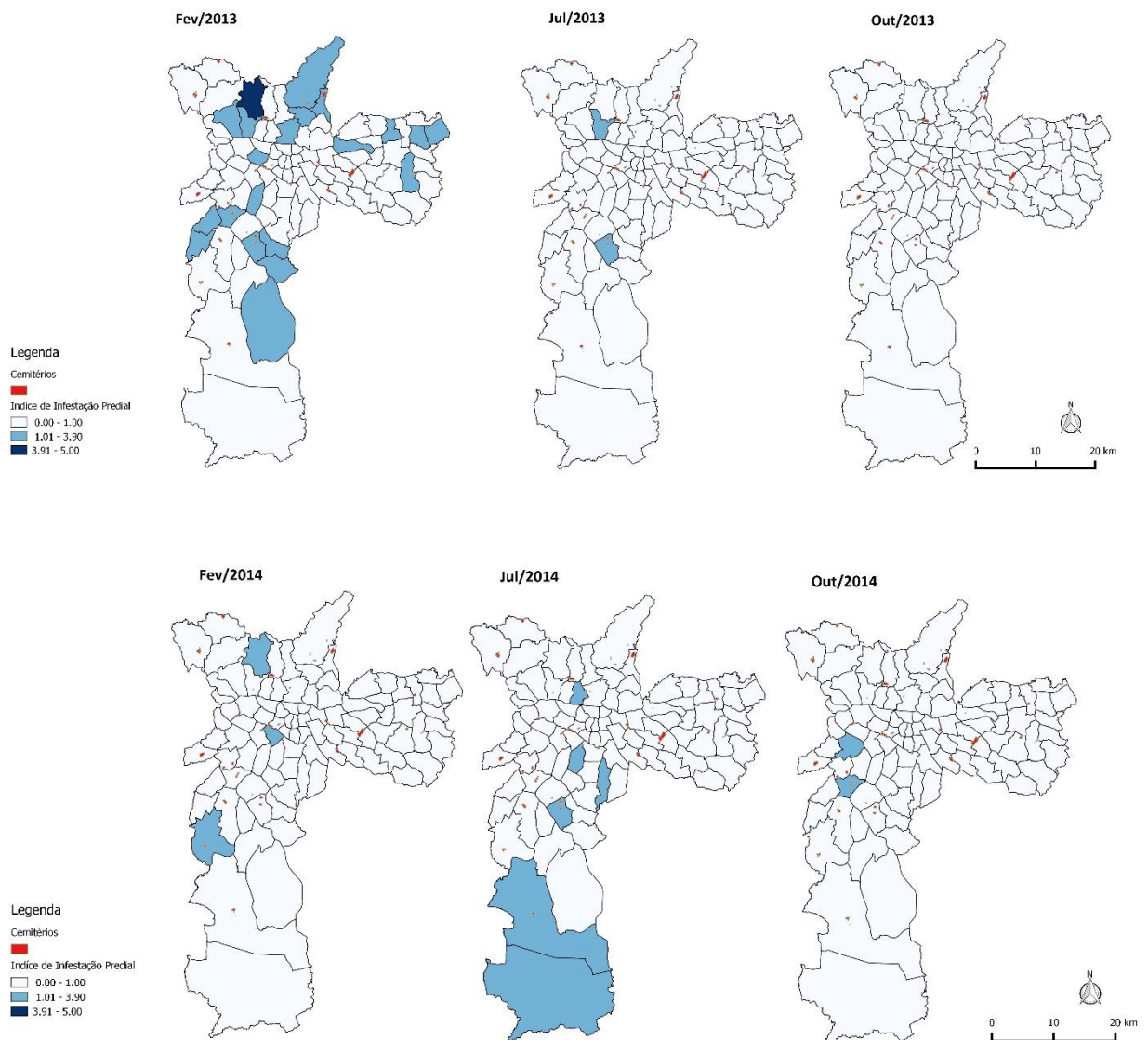
Gráfico 5 - Índice de positividade para *Aedes aegypti* por Pontos Estratégicos no Município de São Paulo



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Entre os pontos estratégicos estão os cemitérios, inseridos neste grupo por apresentarem grandes quantidades de recipientes em condições altamente favoráveis à proliferação do *Aedes aegypti*, bem como possibilidade dispersão deste vetor para as adjacências. No entanto, os cemitérios, enquanto pontos estratégicos, não apresentam forte relação com a taxa de incidência de dengue por distrito administrativo, no período de 2013 e 2014 (Figura 7). Não houve significância aos seguintes modelos de regressão: linear (variável bruta, elevada ao quadrado e sua raiz quadrada). Entretanto, apresentou significância para regressão de Poisson com intercepto de 3,13 e B1 de -0,06.

Figura 7 - Relação entre Índice de Infestação Predial e presença de cemitérios por Distrito Administrativos no Município de São Paulo no período de 2013 a 2014

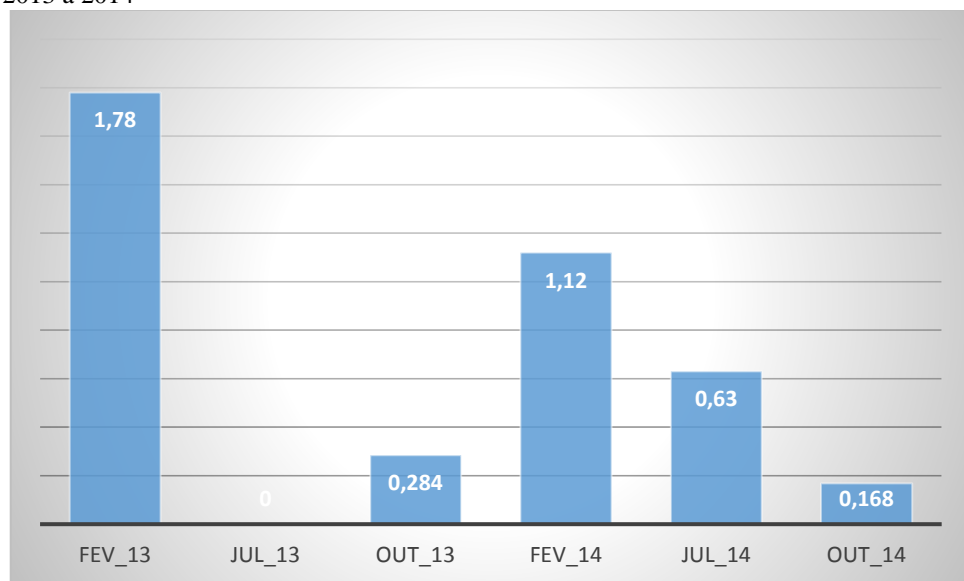


Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Sobre os imóveis especiais, sabe-se que eles se apresentam como aqueles de maior importância na disseminação do vírus da dengue por se tratarem de imóveis em que transitam grande fluxo de pessoas e ou suas construções apresentam complexidades que facilitam a proliferação do vetor. Entre eles estão os serviços de saúde (hospitais, serviços de pronto socorro e unidade básica de saúde), asilos, templos religiosos, hotéis, colônia de férias, quartéis, delegacias de polícia, penitenciárias, centro esportivos ou culturais, campos de futebol, zoológicos, parques, cidade universitária, casas comerciais e indústrias selecionadas mediante avaliação cadastral. Trata-se de um processo dinâmico, pois nem sempre o imóvel classificado como imóvel especial em um ano, o será no ano subsequente.

Entretanto entre os imóveis especiais avaliados entre 2013 e 2014 constatou-se que a maior positividade ocorre no mês de fevereiro (Gráfico 6), ainda durante o verão, período muito chuvoso.

Gráfico 6 - Positividade para *Aedes aegypti* em Imóveis especiais no Município de São Paulo, durante o período de 2013 a 2014

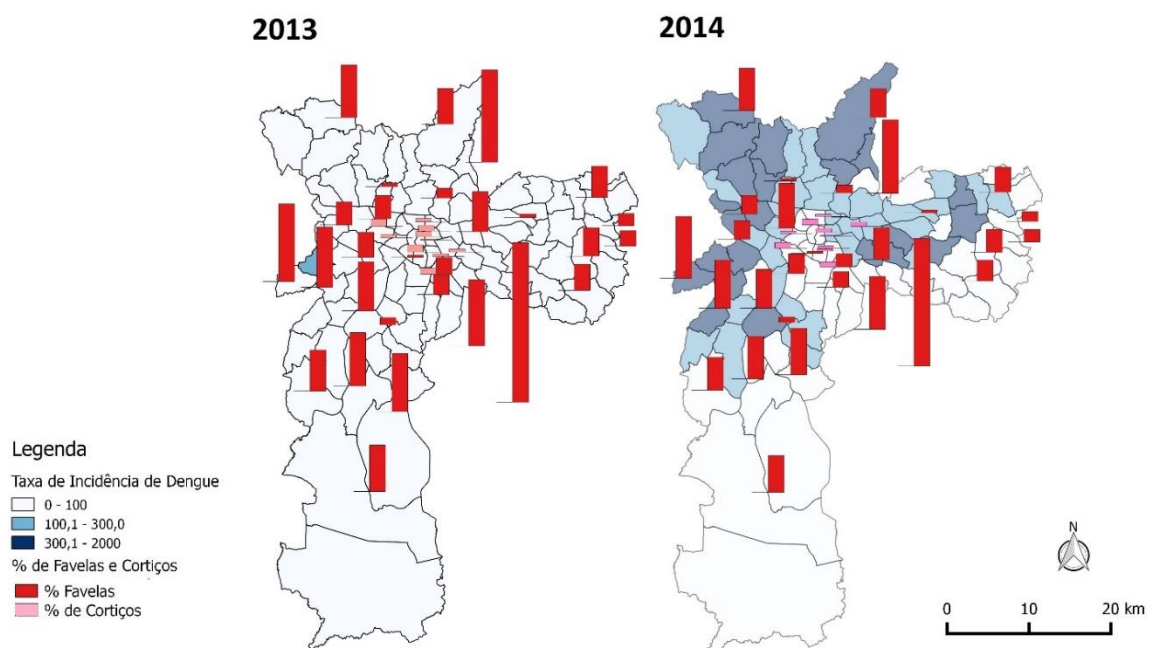


Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Embora favelas e cortiços não sejam considerados imóveis especiais ou pontos estratégicos acredita-se que devido condições precárias em relação ao ambiente e saneamento no caso principalmente de favelas e a alta densidade demográfica no caso de cortiços poderiam favorecer a presença do inseto e casuística de dengue (figura 8), mas os dados relacionando porcentagem de favelas de cada distrito administrativo com a taxa de incidência da dengue não apresentaram significância aos seguintes modelos de regressão: linear (variável bruta, elevada

ao quadrado e sua raiz quadrada). Mesmo o nível de significância identificada para regressão de Poisson foi extremamente fraca. A porcentagem de cortiço por distrito administrativo em relação a taxa de incidência de dengue também não apresentou significância aos seguintes modelos de regressão: linear (variável bruta, elevada ao quadrado e sua raiz quadrada). Entretanto, apresentou significância para regressão de Poisson com intercepto de 3,15 e B1 de -3,60.

Figura 8 - Relação entre taxa de incidência de dengue e áreas de favelas e cortiços por Distritos Administrativos no Município de São Paulo em 2013 e 2014



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

7.4 DISCUSSÃO

A partir de 2014 houve mudança na classificação dos casos de dengue, para dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave, ao invés de febre hemorrágica da dengue (FHD), síndrome do choque da dengue (SCD) e dengue com complicações (DCC), o que comprometeria de certa forma a comparação dos casos graves nos anos anteriores (BRASIL, 2015). Entretanto como o presente estudo apresentou os casos de dengue de modo geral, no sentido de contextualizar o padrão de morbidade dos anos de estudo e estabelecer correlação

com os indicadores entomológicos, portanto esta mudança não representou dificuldade na obtenção e análise dos resultados.

Ainda sobre os casos de dengue, apesar de 2013 ser considerado como o ano em que se obteve um pico na frequência da doença, com 1.470.487 casos notificados no Brasil, tendo na região sudeste a maior concentração de casos (BRASIL, 2014), não foi identificado um aumento expressivo de casos no Município de São Paulo em 2013. Na capital paulista, o Rio Pequeno foi o único Distrito Administrativo com aumento na taxa de incidência para níveis considerados moderados.

Entretanto, ao considerar a afirmação do estudo de Trancoso et al. (2016) em sua abordagem sobre a gravidade quanto a ausência de registro envolvendo o número de doentes e mortos pela dengue, em que os valores reais excederiam as estatísticas oficiais em 7 vezes, teríamos então para o ano de 2013 um aumento expressivo de casos no Município de São Paulo, coerente com a afirmação quanto a existência de um pico epidêmico no país. Um fator importante que poderia estar contribuindo para a subnotificação seria a dificuldade quanto ao diagnóstico pois, segundo Bhatt (2013) casos assintomáticos ou leves podem não estar sendo captados pela vigilância epidemiológica.

Nenhum distrito administrativo manteve casuística elevada em todos os anos da série histórica apresentada, no entanto constatou-se que no ano de 2013 o único distrito administrativo com mudança na classificação de baixa taxa de incidência para moderada taxa de incidência foi o Rio Pequeno, e a partir do ano de 2014 vários distritos administrativos, principalmente da zona norte do município tiveram coeficiente de incidência elevado e moderado. Segundo Chiaravalloti (2012), o investimento em ações preventivas, como treinamento dos profissionais e educação em saúde, geralmente ocorrem de forma descontínua. Desta forma, a presença de indicadores baixos, reduziria também a atenção e investimentos específicos, desencadeando por consequência elevação na casuística chamando novamente a atenção para intensificação das ações em caráter emergencial. O que também poderia ter acontecido no período avaliado. Atualmente houve, por exemplo, segundo Brasil (2016) a implementação das ações contra o vetor *Aedes aegypti*, em função dos novos casos autóctones de Chikungunya e Zika. Acredita-se que não haveria necessidade das ações emergenciais se o rigor nas ações fossem contínuas.

Segundo Brasil (2005) a avaliação dos indicadores entomológicos em conjunto possibilita a avaliação satisfatória da densidade vetorial, desde que sejam adequadamente interpretadas. Neste estudo constatou-se são levantados dados relevantes para avaliação da situação entomológica de todas as áreas do município, no entanto sem uma análise minuciosa

de cada um dos indicadores, a capacidade de impactar de maneira efetiva e positiva a realidade local, seria pequena. Nesta pesquisa chama a atenção os indicadores entomológicos encontrarem-se mais altos nos períodos de menor incidência da dengue, esta questão mereceria um detalhamento maior utilizando-se dados complementares de acordo com a necessidade e avaliação especial por parte dos gestores.

Por outro lado, no que se refere à relação entre Índice de Infestação Predial Médio, Índice de Breteau respectivamente e a Taxa de Incidência de Dengue média, o fato dos dados não apresentarem significância aos diferentes modelos estatísticos pode ter sido por influência da não obtenção dos dados de dengue correspondente a cada período de avaliação entomológica, pois foi utilizada a taxa de incidência média e por isso os indicadores entomológicos foram ajustados da mesma forma.

Segundo Sampaio (2016), os principais recipientes positivos para a presença do vetor *Aedes aegypti* foram os classificados como móveis e o lixo. Neste estudo foi identificado que o principal recipiente positivo no período de 2013 e 2014 também foram os móveis, ou seja, aqueles que como o vaso de planta e o prato/pingadeira podem atuar com criadouro, no entanto deixaria de ter esta condição ao não acumular água. Diante da crise hídrica pelo qual o Estado de São Paulo foi submetido do ano de 2013, esperava-se que os principais criadouros fossem os reservatórios de água não suspensos e não ligados à rede, pertencente ao Grupo A entre os reservatórios trabalhados pelo Programa Nacional de Controle da Dengue, o que expressaria uma forma inadequada de armazenamento de água para uso domiciliar, no entanto não foi o resultado obtido.

Diante do exposto constatou-se neste estudo que os principais criadouros estão nas residências. Valle (2016) afirma que o reconhecimento quanto a maioria dos criadouros permanecer no ambiente domiciliar, fez com que a sociedade fosse responsabilizada e por este motivo passou a fazer parte do esforço coletivo para a eliminação dos criadouros.

Entre os Pontos Estratégicos, no estudo realizado por Mayo (2013), no Município de Mococa, o predomínio de positividade esteve relacionado aos estabelecimentos como borracharias, depósito de pneus e material de reciclagem, o cemitério foi o sétimo principal Ponto Estratégico naquele município. Apesar dos cemitérios, inseridos neste grupo por apresentarem grandes quantidades de recipientes em condições altamente favoráveis à proliferação do *Aedes aegypti*, bem como possibilidade dispersão deste vetor para as adjacências, os cemitérios, avaliados neste estudo enquanto pontos estratégicos, não apresentam forte relação com a taxa de incidência de dengue por distrito administrativo, no período de 2013 e 2014. Sobre os demais pontos estratégicos, sabe-se que um estabelecimento com esta

classificação em um momento, pode não ter esta mesma classificação no período subsequente, trata-se de um processo dinâmico, pois nem sempre o imóvel classificado como imóvel especial em um ano, o será no ano subsequente, isto dificilmente ocorreria em relação aos cemitérios, no entanto este fator dificultou a obtenção do shape file dos demais PE para que fosse possível sua representação espacial.

Conclui-se que no âmbito da atuação para controle do vetor é fundamental o acompanhamento das atividades de vigilância entomológica e seus resultados. As políticas públicas somente atingem sucesso quando o contexto é monitorado de maneira contínua considerado para planejamento, outra questão a ser considerada é a atuação integrada entre as diferentes áreas da vigilância em saúde, o que seria de extrema importância.

REFERÊNCIAS

- ALFARO-MURILLO, J. A.; PARPIA, A. S.; FITZPATRICK, M. C.; TAMAGNAN, J. A.; MEDLOCK, J.; NDEFFO-MBAH, M. L.; FISH, D.; ÁVILA-AGÜERO, M. L.; MARÍN, R.; KO, A. I.; GALVANI, A. P. A Cost-effectiveness tool for informing policies on zika virus control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004743, 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004743>>. Acesso em: 14 outubro 2016.
- AMARAL, R. J. V.; PETETSKI, M. D. Interação patógeno-vetor: dengue. In: INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: INCTEM, 2012.
- ARAÚJO, H. R. C. **Ultra estrutura de hemócitos de *Aedes aegypti***. 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado em ciências) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2009.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, Chikungunya e Zika. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 33, p. 1-8, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde, relatório técnico n.01/2016 CGPNI/DEVIT/SVS/MS. Critérios para orientar o processo de decisão para introdução da vacina contra dengue no PNI. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/05/relatorio-01-criterios-orientar-decisao-vacina-dengue.pdf>>. Acesso em 9 out. 2016.
- BRASIL. Portaria n. 204, de 17 de fevereiro de 2016. Notificação compulsória da ZIKA. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 fev.2016. Seção 1, pág. 23.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue até a semana epidemiológica e febre de Chikungunya até a Semana Epidemiológica 20, 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 15, p. 1-7, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **O mosquito da dengue pode matar: e é ainda mais perigoso para gestantes; proteja-se**. Disponível em: <http://www.crianca.mppr.mp.br/arquivos/File/publi/saude/microcefalia_ministerio_da_saude_2015.pdf>. Acesso em: 21 out. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue até a semana epidemiológica 41 e febre de Chikungunya até a semana epidemiológica 42 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, n. 26, p. 1-7, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Preparação e resposta à introdução do o vírus Chikungunya no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 100 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: manual de enfermagem**. 2. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue: situação epidemiológica. **Boletim Epidemiológico**, v. 43, n. 1, p. 11-15, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico, adulto e criança**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe epidemiológico da dengue: análise de situação e tendências**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em saúde: dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e tuberculose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n. 21)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil:– LIRAA: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e predial**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Plano nacional de controle da dengue**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

DENGUE instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 3. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde; Fundação Nacional de Saúde, 2001. 84 p.

CARDOSO, C. W.; PAPLOSKI, I. A. D.; KIKUTI, M.; RODRIGUES, M. S.; SILVA, M. M. O.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I.; REIS, M. G.; RIBEIRO, S. R. Outbreak of exanthematous illness associated with zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2274-2276, 2015.

CÂMARA, F. P.; GOMES, A. F.; SANTOS, G. T.; CÂMARA, D. C. P. Clima e epidemias de dengue no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 137-140, 2009.

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

CHARREL, R. N.; GOLFART, L.; GALLIAN, P.; LAMBALLERIE, X. Globalization of chikungunya: 10 years to invade the world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. 662-663, 2014.

DIAS, J. P. **Avaliação da efetividade do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*. Brasil, 1996-2002**. Salvador, 2006. 79p. Tese (Doutorado) – Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2006.

FERGNSON, M. N.; BARRAQUER, I. R.; DORIGATTI, I.; ROMERO, L. M.; LAYDON, D. J.; CUMMINGS, D. A. T. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. **Science**, v. 353, n. 6303. p. 1033-1036. 2016.

GOMES, A. F.; NOBRE, A. A.; CRUZ, G. O. Temporal analysis of the relationship between dengue and meteorological variables in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 2001 -2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 11, p. 2189-2197, 2012.

GUAGLIARDO, S. A.; MORRISON, A. C.; BARBOZA, J. L.; REQUENA, E.; ASTETE, H.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G.; KITRON, U. River boats contribute to the regional spread of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Peruvian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003648, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003648>>. Acesso em: 04 fev. 2016.

GUBLER, D. J. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 3-11, 2011. Supplement.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika virus spreads to new areas - region of the Americas, May 2015-January 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 55-8, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820163>>. Acesso em: 4 set. 2016.

LIMA-CAMARA, Tamara Nunes. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102016000100602&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 21 out. 2016.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. F.M. Zika virus in Brasil and the danger o infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 4-10, 2015.

MAYO, R. C.; OLIVEIRA, M. A. D. P.; COSTA, M. A. F.; ALVES, M. J. C. P.; LEITE, O. F.; RANGEL, O.; SOUZA, S. S. A. L.; ANDRADE, V. R.; OLIVEIRA, V. L. M. Efetividade das ações de vigilância e controle do *Aedes aegypti* nos pontos estratégicos do município de Mococa, SP -2011. **BEPA Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 10, n. 109, jan. 2013. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-42722013000100001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 14 set. 2016.

MAFRA, A. A.; LEMOS, F. L. **Linha de atenção à saúde: dengue**. Belo Horizonte: Governo de Estado de Minas Gerais, 2009.

NDEFFO-MBAH, M. L.; DURHAM, D. P.; A. SKRIP, L.; NSOESIE, E. O.; John S.; BROWNSTEIN, D. F.; GALVANI A. P. Evaluating the effectiveness of localized control strategies to curtail chikungunya. **Scientific Reports**, v. 6, n. 23997, p. 1-6, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep23997>>. Acesso em 21 out. 2016.

PEREIRA, M.; SUZUKI, A.; BISORD, I.; BARLETA, C.; FERREIRA, I. T. R. N.; FRÓES, M. H.; MAEDA, A. Y.; CRUZ, M. G. B.; MARGARIDO, S. A.; SECCO, R. H.; GOMES, M. A.; WANDERLEY, D. M. V. Dengue no Estado de São Paulo: situação epidemiológica e ações desenvolvidas em 2013. **BEPA Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 10, n. 119, p.3-14, 2013.

PINHEIRO V. C. S.; TADEI P, W. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 245-250, 2002.

PINTO JUNIOR, V. L. Dengue e Chikungunya: coexistência possível no Brasil. **Revista de Medicina e Saúde**, v. 3, n. 1, p. 2-3, 2014.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; VILLAMIL-GOMEZ, W. E.; FRANCO-PAREDES, C. The arbovial burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 3, p. 177-179, 2016.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). Institute Incorporation. **SAS user's guide: statistics**. 8. ed. Cary: SAS, 2001.

SANTOS, S. S.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SAMPAIO, S. M. P.; BARBOSA, G. L.; FERREIRA, I. T. R. N.; PEREIRA, M.; WANDERLEY, D. M. V.; FONSECA-JUNIOR, D. P. Todos juntos contra o *Aedes aegypti*: o desafio do controle vetorial. **BEPA Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 13, n. 149, p. 9-14, 2016.

SÃO PAULO. (Município). Lei municipal n.11.220, de 20 de maio de 1992. Institui a divisão geográfica da área do município em distritos. **Diário Oficial do Município de São Paulo**, São Paulo, v. 37, n. 94, p.2, 21 mai. 1992.

SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; SAYAN, G. H., Economic impact of dengue illness in the America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200-207, 2011.

SHEFFIELD, P. E.; LANDRIGAN P. J. Global climate change and children's health: Threats and strategies for prevention. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, p. 291-8, 2011.

SUAYA, J. A.; SHEPARD, D. S.; SIQUEIRA, J. B.; MARTELLI, C. T.; LUM, L. C.; TAN, L. H.; KONGSIN, S.; JAMTON, S.; GARRIDO, F.; MONTOYA, R.; ARMIEN, B.; HUY, R.; CASTILLO, L.; CARAM, M.; SAH, B. K.; SUGHAYYAR, R.; TYO, K. R.; HALSTEAD, S. B. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 5, p. 846-55. 2009.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 419-422, jun. 2016.

VALLE, D. Sem Bala Mágica: Cidadania e participação social no controle do *Aedes aegypti*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 3, p. 629-632, 2016.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: WHO, 2009.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em: 07 set. 2016.

8 CAPÍTULO II: MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DE OVOS DE *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae)

RESUMO

Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) apresenta grande relevância em saúde pública em nível mundial devido sua atuação como vetor de arboviroses, o que torna fundamental o maior conhecimento sobre o mosquito. Diante do exposto esta pesquisa se propõe analisar os aspectos morfológicos e morfométricos de ovos de *Aedes aegypti* em duas populações. Foram utilizados ovos provenientes do insetário do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (n=46) e oriundos do insetário da Universidade Estadual do Maranhão (n=37). As imagens foram obtidas por Microscopia eletrônica de Varredura-MEV e analisadas para avaliação do padrão morfológico e mensuração acerca do comprimento, largura, razão comprimento/largura (índice) e diâmetro da micrópila. Constatou-se diferenças significantes entre as duas populações de ovos para cada um dos atributos morfométricos avaliados. O que reforça a indicação de que a espécie deverá ser alvo de investigação com o uso de outras ferramentas da taxonomia e sistemática, pois poderia estar havendo um processo de microevolução deste inseto, uma vez que submetido à condições ambientais distintas (nível de poluição, qualidade dos poluentes no ar, qualidade da água, temperatura), seria possível ocorrer um processo evolutivo com capacidade para interferir na sua capacidade vetora e consequentemente na epidemiologia de doenças transmitidas pelo mosquito.

Palavras chave: *Aedes aegypti*. Culicidae. Córion. Microscopia eletrônica de varredura. Ovos de insetos e ultraestrutura.

8.1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* apresenta grande importância em saúde pública, em nível mundial, em função, principalmente, do seu envolvimento na transmissão de arboviroses (*Arthropod-borne-viruses*) como a dengue (WHO, 2009), Chikungunya (CHARREL ET AL, 2014) e Zika (MARCONDES; XIMENES, 2015; FAUCI; MORENS, 2016), este último, confirmado no Brasil pela primeira vez em maio de 2015 (BRASIL, 2015).

O cenário epidemiológico envolvendo a Dengue, Chikungunya e Zika é caracterizado pela circulação simultânea de seus agentes etiológicos em várias localidades (RODRIGUEZ-MORALES; VILLAMIL-GOMES; FRANCO-PAREDES, 2016), envolvendo o risco de dispersão além da possibilidade de co-infecção (PESSOA et al., 2016; RODRIGUEZ-MORALES; VILLAMIL-GOMES; FRANCO-PAREDES, 2016), o que potencializa a relevância deste vetor (BRASIL, 2015).

Diante magnitude dos casos, expressos pela casuística destas doenças e fatores como patogenicidade dos agentes infecciosos, alta competência do seu principal vetor, o *Aedes aegypti*, sua antropofilia e boa adaptação ao ambiente urbano, gera um contexto que poderia ser classificado como favorável ao mosquito (LIMA-CAMARA, 2016) e torna a prevenção uma tarefa de extrema dificuldade a ser atingida com os atuais recursos disponíveis (BRASIL, 2015).

A questão da inexistência de vacina com alta efetividade para a dengue (FERGUNSON et al., 2016) e a inexistência de vacina disponível para o controle de infecção por CHKV (MDEFFO-MBAH et al., 2016) e por ZIKV (LAROCCA et al., 2016; SAXENA et al., 2016), torna evidente a necessidade de manutenção do controle da doença voltada para o vetor e importância da integração de uma vigilância entomológica e epidemiológica (BRASIL, 2015; LIMA-CAMARA, 2016; MDEFFO-MBAH et al., 2016).

Entre as atribuições da vigilância entomológica estão a busca e identificação de focos de proliferação do vetor, onde são encontradas as fases jovens ou imaturas do *Aedes aegypti*, fase que recebe ênfase de atenção na busca de eliminar o mosquito (BRASIL, 2013).

Além da necessidade de localizar o inseto vetor e identificar o seu criadouro, torna-se relevante obter maiores conhecimentos acerca das características e fragilidades inerentes ao inseto nas diferentes fases do seu ciclo biológico. O *Aedes aegypti* é um inseto holometábolo, ou seja, apresenta desenvolvimento completo, pois seu ciclo biológico envolve as fases de ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto (FORATTINI, 2002).

Em relação aos ovos, objeto de atenção neste estudo, sabe-se que apresentam especial importância, pois são resistentes à dessecação, podendo permanecer viáveis por mais de um ano (FORATTINI, 2002; BRASIL, 2013), este fator tem-se apresentado como um dos principais obstáculos para o controle do *Aedes aegypti* (FARNESI et al., 2015).

A estrutura de revestimento externo do ovo é denominada córion tem além de função protetora, a função de permitir trocas gasosas e minimiza a perda de água. O córion é constituído por camadas distintas: o endocórion e exocórion (CLEMENTS, 1992). O exocórion, geralmente apresenta ornamentações que possibilitam identificação da espécie. Trata-se de um excelente

parâmetro de comparação entre espécies, pois tem a capacidade de revelar significativas diferenças (LINLEY, 1989; SANTOS-MALLET et al., 2010; SUMAN et al., 2011).

Os ovos têm se prestado a mensurações, objetivando serem utilizados como caracteres taxonômicos. Desta forma, utiliza-se também calcular o índice do ovo (l/W ratio) estabelecendo a razão entre comprimento e largura. O comprimento é medido pela distância entre as duas extremidades, enquanto a largura corresponde ao valor máximo perpendicular ao comprimento (FORATTINI, 2002).

Em estudo desenvolvido na Flórida, foi descrito a morfologia e parâmetros morfométricos em relação ao *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* e *Aedes bahamensis* e constatou-se que a avaliação aprofundada de grupos de diferentes ovos é importante para esclarecer as diferenças ultraestruturais (LINLEY, 1989).

Foram estabelecidas comparação entre os aspectos morfológicos e morfométricos, a partir da técnica de microscopia eletrônica de varredura, entre ovos de diferentes espécies do gênero *Aedes* originários de Gwalior, Índia. O autor demonstrou que além do *Aedes aegypti*, outros culicídeos do mesmo gênero, apresentam aspectos semelhantes no que se refere a características das células do exocóron (SUMAN et al., 2011).

No estudo realizado com objetivo de avaliar os aspectos da morfologia e morfometria entre ovos de *Aedes aegypti* e *Aedes notoscriptus* utilizando-se da microscopia eletrônica de varredura foi identificado alto grau de variação entre estas espécies (FAULL; WILLIAMS, 2016).

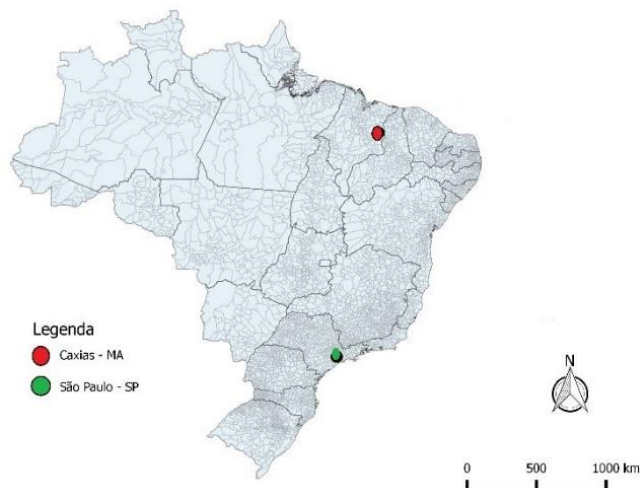
Ainda sobre o exocóron, sua análise utilizando-se da microscopia eletrônica de varredura, tem sido aplicada de maneira cada vez mais frequente, em várias ordens de insetos. Na ordem Diptera, ao qual pertence o *Aedes aegypti*, este aspecto foi estudado por diversos autores (HORSEFALL et al., 1970; OLSON; MEOLA, 1976; SALLUM; FLORES, 2004; PACHECO, 2012). A descrição morfológica dos ovos utilizando esta técnica tem possibilitado a caracterização ultraestrutural da superfície dos ovos de culicídeos de interesse médico além de permitir identificar caracteres de potencial uso taxonômico e filogenético (FORATTINI, 2002; REINERT, 2005). Os insetos, principalmente os considerados de importância médica, quando submetidos a várias estratégias para seu controle associados a mudanças na paisagem, pode apresentar variação fenotípica e passa a ser fonte de muitas perguntas epidemiológicas e taxonômicas, daí uma das justificativas para o seu estudo. Atualmente discute-se amplamente o significado evolutivo de assimilação genética e epigenética. Achados morfométricos podem, portanto, fornecer as informações necessárias, visando mapeamento preliminar apontando para áreas onde se poderia investir na maquinária molecular (DUJARDIN, 2008).

O *Aedes aegypti* tem sido objeto de estudo no mundo todo e levanta-se a hipótese de exista a possibilidade de que populações diferentes desta espécie apresentem algumas características distintas. Esta variabilidade fenotípica poderia ao longo de tempo, ter o poder de influenciar na capacidade vetora do inseto. Diante do exposto, o presente estudo se propõe a identificar os aspectos morfológicos dos ovos de *Aedes aegypti* e estabelecer comparações morfométricas entre diferentes populações deste culicídeo.

8.2 MATERIAL E MÉTODO

Os ovos utilizados neste estudo foram oriundos de duas populações distintas de *A. Aegypti*, sendo 46 ovos disponibilizados pelo insetário mantido pelo Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, USP - Campus Capital, coletados durante o período de novembro/2014 a fevereiro/2015 e 37 ovos de *Aedes aegypti* com procedência do insetário da Universidade do Estado do Maranhão UEMA - Campus Caxias (Figura 9) e coletados durante o mês de maio de 2014.

Figura 9- Localização dos municípios brasileiros onde foram coletados os ovos de *Aedes Aegypti*



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Os ovos foram selecionados para obtenção de imagens e análise morfométrica utilizando microscópio eletrônico de varredura MEV AL FEI Quanta 250 no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. A metodologia utilizada para este objetivo foi: primeiramente o material biológico foi fixado em solução Karnovsky modificado (glutaraldeído 5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2), seguida de lavagem em tampão Cacodilato de sódio, pH 7,2 e fixação posterior em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M. Após realização de nova série de lavagem e controle da limpeza, os ovos foram desidratados em série crescente de etanol até o etanol absoluto (50%, 75%, 90% e 100%). Após submetidos ao ponto crítico, procedeu-se a montagem do material, realizada sobre Stubs utilizando-se fita adesiva dupla face de carbono, na sequência realizou-se a cobertura com banho de ouro, usando o sistema de *sputtering* e o material biológico foi avaliado ao MEV.

As mensurações foram realizadas a partir das imagens obtidas e foram elas:

- Comprimento: distância entre a micrópila e a extremidade oposta,
- Largura: maior distância perpendicular ao comprimento,
- Índice do ovo: razão entre comprimento/largura,
- Diâmetro do disco da micrópila.

As medidas foram obtidas diretamente durante a captura das imagens de MEV e então submetidas à análises de tendência central (média), medidas de dispersão (desvio padrão, valor máximo e valor mínimo). Foi realizada análise de variância (ANOVA) e em seguida teste de Turkey com utilização Graph Pad Prism versão 6.01. Foi considerado intervalo de confiança de 95%. A terminologia adotada e considerada neste estudo para descrição dos ovos foi proposta por Harbach & Knight (1978).

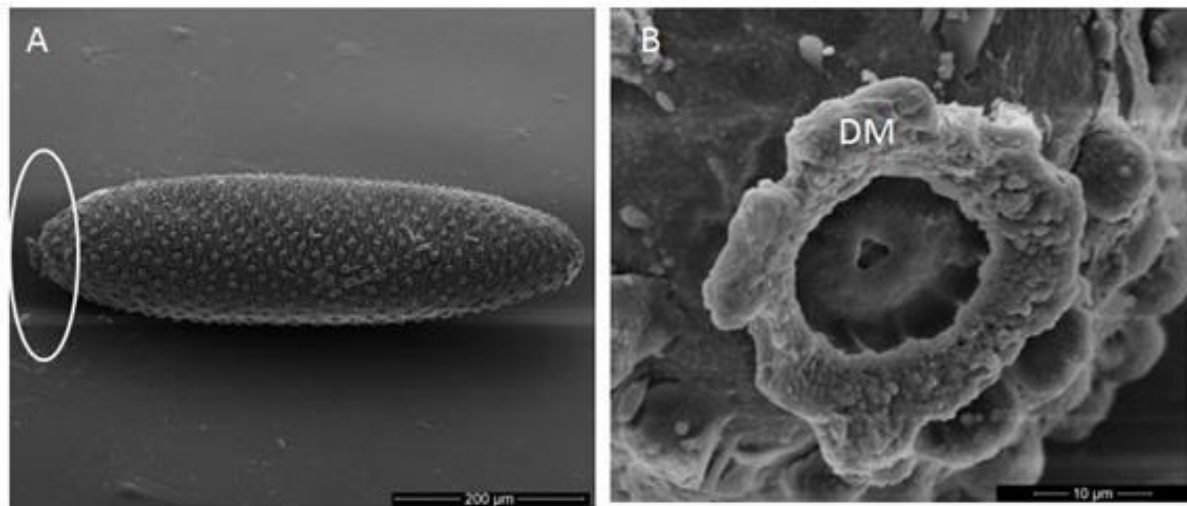
8.3 RESULTADOS

Os ovos de *Aedes aegypti* se apresentam com coloração esbranquiçada no momento da ovoposição que rapidamente passa a ser negra. Foram identificadas características como aspecto brilhante, extremidades afiladas, simetria bilateral, além da superfície achatada oposta a uma superfície convexa. Já as extremidades são caracterizadas por polos, o polo anterior, onde

se localiza todo o aparato micropilar (disco/coroa da micrópila, setores do disco da micrópila e micrópila) e é levemente proeminente quando comparado ao polo oposto. O aparelho micropilar mantém formato de círculo proeminente e contínuo (Figura 10A e 1B). Enquanto o polo posterior, apresenta-se mais afilado em relação ao lado oposto (Figura 10 A e 11 A).

Há grande capacidade dos ovos em se aderirem firmemente à diversos substratos. Esta adesividade, bem como o tamanho reduzido dos ovos foram fatores que dificultaram a manipulação e processamento deste material biológico, no entanto não se trata de um fator limitante para a realização dos procedimentos.

Figura 10 - Ovo de *Aedes aegypti*



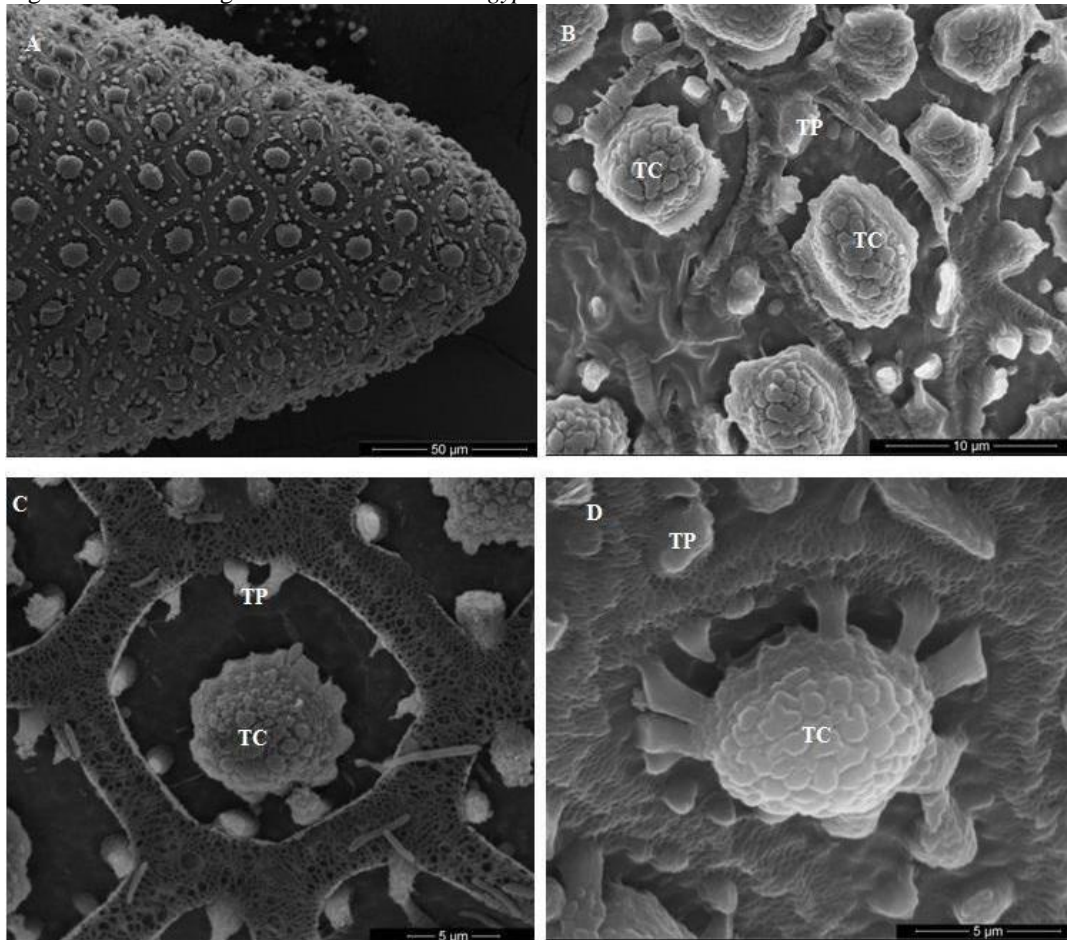
Fonte: Mundim-Pombo, (2016)

Legenda. (A) Ovo *Aedes aegypti* em posicionamento anteroposterior com destaque para a extremidade anterior, onde observa-se o disco micropilar. (B) Disco micropilar (DM) e ao centro a micropila (poro trilobulado ao centro do disco da micrópila), orifício por onde penetra o espermatozóide para fecundação do ovócito.

No revestimento externo dos ovos identificou-se regularidade no que se refere ao aspecto de distribuição e formato de suas células, a maioria delas mantém forma hexagonal (Figuras 11 D e E).

Na região central das células coriônicas, são identificados tubérculos de maior diâmetro. Os tubérculos estão simetricamente dispostos, existem pequenos tubérculos periféricos dispostos, de maneira organizada, no entorno de tubérculos centrais maiores (Figura 11B, 11C e 11D). Ambos se apresentam de forma proeminente no exocórrion, dando então o aspecto de alto relevo ou textura.

Figura 11 - Morfologia dos ovos de *Aedes aegypti*



Fonte: Mundim-Pombo, (2016)

Legenda. (A) Extremidade posterior do ovo evidencia sua ornamentação, denominada rede exocoriônica. Apresentam-se de forma proeminente na superfície, dando o aspecto de alto relevo ou textura.; (B) Tubérculo Central (TC) apresenta maior dimensão e está circundado por Tuberculos Periféricos menores (TP); Na rede exocoriônica (C), observa-se a disposição do Tubérculo Periféricos (TP) em relação ao Tubérculo Central (TC); e (D) tubérculo central (TC)

No âmbito dos atributos relacionados à dimensão linear da população de ovos procedente do Município de São Paulo observou-se que a medida referente ao comprimento foi $581.45 \pm 39.73 \mu\text{m}$ e a largura de 175.36 ± 11.59 . Já o índice do ovo (razão comprimento/largura) foi de $3.32 \pm 0.26 \mu\text{m}$. No que se refere à medida do diâmetro do disco da micrópila (DM) dos ovos avaliados, este se manteve em $18.75 \pm 1.92 \mu\text{m}$. Sobre a dimensão linear da população de ovos oriundo do Município de Caxias constatou-se que o comprimento obtido foi de $580.09 \pm 32.30 \mu\text{m}$; no que se refere a largura, foi obtido $166.75 \pm 19.76 \mu\text{m}$. Já o índice do ovo foi de $3.51 \pm 0.35 \mu\text{m}$ e a medida do diâmetro do disco da micrópila (DM) se manteve em $20.79 \pm 1.94 \mu\text{m}$ (Tabela 1).

Ao estabelecer comparações entre os ovos coletados no Município de Caxias - MA e Município de São Paulo-SP, no que se refere aos atributos envolvendo a dimensão linear, foi obtido que para a hipótese de igualdade, quanto a cada um dos parâmetros avaliados, estes não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$). No entanto os resultados para cada uma das variáveis (comprimento, largura, índice e diâmetro da micrópila) foram estatisticamente significantes ao analisar cada população isoladamente.

Os resultados foram também comparados com àqueles provenientes dos estudos de Suman et al, (2011), Linley (1989) e Faull (2016) (Tabela 2, Gráfico 7).

Tabela 1- Parâmetros morfométricos relacionados a dimensão linear da população de ovos de *Aedes aegypti* oriundos do Município de São Paulo- SP e Caxias - MA segundo medidas de tendência central e de dispersão

Atributos Morfométricos		Medidas de Tendência Central e de Dispersão			
		Média	IC95%	Valor Máximo	Valor Mínimo
Ovos coletados em São Paulo	Comprimento	581.45±39.73	569.65 - 593.25	655.20	521.40
	Largura	175.36±11.59	171.92 - 178.80	199.60	156.50
	Comp/Larg	3.32±0.26	3.24 – 3.40	4.13	2.78
	Diâmetro	18.75±1.92	18.18 - 19.32	22.18	14.27
Ovos coletados no Maranhão	Comprimento	580.09±32.30	569.33 - 590.86	642.40	522.30
	Largura	166.75±19.76	160.16 - 173.34	212.00	135.00
	Comp/Larg	3.51±0.35	3.39 – 3.65	4.24	2.57
	Diâmetro	20.79±1.94	20.14 – 21.43	24.85	17.03

Fonte: Mundim-Pombo (2016)

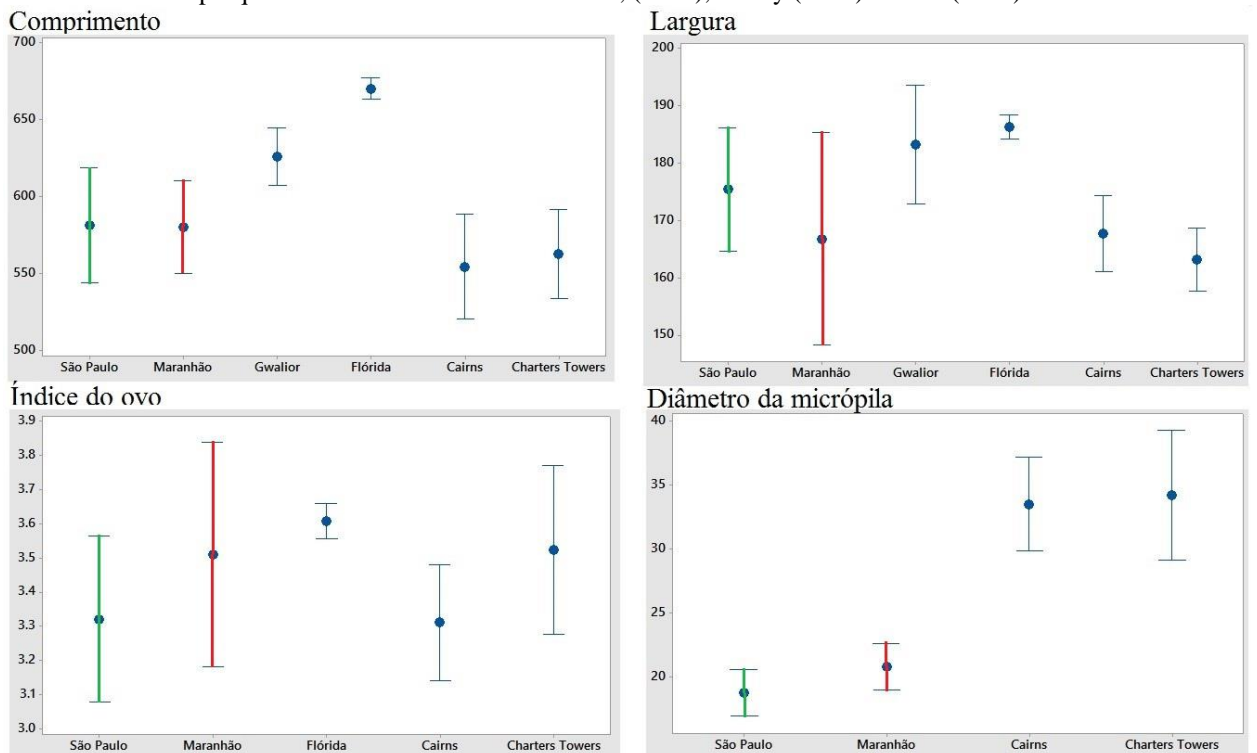
Tabela 2. Análise comparativa entre os achados morfométricos de ovos de *Aedes aegypti* identificado nesta pesquisa e os resultados de Suman et al, (2011), Linley (1989) e Faull (2016)

	<i>A. aegypti</i> ^{a*}	<i>A. aegypti</i> ^{b**}	<i>A. aegypti</i> ^c	<i>A. aegypti</i> ^d	<i>A. aegypti</i> ^{e***}	<i>A. aegypti</i> ^{f****}
Comprimento	581.45±39.73	580.09±32.30	625.65±19.91	670.2±7.2	554.41±36.56	562.62 ± 30.85
Largura	175.36±11.59	166.75±19.76	183.30±11.04	186.3±2.2	167.65±7.05	160.15 ± 9.73
Comp/Larg	3.32±0.26	3.51±0.35	-----	3.61± 0.05	3.31±0.18	3.52 ± 0.27
Diâmetro do disco micropilar	18.75±1.92	20.79±1.94	-----	-----	33.49 ± 3.9	34.19 ± 5.4

Fonte: (a) Mundim-Pombo (2016); (b) Mundim-Pombo (2016); (c) Suman et al. (2011); (d) Linley (1989) (e) Faull and Wiliams (2016); (f) Faull and Williams (2016)

*População de ovos de São Paulo, ** População de ovos do Maranhão ***Populações de ovos de Cairns-Austrália ****População de ovos de Charters Towers – Austrália

Gráfico 7- Achados morfométricos para média e intervalos considerando o desvio padrão de ovos de *Aedes aegypti* identificado nesta pesquisa e os resultados de Suman et al, (2011), Linley (1989) e Faull (2016)



Fonte: Mundim Pombo (2016)

*destaque para os resultados do presente estudo. Verde – resultado da avaliação dos ovos procedentes de São Paulo.

Vermelho – resultado da avaliação dos ovos procedentes do Maranhão

8.4 DISCUSSÃO

Segundo Service (2000) os ovos de culicídeos, incluindo o ovo do mosquito *Aedes aegypti*, podem ser pretos ou castanhos e apresentam medidas inferiores a 1,0 mm de comprimento. No presente estudo todos os ovos analisados apresentaram dimensões inferiores a 1 mm e de coloração negra, apesar de que no momento da postura de ovos ele apresentavam coloração branca, escurecendo logo em seguida, conforme descrição de Forattini (2002). Outras características inerentes ao ovo são: presença de contorno oval ou elíptico, dotado de simetria bilateral (FORATTINI, 2002; SUMAN et al. 2011), característica identificada nesta pesquisa.

O exocócion mantém, geralmente, ornamentações que possibilitam identificação da espécie. Trata-se de um excelente parâmetro de comparação entre espécies, pois tem a capacidade de revelar significativas diferenças (Service, 2000, Suman et al, 2011). Nas figuras apresentadas (Figuras 10B, 11A, 11B e 11C) as ornamentações no exocócion mantiveram o mesmo padrão de organização na espécie estudada.

Suman et al. (2011) demonstraram que além do *Aedes aegypti*, outros culicídeos do mesmo gênero, apresentam ornamentação com células coriônicas poligonais no exocócion do ovo, onde observa-se um tubérculo grande central e outros menores e periféricos com exceção da superfície anterior que contém o aparato micropilar. Linley (1989), Malhotra e Chauhan (1994) apresentaram concordância nesta constatação. Apesar de este estudo ter se concentrado em uma espécie, foi identificada características similares às descritas.

Linley (1989) acrescenta que os tubérculos centrais na superfície externa do ovo são unidos aos tubérculos periféricos por meio de projeções espessas em forma de linha, no entanto estas apresentam diferenças quanto às suas dimensões de acordo com a localização no exocócion. Neste estudo esta projeção pode ser observada na figura 11D.

Ao rejeitar a hipótese de igualdade entre as duas populações de ovos, sugere-se que a semelhança identificada nas duas populações distintas tenha ocorrido devido ao acaso, e diante do exposto levanta-se a hipótese de que possa estar ocorrendo microevolução nestas populações considerando estes atributos. Entretanto o uso de outras ferramentas taxonômicas e filogenéticas são necessárias para aprofundar a discussão sobre este processo evolutivo

Ao comparar morfologicamente, a partir de microscopia eletrônica de varredura, os ovos de *Aedes aegypti* em relação aos ovos de *Aedes albopictus*, procedentes de Gwalior na Índia, Suman et al. (2011), afirmam que os primeiros são maiores quanto ao atributo disco e poro da micrópila em relação ao segundo e as células poligonais do cócion apresentam pouca

capacidade para auxiliar na distinção entre estas espécies isoladamente. Faull e Williams (2016) realizaram outro estudo ampliando a análise, ao comparar os parâmetros morfológicos e morfométricos entre *Aedes aegypti* procedente de duas diferentes cidades australianas, Cairns e Charters Towers entre si (Tabela 2) e em relação ao *Aedes notoscriptus*. Apesar deste estudo ter estabelecido análise comparativa somente intraespecífica, e não entre espécies distintas, fica evidente a possibilidade de estabelecê-las em relação a outras espécies do gênero *Aedes*, por exemplo.

Ainda sobre o estudo realizado por Suman et al. (2011), o comprimento dos ovos de *Aedes Aegypti*, identificaram dimensões de $625.65 \pm 19.91 \mu\text{m}$ para amostras coletadas na Índia e $183.30 \pm 11.04 \mu\text{m}$ de largura. Neste estudo estas dimensões das populações de ovos do Maranhão e São Paulo, quando comparado aos ovos oriundos de Gwalior na Índia, considerando o desvio padrão e o intervalo de confiança são inferiores, assim como ocorre em relação à população de ovos procedentes da Austrália (Município de Cairns e Charters Towers).

Em outra análise realizada por Linley (1989), o *Aedes aegypti* proveniente da Flórida USA, apresentou comprimento inferior a $700 \mu\text{m}$. O comprimento identificado na população de ovos de Caxias e São Paulo também atingiram níveis inferiores, tendo como valor máximo $612.39 \mu\text{m}$ e $621.18 \mu\text{m}$ respectivamente. No que se refere ao revestimento coriônico, os achados foram semelhantes (Tabela 2), embora tenham diferenças matemáticas em suas medidas.

Outra população de representantes desta espécie foi analisada no estudo realizado por Faull e Williams (2016), os resultados obtidos indicaram células coriônicas exteriores de *Aedes aegypti* principalmente hexagonal, ocasionalmente, pentagonal e raramente heptagonais. Neste estudo não foi avaliado formato das células coriônicas de maneira quantitativa, mas qualitativamente pode-se verificar células coriônicas em todos os formatos citados, também predominando o formato hexagonal.

Em relação ao diâmetro da micrópila, os ovos originários de São Paulo e Maranhão apresentam dimensões inferiores quando comparados aos resultados do estudo de Faull e Williams (2016), tanto em relação ao Município de Cairns quanto ao Município de Charters Towers.

Estudos morfológicos e morfométricos cujos ovos de culicídeos são focos de interesse são fundamentais para identificação e melhor conhecimento das espécies. Dujardin (2008)

discute em sua publicação que o significado evolutivo do impacto ambiental sobre a variabilidade métrica e valorizou o uso da morfometria, pois podem fornecer informações necessárias que possibilitam a elaboração de mapas preliminares apontando para áreas relevantes, onde se deve investir no uso de maquinaria molecular.

Dujardim (2008) ainda acrescenta que estes estudos são importantes também por permitir avaliação de aspectos taxonômicos e análise de possibilidade de especiação, pois acredita-se que estímulos externos, tais como, mudanças ambientais ou de disponibilidade de alimento, podem desencadear alterações morfológicas. Este conhecimento tem grandes chances de gerar, inclusive, impacto positivo na epidemiologia das doenças, cuja espécie estudada seja vetor.

Diante dos achados conclui-se que existe diferenças entre as populações de ovos. Sabe-se que ovos de *Aedes aegypti* e demais espécies, oriundos de diferentes regiões mantêm a possibilidade de passar por processo de especiação, ou seja, insetos, submetidos a condições ambientais distintas (nível de poluição, qualidade dos poluentes no ar, qualidade da água), podem estar sofrendo um processo evolutivo cujos indícios seriam identificados inicialmente pela alteração morfológica e devem ser confirmadas em seguida com o uso da biologia molecular. Neste caso foram identificadas diferenças e sugere-se que estudos envolvendo a biologia molecular sejam realizadas para estes esclarecimentos.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue até a semana epidemiológica 41 e febre de Chikungunya até a semana epidemiológica 15 de 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 15, 2015.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Levantamento rápido de índices para *Aedes aegypti*-LIRAA- Para Vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde: 2013.
- CHARREL, R. N.; GOLFART, L.; GALLIAN, P.; LAMBALLERIE, X. Globalization of Chikungunya: 10 years to invade the world. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 20, n. 7, p. 662-663, 2014
- CLEMENTS, A. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction**. London: Chapman & Hall, 1992.
- DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v.8, n. 6, p. 875-890, 2008.
- FARNESI, L. C.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; MARTINS, A. J.; VALLE, D., REZENDE, G. L. Physical Features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. **Journal of Insect physiology**, v. 83, p 43-52. 2015
- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas: yet another abovirus threat. **New England Journal Medicine**, v.374, p. 601-604, 2016.
- FAULL, K. J.; WILLIAMS, C. R. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) eggs using scanning electron microscopy. **Arthropod Structure & Development**, v. 45, n. 3, p. 273-280, 2016.
- FERGUNSON, N. M.; RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; DORIGATTI, I.; TERAN-ROMERO, L. M.; LAYDON, D. J.; CUMMINGS, D. A. T. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: modeling optimal deployment. **Science**, v. 353, n. 6303, p. 1033-1036, 2016.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2.
- GUIMARÃES, J. H., TUCCI, E. C., BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitas de importância veterinária**. São Paulo: Pleiades, 2001.
- HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 55-8, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820163>>. Acesso em: 4 set. 2016.
- HORSFALL, W.R.; VOORHEES, F.R.; CUPP, E. W. Eggs of floodwater mosquitoes. XIII: Chorionic sculpturing. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 63, p. 1709-1716, 1970.

LAROCCA, R. A.; ABBINK, P.; PERON, J. P. S.; ZANOTTO, P. M. A.; LAMPIETRO, M. J.; BADAMCHI-ZADEH, A.; BOYD, M.; NG'ANG'A, D.; KIRILOVA, M.; MERCADO, N. B.; LI, Z.; MOSELEY, E. T.; BRICAULT, C. A.; BORDUCCHI, E. N.; BIBLIO, P. B.; JETTON, D.; NEUBAUER, G.; NLOLOLA, J. P.; MAXFIELD, L. F.; LA BARRERA, R. A.; JARMAN, R. G.; ECKELS, K. H.; MICHAEL, N. L., THOMAS, S. J.; BAROUCH, D. H. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, p. 474-478. 2016.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102016000100602&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 21 out. 2016.

LINLEY, J. R. Comparative fine structure of the eggs of *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. bahamensis* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 26, n. 6, p. 510–521, 1989.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, F. F. M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0220-2015>>. Acesso em: 2 set. 2016.

MALHOTRA, P.R.; CHAUHAN, R.S. Scanning electron microscopy of the egg of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae). **Asian Journal of Experimental Science**, v.8, p.19-26, 1994.

NDEFFO-MBAH, M. L.; DURHAM, D. P.; A. SKRIP, L.; NSOESIE, E. O.; John S.; BROWNSTEIN, D. F.; GALVANI A. P. Evaluating the effectiveness of localized control strategies to curtail chikungunya. **Scientific Reports**, v. 6, n. 23997, p. 1-6, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep23997>>. Acesso em 21 out. 2016.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p.

OLSON, J. K.; MEOLA, S. M. Variation in chorionic sculpturing of eggs of *Aedes sollicitans* (Walker). **Annals of the Entomological Society of American**, v.69, p.96-100, 1976.

PACHECO, J. B.; SANTOS-MALLET, J. R.; GUIMARAES, A. E., COSTAS, J. M.; ALENCAR, J. Ultrastructure and morphometry of the egg of *Psorophora albigena* Lutz, 1908 (Diptera: Culicidae). **Micron**, v. 43, n.2-3, p. 418-421, 2012.

PESSÔA, R.; PATRIOTA, J. V.; LOURDES DE SOUZA, M. de; FELIX, A. C.; MAMEDE, N.; SANABANI, S. S. Investigation into an outbreak of dengue-like illness in pernambuco, brazil, revealed a cocirculation of zika, chikungunya, and dengue virus type 1. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. e3201, mar. 2016. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201603220-00059>>. Acesso em: 19 set. 2016

REINERT J. F. List of species described in the egg stage of tribe Aedini (Diptera: Culicidae) with their literature citations. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 21, n. 3, p. 252-262, 2005.

- RODRIGUEZ-MORALES, A. J., VILLAMIL-GOMEZ, W. E., FRANCO-PAREDES, C. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14 n. 3. p. 177-179. 2016
- SALLUM, M. A. M.; FLORES, D. C. Ultrastructure of the eggs of two species of *Anopheles* (*Anopheles*) meigen (Diptera, culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 2, p. 185-192, 2004.
- SANTOS-MALLET, J. R. S.; MULLER, G. A.; GLEISER, R. M.; ALENCAR, J.; MARQUES, W. A.; SARMENTO, J. S.; MARCONDES, C. B. Scanning Electron Microscopy of the eggs of *Aedes scapularis* from southern south America. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.26, n.2, 205-209, 2010.
- SAXENA, S. K.; ELAHI, A.; GADUGU, S.; PRASAD, A. K. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. **Virus Disease**, v. 27, n.2, p.111-115, 2016.
- SERVICE, M. W. **Medical entomology for students**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 302 p.
- SUMAN, D. S; SHIRIVASTAVA, S. C.; PANT, S. C.; BAHMA, D. P. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. **Arthropod Structure and Development**, v.40, n.5, p.479-483, 2011.
- VILLAMIL-GOMES, W. E.; GONZALES-CAMARGO, O.; AVUBI, J. R.; ZAPATA-SERPA, D.; RODRIGUEZ-MORALES, AL. J. Dengue, Chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. **Journal of Infection and Public Health**, v.9, n.5, p.684-686, 2016.
- WORD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva, WHO, 2009.

**9 CAPÍTULO III: ANÁLISE MICROSCÓPICA DO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DO *Aedes aegypti***

RESUMO

Apesar da extrema importância do vetor *Aedes aegypti* pouca atenção ainda é dada ao seu desenvolvimento embrionário. Sabe-se que o conhecimento da cinética embrionária tem grande potencial para auxiliar no desenvolvimento de novas tecnologias de controle vetorial e consequentemente no controle das arboviroses, daí a justificativa na abordagem desta temática. Objetivando analisar microscopicamente desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti* no terço inicial, intermediário e final de desenvolvimento, foram utilizados ovos procedentes do insetário do Instituto de Biomédicas da Universidade de São Paulo-USP. O procedimento metodológico envolveu análises morfológicas e ultraestruturais utilizando de equipamentos para microscopia óptica (luz e confocal) e eletrônica (transmissão e varredura) dos embriões nos terços inicial, intermediário e final de desenvolvimento, mantidos em temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ até a coleta para processamento. Características morfológicas distintas foram identificadas nas fases iniciais e intermediárias de desenvolvimento. No terço inicial constatou-se presença de epidélio primordial e características sugestivas de intensa atividade celular. Ao final desta fase (após 18 horas) o embrião se apresentava com leve dobramento contornando o ovo internamente (extensão da banda germinal). Na fase intermediária ficou evidente a camada serosa, a disposição do embrião compatível com a situação de retração da banda germinal e início do processo de segmentação. Já no terço final de seu desenvolvimento foi identificada presença abundante de cerdas, e após 50 horas foi possível diferenciar a região cefálica, bem como os segmentos torácicos e abdominais. Apesar dos resultados obtidos, conclui-se que a grande resistência do córion foi um fator gerador de dificuldades para análises microscópicas do embrião, principalmente relacionado ao procedimento de fixação.

Palavras Chave: *Aedes aegypti*. Morfologia. Análise microscópicas. Desenvolvimento embrionário.

9.1 INTRODUÇÃO

Apesar da extrema importância do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue (SANTOS et al., 2008; ARAÚJO, 2009; AMARAL, 2012; GOMES, 2012; PEREIRA et al., 2013), Chikungunya (CHARREL et al., 2014; PINTO JUNIOR, 2014; BRASIL, 2015a) e Zika vírus, pouca atenção ainda é dada ao seu desenvolvimento embrionário. Sabe-se que o conhecimento da cinética embrionária tem grande potencial para auxiliar no desenvolvimento de novas tecnologias de controle vetorial e conseqüentemente no controle das arboviroses (FARNESI et al., 2009).

O início da embriogênese ocorre a partir da fusão do pró núcleo feminino com o pró núcleo masculino, após o ovócito passar pelo tubo ovariano, fazendo com que espermatozóides sejam liberados a partir da espermateca da fêmea e penetrem então numa região denominada micrópila (FONSECA et al., 2012).

A região por onde penetra o espermatozóide, a micrópila, corresponderá à localização da cabeça do embrião e torna-se o ponto de referência, sendo então designada extremidade anterior, aquela que ostenta o aparelho micropilar, já a extremidade posterior será aquela oposta ao aparelho micropilar. É considerada superfície dorsal àquela correspondente ao corpo do embrião ou a que entra em contato com o substrato onde o ovo foi depositado, conseqüentemente a face oposta seria a superfície ventral (FORATTINI, 2002).

Sobre o córion, estrutura que protege o ovo, é composto por duas camadas denominadas endocóron e exocóron, camadas distintas, decorrentes da produção da proteína corionica em momentos diferentes (CLEMENTS, 1992). São as células foliculares (células somáticas da mãe e que envolvem cada folículo ovariano do inseto), as responsáveis por sua produção e secreção. O córion estará formado no momento da oviposição (LI; LI, 2006; CARDOSO, 2009; FONSECA et al., 2012).

Sobre a oviposição, é conhecido que em média cada fêmea produz cerca de 120 ovos. Como nos recipientes positivos para ovos tem sido encontrada quantidade muito superior a capacidade de uma fêmea, subentende-se que o mesmo recipiente é visitado por várias delas (REITER, 1996; ABREU, 2010). As fêmeas não realizam oviposição diretamente em água, elas o fazem em recipientes ou áreas com potencial para se tornarem criadouros (FORATTINI, 2002).

Segundo VARGAS et al. (2014), ovos frescos são suscetíveis a perda de água, e esta é uma condição que pode prejudicar a sua viabilidade.

A precária descrição sobre a morfologia embrionária do *Aedes aegypti* tem sido atribuída aos problemas relacionadas à permeabilidade do ovo. Desta forma considera-se o inseto modelo para o estudo de desenvolvimento embrionário de insetos, a *Drosophila melanogaster* (VITAL, 2006; FONSECA et al. 2012).

Considerando o modelo de estudo, sabe-se que após a fecundação o zigoto passa por divisões mitóticas, este processo é realizado sem a separação do citoplasma, de modo que neste momento são encontrados muitos núcleos num citoplasma comum. Os núcleos migram para a periferia e passarão a formar o blastoderma sincicial. As membranas se formarão em seguida formando as células, dando então origem ao blastoderma celular. Entretanto alguns núcleos não originarão o blastoderma celular, eles se posicionarão na extremidade posterior desenvolvendo-se em células polares que no futuro serão às células germinativas (VITAL, 2006).

Durante a embriogênese são definidos os eixos antero-posterior (AP) e dorso ventral (DV), essenciais para a correta alocação dos futuros órgãos e seguimentos da fase adulta (ROTH; LYNCH, 2009).

A gastrulação, processo pelo qual movimentos altamente integrados de células e tecidos reorganizam as células do blastoderma, envolverá, na sequência, a separação dos grupos celulares em três camadas germinativas, o ectoderma, o mesoderma e o endoderma. Em geral as células derivadas do ectoderma darão origem à regiões externas do corpo (epiderme), do mesoderma serão originados os músculos, já do endoderma o tubo digestório e seus anexos (FONSECA et al., 2012).

Sobre a formação das membranas extra-embrionárias, a serosa e amnion, ocorre durante o desenvolvimento embrionário precoce, precedida pela formação do disco blastodermal, seguida então da diferenciação destas duas membranas protetoras. A externa é a serosa, que se diferencia diretamente do disco blastodermal e o amnion é o interno que se diferencia das regiões adjacentes ao disco blastodermal (FONSECA et al., 2012) Em *Aedes aegypti* o amnion e a serosa são bastante evidentes (PANFILIO, 2008). O processo em que o embrião é envolvido pelas membranas serosa e amnion ocorre simultaneamente ao processo de gastrulação (FONSECA, 2012). A serosa é a responsável pela formação de uma cutícula protetora denominada cutícula serosa, e exerce papel fundamental no fenômeno da resistência contra dessecação (PAPATSENKO et al., 2011).

FARNESI et al. (2009), verificaram em seu estudo que quando submetido a temperatura de 16°C a embriogênese se completa em 489,3±0,6 horas, em temperatura de 22°C a embriogênese é finalizada em 98,3 horas, já em temperatura de 25°C a embriogênese está completa em 77,4 horas, e em temperatura de 28°C o desenvolvimento é finalizado em 61,6 ± 1,2 horas.

Em condições ambientais favoráveis, os ovos de *Aedes aegypti* se desenvolvem e logo após imersão em água, eclodem. Quando submetido em situações adversas como é o caso das baixas temperaturas, dá-se a diapausa no interior do ovo. E assim, este estado de quiêscência poderá se prolongar por seis meses ou mais tempo até o encontro com água em situação ambiental favorável (CONSOLINI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; LACOUR et al., 2014).

No momento da eclosão, a casca do ovo é rompida em virtude de atividade muscular da larva, ao qual aumenta de volume e conseqüentemente aumenta a pressão exercida a partir principalmente da espícula, estrutura especializada conhecida como órgão rompedor de ovo (*egg-breaker, egg burster*). A eclosão do ovo se faz a partir de estímulos variados e a partir daí ocorre o rompimento do corion, em que se observa a formação de uma fenda que rompe a parte correspondente a este revestimento (FORATTINI, 2002).

As larvas resultantes da eclosão dos ovos, são sempre aquáticas, apresentam aspecto vermiforme, seu corpo está dividido em cabeça, torax e abdome. Os dois primeiros são mais volumosos quando comparado com o abdome, que por sua vez tem aspecto semicilíndrico e seu último segmento é diferenciado em lobo anal. Ainda no primeiro estágio, a larva é provida de um “dente” quitinoso que a auxilia no processo de eclosão. (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; PEREIRA, 2006). A partir daí uma nova fase do ciclo biológico irá se desenvolver e caso não haja controle destes dípteros, principalmente nas fases mais vulneráveis do ciclo biológico, o risco para transmissão de doenças como a dengue, se manterá presente.

É fundamental compreender o desenvolvimento embrionário e os fatores relacionados a ela, suas fragilidades e fatores de resistência para atuação efetiva no sentido de controlar o vetor e conseqüentemente reduzir o impacto negativo das arboviroses transmitidos pelo *Aedes aegypti*. Diante do exposto, este estudo objetiva analisar microscopicamente desenvolvimento embrionário deste vetor no terço inicial, intermediário e final de desenvolvimento.

9.2 METODOLOGIA

Os ovos de *A. aegypti* foram obtidos do insetário mantido pelo Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo- Campus Capital.

Após a sincronização da postura ovos, foram coletados três grupos de ovos deste inseto em diferentes momentos da embriogênese, no terço/fase inicial, intermediária e final de seu desenvolvimento. Considerou-se que a embriogênese estará finalizada em aproximadamente 61,6 horas quando em temperatura de 28°C, conforme estudo de FARNESI et al. (2009).

Todas as amostras foram mantidas em temperatura de 28°C, e por este motivo permaneceram no insetário de origem desde a postura de ovos até o momento da coleta para o seu processamento. Este padrão foi mantido para os três diferentes momentos de coleta. Cada grupo de amostra coletada, teve seu desenvolvimento interrompido ao ser submetida ao procedimento de fixação dos tecidos.

O procedimento metodológico utilizado para continuidade deste estudo envolveu análises morfológicas e ultraestruturais, são elas: Microscopia Óptica (Luz e Confocal) e Microscopia Eletrônica (Transmissão e Varredura).

9.2.1 Microscopia Óptica: Luz

As amostras foram fixadas em solução de formaldeído 10%. Após completa fixação foram desidratadas em série de etanóis em concentrações crescentes (70 a 100%) e diafanizadas em xilol, com posterior inclusão em parafina histológica. Cortes de 3µm de espessura foram realizados no micrótomo (Leika, German) e corados com Hematoxilina-Eosina. As imagens foram obtidas através do microscópio de luz Nikon Eclipse E- 800 no no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) -USP.

9.2.2 Microscopia Óptica: Confocal de Fluorescência por Varredura laser

Os ovos foram processados inicialmente com lavagem em água, seguida da imersão em hipoclorito de sódio 3% até sua clarificação (aproximadamente 30 minutos), com posterior lavagem em PBS, triton 0,02% por 5 minutos e novamente lavagem em PBS, o material então foi fixado em formoldeído 3,7% por 20 minutos, após este procedimento foi realizada nova sequência de lavagem com PBS, permeabilização com uso do triton 1% em temperatura ambiente e lavagem com PBS por duas vezes. A incubação foi realizada em câmara escura por 60 minutos e foi utilizada faloidina (FITC). A RNase foi adicionada nos 30 minutos finais da incubação. Após esse tratamento os embriões foram novamente lavados com PBS e os núcleos foram corados com Iodeto de Propídio. Foram obtidas imagens fluorescentes por microscopia confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510) no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (BioCeM) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP.

9.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

O material biológico foi fixado em solução Karnovsky modificado (glutaraldeído 5% e paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2), seguida de lavagem em tampão Cacodilato de sódio, pH 7,2 e fixação posterior em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2M. Após realização de nova série de lavagem e controle da limpeza, os ovos foram desidratados em série crescente de etanol até o etanol absoluto (50%, 75%, 90% e 100%). Após passar em ponto crítico, foi realizada montagem do material sobre Stubs utilizando-se fita adesiva dupla face de carbono seguida da cobertura com banho de ouro, usando o sistema de *sputtering*, e para a análise do material foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250 no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. – SP, Capital no qual foram fotomicrografados para posterior análise.

9.2.4 Microscopia Eletrônica de transmissão

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2%, pós-fixada em uma solução de tetróxido de ósmio a 1% a 4°C e uma solução aquosa de 5% de acetato de uranilo à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol, concentração crescente, imerso em óxido de propileno e embebido em resina Spurr. Para a microscopia de luz seções semi-finas foram cortadas em uma Cut Ultra Reichert[®] ultramicrotomo e corados com uma solução a 1% de azul de toluidina. As seções finas de 90 nm, foram cortadas e recolhidas em 200 mesh (Sigma[®]) e contrastadas com uma solução de acetato de uranilo a 4% e uma solução aquosa 0,4% de citrato de chumbo. As grades foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão, no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) -USP.

Especificamente para as análises do corte semi fino, os ovos foram submetidos a um processamento prévio com lavagem em água, seguida da imersão em hipoclorito de sódio 3% até sua clarificação (aproximadamente 30 minutos), com posterior lavagem em PBS, triton 0,02% por 5 minutos e novamente lavagem em PBS, só então foram fixadas em glutaraldeído dando sequência ao processamento.

A terminologia considerada para descrição das estruturas considerou Harbach & Knight (1978).

9.3 RESULTADOS

O desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti* ocorre no interior de ovos de até 1 mm de comprimento (Figura 12), de coloração escura e com capacidade de se aderirem firmemente à diversos substratos. A adesividade e tamanho reduzido dos ovos dificultaram sua manipulação e processamento, entretanto não impediu a realização dos procedimentos.

Figura 12- Aspecto macroscópico do ovo de *Aedes aegypti*

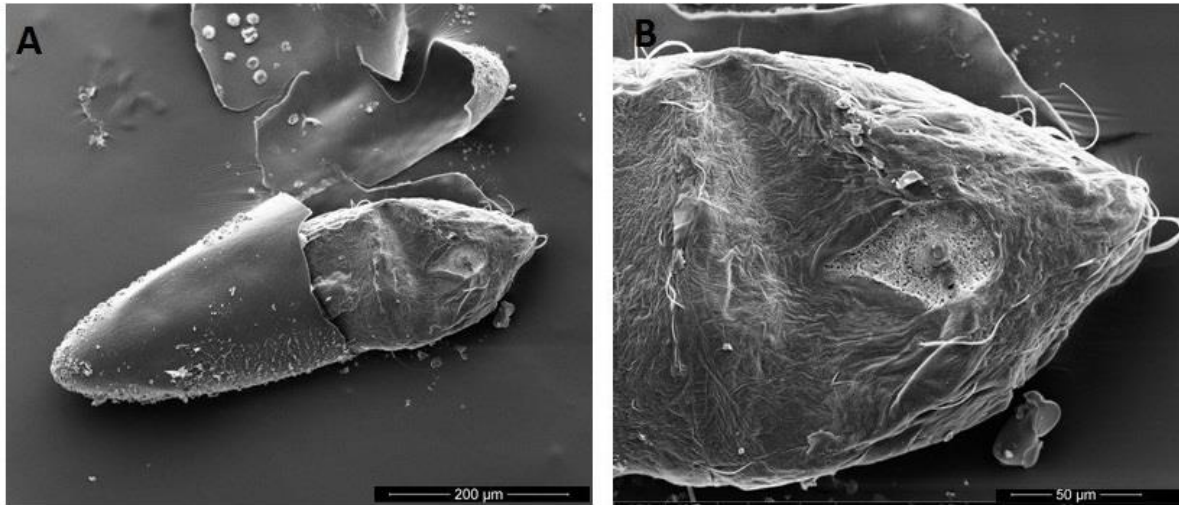


Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda: ovos escuros, com aspecto brilhante, pequenos (comprimento inferior a 1 mm) e extremidades afiladas.

No período que compreende o terço inicial de desenvolvimento do embrião de *Aedes aegypti*, foi possível constatar escassa presença de cerdas na região cefálica e estruturas relativamente homogêneas quanto aos seus aspectos morfológicos gerais, chama a atenção a formação ao centro da região cefálica, a futura espícula rompedora do córion (Figura 13A e 13B), que por sua vez permitirá a abertura para a área externa ao ovo e liberação da larva. A identificação desta região como sendo a região cefálica é possível em função desta região ser coincidente com o aparato micropilar.

Figura 13- Embrião em fase inicial de desenvolvimento



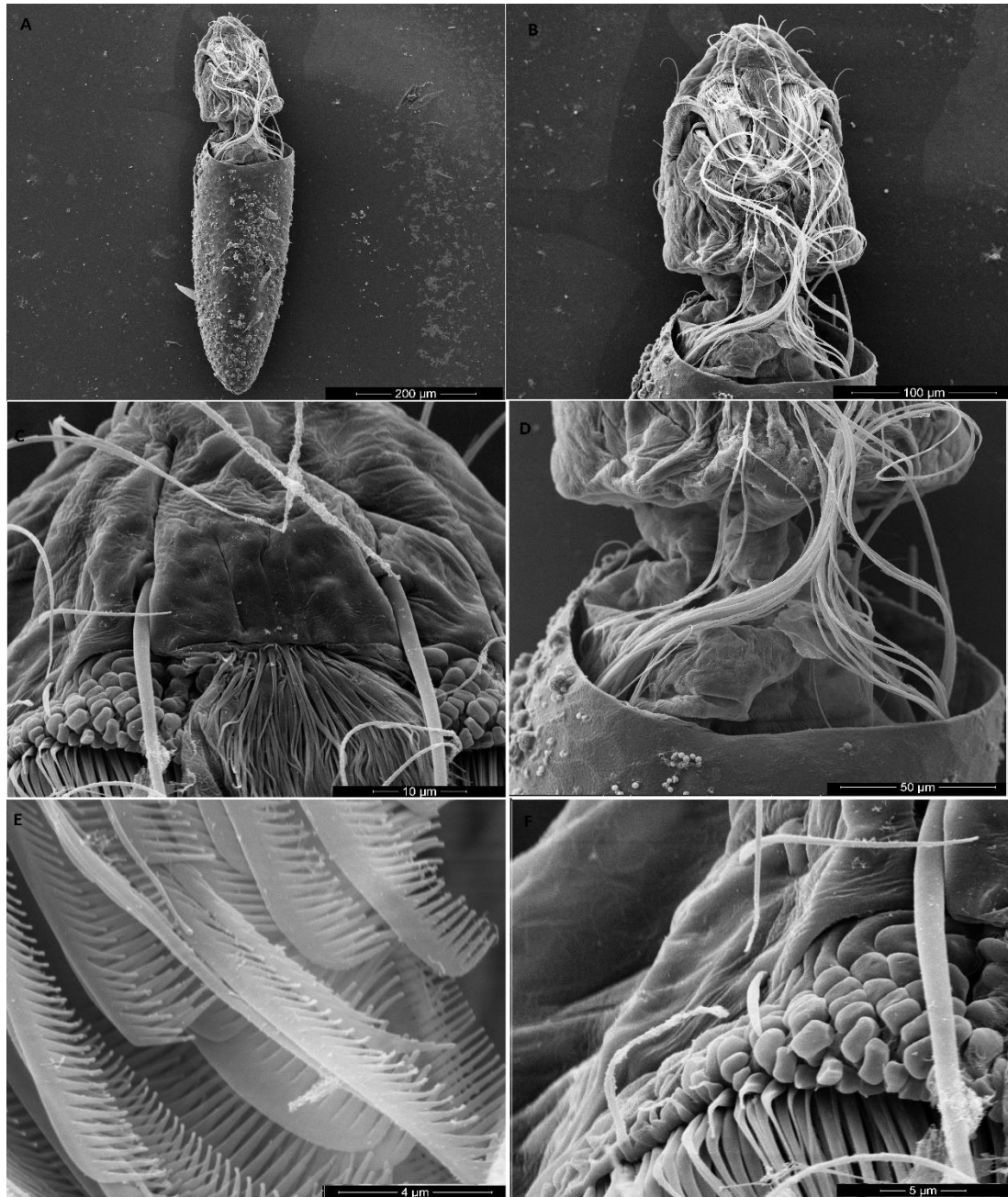
Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda: (A) Córion seccionado deixa exposta a estrutura embrionária em fase inicial de desenvolvimento (B) Região anterior do embrião, correspondente à estrutura cefálica. Espícula rompedora do córion em formação ao centro e presença de poucas cerdas.

A fase intermediária (Figura 14) de desenvolvimento traz características como o aumento no que se refere a presença de cerdas, incluindo as escovas palatais, que futuramente possibilitará que a larva execute movimentos promovendo corrente de água para trazer alimentos para serem consumidos. Constata-se também afunilamento separador da região cefálica e torácica e perda da homogeneidade do aspecto morfológico geral.

No terço final de desenvolvimento (Figura 15 e 16) o corpo da futura larva já apresenta as divisões em cabeça, tórax e segmentos abdominais, mas o indicador para finalização do crescimento é principalmente a presença da espícula rompedora do córion (Figura 16 e 17). Esta estrutura persiste até a primeira fase larval (Figura 18), fator que diferencia o primeiro e segundo estágios larvais.

Figura 14- Embrião em fase intermediária de desenvolvimento (terço intermediário da embriogênese)

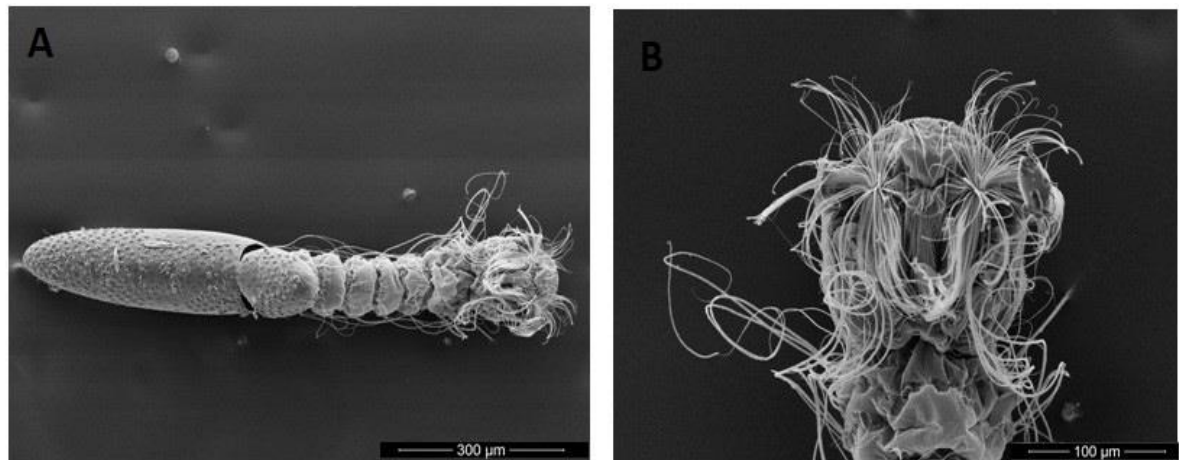


Mundim-

Pombo (2016)

Legenda. (A) Cori3n seccionado, regi3o cef3lica do embri3o e parte da regi3o tor3cica. (B) regi3o cef3lica, presen7a de cerdas e afunilamento separador da regi3o cef3lica e tor3cica. (C) extremidade anterior da regi3o cef3lica (D) c3rion seccionado e aproxima73o do afunilamento separador da cabe7a e t3rax (E) escovas palatais (F) c3lulas da regi3o cef3lica

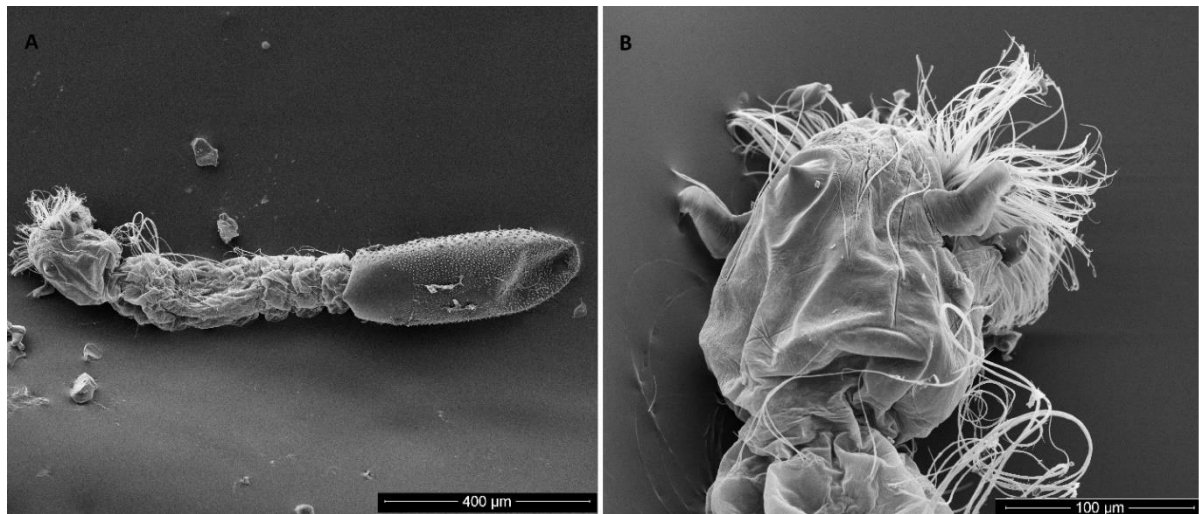
Figura 15- Embrião em fase final de desenvolvimento (vista ventral)



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda (A) embrião com seguimentos abdominais formados, corpo dividido em cabeça, tórax e abdome. (B) cabeça e parte do tórax. Presença de cerdas principalmente na região cefálica

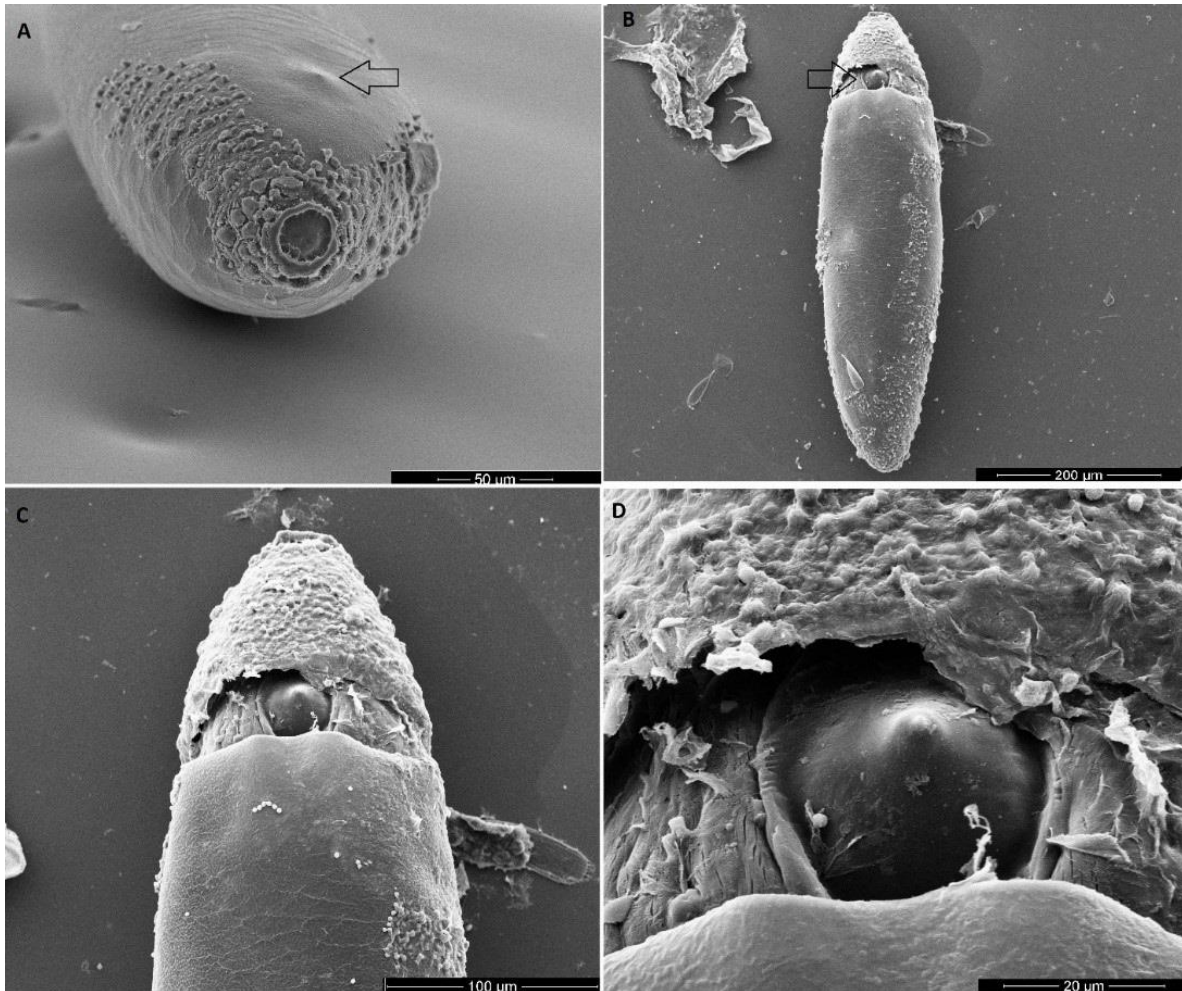
Figura 16. Embrião em fase final de desenvolvimento (vista lateral)



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda (A) embrião com seguimentos abdominais formados, corpo dividido em cabeça, tórax e abdome. Espícula ao centro da face dorsal para eclosão do ovo (B) cabeça e região anterior do tórax. Presença antena, espícula ao centro e cerdas na região cefálica.

Figura 17. Desenvolvimento embrionário concluído e processo de eclosão da larva

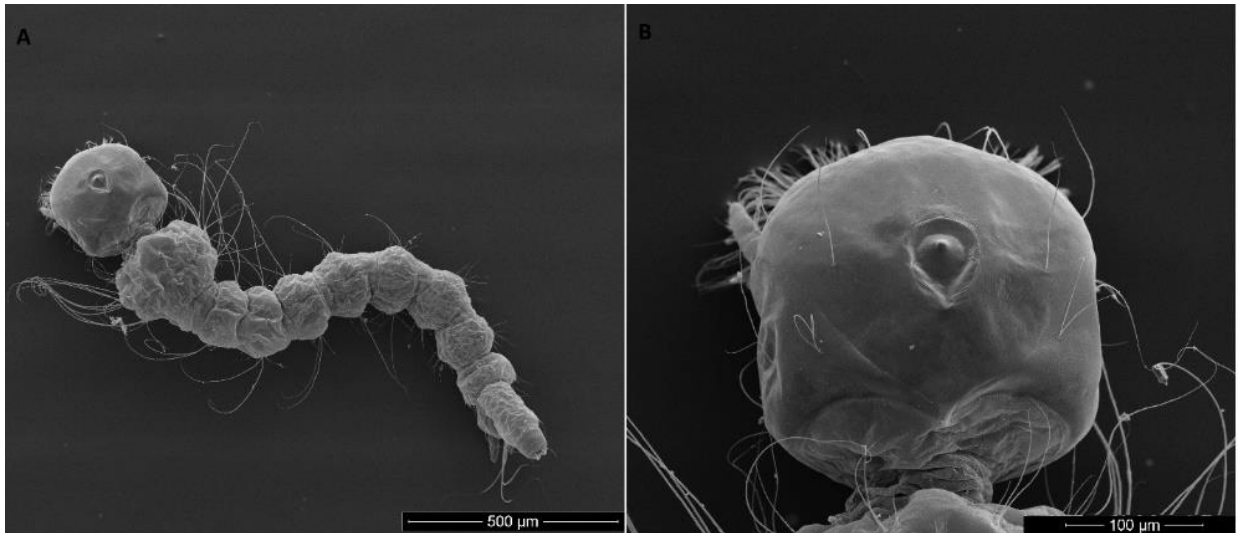


Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda: (A) ponto proeminente (seta) onde haverá o rompimento da corion. (B e C) Corion rompido deixando evidente a estrutura responsável pelo seu rompimento, a espícula rompedora (D) imagem aproximada da espícula rompedora do córion

No período de conclusão da embriogênese, foi identificada uma proeminência no córion (Figura 17A), especificamente na região anterior, o que indica que a larva está pronta para ganhar o ambiente aquático. O local de identificação da proeminência foi o que deu origem ao rompimento fissura trasnversal nesta região pela espícula rompedora do córion (Figura 17B, 17C e 17D), no ovo após conclusão do desenvolvimento embrionário. Esta região será aquela por onde a larva deixará o ovo.

Figura 18. Larva de primeiro estágio (após eclosão)

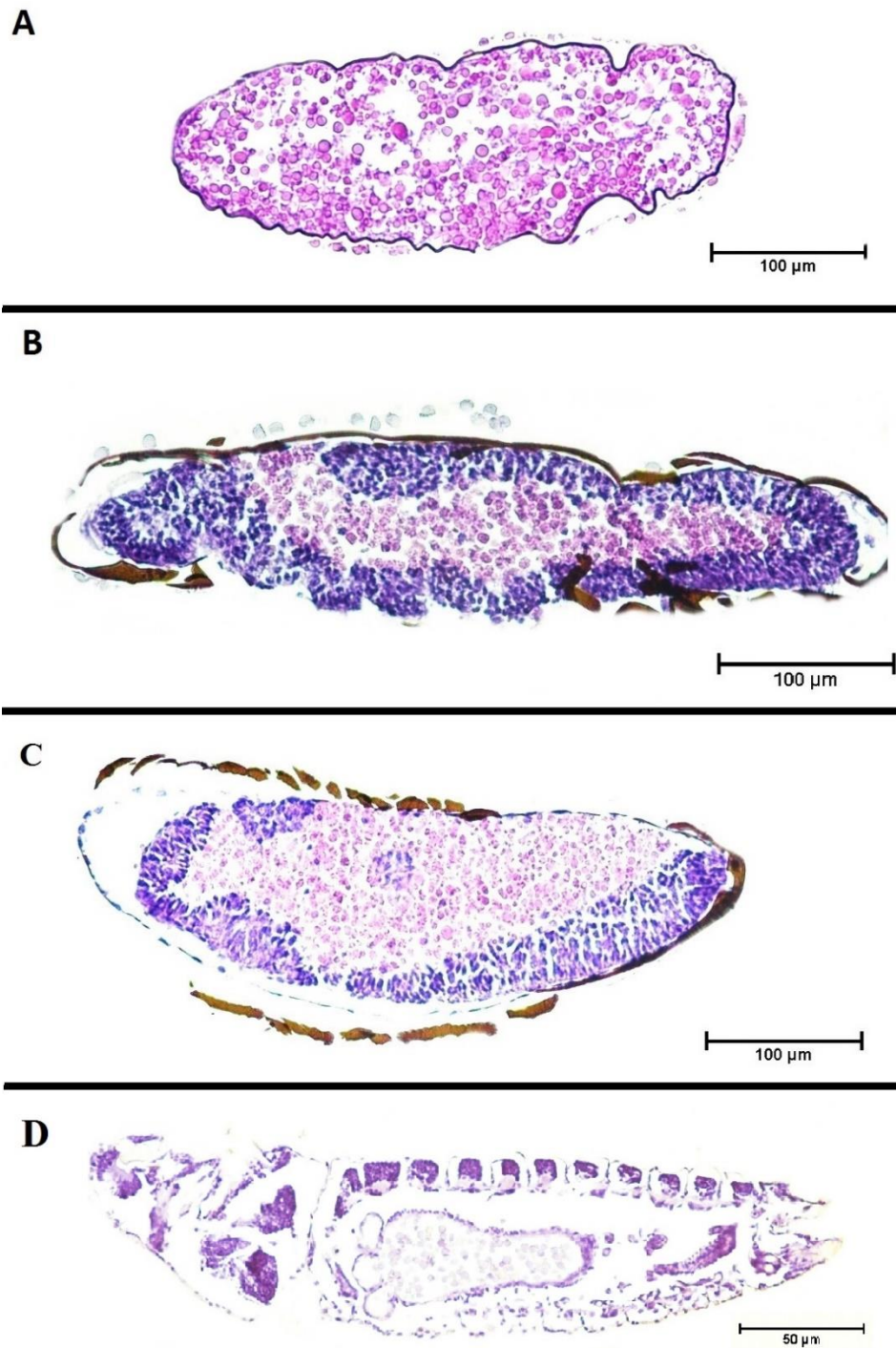


Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda. (A) Larva de 1 instar em visão dorsal (B) cabeça da larva (face dorsal) Espícula rompedora do córion ao centro.

Na análise histológica foram identificados elementos característicos da ornamentação do exocóron, pois circundando esta região, estão os tubérculos centrais (maiores) e os tubérculos periféricos (Figura 19 A e 19B). No interior do ovo, identifica-se células de embrionárias, e especificamente no terço inicial de desenvolvimento (5 horas), foi possível observar em corte semi fino, a presença de células arredondadas com núcleo periférico e várias células apresentando dois núcleos, processo sugestivo de divisão celular (Figura 20A, 20C e 20D). Ainda na fase inicial de desenvolvimento embrionário, após 18 horas a partir da análise do corte semi fino constatou-se dobramento do embrião contornando o ovo internamente em cerca de 60% dele, situação denominada extensão da banda germinal e ocorre no momento da gastrulação quando o blastodema ventral sofre extensão (Figura 21A, 21 B e 21 C), sugere-se ainda que o processo de atividade celular esteja se mantendo de maneira intensa após 18 horas de início do desenvolvimento celular, pois constatou-se grande número de células em processo de divisão (Figura 21E e 21F).

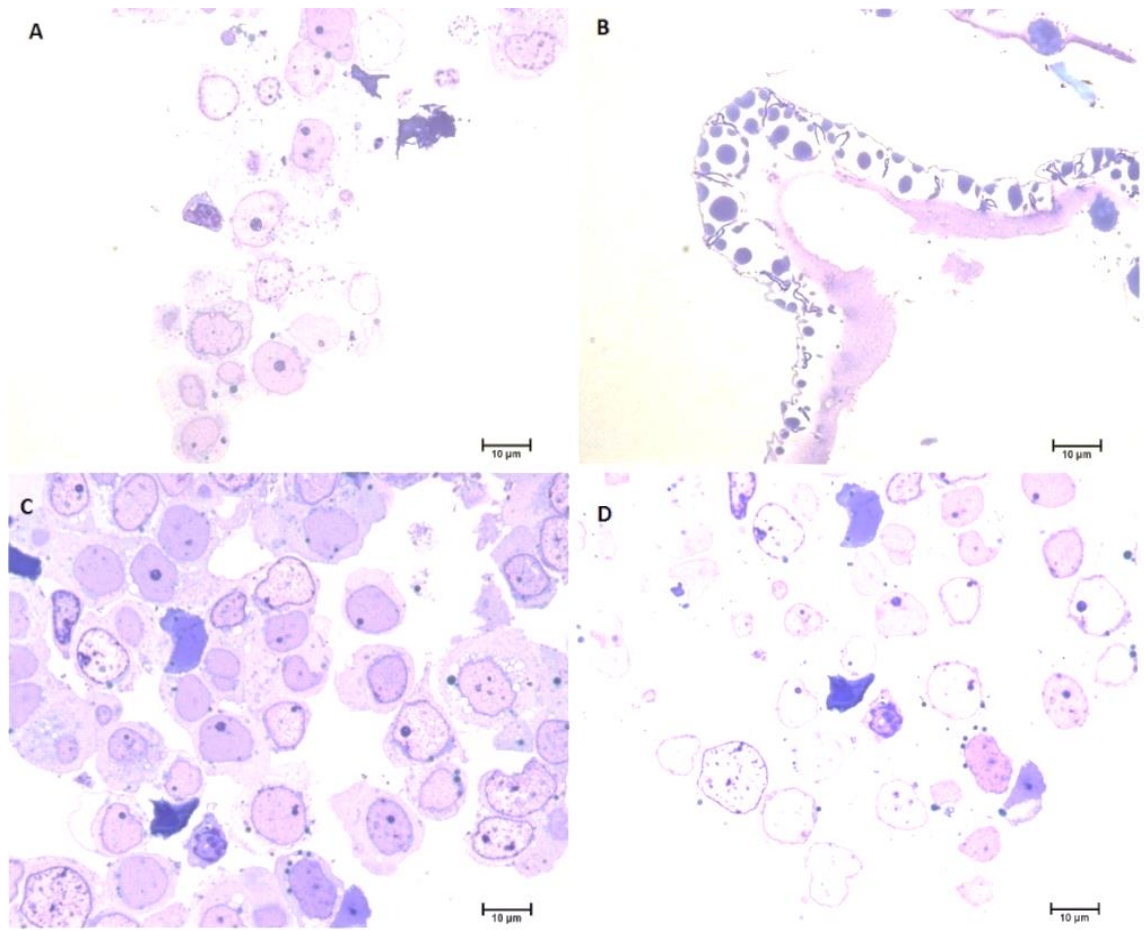
Figura 19- Aspectos histológicos de um embrião em fase inicial (5 e 18 horas), fase intermediária (25 horas) e fase final (45 horas) de desenvolvimento



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

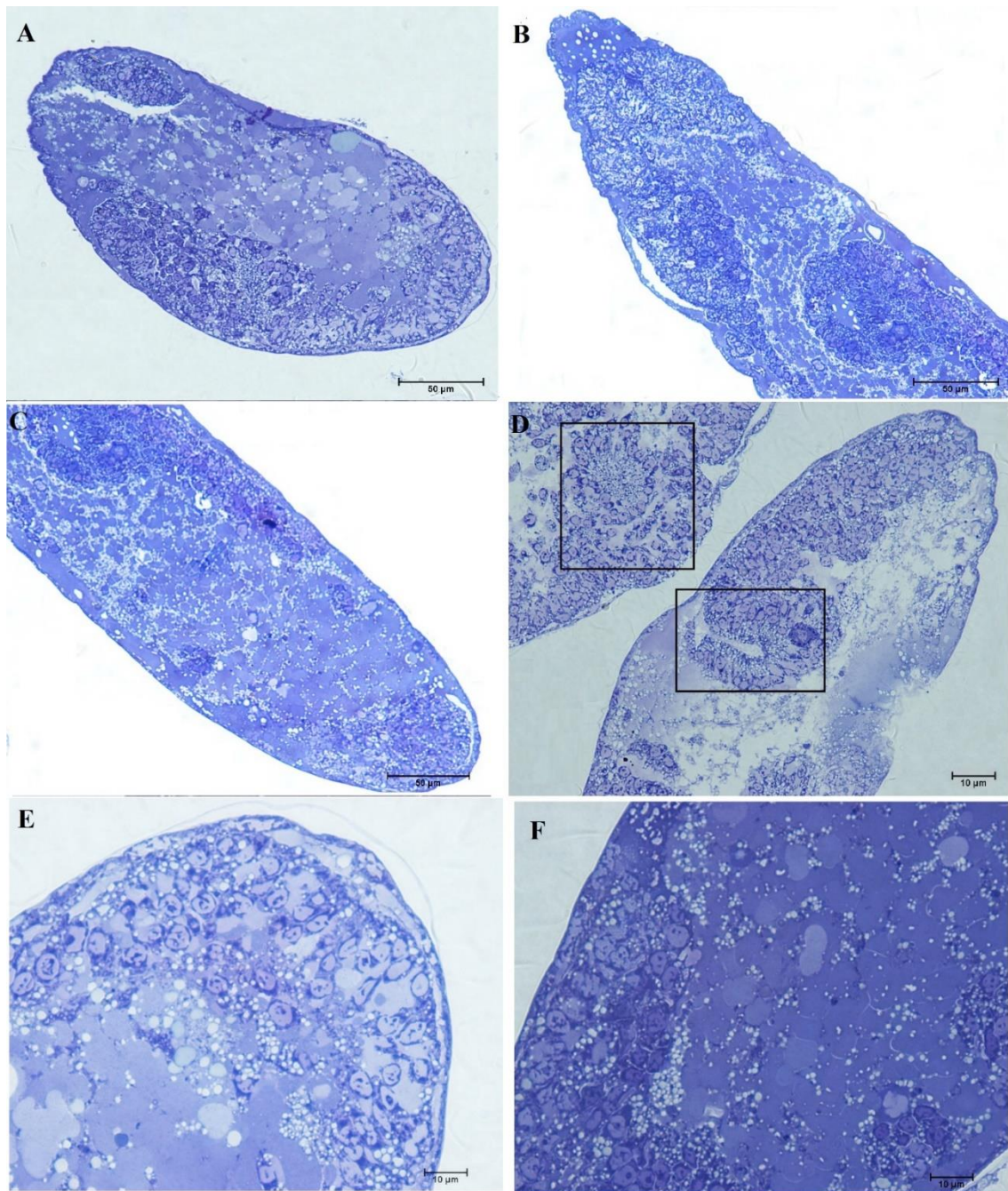
Legenda. (A) Exocóron circundado pelo tubérculo central e presença de vitelo no interior do ovo (B) Ovo de *Aedes aegypti* após 18 horas de desenvolvimento embrionário. Embrião em situação de extensão da banda germinal, na superfície do córion estão presentes tubérculos (C) Embrião em fase intermediária de desenvolvimento, em evidência está a serosa (D) Embrião em fase final de desenvolvimento (45 horas).

Figura 20- Células embrionárias de *Aedes aegypti* em fase inicial de desenvolvimento (5 horas) observado em microscopia de luz a partir de corte semi fino



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda. (A, C e D) células de embrião em início da embriogênese, (B) Células do exocórcion dos ovos (tubérculo central, tubérculo periférico, estruturas ornamentais que envolvem o ovo)

21- Embrião de *Aedes aegypti* após 18 horas de desenvolvimento a partir da análise do corte semi fino

Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda: (A) dobramento do embrionário discreto contornando o ovo internamente em cerca de 60% dele (extensão da banda germinal) (B) região cranial do embrião (C) região caudal do embrião (D) ao centro da área em destaque são apresentadas etapas sequenciais no desenvolvimento embrionário de embriões distintos (E) células embrionárias contornando o cório internamente (F) presença de vitelo circundado por células embrionárias em atividade celular.

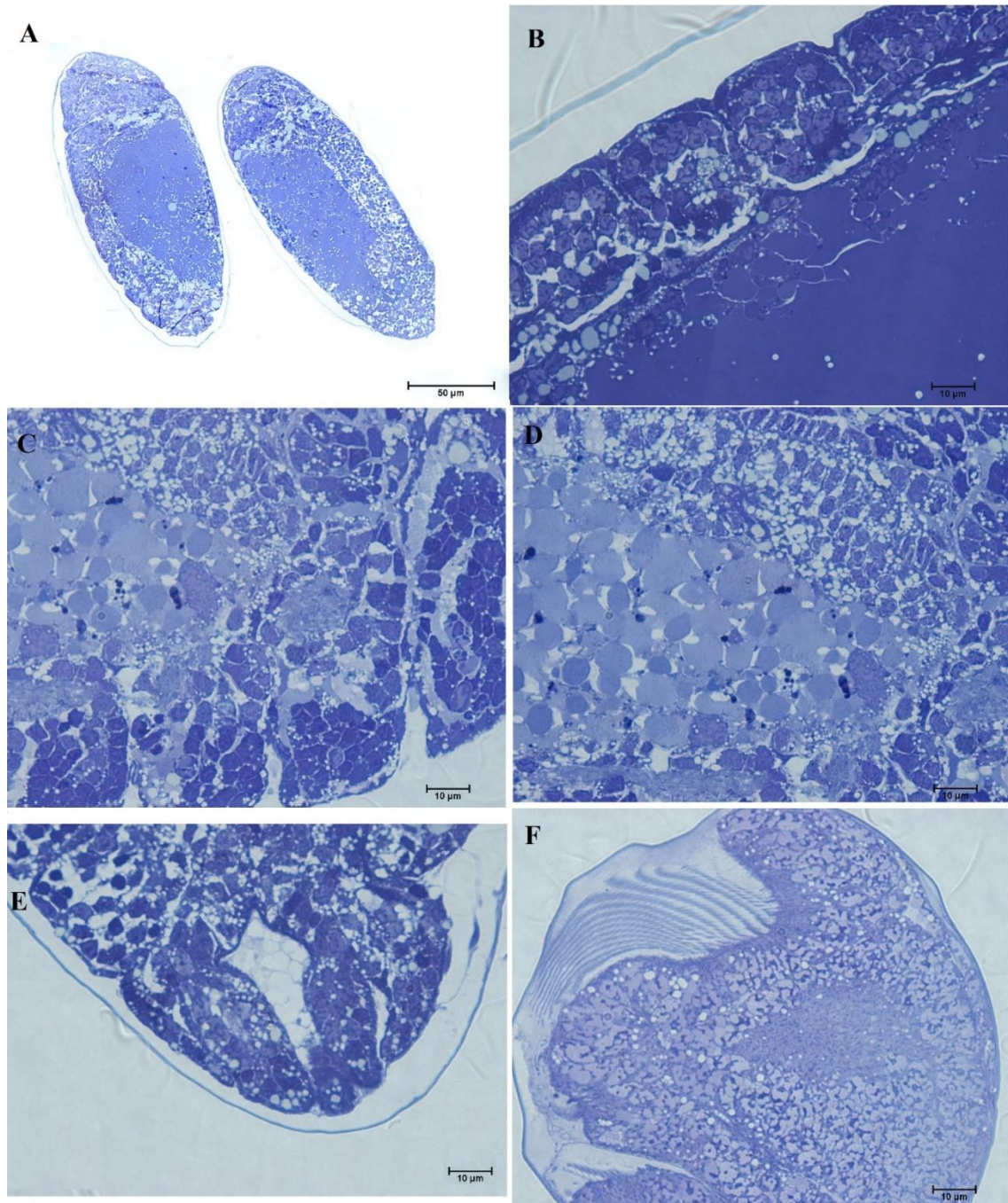
No embrião em fase intermediária de desenvolvimento é evidente a presença de uma membrana envolvendo o embrião e, portanto, localizada entre o embrião e o córion, esta membrana extraembrionária é a camada serosa (Figura 19C).

Ainda nesta fase foram analisados embriões após 25 horas (Figura 19C) e 30 horas de desenvolvimento (Figura 22A a 22F). Observou-se neste período o processo de formação dos segmentos abdominais e torácicos e estruturas como o sifão respiratório e o último seguimento abdominal sob forma de apêndice caudal (Figura 22 E), espícula que futuramente irá promover a fenda para liberação da larva no momento da eclosão do ovo, além da presença de cerdas na região cefálica (Figura 22F).

Em relação a fase final de desenvolvimento (Figura 19D e 23A a 23F) tem-se que a segmentação se encontra melhor definida, bem como o intestino primitivo (23B), a presença discreta de cerdas na região cefálica é substituída pela presença abundante destas estruturas (23E).

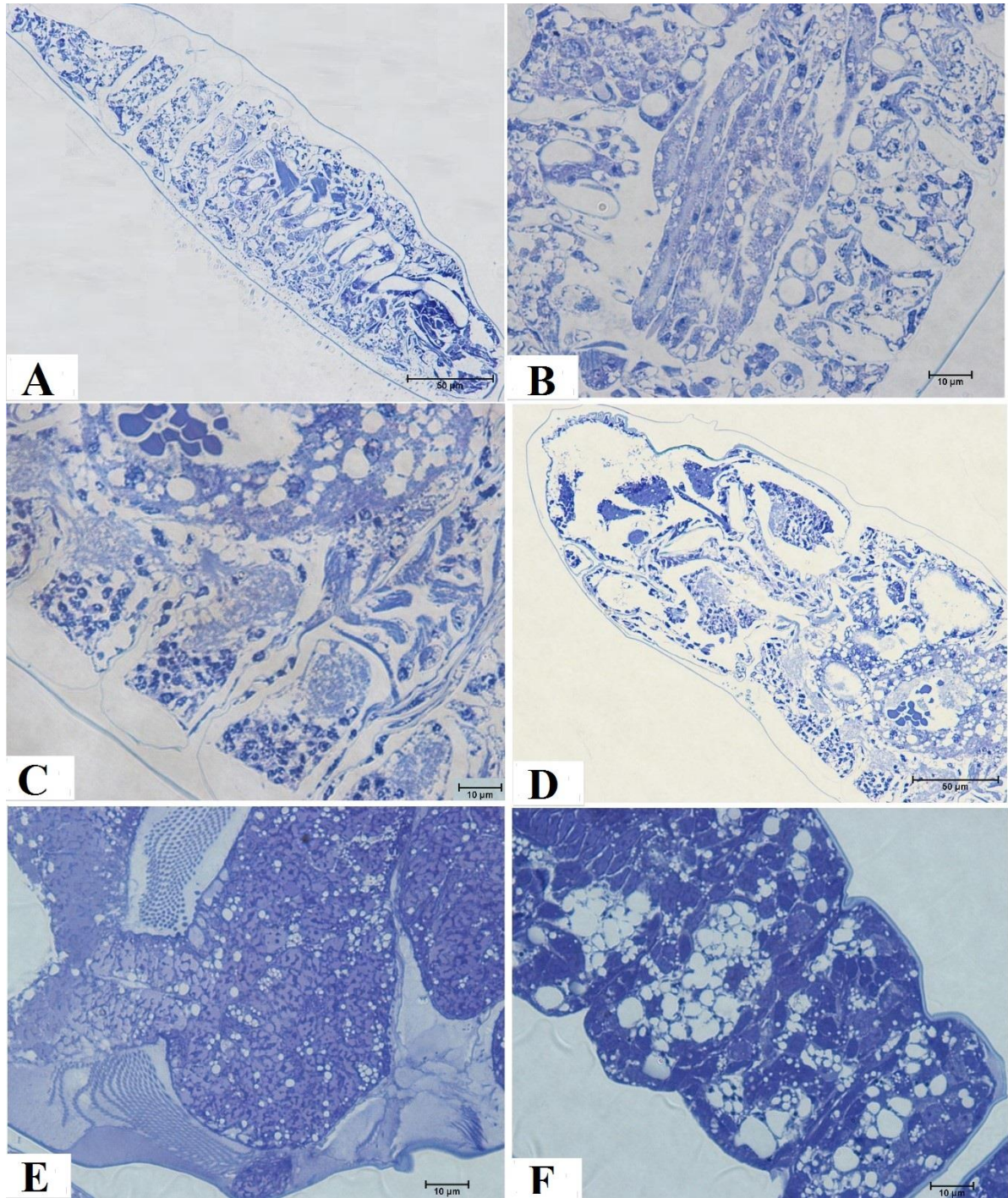
Sabe-se que um importante elemento do citoesqueleto é a actina, e esta por sua vez foram marcados pela reação com a faloidina, que então possibilitou entender a sua distribuição pelas células, já o núcleo foi marcado pelo iodeto de propídio. As imagens obtidas por microscopia confocal possibilitaram acompanhar a sequência no desenvolvimento embrionário a partir de 18 horas de desenvolvimento (fase inicial) até o momento em que a larva se encontra pronta para ganhar o ambiente (Figura 24A a 24F). Nesta análise foi possível identificar o embrião em situação de extensão da banda germinal (24B), após 30 horas de desenvolvimento ficou nítida a camada de células da serosa envolvendo o embrião (24B), e ao final do desenvolvimento constata-se em 40 horas, o processo de segmentação e fechamento dorsal (Figura 24C) e em 50 horas observou-se embrião cuja segmentação torácica e abdominal encontrava-se bem definida (Figura 24D), pode-se observar o momento de eclosão da larva (Figura 24E) e por fim o embrião após diapausa de 7 dias, com seu desenvolvimento finalizado, pronta para ganhar o ambiente externo. Neste caso constatou-se a presença de segmentação visível e entre o quinto e o sexto segmento abdominal foi possível evidenciar o intestino (Figura 24F).

Figura- 22 Embrião de *Aedes aegypti* após 30 horas de desenvolvimento a partir da análise do corte semi fino



Legenda: (A) Em menor aumento tem-se a visão geral dos embriões após 30 horas de desenvolvimento (B e C) segmentos abdominais em formação (D) adjacente aos segmentos abdominais em formação, estão as células com reservas nutricionais (E) sifão respiratório e apêndice caudal em formação (F) região cefálica com presença de cerdas e formação da espícula rompedora de córion ao centro.

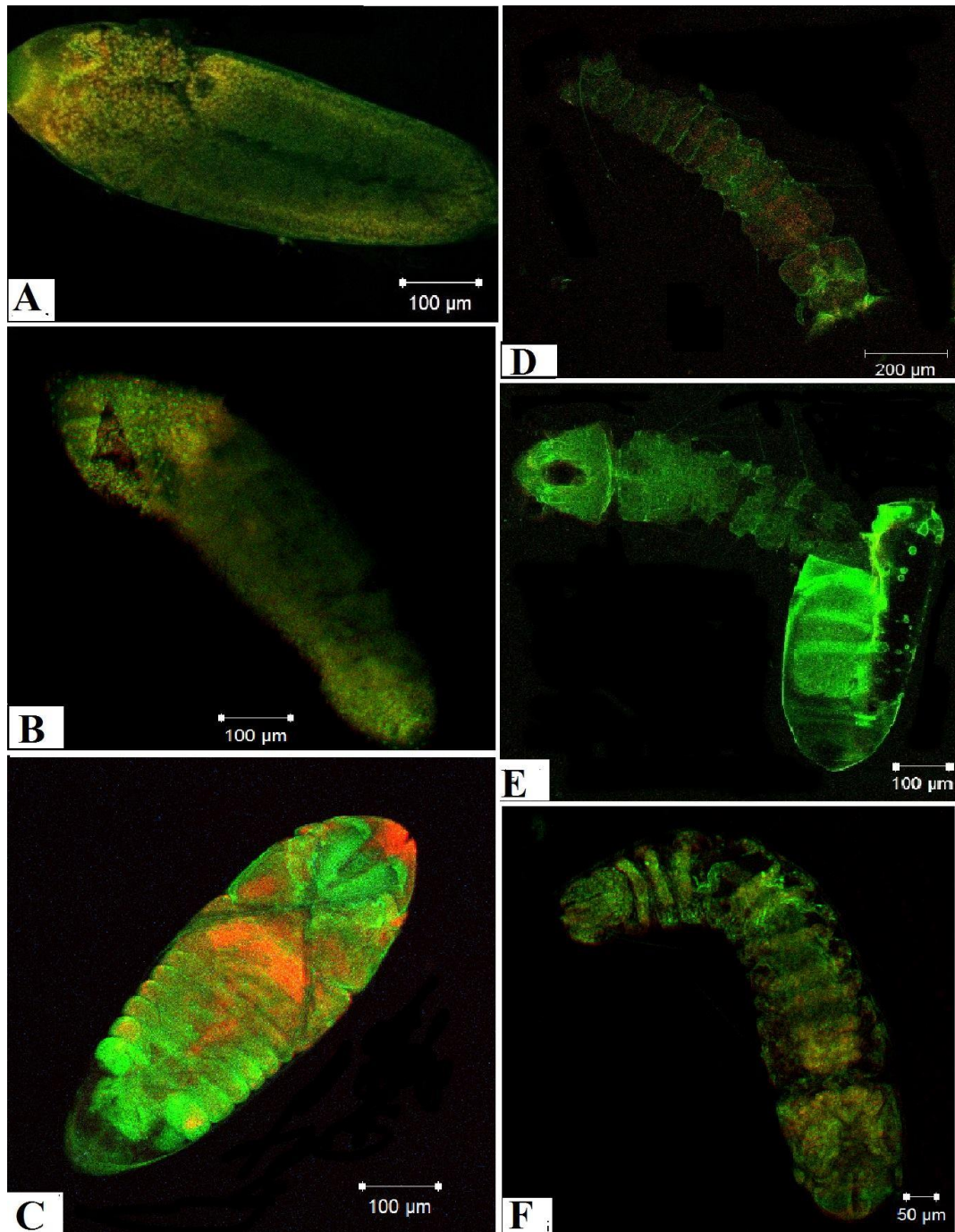
Figura- 23. Embrião de *Aedes aegypti* após 50 horas de desenvolvimento a partir da análise do corte semi fino



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda: (A) Visão geral do embrião após 50 horas de desenvolvimento (B) Segmentos definidos na região abdominal, na região central estruturas alongadas composta por células diferenciadas fazem parte do intestino do inseto (C) Diferentes grupos de células e melhor definição dos segmentos abdominais (D) região cefálica e torácia do embrião (E) região cefálica e presença de cerdas bilaterais (F) Segmentos abdominais definidos

Figura 24- Fases inicial, intermediária e final de desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti*, eclosão do ovo e larva de primeiro instar analisadas por microscopia confocal



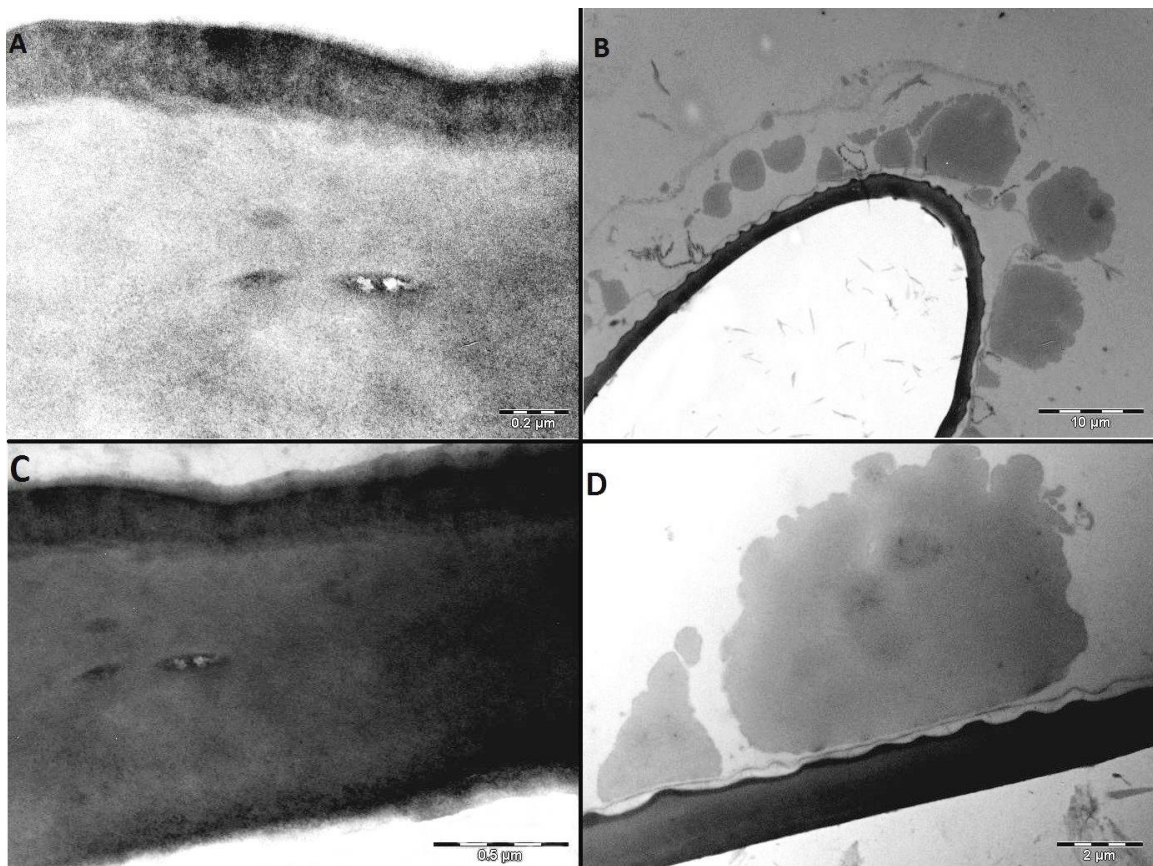
Legenda: (A) Extensão da banda germinal em embrião após 18 horas de desenvolvimento embrionário (B) Embrião após 30 horas de desenvolvimento, dorsal e superficialmente identifica-se células da camada serosa (C) Embrião de 40 horas de desenvolvimento, fechamento dorsal e processo de segmentação abdominal (D) Embrião após 50 horas de desenvolvimento, segmentação torácica e abdominal finalizada (E) momento da eclosão da larva (F) embrião após diapausa de 7 dias, desenvolvimento finalizado. Presença de segmentação visível e entre o quinto e o sexto segmento abdominal é possível evidenciar o intestino do inseto.

A microscopia de transmissão foi utilizada em caráter complementar para análise do córion (Figura 25A a 25D), foi possível identificar as ornamentações do exocóron, e confirmar que a característica impermeável do córion, impediu a entrada dos fixadores e resina no interior da célula no processamento da amostra, havendo comprometimento destas células.

Outro achado, em relação ao exocóron, e consiste em que ele se apresenta mais eletrodensa quando comparado à camada adjacente, o endocóron.

Chamou a atenção a característica de impermeabilidade do córion como um todo, que tornou todas muitas análises, relacionadas a ele, como sendo de extrema dificuldade e gerando várias repetições nas diferentes etapas deste estudo.

Figura- 25 Córon do *Aedes aegypti* por microscopia de transmissão



Fonte: Mundim-Pombo (2016)

Legenda: (A) E exocóron (faixa superior) mais eletrodensa quando comparada com o endocóron (faixa inferior). (B) a diferença entre o ambiente interno do ovo (mas claro) e o externo (mais escuro com presença de tubérculos centrais, maiores, e tubérculos periféricos, menores) evidencia a impermeabilidade do córion, já que a resina não atingiu o interior do ovo (C) Espessura do córion do ovo (D) Tubérculo central (maior) tubérculo periférico (menor).

9.4 DISCUSSÃO

As características dos ovos de um representante dos culicídeos, no caso *Aedes aegypti* avaliados neste estudo tiveram coloração preta ou castanhos e medidas inferiores a 1,0 mm de comprimento, da mesma forma que nos estudos de Service (2000). Apesar de que no momento da postura de ovos ele apresentavam coloração branca, escurecendo logo em seguida, conforme descrito por Forattini (2002). Outras características inerentes ao ovo são: presença de contorno oval ou elíptico, dotado de simetria bilateral (FORATTINI, 2002; SUMAN et al., 2011), característica identificada nesta pesquisa.

Segundo Vargas et al. (2014), ovos frescos são suscetíveis a perda de água e esta condição pode prejudicar sua viabilidade. Tal afirmação sugere que haveria maior permeabilidade nos ovos com menor tempo de desenvolvimento embrionário, portanto haveria maior facilidade na fixação dos tecidos embrionários e na obtenção dos resultados coerentes aos objetivos propostos. No entanto nesta pesquisa não foi identificada maior facilidade de processamento dos ovos em nenhuma das fases avaliadas, todas elas foram igualmente trabalhosas, pois a resistência do cório foi um fator dificultador constante.

A resistência identificada é coerente com a afirmação de Fonseca (2012) em que atribui a precária descrição sobre a morfologia embrionária do *Aedes aegypti* aos problemas relacionados à permeabilidade do ovo.

Segundo Panfíglia (2008) a membrana extraembrionária externa, a serosa, pode ser facilmente evidenciada. Isso pode ser constatado não somente na análise histológica (Figura 19C) em que a camada serosa encontrava-se entre o cório e os tecidos embrionários, como também na análise a partir da microscopia confocal (Figura 24 B) em que se caracterizou como grupo distinto de células quando comparada às demais. Entretanto em ambas as imagens, a serosa foi melhor evidenciada na fase intermediária de desenvolvimento embrionário.

Segundo Consolini; Oliveira, 1994 após finalização do desenvolvimento embrionário, quando em condições ambientais favoráveis os ovos de *Aedes aegypti* quando imersos em água, eclodem. Neste estudo foram analisados alguns ovos com desenvolvimento embrionário finalizado (Figura 24E e 24F), neste caso constatou-se a eclosão de aproximadamente 40% dos ovos mesmo após imersão em hipoclorito de sódio 3%, ou seja, ainda quando submetidos a condições ambientais desfavoráveis, após aproximadamente 1 hora do início do processamento da amostra, alguns embriões ainda se mantinham vivos e os ovos eclodiram. Já os ovos

armazenados por período superior a 30 dias, eclodiam imediatamente ao primeiro procedimento para a análise por microscopia confocal, ou seja, na lavagem em água.

No momento da eclosão, o córion é rompido em virtude da atividade muscular da larva, o qual aumenta de volume e conseqüentemente aumenta a pressão exercida a partir da espícula, estrutura especializada, ocorre então o rompimento do córion, a partir de uma fenda na parte correspondente ao revestimento citado (FORATTINI, 2002). Esta descrição foi constatada neste estudo (Figura 17A a 17D) e a espícula citada foi evidenciada histologicamente na Figura 22F.

O mesmo ocorre em relação à descrição de Consolini; Oliveira, (1994), sua descrição, em que as larvas de primeiro estágio mantem o “dente quitinoso” que auxilia no processo de eclosão do ovo foi identificada nas Figuras 18A e 18B.

No que se refere ao procedimento metodológico para obtenção dos cortes semi fino e posterior análise, esta etapa só obteve sucesso após adaptação do protocolo utilizando-se do tratamento prévio em que os ovos foram submetidos a um processados prévio inicialmente com lavagem em água, seguida da imersão em hipoclorito de sódio 3% até sua clarificação (aproximadamente 30 minutos), com posterior lavagem em PBS, triton 0,02% por 5 minutos e novamente lavagem em PBS, só então foram fixadas em glutaraldeído, ao invés de fixar de imediato o material biológica em solução fixadora (glutaraldeído). Isto possibilitou a clarificação/remoção do córion e possibilitou fixação do material.

Para a coleta dos ovos, as fêmeas adultas realizaram postura por 30 minutos, após este período foram retiradas do frasco em que estavam mantidas para o referido fim, após esta etapa foi iniciado o processamento do material biológico, entretanto nas imagens obtidas identificou-se discreta ausência de sincronidade nos momentos de desenvolvimento entre os embriões. O que pode ser observado no quadrado em destaque na Figura 21D, pois embriões distintos apresentavam etapas distintas embora sequenciais do desenvolvimento. FARNESI et al, (2009), em seu estudo verificaram que quando submetido a temperatura de 16°C a embriogênese se completa em $489,3 \pm 0,6$ horas, em temperatura de 22°C a embriogênese é finalizada em 98,3 horas, já em temperatura de 25°C a embriogênese está completa em 77, 4 horas, e em temperatura de 28°C o desenvolvimento é finalizado em $61,6 \pm 1,2$ horas, no entanto não há abordagem sobre a ausência de sincronidade discreta ou grave. Acredita-se que o tempo em que as fêmeas foram mantidas em postura, ou seja, os 30 minutos, possam ter levado a esta discreta diferença, pois não havia como diferenciar o ovo após 30 minutos de postura e aquele recém oviposto no momento da coleta.

Diante do exposto conclui-se que características morfológicas distintas foram identificadas nas fases iniciais, intermediárias e finais de desenvolvimento embrionário e confirmou-se a grande dificuldade em obter resultados oriundos de análises morfológicas decorrentes da grande resistência do córion.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, R. J. V.; PETETSKI, M. D. Interação patógeno-vetor: dengue. In: INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: INCTEM, 2012.
- ARAÚJO, H. R. C. **Ultra estrutura de hemócitos de *Aedes aegypti***. 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado em ciências) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue até a semana epidemiológica 41e febre de Chikungunya até a semana epidemiológica 15 de 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 15, 2015.
- CARDOSO, A. F. **Vitelogênese do mosquito *Culex quinquefasciatus***. 2009. 30p Tese (Doutorado em ciências). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- CHARREL, R. N.; GOLFART, L.; GALLIAN, P.; LAMBALLERIE, X. Globalization of chikungunya: 10 years to invade the world. **Clinical microbiology and infection**, n. 7, v. 20, p. 662-663, 2014.
- CLEMENTS, A. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction**. London: 1992.
- CONSOLI, R. A. E. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 228 p.
- FARNESI, L. C.; MARTINS, A. J.; VALLE, D.; REZENDE, G. L. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 124–126, 2009.
- FONSECA, R. N.; GOMES, H.; ARAÚJO, H. Aspectos morfofuncionais da embriologia dos artrópodes. In: INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: INCTEM, 201, 2012.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2.
- GOMES, A. F.; NOBRE, A. A., CRUZ, G. O. Temporal analysis of the relationship between dengue and meteorological variables in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 2001 -2009. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 11, p. 2189-2197, 2012.
- LACOUR, G.; FLORIAN, V.; CADILHAC, N.; SOYER, S.; LAGNEAU, C.; HANCE, T. When mothers anticipate: Effects of prediapause stage on embryo development time and of maternal photoperiod on eggs of a temperate and a tropical strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Physiology**, n. 71, p. 87-96, 2014.

LI, J. S.; LI, J. Major proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n.12, p. 954-964, 2006.

MARIO, L. C. **Isolamento e caracterização de células indiferenciadas de ovos embrionários de *Aedes aegypti***. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

PANFILIO, K. A. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. **Developmental Biology**, n. 313, v. 2, p. 471-491, 2008.

PAPATSENKO, D.; LEVINE, M.; GOLTSEV, Y. Clusters of temporal discordances reveal distinct embryonic patterning mechanisms in *Drosophila* and *Anopheles*. **PLoS Biol**, v. 9(1): e1000584. doi:10.1371/journal.pbio.1000584. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000584>>. Acesso em: 21 out. 2016

PEREIRA, M.; SUZUKI, A.; BISSARD, I.; BARLETA, C.; FERREIRA, I. T.R.N.; FRÓES, M. H.; MAEDA, A. Y.; CRUZ, M. G. B.; MARGARIDO, S. A.; SECCO, R. H.; GOMES, M. A.; WANDERLEY, D. M. V. Dengue no Estado de São Paulo: Situação epidemiológica e ações desenvolvidas em 2013. **BEPA Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 10, n. 119, p.3-14, 2013.

PEREIRA, S. T.; SECUNDINO, N. F. C.; BOTELHO, A. C. C.; PINHEIRO, V. C.; TADEI, W. P.; PIMENTA, P. F. P. Role of egg buster in hatchling of *Aedes aegypti*: Scanning electron microscopy study. **Journal of Medical Entomology**, n 43, v. 1, p. 68-72, 2006.

PINTO JUNIOR, V. L. Dengue e Chikungunya: coexistência possível no Brasil. **Revista de Medicina e Saúde**, v. 3, n. 1, p. 2-3, 2014.

ROTH, S.; LYNCH, J. A. Symmetry breaking during *Drosophila* oogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 21, 2009.

SANTOS, S. S.; ROMANOS, M. T. V; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

TAUIL PL. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, n. 44, v.3, p. 555-558, 2009.

VARGAS, H. C.; FARNESI, L. C.; MARTINS, A. J.; REZENDE, G. L. Serosa cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Insect Physiology**, v.62, p. 54-60, 2014.

10 CONCLUSÃO

Conclui-se que:

É fundamental a avaliação dos dados oriundos do levantamento entomológico, pois somente desta maneira é possível elaborar políticas públicas efetivas e com poder transformador da realidade, por exemplo, ao identificar o ambiente domiciliar como local de grande importância para presença de criadouros, não há como não trabalhar a responsabilização da população.

A avaliação do padrão morfológico e morfometria pode levar a indicação de que a espécie estudada deverá ser alvo de investigação com o uso de outras ferramentas da taxonomia e sistemática, pois poderia estar havendo um processo de microevolução, pois o organismo uma vez que submetido à condições ambientais distintas (nível de poluição, qualidade dos poluentes no ar, qualidade da água, temperatura), seria possível ocorrer um processo evolutivo com capacidade para interferir na sua capacidade vetora e conseqüentemente na epidemiologia de doenças transmitidas pelo mosquito.

Características morfológicas distintas foram identificadas nas fases iniciais, intermediárias e finais de desenvolvimento embrionário e confirmou-se a grande dificuldade em obter resultados oriundos de análises morfológicas decorrentes da grande resistência do córion.

REFERÊNCIAS

- ABE, A. H. M.; MARQUES, S. M.; COSTA, P. S. S. Dengue em crianças: da notificação ao óbito. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 2, n. 30, p. 263-71, 2012.
- ALFARO-MURILLO, J. A.; PARPIA, A. S.; FITZPATRICK, M. C.; TAMAGNAN, J. A.; MEDLOCK, J.; NDEFFO-MBAH, M. L.; FISH, D.; ÁVILA-AGÜERO, M. L.; MARÍN, R.; KO, A. I.; GALVANI, A. P. A Cost-effectiveness tool for informing policies on zika virus control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004743, 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004743>>. Acesso em: 14 outubro 2016.
- AMARAL, R. J. V.; PETETSKI, M. D. Interação patógeno-vetor: dengue. In: INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: INCTEM, 2012.
- ARAÚJO, H. R. C. **Ultraestrutura de hemócitos de *Aedes aegypti***. 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado em ciências) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2009.
- ARAÚJO, J. R.; FERREIRA, E. F.; ABREU, M. H. N. G. Revisão Sistemática sobre Estudos de Espacialização da dengue no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 4, p. 696-708, 2008.
- ATKINSON, B.; HEARN, P.; AFROUGH, B.; LUMLEY, S.; CARTER, D.; AARONS, E. J.; SIMPSON, A. J., BROOKS, T. J., HEWSON, R. Detection of Vírus Zika in semen. **Emerging Infectious Disease Journal**, v. 22, n. 5, p. 940, 2016.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: Situação epidemiológica e contribuição para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p.53-72, 2008.
- BARZON, L.; PACENTI, M.; BERTO, A.; SINIGAGLIA, A.; FRANCHIN, E.; LAVEZZO, E.; BRUGNARO, P.; PALÙ, G. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n.10, p. pii=30159, 2016. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21409>>. Acesso em: 21 out. 2016.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R. W.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–7, 2013.
- BASTOS, M. S. **Perfil soro epidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998 – 2001)**. 2004. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2004.
- BONALDO, M. C.; RIBEIRO, I. P.; LIMA, N. S.; SANTOS, A. A. C. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. v. 10, n. 6, p. 1–17, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, Chikungunya e Zika . **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 33, p. 1-8, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. **Relatório técnico n.01/2016 CGPNI/DEVIT/SVS/MS: critérios para orientar o processo de decisão para introdução da vacina contra dengue no PNI**. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/05/relatorio-01-criterios-orientar-decisao-vacina-dengue.pdf>>. Acesso em: 9 out. 2016b.

BRASIL. Portaria n. 204. Notificação compulsória da ZIKA. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 fev. 2016c. Seção 1, p. 23.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue até a semana epidemiológica 41e febre de chikungunya até a semana epidemiológica 15 de 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 15, 2015a.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em Saúde: Ações inovadoras e resultados: gestão 2011 a 2014**. Brasília, 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **O mosquito da dengue pode matar: e é ainda mais perigoso para gestantes; proteja-se**. Disponível em: <http://www.crianca.mppr.mp.br/arquivos/File/publi/saude/microcefalia_ministerio_da_saude_2015.pdf>. Acesso em: 21 out. 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue até a semana epidemiológica 41e febre de chikungunya até a semana epidemiológica 42 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, n. 26, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Preparação e resposta à introdução do o vírus Chikungunya no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014b. 100 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: manual de enfermagem**. 2. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue: Situação epidemiológica. **Boletim Epidemiológico**, v. 43, n. 1, p. 11-15, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Epidemiológico da dengue: análise de situação e tendências**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em saúde: dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e**

tuberculose. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n. 21).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. **Diagnóstico rápido nos municípios para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil – LIRAA:** metodologia para avaliação dos índices de Breteau e predial. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Plano nacional de controle da dengue.** Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

CAO-LORMEAU, V. M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A. L.; MALLET, H. P.; SALL, A. A.; MUSSO, D. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013 **Emerging Infectious Disease**, v. 20, p.1085–1086, 2014.

CÂMARA, F. P.; GOMES, A.F.; SANTOS, G. T.; CÂMARA, D. C. P. Clima e epidemias de dengue no Estado do Rio de Janeiro. Revista **Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n. 2, p. 137-140, 2009.

CAMPANELLI, E. S. **O desenvolvimento de um processo de infecção do *Aedes aegypti* pelo vírus dengue: Caracterização da interação do vírus com uma população de mosquitos autóctones.** Belo Horizonte, 2007. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. L. Zika virus outbreak, **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, 2015.

CARDOSO, A. F. **Vitelogênese do mosquito *Culex quinquefasciatus*.** 2009. Tese (Doutorado em ciências). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

CARDOSO, C. W.; PAPLOSKI, I. A. D.; KIKUTI, M.; RODRIGUES, M. S.; SILVA, M. M. O.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I.; REIS, M. G.; RIBEIRO, S. R. Outbreak of exanthematous illness associated with zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2274-2276, 2015.

CASTRO, J. N. C. **Aspectos virológicos do Dengue no Estado do Amazonas.** 54p. 2004. Dissertação. (Mestrado em Doenças Tropicais e Infeciosas). Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2004.

CONSOLI, R. A. E. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro, Fiocruz, 1994. p. 228

CHARREL, R. N.; GOLFART, L.; GALLIAN, P.; LAMBALLERIE, X. Globalization of Chikungunya: 10 years to invade the world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. 662-663, 2014.

CLEMENTS, A. **The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction.** London, 1992.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; FREITAS, B. C.; DIAS, J. L. M.; GUIMARÃES, K. P.; BENAZZATO, C.; ALMEIDA, N.; PIGNATARI, G. C.; ROMERO, S.; POLONIO, C. M.; CUNHA, I.; FREITAS, C. L.; BRANDÃO, W. N.; ROSSATO, C.; ANDRADE, D. G.; FARIA, D. de P.; GARCEZ, A. T.; BUCHPIGEL, C. A.; BRACONI, C. T.; MENDES, E.; SALL, A. A.; ZANOTTO, P. M. de A.; PERON, J. P. S.; MUOTRI, A. R.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–71, 9 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27279226>>. Acesso em: 2 set. 2016.

DECKARD, D. T.; CHUNG, W. M.; BROOKS, J. T.; SMITH, J. C.; WOLDAI, S.; HENNESSEY, M.; KWIT, N.; MEAD, P. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 14, p. 372–374, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6514a3.htm>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

DENGUE instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 3. ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde; Fundação Nacional de Saúde, 2001. 84 p.

DIAS, J. P. **Avaliação da efetividade do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*. Brasil, 1996-2002.** Salvador, 2006. 79p. Tese (Doutorado) – Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2006.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.46, n.5, 509–520, 1952.

DONALÍSIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283-285, 2015.

D'ORTENZIO E., MATHERON S., DE LAMBALLERIE X., HUBERT B., PIORKOWSKI G., MAQUART M., DESCAMPS D., DAMOND F., YAZDANPANAH Y., LEPARC-GOFFART I. Evidence of sexual transmission of Vírus Zika. **New England Journal of Medicine**, 2016.

DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v.8, n. 6, p. 875-890, 2008.

DUPONT-ROUZEYROL, M.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; DAURÈS, M.; JOHN, M., GRANGEON, J.-P.; GOURINAT, A. C. (2015). Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 381–382, 2015.

FARIA, N. R.; LOURENÇO, J.; MARQUES DE CERQUEIRA, E.; MAIA DE LIMA, M.; CARLOS JUNIOR ALCANTARA, L.; ALCANTARA, L. C. J. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLoS Currents**, 1 fev. 2016. Disponível em: <<http://currents.plos.org/outbreaks/article/epidemiology-of-chikungunya-virus-in-bahia-brazil-2014-2015/>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

FARIA, N. R.; AZEVEDO, R. do S. da S.; KRAEMER, M. U. G.; SOUZA, R.; CUNHA, M. S.; HILL, S. C.; THÉZÉ, J.; BONSALE, M. B.; BOWDEN, T. A.; RISSANEN, I.; ROCCO,

I. M.; NOGUEIRA, J. S.; MAEDA, A. Y.; VASAMI, F. G. da S.; MACEDO, F. L. de L.; SUZUKI, A.; RODRIGUES, S. G.; CRUZ, A. C. R.; NUNES, B. T.; MEDEIROS, D. B. de A.; RODRIGUES, D. S. G.; NUNES QUEIROZ, A. L.; DA SILVA, E. V. P.; HENRIQUES, D. F.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; DE OLIVEIRA, C. S.; MARTINS, L. C.; VASCONCELOS, H. B.; CASSEB, L. M. N.; SIMITH, D. de B.; MESSINA, J. P.; ABADE, L.; LOURENÇO, J.; CARLOS JUNIOR ALCANTARA, L.; DE LIMA, M. M.; GIOVANETTI, M.; HAY, S. I.; DE OLIVEIRA, R. S.; LEMOS, P. da S.; DE OLIVEIRA, L. F.; DE LIMA, C. P. S.; DA SILVA, S. P.; DE VASCONCELOS, J. M.; FRANCO, L.; CARDOSO, J. F.; VIANEZ-JÚNIOR, J. L. da S. G.; MIR, D.; BELLO, G.; DELATORRE, E.; KHAN, K.; CREATORE, M.; COELHO, G. E.; DE OLIVEIRA, W. K.; TESH, R.; PYBUS, O. G.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C.; LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M.; DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J.; FAYE, O.; FAYE, O.; DIALLO, D.; DIALLO, M.; WEIDMANN, M.; SALL, A. A.; IOOS, S.; MALLET, H. P.; GOFFART, I. L.; GAUTHIER, V.; CARDOSO, T.; HERIDA, M.; DUFFY, M. R.; CHEN, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A. J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B. J.; FISCHER, M.; HAYES, E. B.; HADDOW, A. D.; SCHUH, A. J.; YASUDA, C. Y.; KASPER, M. R.; HEANG, V.; HUY, R.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C.; CAO-LORMEAU, V. M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A. L.; MALLET, H. P.; SALL, A. A.; MUSSO, D.; DUPONT-ROUZEYROL, M.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; DAURÈS, M.; JOHN, M.; GRANGEON, J. P. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6283, p. 345–9, 15 abr. 2016a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27013429>>. Acesso em: 4 set. 2016.

FARNESI, L. C.; BRITO, J. M. ; LINSS, J. G. ; PELAJO-MACHADO, M. ; VALLE, D. ; REZENDE, G. L. Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. **Plos One**, v. 7, n.1, p. 303-63, 2012.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas: yet another abovirus threat. **New England Journal Medicine**, v.374, p. 601-604, 2016.

FAYE, O.; FAYE, O.; DIALLO, D.; DIALLO, M.; WEIDMANN, M.; SALL, A. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 311, 2013. Disponível em: <<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-10-311>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

FERGUNSON, N. M.; RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; DORIGATTI, I.; TERAN-ROMERO, L. M.; LAYDON, D. J.; CUMMINGS, D. A. T. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: modeling optimal deployment. **Science**, v. 353, n. 6303, p. 1033-1036, 2016.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224- 229, 2007.

FONSECA, R. N.; GOMES, H.; ARAÚJO, H. Aspectos morfofuncionais da embriologia dos artrópodes. In: INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro: INCTEM, 2012.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2.

FRANCO O. Reinfestação do Pará por *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 21, n.4, p.729-31, 1969

FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K. C.; CHILSON FOY J. L.; BLITVICH, B. J.; TRAVASSOS, R. A.; HADDOW, A. D.; LANCIOTTI, R. S.; TESH, R. B. Probable non-vector-borne transmission of Vírus Zika, Colorado, USA. **Emerging Infectious Disease**, v17, n.5, p.880-882, 2011.

FURUYA-KANAMORI, L.; LIANG, S.; MILINOVICH, G.; SOARES MAGALHAES, R. J.; Clements, A. C. A.; WENBIAO, HU.; BRASIL, P.; FRENTIU, F. D.; DUNNING, R.; YAKOB, L. Co distribution an co infection of chikungunya and dengue viruses. **BMC Infections Disease**, v. 16, n.84, 2016. Disponível em <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1417-2>>. Acesso em 22 out. 2016.

FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, R. L. Presumed unconstrained dispersal of *Aedes aegypti* in the city of Rio de Janeiro. Brasil, **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 1, n. 43, p. 8-12, 2009.

GOMES, A. F.; NOBRE, A. A., CRUZ, G. O. Temporal analysis of the relationship between dengue and meteorological variables in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 2001 -2009. **Cadernos de Saúde Pública**: Rio de Janeiro: v.28, n. 1. p 2189-2197, 2012.

GOURINAT, A. C.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; GOARANT, C.; DUPONT-ROUZEYROL M. Detection of Vírus Zika in urine. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, n.1, p. 84–86 20. 2015.

GUAGLIARDO, S. A.; MORRISON, A. C.; BARBOZA, J. L.; REQUENA, E.; ASTETE, H.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G.; KITRON, U. River boats contribute to the regional spread of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Peruvian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003648, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003648>>. Aceso em: 04 mar. 2016.

GUBLER, D. J. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 3-11, 2011. Supplement.

GUEDES, D. R. D. **Análise da competência vetorial para o vírus da dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco**. Recife, 2012. Tese (doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz- Centro de Pesquisa Aggeu Magalhaes.

GUIMARÃES, J. H., TUCCI, E. C., BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitas de importância veterinária**. São Paulo, Plêiade, 2001.

GUBLER, D. J. CLARCK G. G. Dengue/ Dengue hemorrhagic fever: The emergence of a global health problem. **Emerging Infections Diseases**, Atlanta: v. 1, n. 2, p. 55-57, 1995.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 3, n. 4, p 376-396, 1990.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 55–8, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820163>>. Acesso em: 4 set. 2016.

HILL S. L.; RUSSELL K.; HENNESSEY M.; CHARNETTA, W.; OSTER, A. M.; FISCHER, M.; MEAD, P. Transmission of Vírus Zika through sexual contact with travellers to areas of ongoing transmission — continental United States, 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.65, p.215-216, 2016

HONÓRIO, A. N.; CAMARA, D. C. P.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906 -908. 2015.

HORSFALL, W. R.; VOORHEES, F. R.; CUPP, E. W. EGGS OF FLOODWATER MOSQUITOES. XIII. Chorionic sculpturing. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 63, p. 1709 - 1716, 1970.

KUCEROVA, Z.; STEJSKAL, V. Comparative egg morphology of silvanid and laemophloeid beetles (Coleoptera) occurring in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, p. 219–227, 2002.

LACOUR, G.; FLORIAN, V.; CADILHAC, N.; SOYER, S.; LAGNEAU, C.; HANCE, T. When mothers anticipate: Effects of prediapause stage on embryo development time and of maternal photoperiod on eggs of a temperate and a tropical strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Physiology**, n. 71, p. 87-96, 2014.

LI, J. S., LI, J. Major proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 954-964, 2006.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102016000100602&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 21 out. 2016.

LINLEY, J. R. Comparative fine structure of the eggs of *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. bahamensis* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 26, n. 6, p. 510–521, 1989.

LIPSITCH, M., COWLING, B. J. Zika vaccine trials. **Science**, v. 353, n. 6304. p. 1094 – 1095, 2016.

LO PRESTI, A., LAI, A., CELLA, E. GIANGUGLIELMO, Z., CICCIOZZI, M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, n.12, p. 925 – 932, 2014.

LOOS, S.; MALLETT, H. P.; LEOPARC, G. I.; GAUTHIER, V.; CARDOSO, T.; HERIDA, M. Current Zika Virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v.44. n. 7. P. 302-307, 2014.

MAFRA, A. A.; LEMOS, F. L. **Linha de atenção à saúde: dengue**. Belo Horizonte. Governo de Estado de Minas Gerais, 2009. Disponível em <http://www.fhemig.mg.gov.br/images/stories/protocolos_clinicos/linha_guia_de_atencao_a_saude_dengue_ses_mg.pdf>. Acesso em 21 out. 2014.

MALHOTRA, P.R.; CHAUHAN, R.S. Scanning electron microscopy of the egg of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae). **Asian Journal of Experimental Science**, v.8, p.19-26, 1994.

MANSUY J. M.; DUTERTRE M.; MENGELLE C.; FOURCADE. C.; MARCHOU.; B. DELABEL.; P. IZAPET, J.; MARTIN-BLONDEL. G. Vírus Zika: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? **Lancet Infectious Disease**. v.16, p.405-405. 2016. Disponível em [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/laninf/PIIS1473-3099\(16\)00138-9.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/laninf/PIIS1473-3099(16)00138-9.pdf). Acesso em 14 jul. 2016.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, F. F. M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4–10, [s.d.]Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0220-2015>>. Acesso em: 2 set. 2016.

MARIO, L. C. **Isolamento e caracterização de células indiferenciadas de ovos embrionados de *Aedes aegypti***. 2015. Dissertação (Mestrado em ciências) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015.

MAZZINI, M.; CARCUPINO, M.; FAUSTO, A. M. Egg chorion architecture in stick insects (Phasmatodea). **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, v. 22, n. 2, p. 391-415, 1993.

MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLETT, J. R.; MELLO, R. P.; GOMES, L.; QUEIROZ, M. M. C. Identification of fly eggs using scanning electron microscopy for forensic investigations. **Micron**, v.39, p. 802–807, 2008.

MO, Y.; SALADA, B. M. A.; TAMBYAH, O. A. Zika virus: a review for clinicians. **British Medical Bulletin**, v.119, n.1, p. 25-36, 2016.

MORATORI, C. 2009.86f. **Padrões genéticos morfológicos em populações de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MOTOKI, M. T. **Caracterização de populações de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) do Brasil por estruturas da morfologia externa dos ovos, das asas e por**

sequência gênicas. 2012. 221 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil (letter). **Emerging Infectious Disease**, v.21, n. 10. 2015.

MUSSO, D.; ROCHE, C., ROBIN, E., NHAN, T., TEISSIER, A., CAOLORMEAU, V. M. Potential sexual transmission of Vírus Zika. **Emerging Infectious Disease**, v.2. n. 2, p.359-61, 2015.

MUSSO, D.; ROCHE, C., NHAN, T. X. ROBIN, E.; TEISSIER, A.; CAOLORMEAU, V. M. Detection of Vírus Zika in saliva. **Journal of Clinical Virology**, v.68, p.53-5, 2015.

NASCIMENTO, M. C. **Geopidemiologia da dengue no Município de Alfenas, MG**. São Paulo, 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2011.

NDEFFO-MBAH, M. L.; DURHAM, D. P.; A. SKRIP, L.; NSOESIE, E. O.; John S.; BROWNSTEIN, D. F.; GALVANI A. P. Evaluating the effectiveness of localized control strategies to curtail chikungunya. **Scientific Reports**, v. 6, n. 23997, p. 1-6, 2016. Disponível em: < <http://www.nature.com/articles/srep23997>>. Acesso em 21 out. 2016.

NEVES, D. P. Parasitologia Humana. São Paulo, 2005. 494 p.

OELOFSEN, M. J.; GERICKE, A.; SMITH, M. S.; VAN DER LINDE, T. C. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex* (*Culex*) *theileri* (Diptera: Culicidae) and its susceptibility to infection with arboviruses. **Journal Medical Entomology**, v. 27, n.6, p. 939-944, 1990.

OLSON, J. K.; MEOLA, S. M. Variation in chorionic sculpturing of eggs of *Aedes sollicitans* (Walker). **Annals of the Entomological Society of American**. v.69, p.96-100, 1976.

PACHECO, J. B.; SANTOS-MALLET, J. R.; GUIMARAES, A. E., COSTAS, J. M.; ALENCAR, J. Ultrastructure and morphometry of the egg of *Psorophora albigena* Lutz, 1908 (Diptera: Culicidae). **Micron**. v. 43, n.2-3, p. 418-421, 2012.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological update: neurological syndrome, congenital anomalies, and Zika virus infection. January 17, 2016. Disponível em:< www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32879&lang=em>. Acesso em 10 abr., 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological update: increase of microcephaly in the northeast of Brazil. November 17, 2015. Disponível em:< www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32285&lang=en>. Acesso em 20 abr, 2016.

PANFILIO, K. A. Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. **Development Biology**, n. 313, v. 2, p. 471-491, 2008.

PEREIRA, M.; SUZUKI, A.; BISORD, I; BARLETA, C.; FERREIRA, I. T.R.N.; FRÓES, M. H.; MAEDA, A; Y.; CRUZ, M. G. B.; MARGARIDO, S.A.; SECCO, R. H.; GOMES, M. A.; WANDERLEY, D. M. V . Dengue no Estado de São Paulo: Situação epidemiológica e ações desenvolvidas em 2013. **BEPA Boletim. Epidemiológico**. Paulista, v. 10, n. 119, p. 3-14, 2013.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

PESSÔA S.B., MARTINS A.V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PESSÔA, R.; PATRIOTA, J. V.; LOURDES DE SOUZA, M. de; FELIX, A. C.; MAMEDE, N.; SANABANI, S. S. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. e3201, mar. 2016. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201603220-00059>>. Acesso em: 19 set. 2016

PIALOUX G, GAÜZÈRE B-A, JAURÉGUIBERRY S, STROBEL M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. **Lancet Infectious Disease**, v. 7, n. 5. p.319–27, 2007.

PINHEIRO V. C. S.; TADEI P, W. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 245-250, 2002.

PINTO JUNIOR, V. L. Dengue e Chikungunya: coexistência possível no Brasil. **Revista de Medicina e Saúde**, v. 3, n. 1, p. 2-3, 2014.

POWERS, A. M., CRHISTOPHER H. LOGUE. Changing patterns of Chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 2363 -2377, 2007.

PYKE, A. T.; DALY, M. T.; CAMERON, J. N.; MOORE, P. R.; TAYLOR, C. T.; HEWITSON, G. R.; HUMPHREYS, J. L.; GAIR, R. Imported Zika virus infection from the Cook Islands into Australia. **PLOS Current Outbreak**, 2014. Disponível em <<http://currents.plos.org/outbreaks?s=Imported+Zika+virus+infection+from+the+Cook+Islands+into+Australia>>. Acesso em: 21 out.2016.

REINERT, J. F. List of species described in the egg stage of tribe Aedini (Diptera: Culicidae) with their literature citations. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 21, n. 3, p. 252-262, 2005.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: 3 ed. Guanabara Koogan, 2001.

ROCCO, I. M.; SILVEIRA, V. R.; SILVA, S. J. S.; SPENASSATO, C.; BISORDI, I.; SUZUKI, A. first isolation of dengue 4 in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n.1, p. 49-51, 2012.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; VILLAMIL-GOMEZ, W. E.; FRANCO-PAREDES, C. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue,

chikungunya and Zika in the Americas. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14 n. 3. p 177-179. 2016.

SALLUM, M. A. M.; FLORES, D. C. Ultrastructure of the eggs of two species of *Anopheles* (*Anopheles*) meigen (Diptera, culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 48, n. 2, p. 185-192, 2004.

SAMPAIO, S. M. P.; BARBOSA, G. L.; FERREIRA, I. T. R. N.; PEREIRA, M., WANDERLEY, D. M. V, FONSECA-JUNIOR D. P. Todos juntos contra o *Aedes aegypti*: o desafio do controle vetorial. **BEPA Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 13, n. 149. 2016.

SANTANA, V. S; LAVEZZO, L. C.; MONDINI, A.; TERZIAN, C. B.; BRONZONIN, R. V. M.; ROSSIT, A. R. B.; MACHADO R. L. D.: RAHAL, P.; LELLES, M. C.; NOGUEIRA, M.L.; Concurrent dengue and malaria in the Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p.508-511, set-out, 2010.

SANTOS-MALLET, J. R. S.; MULLER, G. A.; GLEISER, R. M.; ALENCAR, J.; MARQUES, W. A.; SARMENTO, J. S.; MARCONDES, C. B. Scanning Electron Microscopy of the eggs of *Aedes scapularis* from southern south America. **Journal of the American Mosquito Controle Association**, v.26, n.2, 205-209, 2010.

SANTOS, S. S.; ROMANOS, M. T. V; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SÃO PAULO. (Município). Lei municipal n.11.220, de 20 de maio de 1992. Institui a divisão geográfica da área do município em distritos. **Diário Oficial do Município de São Paulo**, São Paulo, v. 37, n. 94, p.2, 21 mai. 1992.

SCALI, V.; MAZZINI, M. Interpopulation differences in egg sculpturing of the stick insect, *Clonopsis gallica* (Charp.) (Phasmatodea, Bacillidae). **International Journal of Insect Morphology & Embryology**. v. 11, n. 3, p. 189-195, 1982.

SCHWARTZ, O.; AIBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p 491-500, 2010.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). Institute Incorporation. **SAS User's guide: statistics**. 8. ed. Cary: SAS, 2001

SAXENA, S. K.; ELAHI, A.; GADUGU, S.; PRASAD, A. K. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. **Virus Disease**, v. 27, n.2, p.111-115, 2016.

SERVICE, M. W. **Medical entomology for students**. 3rd.ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2000. 302 p.

SIMON, F.; PAROLA, P.; GRANDADAM, M.; FOURCADE, S.; OLIVER, M., BROUQUI, P. et al. Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands: report of 47 cases. **Medicine (Baltimore)**, v. 86, p.123-137, 2007.

SHEPARD, D. S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y. A.; ZAMBRANO, B.; SAYAN, G. H., Economic impact of dengue illness in the America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200-207, 2011.

SHEFFIELD, P. E.; LANDRIGAN P. J. Global climate change and children's health: Threats and strategies for prevention. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, p. 291-8, 2011.

SOARES, J. B. R. C.; GAVIRAGHI, A.; OLIVEIRA, M. F. Mitochondrial physiology in the major arbovirus vector *Aedes aegypti*: substrate preferences and sexual differences define respiratory capacity and superoxide production. **PLoS ONE**, v.10, n.3, p.1-35, 2015.

SOPER F.L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene America**, v.14, n.6, p.887-91, 1965.

SUKONTASON, K.; SUKONTASON, K. L.; PIANGJAI, S.; CHOOCHOTE, W.; BOONCHU, N.; CHAIWONG, T.; KURAHASHI, H. Fine structure of the eggs of blowflies *Aldrichina graham* and *Chrysomya pacifica* (Diptera: Calliphoridae). **Biological Research**, v.37, p. 483-487, 2004.

SUAYA, J. A.; SHEPARD, D. S.; SIQUEIRA, J. B.; MARTELLI, C. T.; LUM, L. C.; TAN, L. H.; KONGSIN, S.; JIAMTON, S.; GARRIDO, F.; MONTOYA, R.; ARMIEN, B.; HUY, R.; CASTILLO, L.; CARAM, M.; SAH, B. K.; SUGHAYYAR, R.; TYO, K. R.; HALSTEAD, S. B. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 5, p. 846-55. 2009.

SUMAN, D. S; SHIRIVASTAVA, S. C.; PANT, S. C.; BAHMA, D. P. Differentiation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* with egg surface morphology and morphometrics using scanning electron microscopy. **Arthropod Structure and Development**, v. 40, n. 5, p. 479-483, 2011.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia da dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, p. 99-102, 2001.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TAUIL P. L. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n.3, p. 555-8, 2009.

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

TOGNARELLI, J.; ULLOA, S.; VILLAGRA, E.; LAGOS, J.; AGUAYO, C.; FASCE, R.; PARRA, B.; MORA, J.; BECERRA, N.; LAGOS, N.; VERA, L.; OLIVARES, B.; VILCHES, M.; FERNÁNDEZ, J. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of virology**, v. 161, n. 3, p. 665–8, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26611910>>. Acesso em: 4 set. 2016.

TRACOSO, A. Zika threatens to become a huge worldwide pandemic. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.6, n. 6, p. 520-527, 2016.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; AGUIAR, R.. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 2, p. 419-422, jun. 2016. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222016000200419&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em 24 de ago. 2016.

VALOTTO, C. P.B. **Estudo das alterações morfohistológicas em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao tanino catéquico isolado da *Magonia pubescens* (Sapindaceae) e ao diterpeno de *Copaifera reticulata* (Leguminosae)**, 2009. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2009.

VARGAS, H. C. M.; FARNESI, L. C.; MARTINS, A. J.; VALLE, D.; REZENDE, G. L. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Insect Physiology*, v. 62, n. 1, p. 54-60, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.001>>. Acesso em 2 dez. 2014.

VARMA M. G. R.; PUDNEY, M. The growth and serial passage of cell lines from *Aedes aegypti* (L) larvae in different media. *Journal of Medical Entomology*, v.6, p. 432-439, 1969.

VENTURI, G.; ZAMMARCHI, L.; FORTUNA, C.; REMOLI, M.; BENEDETTI, E.; FIORENTINI, C.; TROTTA, M.; RIZZO, C.; MANTELLA, A.; REZZA, G.; BARTOLONI, A. An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy. *Eurosurveillance*, v. 21, n.8, 2016.

VILLAMIL-GOMES, W. E.; GONZALES-CAMARGO, O.; AVUBI, J. R.; ZAPATA-SERPA, D.; RODRIGUEZ-MORALES. AL. J. Dengue, Chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *Journal of Infection and Public Health*, v.9, n.5, p.684-686, 2016.

WAEHRE, T.; MAAGARD, A.; TAPPE, D.; CADAR, D.; SCHMIDT-CHANASIT, J. Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. *Emerging Infectious Disease*, v.20, n.8, p.1412–1414. 2014.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 372, p. 1231 – 1239, 2015.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva, WHO, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf?ua=1>> Acesso em: 21 out. 2016

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**. 2016. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 07 set. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevenção da transmissão do vírus Zika por via sexual **Atualização das orientações provisórias**. Geneva: WHO, Jun 2016. Disponível em

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204421/5/WHO_ZIKV_MOC_16.1_por.pdf>.
Acesso em: 16 nov. 2016.

YADAV, P.; GOKHALE, M. D.; BARDE, P. V.; SINGH, D. K.; MISHRA, A. C.;
MOURYA, D. T. Experimental Transmission of Chikungunya virus by anopheles stephensi
mosquitoes. **Acta Virologica**, v. 47, p. 45-47, 2003.