

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA –JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Aedes
aegypti* (Linnaeus, 1762) EM ALGUMAS REGIÕES DO
BRASIL.**

ALINE RIBEIRO BRONZATO

BOTUCATU – SP

- 2015 –

ALINE RIBEIRO BRONZATO

ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) EM ALGUMAS REGIÕES DO BRASIL.

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética, do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

BOTUCATU – SP

- 2015 -

DEDICATÓRIA

*Aos amores da minha vida,
minha mãe **Maria das Graças Ribeiro Bronzato**,
meu pai, **João Vicente Bronzato**
e meu irmão, **Leonardo Ribeiro Bronzato**,
por acreditarem em mim e sempre
apoiarem as minhas escolhas.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me possibilitar alcançar mais essa conquista, por me guiar e dar toda a sabedoria e entendimento necessários para concluir este trabalho.

Em especial aos meus queridos pais, Maria das Graças Ribeiro Bronzato e João Vicente Bronzato, por serem meu porto seguro, pelo amor, dedicação e pelo apoio incondicional. Ao meu irmão, Leonardo Ribeiro Bronzato, pelos valiosos conselhos, pelas longas conversas e principalmente pela amizade e companheirismo.

Ao meu orientador, Paulo Eduardo Martins Ribolla, pela orientação e ensinamentos durante a realização deste doutorado e, sobretudo pelas oportunidades que me concedeu, e que fizeram grande diferença em minha carreira profissional e vida pessoal.

Ao meu orientador em Lisboa, Doutor João Soares da Silva Pinto, por me receber em seu grupo, pela oportunidade de realizar meu estágio de doutorado em seu laboratório e por toda a disponibilidade e atenção dispensadas.

À Pós-doutoranda Patrícia Salgueiro por toda a amizade e pela ajuda prestada durante o trabalho e estadia no CMDT, seus ensinamentos foram indispensáveis.

Aos amigos que conquistei no Instituto de Higiene e Medicina Tropical – IHMT: Vasco Gordicho, Gonçalo Seixas, José Luis Vicente, Patrícia Salgueiro, Renato Silva, Monica Guerra, Soraia Rosa e Lis Tavares, pela amizade e por tornarem minha estadia em Portugal mais alegre.

Aos amigos do Pangene, Aline Angella, Ana Teresa, Diego, Giovana, Letícia Nogueira, Leticia Oda, Melina e Rita pelo convívio e troca de experiências ao longo destes quatro anos.

Aos colegas, funcionários e professores do Departamento de Parasitologia, pela agradável convivência. Em particular ao Dr. Newton Madeira pela amizade e orientação durante o estágio de docência e à Dra. Semíramis Guimarães Ferraz Viana pela amizade e valiosos conselhos.

Aos amigos e Funcionários do Instituto de Biotecnologia – IBTEC, pela convivência nestes últimos tempos.

Aos pesquisadores da UFMS, UFPR e CPQR-MG pela colaboração na doação das amostras. Também a Secretaria de Vigilância em Saúde de Botucatu, em especial ao Gumercino e Beatriz pela ajuda durante as coletas de Aedes em Botucatu.

Ao meu querido namorado, Peres Ramos Badial, pelo amor, companheirismo, atenção e toda ajuda, principalmente na reta final deste trabalho. Pelo apoio e incentivo irrestritos durante o estágio-sanduiche em Portugal e por muitas vezes me trazer novamente a razão e acreditar no meu trabalho e capacidade.

A toda minha família, em especial à minha tia Alix, por todo apoio e incentivo durante esses anos.

Aos amigos de república, César Erineudo Tavares de Araújo, Didier Quevedo Cagnini e Ricardo Yamatogi pela convivência e amizade.

Aos meus amigos de Santa Cruz do Rio Pardo, Maringá e Botucatu, que longe ou perto fizeram-se presentes, obrigado pelo carinho e amizade.

A FAPESP pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos utilizada durante o Doutorado-Sanduiche em Lisboa - Portugal.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética pela oportunidade de trabalho concedida.

*“É o tempo da travessia.
E se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado
para sempre à margem
de nós mesmos”.*

(Fernando Pessoa)

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

Aedes aegypti é considerado o principal vetor de arboviroses que acometem os seres humanos. Até o momento a única medida disponível para erradicação da dengue, é o controle do vetor, *Ae. aegypti*. O conhecimento aprofundado sobre a estruturação genética e dinâmica populacional dessa espécie em diferentes ambientes é crucial, uma vez que populações geneticamente diferentes podem apresentar diferenças quanto à capacidade e competência vetorial. O Brasil possui regiões com diferentes características climáticas e geográficas, assim o conhecimento detalhado sobre populações de mosquitos que colonizam diferentes habitats, é pertinente. Este trabalho avaliou a estrutura populacional de mosquitos *Ae. aegypti* provenientes de cinco cidades do Brasil (i.e., Belo Horizonte, Botucatu, Campo Grande, Maringá e Rondonópolis) utilizando marcadores microssatélites. Ainda, empregou-se esses marcadores para investigar a dinâmica de oviposição e consequente dispersão de mosquitos *Ae. aegypti* em Botucatu. Em macro-análises populacionais, utilizando DAPC, observamos agrupamento entre indivíduos de mesma localidade e estruturação populacional para mosquitos de Belo Horizonte. Análises de micro-estruturação populacional identificaram seis sub-populações de mosquitos *Ae. aegypti* entre as seis sub-regiões de Belo Horizonte, ainda foram sugeridas estruturação populacional intermediária para mosquitos das sub-regiões de Campo Grande e falta de estruturação genética entre mosquitos das sub-regiões de Botucatu. Com esses resultados acreditamos que estruturação genética ocorra em correlação com o tamanho da cidade - localidades maiores parecem proporcionar estruturação genética para populações de mosquitos *Ae. aegypti*. Análises de PCA em ovitrampas da cidade de Botucatu apontaram organização populacional de *Ae. aegypti* em famílias. Análises de *Pedigree* e coeficiente de *inbreeding*, indicaram que de 30 mosquitos analisados da mesma ovitrampa, apenas 4 pareceram manter relações restritas de parentesco. Estes resultados sugerem que fêmeas de *Ae. aegypti* copulam com mosquitos que estão mais próximos geograficamente e dispersam seus ovos em diferentes criadouros, auxiliando assim, a manutenção e disseminação de mosquitos e, consequentemente de agentes etiológicos por eles veiculados. Os resultados obtidos na presente pesquisa auxiliarão no entendimento da dispersão de mosquitos *Ae. aegypti*, bem como no desenvolvimento de estratégias direcionadas para redução destes vetores, visando diminuir a transmissão da Dengue, e auxiliar na solução da problemática que o país enfrenta com epidemias da doença.

Palavras-chave: *Ae. aegypti*, microssatélites, macro-micro análise, dispersão.

ABSTRACT

Aedes aegypti is considered the main vector of arboviruses affecting humans. Nowadays, the only feasible measure to eradicate the dengue fever depends exclusively of vector control. The deep knowledge about the structure and dynamics of *Ae. aegypti* population in distinct environments is critical, since genetically different populations may present differences related to vector competence and capacity. Brazil has regions with different climatic and geographic characteristics, therefore, detailed knowledge about mosquito population that colonizes different habitats is extremely important. The present study evaluated the population structure of *Ae. aegypti* mosquitoes in five different Brazilian cities (i.e., Belo Horizonte, Botucatu, Campo Grande, Maringá and Rondonópolis) using a microsatellite markers. Those markers were also used to evaluate the oviposition dynamic and the consequences of *Ae. aegypti* mosquitoes dispersion, of the city of Botucatu. Population macro-analysis, using DAPC evidenced, genetic clusters among individuals of the same locality, and population structure in mosquitoes of Belo Horizonte. Population microstructure analysis identified six sub-populations of *Ae. aegypti* mosquitoes among six sub-regions of Belo Horizonte. In addition, the microstructure analysis suggested intermediate population structure in the sub-regions of Campo Grande, and lack of genetic structure among mosquitoes from the sub-regions of Botucatu. Therefore, these results indicate that genetic organization occurs in correlation with city size – where large towns seem to provide genetic structure to the populations of *Ae. aegypti*. PCA analysis of ovitraps obtained in Botucatu indicated population organization of *Ae. aegypti* mosquitoes in families. *Pedigree* analysis and inbreeding coefficient indicated that only for out of 30 mosquitoes analyzed in the same ovitrap, keep restricted familial relationships. These results suggest that *Ae. aegypti* females mates with mosquitoes geographically close, and scatter their eggs in different breeding sites, supporting the maintenance and dissemination of mosquitoes and, consequently the etiologic agents conveyed by them. The results of the present study assist in the understanding of *Ae. aegypti* mosquitoes dispersion. Also our study may facilitate the development of strategies for mosquito incidence reduction and dengue transmission reduction, helping solve the disease outbreaks that affects Brazil.

Key words: *Aedes aegypti*, microsatellite, macro-micro population analysis, dispersion.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xxi
I. REVISÃO DE LITERATURA	26
1.1. Mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) – Conceitos iniciais.....	26
1.2. <i>Aedes aegypti</i> como vetor de doenças.....	32
1.3. Dengue: Conceitos da doença	35
1.4. Dengue: História da dispersão da doença no mundo.	37
1.5. Dengue no Brasil: História e dados atuais.	39
1.6. Medidas de controle da Dengue.....	41
1.7. Polimorfismos de marcadores moleculares.....	42
1.8. Microsatélites	44
1.9. Genética de Populações de <i>Aedes aegypti</i>	46
II. OBJETIVOS	50
2.1. Objetivos Gerais:.....	50
2.2. Objetivos específicos:	50
III. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1. GENOTIPAGEM POR MICROSATÉLITES.....	53
a) Amostragem	53
b) Extração e quantificação do DNA.....	53
c) Metodologia de marcadores microsatélites.....	54
d) Multiplex	59
3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS GENÉTICOS	62
A. <i>Software R</i>	62
B. Frequências alélicas, Heterozigotia Esperada e Observada e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).	63
C. Diversidade Alélica, Diversidade Genotípica, Riqueza Alélica e Coeficiente de Endogamia	63
D. Desequilíbrio de ligação.....	64

E. Estruturação populacional	65
F. Análise de Máxima Verosimilhança.....	66
G. Coeficiente de <i>Inbreeding (F)</i>	66
IV. CAPÍTULO I	68
MACRO E MICRO ESTUDO POPULACIONAL DE MOSQUITOS <i>Ae. aegypti</i> EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.....	68
4.1. Justificativa	68
4.2. Características das áreas Amostradas.....	69
4.3. Resultados	77
4.4. Discussão	109
V. CAPÍTULO II	115
ANÁLISE DE DISPERSÃO GENÉTICA DE MOSQUITOS <i>Ae. aegypti</i> NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU – SP	115
5.1. Justificativa	115
5.2. Obtenção das amostras.....	115
5.3. Delineamento do estudo populacional	118
5.4. Resultados	119
5.5. Discussão	141
VI. CONCLUSÕES	146
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148
VIII. ANEXOS	160
Anexo 1. Figura 54. Atribuição de <i>Membership</i> . <i>Heat colors</i> representam probabilidades de adesão (vermelho = 1, branco = 0); cruces azuis representam o <i>cluster</i> original. Eixo x: populações em estudo; Eixo y: indivíduos de Belo Horizonte. Figuras: A. <i>membership</i> para a população de BH; B. <i>membership</i> para a população de BTU; C. <i>membership</i> para a população de CG; D. <i>membership</i> para a população de MAR; E. <i>membership</i> para a população de RON. Figuras geradas pelo <i>Software R</i> , pacote <i>adegenet</i>	165
Anexo 2. Figura 55. Dendrograma de Distância Genética de Bruvo's. Árvore de distância genética calculada pela estatística de Bruvo's após clusterização dos dados com BIC (baseado em <i>K-means</i>), <i>bootstrap</i> de . Figuras A: Distância genética entre os indivíduos das 4 sub-regiões de BTU; B. Distância genética entre indivíduos das 6 sub-regiões de BH; C. Distância genética entre indivíduos das 7 sub-regiões de CG. Dendrogramas gerados pelo <i>Software R</i> , pacote <i>poppr</i>	170

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- ADL: Avaliação de Densidade Larvária
- BH: Belo Horizonte
- BIC: Critérios de Informações *Bayesiana*
- BTU: Botucatu
- °C: Graus Celsius
- CCZ: Centro de Controle de Zoonoses
- CG: Campo Grande
- CHIK-V: Vírus *Chikungunya*
- CMDT: Centro de Malária e outras Doenças Tropicais
- DAPC: Análise Discriminante de Componente Principal
- H₂O *milli-Q*: água *milli-Q*
- DL – desequilíbrio de ligação
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- dNTPs: *deoxynucleotide triphosphates* (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- DEN-1: vírus dengue, sorotipo I
- DEN -2: vírus dengue, sorotipo II
- DEN-3: vírus dengue, sorotipo III
- DEN-4: vírus dengue, sorotipo IV
- *F*: Coeficiente de *Inbreeding*
- FAM: corante fluorescente para oligonucleotídeos (cor azul)
- *Fis*: coeficiente de endogamia
- *Fst*: índice de fixação
- *FS*: *Full-Sibs* (irmãos completos)
- *He*: Heterozigosidade esperada
- HEX: corante fluorescente para oligonucleotídeos (cor verde)
- *Ho* – Heterozigosidade observada
- *HS*: *Half-Sibs* (meio-irmãos)
- HWD: Desvio/Desequilíbrio de Hardy-Weinberg
- HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg
- *I_A*: Índice de associação
- IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IHMT: Instituto de Higiene e Medicina Tropical
- L1: larva de primeiro estágio
- L2: larva de segundo estágio
- L3: larva de terceiro estágio
- L4: larva de quarto estágio
- LIRAA: Levantamento Rápido de Índices para *Ae. aegypti*
- Km: quilômetros
- M: Molar
- M-13: oligonucleotídeo complementar para marcação fluorescente
- MAR: Maringá
- *MLG*: *Multilocus Genotype* (Genótipos *Multilocus*)
- mM: Milimolar (10⁻³ molar)
- μl: Microlitros (10⁻⁶ litros)
- μM: Micromolar (10⁻⁶ molar)
- MgCl₂: Cloreto de magnésio

- NED: corante fluorescente para oligonucleotídeos (cor amarelo)
- ng: nanogramas (10^{-9} g)
- nM: nanomolar
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- OPAS: Organização Pan-americana de Saúde
- pb: pares de bases
- PCA: Análise de Componente Principal
- PCR: (Polymerase Chain Reaction) - Reação em Cadeia da DNA Polimerase
- PO: *Parent-Offspring* (pais e filhos)
- Primer F: oligonucleotídeo iniciador *forward*
- Primer R: oligonucleotídeo iniciador *reverse*
- r^2 : Índice de associação randomizado
- RON: Rondonópolis
- ROX500: padrão de peso molecular de 35-500pb
- SESAU: Secretaria Municipal de Saúde Pública (Campo Grande)
- SMSA: Secretaria Municipal de Saúde Ambiental (Belo Horizonte)
- SSRs: sequências simples repetidas
- SVA: Secretaria de Vigilância Ambiental (Rondonópolis)
- TBE: tampão para eletroforese e gel de agarose (Tris-Borato-EDTA)
- U: Unidades
- UNESP: Universidade Estadual Paulista
- UNL: Universidade Nova de Lisboa
- U: *unrelated* (indivíduos não relacionados geneticamente)
- UV: luz ultra-violeta;
- VAS: Vigilância Ambiental em Saúde (Botucatu)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Aedes aegypti*.** A) *Aedes aegypti* macho (Foto: Marcos Teixeira de Freitas, Flickr); B) *Aedes aegypti* fêmea (Foto: Centers for Disease Control and Prevention – CDC)..... 26
- Figura 2. Imagens - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.** Adaptado de: Centers for Disease Control - CDC. http://www.cdc.gov/Dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html; e <http://www.riocontradengue.com.br/Site/Conteudo/Porque.aspx>. 28
- Figura 3. Distribuição de *Aedes aegypti* no mundo.** Espécie encontrada em geral entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul do globo, área representada pelas faixas vermelhas superior e inferior na figura. Fonte: Imagem adaptada do website: <http://auladengue.ioc.fiocruz.br/> 29
- Figura 4. Possíveis criadouros de *Ae. aegypti* no extradomicílio.** Fotos de Campo Grande – MS, durante a distribuição das ovitrampas na cidade. A coleta foi realizada em parceria com a Secretaria de Saúde e Controle de Zoonoses do Município e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMT.....31
- Figura 5. Mapas de incidência de Febre Amarela.** Febre Amarela no mundo em 2008. Fonte: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>..... 33
- Figura 6. Mapas de incidência de Febre Chicungunya no mundo.** Incidência de casos com carácter de transmissão autóctone da doença. Fonte: (CDC, 2015). http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/ChikungunyaWorldMap_03-10-2015.pdf.....35
- Figura 7. Ciclo de transmissão da Dengue.** Transmissão horizontal da doença. Imagem adaptada de <http://laboratoriobiolider.com.br/dengue.html>..... 37
- Figura 8. Mapa de distribuição da Dengue no mundo.** A legenda abaixo da figura possui informações sobre os locais acometidos ou não pela Dengue e a incidência da doença a níveis de país e/ou estados/localidades). Fonte: <http://www.healthmap.org/dengue/pt/>..... 39
- Figura 9. Microssatélites.** Fonte: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Microsatellite+Repeats&lang=1 46
- Figura 10. Esquema de amplificação (PCR) primers M-13 acoplados.** A e B. Iniciadores específicos de microssatélites – caixas tracejadas; C. M-13 seqüência universal de M-13 (caixa cinza ondulada, e a estrela indica a fluorescência FAM. D. Primer M13(-21) incorporada nos produtos de PCR, durante os primeiros ciclos. E) Primer universal M13(-21) marcado com FAM, a incorporação ocorre durante os ciclos subsequentes. F) Produto final marcado com fluorescência que poderá ser analisado em sequenciadores automáticos. Fonte: <http://biotech.nature.com>..... 54
- Figura 11. Programa dos ciclos da PCR.** Condições utilizadas para os primers desenvolvidos por Brown et al. (2011) e Slotman et al. (2007). 55
- Figura 12. Programa dos ciclos da PCR.** Condições utilizadas para primers desenvolvidas por Lovin et al. (2009). 56
- Figura 13. Confirmação de amplificação da reação de PCR.** Gel de Agarose [2%], (MM) Marcador de peso Molecular de 100pb; (N) Controle Negativo. Exemplo de confirmação de amplificação de mosquitos *Ae. aegypti* com os primers AC7-FAM (A); e B3-HEX (B) marcados com fluorescência. Amplificação satisfatória em todos os indivíduos (presença de bandas)..... 57

- Figura 14. Eletroferogramas.** Exemplos de ampliações satisfatórias de mosquitos *Ae. aegypti* com os *primers* A. AG2-[HEX] (picos verdes), indivíduo heterozigoto para os tamanhos de alelos 116.6 e 156.3pb; B. AC2[FAM] (pico azul), indivíduo homozigoto para o alelo 187.4pb. O marcador de peso molecular ROX500 aparece em vermelho. 61
- Figura 15. Mapa das cinco regiões amostradas.** Partes coloridas: Estado de Origem das amostras; Estrelas: referenciam os municípios de coleta, com escalas aproximadas. Figura adaptada da página do *Google Maps*. 69
- Figura 16. Mapa das sub-regiões amostradas em Belo Horizonte.** Cores em gradiente de verde representam as regiões amostradas, e os números em vermelho, a identificação de cada Regional segundo informações prévias da Secretaria de Saúde local. Fonte: Mapa adaptado do *Google Maps*. 71
- Figura 17. Mapa das sub-regiões amostradas em Botucatu.** Cores em gradiente de azul representam as regiões amostradas, e os números em vermelho, a identificação de cada Regional segundo informações prévias da Secretaria de Vigilância Ambiental em Saúde. Fonte: Mapa adaptado do *Google Maps*. 73
- Figura 18. Mapa das sub-regiões amostradas em Campo Grande.** Cores em vermelho representam as regiões amostradas, e os números em preto, a identificação de cada Bairro segundo informações prévias da Secretaria Municipal de Saúde Pública (Sesau e CCZ). Fonte: Mapa adaptado do *Google Maps*. 75
- Figura 19. Curva de acúmulo de Genótipo.** *Eixo y*: número de indivíduos genotipados; *Eixo x*: número de *loci* utilizados para genotipagem. Os pontos pretos indicam a variabilidade esperada e as caixas brancas a distribuição dos dados. 78
- Figura 20. Porcentagem de missing data.** Porcentagem de dados faltantes. O *heat map* ao lado da figura determina quais *loci* e populações possuem menor ou maior porcentagem de informações faltantes. *Eixo x*: populações em estudo; *eixo y*: *loci* utilizados para genotipagem. Cor azul representam *loci* com até 5% de *missing data*; Cor amarela representam *loci* com mais de 50% de *missing data*. 79
- Figura 21. Frequências Alélicas para cada locus e Populações.** Populações: MG – Belo Horizonte; BT – Botucatu; MS – Campo Grande; PR – Maringá; MT – Rondonópolis; Legenda de cada gráfico- **Eixo x**: as cinco populações em estudo; Barras coloridas: os alelos identificados (legenda para cada barra/alelo localizada abaixo de cada gráfico, com o tamanho dos alelos em pb); **Eixo y**: porcentagem para cada alelo, em cada população. 83
- Figura 22. Histogramas de desequilíbrio de ligação.** Linha azul pontilhada: distribuição observada dos dados; Barra cinza: distribuição esperada para os dados após 1.000 testes permutacionais. Foram calculados dois índices para testar desequilíbrio de ligação, (I_d) - histogramas à esquerda da figura; (r^{-d}) - histogramas à direita da figura. Imagens geradas pelo *Software R*, pacote *poppr*. 87
- Figura 23. Significância de Variações.** Significância das variações entre três diferentes hierarquias. Análises baseadas em AMOVA. Barras em cinza: distribuição esperada para os dados; linha vertical preta: dados observados; Figuras A, B e C referem-se aos testes realizados para análise de variância. Gráfico gerado no *Software R* com o pacote *ade4*. 90
- Figura 24. Representação Gráfica gerada pelo programa Structure.** Assumido $K=2$. *Eixo x*: os números correspondem às seguintes localidades: 1 – Belo Horizonte; 2 – Botucatu; 3 – Campo Grande; 4 – Maringá e 5 – Rondonópolis; *Eixo y*: Probabilidade de cada indivíduo pertencer ao *cluster* que foi atribuído. 91

- Figura 25. DAPC para as cinco populações em estudo.** **A.** Valores retidos de PCAs e Valores de *Eigenvalues* para discriminação das cinco populações em estudo; **B.** Gráfico de dispersão dos indivíduos das cinco populações em estudo, considerando o primeiro (eixo x) e o segundo (eixo y), componentes principais - pontos representam os indivíduos e as elipses a delimitação para cada agrupamento; **C.** Gráfico de funções discriminantes – considerando o primeiro componente discriminatório. Cada pico representa os indivíduos de uma população, legenda das cores e populações ao lado da figura. 93
- Figura 26. Valores de BIC para a população de Botucatu.** Valor ideal de BIC para *clusterização* dos dados referentes às sub-regiões de Botucatu indicado pelo cotovelo no eixo do gráfico. Gráfico gerado pelo *software R*, pacote *poppr*. 96
- Figura 27. DAPC para as sub-regiões de Botucatu.** **A.** Gráfico de dispersão dos agrupamentos considerando os dois principais componentes discriminativos (eixos x e y) - pontos representam os indivíduos e as elipses a delimitação para cada agrupamento; **B.** Mapa do município de Botucatu com as sub-regiões de coleta 1, 2, 3 e 4; **C.** Tabela de contingência para atribuição de indivíduos, colunas: se referem ao *cluster* original; linhas se referem as novas inferências. Gráficos gerados pelo Programa *R*, pacote *poppr* e mapa de Botucatu adaptado do *Google maps*. 98
- Figura 28. Valores de BIC para a população de Belo Horizonte.** Valor ideal de BIC para *clusterização* dos dados referentes às sub-regiões de Belo Horizonte, indicado pelo cotovelo no eixo x do gráfico. Gráfico gerado pelo *software R*, pacote *poppr*. 100
- Figura 29. DAPC para as sub-regiões de Belo Horizonte.** **A.** Gráfico de dispersão dos agrupamentos considerando o primeiro (eixo x) e segundo (eixo y) componentes - pontos representam os indivíduos e as elipses a delimitação para cada agrupamento; **B.** Mapa do município de Belo Horizonte com as sub-regiões de coleta 1, 2, 4, 5, 7, 8 e 9; **C.** Tabela de contingência para atribuição de indivíduos, colunas: se referem ao *cluster* original; linhas se referem as novas inferências. Gráficos gerados pelo programa *R*, pacote *poppr* e mapa da cidade de Belo Horizonte adaptado do *Google maps*. 102
- Figura 30. Atribuição de Membership para a população de Belo Horizonte.** Cores em *Heat color* representam probabilidades de filiação de cada indivíduo (vermelho = 1, branco = 0); cruzes azuis representam o *cluster* de origem. Eixo y: mosquitos provenientes do município de Belo Horizonte; Eixo x: Sub-regiões amostradas de Belo Horizonte. 103
- Figura 31. Valores de BIC para a população de Campo Grande.** Valor ideal de BIC para *clusterização* dos dados referentes às sub-regiões de Campo Grande, indicado pelo cotovelo no eixo x do gráfico. Gráfico gerado pelo *software R*, pacote *poppr*. 105
- Figura 32. DAPC para as sub-regiões de Campo Grande.** **A.** Gráfico de dispersão dos agrupamentos considerando os dois principais componentes discriminatórios (eixo x e eixo y)- pontos representam os indivíduos e as elipses a delimitação para cada agrupamento; **B.** Mapa do município de Belo Horizonte com as sub-regiões de coleta 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; **C.** Tabela de contingência para atribuição de indivíduos, colunas: se referem ao *cluster* original; linhas se referem as novas inferências. Gráficos gerados pelo *Software R*, pacote *poppr*. Mapa do Município de Campo Grande adaptado do *Google maps*. 107
- Figura 33. Gráfico de funções discriminantes para as sub-regionais de CG.** Considerando somente o primeiro componente discriminatório. Picos referenciam as sete sub-regiões de Campo Grande, legenda das cores e populações encontram-se ao lado da figura. Gráfico gerado pelo *Software R*, pacote *poppr*. 108

- Figura 34. Ovitrapas.** Armaldilha elaborada por Fay & Eliason (1966), e utilizada em nosso estudo para amostragem de mosquitos *Ae. aegypti* em estudos de dispersão..... 116
- Figura 35. Ovitrapas amostradas.** A. Mapa de Botucatu, identificando as áreas III e IV; B. Ovitrapas obtidas da área III, quadrante de origem da ovitrapa e distância em Km de uma ovitrapa para outra. C. Ovitrapas obtidas da área IV, quadrante de origem da ovitrapa e distância em Km de uma palheta para outra. Mapa de Botucatu gerado no *Google Earth* com adaptações..... 117
- Figura 36. Heat map de HWE.** O gráfico identifica valores de $p \leq 0,05$ para HWD (cores em vermelho); Eixo x: identificação de cada ovitrapa; Eixo y: *loci* analisados. Figura gerada pelo *Software R*, pacote *poppr*..... 121
- Figura 37. Histogramas de Desequilíbrio de ligação.** Colunas cinzas: distribuição esperada para os dados após 1.000 testes permutacionais; Linha pontilhada azul: dados observados. Histogramas gerados pelo *Software R*, pacote *poppr*..... 123
- Figura 38. Análise de PCA.** Análises de PCA considerando os primeiro (eixo x) e segundo componentes (eixo y). A. PCA entre mosquitos da área III e IV; B. PCA para as ovitrapas provenientes da área III; C. PCA para as ovitrapas provenientes da área IV. Abaixo nas figuras, valores de *Eigenvalues* para discriminação dos dados. 126
- Figura 39. Análise de DAPC.** Considerando os primeiro (eixo x) e segundo (eixo y) componentes. A. DAPC entre mosquitos da área III e IV; B. DAPC para as ovitrapas provenientes da área III; C. DAPC para as ovitrapas provenientes da área IV. Identificação para cada ovitrapa pode ser consultada na tabela acima da figura. 127
- Figura 40. Análises de membership para ovitrapas das áreas III e IV.** A e C: tabela de contingência para atribuição de indivíduos: colunas representam os clusters originais e linhas as posteriores atribuições para indivíduos das ovitrapas da área III e IV respectivamente; B-D. Atribuições de *membership* para ovitrapas da área III e IV, respectivamente (eixo x: ovitrapas; eixo y: probabilidade de atribuição de cada indivíduo). 129
- Figura 41. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitrapa 110.** A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*. 131
- Figura 42. Probabilidade de inbreeding individual para indivíduos da ovitrapa 110.** Gráficos representam os quatro indivíduos identificados nas análises de coeficiente *F* com maior *Inbreeding*. Probabilidades para o indivíduo 4: 100%; Indivíduos 6 e 7: 70%; Indivíduo 27: 80%. Gráficos gerados no *Software R*, pacote *adegenet*..... 131
- Figura 43. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitrapa 117.** A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*. 132
- Figura 44. Probabilidade de inbreeding individual para indivíduos da ovitrapa 117.** Gráficos representam os quatro indivíduos identificados nas análises de coeficiente *F* com maior *Inbreeding*. Probabilidades para todos os indivíduos de 80%. Gráficos gerados no *Software R*, pacote *adegenet*. 133

- Figura 45. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitrampa 122.** A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*. 134
- Figura 46. Probabilidade de *inbreeding* individual para indivíduo da ovitrampa 122.** O Gráfico representa o indivíduo 30, identificado pelo coeficiente *F* com maior *Inbreeding*. Probabilidades de *inbreeding* de 60%. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*. 134
- Figura 47. Análises de parentesco entre mosquitos das ovitrampas 110 e 122.** Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda no eixo da figura identifica os *Pedigrees* (U: não relacionados geneticamente; HS: meio irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos)..... 135
- Figura 48. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitrampa 154.** A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*. 136
- Figura 49. Probabilidade de *inbreeding* para indivíduo da ovitrampa 154.** O Gráfico representa o indivíduo 10, identificado pelo coeficiente *F* com maior *Inbreeding*. Probabilidades de *inbreeding* de 60%. Gráfico gerado em no *Software R*, pacote *adegenet*. 137
- Figura 50. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitrampa 173.** A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*. 138
- Figura 51. Probabilidade de *inbreeding* individual para indivíduos da ovitrampa 173.** Gráficos representam os dois indivíduos identificados pelo coeficiente *F* com maior *Inbreeding*. Probabilidades para ambos indivíduos de 100%. Gráficos gerados no *Software R*, pacote *adegenet*. 138
- Figura 52. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitrampa 110.** A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*. 139
- Figura 53. Análises de parentesco entre mosquitos das ovitrampas 173 e 176.** Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda no eixo da figura identifica os *Pedigrees* (U: não relacionados geneticamente; HS: meio irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos)..... 140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições da reação de PCR para amplificação de <i>loci</i> microssatélites. Condições utilizadas para <i>primers</i> desenvolvidos por Brown et al. (2011) e Slotman et al. (2007).	55
Tabela 2. Condições da reação de PCR para amplificação de <i>loci</i> microssatélites. Condições utilizadas para <i>primers</i> desenvolvidos por Lovin et al. (2009).	56
Tabela 3. Características gerais dos Microssatélites utilizados no estudo 1 e 2. Nome dos <i>Loci</i> , Fluoróforo, Tamanho esperado de amplificação, Sequência dos primers, Temperatura de Anelamento e Referência de cada par de <i>primer</i>	58
Tabela 4. Esquema de multiplex. Padrão de multiplex utilizado no trabalho referente ao capítulo I.	60
Tabela 5. Esquema de multiplex. Padrão de multiplex utilizado no trabalho referente ao capítulo II.	60
Tabela 6. Descrição da amostragem. Cidade e Estado de origem das amostras; Método de coleta de ovos de <i>Ae. aegypti</i> utilizado pela Secretaria de Saúde Local; Quantidade de Amostras por localidade e Abreviaturas utilizadas neste trabalho para identificação de cada localidade em Tabelas e Figuras.	68
Tabela 7. Diversidade Genotípica. Pop: nome das populações; N: número de indivíduos observados; <i>oMLG</i> : número de genótipos <i>multiocus</i> observado; <i>eMLG</i> : Número de genótipos <i>multilocus</i> esperado (com base no menor número amostras – 58); SE: erro padrão baseado em MLG; H: índice de Shannon-Wiener; G: índice de Stoddart e Taylor; Hexp: Heterozigosidade esperada - Nei; E = índice de uniformidade. (Valores calculados pelo pacote <i>poppr</i> , <i>Software R</i>).	81
Tabela 8. Diversidade Genética dos indivíduos das 5 diferentes regiões analisadas neste trabalho. N: número de indivíduos genotipados. Número de Alelos; Riqueza Alélica por <i>locus</i> e por população; Allelic Richness per <i>locus</i> and population baseado no número mínimo de amostras (38 indivíduos) calculado no FSTAT; Ho: Heterozigosidade Observada; He: Heterozigosidade esperada, calculadas no Arlequin v3.1; FIS coeficiente de endogamia, calculado no FSTAT e P: Alelos Privados (média). Os valores em negrito indicam os <i>loci</i> em desequilíbrio de Hardy-Weinberg após a Correção de Bonferroni com **p < 0.005	84
Tabela 9. Desequilíbrio de ligação. I_A = Índice de associação entre os indivíduos; pI_A = valor de p do índice de associação; r^{-d} = índice de associação standardizado; pr^{-d} = valor de p de r^{-d} . Valores gerados através do <i>Software R</i> utilizando o pacote de dados <i>poppr</i>	85
Tabela 10. Índices de fixação F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) obtidos entre pares de populações e para o total de <i>loci</i> microssatélite analisados. Valores calculados com o Programa Arlequin. Valores de $p \leq 0.001$	88
Tabela 11. Significância de variações. Significância das variações entre três diferentes hierarquias. Análises baseadas em Análise de Variância Molecular (AMOVA). Testes gerados no <i>Software R</i> com o pacote <i>ade4</i>	89
Tabela 12. Definição das regiões. Determinação das sub-regiões para as três localidades. Dados delineados a partir das informações obtidas nos órgãos responsáveis pela distribuição e coleta das ovitrampas em cada Município.	95

Tabela 13. Características das áreas amostradas. Amostra: tipo de amostra coletada no campo; Área: área de origem das ovitrampas; Ovitrapa: identificação da Ovitrapa/Palheta; Total de indivíduos: número total de indivíduos de cada palheta; N: total de amostras por área. 118

Tabela 14. Diversidade Genética dos indivíduos das 2 diferentes áreas de coleta em Botucatu analisadas. Número de Alelos; Riqueza Alélica por *locus* e por população baseado no número mínimo de amostras (47 indivíduos) calculado no FSTAT; H_o : Heterozigosidade Observada; H_e : Heterozigosidade esperada, calculadas no Arlequin v3.1; FIS coeficiente de endogamia, calculado no FSTAT e P: Alelos Privados (média). Os valores em negrito, indicam os *loci* em desequilíbrio de Hardy–Weinberg após a Correção de Bonferroni com $**p < 0.001$ 120

Tabela 15. Desequilíbrio de ligação. I_A = Índice de associação entre os indivíduos; pI_A = valor de p do índice de associação; $r^{\bar{d}}$ = índice de associação standardizado ; $pr^{\bar{d}}$ = valor de p de $r^{\bar{d}}$. Valores gerados através do *Software R* utilizando o pacote de dados *poppr*. 122

Tabela 16. Índices de fixação F_{ST} . Valores obtidos entre pares de populações e para o total de *loci* microssatélite analisados. Valor de $p \leq 0,0001$ 124

REVISÃO DE LITERATURA

I. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) – Conceitos iniciais.

Mosquitos pertencentes à ordem Díptera e família Culicidae, são divididos em três subfamílias: Culicinae, Anophelinae e Toxoryhynchitinae (Knight & Stone, 1977). Algumas espécies pertencentes à subfamília Culicinae atuam como vetores de importantes doenças relacionadas ao homem (Forattini, 2002).

Dentre os mosquitos da subfamília Culicinae destaca-se o mosquito *Aedes aegypti*, essa espécie é considerada importante para a saúde pública mundial, já que é capaz de transmitir diferentes vírus aos seres humanos (Gubler, 2002).

Ae. aegypti oficialmente conhecido como o "mosquito da Febre Amarela" é talvez um dos mosquitos mais estudado e geneticamente caracterizado dentro desta família (Failloux et al., 2002). Nos dias atuais é incriminado como principal vetor de vírus como Dengue, Febre Amarela e Febre *Chikungunya* (Gubler, 2002; Charrel et al., 2007).

Morfologicamente, *Ae. aegypti* é de pequeno a médio porte, com cerca de 4-7 milímetros de comprimento (**Figura 1. A-B**). Os adultos desta espécie possuem escamas brancas na superfície dorsal superior do tórax, que formam a figura de um violino ou lira. Cada segmento tarsal das pernas traseiras possui bandas basais brancas, formando listras. O abdômen é geralmente marrom escuro com escamas brancas (Carpenter & Lacasse 1955).

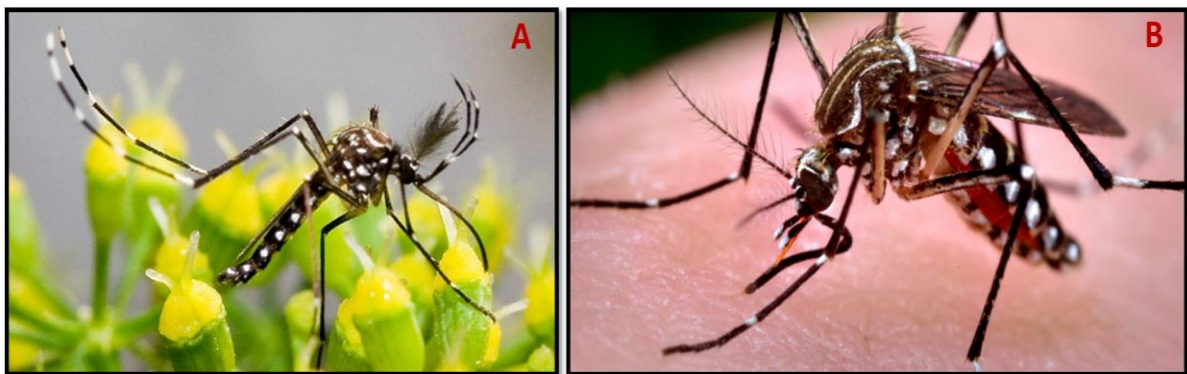


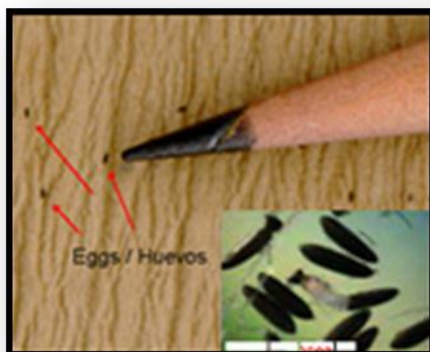
Figura 1. *Aedes aegypti*. A) *Aedes aegypti* macho (Foto: Marcos Teixeira de Freitas, Flickr); B) *Aedes aegypti* fêmea (Foto: Centers for Disease Control and Prevention – CDC).

As fêmeas *Ae. aegypti* são geralmente maiores que os machos e distinguem-se por possuírem pequenos palpos com escamas brancas. Ainda, machos têm antenas plumosas (**Figura 1. A**), enquanto que as fêmeas possuem cerdas, mas estas são mais esparsas (**Figura 1. B**). O aparelho bucal masculino é adaptado para a alimentação nectífera, enquanto que o feminino é modificado para a alimentação sanguínea (Cutwa-Francis & O'Meara 2007).

Mosquitos *Aedes aegypti* têm o ciclo de vida dividido em quatro fases (Nelson, 1986; Honório, 1999):

1ª Fase: Ovo

Fase inicial do mosquito, de formato alongado e fusiforme, inicialmente os ovos são brancos e posteriormente escurecem quando em contato com o oxigênio, presente no meio ambiente. Medem aproximadamente 0,4mm de comprimento e são depositados pela fêmea na parede interna dos criadouros, geralmente próximos à superfície da água. Em condições favoráveis de temperatura e umidade, a eclosão ocorre entre dois e três dias após a postura. Podem resistir a longos períodos de dessecação (até 450 dias). Em média, cada fêmea pode colocar de 100 a 200 ovos por oviposição, e realizar até 5 posturas durante sua vida.



2ª Fase: Larva

Fase essencialmente aquática e caracterizada por quatro estádios (L1, L2, L3 e L4). É a fase de crescimento, pois neste período as larvas alimentam-se do material orgânico acumulado nas paredes e no fundo dos criadouros. Obtêm oxigênio através do sifão, localizado na parte posterior do corpo que fica acima da superfície da água, enquanto que o restante do corpo permanece submerso verticalmente. O desenvolvimento completo pode ocorrer entre 5 a 10 dias e é dependente da temperatura, mosquitos *Aedes* podem permanecer na fase larval durante meses, desde que o fornecimento de água seja suficiente para sua manutenção.



3ª Fase: Pupa

Fase essencialmente aquática. Pupas de mosquitos, diferentemente de outros insetos holometábolos, são móveis e respondem a estímulos. Essas não se alimentam durante o período pupal que ocorre em média de 2 a 3 dias. Na transição de pupa para adulto ocorrem transformações que levam a formação do adulto e a mudança do hábito aquático pelo terrestre. Essa modificação ocorre através da ingestão de ar, que faz com que o abdômen se estenda e rompa a caixa pupal, emergindo primeiramente a cabeça do inseto adulto. Geralmente os machos se desenvolvem primeiro do que as fêmeas.



4ª Fase: Adulto

Representa a fase reprodutiva do inseto, e onde ocorre a dispersão da espécie. Os adultos vivem em média 45 dias e completam o ciclo de ovo-adulto em um curto espaço de tempo, geralmente entre 10 e 15 dias. O desenvolvimento completo de mosquitos *Aedes aegypti* está diretamente relacionado a temperatura, disponibilidade de alimento e densidade populacional do criadouro, já que durante o estágio larval pode ocorrer competição entre as larvas por alimento dentro do criadouro.



Figura 2. Imagens - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Adaptado de: *Centers for Disease Control - CDC*. http://www.cdc.gov/Dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html; e <http://www.riocntradengue.com.br/Site/Conteudo/Porque.aspx>.

Tanto o macho quanto a fêmea de mosquitos *Aedes aegypti* se alimentam de substâncias que contêm açúcar (néctar e seiva de plantas), todavia as fêmeas necessitam de

sangue em sua dieta alimentar. Estas possuem hábito alimentar crepuscular, realizando a hematofagia nas primeiras horas da manhã até as últimas da tarde, entretanto, devido à disponibilidade de alimento podem também se alimentar de sangue durante a noite (Fundação Oswaldo Cruz, 2008).

Embora possam ocasionalmente se alimentar com sangue antes da cópula, as fêmeas de *A. aegypti* intensificam a voracidade pela hematofagia após a fecundação, quando precisam ingerir sangue para a maturação dos ovários e desenvolvimento completo dos ovos. Normalmente, três dias após a ingestão de sangue as fêmeas já estão aptas para a postura, passando então a procurar um local para desovar, estas podem alimentar-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, aumentando a capacidade deste vetor em transmitir vírus (Barata et al., 2001).

A espécie *Ae. aegypti* tem distribuição mundial, em geral encontrada nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul que correspondem à isoterma de inverno de 10°C (Bancroft, 1906). Acredita-se que mosquitos *Ae. aegypti* tiveram sua origem no Continente Africano, especialmente na região do Egito, local onde se encontra o maior número de representantes do subgênero *Stegomyia* e onde ocorrem as espécies mais estreitamente relacionadas ao *Ae. aegypti* (**Figura 3**) (Mattingly, 1957).



Figura 3. Distribuição de *Aedes aegypti* no mundo. Espécie encontrada em geral entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul do globo, área representada pelas faixas vermelhas superior e inferior na figura. Fonte: Imagem adaptada do website: <http://auladengue.ioc.fiocruz.br/>

São consideradas duas subespécies de *Ae. aegypti*, estas foram primeiramente identificadas com base na morfologia e distribuição geográfica, *Ae. aegypti formosus* de coloração castanho escura habita áreas silvestres do deserto do Saara, enquanto que *Ae. aegypti aegypti* de coloração castanha coloniza ambientes urbanos domésticos, e possui distribuição mais abrangente, desde as planícies costeiras da África até as Américas, e Sudeste da Ásia e Pacífico (Tabachnick & Powell, 1979).

Acredita-se que *Ae. aegypti* foi introduzido nas Américas entre os séculos XV e XVIII vindo da África, provavelmente devido ao intenso comércio entre estas áreas (Powell & Tabachnick, 2013). Tais hipóteses são levantadas por estudos que indicam mosquitos *Ae. aegypti formosus* como ancestral do mosquito *Ae. aegypti* que existe hoje. Este ancestral selvagem viveu na África Sub-Saariana e tinha hábitos parecidos com a forma atual do mosquito domiciliado (Tabachnick, 1991).

Esta possibilidade de parentesco entre *Ae. aegypti* e *Ae. aegypti formosus* foi sugerida devido a um processo seletivo decorrente da destruição dos habitats naturais pelos seres humano, este mosquito então se adaptou às áreas alteradas e, posteriormente, encontrou nos aglomerados humanos o ambiente adequado à sua sobrevivência, tanto para captação de alimento quanto recipientes para postura dos ovos. A adaptação aos criadouros artificiais teria sido um grande passo em direção ao comportamento sinantrópico (Christophers, 1960).

A partir da África o mosquito adaptado (é provável que este, anteriormente, tenha se adaptado ao domicílio e transporte humano) se dispersou pelo mundo de forma passiva através das rotas comerciais entre os séculos XVII e XIX. No continente Americano, por exemplo, sua presença está associada ao intenso tráfego de navios negreiros provenientes da África Ocidental na época da colonização (Forattini, 1965; Tabachnick, 1991; Powell & Tabachnick, 2013).

Recentemente, Brown et al. (2013b) confirmaram as suposições sobre a origem e dispersão de *Ae. aegypti*. Fortes indícios foram atribuídos para a origem deste mosquito ter ocorrido no Continente Africano, onde uma forma domiciliada surgiu e se espalhou por todo o mundo tropical e subtropical devido ao comércio e movimentação humana. Os resultados confirmaram ascendência Africana das espécies estudadas e ainda levantou-se uma consistente hipótese de que nas rotas comerciais, humanos dispersaram *Ae. aegypti domiciliado* da África em direção ao Novo Mundo, seguido de uma invasão tardia do Novo Mundo para o Sudeste da Ásia e do Pacífico.

No Brasil *Ae. aegypti* está restrito às cidades, sempre ligado ao peridomicílio e domicílio humano. Ambos os sexos são encontrados em proporções semelhantes dentro das casas e peridomicílio, isso acontece após a emergência dos adultos que dirigem-se e/ou permanecem próximos às casas e ali copulam, obtêm seus alimentos e desovam. Tal dinâmica reprodutiva só é possível devido às condições domiciliares ou peridomiciliares humanas que auxiliam a dispersão do mosquito (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A preferência de oviposição de mosquitos *Aedes* por criadouros artificiais e a disponibilidade de alimentação de sangue humano faz com que a concentração populacional advinda com a urbanização e a grande oferta de recipientes artificiais sejam fatores determinantes na crescente proliferação destes mosquitos nos centros urbanos. Criadouros artificiais são todos os materiais abandonados, tais como pneus, latas, vasos de plantas, caixas d'água, piscinas, etc, que servem como reservatórios para acumular água (**Figura 4**). Esses criadouros são escolhidos pelas fêmeas de *Aedes*, pois são substratos úmidos, próximos à água ou local inundável, garantindo a eclosão e desenvolvimento das larvas (Gadelha & Toda, 1985; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).



Figura 4. Possíveis criadouros de *Ae. aegypti* no extradomicílio. Fotos de Campo Grande – MS, durante a distribuição das ovitrampas na cidade. A coleta foi realizada em parceria com a Secretaria de Saúde e Controle de Zoonoses do Município e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMT.

Além dos recipientes artificiais oferecidos pelo homem, parece existir uma correlação positiva entre a presença do mosquito adulto e as condições gerais das moradias. Nogueira et al. (2005) mostraram correlação significativa entre a presença de adultos de *Aedes* e a condição das casas sob três aspectos:

- Condição geral da moradia;
- Sombreamento;
- Limpeza do quintal.

Casas onde estes três itens se apresentavam insatisfatórios, um número maior de ovitrampas com ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram positivas, quando comparadas com casas em boas condições.

1.2. *Aedes aegypti* como vetor de doenças

Doenças transmitidas por vetores se caracterizam por ter sua causa relacionada a um agente infeccioso que é transmitido a hospedeiros vertebrados através de artrópodes sugadores de sangue. O termo "vetor" refere-se a qualquer artrópode que transmite uma doença por meio de atividade alimentar ou mecânica (Virginia Department of Health, 2014).

Um determinado grupo de vírus que possui características de sobrevivência, desenvolvimento e disseminação em artrópodes é conhecido como "arbovírus", esta denominação foi recomendada internacionalmente em 1963 para substituir a expressão "*arthropod-borne-virus*", adotada anteriormente em 1942. A disseminação de arboviroses ocorre através da picada de mosquitos em hospedeiros vertebrados susceptíveis a infecção (Who, 1997; Calisher, 1986).

Segundo Mitchell (1995), o mosquito é considerado vetor de arboviroses se comprovado que:

- ❖ O isolamento do agente infeccioso foi realizado em espécimes de mosquitos coletados diretamente da natureza;
- ❖ O mosquito se infectou após alimentação de sangue de um hospedeiro na fase de viremia ou uma suspensão de vírus;
- ❖ O vírus foi transmitido para um hospedeiro através de picadas ou encontrado vírus nas glândulas salivares do mosquito;

❖ A associação entre a espécie de mosquito estudada e a população de vertebrados na qual a infecção viral esteja ocorrendo for confirmada por evidências de campo.

Existem diversos patógenos naturais que participam do ciclo hospedeiro-vetor, geralmente o patógeno causa pouco ou nenhum efeito deletério sobre o vetor, no entanto infecções em hospedeiros intermediários, tais como os seres humanos podem causar altas taxas de mortalidade para estes. Dentre as doenças desse carácter que acometem os seres humanos podemos destacar a Febre Amarela, Febre *Chinkungunya* e Dengue (Higgs & Beaty, 2005).

▪ **A Febre Amarela** foi uma das doenças mais devastadoras e importantes que acometeu países da África e das Américas nos séculos XVII-XX com surtos epidêmicos da doença que envolveram milhares de casos humanos. Até o momento não há tratamento específico para a doença, entretanto, como medida preventiva contra a Febre Amarela temos a vacina existente desde 1951. Esta vacina tem contribuído significativamente para a prevenção e diminuição da disseminação da doença (WHO, 2014a). Entretanto, a preocupação com a reemergência da doença ainda é pertinente em muitos países, durante o século XX a Febre Amarela ressurgiu causando grandes epidemias. Segundo a Organização Mundial da Saúde, entre os anos de 1988 a 2006, 26.356 novos casos de Febre Amarela foram reportados no mundo (Tabachnick et al., 2006). Atualmente 44 países, sendo 31 países da África e 13 das Américas, incluindo o Brasil, são considerados endêmicos para esta arbovirose (**Figura 5**) (WHO, 2014a).



Figura 5. Mapas de incidência de Febre Amarela. Febre Amarela no mundo em 2008. Fonte: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>.

▪ A Febre *Chikungunya* (CHIK-V), compartilha alguns sinais clínicos com a Dengue, e pode ser diagnosticado em áreas onde a Dengue é comum devido sua transmissão ocorrer pelo mesmo vetor, *Ae. aegypti*. Não há cura para a doença, por isso o tratamento é focado no alívio dos sintomas. *Chikungunya* ocorreu inicialmente na África, Ásia e no Subcontinente Indiano, entretanto nas últimas décadas a disseminação da doença tem se tornado um fator preocupante (**Figura 6**). Em 2007, uma epidemia foi apontada no nordeste da Itália, onde o vírus foi encontrado em transmissão autóctone (humano/mosquito – mosquito/humano) (Staples et al., 2009). No Brasil, a Febre *Chikungunya* é uma doença de notificação imediata, pois há ocorrências de casos suspeitos e autóctones que podem indicar um possível surto. Segundo Boletim Epidemiológico liberado pela secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) em 2015, durante o ano de 2014 foram notificados 3.655 casos autóctones suspeitos de Febre Chikungunya, destes, 2.773 foram confirmados por critério laboratorial ou clínico-epidemiológico. estes números são relativamente altos quando consideramos casos autóctones e devem ser observados, já que mosquitos vetores competentes e hospedeiros suscetíveis existentes em nosso território aumentam o risco de transmissão endêmica do CHIK-V (IOC/FIOCRUZ, 2014).

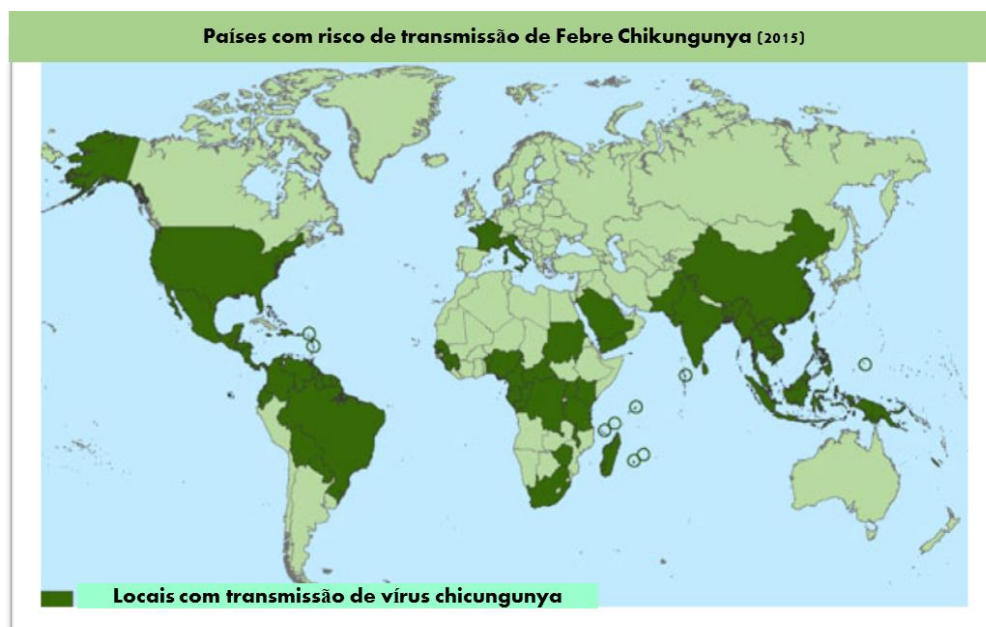


Figura 6. Mapas de incidência de Febre Chikungunya no mundo. Incidência de casos com carácter de transmissão autóctone da doença. Fonte: (CDC, 2015). http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/ChikungunyaWorldMap_03-10-2015.pdf

▪ **A Dengue** é caracterizada como a doença mais comum que é transmitida por mosquitos aos seres humanos, atualmente gera grande preocupação para a Saúde Pública Mundial. Em média, no mundo 2.5 bilhões de pessoas habitam áreas onde o vírus da Dengue pode ser transmitido. A distribuição geográfica de ambos, mosquitos vetores e vírus levaram ao ressurgimento mundial de epidemias da doença e surgimento de formas mais graves da Dengue (febre hemorrágica da dengue - FHD) (WHO, 2014b). O impacto da doença sobre a população humana é notório, não apenas pelos sintomas causados como também pela ocorrência de óbitos. Os prejuízos econômicos são expressivos em decorrência de gastos com tratamentos, hospitalizações, controle dos vetores e perdas com turismo (WHO, 1997).

Dada à capacidade de *Ae. aegypti* atuar como vetor de doenças e a comprovada relação deste mosquito com casos de Dengue e Febre *Chikungunya* (Gubler, 2002; Charrel et al., 2007), a preocupação com o surgimento de epidemias é crescente, já que as condições climáticas existentes no Brasil associadas aos hábitos da população, favorecem a presença do vetor e conseqüentemente a circulação dos vírus.

1.3. Dengue: Conceitos da doença

Acredita-se que o termo Dengue foi derivado da frase “*ki dengu pepo*”, que descreve os ataques causados por maus espíritos e, inicialmente, era utilizado para descrever enfermidades que acometeram ingleses durante uma epidemia que afetou a Índia Ocidental em 1927-1928. Foi durante uma epidemia em Cuba que a doença foi primeiramente chamada de Dunga, e somente alguns anos depois, seu nome universalizado, Dengue (Holmes et al., 1998).

O vírus da Dengue é pertencente ao gênero Flavivírus, família Flaviviridae e são conhecidos quatro sorotipos antígenicamente distintos, sendo DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. A infecção por um dos sorotipos confere imunidade homóloga somente para este especificamente, e teoricamente, indivíduos podem ser infectados pelos quatro sorotipos (Gould & Solomon, 2008). O vírus Dengue tem como hospedeiro vertebrado o homem e outros primatas, mas somente o primeiro apresenta manifestações clínicas da infecção e período de viremia de aproximadamente sete dias. Nos demais primatas a viremia é baixa e de curta duração (Gubler, 1998a).

No homem a Dengue manifesta-se como uma enfermidade infecciosa aguda caracterizada por um amplo espectro clínico, que pode se desenvolver em duas formas de infecção, assintomática ou forma hemorrágica. Os casos típicos de Dengue podem ser agrupados em duas categorias principais (Singhi et al., 2007):

❖ **Dengue clássico:** caracteriza-se por febre alta de início abrupto, cefaléia intensa, dor retroorbitária, dores articulares e musculares, prostração, podendo ocorrer alguns fenômenos hemorrágicos, porém sem maiores consequências;

❖ **Dengue hemorrágica:** conhecida como síndrome de choque da Dengue e caracterizada por quadros de febre alta, inicialmente indiferenciáveis da forma clássica, porém entre o terceiro e o quinto dia da enfermidade, ocorrem fenômenos hemorrágicos (petequia, púrpura, equimose, epistaxe, sangramento gengival, sufusões hemorrágicas, hematemese, melena) e/ou insuficiência circulatória com ou sem choque hipovolêmico.

O ciclo de transmissão da doença inicia-se quando fêmeas de mosquitos *Aedes* são contaminadas com o vírus Dengue depois de se alimentarem do sangue de um vertebrado infectado, em período de viremia (fase febril). Posteriormente, ocorre o desenvolvimento do vírus no mosquito, período conhecido como “incubação extrínseca”, que geralmente ocorre de 8 a 10 dias. Durante um novo repasto sanguíneo a fêmea, agora infectada, é capaz de transmitir o vírus que se encontra presente em sua saliva para um novo hospedeiro susceptível. No organismo do hospedeiro vertebrado, o período de incubação ou desenvolvimento do vírus é denominado “incubação intrínseca” (**Figura 7**) (Singhi et al., 2007; Gubler, 1998a).

Têm-se discutido que a infecção dos mosquitos com arbovírus pode ocorrer por três diferentes mecanismos (Gunther et al., 2007; Garcia-Rejon et al., 2008; Guedes et al., 2010; Pessanha et al., 2011):

a) Transmissão horizontal – durante o repasto sanguíneo a fêmea ingere, juntamente com o sangue, o vírus que está presente no hospedeiro vertebrado infectado;

b) Transmissão vertical ou transovariana (inseto – progênie) - as fêmeas infectadas transmitem o vírus para sua progênie;

c) Transmissão venérea - os mosquitos são infectados durante a cópula. Neste caso, um macho infectado via transmissão transovariana, poderá ser capaz de transmitir o vírus para uma fêmea sadia. Uma vez infectada, a fêmea transmitirá o patógeno para um hospedeiro vertebrado sadio dando início assim, ao ciclo de transmissão da doença.

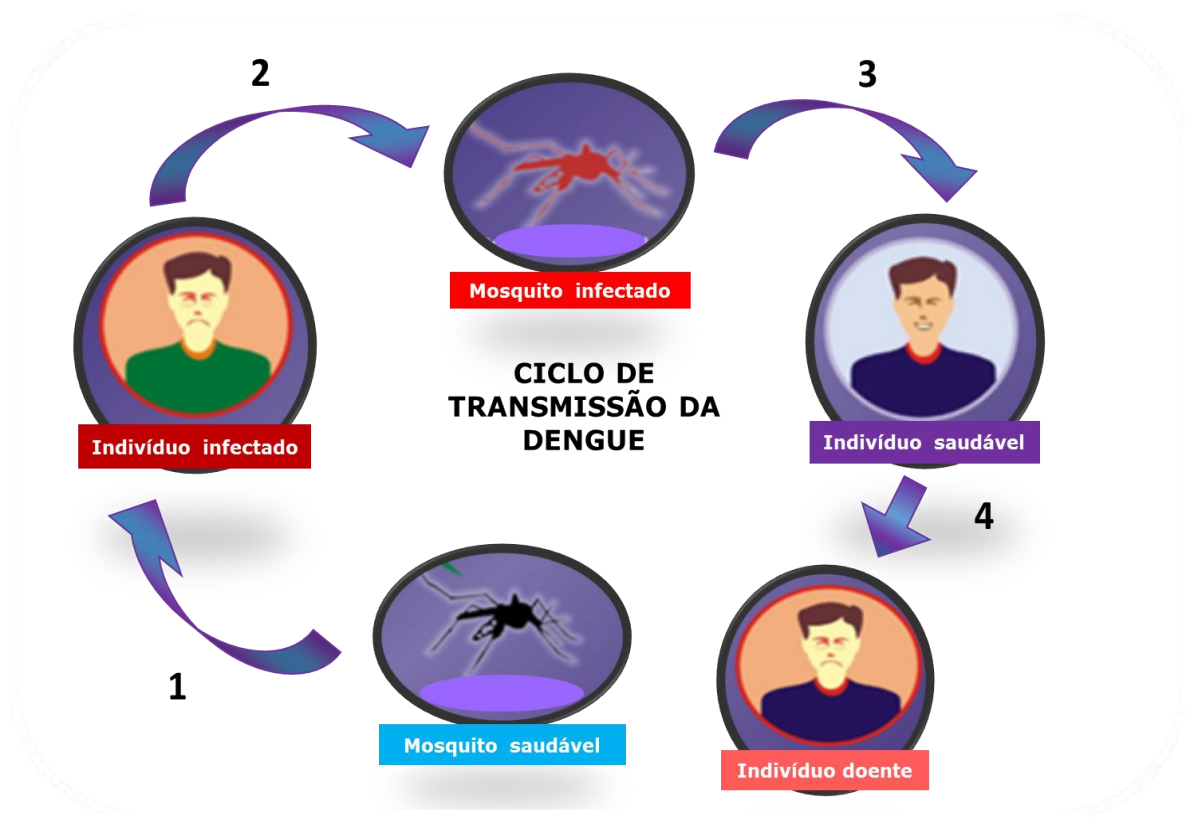


Figura 7. Ciclo de transmissão da Dengue. Transmissão horizontal da doença. Imagem adaptada de <http://laboratoriobiolider.com.br/dengue.html>.

Secundariamente a transmissão transovariana auxilia na propagação do vírus Dengue, já que os fatores acumulados, do vírus transmitido da mãe infectada para os ovos, associado ao fenômeno de diapausa destes, mantém o vírus sempre em circulação auxiliando a propagação da doença e sustentando as epidemias.

1.4. Dengue: História da dispersão da doença no mundo.

A origem exata da Dengue ainda não é clara, alguns indícios sugerem que ela tenha se originado na África e posteriormente se espalhado pelo mundo juntamente com o vetor *Ae. aegypti* (Ehrenkranz et al., 1971). Considerando a capacidade que os vírus, em geral, têm

de se adaptar ao hospedeiro invertebrado, alguns autores acreditam que o vírus Dengue tenha se originado em ciclos silvestres envolvendo primatas inferiores e mosquitos habitantes da Península do Malaia (Rudnick, 1986).

As primeiras epidemias de Dengue surgiram na década de 1600, mais especificamente em 1635 na Martinica e Guadalupe; e em 1699 no Panamá onde foram descritos os primeiros relatos de suspeita de infecção pela doença (Gubler, 1998). Já no século XIX, os surtos de Dengue tornaram-se comuns em várias cidades portuárias, tais como Caribe, Norte, Central e América do Sul. Estas epidemias foram relacionadas às atividades portuárias comerciais já existentes nesta época (Halstead, 1992).

Pelo final do século XIX e início do século XX, a mais ampla distribuição da doença foi observada nas Américas, incluindo países desde os Estados Unidos até o Chile e Argentina. Em 1934, uma extensa epidemia começou em Miami, afetando 10% da população, e depois se espalhou para o resto da Flórida e ao Sul da Geórgia. Tais fatos indicam que tanto o vírus Dengue, quanto o mosquito *Ae. aegypti* já apresentavam uma distribuição consolidada na região dos trópicos nesta época (Henchal & Putnak, 1990).

Foi na década de 40 que o sorotipo DEN-2 foi identificado durante uma epidemia nos Estados Unidos (Public Health, 1941). Entre os anos de 1943 a 1944 as pesquisas com o vírus Dengue foram iniciadas, quando o vírus foi isolado pela primeira vez e foram realizados diagnósticos a partir de testes laboratoriais. A identificação do sorotipo era realizada a partir da detecção de anticorpos, e a descrição da maioria das epidemias deste período foi baseada em características clínicas e epidemiológicas, ou seja, Dengue como doença (Hotta & Kimura, 1952).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, atualmente 40% da população mundial, cerca de 2.5 bilhões de pessoas que habitam áreas tropicais e subtropicais do mundo estão em risco de contrair Dengue (**Figura 8**). Nos últimos anos a doença tornou-se endêmica em 112 países da África, Américas, Região Leste do Mediterrâneo, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (Who, 2014b).

Informativos recentes sobre os casos de Dengue nas Américas liberados pelo Programa Regional da Dengue da OPAS/OMS no mês de fevereiro de 2013, registraram 279.540 casos da doença, sendo 1.752 casos graves e 84 óbitos. Os países que registraram os maiores números de casos graves foram: México (543), Venezuela (377) e Brasil (324), o que equivale a 71% dos casos graves de todo o continente Americano. Quanto aos óbitos, destaca-se o Brasil com maior índice de casos (33%) (OMS, 2013).

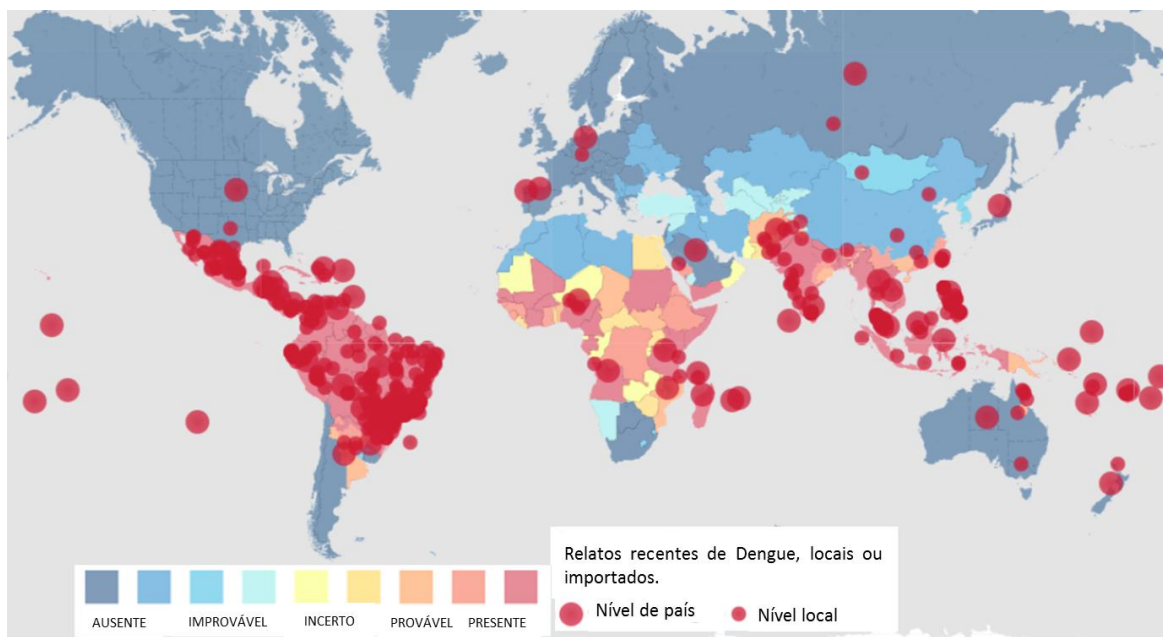


Figura 8. Mapa de distribuição da Dengue no mundo. A legenda abaixo da figura possui informações sobre os locais acometidos ou não pela Dengue e a incidência da doença a níveis de país e/ou estados/localidades). Fonte: <http://www.healthmap.org/dengue/pt/>.

1.5. Dengue no Brasil: História e dados atuais.

No Brasil, as primeiras evidências sobre a Dengue foram relatadas por volta dos anos 1845 e 1849 (Schneider, 2001). Nesta época foram notificados surtos no Paraná, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Pedro, 1923; Mariano, 1916; Severo, 1955).

Em 1901 foi realizado em Sorocaba-SP, o plano de erradicação da doença elaborado por William Gorgas, que propunha controlar o mosquito vetor, *Ae. aegypti* através da utilização de compostos químicos e também eliminar recipientes abandonados. Dois anos depois Oswaldo Cruz teve a mesma iniciativa na cidade do Rio de Janeiro (Who, 2014c). Uma epidemia de Febre Amarela em 1928 fez com que as autoridades brasileiras elaborassem uma proteção maior ao país, com a erradicação absoluta do vetor da doença, o mosquito *Ae. aegypti*, que aconteceu em 1932 (Severo, 1955).

Na década de 1940 a Conferência Pan-Americana de Saúde destacou as medidas de prevenção e controle contra o *Ae. aegypti* desenvolvidas pelo Brasil (PAHO, 1947). O advento do DDT auxiliou esta campanha, não só a nível nacional, mas em escala de continente. O Brasil alcançou a erradicação do mosquito por completo em 1955, tal ação foi

referendada oficialmente pela Organização Pan-americana da Saúde (OPAS) em 1958. Possivelmente, como resultado desses esforços acredita-se que apenas um único sorotipo do vírus Dengue teria permanecido em circulação no século XX, sendo este o genótipo americano DEN-2 (Anderson & Downs, 1956; Teixeira et al., 1999).

Entretanto, os esforços humanos na eliminação do vetor *Ae. aegypti* se desfizeram rapidamente na década de 60, com a reinfestação do mosquito vetor e consequente reemergência da doença. Apesar do compromisso firmado com a PAHO, apenas três países realizaram uma campanha continuada para controle de *Ae. aegypti*. A deterioração da erradicação ocorreu, principalmente, devido à perda da importância política na maioria dos países que havia alcançado a eliminação do mosquito. Além disso, a vigilância diminuiu gradualmente, tal que as pequenas reinfestações já não eram possíveis de serem detectadas. Outros fatores determinantes foram o saneamento ambiental inadequado dos países emergentes, a rápida expansão de viagens internacionais e domésticas, que favoreceram a dispersão passiva do mosquito, e o desenvolvimento de resistência dos mosquitos ao DDT e outros inseticidas organoclorados utilizados na erradicação inicial do vetor da Dengue (PAHO, 1997).

Em Novembro de 1981 até Março de 1982, ocorreu uma epidemia na região Amazônica, na cidade de Boa Vista, com cerca de 11 mil casos da doença e circulação dos sorotipos DEN-1 e DEN-4. Em 1986, nova epidemia de Dengue volta a ocorrer na região metropolitana do Rio de Janeiro e municípios vizinhos. No ano seguinte, mais quatro estados foram atingidos, sendo Pernambuco, Bahia e Minas Gerais. A doença atingiu o estado de Mato Grosso do Sul em 1990 e atingiu novamente, mas desta vez com grande intensidade, o Estado de São Paulo. Em 1991 foi introduzido no Estado do Tocantins e, em 1992, no estado de Mato Grosso (Teixeira, 1999).

Tais séries históricas referenciam os dados de Dengue divulgados pelo Ministério da Saúde nos períodos de 1980 a 1991, onde fica evidente que a Dengue tornou-se endemo-epidêmica na maioria dos Estados do Brasil em um curto espaço de tempo desde a reintrodução do mosquito e consequentes casos da doença no país (Ministério da Saúde, 1992).

No século XXI, o Brasil tornou-se o país com o maior número de casos de Dengue, sendo mais de três milhões de pessoas acometidas pela doença entre os anos de 2000-2005, o que representa 61% de todos os casos notificados pela Organização Mundial de Saúde (Teixeira & Barreto, 2009).

Na região das Américas, a Dengue tem ocorrido com surtos cíclicos a cada 3-5 anos. No Brasil, a transmissão vem ocorrendo de forma continuada desde 1986, intercalando com a ocorrência de epidemias. Geralmente estes fatores estão associados com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente não ocupadas ou alteração do sorotipo predominante. O maior surto no Brasil ocorreu em 2013, com aproximadamente 2 milhões de casos notificados (Ministério da Saúde, 2014b).

Em 2015 foram enviadas 826 amostras para realização do exame de isolamento viral, havendo 382 resultados positivos (46,2%). As proporções dos sorotipos virais identificados foram: DEN-1 (87,7%), seguido de DEN-4 (11,0%) e DEN-2 (1,3%) (SVS, 2015).

A co-circulação de mais de um sorotipo e o aumento da densidade populacional do vetor responsável pela transmissão da doença são fatores que podem favorecer o risco de mais uma epidemia com um aumento do número de casos da forma hemorrágica de Dengue. Têm-se observado novas regiões de diversos países, antes não atingidos, com atividade epidêmica e circulação simultânea ou sucessiva de vários sorotipos virais, indicando crescente disseminação da Dengue no mundo (PAHO, 2006).

Em 2015 foram registrados 224.101 novos casos notificados de Dengue no Brasil até o mês de março deste ano. A região Sudeste teve o maior número de casos notificados (145.020 casos; 64,7%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (34.125 casos; 15,2%), Nordeste (21.472 casos; 9,6%), Norte (12.001 casos; 5,4%) e Sul (11.483 casos; 5,1%) (SVS, 2015).

1.6. Medidas de controle da Dengue.

A **vacina contra a Dengue** vem sendo muito discutida (Edelman & Hombach, 2008; Cassetti & Halstead, 2014), contudo até o momento, algumas inconstâncias a partir deste assunto impossibilitaram a elaboração e/ou distribuição desta. A possibilidade de uma vacina cuja eficácia diminua ao longo do tempo causa preocupações que limitam sua finalização. Equívocos ou incertezas sobre o efeito de uma vacina, poderiam criar um "perfil imunológico" que além de não proteger o indivíduo contra a doença ainda aumentaria o risco deste contrair a forma mais grave através de mecanismos imunopatológicos complexos de subseqüentes infecções naturais (Morens & Fauci, 2008).

Assim as alternativas para controle da Dengue, são medidas que controlem populações de mosquitos *Ae. aegypti* (WHO, 2014c).

O uso de inseticidas são frequentemente utilizados para o controle de mosquitos vetores (Rose, 2001). Entretanto, têm sido detectados mecanismos de resistência para todas as classes de inseticidas, afetando direta e profundamente as endemias da Dengue em várias localidades, inclusive no Brasil (Fonseca-González et al., 2010; Lima et al., 2011; Marcombe et al., 2012; Bissete et al., 2013).

A **infecção de mosquitos com bactérias do gênero *Wolbachia*** têm sido uma alternativa utilizada como controle biológico de mosquitos *Ae. aegypti*. A incompatibilidade citoplasmática existente entre mosquitos e estirpes de *Wolbachia* podem reduzir o tempo de vida, ou ainda inibir diretamente a capacidade do vírus Dengue infectar *Ae. aegypti* (McMeniman et al., 2009; Moreira et al., 2009; Walker et al., 2011).

Prevenir ou reduzir a transmissão de Dengue e outras arboviroses depende inteiramente do controle de vetores *Ae. aegypti*. Contudo, pouco ainda se conhece sobre a dinâmica populacional deste mosquito em seu habitat natural. O desenvolvimento de ferramentas, tais como as citadas anteriormente, dependem de conhecimentos mais abrangentes sobre a ecologia, dinâmica populacional, interação parasito-vetor, dispersão de mosquitos, entre outros, para serem de fato eficientes no controle da Dengue e outras doenças veiculadas por mosquitos *Ae. aegypti*. Tais conhecimentos são fundamentais uma vez que populações geneticamente diferentes podem apresentar também diferenças quanto a sua capacidade e competência vetorial, por exemplo.

Tendo em vista a alta diversidade genética das populações de mosquitos, a rápida dispersão destes e as condições ambientais presentes no Brasil, o desenvolvimento e utilização de marcadores genéticos para estudos envolvendo mosquitos *Ae. aegypti* poderão contribuir para o direcionamento de abordagens e técnicas mais eficientes para controle destes vetores e conseqüentemente evitar a dispersão dos agentes infecciosos por eles veiculados, tais como o vírus da Dengue.

1.7. Polimorfismos de marcadores moleculares

O objetivo dos estudos genéticos é a distinção entre genótipos relevantes para uma determinada característica de interesse em um organismo. Esta distinção ocorre baseada em

marcadores informativos, a este sistema dá-se o nome de marcadores genéticos ou marcadores moleculares (Schlötterer, 2004).

Marcadores moleculares podem fornecer informações sobre a variação alélica ou polimorfismo em um determinado *locus*, indicando o fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou um segmento específico de DNA correspondente às regiões expressas ou não do genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Até a década de 60, os estudos populacionais para detecção de diferenças entre os organismos eram realizados com base em características fenotípicas, entretanto como as variantes fenotípicas são raras, as populações eram frequentemente classificadas como homogêneas. Assim, houve a necessidade de buscar ferramentas mais sensíveis à detecção de diferenças ou polimorfismos, de um determinado *locus* (Schlötterer, 2004).

A primeira técnica desenvolvida para refinar estudos de variação genética a partir de marcadores moleculares, foram as Isoenzimas. O princípio desta técnica é a detecção da variação das proteínas de uma enzima por eletroforese em gel nativo de acordo com as diferenças de tamanho e carga (Avise et al., 1994). Desde então, marcadores alozimáticos foram empregados com sucesso em uma vasta gama de espécies. Entretanto, o número efetivo de informações obtidas a partir deste marcador ainda era muito pequeno, já que as Isoenzimas atuam como um método indireto de detecção de variações do DNA (Hillis et al., 1996).

Um marcador molecular ideal seria aquele capaz de identificar a própria variação do DNA ao invés de se basear em variações na mobilidade electroforética de proteínas que o DNA codifica. A busca por novas metodologias foi alcançada na década de 80, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular (Lopes et al, 2002), que somente foi possível com a concepção da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Amplificação em Cadeia da Polimerase) desenvolvida por Mullis & Faloona em 1987 (Saiki et al., 1988).

Com o desenvolvimento da PCR diversas técnicas foram produzidas, e estão hoje disponíveis para uso em estudos de polimorfismo genético, são estas: *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), Microsatélites (*SSR – Simple Sequence Repeats*), Sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA) e de genes de RNA ribossomal (rRNA) (Avise, 1994) e marcadores *multilocus* codominantes, como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Brookes, 1999).

Marcadores de carácter dominante (tais como o *RAPD*), não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos quando amplificados via PCR. A dominância restringe as inferências feitas com esta classe de marcadores, pois a leitura dos fragmentos é estabelecida por apenas um fragmento de determinado tamanho, os quais constituem apenas uma classe, isto é, alelos de um mesmo *locus* são revelados pela presença ou ausência de uma banda. Os indivíduos nos quais o alelo não foi amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para a ausência da banda (Williams et al., 1990).

Já marcadores caracterizados codominantes (tais como os Microssatélites) são mais informativos frente a outros marcadores moleculares. A possibilidade de distinção entre os alelos em um organismo diploide é a maior vantagem desta classe de marcadores (Schlötterer, 2000). Estes tipos de marcadores caracterizam-se por serem abundantes, distribuídos por todo o genoma e multialélicos. O conteúdo genético informativo de um loco *SSR* é bastante alto, e por isso é uma das técnicas mais indicadas para estudar polimorfismos entre sequências de DNA (Buso et al., 2003).

1.8. Microssatélites

Os microssatélites ou “*simple sequences repeats*” (*SSRs*), representam uma sequência do genoma repetida em tandem, de 1 a 6 nucleotídeos, que são abundantemente distribuídos em genomas e demonstram altos níveis de polimorfismo alélico (Goldstein et al., 1999).

A técnica de amplificação de marcadores microssatélites revela polimorfismo em um loco devido às diferenças no número de vezes (*n*) em que, por exemplo, um dinucleotídeo $(AG)_n$ se repete naquele loco. Essas variações no número de repetições constituem-se em variações no comprimento do segmento detectado pela reação de polimerase em cadeia e na separação dos fragmentos amplificados (Buso et al., 2003).

A principal característica dos microssatélites como marcadores moleculares é sua hipermutabilidade e conseqüente hipervariabilidade em espécies e suas populações. A taxa de mutação de microssatélites é estimada em 10^{-2} a 10^{-6} por loco por geração, e estão distribuídos aleatoriamente no genoma em uma densidade de aproximadamente 1 microssatélite a cada 10 a 15 Kb, dependendo da espécie (Tautz, 1989).

A existência de microssatélites em genomas eucarióticos começou a ser conhecida a partir da década de 1970 (Bruford & Wayne, 1993). Hamada et al. (1982), demonstraram um grande número e ampla ocorrência dessas sequências repetitivas desde organismos mais simples, como leveduras, até os mais complexos, como os vertebrados.

Marcadores moleculares podem ser divididos em duas classes, sendo tipo I - marcadores associados com genes de funções conhecidas; e tipo II - marcadores associados com sequências anônimas do genoma. Os microssatélites geralmente representam marcadores do tipo II, uma vez que geralmente estão em regiões intergênicas não codificantes. Amplamente usados como marcadores genéticos, microssatélites podem ser classificados de acordo com o tipo de repetição da sequência (Oliveira et. al., 2006):

➤ **Perfeito** – A repetição da sequência não é interrompida por uma base que não pertence ao padrão repetitivo. Ex: TATATATATATATATATA;

➤ **Imperfeito** – Uma base que não possui o mesmo padrão da repetição está presente. Ex: TATATATACTATATA.

➤ **IntERRUPTO** – Uma pequena sequência dentro da repetição não coincide com o padrão de repetição da sequência original. Ex: TATATACGTGTATATATATA.

➤ **Composto** – A sequência contém duas adjacentes distintas da repetição padrão. Ex: TATATATATAGTGTGTGTGT.

A utilização de sequências conservadas que flanqueiam os microssatélites possibilita a síntese de oligonucleotídeos para a caracterização destes via PCR (**Figura 9**). O uso destas sequências é baseado no pressuposto de que estas são únicas para cada *locus* e que mutam muito mais lentamente do que a região repetitiva alvo microssatélite (Hancock, 1999).

Após a amplificação de cada microssatélite em cada amostra utilizando-se o par de oligonucleotídeos específicos, os produtos gerados são caracterizados segundo seu tamanho, por eletroforese em gel, eletroforese capilar ou a definição dos tamanhos realizada em sequenciadores automáticos.

Microssatélites podem ser utilizados para explicar diversas características de uma população, tais como parentesco entre populações naturais, similaridade entre populações de diferentes nichos geográficos, aplicações filogeográficas para conhecer a estrutura de populações sobre uma vasta área geográfica, revelar casos de panmixia em populações com distâncias geográficas menores, fragmentação de população e hibridação de espécies (Chistiakov et al., 2006; Powel et al., 1996). No campo entomológico, os microssatélites vêm sendo utilizados para o estudo populacional de vários insetos de importância médica

(Maingon et al., 2003; Moreno et al., 2007; Harry et al., 2008; Brown et al., 2013a; Angella et al., 2014).

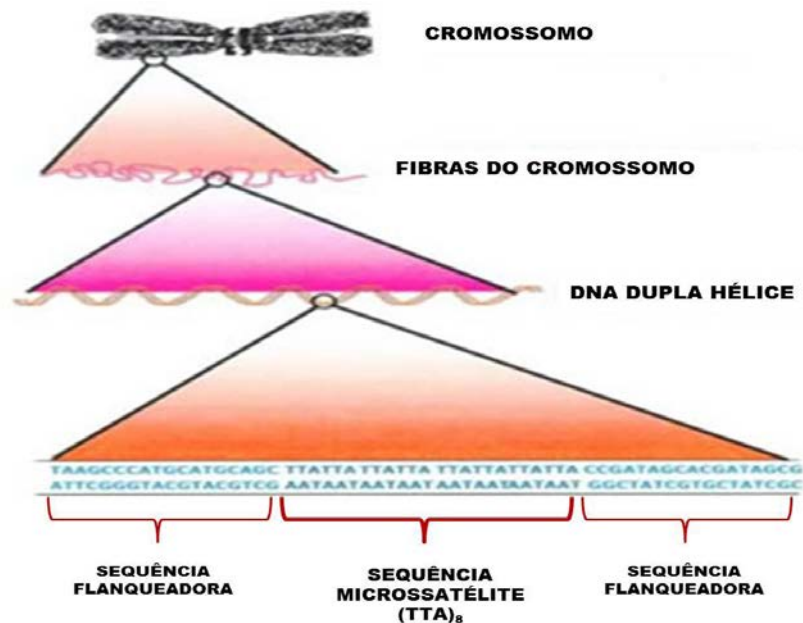


Figura 9. Microssatélites. Fonte: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Microsatellite+Repeats&lang=1

Em mosquitos *Ae. aegypti* os microssatélites vêm apresentando grandes descobertas acerca da evolução, dispersão da espécie, análise temporal, estrutura populacional, entre outros (Costa-Ribeiro et al., 2006; Hlaing et al., 2010; Brown et al., 2011; 2013a; 2013b; Gloria-Soria et al., 2014; Mendonça et al., 2014; Monteiro et al., 2014).

1.9. Genética de Populações de *Aedes aegypti*.

A variabilidade genética em mosquitos é responsável por diferenças encontradas em populações de uma mesma espécie de acordo com a região onde está localizada. Tal variabilidade pode ser atribuída à adaptação a diversos fatores, tais como: temperatura,

umidade relativa do ar, índice pluviométrico, vegetação; ou até mesmo por ações antrópicas como urbanização, poluição ambiental, desmatamento e o uso de produtos químicos. As condições ambientais, tais como as variações climáticas desempenham um importante papel para a adaptação de populações de diversos organismos, tornando-os diferentes quando comparamos diferentes populações (Hodkinson, 2005).

Devido a grande importância que mosquitos *Ae. aegypti* tem para a Saúde Pública mundial, já que é considerado o principal vetor da Dengue e outras arboviroses associadas aos seres humanos, estudos populacionais que estimem a variação genética destes mosquitos estão sendo desenvolvidos visando à compreensão da dinâmica populacional, adaptação e dispersão destes vetores em diferentes habitats. Os resultados obtidos em diferentes estudos populacionais que utilizaram marcadores moleculares como ferramenta de investigação revelaram, até o momento, estruturação genética de populações de *Ae. aegypti* em diferentes regiões do mundo.

Paduan et al. (2006), utilizando marcadores RAPD encontraram elevados níveis de diferenciação genética entre populações de *Ae. aegypti* de seis estados brasileiros, bem como dentro de seus municípios. Os autores consideraram que as populações brasileiras destes mosquitos poderiam ser subdivididas em dois grupos principais, um compreendendo as populações do Nordeste e o segundo, as populações do Norte, Centro-Oeste e Sudeste.

Brown et al. (2011) analisaram amostras de mosquitos *Aedes* de 24 diferentes localidades do mundo, utilizando 12 *loci* microssatélites. Os dados obtidos evidenciaram dois grupos genéticos distintos: um incluindo todas as populações domésticas do mosquito fora da África e o outro incluindo populações nacionais e florestais da África. Isto sugere que a associação humana com o mosquito na África ocorreu independentemente das populações domésticas de *Aedes* em todo o resto do mundo. Além disso, as medidas de diversidade genética indicam que *Ae. aegypti formosus* é a forma ancestral da espécie domiciliada que ocupa os centros urbanos atualmente.

Mais tarde, Brown et al. (2013b) obteve amostras de *Ae. aegypti* de 21 localidades, que representavam 13 países em torno do mundo, para investigar a dispersão global destes mosquitos. Foram utilizados quatro genes nucleares e 1.504 SNPs para testar a hipótese de que *Ae. aegypti* se originou na África, onde uma forma doméstica surgiu e se espalhou por todo o mundo tropical e subtropical, com o comércio e movimentação humana. Os resultados confirmaram ascendência Africana das espécies, e indicaram um único evento de subespeciação pantropical. Além disso, os dados genéticos apoiaram fortemente a hipótese de que as rotas comerciais humanas transportaram *Ae. aegypti* domiciliado para fora da

África em direção ao Novo Mundo, e posteriormente ocorreu uma nova invasão destes mosquitos do Novo Mundo para o Sudeste da Ásia e do Pacífico.

Campos et al. (2012) analisaram, a partir de 9 marcadores SNPs, variações sazonais de populações de *Ae. aegypti* em Botucatu – SP. Foram avaliadas amostras de ovitrampas oriundas do campo durante os anos de 2005 a 2010. Foi identificado que independentemente da grande variação na abundância de mosquitos, o tamanho populacional efetivo manteve-se estável ao longo dos anos. Tais resultados são importantes para elucidar que estes mosquitos são capazes de manter um número suficiente de população reprodutora ativa durante as variações de temperatura e pluviosidade anuais, o que indica que novas perspectivas em métodos de controle deste vetor, devem ser adquiridas.

Mendonça et al. (2014) analisou 9 *loci* microssatélites para examinar o efeito da sazonalidade sobre a estrutura genética e os padrões de fluxo gênico em *Ae. aegypti* de quatro bairros do Município de Manaus coletados durante as duas principais estações, chuvosa e seca. A partir dos dados obtidos, foi sugerido que as populações de *Ae. aegypti* de Manaus são mantidas de forma contínua ao longo do ano, com redução sazonal ao invés de extinção das populações nas diferentes estações. Estes resultados foram extremamente importantes para a concepção de novas estratégias de controle da Dengue na cidade de Manaus.

Um estudo mitocondrial com o gene ND4, testou a variação genética de populações naturais de *Ae. aegypti* da Amazônia brasileira. Foram estudadas 10 populações deste vetor, das cidades de Manaus e Coari (AM); Santarém e Belém (PA); Boa Vista e Pacaraima (RR); Rio Branco (AC). Os resultados genético populacionais indicaram dois agrupamentos para estas populações, propondo a presença de linhagens distintas entre estas localidades. Esses resultados, somados com os níveis de variabilidade genética observada e a comparação com haplótipos de outros estudos, sugeriram que, pelo menos, duas introduções do *Ae. aegypti* ocorreram na Amazônia: uma por Boa Vista, advinda do México e Venezuela; e outra por Belém, advinda do restante do país ou pelo Oceano Atlântico (Lima-Júnior & Scarpassa, 2009).

Vários estudos sobre a diversidade genética de populações naturais de *Ae. aegypti* vêm sendo desenvolvidos, entretanto, pouco ainda se conhece sobre as diferenças genéticas destes mosquitos que colonizam diferentes regiões do Brasil. O conhecimento aprofundado sobre a organização populacional destes mosquitos em diferentes cidades será importante para complementar as informações já existentes sobre a dispersão de *Ae. aegypti* no Brasil, bem como desenvolver estratégias de controle mais direcionadas.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

- Avaliar a estruturação genética populacional de *Ae. aegypti* provenientes de 5 diferentes Estados do Brasil, utilizando como ferramenta investigativa, marcadores microssatélites.
- Compreender a dispersão de mosquitos *Ae. aegypti* em duas diferentes áreas do município de Botucatu – SP.

2.2. Objetivos específicos:

- Genotipar mosquitos *Ae. aegypti* de cinco diferentes Estados do Brasil, sendo estes: Belo Horizonte – MG, Botucatu – SP, Campo Grande – MS, Maringá – PR e Rondonópolis – MT;
- Analisar a variabilidade genética das cinco populações obtidas;
- Realizar análises genético populacionais visando à compreensão de macro e micro estruturações populacionais das cinco populações em estudo;
- Genotipar mosquitos *Ae. aegypti* provenientes de duas áreas da cidade de Botucatu – SP;
- Caracterizar a dispersão da oviposição empregando como modelo duas populações de mosquitos *Ae. aegypti* de Botucatu – SP;

MATERIAIS E MÉTODOS

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Para esta tese foram realizados dois diferentes estudos populacionais utilizando marcadores moleculares microssatélites. Visando facilitar o entendimento da dinâmica utilizada para os dois diferentes estudos, apresenta-se uma introdução discorrendo sobre o MÉTODO utilizado, já que o princípio deste foi igual para ambos (item 3.1. Materiais e Métodos). E, posteriormente apresentam-se as abordagens adotadas e resultados obtidos para cada estudo separadamente, em forma de capítulos. São estes:

a) **Capítulo I** – Macro e micro-análises populacionais de mosquitos *Ae. aegypti* de diferentes regiões do Brasil.

b) **Capítulo II** – Análise de Dispersão Genética de mosquitos *Ae. aegypti* no Município de Botucatu – SP

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. GENOTIPAGEM POR MICROSSATÉLITES

a) Amostragem

Amostras de ovos de mosquitos *Ae. aegypti* foram coletadas a partir de ovitrampas, esta metodologia se baseia em armadilhas de captura proposta por Fay & Eliason (1966). A distribuição das ovitrampas foi realizada cobrindo uma extensão geográfica dos municípios selecionados, afim de obter-se uma amostragem representativa da população local de mosquitos *Ae. aegypti*. Para tanto, foi realizada uma estimativa do número mínimo de pontos para instalação segundo o número de imóveis dos municípios. A amostragem prevê a instalação destas armadilhas por um período de 4 semanas. A cada semana as palhetas contendo ovos são retiradas e armazenadas até serem enviadas ao Departamento de Parasitologia da Unesp-Botucatu.

Após o recebimento das palhetas foram mantidos no insetário os ovos de cada localidade até o estágio adulto em condições controladas (temperatura de 27° C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12h). Ao atingirem o estágio de pupa foram transferidas para um copo plástico e acondicionadas em uma gaiola de triagem, que consiste na identificação individual dos insetos adultos emergidos (nesta etapa os mosquitos serão identificados e separados como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*). Após a identificação, os mosquitos foram congelados a -20°C até o momento do uso para os estudos populacionais.

b) Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico total foi extraído de mosquitos inteiros, triturados com auxílio de um pistilo, em tampão de extração utilizando-se resina *Chelex100® Molecular Biology*

Grade Resin (Bio-Rad Laboratories), preparada a 5% conforme as recomendações do fabricante. A concentração e qualidade do DNA foi estimada submetendo-se 2 μ L do DNA de cada amostra ao espectrofotômetro *NanoDrop*[®] (*ND-1000*).

c) Metodologia de marcadores microssatélites

No total foram analisados 12 marcadores microssatélites no estudo referente ao capítulo I, e 8 microssatélites no estudo referente ao capítulo II desta tese (**Tabela 3**). Os oligonucleotídeos iniciadores microssatélites utilizados neste estudo foram marcados com uma sequência fluorescente M-13 (**Figura 10**) (Lorenz et al., 2001; Schuelke, 2000).

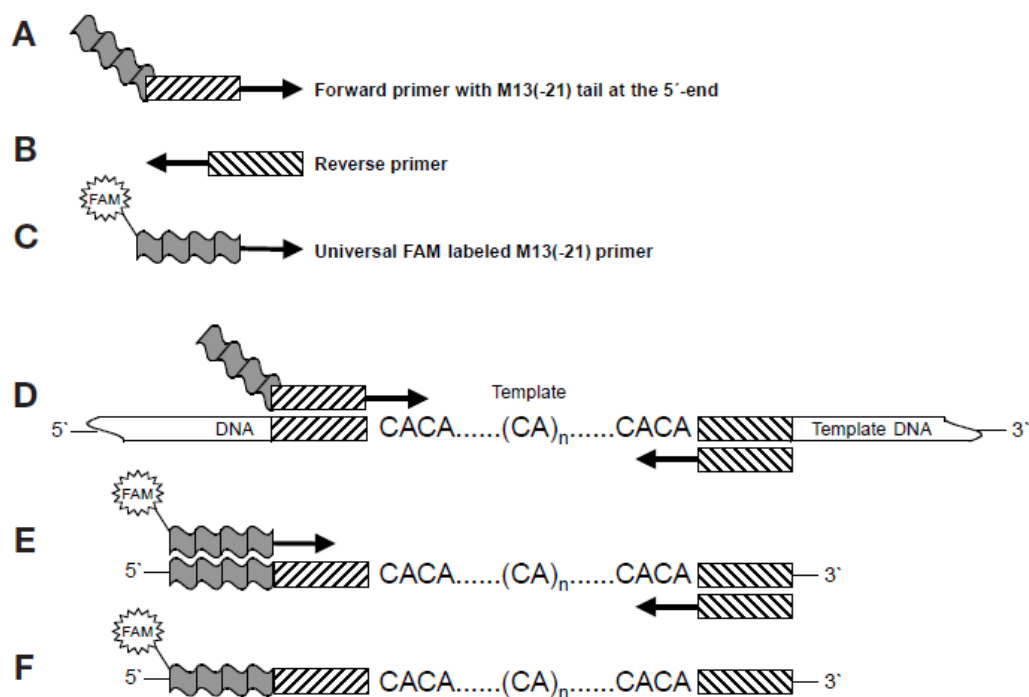


Figura 10. Esquema de amplificação (PCR) primers M-13 acoplados. A e B. Iniciadores específicos de microssatélites – caixas tracejadas; C. M-13 sequência universal de M-13 (caixa cinza ondulada, e a estrela indica a fluorescência FAM). D. Primer M13(-21) incorporada nos produtos de PCR, durante os primeiros ciclos. E) Primer universal M13(-21) marcado com FAM, a incorporação ocorre durante os ciclos subsequentes. F) Produto final marcado com fluorescência que poderá ser analisado em sequenciadores automáticos. Fonte: <http://biotech.nature.com>.

Os microssatélites foram amplificados individualmente (uma reação de PCR por *locus*), para cada mosquito. Cada reação de PCR foi realizada num volume total de 20µL e 25µL. As condições de reação e de amplificação estão descritas nas **Tabelas 1 e 2** (Condições para reação de PCR), e nas **Figuras 11 e 12** (Condições de temperatura e ciclos da PCR), tanto no Estudo 1 quanto no Estudo 2, os microssatélites foram amplificados utilizando um termociclador da *Bio-Rad - MyCycler Thermal cycler*.

Tabela 1. Condições da reação de PCR para amplificação de loci microssatélites. Condições utilizadas para *primers* desenvolvidos por Brown et al. (2011) e Slotman et al. (2007).

Reagentes	[trabalho]	[final]/amostr.	Volume/amostr.
ddH ₂ O	-	-	Perfazer até 1 µl
PCR buffer	5 X	1 X	4 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.2 µl
dNTPs	2 mM	0.2 mM	2 µl
Primer F	0.5 µM	25 nM	1 µl
Primer R	5 µM	250 nM	1 µl
Primer M13	5 µM	500 nM	2 µl
<i>Taq</i> DNA polymeras	5 U/µl	0.75	0.15 µl
DNA	-	-	1 µl - - 1 µl

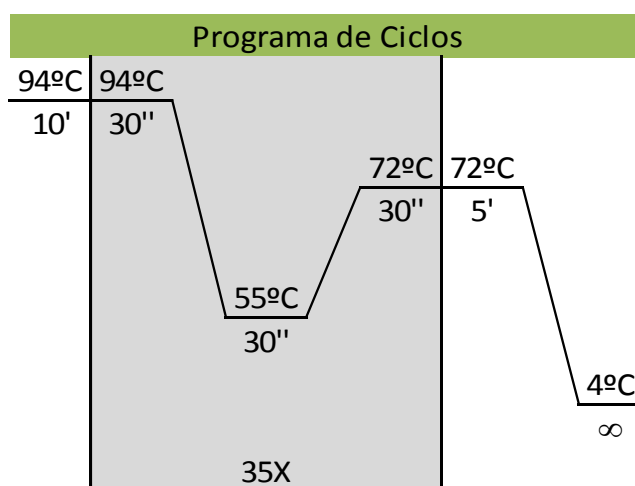


Figura 11. Programa dos ciclos da PCR. Condições utilizadas para os *primers* desenvolvidos por Brown et al. (2011) e Slotman et al. (2007).

Tabela 2. Condições da reação de PCR para amplificação de *loci* microsatélites.
Condições utilizadas para *primers* desenvolvidos por Lovin *et al.* (2009).

Reagentes	[trabalho]	[final]/amostra	Volume/amostra
ddH ₂ O			Perfazer até 24 µl
PCR buffer	5 X	1 X	5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
dNTPs	2 mM	0.2 mM	2.5 µl
Primer F	5 µM	0.2 mM	1 µl
Primer R	5 µM	0.2 mM	1 µl
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U/µl	0.75 U	0.2 µl
DNA	-	-	1 µl

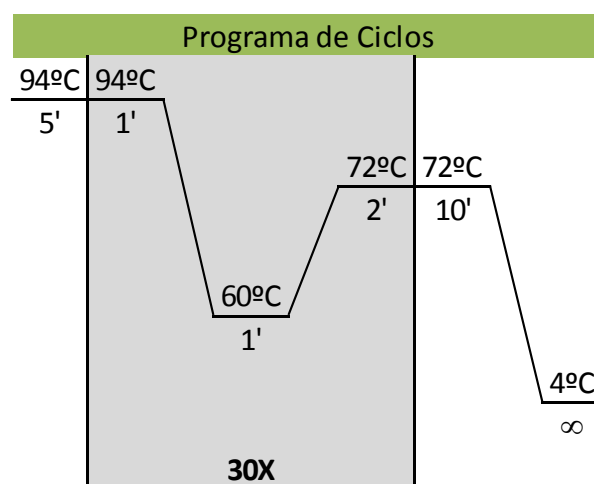


Figura 12. Programa dos ciclos da PCR. Condições utilizadas para *primers* desenvolvidas por Lovin *et al.* (2009).

Para os dois diferentes estudos foram adotadas as mesmas condições de PCR, entretanto para o Estudo 2 as metodologias foram aplicadas no laboratório PANGENE – Pesquisas e Análises Genéticas – da Unesp, no Departamento de Parasitologia, em Botucatu – SP. E para as amostras do Estudo 1, as metodologias foram realizadas no CMDT - Centro de Malária e Doenças Tropicais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, na Universidade Nova de Lisboa (UNL), em Lisboa – Portugal, sob supervisão do Dr. João Soares da Silva Pinto, durante o estágio de Doutorado-Sanduiche realizado no período de 29/01/2014 a 26/07/2014.

A fim de verificar a eficiência das reações de PCR, 8µl do produto amplificado era visualizado em gel de Agarose [2%] (*Lonza – Agarose LE, Seakem[®]*) corado com brometo de etídeo 10mg/ml (*Sigma*) em TBE 1x (*Applichem – TBE buffer 10x*). Todas as corridas de eletroforese levaram 5µl de marcador de DNA, *ladder* de peso molecular 100pb (*Promega*), e foram submetidas à corrida eletroforética a 130v durante cerca de 40 minutos. A visualização dos produtos amplificados foram realizadas em transiluminador de luz UV e fotografadas no sistema *Uvidoc[®]* (*Uvitec*) (**Figura 13**)

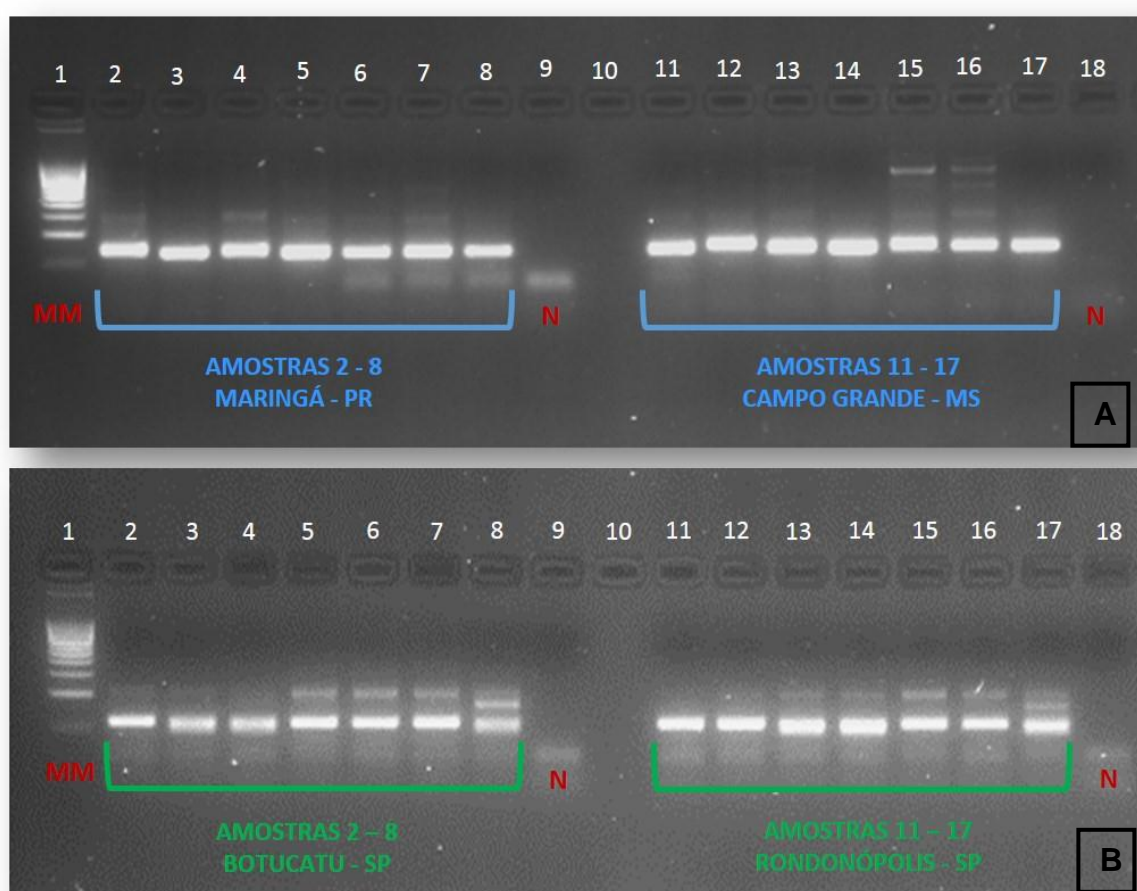


Figura 13. Confirmação de amplificação da reação de PCR. Gel de Agarose [2%], (MM) Marcador de peso Molecular de 100pb; (N) Controle Negativo. Exemplo de confirmação de amplificação de mosquitos *Ae. aegypti* com os *primers* AC7-FAM (A); e B3-HEX (B) marcados com fluorescência. Amplificação satisfatória em todos os indivíduos (presença de bandas).

Tabela 3. Características gerais dos Microsatélites utilizados nos estudos referentes aos capítulos I e II desta tese. Nome dos *Loci*, Fluoróforo, Tamanho esperado de amplificação, Sequência dos primers, Temperatura de Anelamento e Referência de cada par de *primer*.

<i>Locus</i>	Fluoróforo	Tamanho	Sequência dos <i>primers</i>	Temperatura	Fonte
		pb		Anelamento(°C)	
A1*	M13-FAM	155 - 165	For - GACGTAAACCGAGTGGGAGA Rev - GCATTTAACCGCGCTAGAAC	55 °C	Brown <i>et al.</i> (2011)
AC2*	M13-FAM	175 - 190	For - AATACAACGCGATCGACTCC Rev - AACGATTAGCTGCTCCGAAA	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
AG1*	M13-HEX	110 - 130	For - AATCCCCACACAAACACACC Rev - GGCCGTGGTGTACTCTCTC	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
AG5*	M13- HEX	170 - 180	For - TGATCTTGAGAAGGCATCCA Rev - CGTTATCCTTTCATCACTGTTC	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
AG2*	M13- HEX	115 - 180	For - TCCCCTTCAAACCTAATGG Rev - TTTGCCCTCGTATGCTCTCT	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
CT2*	M13- HEX	185 - 195	For - CGCAGTAGGCGATATTCGTT Rev - ACCACCACCAACACCATTCT	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
B2*	M13- HEX	90 - 115	For - GGAAACACTTGCAGGGACAT Rev - GCAGATGGTGGCAGTAGTA	55 °C	Brown <i>et al.</i> (2011)
AC4*	M13-FAM	125 - 135	For - GCGAATCGTTCCCATAGTA Rev - CTTTATCGATCGACGCCATT	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
AG4*	M13-FAM	145 - 170	For - AAAACCTGCGCAACAATCAT Rev - AAGGACTCCGTATAATCGCAAC	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
AC7*	M13-FAM	130 - 145	For - TCGGCAAATTACCACAAACA Rev - CATTGGACTCGCTATAACACAC/	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
AC1**	M13-FAM	193 - 209	For - TCCGGTGGGTTAAGGATAGA Rev - ACTTCACGCTCCAGCAATCT	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
AC5**	M13-FAM	149 - 163	For - TGGATTGTTCTTAACAAACACGAT Rev - CGATCTCACTACGGGTTTCG	55 °C	Slotman <i>et al.</i> (2007)
A9**	M13-FAM	182 - 194	For – GCAGCATGCACTTCACATTT Rev - CGAATGGCATCTGATTCAAG	55 °C	Brown <i>et al.</i> (2011)

88AAT1***	HEX	215 - 225	For - CGTCGACGTTATCTCCTTGTT Rev - CCAACGCAAGATGCAAGATA	60 °C	Lovin <i>et al.</i> (2009)
86AC1***	NED	250 - 260	For - GCGAATCGGTTCCCATAGTA Rev - ACCCATCGAATTCCATTCA	60 °C	Lovin <i>et al.</i> (2009)
201 AAT1***	HEX	330 - 340	For - GATCGTTCGACAGCATCTGA Rev - GGAAAGCTCATCGCCTACTG	60 °C	Lovin <i>et al.</i> (2009)

*Primers utilizados para amplificação de amostras do estudo 1 e 2;

**Primers utilizados para amplificação de amostras somente do estudo 2;

***Primers utilizados somente em amostras do estudo 1 e amplificados juntos, na mesma reação.

d) Multiplex

As amostras para análise de fragmentos foram preparadas em microplacas de 96 poços de 200µl cada, com o objetivo de baratear a técnica, emparelhamos os *loci* microssatélites com base na não sobreposição de tamanho e cor da fluorescência conjugada, montando um sistema de Multiplex para visualização dos tamanhos dos fragmentos em sequenciadores automáticos (Tabela 4 e 5). Conforme previamente estabelecido por Brown et al. (2011). Para tanto, 1uL do produto de PCR de cada conjunto de *primers* amplificado, foi adicionado a 9uL de uma mistura de formamida *Hi-DiTM Formamide* da *Applied Biosystems*.

Para o Estudo 1, ainda foi adicionado em cada poço da placa que continha o produto de PCR, 0.3uL de marcador de peso molecular *GeneScan 500 ROX* da *Applied Biosystems*. Este marcador permite a estimativa do tamanho dos alelos (em pares de bases), obtidos na análise de fragmentos. As placas foram enviadas ao Laboratório de Diagnóstico Molecular e Sequenciamento da UNESP – Botucatu.

Já as placas do Estudo 2, que foram preparadas no CMDT – Lisboa, eram enviadas a Universidade de Yale, *GeneSifter® Analysis Edition* (http://dna-analysis.research.yale.edu/dna_sequencing.html).

Os fragmentos amplificados eram então, separados por eletroforese capilar em sequenciadores automáticos e, após recebimento dos resultados, os picos que representam o tamanho dos alelos foram visualizados utilizando o *software GeneMarker V1.40* (SoftGenetics, UK) (Figura 14).

Para análise dos tamanhos de alelos foram utilizados padrões para acurácia dos resultados. Os padrões foram um controle positivo e outro negativo; para o controle positivo foi usada uma amostra de *Ae. aegypti* que tinha seu padrão de tamanho e característica do pico/alelo, testado em várias outras ampliações; e para o controle negativo utilizamos a amplificação de PCR sem amostra de DNA. Estes padrões foram seguidos para todos os indivíduos analisados.

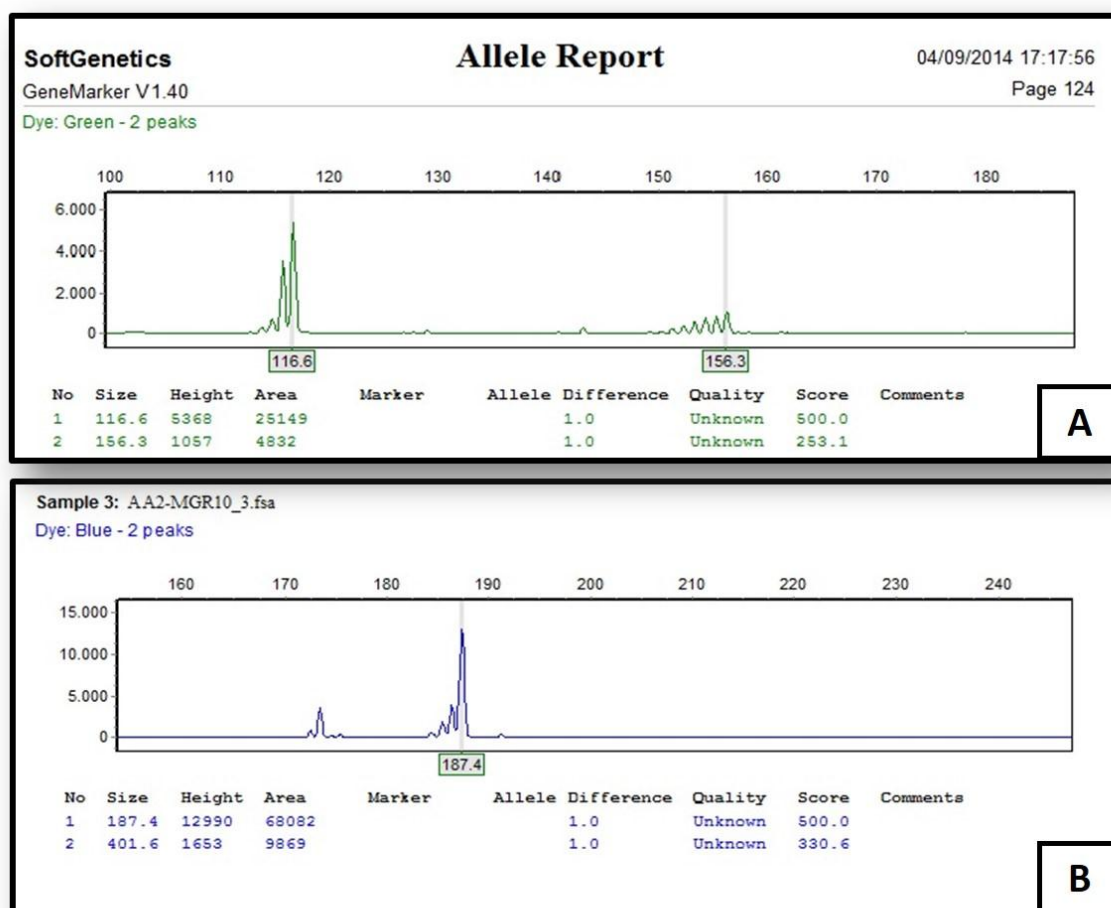


Figura 14. Eletroferogramas. Exemplos de ampliações satisfatórias de mosquitos *Ae. aegypti* com os primers A. AG2-[HEX] (picos verdes), indivíduo heterozigoto para os tamanhos de alelos 116.6 e 156.3pb; B. AC2[FAM] (pico azul), indivíduo homozigoto para o alelo 187.4pb. O marcador de peso molecular ROX500 aparece em vermelho.

3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS GENÉTICOS

Com os genótipos obtidos na leitura dos eletroferogramas dos microssatélites, foi organizada uma base de dados no Programa *Excel*® (*Microsoft*) por indivíduo e *locus*, contendo o tamanho dos alelos em pares de bases, afim de realizar as análises genético populacionais. Os parâmetros determinados nas análises estatísticas foram testados com nível de significância de 0,05, para a rejeição da hipótese nula (H_0) e para testes múltiplos, este valor foi corrigido de acordo com o método sequencial de Bonferroni (Holm, 1979) para evitar erros do tipo I (falsa rejeição de H_0). Os testes estatísticos foram desenvolvidos com os mesmos parâmetros para ambos estudos desenvolvidos neste trabalho, são estes:

A. Software R

R é uma linguagem e ambiente para computação estatística e gráfica desenvolvido por Ihaka & Gentleman (1996). *R* como Software fornece uma ampla variedade de estatísticas (testes estatísticos clássicos, análise de séries temporais, classificação, *clusterização*, estatísticas aplicadas a estudos genético populacionais, análises filogenéticas e análises de genômica comparativa); e técnicas gráficas altamente extensíveis.

R é derivado da linguagem de programação estatística *GNU – S*, a linguagem *S* é o veículo de escolha para a investigação na metodologia estatística e *R* fornece uma rota de código aberto para a participação nessa atividade. *R* está disponível como *Software* livre sob os termos da GNU (General Public License) em forma de código-fonte da *Free Software Foundation*. Ele compila os dados e roda em uma ampla variedade de plataformas computacionais, tais como o *Windows*.

Existem muitos pacotes para o *R*, em nossas análises utilizamos basicamente o pacote *Poppr*, desenvolvido por Kamvar et al. (2013). *Poppr* introduz funções essenciais para a análise de populações, permitindo análises hierárquicas de populações com vários níveis de subpopulações, abordagens para estudos com amostras clonais, análises de distância (incluindo a distância de Bruvo's) (Bruvo et al., 2004). Dendrogramas com suporte de *bootstrap*, testes de Desequilíbrio de ligação e Equilíbrio de Hardy-Weinberg e análises

de Componente Principal (PCA e DAPC). Ainda outros pacotes, como o *adegenet* (Jombart, 2008), *ggplot2* (Wickham, 2009), *mmod* (Winter, 2012), *ad4* (Dray & Dufour, 2007) são utilizados pelo *poppr* quando este não possui ferramentas para calcular determinadas análises complementares.

B. Frequências alélicas, Heterozigotia Esperada e Observada e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

As frequências alélicas e genóticas são resultado da soma do número de indivíduos heterozigotos para um determinado alelo com duas vezes o número de indivíduos homozigotos, e divisão do resultado pelo dobro do número total de indivíduos.

A heterozigotia esperada (H_e) é a proporção esperada de genótipos heterozigóticos numa população de n indivíduos. Esse parâmetro baseia-se nas frequências alélicas num dado *locus*, assumindo o princípio de Hardy-Weinberg (Nei, 1987). A heterozigotia observada (H_o) é a proporção de genótipos heterozigóticos encontrada numa amostra de n indivíduos. Ambos parâmetros foram determinados com auxílio do programa Arlequin v.3.1. (Excoffier et al., 2005).

A verificação de HWE, que aplica o método de Guo & Thompson (1992), foi feita com auxílio do programa Arlequin v.3.1. (Excoffier et al., 2005). Este teste foi feito com os dados dos genótipos, *locus* por *locus*. Para cada *locus* microssatélite testou-se a hipótese nula (H_0 = união aleatória de gametas) com duas hipóteses alternativas (H_1 = déficit de heterozigóticos ou H_1 = excesso de heterozigóticos).

C. Diversidade Alélica, Diversidade Genotípica, Riqueza Alélica e Coeficiente de Endogamia.

A diversidade pode ser quantificada de diferentes maneiras quando calculamos as Frequências Genóticas ou as Frequências Alélicas de um determinado *locus* em uma determinada população. Os índices mais importantes são os cálculos de Riqueza Alélica ou Genotípica e *Evenness* (Grunwald et al., 2003).

O cálculo de *Evenness* (E) é uma medida de distribuição de abundância em genótipos. Os valores variam entre 0 e 1, quando se aproximam de 1 indicam que os genótipos são igualmente abundantes nesta população, sendo o contrário, caracterizados com escasso *Evenness*. Estes índices foram calculados segundo a Diversidade de Shannon-Wiener (2001) e

Stoddard e Taylor (1998), tais estatísticas foram analisadas no *Software R*, com o pacote *poppr*.

A riqueza alélica (Ra) é uma medida de diversidade alélica ajustada pelo tamanho da amostra de menor dimensão. Esta medida permite uniformizar as amostras em estudo de modo a torná-las comparáveis. Estes parâmetros foram determinados através do programa *FSTAT versão 2.9.3.2* (Goudet, 1995).

O coeficiente de endogamia (F_{IS}), que traduz os níveis de heterozigotia/homozigotia numa dada população, foi obtido através do programa Arlequin v.3.1. (Excoffier et al., 2005) para cada *locus* microssatélite. Os valores negativos de F_{IS} correspondem a um excesso de heterozigotos e valores positivos a um déficit de heterozigotos. Se $F_{IS}=0$ o acasalamento entre os indivíduos de uma população ocorre de modo aleatório e $H_e = H_o$, portanto, as frequências genotípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (De Meeûs et al., 2007).

D. Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação é a associação não aleatória de alelos em diferentes *loci*, e foi analisado com auxílio do programa *Genepop versão web* (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008).

Testes de significância por randomização são conceitualmente mais robustos do que testes de aproximações analíticas simples quando queremos analisar desequilíbrio de ligação (Haubold et al., 1998). Para isso são utilizados geralmente dois índices em associação em testes de combinações de *loci*, estes realizam reamostragem dos dados, objetivando obter uma distribuição nula para a expectativa de acasalamentos aleatórios entre as populações analisadas (Grünwald et al., 2003).

As análises de significância por randomização foram utilizadas para testar o desequilíbrio de ligação entre *loci*, para tanto utilizou-se o *Software R*, pacote *poppr* que se baseia nos índices (I_A) e ($r^{\bar{d}}$). O índice $r^{\bar{d}}$ foi uma alternativa proposta por Agapow & Burt (2001) para normalizar os testes de variância realizados por I_A , já que este índice representa o número real de *loci* analisados, e por isso é menos tendencioso de ser considerado.

E. Estruturação populacional

As análises da estrutura populacional foram calculadas empregando a análise de variância molecular (AMOVA), com o programa *Arlequin v.3.1* (Excoffier et al., 2005). Esse método estatístico se baseia na geração de estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos (inter e intrapopulacional). Para as análises *Bayesianas* de subestrutura populacional recorreu-se ao programa *Structure versão 2.3* (Pritchard et al., 2000). A análise de *clusters* foi feita sem informação *a priori* sobre a localização das amostras. A fim de obter o melhor número de *clusters* (*K*) foram feitas 10 corridas, para *K* de 1 a 7 (para o estudo 1). Para todas as corridas assumiu-se modelo de mistura, valor de *burn-in* de 50000 interações com 50000 repetições. Estes resultados foram analisados pelos programas *Structure Harvester* (Earl & Von Holdt, 2011) e *CLUMPP* (Jakobsson & Rosenberg 2007).

Para testar se as populações são significativamente diferentes, realizou-se teste de aleatorização usando o pacote *ade4* do *Software R*. Estas análises se baseiam em permutações aleatórias entre as matrizes de amostras, tal como descrito por (Excoffier, et al., 1992).

Análises de Componente Principal (PCA) foram aplicadas para investigar a estruturação populacional. Estas se baseiam em análises multivariadas e são utilizadas para identificar as estruturas genéticas em grandes conjuntos de dados. PCA resume a variabilidade global entre indivíduos, que inclui tanto a divergência entre os grupos (variabilidade genética estruturada), quanto à variação que ocorre no interior de grupos (variabilidade genética "aleatória") (Hotelling, 1933).

DAPC – Análise Discriminante de Componentes Principais foi aplicada para avaliar estruturação populacional mais aprofundada entre as regiões estudadas. *DAPC* transforma os dados utilizando análises de componente principal (PCA) e posteriormente realiza a análise discriminativa (DA) entre grupos, esta abordagem garante que as variáveis sejam perfeitamente não correlacionadas entre si, e que o seu número seja menor do que as variáveis dentre indivíduos, tal prática não implica na perda de informações, já que todos os componentes principais (PCs) podem ser retidos e, por conseguinte, toda a variação nos dados originais conservadas. Após a *clusterização* com PCA os grupos são discriminados com análises estatísticas de DAPC, que capta as diferenças entre os PCs retidos (Jombart et al., 2010).

Análises de PCA e DAPC foram realizadas no *Software R*, com os pacotes *adegenet* e *poppr*.

F. Análise de Máxima Verossimilhança.

O Programa *ML-RELATE* (Kalinowski et al., 2006), foi utilizado para estimar o grau de relacionamento entre pares de indivíduos de uma amostra. Este programa aplica uma estatística de máxima verossimilhança para classificar o relacionamento entre pares de indivíduos em quatro classes de *Pedigree* genético: *U* (*Unrelated*) são indivíduos não relacionados, *HS* (*Half-Sibs*) meio-irmãos, *FS* (*Full-Sibs*) irmãos verdadeiros, ou irmãos completos e *PO* (*Parent-Offspring*) pais e filhos.

G. Coeficiente de *Inbreeding* (*F*)

Endogamia refere-se a um excesso de homoziguidade em um determinado indivíduo, devido ao acoplamento de pais geneticamente relacionados. Este excesso de homoziguidade se dá pelo fato de existirem chances não negligenciáveis de um indivíduo homozigoto herdar dois alelos idênticos a partir de um ancestral comum recente. O Coeficiente *F* é definido como a probabilidade de que em determinado *locus*, dois alelos idênticos terem sido herdados de um ancestral comum. Coeficiente *F* permite calcular a probabilidade de um determinado estado (homozigoto / heterozigoto) em um dado genótipo (*log-probabilidades* são somadas através de *loci*), esta característica ser definida por *Inbreeding* ou endogamia (Wright, 1922; Falconer & Mackay, 1996).

O Coeficiente de *Inbreeding* foi calculado utilizando o *Software R*, pacote *adegenet*, que primeiro calcula a média de endogamia para cada indivíduo, e traça uma distribuição geral da população com valores aceitos de probabilidade de endogamia quando são $\leq 0,5$. Ainda, neste pacote de dados, é possível recalculá-lo para cada indivíduo separadamente (que foi anteriormente identificado pelo cálculo do *Coeficiente F*), e conhecer quais as porcentagens, ou chances, deste indivíduo ser homozigoto através de herança de um ancestral comum (Jombart, 2008).

CAPÍTULO I

IV. CAPÍTULO I

MACRO E MICRO-ANÁLISES POPULACIONAIS DE MOSQUITOS *Ae. aegypti* DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.

4.1. Justificativa

Com o objetivo de investigar as possíveis diferentes estruturas genéticas existentes entre populações de mosquitos *Ae. aegypti* que colonizam diferentes regiões, obtivemos amostragens representativas de cinco cidades do Brasil (**Tabela 6; Figura 15**). Mosquitos adultos foram genotipados e submetidos à estudos populacionais (*como visto no item 3.1. Genotipagem por Microssatélites*).

Um total de 446 mosquitos foram genotipados, utilizando 12 marcadores microssatélites (**Tabela 3**). Esta etapa do trabalho foi realizada no laboratório do CMDT, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, em Lisboa – Portugal.

Devido às diferentes características de cada amostragem, tais como, obtenção das amostras e regiões amostradas, falaremos separadamente sobre cada localidade a seguir.

Tabela 6. Descrição da amostragem. Cidade e Estado de origem das amostras; Método de coleta de ovos de *Ae. aegypti* utilizado pela Secretaria de Saúde Local; Quantidade de Amostras por localidade e Abreviaturas utilizadas neste trabalho para identificação de cada localidade em Tabelas e Figuras.

Localidade	Estado	Metodologia de coleta	Nº de amostras por localidade	Abreviaturas*
Belo Horizonte	Minas Gerais	ovitrapas	86	BH
Botucatu	São Paulo	ovitrapas	90	BTU
Campo Grande	Mato Grosso do Sul	ovitrapas	90	CG
Maringá	Paraná	ovitrapas	90	MAR
Rondonópolis	Mato Grosso	ovitrapas	90	RON
Total de mosquitos genotipados			446	

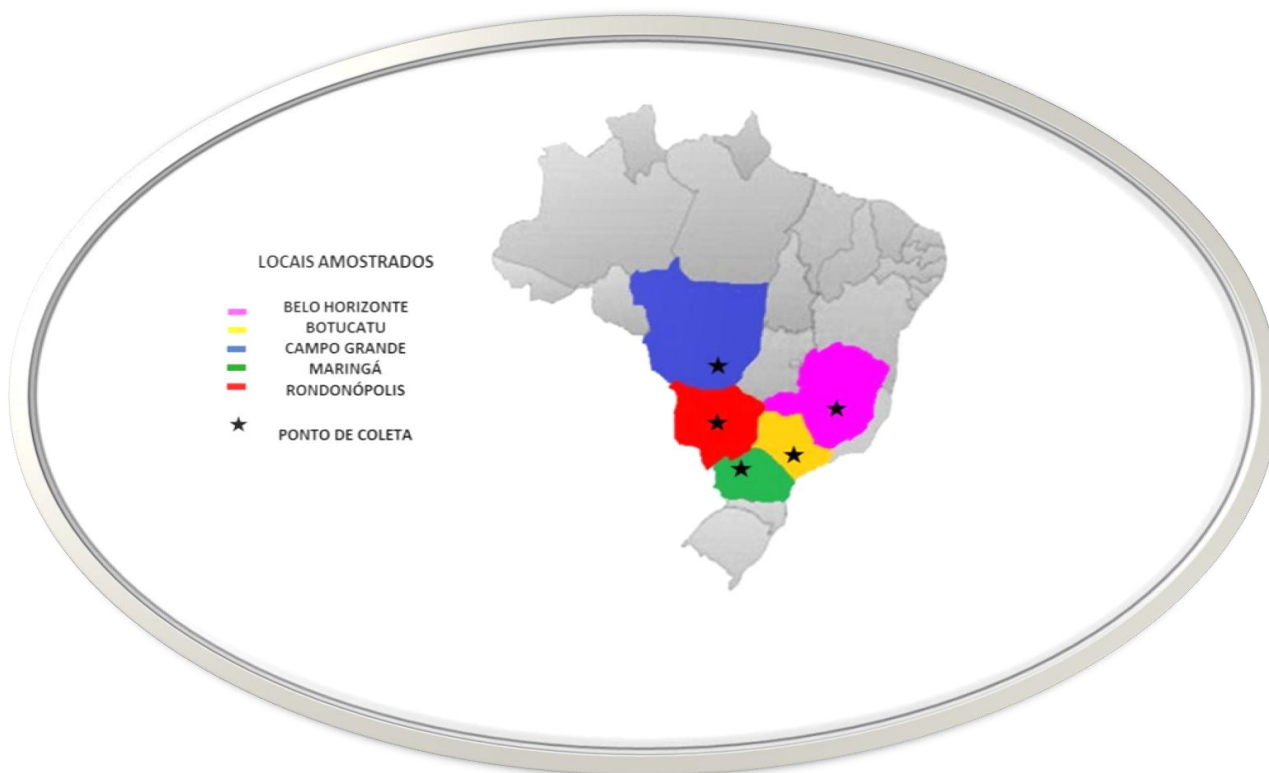


Figura 15. Mapa das cinco regiões amostradas. Partes coloridas: Estado de Origem das amostras; Estrelas: referenciam os municípios de coleta, com escalas aproximadas. Figura adaptada da página do *Google Maps*.

4.2. Características das áreas Amostradas.

• Belo Horizonte – MG

O Município de Belo Horizonte está localizado na região Centro-Sul do Estado de Minas Gerais. Tem sua população estimada em 2.491.109 habitantes, segundo os dados do Censo divulgados em Agosto de 2014. Está situado a 852 metros de altitude, com clima Tropical e temperaturas médias anuais entre 17 e 20°C, os índices pluviométricos estão próximos de 1.300mm anuais (IBGE, 2014).

No Município de Belo Horizonte, o combate à Dengue é coordenado pela Prefeitura Municipal através da Secretaria Municipal de Saúde Ambiental (SMSA). As ações pontuais

do grupo social da SMSA mobilizam o SUS-BH por meio de projetos, tais como “Meu bairro em foco” e “Quinta Itinerante”, no combate à doença por meio de atuações técnicas e lúdicas nos territórios que apresentam altos índices de infestação vetorial e registros de entrada de novos casos de Dengue. As ações são aplicadas seguindo a subdivisão do Município que é estabelecida em nove Distritos Sanitários, sendo estes chamados Regionais (Norte, Centro-Sul, Pampulha, Barreiro, Venda Nova, Oeste, Noroeste, Leste e Nordeste). Tais unidades têm suas áreas de abrangência constituídas por setores censitários contíguos, considerando as barreiras geográficas, a malha viária e a população residente (PMBH, 2014).

Mesmo com todo o esforço da Secretaria de Saúde local, o Município de Belo Horizonte há alguns anos vem sofrendo com epidemias de Dengue. Somente entre os meses de Janeiro a Fevereiro de 2015, já foram confirmados 336 casos da doença. A Regional com o maior número de casos é o Barreiro, com 92 confirmações, seguida pelas regionais Noroeste e Oeste (PMBH, 2015).

O LIRAA (Levantamento Rápido de Índices para *Ae. aegypti*), referente ao mosquito *Ae. aegypti* realizado em janeiro de 2015, apontou índice menor que o do ano de 2014, entretanto, apesar da baixa infestação a SMSA alerta a população sobre os riscos de transmissão da Dengue e da Febre *Chikungunya*, já que houve um aumento no percentual de focos do mosquito dentro dos domicílios - de 80% no LIRAA de janeiro/14, para 84% em janeiro/15 (SMSBH, 2015).

As análises populacionais realizadas em nosso trabalho, com mosquitos *Ae. aegypti* da cidade de Belo Horizonte, foram possíveis devido à obtenção de amostras com o Dr. Paulo Pimenta, Pesquisador do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ – MG, o qual possui uma colaboração pré-estabelecida com a Secretaria de Saúde. A SMSA realiza a distribuição das ovitrampas no Município, o Dr. Paulo Pimenta gentilmente arrecadou amostras das ovitrampas e, posteriormente nos enviou os ovos de *Ae. aegypti* provenientes do campo e coletados durante o mês de Abril de 2013.

Os ovos foram separados por regionais e enviados para nosso laboratório em Botucatu - SP. Já no insetário foram mantidos em temperatura, umidade e fotoperíodo controlados até a fase adulta dos mosquitos. Na fase adulta os mosquitos foram organizados por regionais (**Figura 16**) e escolhidos aleatoriamente para análise total da população de Belo Horizonte.

MAPA DO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE - MG



Figura 16. Mapa das sub-regiões amostradas em Belo Horizonte. Cores em gradiente de verde representam as regiões amostradas, e os números em vermelho, a identificação de cada Regional segundo informações prévias da Secretaria de Saúde local. Fonte: Mapa adaptado do *Google Maps*.

• Botucatu – SP

Botucatu é uma cidade localizada no Centro-Oeste do Estado de São Paulo, com uma área de 1,482 km² e a população estimada em 137.899 habitantes (IBGE, 2014). O clima é Tropical de altitude e possui duas estações bem definidas, uma estação seca e fria, entre maio e outubro, e outra estação chuvosa e quente, entre novembro e abril (PMB, 2014a).

No município de Botucatu a vigilância e o controle de *Ae. aegypti* são realizados pela Prefeitura Municipal, mais especificamente pelo órgão de Vigilância Ambiental em Saúde

(VAS). Uma das metodologias adotada pelo Município para monitoramento da infestação de mosquitos é a Avaliação da Densidade Larvária (ADL). No mês de julho de 2014 foi aferida a ADL e, nesta ação foram investigados 3.537 imóveis, destes apenas 0,5% estavam infestados com larvas de *Ae. aegypti*. Levando em consideração o índice preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para infestações, o valor encontrado para o Município na ocasião foi classificado como satisfatório. Quanto aos casos de Dengue, neste mesmo ano foram registrados em sua maioria casos importados (18), em que o indivíduo se infectou fora do local onde foi diagnosticada e apenas 2 casos autóctones, quando a infecção ocorre no próprio município. Os casos autóctones foram rapidamente identificados e a VAS juntamente com a Secretaria de Saúde impediram a transmissão (PMB, 2014b).

Entretanto, em 2015 o Município obteve um aumento significativo de casos da doença. Até o início do mês de março foram confirmados 53 casos de Dengue, sendo 18 casos importados e 35 autóctones. A preocupação com o avanço da Dengue no município é crescente, visto não apenas o período de chuvas que ocorre nesta época, mas também pelo número elevado de materiais que acumulam água e continuam a ser encontrados pelos agentes de saúde pública em residências e terrenos baldios do Município. Em janeiro de 2015, a ADL apontou índice de 5,5 o que representa que a cada 100 imóveis pesquisados no município, de cinco a seis tem focos com larvas de *Ae. aegypti*. Levando em consideração o índice abaixo de 1, preconizado como satisfatório pela Organização Mundial da Saúde, o risco de surto de Dengue é real (PMB, 2015).

Para nosso estudo, ovos de mosquitos *Ae. aegypti* foram coletados pela VAS durante o mês de Abril de 2013, as coletas foram acompanhadas e realizadas num período total de duas semanas. Previamente a cidade de Botucatu foi dividida em 4 grande Regiões (**Figura 17**), e realizada uma estimativa do nº de ovitrampas/nº de casas, assim as ovitrampas foram distribuídas de forma a cobrir toda a área do Município.

As amostras foram gentilmente cedidas pela VAS e levadas ao nosso laboratório na Unesp – Botucatu ao fim das duas semanas de coleta. Já no insetário, os ovos foram mantidos em temperatura, fotoperíodo e humidade controladas até a fase adulta dos mosquitos, onde estes foram separados por espécie (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*). Mosquitos identificados como *Ae. aegypti* foram selecionados e estocados em freezer a -20°C.

Para os estudos populacionais, os mosquitos congelados foram escolhidos aleatoriamente, objetivando tornar a amostragem representativa para toda a área do Município de Botucatu.

MAPA DO MUNICÍPIO DE BOTUCATU - SP

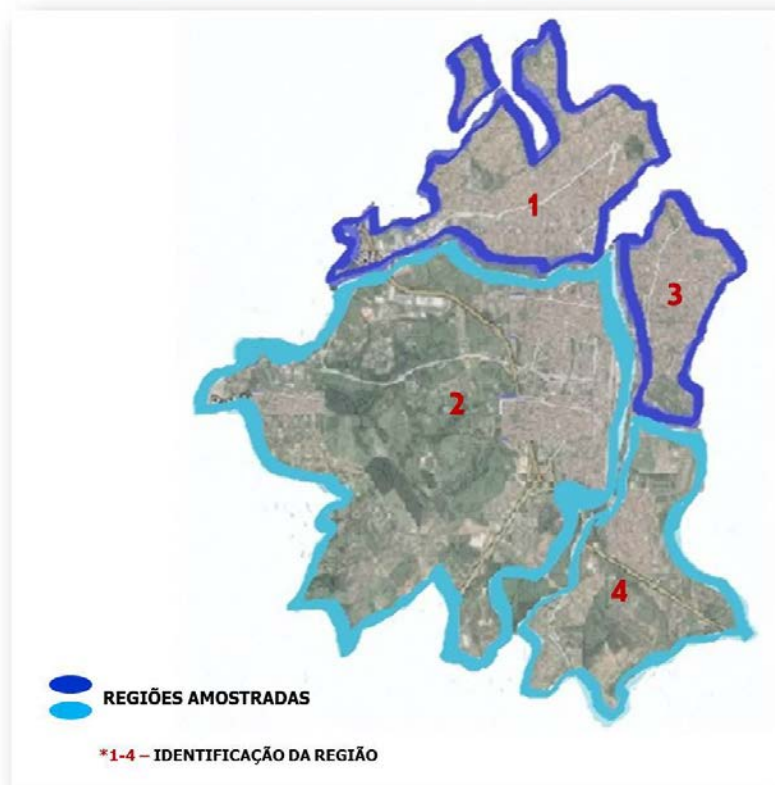


Figura 17. Mapa das sub-regiões amostradas em Botucatu. Cores em gradiente de azul representam as regiões amostradas, e os números em vermelho, a identificação de cada Regional segundo informações prévias da Secretaria de Vigilância Ambiental em Saúde. Fonte: Mapa adaptado do *Google Maps*.

• Campo Grande – MS

A cidade de Campo Grande está localizada na região Centro-Oeste do Brasil e é a capital do Estado de Mato Grosso do Sul. Possui temperaturas bastante variáveis durante o ano, com predominância de clima tropical. Possui duas estações muito bem definidas: quente e úmida no verão e menos chuvosa e mais amena no inverno, a Precipitação média anual é de 1.534mm (PMCG, 2014a). Sua população possui cerca de 843.120 habitantes segundo dados recentes do IBGE (IBGE, 2014).

A população de Campo Grande vem convivendo com a Dengue, desde o ano de 1986. O sorotipo DEN-1 era predominando naquela época, entretanto, dez anos depois foi constatado o sorotipo DEN-2 no Município. O qual foi responsável pela epidemia que

ocorreu no ano de 2002, chegando aproximadamente a 13.000 notificações. Em 2005, novo sorotipo foi identificado em circulação, o DEN-3, que devido à existência de uma população susceptível e condições favoráveis, veio a deflagrar nova epidemia em 2007 (PMCG, 2012).

Segundo a Secretaria Estadual da Saúde do Estado de Mato Grosso do Sul, até o mês de Março de 2015, 1.290 novos casos foram notificados em Campo Grande (SESMS, 2015). Apesar deste número ser considerado de média incidência, o Município de Campo Grande vem mobilizando uma força-tarefa com 136 agentes de saúde para atuar em ações de prevenção a Dengue em alguns bairros da cidade, onde a ADL identificou risco de epidemia devido a grande quantidade de criadouros encontrados (PMCG, 2015).

Em Campo Grande, a Secretaria Municipal de Saúde Pública (SESAU) juntamente com o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) realiza ações de controle de *Ae. aegypti* no Município. Estes órgãos possuem um comitê de mobilização de Combate à Dengue, tendo como objetivo a mobilização para educação permanente da população, através de parcerias com órgãos e entidades, conscientização nas escolas, informes educativos no jornal da associação comercial e a vistoria em imóveis sem ocupação (PMCG, 2014a).

Outro grande problema que o Município enfrenta é o risco de transmissão da Febre *Chikungunya*, em 2013 foram notificados 61 casos suspeitos da doença, entretanto até setembro deste mesmo ano, somente um paciente foi confirmado com infecção de carácter autóctone por este vírus (PMCG, 2014b).

Em nosso estudo, a colaboração com a Dra. Alessandra Gutierrez de Oliveira (Pesquisadora na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul) possibilitou a obtenção das amostras de *Ae. aegypti* do Município de Campo Grande. A Dra. Alessandra possui uma prévia colaboração com a SESAU-CCZ, o que possibilitou nossa participação nas coletas e posterior obtenção das amostras. As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas através de ovitrampas provenientes de 7 Bairros da cidade de Campo Grande. As coletas ocorreram durante o mês de Fevereiro de 2013, e os bairros amostrados foram: Moreninha, José Pereira, Nasser, Pioneiros, Novos Estados, Santa Emília e Carvalho (**Figura 18**).

Os ovos eram enviados ao Laboratório da UFMS e mantidos em insetário até a fase adulta. Já nesta fase, foram separados por Bairros de origem e estocados em álcool [70%],

para posteriormente serem enviados ao nosso laboratório na Unesp em Botucatu, para extração do DNA e posteriores análises genético populacionais.

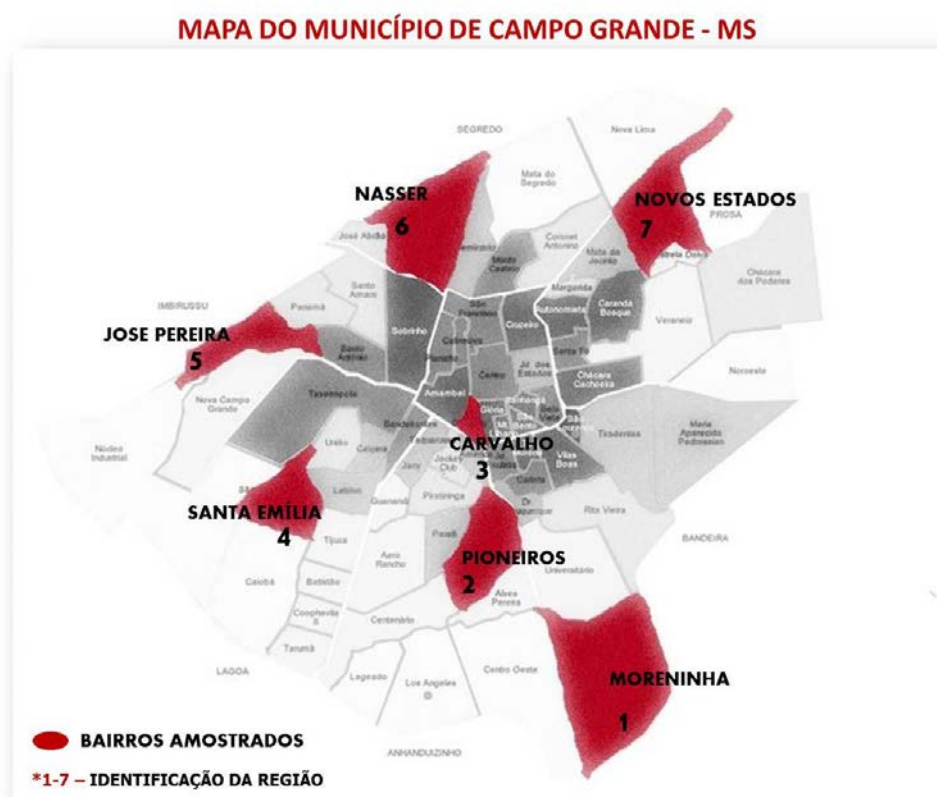


Figura 18. Mapa das sub-regiões amostradas em Campo Grande. Cores em vermelho representam as regiões amostradas, e os números em preto, a identificação de cada Bairro segundo informações prévias da Secretaria Municipal de Saúde Pública (Sesau e CCZ). Fonte: Mapa adaptado do *Google Maps*.

- **Maringá – PR**

O Município de Maringá possui sua população estimada em 391.698 habitantes, segundo o IBGE (2014), e está situada na região Norte Central do Estado do Paraná. O clima do Município é subtropical, com temperaturas médias anuais de 21.5 °C. As chuvas são bem distribuídas durante o ano, porém com maior tendência nos meses de verão (PMM, 2014).

O Município de Maringá possui sua área urbana distribuída em continuidade com os Municípios de Paiçandu e Sarandi, a este Área Urbana Contínua se dá o nome de AUC–

Maringá. Os municípios de Maringá apresentam registros históricos de casos de Dengue que seguem proporcionalmente os casos na escala estadual, nacional e mundial (Junior e Mendonça, 2012).

Surtos da doença começaram a aparecer em 1995, quando foram registrados 830 casos suspeitos de Dengue. Já em 2002, foram notificados mais de 650 casos positivos e 02 óbitos pela Febre Hemorrágica da Dengue (FHD). No ano de 2007, uma notável epidemia notificou mais de 7.900 casos positivos e 06 óbitos, sendo 05 deles por FHD. Neste período epidêmico, o Município chegou a apresentar uma média de 110 notificações diárias (Junior e Mendonça, 2012).

Em conjunto com o Comitê Municipal de Combate à Dengue, a Secretaria de Saúde realiza campanhas junto ao público nas Unidades de Saúde, empresas e instituições (PMM, 2015a). Além dessas ações, o LIRAA é realizado para controlar a infestação de *Ae. aegypti* no Município, em 2015 foi aferido durante o mês de janeiro com índice de 2,2%. Este índice é apontado pelo Ministério da Saúde como sinal de alerta, por isso os agentes ambientais do município continuam as ações de orientação e combate ao mosquito (SSM, 2015). Quanto aos casos de Dengue no Município, até o mês de março de 2015, foram notificados 658 casos, sendo apenas 59 confirmados, o restante segue em investigação (PMM, 2015b).

• Rondonópolis – MT.

O município de Rondonópolis pertence à região Sudeste de Mato Grosso e possui clima Tropical quente e sub-úmido. A precipitação anual é de 1.500mm, com temperatura média 24° C anuais e máximas de 40° C (PMR, 2014). Sua população em 2014 foi estimada em aproximadamente 211.718 mil habitantes (IBGE, 2014).

O controle de Dengue no município de Rondonópolis é realizado pela Secretaria de Vigilância Ambiental (SVA) em parceria com o Departamento de Vigilância Epidemiológica, que além do levantamento do índice larvário realizado com frequência no município, os agentes de Vigilância Ambiental atuam constantemente nas ações de conscientização dos moradores e orientações sobre como prevenir a Dengue com iniciativas simples (PMR, 2015a).

No ano de 2013 foram registrados 1.820 casos de Dengue em Rondonópolis, além da introdução do sorotipo DEN-4, que devido à susceptibilidade dos moradores desta região, ocasionou um dos piores surtos da doença que o Município já enfrentou. Foram realizadas

um total de 3.413 notificações em 2013, sendo que 53% deste resultaram em casos confirmados de infecções por Dengue, isto somente entre janeiro e dezembro deste mesmo ano (PMR, 2015b).

• **Amostragem de *Ae. aegypti* de Maringá e Rondonópolis**

As amostras das cidades de Maringá e Rondonópolis foram gentilmente cedidas pelo Dr. Mario Antonio Navarro, professor e pesquisador da Universidade Federal do Paraná UFPR.

A coleta das amostras destas duas localidades foram realizadas por empresas terceirizadas, e segundo informações do Dr Mario seguiram a metodologia de Ovitampas. Após a realização das coletas, os ovos de *Ae. aegypti* foram enviados a seu laboratório na UFPR-Curitiba, para desenvolvimento dos adultos, estes foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo até a fase adulta destes.

Os ovos recebidos pelo grupo do Dr. Mario foram colocados em uma gaiola (uma gaiola para cada cidade amostrada) para o desenvolvimento dos adultos, posteriormente, já na fase adulta, uma amostra representativa de cada Município foi mantida em álcool [70%] para os estudos genéticos que o grupo desenvolve.

Para nosso estudo arrecadamos as amostras já selecionadas pelo grupo do Dr. Mario, as quais foram provenientes do campo e selecionadas de forma a representar a localidade amostrada. Os mosquitos adultos foram enviados para nosso laboratório, na UNESP – Botucatu e mantidos em álcool [70%], estes foram identificados e posteriormente submetidos aos métodos de extração de DNA adotados em nosso trabalho.

4.3. Resultados

A. Análise de poder discriminatório e manipulação dos dados.

Análises estatísticas foram realizadas para investigar a qualidade dos dados gerados com as genotipagens, bem como quão informativos foram os marcadores microssatélites por nós selecionados.

A primeira ferramenta que utilizamos foi a curva acumulativa de genótipos, que permite avaliar o número de *loci* ideal para análises discriminativas visando estudos populacionais. Esta análise considera o número de indivíduos amostrados e a variabilidade genética observada. Nós utilizamos uma função de 1.000 *bootstraps* para cada *boxplot*, isto significa que cada *locus* foi amostrado aleatoriamente 1.000 vezes, considerando os dados observados, antes de ser gerada a curva de informações retidas.

Para nossos dados o *plateau* de variabilidade genotípica foi alcançado com 9 *loci* microssatélites (**Figura 19**), ou seja, a captação de polimorfismos entre os indivíduos pôde ser discriminada com 9 dos 12 *loci* utilizados. Esta análise comprovou a capacidade dos marcadores que utilizamos para realizar análises discriminatórias entre indivíduos e populações.

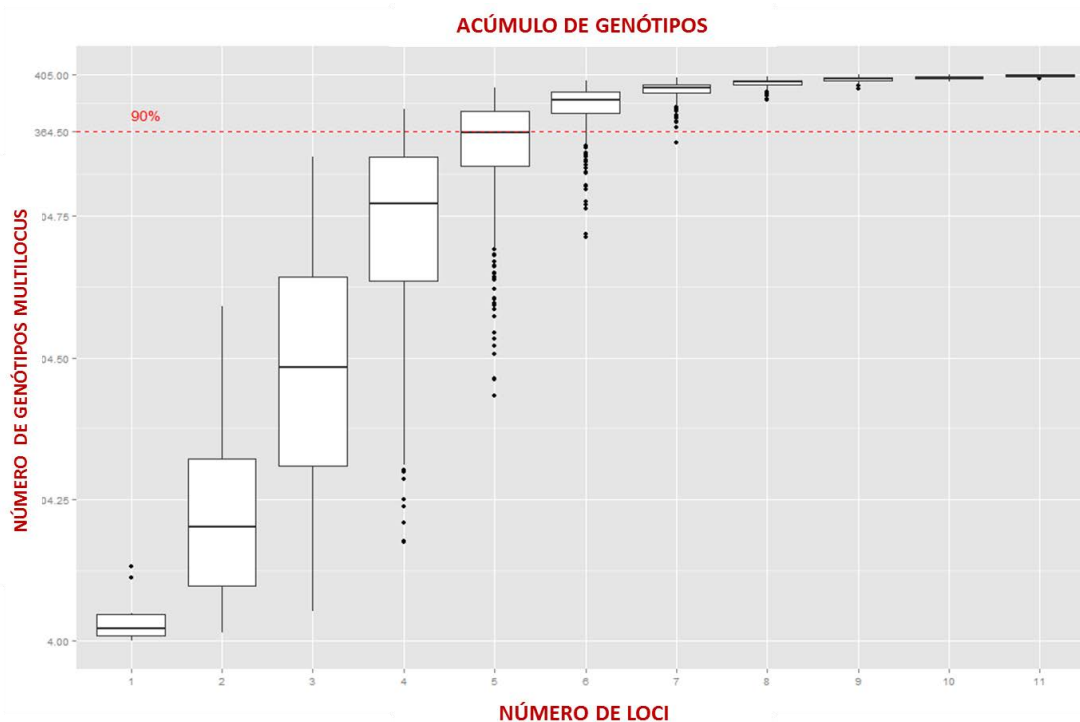


Figura 19. Curva de acúmulo de Genótipo. *Eixo y:* número de indivíduos genotipados; *Eixo x:* número de *loci* utilizados para genotipagem. *Boxplot* representando a distribuição dos valores calculados 1.000 vezes para cada *locus*. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *poppr*.

Em *locus* microssatélites, a ocorrência de alelos nulos pode causar desvios no HWE, levando a conclusões erradas sobre a diversidade genética das populações. Estes podem ser

caracterizados pela não amplificação na PCR, devido à ocorrência de algum problema técnico e, portanto, não são detectados quando os indivíduos são genotipados (Zhang & Hewitt, 2003). Alguns indivíduos do nosso conjunto de dados não foram possíveis de serem genotipados e, desta maneira, atribuídos na planilha de dados com o valor 0 (zero). Para determinar a quantidade de indivíduos sem informação (ou *missing datas*), que poderiam influenciar negativamente em nossas análises, avaliamos a porcentagem destes para cada *locus* e populações.

Na **Figura 20** podemos verificar a porcentagem de *missing data* identificada em nossos dados. O *heatmap* ao lado da figura representa as cores em escala para os percentuais de menores a maiores valores. As porcentagens para cada população ou *locus* podem também ser observadas no gráfico juntamente com as cores que caracterizam os valores obtidos.

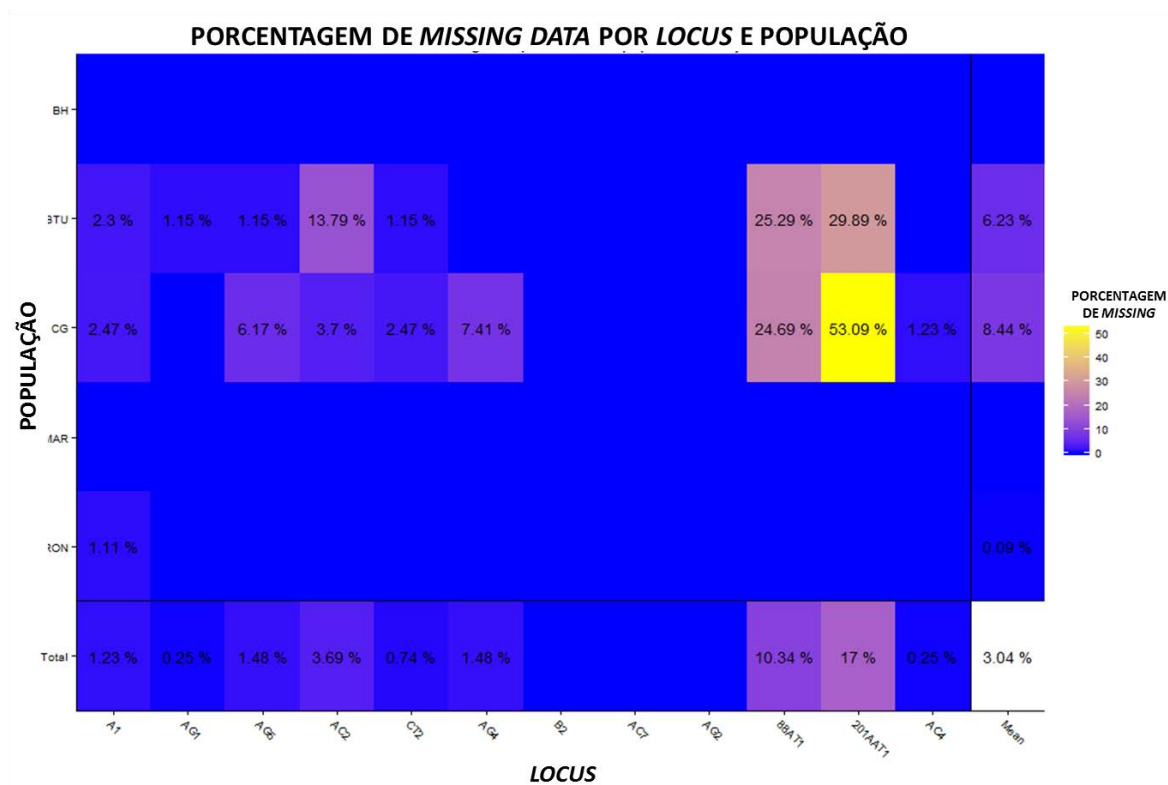


Figura 20. Porcentagem de *missing data*. Porcentagem de dados faltantes. O *heatmap* ao lado da figura determina quais *loci* e populações possuem menor ou maior porcentagem de informações faltantes. Eixo x: populações em estudo; eixo y: *loci* utilizados para genotipagem. Cor azul representam *loci* com até 5% de *missing data*; Cor amarela representam *loci* com mais de 50% de *missing data*.

Apenas para a população de Campo Grande temos um excesso de *missing data* no *locus* 201AAT1 (53,09%), como este padrão não foi observado em outras populações, atribuímos esta falta de indivíduos informativos à genotipagem desta população, que pode ter sido inferior devido à qualidade do DNA utilizado. Durante as ampliações por PCR, em alguns indivíduos/*locus* precisamos aumentar a quantidade de DNA para conseguir uma amplificação satisfatória.

O total de informações faltantes para todas as populações foi baixo (3,04%), por isso não foi necessário excluir nenhum *locus* das posteriores análises. Porém, para melhor acurácia dos resultados, retiramos indivíduos que tinham informações faltantes em mais de 6 *loci*, ou seja, indivíduos que não foram genotipados pela metade dos *loci* aqui utilizados.

B. Diversidade genética

• Frequências Genotípicas

Análises de Diversidade Genotípica (*MLG – Multilocus Genotypes*) apontam considerável diversidade entre os genótipos obtidos, os parâmetros analisados e os valores encontrados para cada população se encontram na **Tabela 7** e serão discutidos a seguir.

Segundo o índice de Shannon-Wiener (H), os valores que se aproximam de zero, indicam baixa diversidade genética. Em nosso estudo podemos considerar Diversidade Genotípica alta nas populações analisadas, já que os índices para todas as populações foram altos (em média 4,0). Maior diversidade foi encontrada nas populações de Maringá e Rondonópolis (4.50), já a menor diversidade foi detectada para a população de Belo Horizonte (4.04). Resultado similar foi obtido no índice de Stoddard e Taylor (G), o qual também indica Diversidade Genotípica, o menor valor foi observado novamente para mosquitos da cidade de Belo Horizonte (56.1), e maior valor para as populações de Maringá e Rondonópolis (90.0).

Os índices de Shannon-Wiener (H) e Stoddard e Taylor (G) são índices apropriados para medir Diversidade Genotípica, entretanto os cálculos acompanham a diversidade pelo total de indivíduos analisados em cada população, por isso maior fidedignidade é observada considerando-se o índice de *Diversidade Genotípica Imparcial* (H_{exp}), que é baseado na

Heterozigosidade esperada de Nei (1978) e calcula a diversidade para todas as populações usando também as frequências genotípicas, mas dimensiona estes valores de acordo com o menor valor de tamanho amostral, esta estimativa calcula a probabilidade de 2 genótipos selecionados aleatoriamente serem diferentes, o valor varia entre 0 e 1. Para nossos dados, em todas as populações este valor se aproxima de 1, o que corrobora com os índices *H* e *G* já observados, confirmando os pressupostos de alta Diversidade Genotípica em todas as populações aqui estudadas.

Outras estimativas de Diversidade Genotípica analisadas foram os valores de *oMLG* (*MLG observado*) comparados com os valores de *eMLG* (*MLG esperado*), *eMLG* é calculado baseado no menor valor de tamanho amostral. Os valores observados foram em sua maioria superiores aos valores esperados, indicando Riqueza Genotípica considerável nas cinco populações analisadas.

Tabela 7. Diversidade Genotípica. Pop: nome das populações; N: número de indivíduos observados; *oMLG*: número de genótipos *multilocus* observado; *eMLG*: Número de genótipos *multilocus* esperado (com base no menor número amostras – 58); SE: erro padrão baseado em *MLG*; *H*: índice de Shannon-Wiener; *G*: índice de Stoddart e Taylor; *Hexp*: Heterozigosidade esperada - Nei; *E* = índice de uniformidade. (Valores calculados pelo pacote *poppr*, *Software R*).

Pop	N	<i>oMLG</i>	<i>eMLG</i>	<i>H</i>	<i>G</i>	<i>Hexp</i>	<i>E</i>
BH	58	57	57	4.04**	56.1**	0.999**	0.990**
BTU	87	87	58	4.47	87.0	1.000	1.000
CG	81	81	58	4.39	81.0	1.000	1.000
MAR	90	90	58	4.50*	90.0*	1.000	1.000
RON	90	90	58	4.50*	90.0*	1.000	1.000
Total	406	405	58	6.00	404.0	1.000	0.998

Números em negrito representam os maiores e menores valores para os índices calculados; *maior valor; **menor valor.

O índice de distribuição dos genótipos (*Evenness – E*) indica equabilidade na abundância da riqueza genotípica em populações naturais, os valores podem variar entre 0 e 1, sendo os números mais próximos de zero, indicadores de falta de homogeneidade na distribuição de riqueza genotípica entre indivíduos de uma população.

Das cinco populações aqui avaliadas, apenas mosquitos de Belo Horizonte apresentam *Evenness* menor (0,990), entretanto apesar de terem o menor valor para este

índice, podemos considerar equidade na distribuição de riqueza genotípica, já que o valor encontrado está muito próximo de 1.

• Frequências Alélicas

Após o cálculo das Frequências Alélicas e dos histogramas organizados, observamos que as frequências para os alelos de cada *locus* variaram consideravelmente entre as populações estudadas, assim como a distribuição dos alelos nas populações (**Figura 21**).

Estimativas de diversidade genética baseadas em frequências alélicas que serão citadas nos próximos parágrafos (Riqueza Alélica, Heterozigotia Esperada e Observada, Coeficiente de Endogamia e Alelos privados) encontram-se descritas na **Tabela 8**, para todos os *loci* e populações.

Dentre os 12 *loci*, os que apresentaram maior valor de riqueza alélica foram: 88AT1 para as cidades de Botucatu (10) e Campo Grande (8); AG2 para as cidades de Belo Horizonte (11), Maringá (13) e Rondonópolis (9). Destes 12 *loci*, o que apresentou menor valor de riqueza alélica foi o *locus* AC4 (2) para as cinco populações em estudo.

Valores de Heterozigosidade observada variaram entre 0,09302 no *locus* CT2 e 0,79775 no *locus* AG2 para mosquitos da cidade de Botucatu; 0,32558 no *locus* AC4 e 0,7907 nos *loci* AG2 e 88AT1 nas amostras de Belo Horizonte; 0,09524 no *locus* CT2 e 0,62025 no *locus* AG4 em mosquitos de Campo Grande; 0,25556 no *locus* B2 e 0,83333 no *locus* 88AT1 em mosquitos provenientes de Maringá; e 0,17778 no *locus* CT2 e 0,78889 no *locus* AG2 para mosquitos da cidade de Rondonópolis.

Comparando os valores de H_o (*observada*) com os valores H_e (*esperados*), estes foram em geral menores para todas as populações e alguns *loci*, entretanto não indicam discrepância significativa entre estes índices.

Os desvios do HWE apresentaram e permaneceram com déficit de heterozigotos após a correção com o ajuste de Bonferroni para a cidade de Campo Grande em 6 *loci*: AC2, A1, B2, 88AT1, AC7 e AG2. Para as cidades de Maringá e Rondonópolis os *loci* não se apresentaram em desvio do HWE. Já para a cidade de Belo Horizonte, 4 *loci* (AG1, 88AT1, AG2 e AG5) permaneceram em HWD após a correção com o método sequencial de Bonferroni. Identificamos considerável HWD entre *loci* para as populações de Belo Horizonte e Campo Grande, este resultado sugere que estas duas populações apresentam excessos de homozigotos ou endogamia dentre os indivíduos.



Figura 21. Frequências Alélicas para cada locus e Populações. Populações: MG – Belo Horizonte; BT – Botucatu; MS – Campo Grande; PR – Maringá; MT – Rondonópolis; Legenda de cada gráfico- **Eixo x**: as cinco populações em estudo; Barras coloridas: os alelos identificados (legenda para cada barra/alelo localizada abaixo de cada gráfico, com o tamanho dos alelos em pb); **Eixo y**: porcentagem para cada alelo, em cada população.

Os valores de *Fis* (Coeficiente de Endogamia) foram na maioria dos *loci*, valores negativos, indicando panmixia nas populações. Mesmo quando analisamos os valores positivos de *Fis*, os números são próximos de 0 (zero), sugerindo ausência de endogamia nas populações analisadas.

Após 66 comparações par a par entre *loci* geradas pelo programa *Genepop*, os resultados para testes de Desequilíbrio de ligação mostraram associação positiva entre dois *loci* (A1 e AC4) para a cidade de Botucatu; para a cidade de Campo Grande entre 4 *loci* (AG1 e AG4, AC7 e AG2, AC7 e 88AT1; AG2 e 88AT1); entre 5 *loci* (AG5 e AG4; AG4 e 88AT1; AG5 e AG2; AG5 e 88AT1; B2 e AC7) para a cidade de Maringá; e para a cidade de Rondonópolis nenhum *loci* teve associação positiva nas comparações par a par. Após as comparações, para a cidade de Belo Horizonte, 5 *loci* foram associados positivamente (AG1 e AC2; AG5 e 88AT1; AG4 e 88AT1; A1 e 201AAT1; AC2 e CT2).

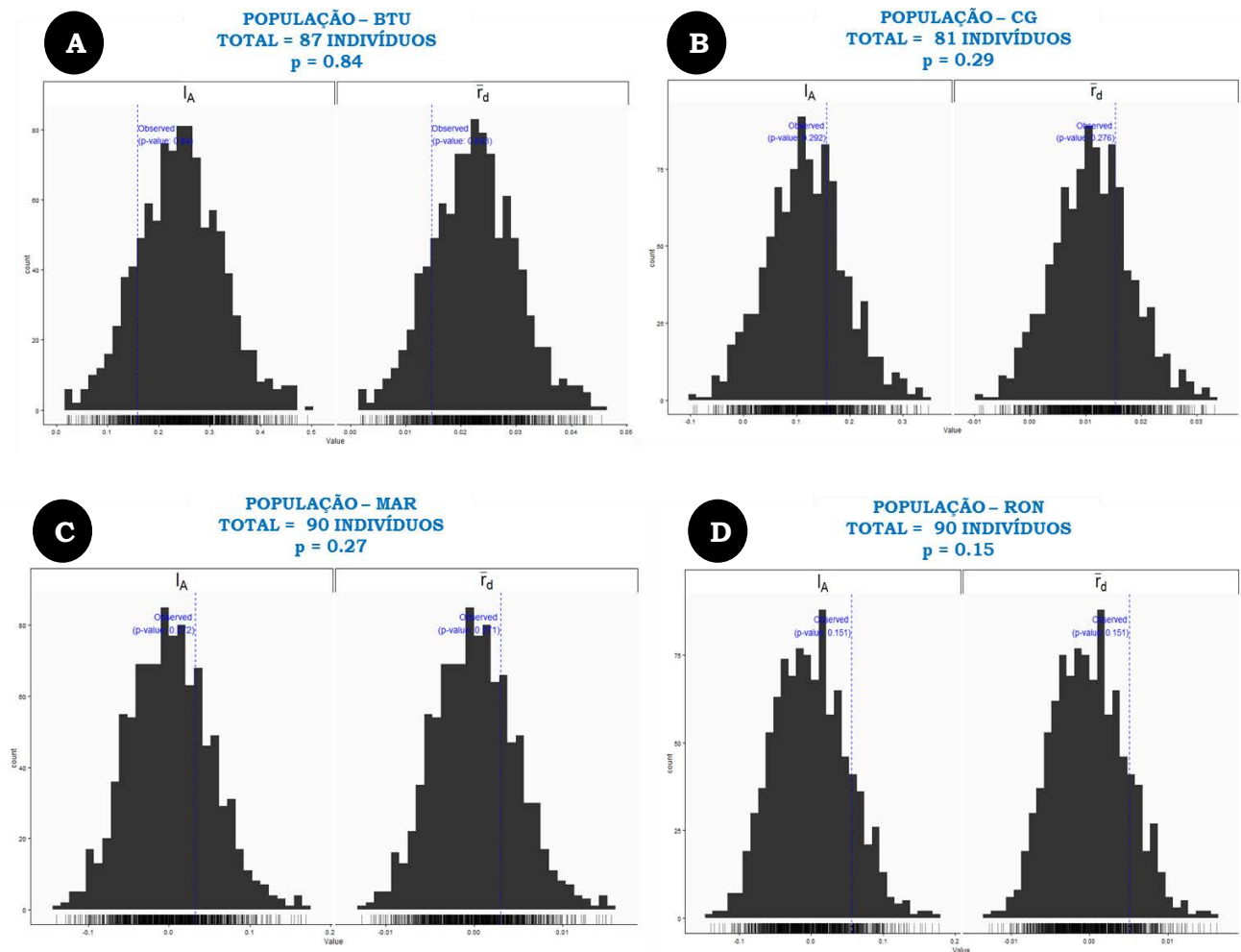
Cálculos de randomização para testar associações entre *loci* foram executados para as cinco populações em estudo. Esse teste se baseou em 1.000 permutações dos índices de associação (I_A) e índice de associação standardizado ($r^{\bar{d}}$). Os resultados podem ser observados na **Tabela 9**. Associação positiva é sugerida, com valores de p significativos, para a população de Belo Horizonte nos dois índices calculados ($I_A = 1.070$; $p = 0.001$; $r^{\bar{d}} = 0.098$; $p=0.001$). Mesmo quando consideramos os valores obtidos para o índice $r^{\bar{d}}$, que é menos tendencioso, associação entre *loci* pode ser considerada.

Tabela 9. Desequilíbrio de ligação. I_A = Índice de associação entre os indivíduos; pI_A = valor de p do índice de associação; $r^{\bar{d}}$ = índice de associação standardizado; $pr^{\bar{d}}$ = valor de p de $r^{\bar{d}}$. Valores gerados no *Software R* utilizando o pacote de dados *poppr*.

	I_A	pI_A	$r^{\bar{d}}$	$pr^{\bar{d}}$
BH	1.070	0.001	0.098	0.001
BTU	0.158	0.840	0.014	0.843
CG	0.157	0.292	0.015	0.276
MAR	0.032	0.272	0.002	0.271
RON	0.055	0.151	0.005	0.151

*Em negrito valores que indicam Desequilíbrio de ligação.

Tais fatores são evidenciados no histograma gerado pelas análises de randomização (**Figura 22-E**), a distribuição dos dados observados está plotada fora da distribuição esperada, isto ocorre nos dois índices avaliados (lado esquerdo - histograma de I_A ; lado direito - histograma de r_d). Neste caso, rejeitamos a hipótese nula de não ligação e aceitamos a hipótese alternativa de ligação entre *loci*. Para as demais populações (**Figura 22, histogramas de A-D**) pode-se verificar que a distribuição dos dados observados está sobreposta com a distribuição esperada, neste caso aceitamos a hipótese nula de não ligação entre *loci*.



***Continuação próxima página.**

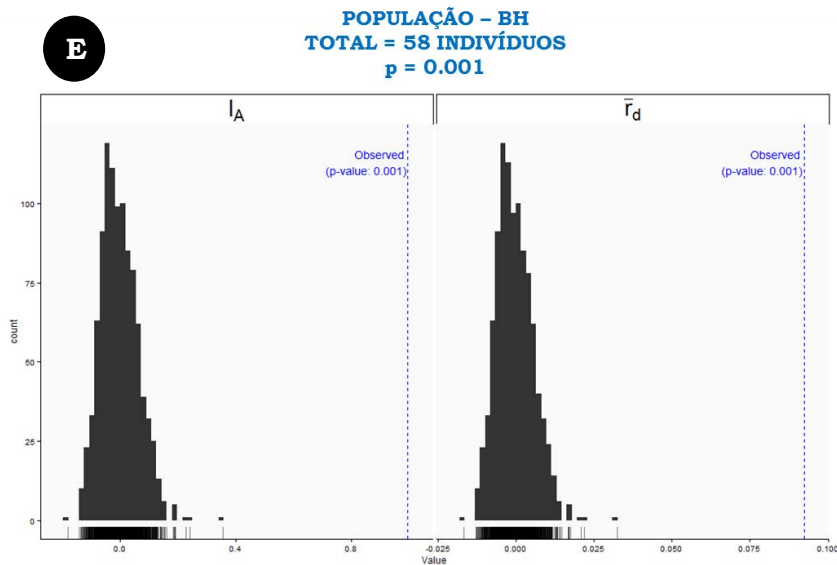


Figura 22. Histogramas de desequilíbrio de ligação. Linha azul pontilhada: distribuição observada dos dados; Barra cinza: distribuição esperada para os dados. Foram calculados dois índices para testar desequilíbrio de ligação, (I_A) - histogramas à esquerda da figura; (\bar{r}_d) - histogramas à direita da figura - utilizando 1.000 testes permutacionais. Imagens geradas pelo *Software R*, pacote *poppr*.

Em análises de Diversidade Genotípica ou Diversidade alélica, os *loci* que apresentaram algum nível de DL ou estão em DWE não se repetiram em todas as populações em estudo, assim como, não foram consistentemente os mesmos. DL e HWD foram identificados em maiores escalas somente para as populações de Campo Grande e Belo Horizonte, as demais populações analisadas apresentaram ou DL ou HWD. Testes randomizados para associação entre *loci* identificaram DL significativo somente para a população de BH. Valores de *Fis* indicaram não endogamia entre mosquitos das cinco populações avaliadas.

Os resultados apontam que as instabilidades observadas para as populações de BH e CG sejam *locus*-específicas e podem ter ocorrido devido a algum efeito populacional para mosquitos destas localidades, por isso não eliminamos nenhum *locus* das análises.

Posteriormente, realizamos análises de estruturação populacional objetivando identificar algum efeito populacional que poderia estar influenciando essas instabilidades.

C. Estruturação Populacional

• **Macro Estruturação Populacional**

Estimativas de F_{ST} foram calculadas para cada par de populações e total de *loci* a fim de avaliar a Distância Genética dos mosquitos provenientes das cinco populações em estudo (**Tabela 10**). O maior valor de F_{ST} obtido foi de 0.053, sugerindo maior distância genética entre as populações de mosquitos provenientes de Belo Horizonte e Rondonópolis. O menor valor de F_{ST} gerado foi entre as cidades de Campo Grande e Rondonópolis (0.017), indicando menor distância genética entre os indivíduos destas regiões.

Avaliamos ainda, os valores de F_{ST} entre as cidades de Maringá e Botucatu (0.019), este valor baixo sugere semelhança genética entre os mosquitos destas regiões. Já entre as cidades de Maringá e Rondonópolis o valor foi maior (0.036) sugerindo, desta vez maior diferença entre os mosquitos destas localidades.

Tabela 10. Índices de fixação F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984) obtidos entre pares de populações e para o total de *loci* microssatélite analisados. Valores calculados com o Programa Arlequin. Valores de $p \leq 0.001$.

	Belo Horizonte				
	Botucatu	Campo Grande	Maringá	Rondonópolis	
Belo Horizonte	-	-	-	-	-
Botucatu	0.032	-	-	-	-
Campo Grande	0.046	0.018	-	-	-
Maringá	0.024	0.019	0.026	-	-
Rondonópolis	0.053*	0.026	0.017**	0.036	-

Em negrito, os maiores e menores valores de F_{ST} encontrados. *maior valor; **menor valor.

Os resultados obtidos de F_{ST} apontam similaridade Genética entre indivíduos quando distâncias geográficas são menores. Nossos dados indicaram as populações de Rondonópolis e Belo Horizonte como mais distantes geneticamente, o que está de acordo quando consideramos a distância espacial existente entre estas regiões.

Análise por AMOVA calculada pelo Programa Arlequin indicou que as populações possuem maior diferenciação internamente (97.01; p-valor 0.0000) do que entre as populações (2.99; p-valor 0.0000).

Para testar se as populações são significativamente diferentes, realizamos um teste de aleatorização, que calcula os componentes de variância através de uma abordagem permutacional, este teste é baseado em AMOVA. Adotamos aqui três diferentes testes de significância para:

- variações internas;
- variações entre amostras;
- variações entre as populações.

O resultado pode ser observado na **Tabela 11** e **Figura 24**.

Tabela 11. Significância de variações. Significância das variações entre três diferentes hierarquias. Análises baseadas em Análise de Variância Molecular (AMOVA). Testes gerados no *Software R* com o pacote *ade4*.

TESTE	OBSERVADO	P
Varição interna	5.25	0.001
Varição entre amostras	0.60	0.001
Varição entre populações	-0,05	0.425

Três histogramas foram gerados, e representam a distribuição hierárquica ao acaso. Na **Figura 23-A**, fica evidenciado que as diferenças internas, considerando cada amostra, são baixas e significativas ($p = 0.001$), já que os dados observados estão plotados fora da distribuição esperada, com valores menores (5.25). Na **Figura 23-B** observa-se significância nas variações entre todos os mosquitos avaliados ($p = 0.001$), os dados observados encontram-se fora da distribuição esperada, com valores superiores (0.6). Na **Figura 23-C**, observamos não significância nas variações entre as cinco populações em estudo, já que os dados observados estão plotados em sobreposição à distribuição esperada, e com valores de p não significativos ($p = 0.425$) sugerindo falta de estruturação genética entre estas.

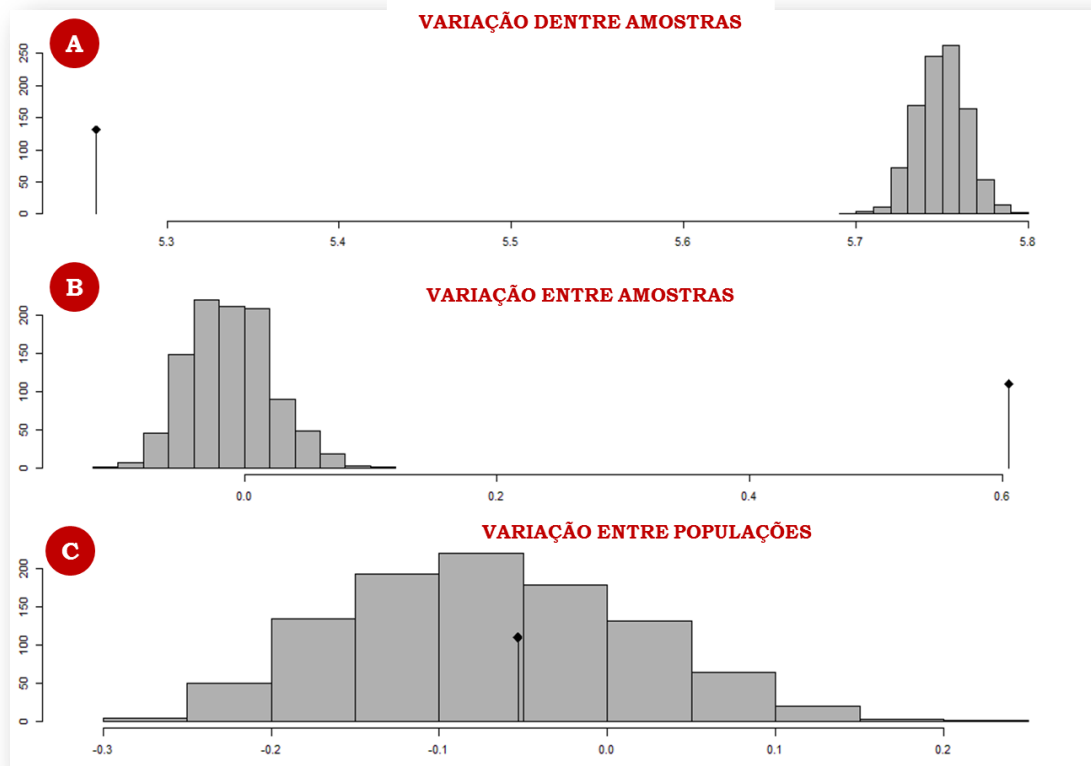


Figura 23. Significância de Variações. Significância das variações entre três diferentes hierarquias. Análises baseadas em AMOVA. Barras em cinza: distribuição esperada para os dados; linha vertical preta: dados observados; Figuras A, B e C referem-se aos testes realizados para análise de variância. Gráfico gerado no *Software R* com o pacote *ade4*.

Na análise de agrupamento populacional efetuada pelo STRUCTURE, o maior incremento de probabilidades posteriores [$\ln P(D)$] foi obtido para $K=2$, separando portanto, as populações em dois *clusters* genéticos (**Figura 24**). Com indivíduos de Belo Horizonte, Botucatu e Maringá agrupados em um *cluster* com padrões de cores mais parecidos e um segundo *cluster* com indivíduos de Campo Grande e Rondonópolis com padrões de cores mais parecidos entre si, sugerindo maior troca genética entre as regiões compreendidas dentro de cada um destes *clusters* genéticos.

Apesar de ter sido incluída no mesmo *cluster* de Botucatu e Maringá, a população de mosquitos de Belo Horizonte parece, em uma análise visual, estar em um terceiro *cluster* genético, com padrão diferente para a inclusão de seus indivíduos.

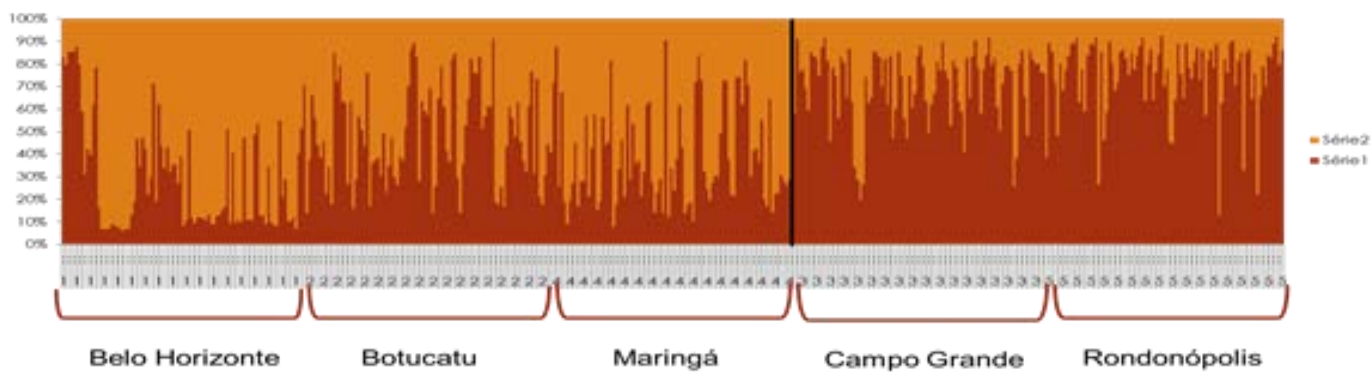


Figura 24. Representação Gráfica gerada pelo programa Structure. Assumido $K=2$. *Eixo x*: os números correspondem às seguintes localidades: 1 – Belo Horizonte; 2 – Botucatu; 3 – Campo Grande; 4 – Maringá e 5 – Rondonópolis; *Eixo y*: Probabilidade de cada indivíduo pertencer ao *cluster* que foi atribuído.

Para este modelo as probabilidades individuais de agrupamento foram de um modo geral, baixas, pois não permitiram a separação clara entre as cinco diferentes populações em estudo. Conseguimos apenas visualizar estruturação entre as populações do primeiro (BH, BTU e MAR) e segundo *clusters* (CG e RON). Esse método também não foi sensível o bastante para esclarecer a discreta estruturação apresentada para a população de BH.

Análises discriminativas utilizando o DAPC foram realizadas para avaliar as variações independentes que cada grupo ou população possui. Valores retidos de PCA foram obtidos para 50 eixos, representando 100% da variação total retida (**Figura 25-A**). Outro critério que o DAPC usa para entender as diferenças entre os indivíduos, é a função *Eigenvalues* (autovalores). Essa função, a partir das informações retidas pelo PCA e posteriormente discriminadas por DAPC, indica o número de componentes principais que melhor explicam as diferenças entre indivíduos. Para nossos dados, quatro componentes foram identificados como mais explicativos para as variações existentes entre os indivíduos das cinco populações em estudo (**Figura 25-A**).

A dispersão dos indivíduos sobre os dois componentes principais de DAPC identificou cinco diferentes agrupamentos (**Figura 25-B**). Os pontos representam os indivíduos e as cores os grupos definidos. A junção dos dados, ou centróides (junção central das arestas) incluem indivíduos de mesma cor em cada grupo e atribui, desta maneira, indivíduos para cinco grupos diferentes. Entretanto, quando avaliamos a estruturação populacional para cada grupo, esta não pode ser bem definida. Estruturação populacional ocorre para mosquitos de Belo Horizonte, estes estão representados pela cor azul e separados dos demais indivíduos e suas populações. Os Mosquitos provenientes das

demais populações foram *clusterizados* em um conjunto diferente da população de BH, apesar desta proximidade genética indicada, pode-se verificar discreta estruturação populacional:

- de mosquitos provenientes de MAR (indivíduos com a coloração laranja), que parecem distantes geneticamente de mosquitos de BH e CG e próximos geneticamente do agrupamento referente à população de Botucatu (indivíduos com a coloração roxa).

- entre as populações de mosquitos provenientes de CG e RON (indivíduos representados pelas cores verde e preto, respectivamente). Os agrupamentos constituídos por mosquitos destas duas localidades encontram-se unidos em um *cluster* genético, indicando similaridade genética consistente entre estes.

Na **Figura 25-C** temos a discriminação das populações a partir de funções geradas também pelo DAPC. Uma única e principal função discriminante, que novamente diferencia a população de BH das demais, é identificada. O pico referente à população de BH (pico azul) está plotado separadamente dos demais picos ou populações. Observa-se ainda, um agrupamento mais restrito entre as populações de BTU e MAR (picos laranja e roxo), e a clara associação das populações de CG e RON (picos verde e preto), indicando identidade genética entre indivíduos destas populações.

A fim de compreender o quanto cada indivíduo realmente participa do grupo a que foi atribuído, o quanto de informações genéticas compartilha com indivíduos de outros grupos, e ainda, o quanto isto estaria influenciando para a estruturação populacional ou constituição de *clusters* genéticos, calculamos as probabilidades de prévias e posteriores associações, ou filiações (*membership*), entre os indivíduos de todas as populações. As inclusões são feitas a partir das funções discriminantes do DAPC atribuídas diversas vezes aleatoriamente.

O resultado pode ser melhor entendido na **Figura 54 (em anexos)** que possui os mapas de inclusões de *membership* para cada população. Nessa Figura, as cruzes azuis representam o *cluster* verdadeiro dos indivíduos e as cores em *heat color*, a probabilidade das novas inclusões calculada pelo DAPC. Os resultados obtidos confirmam as corretas alocações de indivíduos em seu *cluster* original (cruzes azuis estão plotadas corretamente na linha da população original), entretanto as novas atribuições identificam possíveis participações de indivíduos em outros *clusters* que não o seu de origem (cores em *heat color*). Apenas para a população de Belo Horizonte, os indivíduos parecem não compartilhar informações genéticas com outras populações e sim estarem realmente atribuídos em um *cluster* muito bem definido.

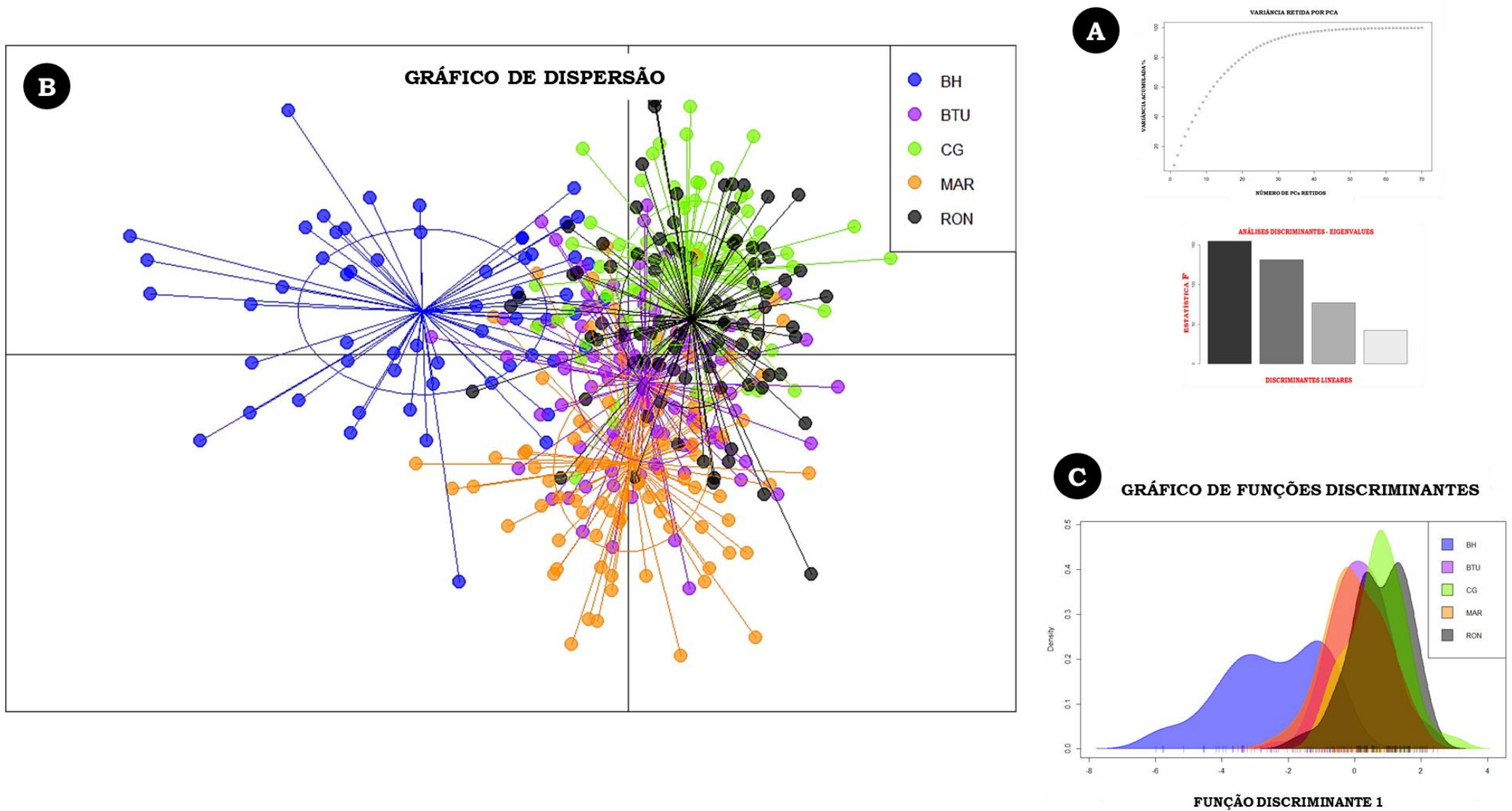


Figura 25. DAPC para as cinco populações em estudo. **A.** Valores retidos de PCAs e Valores de *Eigenvalues* para discriminação das cinco populações em estudo; **B.** Gráfico de dispersão dos indivíduos das cinco populações em estudo, considerando o primeiro (eixo x) e o segundo (eixo y), componentes principais - pontos representam os indivíduos e as elipses a delimitação para cada agrupamento; **C.** Gráfico de funções discriminantes – considerando o primeiro componente discriminatório. Cada pico representa os indivíduos de uma população, legenda das cores e populações ao lado da figura.

A população de Maringá parece compartilhar informações genéticas com indivíduos da população de Botucatu, e o contrário também é verdadeiro, mosquitos de Botucatu parecem possuir informações genéticas semelhantes com mosquitos de Maringá e também com a maioria dos indivíduos das demais populações. Similaridade genética é fortemente sugerida entre mosquitos das localidades de Campo Grande e Rondonópolis, já que apresentam possíveis participações de seus indivíduos em ambos os *clusters* genéticos.

Finalmente, os resultados alcançados com as análises de DAPC sugerem que os mosquitos provenientes de diferentes localidades podem ser separados geneticamente, entretanto a similaridade genética existente entre estes não permite uma separação bem definida das populações. Consistente estruturação pode ser observada apenas para a população de mosquitos de BH, que parecem não compartilhar informações genéticas com mosquitos das demais populações. Entre as populações de mosquitos de BTU/MAR e CG/ RON maior similaridade genética pôde ser observada. Assim, podemos concluir que as *clusterizações* mais restritas ocorreram entre mosquitos de localidades que possuem distâncias geográficas menores.

Provavelmente as semelhanças entre os indivíduos dentro de cada população (para o agrupamento de indivíduos) e limitadas diferenças entre os indivíduos das cinco populações (mistura de indivíduos em outros *clusters*), é devido à similaridade genética entre estes mosquitos, resultado já detectado nas análises por AMOVA.

Análises de micro-estruturação populacional foram realizadas a seguir para definir com maior clareza as estruturações encontradas até o momento para as populações em estudo, assim como, desenvolvidas na tentativa de explicar com maior propriedade os desvios de diversidade genética encontrados para as populações de Belo Horizonte e Campo Grande.

• **Micro Estruturação Populacional**

Para compreender como ocorre a organização populacional dentro de uma determinada região, selecionamos três municípios, já analisados anteriormente, para realizar análises de micro-estruturação populacional. As cidades foram previamente separadas em regionais, considerando as características pré-definidas pelos órgãos responsáveis no

controle dos mosquitos *Ae. aegypti* em cada localidade (como já mostrado no item 5.2. *Características das áreas Amostradas*). Assim para as próximas análises realizadas, respeitamos a ordem hierárquica adotada nas coletas e efetuamos análises para cada localidade.

As populações de *Ae. aegypti* de Belo Horizonte, Botucatu e Campo Grande foram selecionadas para aplicação destas análises, pois conhecíamos previamente os locais de origem de cada indivíduo. Objetivou-se também, com esta abordagem, compreender a estruturação populacional encontrada para os mosquitos de Belo Horizonte nas macro-análises estruturais realizadas anteriormente e também os desvios de diversidade genética identificados para esta população; da mesma forma os desequilíbrios de ligação e desvios de HWE apontados para a população de Campo Grande.

Para tanto, identificamos os indivíduos segundo sua hierarquia original como mostrado na **Tabela 12**, os mapas ilustrando as regiões amostradas podem ser revistos no item (5.2. *Características das áreas Amostradas*).

Tabela 12. Definição das regiões. Determinação das sub-regiões para as três localidades. Dados delineados a partir das informações obtidas nos órgãos responsáveis pela distribuição e coleta das ovitrampas em cada Município.

LOCALIDADE	SUB-REGIÕES DEFINIDAS
Botucatu	1, 2, 3 e 4
Belo Horizonte	1, 2, 4, 5, 7, 8, e 9
Campo Grande	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7

Botucatu – SP

Para avaliar a estruturação populacional nas sub-regiões de Botucatu, primeiramente testamos o valor de BIC (*Bayesian Information Criterion*) a fim de definir o valor ideal de

agrupamento dos dados. Esse valor foi conseguido usando valores médios de K (*K-means*) para identificar o número otimizado de *clusters*. *K-means* é executado sequencialmente, com valores crescentes de k, e diferentes agrupamentos são comparados usando critérios de *Bayesiana*, idealmente, o melhor valor de agrupamento deve corresponder ao menor BIC. Na prática, o "melhor" BIC é muitas vezes indicado por um cotovelo da curva de valores BIC *versus* o número de *clusters*, como uma função de K (Jombart, 2010).

O resultado obtido para a população de Botucatu pode ser visualizado na **Figura 26**. O número ideal para agrupamento dos indivíduos das sub-regiões de Botucatu foi idealmente de 4 *clusters*, como pode ser visualizado na curva de BIC, que forma um cotovelo próximo ao eixo x no valor 4, esta *clusterização* corrobora com o número de sub-regiões adotadas durante as coletas em Botucatu.

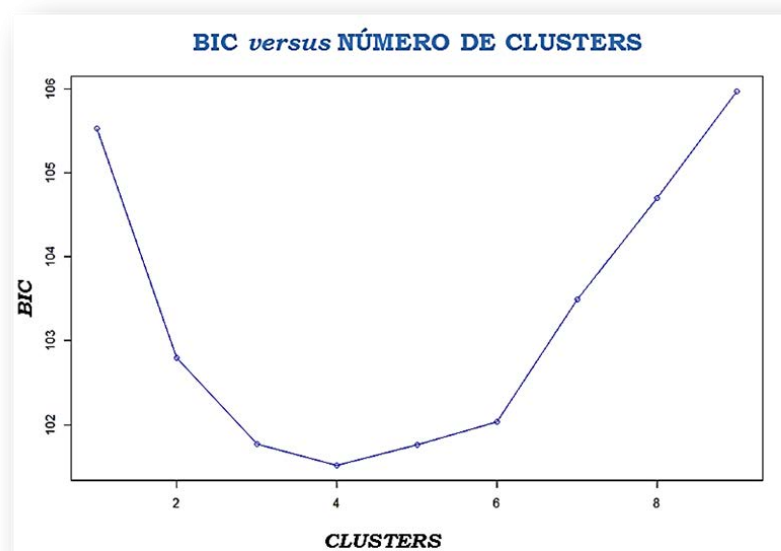


Figura 26. Valores de BIC para a população de Botucatu. Valor ideal de BIC para *clusterização* dos dados referentes às sub-regiões de Botucatu indicado pelo cotovelo no eixo do gráfico. Gráfico gerado pelo *software R*, pacote *poppr*.

Após a *clusterização* dos dados, análises de Distância Genética foram aplicadas utilizando a estatística de Bruvo's, objetivando desta vez, compreender como os indivíduos de Botucatu são relacionados geneticamente entre os *clusters* identificados por BIC. O

método de cálculo de distância de Bruvo's leva em conta os processos de mutação e proporciona uma ferramenta valiosa para as análises intraespecíficas. Os valores para comparação entre alelos encontram-se entre 0 e 1, permitindo assim o cálculo simples de distância genética entre dois alelos. Este processo leva em conta os valores de médias-K e agrupa os dados que devem ser tão distintos quanto o possível (Bruvo et al., 2004).

O Dendrograma gerado com as Distâncias Genéticas entre os indivíduos das sub-regiões de Botucatu pode ser visualizado na **Figura 55-A (em anexos)**. Nesse dendrograma os indivíduos de cada sub-região foram identificados em quatro diferentes cores, considerando os *clusters* apontados por BIC. Observa-se proximidade genética entre todos os indivíduos das 4 diferentes sub-regiões, os indivíduos parecem não manter um padrão de cores para separação em sub-grupos mais semelhantes. Isso ocorre, provavelmente, devido às constantes trocas genéticas entre indivíduos das quatro sub-regiões, ocasionando a similaridade entre os mosquitos aqui analisados.

Valores de *Eigenvalues* para discriminação de mosquitos provenientes das quatro sub-regiões de Botucatu, foram melhor definidos para 3 componentes discriminativos. Após visualização da distribuição dos indivíduos sob os dois componentes no gráfico de dispersão de DAPC (**Figura 27-A**), percebe-se que os indivíduos foram atribuídos corretamente em sua sub-região de origem, já que foram constituídos 4 diferentes padrões de cores no agrupamento dos indivíduos, resultado já observado por BIC. Entretanto, estruturação populacional não pode ser definida, já que indivíduos das 4 diferentes sub-regiões foram *clusterizados* muito próximos indicando, por conseguinte, proximidade genética entre estes. Apesar deste resultado, pode-se considerar que:

- **Os indivíduos da sub-região 1** constituem um *cluster* melhor definido (representados pela cor rosa), já que parecem compartilhar informações genéticas de forma limitada com mosquitos das demais sub-regiões.

- Da mesma forma ocorre para **mosquitos provenientes da sub-região 3** (representados pela cor verde), que parecem compartilhar informações genéticas com indivíduos de todas as outras sub-regiões, entretanto com maior consistência com mosquitos da sub-região 2.

- **Indivíduos das regionais 2 e 4** foram agrupados em sobreposição, e por isso sugere-se que estes partilhem informações genéticas com mais frequência.

Na **Figura 27-B** temos o mapa da região de Botucatu com a identificação das áreas amostradas e a separação imaginária destas. Identifica-se correspondência das regiões amostradas com as clusterizações anteriormente sugeridas.

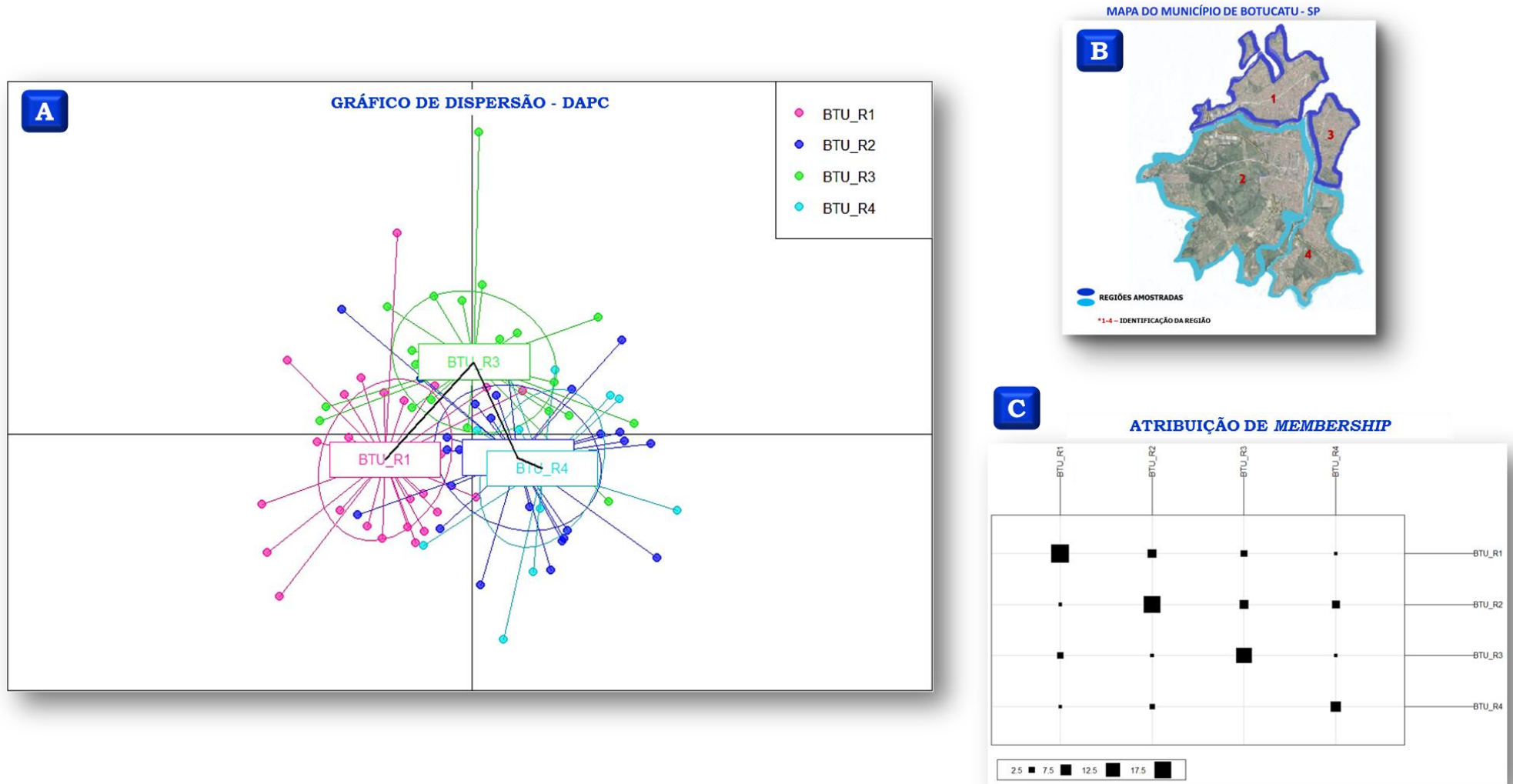


Figura 27. DAPC para as sub-regiões de Botucatu. A. Gráfico de dispersão dos agrupamentos considerando os dois principais componentes discriminativos (eixos x e y) - pontos representam os indivíduos e as elipses a delimitação para cada agrupamento; B. Mapa do município de Botucatu com as sub-regiões de coleta 1, 2, 3 e 4; C. Tabela de contingência para atribuição de indivíduos, colunas: se referem ao *cluster* original; linhas se referem as novas inferências. Gráficos gerados pelo Programa R, pacote *poppr* e mapa de Botucatu adaptado do *Google maps*.

A estruturação observada no Gráfico de dispersão entre os indivíduos da sub-região 1 parece estar correta, já que estes indivíduos colonizam uma região mais lateral do município de Botucatu, e por isso podem não estar em intenso fluxo gênico com mosquitos da sub-região 4, por exemplo. Da mesma forma, ocorre para mosquitos das sub-regiões 2 e 4, estas são muito próximas geograficamente e por isso permitem fluxo gênico mais frequente entre mosquitos destas duas regionais.

Realizamos ainda, análises para avaliar qual a probabilidade de cada indivíduo ter sido atribuído em seu *cluster* de origem. O resultado desta probabilidade é visualizado em uma tabela de contingência (*AGRUPAMENTO REAL vs AGRUPAMENTO INFERIDO*) gerada a partir dos componentes principais do DAPC. As linhas da tabela correspondem aos grupos reais, enquanto que as colunas correspondem aos grupos inferidos, os resultados obtidos podem ser vistos na **Figura 27-C**. A maioria dos indivíduos foi atribuída corretamente em seu grupo original, já que os quadrados, que se referem aos indivíduos, são consistentemente maiores nas colunas de origem e nas linhas das posteriores inferências. Entretanto, notam-se inferências de indivíduos em outros *clusters* que não o seu de origem, indicando novamente a proximidade genética entre indivíduos das quatro diferentes sub-regiões de BTU. Esta análise de atribuição gera um número referente à porcentagem de corretas incidências posteriores, que neste caso foi de 69%.

De modo geral, mosquitos provenientes das 4 sub-regiões de Botucatu foram agrupados adjacientemente, indicando similaridade genética entre estes, resultado já observado nas análises de distância genética. Assim, conclui-se que a população de *Ae. aegypti* desta localidade pode ser considerada homogênea, já estruturação genética não pôde ser observada entre mosquitos provenientes das diferentes sub-regiões de Botucatu.

Belo Horizonte - BH

Os mesmos parâmetros utilizados para micro-análises na cidade de Botucatu foram adotados para as análises entre mosquitos das sub-regiões de Belo Horizonte.

O valor ideal de BIC para esta população indicou agrupamento dos dados em seis *clusters* genéticos. O resultado pode ser visualizado na **Figura 28**. A curva de BIC está

próxima do eixo x no valor 6, esta *clusterização* corrobora com o número de sub-regiões amostradas durante as coletas na cidade de Belo Horizonte para nosso trabalho. Entretanto, pode-se perceber que a curva não forma um cotovelo, e os dados parecem estacionar quando encontram o eixo x. Isto indica que os dados podem não ser informativos o suficiente para separação dos indivíduos em mais de seis *clusters*. Nesta situação seleciona-se o maior número sugerido pelo valor de BIC, ou seja, seis *clusters*.

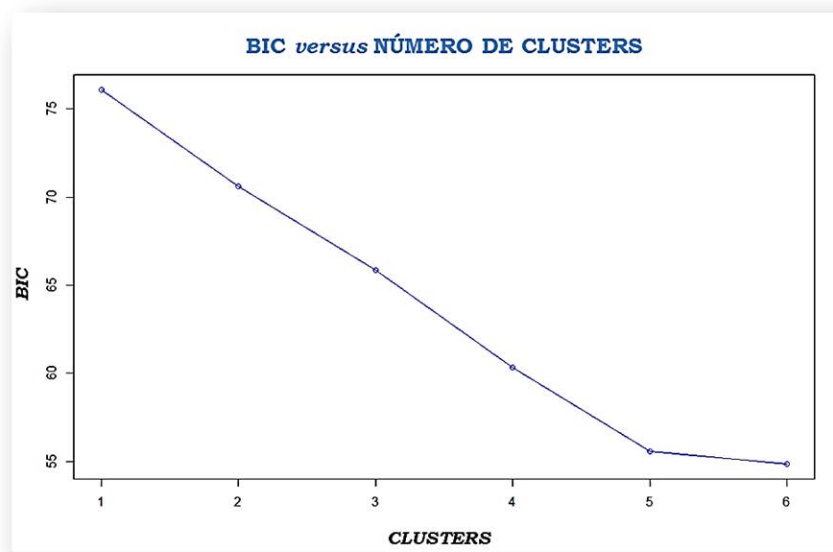


Figura 28. Valores de BIC para a população de Belo Horizonte. Valor ideal de BIC para *clusterização* dos dados referentes às sub-regiões de Belo Horizonte, indicado pelo cotovelo no eixo x do gráfico. Gráfico gerado pelo *software R*, pacote *poppr*.

Após a *clusterização* dos dados, análises de Distância Genética foram aplicadas utilizando a estatística de Bruvo's, objetivando compreender como os indivíduos de Belo Horizonte são relacionados geneticamente entre os *clusters* identificados pelo BIC. O Dendrograma gerado entre os indivíduos das sub-regiões de BH pode ser visualizado na **Figura 55-B (em anexos)**. Dissimilaridade genética consistente é apontada entre indivíduos provenientes das 6 diferentes sub-regiões de Belo Horizonte. Foram geradas seis cores para os seis *clusters* identificados por BIC, e os mosquitos das referidas regiões mantiveram o

padrão de agrupamento em correlação com os *clusters* anteriormente sugeridos, com discreta mistura. Este resultado sugere estruturação populacional entre os mosquitos de cada sub-região de BH, já que as distâncias genéticas são menores entre indivíduos pertencentes a cada um dos 6 *clusters* determinados.

Os componentes identificados por *Eigenvalues* foram, desta vez, definidos em número de 6, sendo três componentes com maior participação para discriminação dos dados e o restante contribuindo pouco para esta caracterização. Na dispersão dos indivíduos, gerada sob os dois componentes principais de DAPC (**Figura 29-A**), identifica-se novamente estruturação genética entre mosquitos que colonizam as diferentes sub-regiões de BH, já que os *clusters* gerados agrupam e definem indivíduos de mesma sub-região. Mais detalhadamente pode-se indicar que:

- **Mosquitos das sub-regiões 4 e 9** (representados pela cor roxa e rosa, respectivamente) parecem muito diferentes geneticamente dos demais mosquitos de BH e também entre si. Indivíduos pertencentes a estas duas sub-regiões estão separados dos demais mosquitos e suas sub-regiões. Da mesma forma, encontram-se também distantes entre si;

- **Mosquitos das sub-regiões 1, 2, 5, 7 e 8**, foram agrupados com mais proximidade, entretanto, pode-se ainda considerar forte estruturação genética entre mosquitos de cada sub-região. Discretas participações de mosquitos das sub-regiões 2, 5 e 8, em outros *clusters* que não o seu de origem podem ser identificadas.

Na **Figura 29-B** temos o mapa com as sub-regiões amostradas de Belo Horizonte. Avaliando a dispersão dos indivíduos pelo DAPC, identificamos correspondência das regiões amostradas com os *clusters* organizados. As sub-regiões 1, 2, 5, 7 e 8 são realmente mais próximas espacialmente e por isso podem permitir certa troca de informações genéticas entre seus indivíduos. Mais especificamente, os grupos de indivíduos das regionais 1 e 7 parecem geneticamente e geograficamente mais próximos. Resultado similar ocorreu para os indivíduos das sub-regiões 5 e 8. Mosquitos das sub-regiões 4 e 9 estão totalmente estruturados entre si e parecem mais diferentes geneticamente, tanto das demais sub-regiões quanto entre si, isto se deve provavelmente à distância geográfica existente entre estes, impedindo fluxo gênico entre mosquitos destas sub-regiões e também com mosquitos das demais sub-regiões de BH.

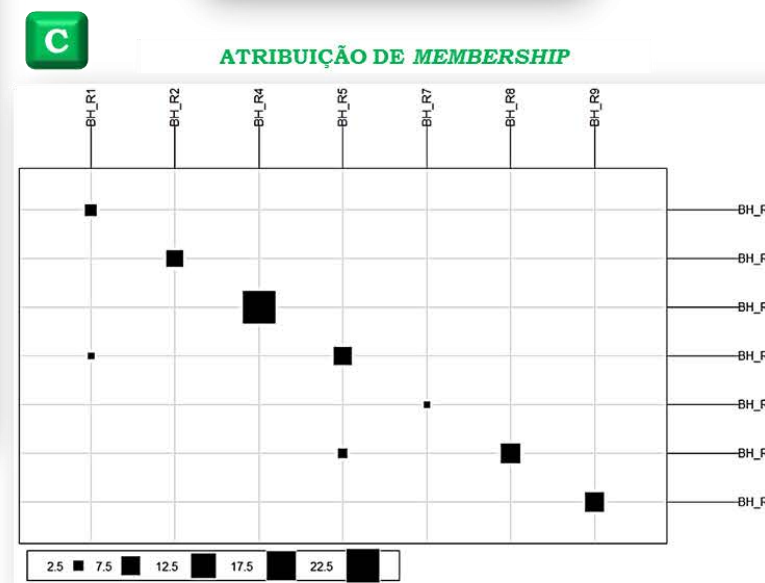
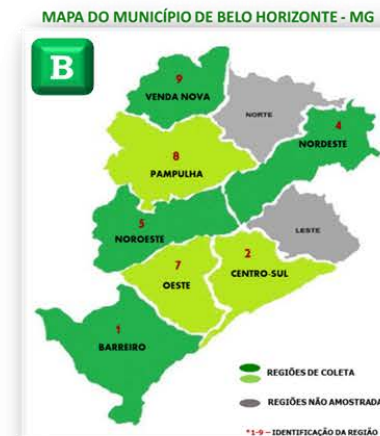
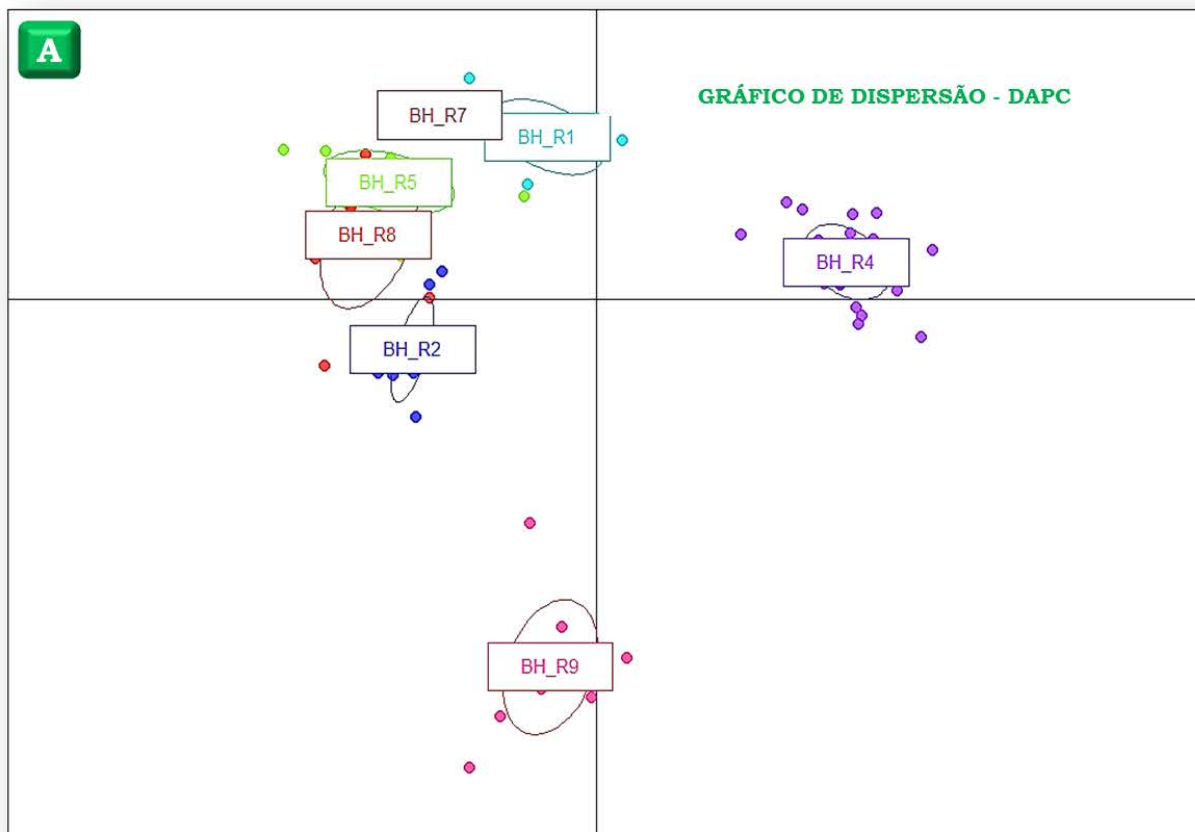


Figura 29. DAPC para as sub-regiões de Belo Horizonte. **A.** Gráfico de dispersão dos agrupamentos considerando o primeiro (eixo x) e segundo (eixo y) componentes - pontos representam os indivíduos e as elipses a delimitação para cada agrupamento; **B.** Mapa do município de Belo Horizonte com as sub-regiões de coleta 1, 2, 4, 5, 7, 8 e 9; **C.** Tabela de contingência para atribuição de indivíduos, colunas: se referem ao *cluster* original; linhas se referem as novas inferências. Gráficos gerados pelo programa *R*, pacote *poppr* e mapa da cidade de Belo Horizonte adaptado do *Google maps*.

Na **Figura 29-C** podemos observar a atribuição dos indivíduos nos *clusters* gerados. As linhas da tabela correspondem aos grupos reais, enquanto que as colunas correspondem aos grupos inferidos. Observa-se que a maioria dos indivíduos foi atribuída corretamente em seu grupo original sem participações nos demais *clusters* (os quadrados que se referem aos indivíduos são consistentemente maiores nas colunas e linhas de atribuições anteriores e posteriores). Escassas inferências de indivíduos pertencentes a um determinado *cluster*, em outro que não o seu de origem são identificadas. Esta análise de atribuições gera um número referente à porcentagem de corretas inferências de indivíduos, que neste caso foi de 95%.

Realizamos ainda, análises de filiações (*membership*) para mosquitos e as sub-regiões de BH (**Figura 30**) para avaliar o quanto cada indivíduo realmente participa do *cluster* a que foi atribuído ou o quanto de informações genéticas compartilha com outros *clusters*.

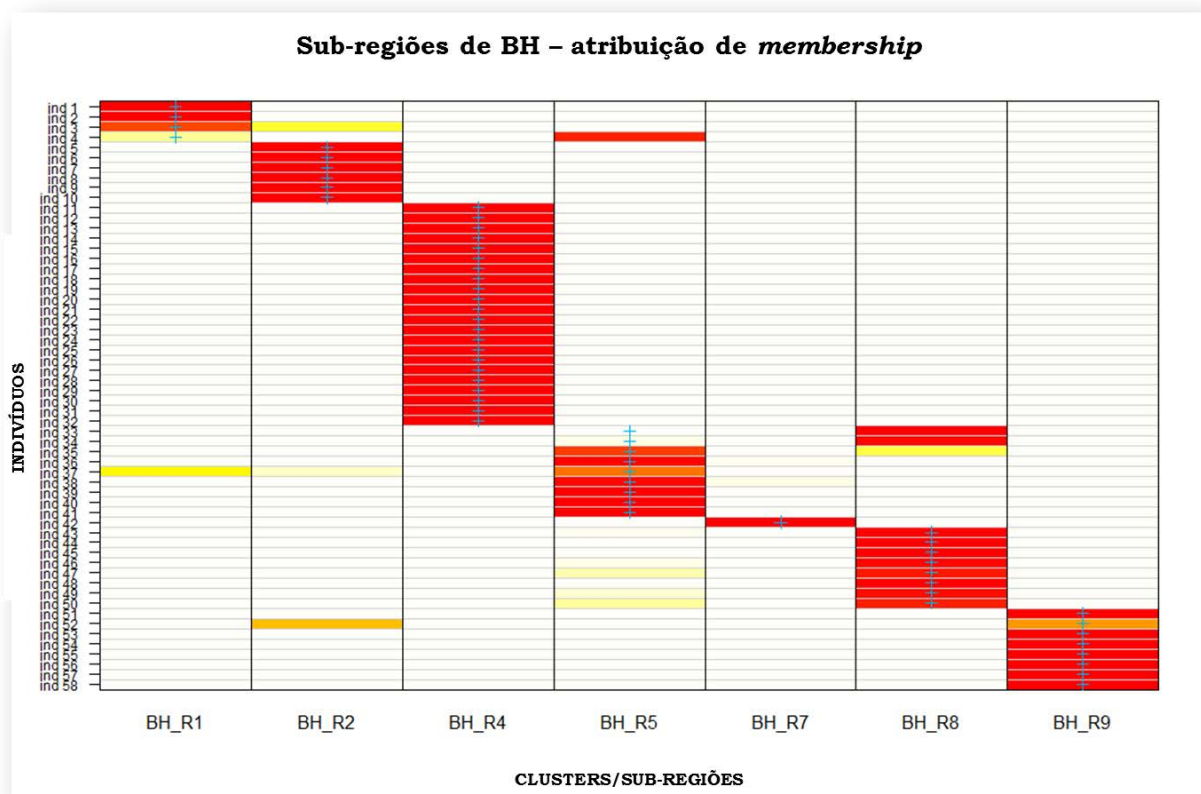


Figura 30. Atribuição de *Membership* para a população de Belo Horizonte. Cores em *Heat color* representam probabilidades de filiação de cada indivíduo (vermelho = 1, branco = 0); cruzes azuis representam o *cluster* de origem. Eixo y: mosquitos provenientes do município de Belo Horizonte; Eixo x: Sub-regiões amostradas de Belo Horizonte.

Os mosquitos de cada sub-região de BH foram corretamente atribuídos em seu *cluster* de origem (cruzes azuis estão plotadas sobrepostas no *cluster* original), as cores em vermelho para as novas atribuições também confirmam este resultado. Apenas entre mosquitos das sub-regiões 8 e 5, podemos observar erro na atribuição de filiação, entretanto, como já observado na Figura 30, indivíduos destes dois *clusters* ou sub-regiões parecem compartilhar informações genéticas.

Podemos concluir que, para a cidade de Belo Horizonte consistente estruturação genética ocorre entre os indivíduos de cada sub-região amostrada. Este dado pode explicar os DL e os HWD encontrados para os indivíduos desta localidade. Acreditamos que cada grupo de mosquitos contribui geneticamente somente entre si, isto conseqüentemente leva a maior identidade entre estes indivíduos, levando aos desvios acima citados. Pode-se, ainda considerar que cada sub-região constitui uma sub-população de *Ae. aegypti* dentro do município de Belo Horizonte.

Campo Grande - MS

Os mesmos parâmetros utilizados nas micro-análises das cidades de Botucatu e Belo Horizonte foram adotados para as análises das sub-regiões de Campo Grande. O valor ideal de BIC, foi de agrupamento dos dados em 5 *clusters* genéticos. O resultado pode ser visualizado na **Figura 31**. A curva de BIC está próxima do eixo x no valor 5, esta *clusterização* não corrobora com o número real de sub-regiões adotadas para as coletas em Campo Grande. Entretanto, a formação do cotovelo para o valor de BIC, bem como a continuidade desta curva identificam a veracidade para a *clusterização* dos dados. Assim concluímos que a informação genética contida nos dados da população de Campo Grande não foi informativa o suficiente para a análise de *K-means* definir um número de agrupamentos em sub-regiões, o que indica possível compartilhamento de informações genéticas e conseqüente similaridade entre mosquitos desta localidade.

Após a *clusterização* dos dados, análises de Distância Genética foram aplicadas utilizando a estatística de Bruvo's, com a finalidade de compreender como os indivíduos de Campo Grande são relacionados geneticamente entre os *clusters* identificados pelo BIC. O

Dendrograma gerado com as Distâncias Genéticas entre os indivíduos das sub-regiões de CG pode ser visualizado na **Figura 55-C** (*em anexos*).

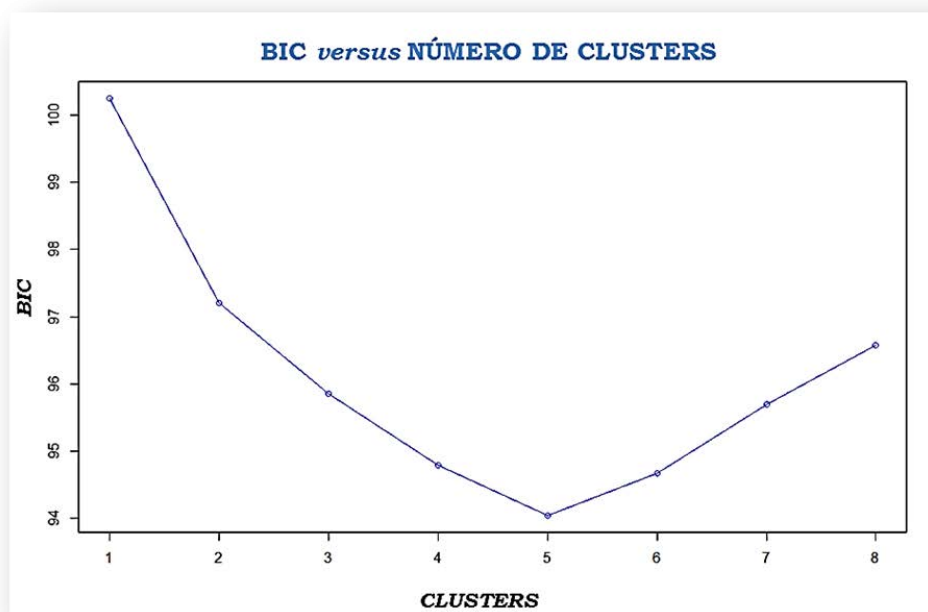


Figura 31. Valores de BIC para a população de Campo Grande. Valor ideal de BIC para *clusterização* dos dados referentes às sub-regiões de Campo Grande, indicado pelo cotovelo no eixo x do gráfico. Gráfico gerado pelo *software R*, pacote *poppr*.

Cinco padrões de cores foram gerados para os cinco *clusters* identificados por BIC, entretanto mistura e reduzido distanciamento genético pode ser observado entre os indivíduos destes grupos, tais resultados sugerem que o agrupamento não pode ser bem definido em sub-regionais para mosquitos desta localidade. Provavelmente, a similaridade entre os indivíduos das sub-regiões de Campo Grande é tão grande, a ponto de não ser possível a discriminação entre grupos consolidados, tanto por BIC, quanto em inferências de distância genética.

Tal resultado é confirmado quando observamos os gráficos gerados pelo DAPC para estruturação populacional (**Figura 32**). Agrupamento ocorre para indivíduos de cada uma das 7 sub-regiões de Campo Grande amostradas, entretanto, a definição dos agrupamentos individuais é incompreensível. Avaliando a dispersão dos indivíduos no gráfico sob os dois

componentes principais (**Figura 32-A**) pode-se confirmar a miscigenação genética entre os mosquitos de Campo Grande. Discretas estruturações populacionais podem ser definidas entre:

- **Mosquitos das sub-regiões laterais (1, 6 e 7)**, que parecem geneticamente diferentes entre si. Os clusters referentes a estas populações (cores em vermelho, rosa e laranja, respectivamente) encontram-se distantes um do outro, e por isso não parecem compartilhar informações genéticas entre si, entretanto o fazem com mosquitos das sub-regiões centrais;

- **Mosquitos das sub-regiões centrais (2, 3, 4 e 5)**, possuem similaridade genética entre si, estes foram agrupados em proximidade e parecem formar um *cluster* genético maior, onde são incluídos mosquitos de todas as sub-regiões de CG. Esses podem ser discriminados de mosquitos das sub-regiões laterais, entretanto não podem ser diferenciados entre si.

Na **Figura 32-B** temos o mapa com as sub-regiões amostradas de Campo Grande. Considerando a dispersão dos indivíduos gerada pelo DACP, podemos concluir que mosquitos pertencentes às sub-regiões centrais (2, 3, 4 e 5) foram agrupados com mais proximidade em um *cluster* único, devido, provavelmente à intensa troca de informações genéticas entre si. Estas sub-regiões são próximas geograficamente, e por isso podem estar contribuindo para a mistura das mesmas características genéticas. Já mosquitos provenientes das sub-regiões laterais (1, 6 e 7) parecem mais distantes geneticamente entre si, isto se deve provavelmente, à distância espacial entre estas sub-regiões. As participações de indivíduos destes *clusters* no *cluster* central podem ser explicadas, novamente, pela contribuição genética dos indivíduos que colonizam as regiões centrais de CG.

É possível ainda, constatar essa miscigenação quando analisamos a tabela de atribuições dos indivíduos entre as sub-regiões (**Figura 32-C**). Verifica-se que a maioria dos indivíduos foi novamente atribuída corretamente em seu grupo original (os quadrados, que se referem aos indivíduos, são maiores nas colunas e linhas de anteriores e posteriores atribuições). Entretanto, abundantes inferências de indivíduos em outros *clusters* que não o seu de origem podem ser observadas. Quando consideramos mosquitos das sub-regiões laterais (1, 6 e 7), estes foram atribuídos nas sub-regiões 2 e 3, que por sua vez parecem contribuir para a miscigenação entre mosquitos de todas as sub-regiões de CG. A porcentagem de atribuições corretas dos indivíduos nos *clusters* gerados foi de 76%.

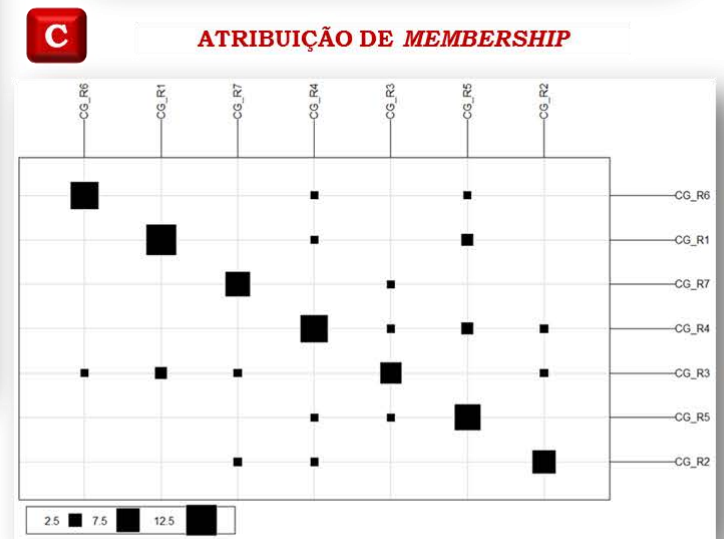
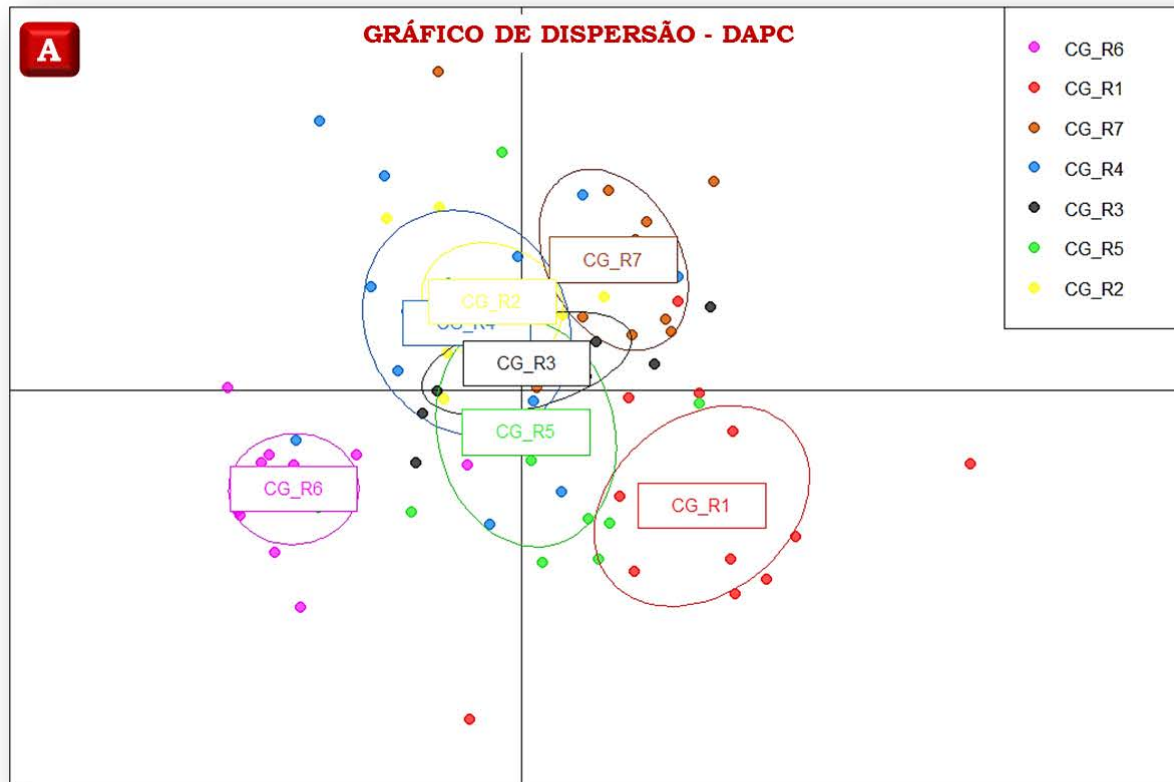


Figura 32. DAPC para as sub-regiões de Campo Grande. **A.** Gráfico de dispersão dos agrupamentos considerando os dois principais componentes discriminatórios (eixo x e eixo y)- pontos representam os indivíduos e as elipses a delimitação para cada agrupamento; **B.** Mapa do município de Belo Horizonte com as sub-regiões de coleta 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; **C.** Tabela de contingência para atribuição de indivíduos, colunas: se referem ao *cluster* original; linhas se referem as novas inferências. Gráficos gerados pelo *Software R*, pacote *poppr*. Mapa do Município de Campo Grande adaptado do *Google maps*.

A definição de *clusters* entre mosquitos de CG para cada sub-região lateral e entre mosquitos das sub-regiões centrais, podem ser melhor visualizados na **Figura 33**. Onde uma única função discrimina muito bem os mosquitos das sub-regiões laterais dos demais mosquitos das sub-regiões centrais (sub-região 1 (pico vermelho), sub-região 6 (pico rosa) e sub-região 7 (pico laranja)). Esta discriminação fica evidente quando consideramos as distâncias entre essas sub-regiões de CG. Pode-se ainda, observar a clara miscigenação de mosquitos das sub-regiões centrais (2, 5, 3 e 4 (picos: preto, amarelo, verde e azul respectivamente)), já que os picos que referenciam as populações das determinadas sub-regiões apresentam-se sobrepostos, indicando similaridade genética entre estes.

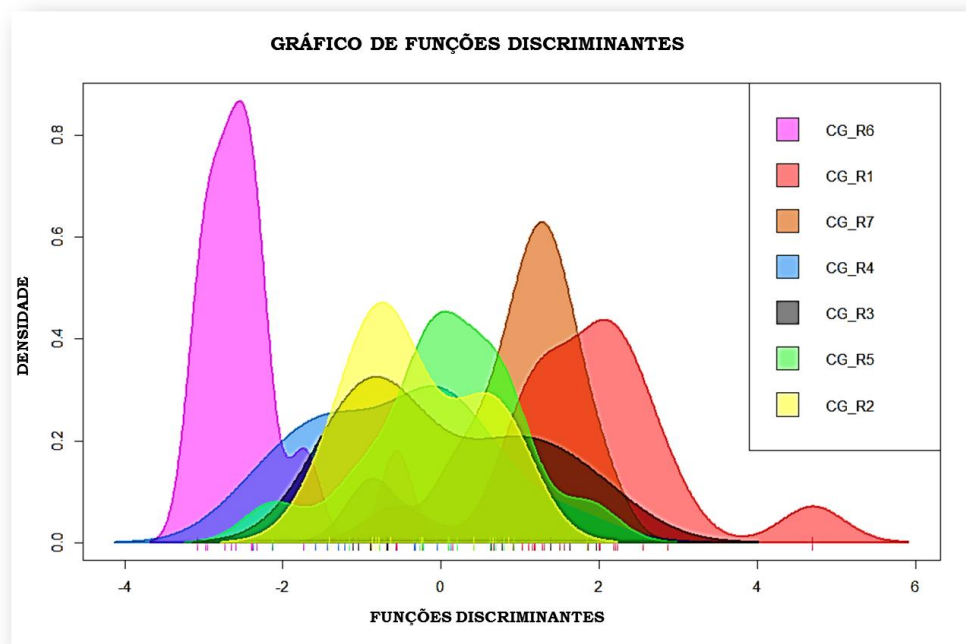


Figura 33. Gráfico de funções discriminantes para as sub-regionais de CG. Considerando somente o primeiro componente discriminatório. Picos referenciam as sete sub-regiões de Campo Grande, legenda das cores e populações encontram-se ao lado da figura. Gráfico gerado pelo *Software R*, pacote *poppr*.

Os resultados de micro-estruturação genética obtidos com análises de DAPC podem nos ajudar a esclarecer os DL e HWD apontados nas análises de diversidade genética para

mosquitos de Campo Grande. Talvez a similaridade entre os mosquitos de todo o município seja alta a ponto dos marcadores microssatélites utilizados conferirem estes desvios para indivíduos desta localidade. Mosquitos provenientes das regiões centrais parecem contribuir consideravelmente para a manutenção da diversidade genética entre os mosquitos de todo o município de Campo Grande.

Os resultados obtidos com as micro-análises das três populações em estudo foram importantes para compreender a organização populacional dentro de cada cidade amostrada. Ainda, contribuíram para esclarecer os desvios de diversidade genética encontrados para as populações de CG e foram indispensáveis na compreensão dos desvios e estruturação populacional, observados para a população de Belo Horizonte.

Podemos ainda considerar certa relação entre estruturação genética de mosquitos *Ae. aegypti* e o tamanho da cidade que estes colonizam, localidades maiores parecem permitir maior estruturação populacional do que cidades menores. Isto é sugerido quando avaliamos os resultados obtidos para mosquitos da cidade de Botucatu, que não possuem estruturação genética definida quando consideramos as sub-regiões amostradas, já para a cidade de Belo Horizonte, estruturação genética é consistente entre os mosquitos das diferentes sub-regiões avaliadas. Ainda, para mosquitos de Campo Grande, podemos concluir que a população de mosquitos *Ae. aegypti* possui estruturação intermediária, quando consideramos os resultados obtidos para as populações de Botucatu e Belo Horizonte.

4.4. Discussão

Sabe-se que mosquitos pertencentes a diferentes habitats podem apresentar diferenças quanto a sua constituição genética (Hodkinson, 2005). Estas diferentes características podem influenciar em variações que auxiliem na dispersão de mosquitos vetores e de agentes etiológicos por eles veiculados.

Ae. aegypti é o principal vetor da dengue, estima-se que 50 milhões de infecções por dengue ocorram anualmente e que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas morram em países onde esta é endêmica (Ministério da Saúde, 2014). No Brasil, o Ministério da Saúde registrou, até o mês de março de 2015, 224.1 mil casos de doença no país, o aumento é de

162%, comparado ao mesmo período do ano passado, quando foram registrados 85.4 mil casos. Ainda, 340 cidades estão em situação de risco para a ocorrência de epidemias, e 877 estão em alerta (Portal Brasil, 2015). Outro fator importante é a recente introdução do vírus *Chicungunya* no Brasil, que eleva a necessidade de controlar estes mosquitos vetores em nosso país (Vega-Rúa et al., 2014).

Extinguir *Ae. aegypti* do meio urbano-doméstico vêm se tornando uma tarefa cada vez mais dispendiosa e laboriosa para a Saúde Pública brasileira, devido, principalmente aos eventos de resistência apresentados por estes insetos (Lima et al., 2011; Belinato et al., 2013; Maciel-de-Freitas et al., 2014). Portanto, medidas que sejam mais adequadas para o controle destes mosquitos têm se tornado cada vez mais necessárias. Compreender as diferenças existentes entre populações de mosquitos *Ae. aegypti* de diferentes regiões do país, bem como entender de que maneira ocorre a organização populacional destes indivíduos dentro de uma determinada localidade, poderá auxiliar na tomada de medidas mais direcionadas para reduzir a infestação destes vetores no meio urbano e, por conseguinte, reduzir a transmissão de dengue.

Neste trabalho utilizamos 12 marcadores microssatélites para genotipar populações de mosquitos provenientes de 5 diferentes regiões do Brasil, são estas Belo Horizonte – MG; Botucatu – SP; Campo Grande – MS; Maringá – PR e Rondonópolis – MT. Análise de estruturação populacional com o Programa Structure agrupou as populações de Belo Horizonte, Botucatu e Maringá em um *cluster* genético; e Campo Grande e Rondonópolis em um segundo *cluster* genético, sugerindo agrupamento das populações que possuem correspondências geográficas.

Macro-análises utilizando DAPC foram também adotadas para compreender a estrutura populacional entre indivíduos das cinco diferentes localidades em estudo. Identificou-se a diferenciação dos indivíduos das cinco regiões em cinco grupos genéticos, entretanto, quando consideramos este agrupamento para cada localidade, estruturação populacional consistente é apontada apenas para mosquitos da cidade de Belo Horizonte. Moderada estruturação entre mosquitos das cidades de Botucatu e Maringá, e miscigenação entre as populações de Campo Grande e Rondonópolis também foram sugeridas. Estes dados corroboram com outros estudos que identificaram diferenças genéticas entre mosquitos que colonizam diferentes regiões (Paduan et al., 2006; Brown et al., 2011; 2013; Monteiro et al., 2014).

Ainda, realizamos micro-análises populacionais em mosquitos provenientes das cidades de Belo Horizonte, Botucatu e Campo Grande. As sub-regiões seguiram o

delineamento adotado durante as coletas para cada região, e apesar de na prática, não existirem barreiras físicas que pudessem realmente separar ou impedir fluxo genético entre os mosquitos, subpopulações foram apontadas para mosquitos de BH. Ainda, identificou-se estruturação intermediária para a população de CG e falta de estruturação genética para mosquitos de BTU. Tais resultados sugerem que estruturação genética ocorra em correlação com o tamanho da cidade, localidades maiores parecem proporcionar melhor estruturação genética para populações de mosquitos *Ae. aegypti*.

Mosquitos *Ae. aegypti* de Campo Grande apresentaram HWD e DL para alguns *loci*, tal fato pode ser explicado pelo excesso de *missing data* consequentes da não genotipagem de indivíduos em alguns *loci*, entretanto, resultados satisfatórios para explicar estes desvios foram obtidos, sugerindo que as instabilidades encontradas para esta população possam ter ocorrido em consequência da miscigenação observada entre indivíduos de todas as sub-regiões amostradas. Esta similaridade entre indivíduos ocorre devido, possivelmente, à intensa troca genética entre mosquitos na cidade de Campo Grande, mediada por indivíduos que colonizam as sub-regiões centrais do município, estas mantêm o fluxo gênico intenso entre mosquitos das sub-regiões centrais, bem como entre mosquitos das sub-regiões laterais. Essa intensa troca de informações aumenta a similaridade genética entre os mosquitos e explica os DL e HWD atribuídos a esta população nas análises de diversidade genética.

Significativos DL e HWD foram observados para a população de Belo Horizonte, assim como diferenciação desta população das demais populações de mosquitos aqui analisadas. Quando micro-análises foram atribuídas, estruturação populacional foi observada entre mosquitos de cada sub-região amostrada. Segundo Agapow & Burt (2001), muitos processos biológicos podem causar desequilíbrio de ligação, ou seja, associações significativas entre alelos em diferentes *loci*, estes processos incluem diferenciação populacional e isolamento por distância. Isto pode explicar o desequilíbrio de ligação encontrado em nossas análises para a população de BH. Análises de distância genética de Bruvo's apontou dissimilaridade genética consistente entre os indivíduos de cada sub-região, acreditamos que os mosquitos de cada regional não trocam informações genéticas entre si, desta maneira, discriminam-se claramente quando avaliamos as variáveis existentes entre estes. Gonçalves (2010) avaliou as taxas de infecções de mosquitos *Ae. aegypti* das 9 regionais de BH, apesar de considerar ausência de barreiras geográficas reais entre os nove distritos sanitários do município, no decorrer do processo de desenvolvimento dos mosquitos e dos experimentos de infecção artificial realizados pela autora, esta observou que

os mosquitos das diferentes regionais apresentaram também diferenças morfológicas e comportamentais. Podemos, portanto, sugerir que para a cidade de Belo Horizonte a população de *Ae. aegypti* está organizada em sub-populações que se mantém muito bem estruturadas dentro de cada sub-regional. Resultado semelhante foi observado por Hlaing et al. (2010) quando estes estudaram dispersão espacial de populações de mosquitos *Ae. aegypti* provenientes de diferentes regiões da Ásia. Os autores sugeriram, através de métodos genéticos de agrupamento, que embora a distância espacial desempenhe um papel importante na formação da estrutura de populações, esta não é o único fator para diferenciação populacional, já que em uma mesma localidade, população de *Ae. aegypti* foram encontradas em diferentes níveis de estruturação. Possivelmente, as subpopulações de BH devem ser mantidas em criadouros artificiais, e suportam as epidemias de Dengue nas diferentes regionais sanitárias deste município.

Micro-análises para a cidade de Botucatu foram também eficientes em separar os indivíduos em quatro grupos, que refenciam as quatro sub-regiões amostradas durante as coletas no município. Discreta estruturação genética foi encontrada para mosquitos das sub-regiões 1 e 3, estes parecem trocar informações genéticas com mosquitos das demais sub-regiões, entretanto puderam ser agrupados em dois diferentes *clusters*. Um terceiro *cluster* é constituído por mosquitos das sub-regiões 2 e 4. Estas estruturações observadas estão de acordo com as distâncias geográficas existentes entre as sub-regiões da cidade de Botucatu, considerando a proximidade espacial entre estas, que é pequena. Tal fato auxilia para a ocorrência de fluxo genético entre mosquitos das diferentes sub-regiões, aumentando a similaridade destes e conseqüentemente tornando a população de *Ae. aegypti* de Botucatu, homogênea.

A proximidade genética entre as populações de Campo Grande e Rondonópolis observadas nas análises de F_{st} e macro-estruturação populacional podem ser explicadas pela proximidade geográfica entre estas regiões, o estado de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso fazem fronteira um com o outro. Devemos considerar que foram amostrados mosquitos de cidades que estão geograficamente muito distantes (em média 490Km), entretanto, a similaridade genética apontada entre indivíduos destas duas regiões pode ser atribuída à dispersão passiva de ovos de *Ae. aegypti* de uma região para outra. A rodovia BR-163 é a única rodovia que liga os estados de MT a MS pelas cidades de Campo Grande e Rondonópolis. Possivelmente, os mosquitos destas duas regiões foram passivamente dispersados por ações humanas de deslocamento, viajando dentro de carros ou em caçambas de caminhões, o que proporcionaria maior similaridade genética entre estas duas populações

de mosquitos. Damal et al. (2013) avaliaram a filogeografia de mosquitos *Ae. aegypti* da costa Leste e Oeste da Flórida utilizando seqüências mitocondriais, as populações dessas duas costas não foram significativamente diferentes, evidenciando a dispersão destes mosquitos em longas distâncias, auxiliada possivelmente, pelo transporte passivo humano.

As abordagens adotadas em nosso trabalho foram importantes para posteriores estudos populacionais que visem um conhecimento mais aprofundado sobre uma determinada região e os organismos que a colonizam. Também poderá auxiliar na elaboração de medidas de controle mais eficientes e direcionadas para diferentes regiões.

Novas medidas desenvolvidas para controle de *Ae. aegypti*, tais como a liberação de mosquitos transgênicos em zonas urbanas, necessitam de um conhecimento prévio e aprofundado sobre a estrutura e organização populacional de mosquitos que colonizam determinada área, assim a nova abordagem de estudos micro-populacionais, adotada em nosso trabalho, poderia auxiliar no para o melhor desenvolvimento destas atividades.

CAPÍTULO II

V. CAPÍTULO II

ANÁLISE DE DISPERSÃO GENÉTICA DE MOSQUITOS *Ae. aegypti* NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU – SP

5.1. Justificativa

Com o objetivo de entender a dispersão de mosquitos *Ae. aegypti* em uma determinada área, propomos estudar geneticamente o comportamento de oviposição de fêmeas desta espécie em duas sub-regiões de Botucatu – SP.

Para tanto, genotipamos o máximo de mosquitos provenientes de uma mesma ovitrampa/palheta com 8 marcadores microssatélites (*descritos no item 4.1. Genotipagem por Microssatélites*). Posteriormente, realizamos análises de Diversidade Genética e Estruturação Populacional, para compreender como ocorre a organização populacional de indivíduos de mesma ovitrampa; investigações de *Pedrigree* genético para avaliar o grau de parentesco entre estes, para poder, desta maneira, afirmar como fêmeas de *Ae. aegypti* dispersam seus ovos.

5.2. Obtenção das amostras

Ovos de mosquitos *Ae. aegypti* provenientes de seis palhetas/ovitrampas oriundas da cidade de Botucatu – SP foram obtidos durante coletas realizadas no mês de Fevereiro de 2012. Previamente, a área total do Município de Botucatu foi dividida em 4 grandes áreas para distribuição de ovitrampas, armadilha de oviposição proposta por Fay & Eliason (1966), na qual contém como substrato uma palheta de Eucatex com tamanho de 2,5 x 12,5cm acondicionada dentro de um frasco preto de aproximadamente 500 mL (**Figura 34**). Este procedimento é realizado pela Secretaria de Saúde Municipal, mais especificamente pela Secretaria de Vigilância Ambiental em Saúde (SVA). Esta atividade está relacionada com as medidas de controle da infestação de mosquitos *Aedes* no Município realizadas pela SVA.

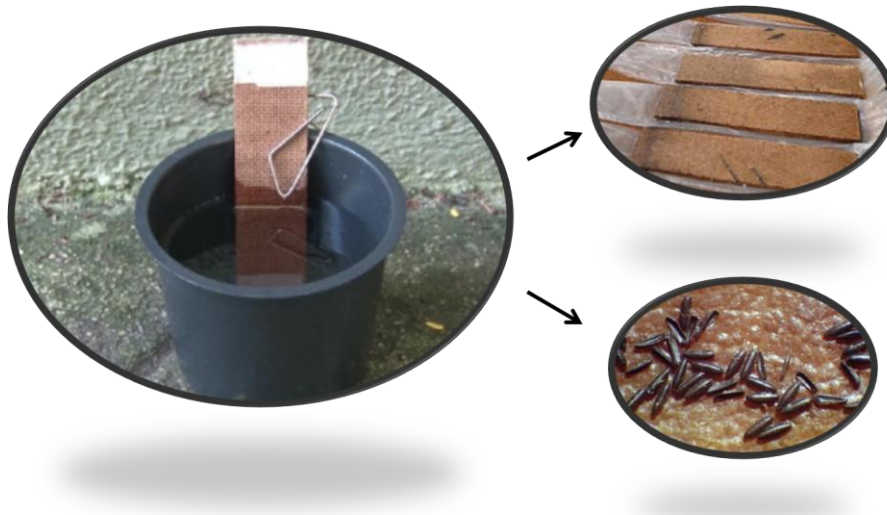


Figura 34. Ovitrapas. Armadilha elaborada por Fay & Eliason (1966), e utilizada em nosso estudo para amostragem de mosquitos *Ae. aegypti* em estudos de dispersão.

As palhetas contendo ovos foram gentilmente cedidos pela SVA e enviadas para nosso laboratório, na Unesp de Botucatu para serem analisadas em lupa para estimar a quantidade de ovos depositados pelas fêmeas de *Ae. aegypti*. Posteriormente, as palhetas foram mantidas em insetário (temperatura de 27°C, umidade relativa de 80% e foto período de 12h), até a fase adulta do mosquito. Já nesta fase, os mosquitos foram acondicionados em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

Das 185 ovitrapas distribuídas no Município, 100 foram positivas para ovos de *Ae. aegypti*, destas, escolhemos 6 ovitrapas utilizando dois critérios:

- Quantidade de adultos por palheta após o desenvolvimento em insetário (selecionou-se palhetas que tiveram maior número de indivíduos);
- Ovitrapas que durante as coletas foram instaladas mais próximas geograficamente.

Foram escolhidas dentre as quatro, duas sub-áreas para amostragem, que aqui chamaremos de ÁREA III e ÁREA IV. As especificações de amostragem, encontram-se na **Tabela 13 e Figura 35.**

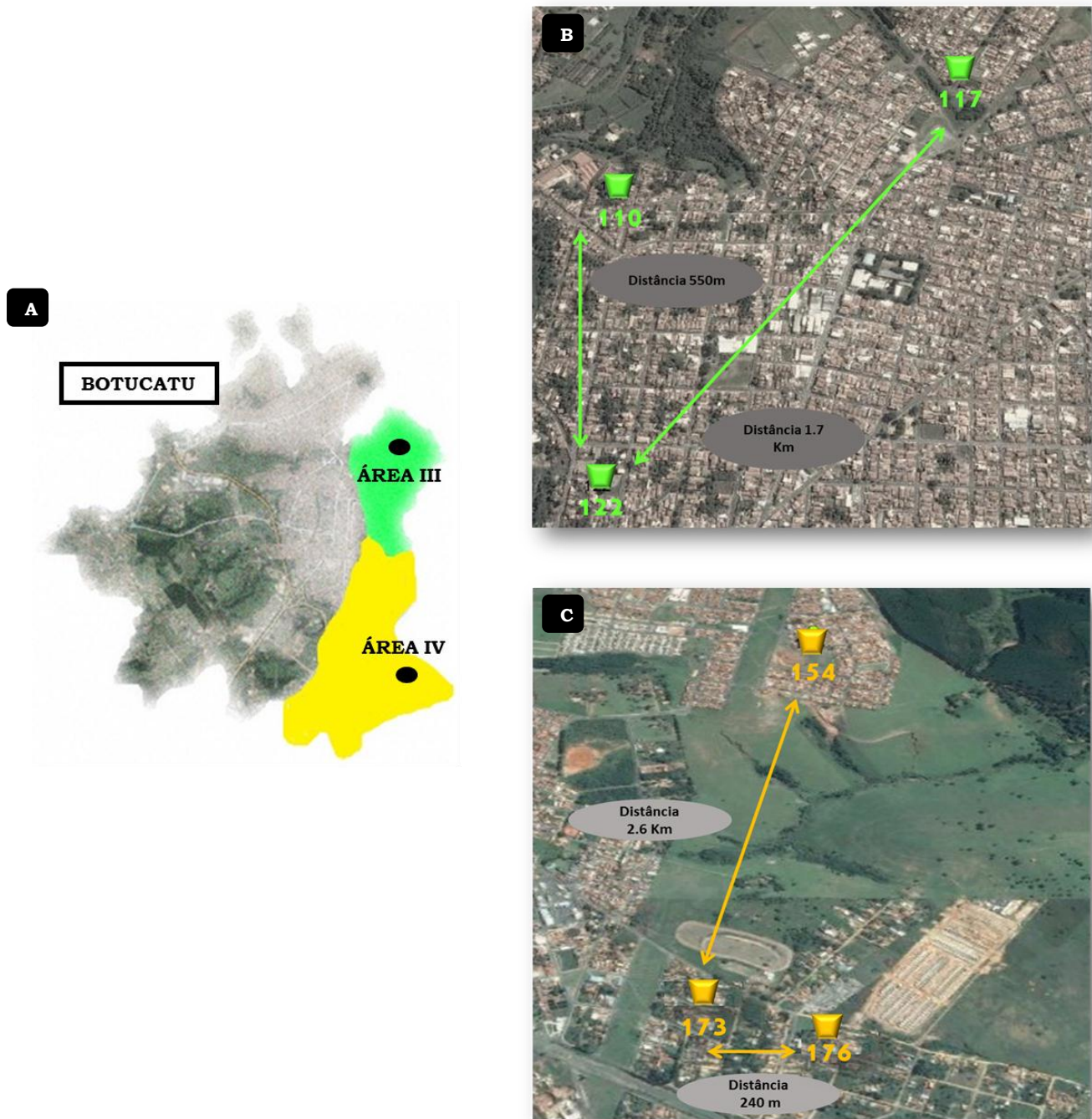


Figura 35. Ovitrapas amostradas. A. Mapa de Botucatu, identificando as áreas III e IV; B. Ovitrapas obtidas da área III, quadrante de origem da ovitrampa e distância em Km de uma ovitrampa para outra. C. Ovitrapas obtidas da área IV, quadrante de origem da ovitrampa e distância em Km de uma palheta para outra. Mapa de Botucatu gerado no *Google Earth* com adaptações.

Tabela 13. Características das áreas amostradas. Amostra: tipo de amostra coletada no campo; Área: área de origem das ovitrampas; Ovitrapa: identificação da Ovitrapa/Palheta; Total de indivíduos: número total de indivíduos de cada palheta; N: total de amostras por área.

AMOSTRA	ÁREA	OVITRAMPAS	TOTAL DE INDIVÍDUOS	N
ovos	III	110	30	90
ovos		117	30	
		122	30	
	IV	154	20	70
		173	20	
		176	30	
TOTAL	2	6	160	160

5.3. Delineamento do estudo populacional

- A.** Estudos de **DIVERSIDADE GENÉTICA** foram realizados entre mosquitos das ovitrampas da área III e IV, para estimar a variabilidade genética existente entre estes;
- B.** Análises de **DIVERSIDADE GENÉTICA** foram realizadas também entre indivíduos de uma mesma ovitrapa, para todas as 6 ovitrampas amostradas. Objetivamos avaliar parâmetros que indicassem excesso de homozigotos e consequente endogamia entre indivíduos de mesmo criadouro (parâmetros tais como desequilíbrio de ligação e desequilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliados);
- C.** Análise de **ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL** entre mosquitos das áreas III e IV foram executadas, para avaliar se mosquitos destas localidades possuem algum nível de similaridade genética. Partimos de análises da região total para análises mais restritas a fim de compreender como os indivíduos são organizados geneticamente;
- D.** Análises de **ESTRUTURA POPULACIONAL** foram realizadas entre mosquitos de ovitrampas de mesma área, para investigar similaridades genéticas que indicassem

algum grau de estruturação e, desta forma correlacionar à dispersão de ovos pelas fêmeas do mosquito;

E. Por fim, realizamos análises de **PEDIGREE** e **INBREEDING GENÉTICO** para indivíduos de uma mesma ovitrampa, para identificar grau de parentesco entre estes.

5.4. Resultados

A. Diversidade genética considerando as áreas III e IV

Estimativas de diversidade genética realizadas entre as ovitrampas da área III e IV encontram-se descritas na **Tabela 14** e serão discutidas a seguir.

A heterozigosidade observada para mosquitos da área III variou de 0.155 no *locus* AC4, à 0.783 no *locus* AG2; e para mosquitos da área IV, variou de 0.074 no *locus* CT2, à 0.636 no *locus* AG1. De modo geral, os níveis de heterozigosidade observados foram baixos quando comparados com os valores esperados, assim, excesso de homozigotos foi apontado para mosquitos das duas diferentes áreas analisadas.

O *locus* que apresentou maior riqueza alélica foi o *locus* AG2, tanto para mosquitos da área III (8), quanto para mosquitos da área IV (7). O *locus* AC4 apresentou o menor índice de riqueza alélica para as duas áreas amostradas, Área III (2) e Área IV (2).

Após 28 comparações par a par para testes de desequilíbrio de ligação entre *loci*, geradas pelo programa Genepop, associação positiva foi sugerida entre 6 *loci* (AG5, AG2, AC5, AC1, AG1 e CT2) para mosquitos da área III; e cinco *loci* (A1, AC5, AG5, AC1 e AG2) para mosquitos da área IV.

Avaliando o HWE, para a mosquitos da área III e IV, 4 *loci* apresentaram déficit de heterozigotos e permaneceram significativos após o ajuste de Bonferroni, sendo A1, AC5, AG2 e AG1 para mosquitos da área III; e AC5, AG2, AC1 e AG1 para mosquitos da área IV. O coeficiente de Endogamia (*Fis*) apresentou valores positivos para alguns *loci* que apresentaram DL e HWD, estes resultados sugerem endogamia entre indivíduos das duas áreas amostradas.

Tabela 14. Diversidade Genética dos indivíduos das 2 diferentes áreas de coleta em Botucatu analisadas. Número de Alelos; Riqueza Alélica por *locus* e por população baseado no número mínimo de amostras (47 indivíduos) calculado no FSTAT; Ho: Heterozigosidade Observada; He: Heterozigosidade esperada, calculadas no Arlequin v3.1; FIS coeficiente de endogamia, calculado no FSTAT e P: Alelos Privados (média). Os valores em negrito, indicam os *loci* em desequilíbrio de Hardy–Weinberg após a Correção de Bonferroni com ****p < 0.001**.

Populações		LOCI								Todos os loci	
		A1	AG1	AG5	AC4	CT2	AG2	AC5	AC1	Total	Mean
Área 3	Riqueza Alélica	3,0	3,0	5,0	2,0	2,0	8,0	6,0	4,0	33	4,1
	Nº de alelos	3	3	5	2	2	8	7	4	34	4,3
	Het. Exp.	0,471	0,513	0,531	0,167	0,072	0,807	0,467	0,587		0,5
	Het. Obs.	0,171*	0,313*	0,573	0,155	0,185	0,783*	0,225*	0,450		0,34
	Fis	0,681	0,371	0,057	0,298	0,112	-0,064	0,651	-0,123		0,25
	P(F)			166 (0.05)			148 (0.02)	148 (0.05)		6	
Área 4	Riqueza Alélica	3	3	5	2	2	7	4	4	30	3,8
	Nº de alelos	3	3	5	2	2	7	4	4	30	3,8
	Het. Exp.	0,637	0,667	0,569	0,651	0,282	0,649	0,297	0,592		0,54
	Het. Obs.	0,302	0,636*	0,600	0,182	0,074	0,625*	0,188*	0,511*		0,29
	Fis	0,36	-0,244	-0,131	-0,091	-0,029	0,228	0,598	0,13		0,10
	P(F)			178 (0.09)			152 (0.15)			2	

B. Diversidade genética considerando indivíduos de mesma ovitrampa.

Quando estimativas de Heterozigosidade observada (*Ho*) foram calculadas para indivíduos de uma mesma ovitrampa, alguns *loci* se apresentaram monomórficos (AC4, CT2, AG2 e AC5), em contrapartida, para os demais *loci*, os valores de heterozigosidade observada foram sempre superiores aos valores esperados para os indivíduos de todas as 6 ovitrampas (dados não tabelados).

Na **Figura 36** pode-se observar os HWD apontados para cada ovitrampa em estudo. A figura em *heat map* indica os valores de $p \leq 0,05$ para *loci* e ovitrampas em desequilíbrio com a cor vermelha, as demais cores indicam que os indivíduos da ovitrampa estão em HWE para determinado *locus*. Os *loci* que apresentam desequilíbrios de HW não foram consistentemente os mesmos para todas as ovitrampas, isto ocorreu apenas para o *locus* AC5. Os desvios observados podem ser atribuídos ao excesso de homozigotos observados nas estimativas de *Ho* realizadas anteriormente para indivíduos de mesma ovitrampa.

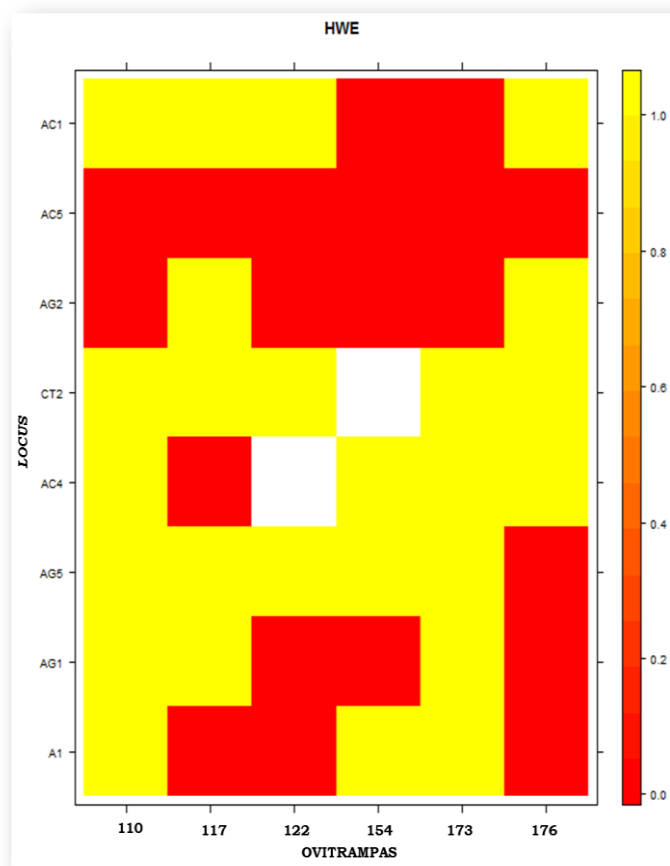


Figura 36. Heat map de HWE. O gráfico identifica valores de $p \leq 0,05$ para HWD (cores em vermelho); Eixo x: identificação de cada ovitrampa; Eixo y: loci analisados. Figura gerada pelo *Software R*, pacote *poppr*.

Análises randomizadas para testar desequilíbrio de ligação foram atribuídas com os índices de Associação (I_A) e índice de associação standardizado ($r^{\bar{d}}$). Após 1.000 testes permutacionais, os resultados obtidos apontam desequilíbrio de ligação entre loci para todas as ovitrampas avaliadas, entretanto com p significativo para as ovitrampas 117, 122, 173 e 176. Este resultado pode ser observado na **Tabela 15**.

Nos histogramas gerados também por essas análises de associação (**Figura 37 A-B**), detectam-se novamente estes desequilíbrios, a distribuição dos dados observados está plotada fora da distribuição esperada, isso ocorre para indivíduos de todas as ovitrampas em estudo e, ocorre nos dois índices calculados (histogramas à esquerda (I_A); histogramas à direita ($r^{\bar{d}}$)). Neste caso rejeitamos a hipótese nula de não ligação entre loci e aceitamos a hipótese alternativa de ligação entre loci. Para análises com indivíduos das ovitrampas 110 e 154, os valores de p de $r^{\bar{d}}$ indicam DL, diferentemente do visto para o índice I_A , pcomo já

visto anteriormente, o índice de associação de $r^{\bar{d}}$ é menos tendencioso, por isso consideramos DL para todas as ovitrampas avaliadas.

Tabela 15. Desequilíbrio de ligação. I_A = Índice de associação entre os indivíduos; pI_A = valor de p do índice de associação; $r^{\bar{d}}$ = índice de associação standardizado ; $pr^{\bar{d}}$ = valor de p de $r^{\bar{d}}$. Valores gerados através do *Software R* utilizando o pacote de dados *poppr*.

OVITRAMPA	I_A	pI_A	$r^{\bar{d}}$	$pr^{\bar{d}}$
110	0.30	0.045	0.04	0.03
117	0.41	0.001	0.06	0.001
122	0.66	0.001	0.11	0.001
154	0.36	0.065	0.06	0.049
173	0.90	0.002	0.14	0.001
176	0.65	0.001	0.10	0.001

*Em negrito valores de p significativos que indicam desequilíbrio de ligação.

DL observados sugerem que *loci* podem estar ligados fisicamente, entretanto acreditamos que os desequilíbrios apontados possam estar relacionados com os *loci* monomórficos apresentados, quando análises de Diversidade Genética foram realizadas para cada ovitrampa.

Pode-se considerar que alguns indivíduos de mesma ovitrampa são muito similares geneticamente, o que levaria ao excesso de homozigose observado nas estimativas de H_o , e aos desvios encontrados para índices de F_{is} (endogamia) e HWD. Entretanto, o excesso de heterozigosidade observado para outros *loci*, por outro lado, indicam indivíduos muito diferenciados dentro de cada ovitrampa.

Estes prévios resultados nos levam a supor que eventos de diferentes oviposições, realizados por diferentes fêmeas de *Ae. aegypti*, ocorreram nestas ovitrampas. Desta forma, tentou-se entender como ocorre a organização populacional para responder tais questões levantadas aqui.

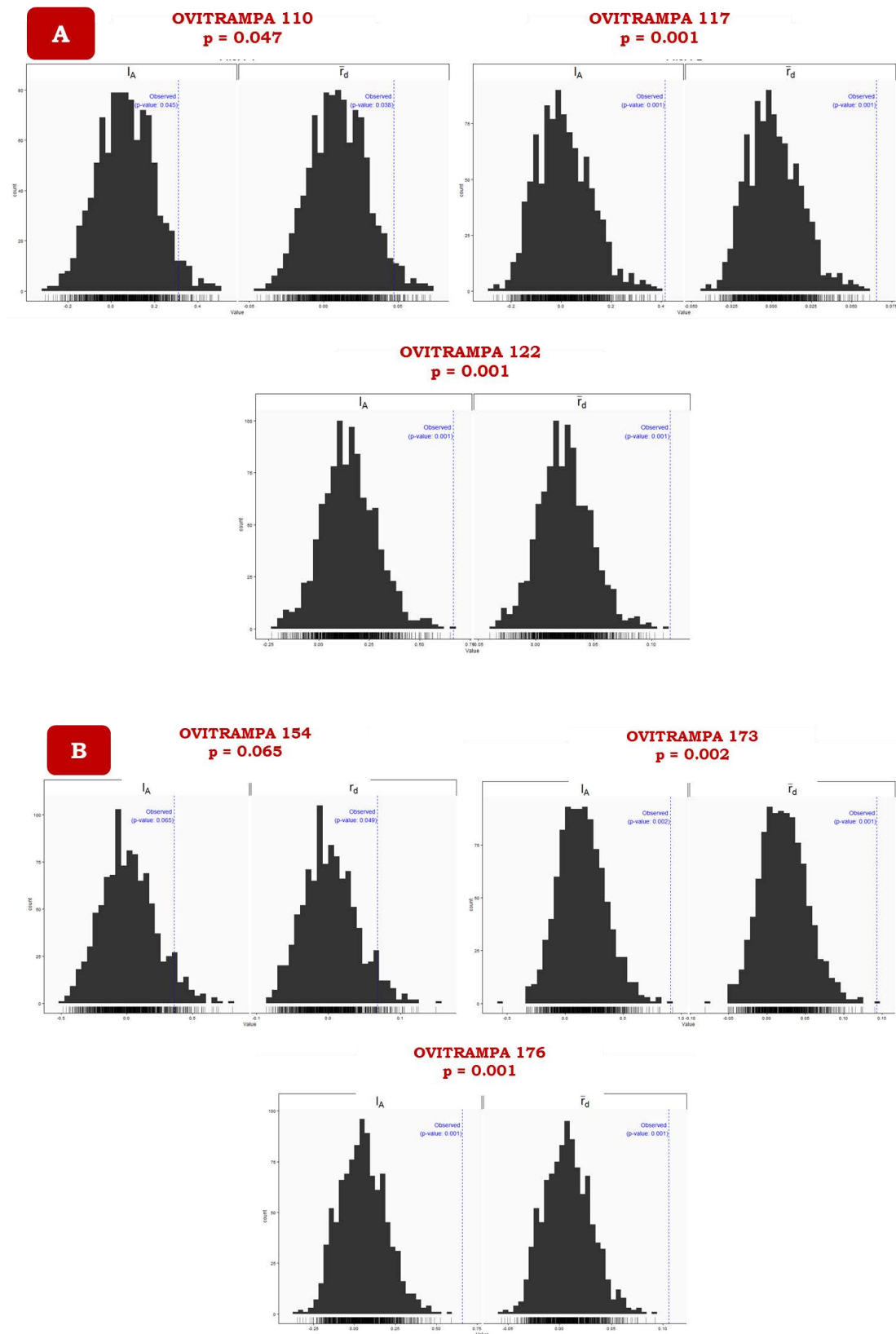


Figura 37. Histogramas de Desequilíbrio de ligação. Colunas cinzas: distribuição esperada para os dados após 1.000 testes permutacionais; Linha pontilhada azul: dados observados. Histogramas gerados pelo *Software R*, pacote *poppr*

C. Estruturação populacional para ovitrampas de cada área e indivíduos de cada ovitrampa.

A análise por AMOVA, entre mosquitos da área III e área IV indicam maior diferenciação dentro de amostras de cada área (93,02, com *p*-valor significativo ≤ 0.0001), do que entre amostras das diferentes áreas (6,98, com *p*-valor significativo ≤ 0.0001).

Estimativas de diferenciação genética (*F_{ST}*) foram calculadas para avaliar o grau de similaridade genética entre os indivíduos das duas áreas amostradas (**Tabela 16**). O nível de diferenciação obtido foi de 0,06979, com *p*-valor significativo ($\leq 0,0001$). Este resultado indica moderada diferenciação genética entre mosquitos das áreas III e IV.

Tabela 16. Índices de fixação *F_{ST}*. Valores obtidos entre pares de populações e para o total de *loci* microssatélite analisados. Valor de $p \leq 0,0001$.

	ÁREA 3	ÁREA 4
ÁREA 3	***	***
ÁREA 4	0.069	***

Análises de Componente Principal (PCAs) foram atribuídas, considerando os mosquitos organizados por áreas (III e IV) e posteriormente, por ovitrampas (ovitrampas da área III e ovitrampas da área IV). Utilizamos estas diferentes abordagens para compreender como os indivíduos se organizam em *clusters* quando consideram-se as diferenças internas para agrupamento.

Cálculos de *Eigenvalues* discriminaram os indivíduos em dois componentes principais (quando são consideradas áreas e quando são consideradas as ovitrampas). Nos gráficos da **Figura 39**, observa-se a dispersão dos indivíduos entre o primeiro e segundo componentes. Os resultados sugerem similaridade genética entre mosquitos das áreas III e IV, já que apesar de agrupados em *clusters* diferentes, indivíduos de uma área parecem participar também do *cluster* que referencia a outra área. Além disso, o agrupamento ocorreu com certa proximidade, indicando novamente que estes mosquitos são similares geneticamente (**Figura 39-A**). Estes resultados corroboram com os encontrados

anteriormente para o índice de F_{st} , onde mosquitos das duas diferentes áreas são moderadamente diferenciados entre si.

Na **Figura 38 B-C**, podemos observar os resultados das análises de PCA realizadas entre as ovitrampas de uma mesma área. Estruturação genética pode ser sugerida entre indivíduos de mesma ovitrampa, já que mosquitos provenientes da área III agrupam-se de forma a definir as ovitrampas 110, 117 e 122; da mesma maneira para indivíduos provenientes da área IV, que agrupam-se seguindo a discriminação das ovitrampas 154, 173 e 176. Apesar desta estruturação, certa mistura de indivíduos em outros *clusters* que não os seus de origem podem ser observadas, tais como:

- **indivíduos da área III** – mosquitos das ovitrampas 122 e 110 parecem partilhar informações genéticas entre si, já que os clusters destes estão mais próximos entre si, do que quando consideramos o cluster dos indivíduos da ovitrampa 117, que por sua vez, parecem participar menos dos demais grupos. Considerando a pequena distância espacial existente entre as ovitrampas 110 e 122 (550m), esta estruturação observada pode estar relacionada com a similaridade genética destes indivíduos. A não participação de indivíduos da ovitrampa 117 nos demais grupos, também parece estar de acordo com a distância espacial, que neste caso é maior entre esta e as demais ovitrampas (1.7Km).

- **indivíduos da área IV** – mosquitos da ovitrampa 154 parecem mais distantes geneticamente de mosquitos das ovitrampas 173 e 176, que por sua vez, parecem muito similares geneticamente. Entretanto, indivíduos da ovitrampa 176 parecem não possuir indivíduos no *cluster* referente à ovitrampa 173 assim como, no *cluster* referente à ovitrampa 154. A distância espacial existente entre palhetas parece novamente corroborar com as estruturações observadas, já que a ovitrampa 154 encontra-se distante geograficamente das ovitrampas 173 e 176 (2.6Km). Porém quando consideramos as ovitrampas 173 e 176, que possuem apenas 240m de distância, mosquitos destas parecem não compartilhar informações genéticas entre si.

Assim, os resultados encontrados com análises de PCA sugerem que as ovitrampas representam famílias dentro da grande área amostrada, já que indivíduos pertencentes a cada ovitrampa agrupam-se entre si, evidenciando maior similaridade genética entre estes. Para compreender como a organização populacional ocorreria entre mosquitos das diferentes ovitrampas, quando considerássemos as variáveis mais diferentes entre estas, durante a o agrupamento dos dados, utilizamos análises com DAPC. O resultado pode ser observado na **Figura 39**.

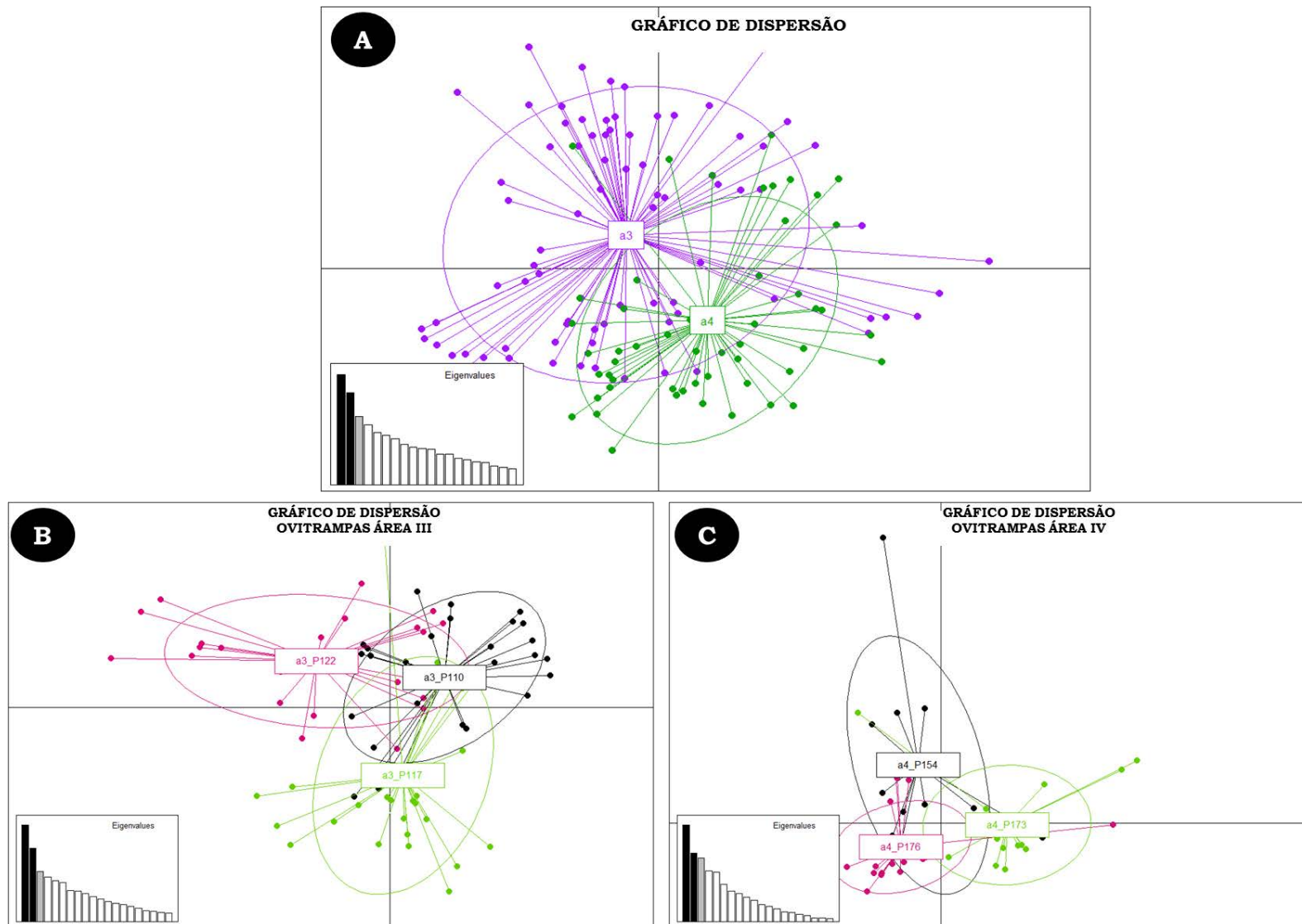


Figura 38. Análise de PCA. Análises de PCA considerando os primeiro (eixo x) e segundo componentes (eixo y). **A.** PCA entre mosquitos da área III e IV; **B.** PCA para as ovitampas provenientes da área III; **C.** PCA para as ovitampas provenientes da área IV. Abaixo nas figuras, valores de *Eigenvalues* para discriminação dos dados.

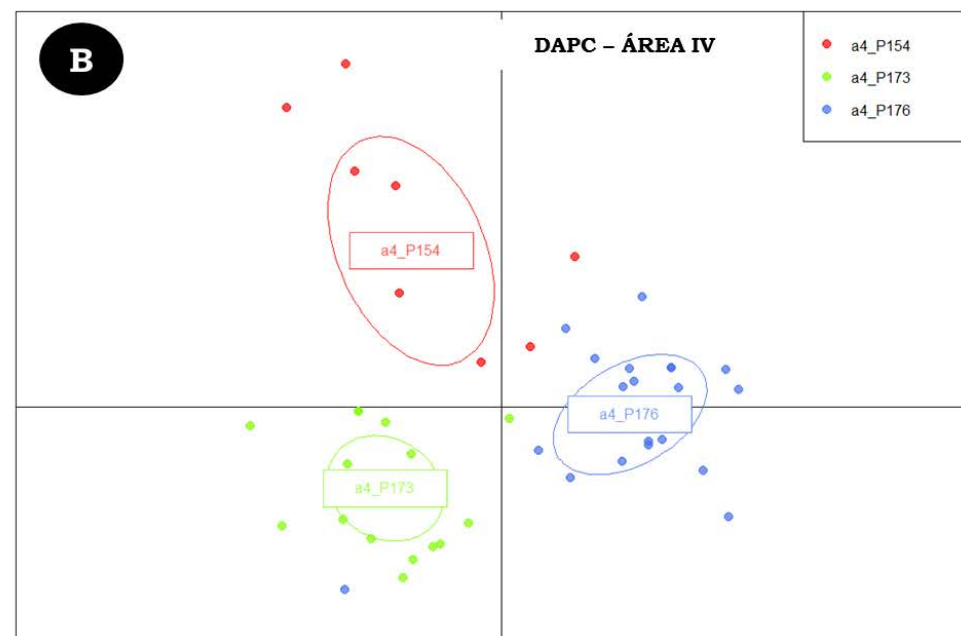
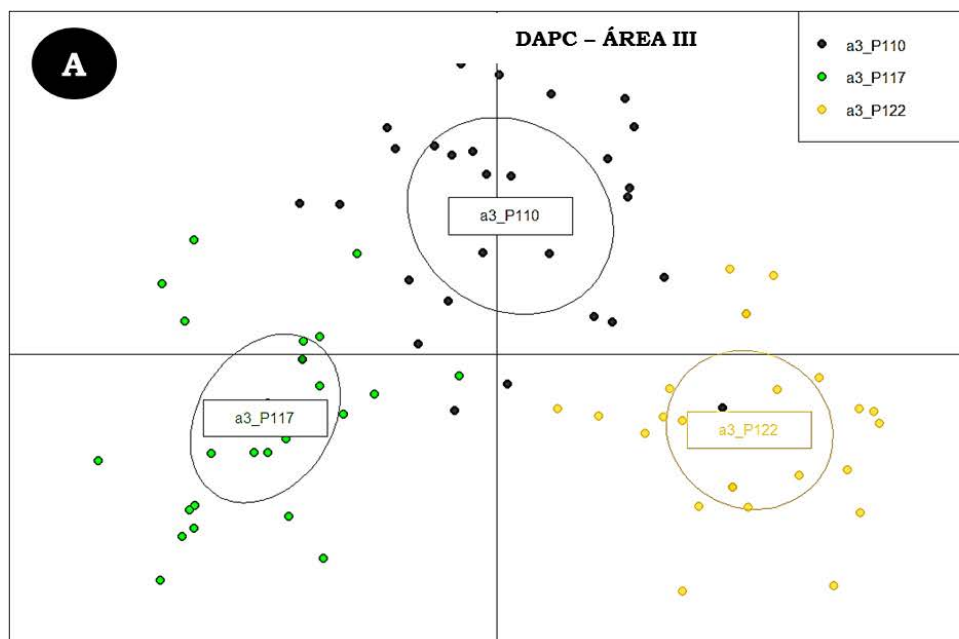


Figura 39. Análise de DAPC. Considerando os primeiro (eixo x) e segundo (eixo y) componentes. **A.** DAPC entre mosquitos da área III e IV; **B.** DAPC para as ovitrampas provenientes da área III; **C.** DAPC para as ovitrampas provenientes da área IV. Identificação para cada ovitrampa pode ser consultada na tabela acima da figura.

Observa-se que os agrupamentos ocorreram para mosquitos de mesma ovitrampa, evidenciando novamente a organização em famílias dentro de cada área. Na **Figura 39 A-B**, temos a dispersão de mosquitos provenientes das ovitampas da área III e IV, os indivíduos se separam em *clusters* genéticos muito bem definidos, estes ainda parecem distantes geneticamente, já que o agrupamento não ocorreu em proximidade para os grupos de cada área, mesmo quando consideramos indivíduos das ovitampas 110/122 e 173 e 176 (mais próximas geograficamente).

Realizamos diferentes análises de *membership* (filiação) para compreender se realmente cada indivíduo foi atribuído em seu *cluster* de origem, ou se ocorreriam atribuições de indivíduos em outras ovitampas. Os resultados obtidos podem ser observados na **Figura 40** através da tabela de contingência e os gráficos gerados para reatribuições de *membership*. Na **Figura 40-A** detecta-se que a maioria dos indivíduos da área III foram atribuídos corretamente em sua ovitrampa original. Os quadrados, que se referem aos indivíduos, são consistentemente maiores, ou seja, representam a maioria dos indivíduos nestes locais. Na **Figura 40-B** podemos visualizar com maior clareza a correta atribuição dos indivíduos em sua ovitrampa original. Maior parte dos indivíduos participa com 100% de probabilidade de filiação no *cluster* em que foi atribuído, isto pode ser observado pelos diferentes padrões de cores constituídos para cada ovitrampa (Ovitrampa 110-preto; Ovitrampa 117-verde; Ovitrampa 122-amarela).

Mesmo resultado pode ser observado para os indivíduos das palhetas provenientes da área IV (**Figura 40 C-D**). Mosquitos de cada ovitrampa foram corretamente atribuídos em seu *cluster* original, esta constatação pode ser visualizada na tabela de contingência (**Figura 40-C**), onde as posteriores atribuições de indivíduos são consistentes no *cluster* original de cada indivíduo. Nas reatribuição de *membership* (**Figura 40-D**), os *clusters* são ainda melhor definidos entre as ovitampas (Ovitrampa 154-vermelha; Ovitrampa 173-laranja-Ovitrampa 176-azul).

Até o momento podemos afirmar que indivíduos de mesma ovitrampa são muito parecidos entre si e muito diferentes de uma ovitrampa para outra, mesmo quando distância espacial é pequena. Nossa hipótese de que cada ovitrampa constitui uma família parece ser real.

Assim, para estimar o grau de parentesco entre indivíduos de mesma ovitrampa e saber se para cada palheta temos a maioria dos indivíduos com relação restrita de parentesco, realizamos análises de *Pedigree*. Com esta abordagem, poderemos afirmar se cada ovitrampa referencia a oviposição de apenas uma ou mais fêmeas de *Ae. aegypti*.

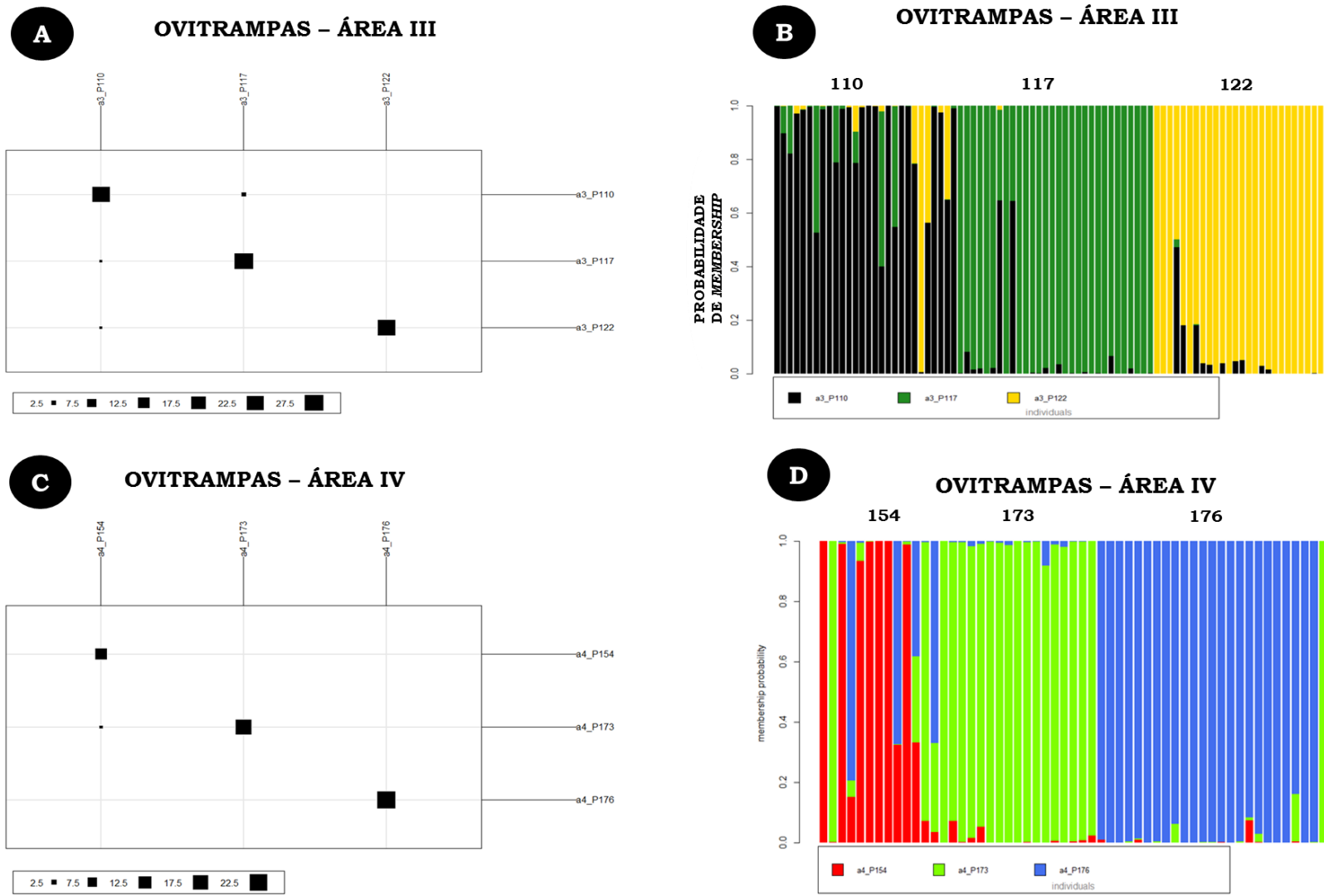


Figura 40. Análises de *membership* para ovitampas das áreas III e IV. A e C: tabela de contingência para atribuição de indivíduos: colunas representam os clusters originais e linhas as posteriores atribuições para indivíduos das ovitampas da área III e IV respectivamente; B-D. Atribuições de *membership* para ovitampas da área III e IV, respectivamente (eixo x: ovitampas; eixo y: probabilidade de atribuição de cada indivíduo).

D. Análise de Parentesco

Análises de PCA e DAPC foram consistentes na separação de famílias entre mosquitos das diferentes ovitrampas. Assim, objetivando conhecer a relação familiar entre os indivíduos de uma mesma ovitrampa, realizamos análises de *Pedigree* genético entre estes. Também Coeficiente de *Inbreeding* (F), ou coeficiente de endogamia, foi testado para estimar a probabilidade de um indivíduo para determinado *locus*, ter herdado dois alelos idênticos de um ancestral comum.

• Ovitrampa 110

Na **Figura 41-A** os valores obtidos nas análises de *Pedigree* para indivíduos da ovitrampa 110, foram maiores para o *Pedigree U-não* relacionados (71%). A porcentagem de indivíduos considerados *FS-irmãos completos* foi de 12%, e esta porcentagem indica que em média 3,6 indivíduos desta ovitrampa podem ser considerados irmãos.

Este resultado também pode ser observado nas análises de Coeficiente F , (**Figura 42-B**) onde dos 30 indivíduos analisados, em média 4 parecem ter maior valor de *inbreeding* ($\leq 0,5$), ou seja serem homozigotos para os *loci* aqui utilizados

O Software utilizado (R, pacote *adegenet*) permitiu a identificação dos indivíduos com maior *inbreeding* dentro de nossos dados, bem como recalculou a probabilidade destes serem realmente homozigotos e terem herdado estes alelos de um ancestral comum. Os indivíduos 4, 6, 7 e 27; possuem 100%, 70% e 80% (respectivamente) de probabilidade de realmente possuírem as características acima citadas, como estes parecem apresentar níveis altos de endogamia, ou seja, serem homozigotos para os mesmos *loci* analisados, podemos admitir que estes indivíduos são os mesmos indicados pelo *Pedigree FS-irmãos completos*, identificados na análise anterior (**Figura 43**).

ÁREA III – OVITRAMPAS 110

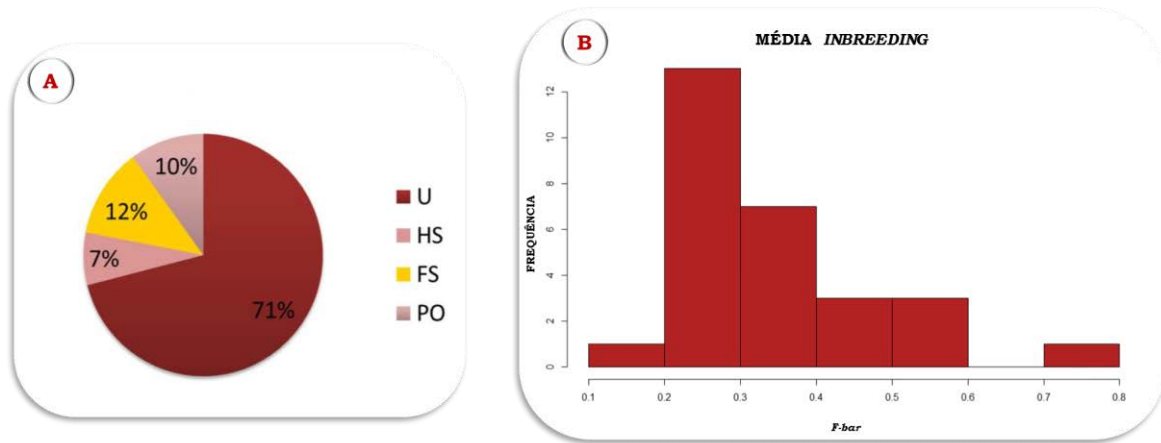


Figura 41. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitrapa 110. A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*.

ÁREA III – OVITRAMPAS 110 Coeficiente F para cada indivíduo

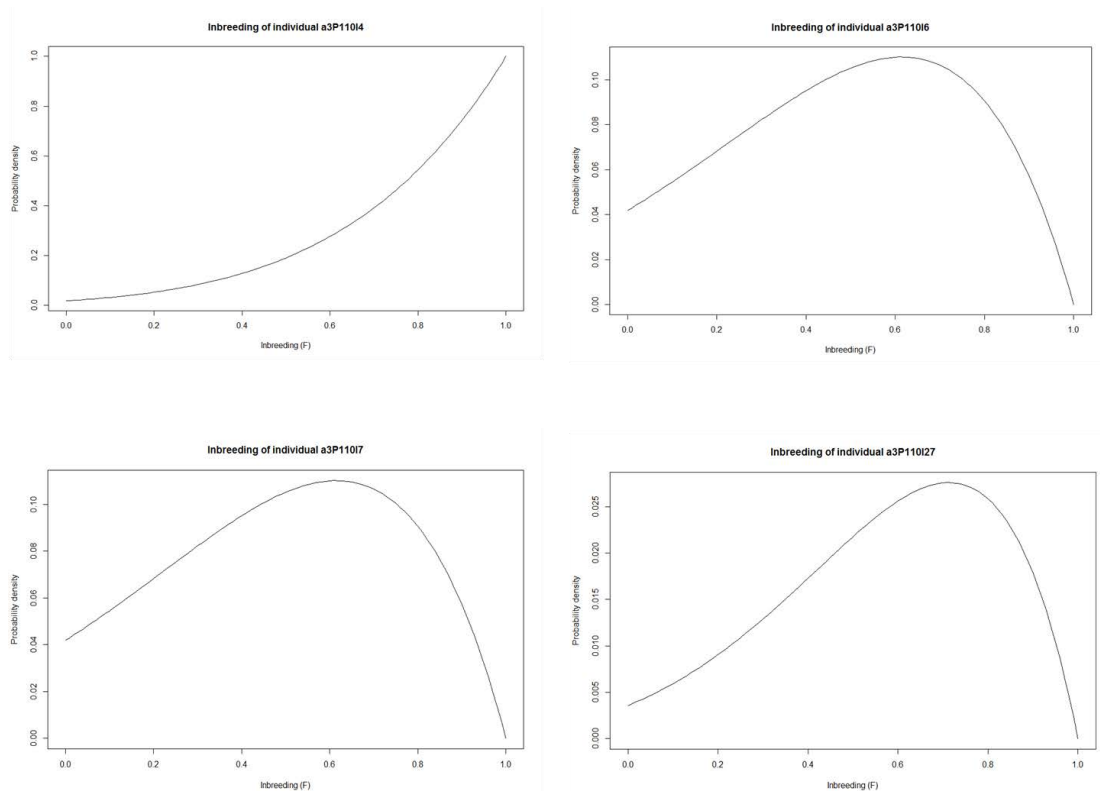


Figura 42. Probabilidade de *inbreeding* individual para indivíduos da ovitrapa 110. Gráficos representam os quatro indivíduos identificados nas análises de coeficiente *F* com maior *Inbreeding*. Probabilidades para o indivíduo 4: 100%; Indivíduos 6 e 7: 70%; Indivíduo 27: 80%. Gráficos gerados no *Software R*, pacote *adegenet*.

• Ovitampa 117

Os valores obtidos em análises de *Pedigree* entre indivíduos da ovitampa 117, foram maiores para o *Pedigree U*-não relacionados (72%), como mostrado na **Figura 43-A**. A porcentagem de indivíduos considerados *FS-irmãos completos* foi de 10%, esta porcentagem indica que em média 3 dos indivíduos desta ovitampa podem ser considerados irmãos.

Análises com o Coeficiente *F* (**Figura 43-B**), indicou que dos 30 indivíduos analisados, em média 4 parecem ter maior *inbreeding* entre si ($\leq 0,5$), são estes, indivíduos 9, 23, 24 e 29. As probabilidades destes indivíduos realmente serem homozigotos e terem herdado o mesmo alelo de um ancestral comum, para os 4 indivíduos identificados nas re-análises de Coeficiente de *Inbreeding* foi de 80% para todos os indivíduos (**Figura 44**). Podemos novamente, correlacionar os indivíduos identificados como homozigotos, como sendo os irmãos apontados na análise de *Pedigree*.

ÁREA III – OVITRAMPAS 117

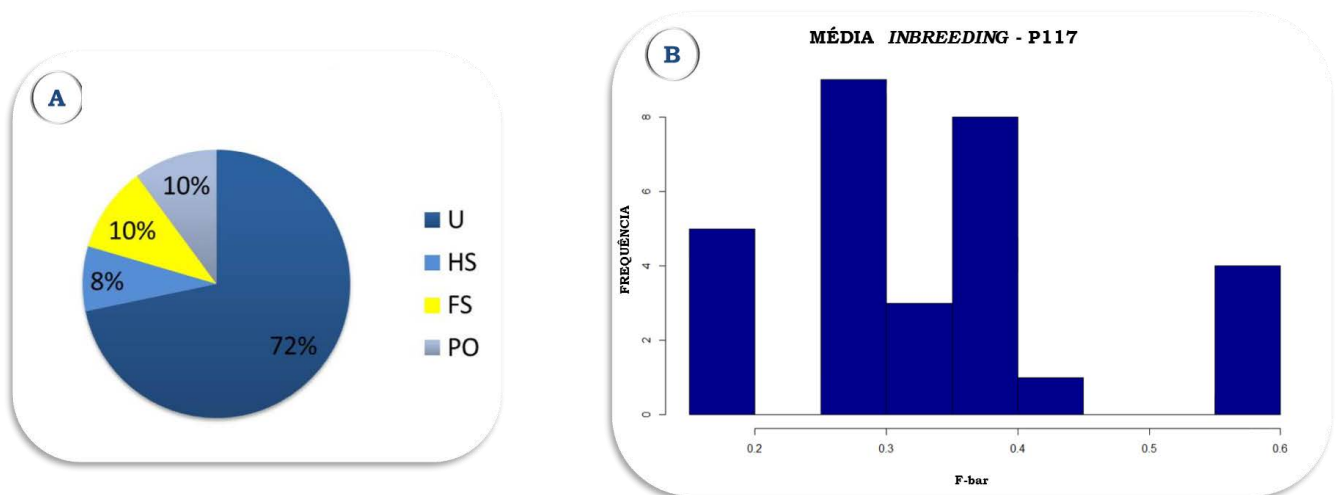


Figura 43. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitampa 117. A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); **B.** Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*.

ÁREA III – OVITRAMPA 117

Coeficiente F para cada indivíduo

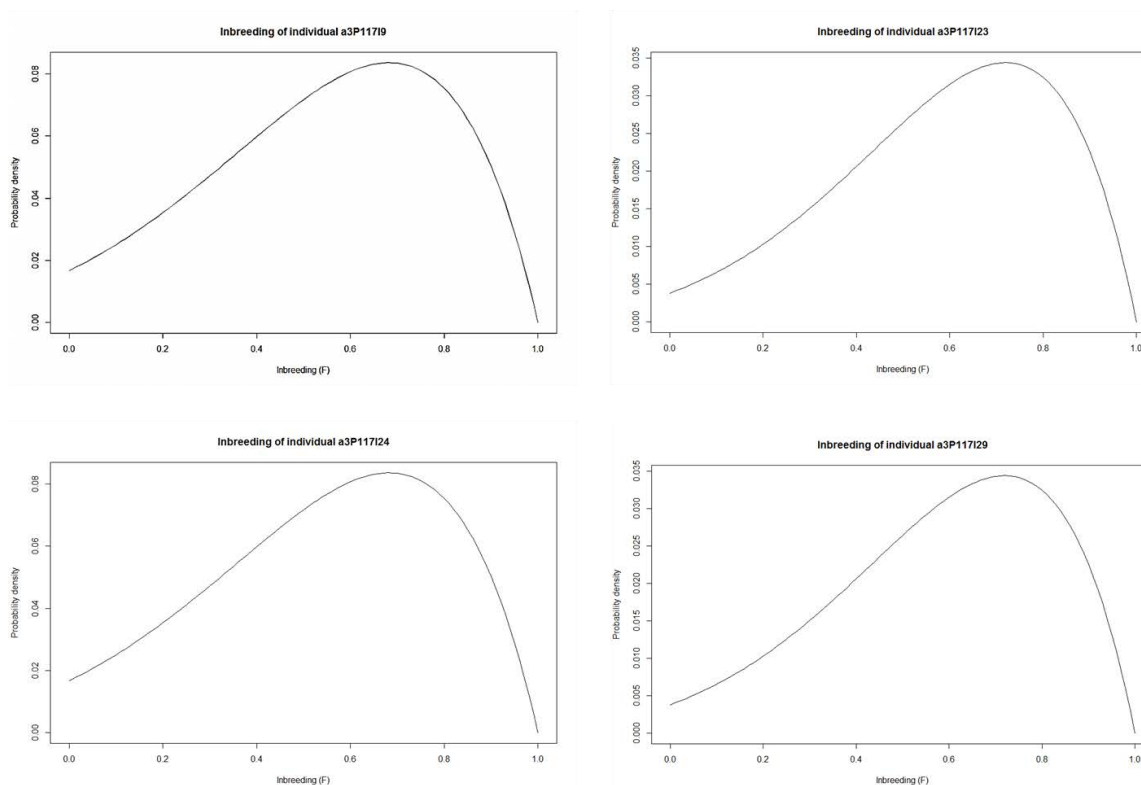


Figura 44. Probabilidade de *inbreeding* individual para indivíduos da ovitrampa117. Gráficos representam os quatro indivíduos identificados nas análises de coeficiente *F* com maior *Inbreeding*. Probabilidades para todos os indivíduos de 80%. Gráficos gerados no *Software R*, pacote *adegenet*.

• Ovitrampa 122

Os valores obtidos em análises de *Pedigree* entre indivíduos da ovitrampa 122, foram novamente maiores para o *Pedigree U*-não relacionados (72%), como mostrado na **Figura 45-A**. A porcentagem de indivíduos considerados *FS-irmãos completos* foi de 19%. Esta porcentagem indica que em média 5,7 dos indivíduos desta ovitrampa podem ser considerados irmãos.

Já as análises com o Coeficiente *F*, indicaram que dos 30 indivíduos analisados, em média apenas 1 parece ter maior *inbreeding* ($\leq 0,5$) (**Figura 45-B**), o indivíduo que chamamos pelo número 30. Quando recalculamos as probabilidades deste indivíduo realmente ser homozigoto, esta é relativamente baixa, de 60% (**Figura 46**). Para esta ovitrampa os dados obtidos com o programa *ML-Relate* não concordaram com os dados obtidos de Coeficiente

F. Talvez, um dos programas não tenham sido sensíveis o bastante para identificar tais características entre os indivíduos analisados.

ÁREA III – OVITRAMPA 122

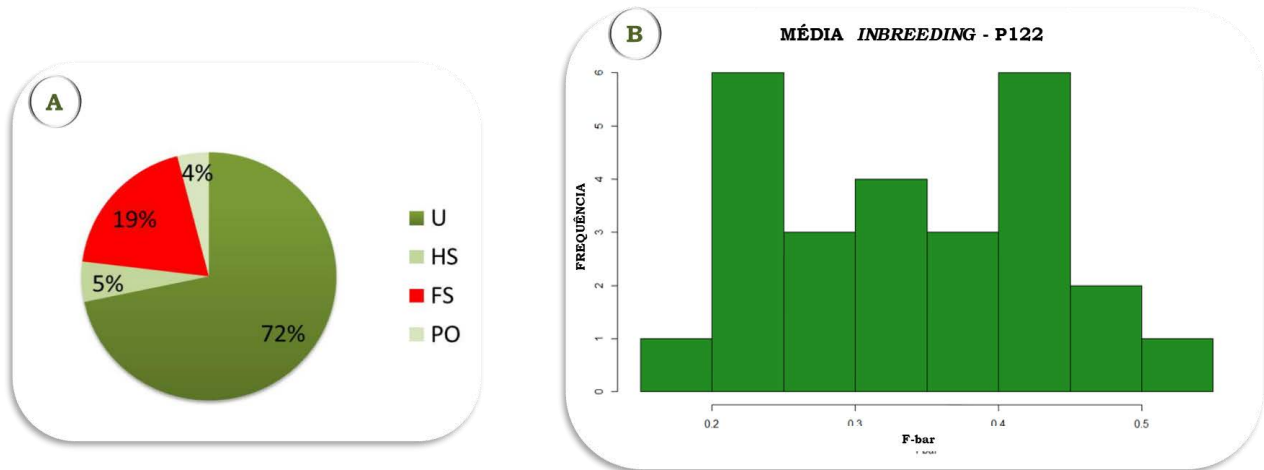


Figura 45. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitampa 122. A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os Pedigrees (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*.

ÁREA III – OVITRAMPA 122 Coeficiente F individual

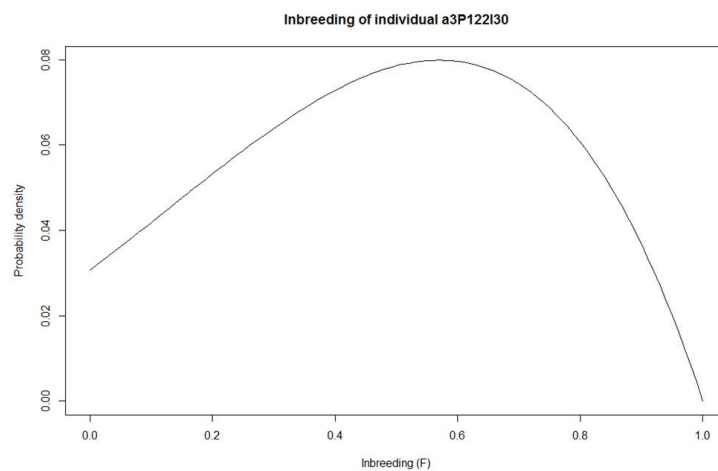


Figura 46. Probabilidade de *inbreeding* individual para indivíduo da ovitampa 122. O Gráfico representa o indivíduo 30, identificado pelo coeficiente *F* com maior *Inbreeding*. Probabilidades de *inbreeding* de 60%. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*.

Pensamos ainda, em analisar a relação de parentesco e Coeficiente de *Inbreeding* entre indivíduos das ovitrampas que apresentavam menor distância espacial. Para isso, escolhemos as ovitrampas 110 e 122, que possuem 550 metros de distância uma da outra. Os resultados podem ser observados na **Figura 47**.

O grau de parentesco dos indivíduos foi novamente baixo, (*Pedigree U*-não relacionados 74%), assim como o Coeficiente de *Inbreeding*, que identificou em média, 5 indivíduos com maiores níveis de endogamia ($\leq 0,5$) entre estas ovitrampas. Entretanto, quando analisamos quais indivíduos indicaram esta homozigosidade, constatamos que são os mesmos identificados anteriormente para as ovitrampas 110 e 122 (110-ind-4; 110-ind-6; 110-ind-27; 122-ind-30).

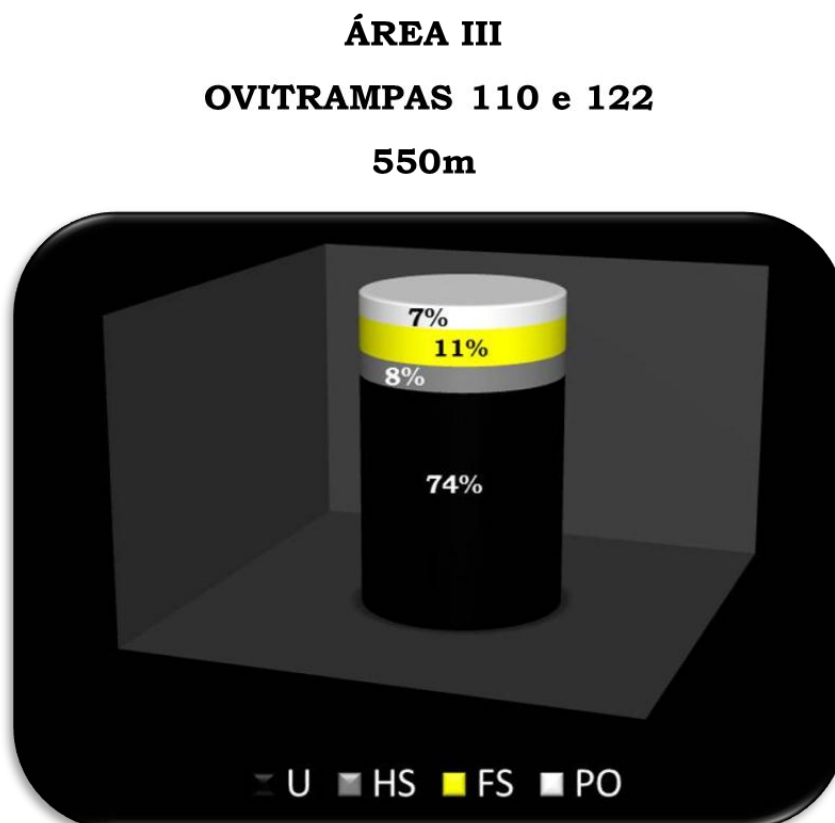


Figura 47. Análises de parentesco entre mosquitos das ovitrampas 110 e 122. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda no eixo da figura identifica os *Pedigrees* (U: não relacionados geneticamente; HS: meio irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos).

As mesmas análises de parentesco foram utilizadas para indivíduos de ovitampas provenientes da área IV. Os resultados obtidos foram os mesmos anteriormente observados para as ovitampas da área III, onde a maioria dos mosquitos de uma mesma ovitampa parecem não ser aparentados entre si.

• Ovitampa 154

Na **Figura 48-A** os valores obtidos em análises de *Pedigree* entre indivíduos da ovitampa 154, foram maiores para o *Pedigree U*-não relacionados (71%). A porcentagem de indivíduos considerados *FS-irmãos completos* foi de 16%. Durante a genotipagem dos indivíduos desta ovitampa, tivemos um excesso de *missing datas*, assim ao invés de 20, conseguimos genotipar apenas 11 mosquitos, portanto esta porcentagem de 16% de *FS*, indicam que em média, 1,7 dos indivíduos são considerados irmãos. Este resultado corrobora com o encontrado nas análises de Coeficiente *F*, onde dos 11 indivíduos analisados, em média 1 parece ter maior *inbreeding* ($F \geq 0,5$) (**Figura 48-B**). Este mosquito, dentro de nossos dados, foi chamado de indivíduo 10. Recalculando a probabilidade deste realmente ser homozigoto, encontramos o valor de 60% (**Figura 49**).

ÁREA IV – OVITRAMPAS 154

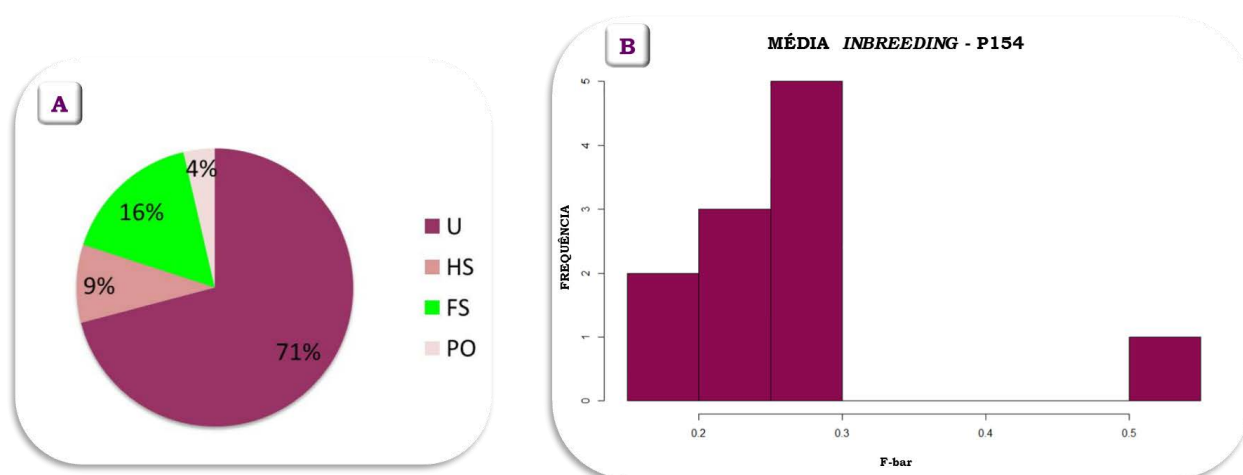


Figura 48. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitampa 154. A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*.

ÁREA IV – OVITRAMPA 154

Coeficiente F individual

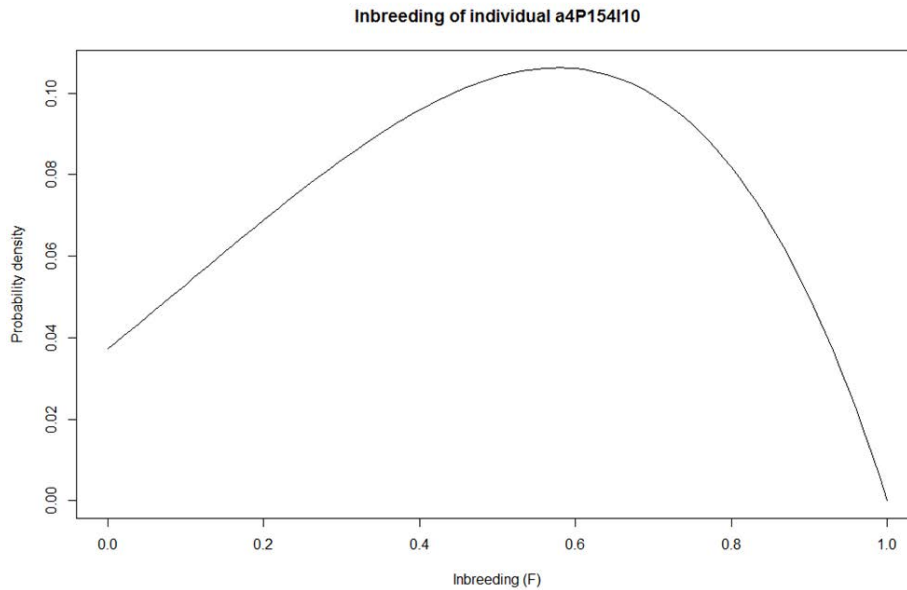


Figura 49. Probabilidade de *inbreeding* para indivíduo da ovitampa 154. O Gráfico representa o indivíduo 10, identificado pelo coeficiente *F* com maior *Inbreeding*. Probabilidades de inbreeding de 60%. Gráfico gerado em no *Software R*, pacote *adegenet*.

• Ovitampa 173

Os valores obtidos em análises de *Pedigree* entre indivíduos da ovitampa 173, foram maiores para o *Pedigree U*-não relacionados (69%) (**Figura 50-A**). A porcentagem de indivíduos considerados *FS-irmãos completos* representa a fatia laranja do gráfico, de 14%. Aqui novamente tivemos problemas para genotipagem de alguns indivíduos, assim de 30 indivíduos, passamos a considerar 19. Portanto, esta porcentagem de 14% indica que 2,6 mosquitos desta ovitampa podem ser considerados irmãos. Análises com o Coeficiente *F*, indicaram que dos 19 indivíduos analisados, em média 2 parecem ter maior *inbreeding* entre si ($\leq 0,5$) (**Figura 50-B**), são estes, indivíduos nomeados de 7 e 10. As probabilidades destes indivíduos realmente serem homozigotos e terem herdado o mesmo alelo de um ancestral comum é de 100% para ambos (**Figura 51**).

ÁREA IV – OVITRAMPA 173

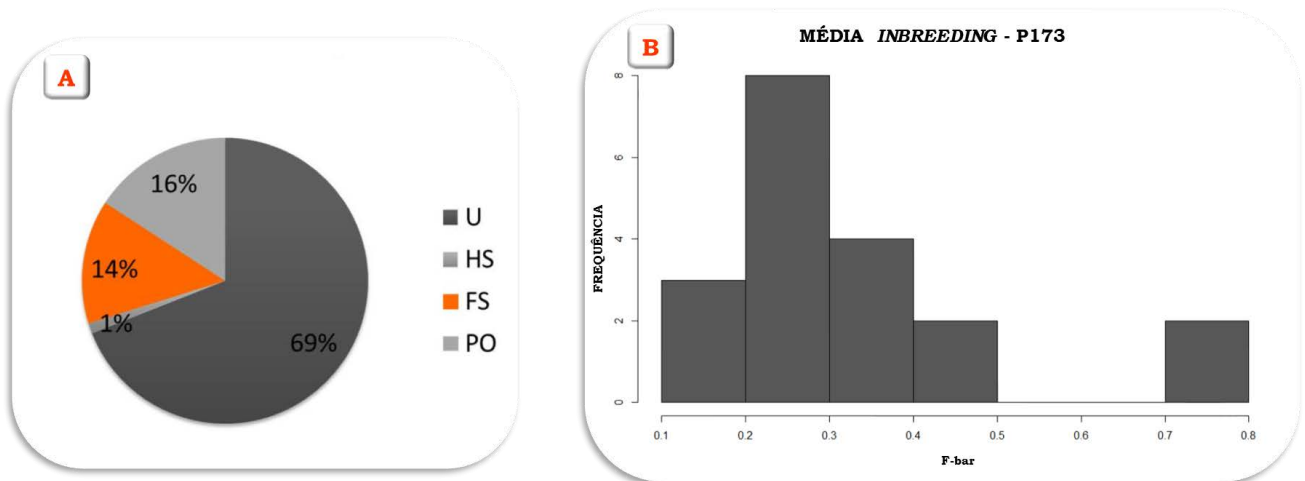


Figura 50. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitampa 173. A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*.

ÁREA IV – OVITRAMPA 173 Coeficiente F para cada indivíduo

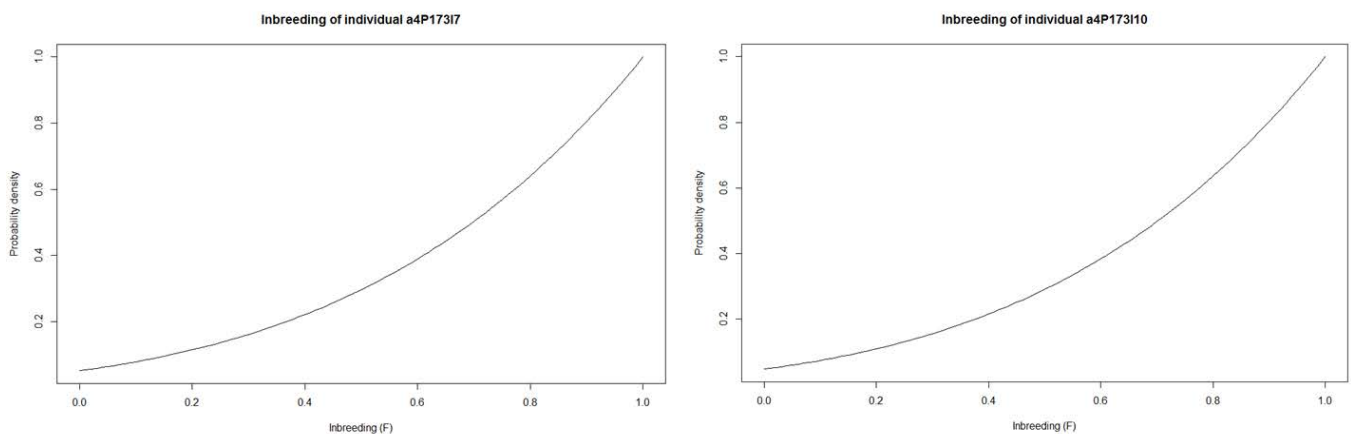


Figura 51. Probabilidade de *inbreeding* individual para indivíduos da ovitampa 173. Gráficos representam os dois indivíduos identificados pelo coeficiente F com maior *Inbreeding*. Probabilidades para ambos indivíduos de 100%. Gráficos gerados no *Software R*, pacote *adegenet*.

• Ovitampa 176

Na **Figura 52-A** os valores obtidos em análises de *Pedigree* entre indivíduos da ovitampa 176, foram novamente maiores para o *Pedigree U-não relacionados* (67%). A porcentagem de indivíduos considerados *FS-irmãos completos* foi de 16%. Esta porcentagem indica que em média 4,8 dos indivíduos desta ovitampa podem ser considerados irmãos. Diferentemente do observado nas análises de Coeficiente *F*, onde dos 30 indivíduos analisados, nenhum apresentou *inbreeding* significativo ($\leq 0,5$) (**Figura 52-B**).

ÁREA IV – OVITRAMPAS 176

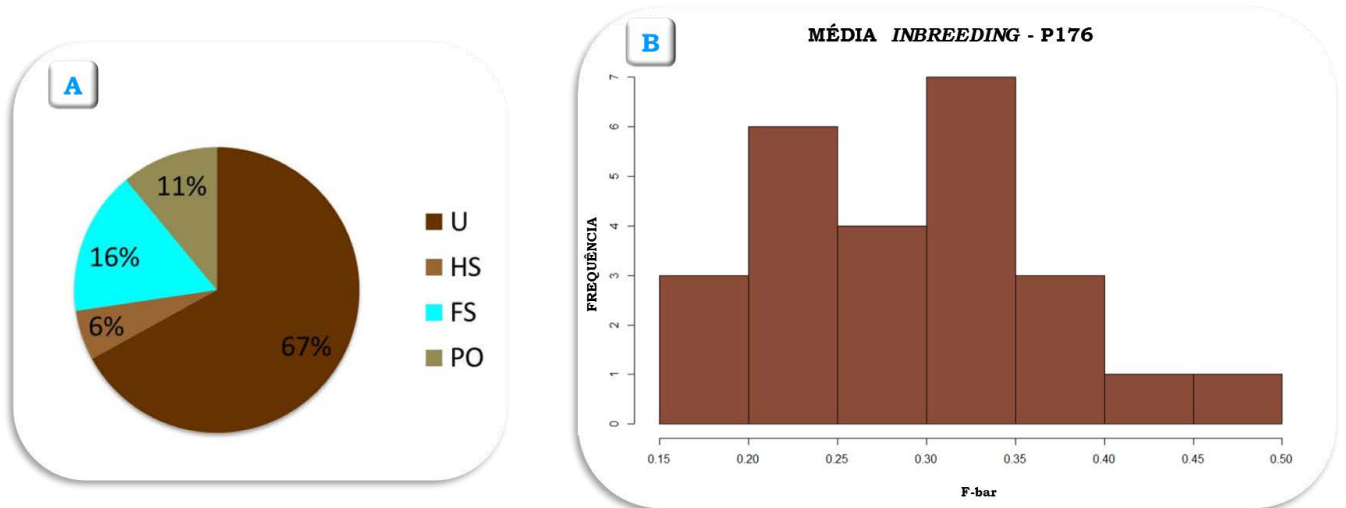


Figura 52. Análises de parentesco entre mosquitos da ovitampa 110. A. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda ao lado do gráfico indica os *Pedigrees* (U: não relacionados; HS: meio-irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos); B. Média de *Inbreeding* entre indivíduos. Eixo x: atribuição de indivíduos, valores $\geq 0,5$ são indicadores; Eixo y: frequência de indivíduos atribuídos. Gráfico gerado no *Software R*, pacote *adegenet*.

Mesmas análises de parentesco foram atribuídas entre indivíduos das ovitampas que apresentavam menor distância geográfica. Para isso, escolhemos indivíduos das ovitampas 173 e 176, que possuem 240 metros de distância espacial. Os resultados podem ser observados na **Figura 53**.

O grau de parentesco dos indivíduos foi novamente baixo quando comparamos o total de indivíduos das duas ovitrampas, (*Pedigree U*-não relacionados 70% e Coeficiente de *Inbreeding* - 7,8 indivíduos com maior inbreeding ($\leq 0,5$)). Dois indivíduos indicados para a ovitampa 173 (173-ind-7; 173-ind-10) foram também identificados aqui. Entretanto, o restante dos indivíduos indicados (5,8) parecem não pertencer a nenhuma ovitampa, assim podemos sugerir que estes realmente sejam aparentados entre si, ou então novamente os programas utilizados não foram sensíveis o suficiente para a identificação de parentesco entre mosquitos das duas ovitrampas.

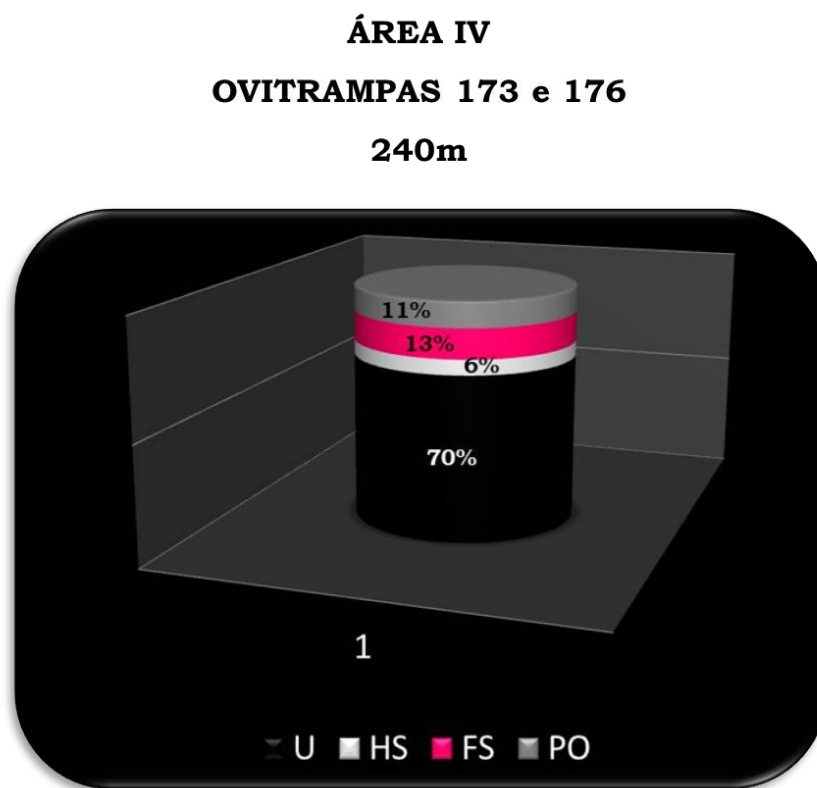


Figura 53. Análises de parentesco entre mosquitos das ovitrampas 173 e 176. Gráfico gerado com os resultados obtidos no programa ML-relate para relação familiar entre indivíduos. Legenda no eixo da figura identifica os *Pedigrees* (U: não relacionados geneticamente; HS: meio irmãos; FS: irmãos completos; PO: pais e filhos).

Tais resultados apontam para uma ampla dispersão de ovos pelas fêmeas de *Ae. aegypti*. Nossos dados sugerem que a maioria dos indivíduos de uma mesma ovitampa não

compartilham a mesma informação genética, ou seja, não possuem relações restritas de parentesco. Mesmo quando analisamos ovitampas que possuem distâncias geográficas menores (uma em relação a outra).

Dados de Diversidade Genética observados, tais como o monomorfismo para alguns *loci* e os DL e HWD, explicam nossos dados de estruturação populacional. Indivíduos muito parecidos entre si constituem um *cluster* genético mais homogêneo e diferenciado. A identificação de alguns irmãos, pelas análises de *Inbreeding* e *Pedigree*, poderiam estar também influenciando para a ocorrência destes desvios.

As análises de *Pedigree* foram esclarecedoras quando indicaram que a maior parte dos indivíduos de uma palheta não são aparentados, o que explica os excessos de heterozigotos observado para alguns *loci*. Este resultado aponta que dentro de uma palheta temos a oviposição de várias fêmeas, ocasionando esta alta diversidade entre indivíduos.

5.5. Discussão

Estudos sobre a dispersão de mosquitos vetores são importantes para compreender a dinâmica de desenvolvimento populacional e ocupação de territórios por estes (Kyle & Harris 2008). Mosquitos fêmeas se dispersam para encontrar companheiros, comida ou locais para oviposição. Esta dispersão é epidemiologicamente importante, pois por este mecanismo estas fêmeas adquirem e disseminam patógenos (Trpis & Hausermann, 1986).

A. aegypti é uma espécie nativa da África que se diferenciou e adaptou-se a ambientes urbanos ao redor do mundo (Brown et al., 2013). Preferencialmente, se desenvolvem em recipientes artificiais dentro de casas humanas, e seus ovos dessecados, podem permanecer viáveis por meses (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). A dispersão destes mosquitos foi mediada pelo homem ao longo dos trópicos, e têm sido facilitada devido as condições favoráveis para seu desenvolvimento e disponibilidade de alimento existentes no ambiente urbano/doméstico e, ocorrem em grandes proporções devido às adaptações deste vetor (Powell & Tabachnick, 2013).

Tais características associadas com a capacidade de *Ae. aegypti* transmitir o vírus da dengue, têm transformado esses mosquitos em um grande problema para a saúde pública mundial. Na América do Sul, a incidência de doença aumentou de ~16/100.000 habitantes

afetados em 1980 para ~72/100.000 habitantes afetados em 2007 (San Martin et al., 2010). No Brasil, no ano de 2010 este número excede o valor de 1 milhão de casos, e destes, 17.489 foram notificados como casos de dengue hemorrágica que levaram a 656 mortes (Dick et al., 2012).

É aceito que fêmeas de *Ae. aegypti* não voam mais que 50-100m durante toda sua vida, entretanto as informações históricas de rápidas colonizações deste mosquito em novas áreas, bem como a expansão que a dengue e outras doenças veiculadas por estes mosquitos vêm adquirindo nas últimas décadas, contradiz este fato (Hemme et al., 2010).

Até o momento vários estudos foram realizados para compreender a dispersão de mosquitos *Ae. aegypti* (Reiter, et al., 1995; Honório et al, 2003; Harrington et al., 2005; Maciel-De-Freitas et al., 2007). Estes se basearam na prévia marcação de ovos ou mosquitos adultos, que eram liberados no ambiente, e posteriormente capturados após alguns dias para estimar a capacidade de voo e consequente dispersão de *Ae. aegypti*. Em nosso trabalho propomos estudar geneticamente o comportamento de oviposição de fêmeas desta espécie a fim de responder como ocorre a dispersão de mosquitos *Ae. aegypti*. Para tanto, selecionamos 6 ovitrampas positivas para ovos de *Ae. aegypti* e que possuíam menores distâncias geográficas, quando distribuídas em duas diferentes áreas do município de Botucatu. Utilizamos 8 marcadores microssatélites para genotipar mosquitos de uma mesma ovitrampa, pretendendo com esta abordagem, investigar como ocorre a organização populacional e qual é a relação familiar destes mosquitos.

Os valores de *Fst* obtidos entre mosquitos das áreas III e IV indicaram nível de diferenciação moderado entre mosquitos destas duas áreas. Resultados de análises de diversidade genética apontaram excesso de homozigotos e DL. Porém, estes desvios ficam evidenciados quando consideramos cada ovitrampa nas análises. Os significantes DL indicados nos cálculos de índices de associação sugeriram ligação entre *loci*, entretanto acreditamos que estes desvios possam estar relacionados com os excessos de homozigotos encontrados anteriormente para alguns *loci*.

O excesso de heterozigosidade observado para outros *loci*, por outro lado, indicaram que alguns indivíduos de mesma palheta são consistentemente diferentes entre si. Este resultado possivelmente está relacionado com eventos de diferentes oviposições, por diferentes fêmeas de *Ae. aegypti* nestas ovitrampas. Isto foi também confirmado pelas análises de *Pedigree*, que apontaram a maior parte dos indivíduos de mesma ovitrampa como não relacionados geneticamente.

Nas análises de verossimilhança, relação de parentesco não foi identificada entre indivíduos da mesma palheta, isso aponta novamente para indícios de ampla dispersão de ovos por fêmeas de *Ae. aegypti*, sugeridos anteriormente. De 11 mosquitos genotipados de uma mesma ovitrampa (ovitrampa 154 com menor número de indivíduos genotipados), nenhum mosquito parece compartilhar informações genéticas. O maior valor de irmãos completos foi apontado para indivíduos das ovitrapas 110 e 117, sendo apenas quatro mosquitos em cada ovitrampa, considerando que genotipamos 30 indivíduos de cada uma destas palhetas, este número pode ser considerado baixo. Levando em consideração que cada fêmea pode colocar de 100 a 200 ovos por oviposição (Honório, 1999), o número de mosquitos irmãos, encontrado em nossos dados, é relativamente baixo para indivíduos de mesma ovitrampa que não possuem níveis próximos de parentesco.

Entre indivíduos de ovitrapas próximas (550 metros entre ovitrapas 110 e 122; e 240 metros para ovitrapas 173 e 176), identificamos baixo grau de relação familiar e estruturação populacional entre estes, isto pode ser em decorrência da existência de outros criadouros naturais ou artificiais disponíveis para oviposição, ou a distância adotada por nós ser maior que a capacidade de vôo destas fêmeas.

Os resultados obtidos em análises de estruturação populacional sugeriram agrupamento genético entre indivíduos de cada ovitrampa. Provavelmente fêmeas de *Ae. aegypti* não voam longas distâncias para acasalarem, e por isso acabam constituindo famílias dentro de uma delimitada área espacial. Tal possibilidade já foi anteriormente sugerida em outros estudos (Trpis & Hausermann 1986, Service, 1997), onde fêmeas de mosquitos voam apenas até encontrarem lugares que supram suas emergências para alimentação, acasalamento e oviposição. Isto poderia explicar nossos dados de mosquitos de cada ovitrampa estarem agrupados entre si e significativamente separados em *clusters* que representam cada uma das três palhetas, oriundas de uma grande área.

Nossos resultados levantam hipóteses que devem ser consideradas quando medidas para controle do vetor forem aplicadas. Se fêmeas de *Ae. aegypti* ovipõem em diferentes criadouros ao longo de sua vida fértil, ou ainda constituem grupos, onde os indivíduos são geneticamente parecidos, a inspeção de criadouros artificiais e naturais, que em geral são realizados pelas Secretarias de Saúde municipais, devem seguir um maior espectro de atuação e o pessoal melhor capacitado para identificação destes criadouros.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

Neste estudo:

- ✈ Mosquitos *Ae. aegypti* de diferentes localidades puderam ser agrupados segundo sua similaridade genética, apresentando portanto, diferenças genéticas quando consideramos diferentes regiões;
- ✈ Estruturação populacional foi sugerida para mosquitos do município de Belo Horizonte, que se deve, provavelmente, devido à organização populacional de mosquitos *Ae. aegypti* ocorrer em sub-populações nesta localidade;
- ✈ Correlação entre tamanho da cidade e estruturação populacional de mosquitos *Ae. aegypti* foi sugerida. Cidades maiores, em território espacial, parecem favorecer a estruturação populacional destes vetores;
- ✈ Fêmeas de *Ae. aegypti* dispersam seus ovos em diferentes criadouros, de 30 indivíduos avaliados de uma mesma ovitrampa, apenas 4 foram apontados como irmãos completos;
- ✈ Cada criadouro atua como uma família de *Ae. aegypti*. Apesar de não manter relações restritas de parentesco, indivíduos de mesma ovitrampa podem ser agrupados segundo sua similaridade genética. Isto indica que fêmeas de *Ae. aegypti* não voam longas distâncias para acasalar, procurar alimento ou realizar oviposições, e sim se dispersam apenas até encontrarem as condições favoráveis para realizar estas atividades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPOW, P.M.; BURT, A. (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Notes**. (1): 101-102.

ANDERSON C.; DOWNS W. (1956). Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. **Science**. (124): 224–225.

ANGELLA A.F.; PATRÍCIA SALGUEIRO, P.; GIL, L.H; VICENTE,J.L.; PINTO, J.; RIBOLLA, P.E.M. (2014). Seasonal genetic partitioning in the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi*. **Malaria Journal**. (13):203.

AVISE, J.C. (1994). **Molecular Markers, Natural History and Evolution** (Chapman and Hall, New York).

BANCROFT, T.L. (1906). On the etiology of dengue fever. **Aus. Med. Gaz.**, 25:17-18.

BARATA, E.A.M. de F.; COSTA, A.I.P; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; GLASSER, C.M.; BARATA, J.M.S.; NATAL, D. (2001). População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**. 3: 237-2.

BELINATO, T.A.; MARTINS. A.J.; LIMA, J.B.P.; VALLE, D. (2013). Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions. **Parasites & Vectors**. (6):83.

BISSET, J.A.; MARÍN R.; RODRÍGUEZ, M.M.; SEVERSON, D.W.; RICARDO, Y.; FRENCH, L.; DÍAZ, M.; PÉREZ, O. (2013). Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. **J. Med. Entomol**. 2:352-61.

BROOKES, A.J. (1999). The essence of SNPs. **Gene**. (234): 177-186.

BROWN, J.E. et al. (2011). Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. **Proc. R. Soc. B**. (1):1-9

BROWN, J.E.; OBAS, V.; MORLEY, V.; POWELL, J.R. (2013a). Phylogeography and Spatio-Temporal Genetic Variation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations in the Florida Keys. **J. Med. Entomol**. (2): 294–299.

BROWN, J.E.; EVANS, B.; ZHENG, W.; ABAS, V.; BARRERA-MARTINEZ, L.; EGIZI, A.; ZHAO, H.; CACCONE, A.; POWELL, J.R. (2013b). Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**. (2): 514–525.

BRUFORD, M.W.; WAYNE, R.K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. **Curr Opin Genet Dev**. (3): 939-943.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. (2003). **Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais**. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. n:30.

BRUVO, R.; MICHIELS, N.K.; D’SOUZA, T.G.; SCHULENBURG, H. (2004). A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. **Molecular Ecology**. (13): 2101–2106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x

CALISHER, C.H. (1986). Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Diseases: WHO Technical Report Series n° 719. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**(1):216-217.

CAMPOS, M.; SPENASSATTO, C.; MAÇORIS, M.L.G.; PADUAN, K.S.; PINTO, J.; RIBOLLA, P.E.M. (2012). Seasonal population dynamics and the genetic structure of the mosquito vector *Aedes aegypti* in São Paulo, Brazil. **Ecology and Evolution**. (11): 2794–2802.

CARPENTER, S.J.; LACASSE, W.J. (1955). **Mosquitoes of North America (North of Mexico)**. University of California Press, Berkeley - CA. 360p.

CASSETTI, M.C.; SCOTT B. HALSTEAD, S.B. (2014). Conference report Consultation on dengue vaccines: Progress in understanding protection, 26–28 June 2013, Rockville, Maryland. **Conference report / Vaccine**. (32): 3115–3121.

CHARREL, R.N.; LAMBALLERIE, X. DE; RAOULT, D. (2007). Chikungunya Outbreaks-The Globalization of vector-borne diseases. **N. England J. Med.** (356): 769-771.

CHISTIYAKOV, D.A.; BART HELLEMANS, B.; FILIP A.M. VOLCKAERT, F.A.M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**. (255):1–29.

CHRISTOPHERS, S.R.(1960). ***Aedes aegypti: The yellow fever mosquito***. Cambridge, England: Cambridge University Press.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. (1994). **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Fiocruz. Rio de Janeiro – RJ. 225p.

COSTA-RIBEIRO, M.C.V.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; ANNA-BELLA FAILLOUX, A.B. (2006). Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. (8): 917-921.

CUTWA-FRANCIS, M.M.; O'MEARA, G.F. (2007). An Identification Guide to the Common Mosquitoes of Florida. **Florida Medical Entomology Laboratory**. Disponível em: <http://fmel.ifas.ufl.edu/Key/index.htm>. Acesso em: 04/2011.

DAMAL, K. et al. (2013). Phylogeography of *Aedes aegypti* (Yellow Fever Mosquito) in South Florida: mtDNA Evidence for Human-Aided Dispersal. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** (3):482–488 doi:10.4269/ajtmh.13-0102

DE MEEÛS, T.; MCCOY, K.D.; PRUGNOLLE, F.; CHEVILLON, C.; DURAND, P.; HURTREZ-BOUSSÈS, S.; RENAUD, F. (2007). Population genetics and molecular epidemiology or how to “débûser la bête”. **Infection, Genetics and Evolution**. (7):308-32.

DICK, O. et al. (2012). Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** (4):584–593.

DRAY, S.; DUFOUR, A-B. (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. **Journal of Statistical Software**. (22): 1-20.

EARL, D.A.; VON HOLDT, B.M. (2011). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**. (4):359–361.

EDELMAN, R.; HOMBACH, J. (2008). Conference report —Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas”: Summary of a World Health Organization Technical Consultation. **Conference report/Vaccine**. (26):4113–4119.

EHRENKRANZ, N.J.; VENTURA, A.K.; CUADRADO, R.R.; POND, W.L.; PORTER, J.E. (1971). Pandemic dengue in Caribbean countries and the southern United States—past, present and potential problems. **N. Engl. J. Med.** (285): 1460–1469.

EXCOFFIER L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among dNA haplotypes: application to human mitochondrial dNA restriction data. **Genetics**. (131):479–491. Disponível em: <http://www.genetics.org/content/131/2/479.abstract>

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinf. Online**. (1):47-50.

FAILLOUX, A-B.; VAZEILLE, M.; RODHAIN, F. (2002). Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. **J. Mol. Evol.** (55):653-63.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. (1996). **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Essex: Longman. 464p.

FAY, R.W., ELIASON, D.A. (1966). A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosqu. News**. (26):531–535.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. (1998). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. p.220.

FONSECA-GONZALEZ, I.; QUINONES, M.L.; LENHART, A.; BROGDON, W.G. (2010). **Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia**.

FORATTINI, O.P. (1965). **Entomologia médica**. 2ed. Sao Paulo, Editora da Universidade de São Paulo. 506p.

FORATTINI, O.P. (2002). **Culicidologia Médica vol.2: Identificação, Biologia, Epidemiologia**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ (2008). **Conheça os hábitos do mosquito da dengue**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=571&sid=32>. Acesso em: 04/2011.

GADELHA, D.P.; TODA, A.T. (1985). Biologia e comportamento de *Aedes aegypti*. **Brasil Mal. D. Trop.** 36p.

GARCIA-REJON, J.; LORONO-PINO, M.A.; FARFAN-ALE, J.A.; FLORES-FLORES, L.; DEL PILAR ROSADO-PAREDES, D.P.E.; RIVERO-CARDENAS, N. et al. (2008). Dengue virus-infected *Aedes aegypti* in the home environment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** (79): 940–50.

GLORIA-SORIA, A.; BROWN, J.E.; KRAMER, V.; HARDSTONE, Y.M.; POWELL, J.R. (2014). Origin of the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*, in California. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** (7): 3029.

GOLDSTEIN, D.B.; ROEMER, G.W.; SMITH, D.A.; REICH, D.E.; BERGMAN, A.; WAYNE, R.K. (1999). The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. **Genetics**. (2): 797-801.

GONÇALVES, C.M. (2010). **O Estudo da Competência Vetorial das Populações de *Aedes aegypti* da Cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao Dengue vírus 2**. Dissertação de Mestrado em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular. Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou.

GOUDET, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-Statistics. **The Journal of Heredity**. (6):485-86.

GOULD, E.A.; SOLOMON T. (2008). Pathogenic flaviviruses. **Lancet**. (371): 500–509.

GRUNWALD, N.J.; GOODWIN, S.B.; MILGROOM, M.G.; FRY, W.E. (2003) Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. **Phytopathology** (93): 738-46.

GUBLER DJ. Dengue. (1988) In: Monath TP. **The arboviruses epidemiology and ecology**. Boca Raton, Florida: CRC Press,p. 223-60.

GUBLER, D.J. (1998). Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerg. Infect. Dis.** (3):442-450.

GUBLER, D.J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol.** (2):100-103.

GUEDES, D. R. et al. (2010). Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. **Journal of vector borne diseases**. (2):67-75.

GUNTHER, J. et al. (2007). Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. **Intervirology**. (5): 347-352.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**. (48):361–372.

HALSTEAD, S.B. (1992). The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **World Health Stat. Q.** (45):292-298.

HAMADA, S.R. et al. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. (79): 6465-6469

HANCOCK, J.M. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. **Evolution and Applications**. Oxford University Press, Oxford. 1–9p.

HARRINGTON, L.C. (2005). Dispersal of the Dengue Vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** (2): 209–220

HARRY, M. Et al. (2008). Microsatellite markers in *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), Chagas' disease vector in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**. (8): 672–675.

HAUBOLD B.; TRAVISANO, M.; RAINEY, P.B.; HUDSON, R.R. (1998) Detecting linkage disequilibrium in bacterial populations. **Genetics**. (150): 1341–1348.

HEMME, R.R.; THOMAS, C.L.; CHADEE, D.D.; SEVERSON, D.W. (2010) Influence of Urban Landscapes on Population Dynamics in a Short-Distance Migrant Mosquito: Evidence for the Dengue Vector *Aedes aegypti*. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** (3):634.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. (1990). **Clin. Microbiol. Rev.** 376-396p.

HIGGS, S.; BEATY, B. J. (2005). **Natural cycles of vector-borne pathogens**. In: MARQUARDT, W. C. (Ed.). *Biology of disease vectors*. Waltham: Elsevier Academic. 167-185p.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (1996). **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Sunderland.

HLAING, T. et al. (2010). Spatial genetic structure of *Aedes aegypti* mosquitoes in mainland Southeast Asia. **Evolutionary Applications**. (3): 319–339. doi:10.1111/j.1752-4571.2009.00113.x

HODKINSON, I. D. (2005). Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. **Biological Reviews**. (80): 489-513.

HOLM, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**. (2):65-70.

HOLMES, E. C.; BARTLEY, L. M.; GARNETT, G. P. (1998). The Emergence of Dengue: Past Present and Future. **Biom. Res. Rep.** 301-325p.

HONÓRIO, N.A. (1999). **Estudos de aspectos da biologia do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1984), em area endêmica de dengue, no estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

HONÓRIO, N.A. et al (2003). Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. (2): 191-198.

HOTELLING, H. (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **The Journal of Educational Psychology**. (24):417-441.

HOTTA S.; KIMURA, R. (1952). Experimental studies on dengue I. Isolation, identification and modification of the virus. **J. Infect. Dis.** (90): 1–9.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 09/2014.

IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. (1996). "R: A Language for Data Analysis and Graphics". **Journal of Computational and Graphical Statistics**. (3): 299–314. doi:10.2307/1390807. JSTOR 1390807. [edit](#)

INSTITUTO OSWALDO CRUZ/FIOCRUZ - (IOC/FIOCRUZ). (2014). **Pesquisa alerta para risco da febre do chikungunya se espalhar nas Américas**. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/pesquisa-do-ioc-e-instituto-pasteur-alerta-para-risco-de-epidemia-de-chikungunya-no-brasil>. Acesso em: 08/2014.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A. (2007). CLUMPP: a *cluster* matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**. (23):1801–1806.

JOMBART, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics** (24): 1403-1405. doi:10.1093/bioinformatics/btn129

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**. (11):94. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/11/94>

JUNIOR, J.A.; MENDONÇA, F. (2012). The Dengue's Fever in Maringá-Pr: Social-Environmental Approach from the Epidemic of 2007. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**. (15):157-176.

KALINOWSKI, S.T.; WAGNER, A.P.; TAPER, M.L. (2006). *ML-Relate*: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes**. (2):576-579.

KAMVAR, Z.N.; TABIMA, J.F.; GRÜNWARD, N.J. (2014) Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ** (2):281 <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.281>

KNIGHT, K.L.; STONE, A. (1977). **A Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae)**. Baltimore - MD: The Thomas Say Foundation.

KYLE, J.L.; HARRIS, E. (2008). Global spread and persistence of dengue. **Annu. Ver. Microbiol.** (62): 71–92.

LIMA-JÚNIOR, R.S.; SCARPASSA, V.M. (2009). Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA-ND4 gene sequences. **Genetics and Molecular Biology**. (2):414-422.

LIMA et al. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & Vectors**. (4):5

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. (2002). **Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP)**. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento* . n 29. 56p.

LORENZ, E.; FREES, K.L.; SCHWARTZ, D.A. (2001). M13-Tailed Primers Improve the Readability and Usability of Microsatellite Analyses Performed with Two Different Allele-Sizing Methodos. **BioTechniques**. (1): 31.

LOVIN, D.; WASHINGTON, K.; DEBRUYN, B.; HEMME, R.; MORI, A.; EPSTEIN, S.; HARKER, B.; STREIT, T.; SEVERSON, D. (2009). Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. **Genomics** (10): 590.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; CODEÇO, C.D.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. (2007). Daily Survival Rates And Dispersal Of *Aedes aegypti* Females In Rio de Janeiro, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** (4): 659–665.

MACIEL-DE-FREITAS R. et al. (2014) Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. **PLoS ONE** (3): e92424. doi:10.1371/journal.pone.0092424.

MAINGON, R.D.C. et al. (2003). Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará State, Brazil. **Molecular Ecology**. (12): 1879–1894.

MARCOMBE, S. et al. (2012). Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. **PLoS ONE**. (2): e30989. doi:10.1371/journal.pone.0030989.

MARIANO, F. (1916). A dengue. Considerações a respeito de sua incursão no Rio Grande do Sul, em 1916. **Arch. Bras. Med.** (8): 271–277.

MATTINGLY, P.F. (1957). Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem: I - Taxonomy and bionomics. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** (51): 392-408.

MCMENIMAN, C. J. et al. (2009). Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science** (323):141–144.

MENDONÇA, B.A.A., et al. (2014). Temporal genetic structure of major dengue vector *Aedes aegypti* from Manaus, Amazonas. **Brazil. Acta Trop.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.014>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (1992). Séries históricas de agravos e doenças transmissíveis. **Inf. Epidemiol. SUS.** 25p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2014). **Portal da Saúde.** Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/435-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/dengue/11-dengue/10708-dengue-texto-indrodutorio>. Acesso em: 08/2014.

MITCHELL, C.J. (1995). Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in Mediterranean Basin. **J. Vector Ecol.** (1):44-58

MONTEIRO, F.A. et al. (2014). Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. **PLoS Negl. Trop. Dis.** (9): e3167. doi:10.1371/journal.pntd.0003167.

MOREIRA, L. et al. (2009). A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell.** (139): 1268–1278.

MORENO M.; SALGUEIRO, P.; VICENTE, J.L.; CANO, J.; BERZOSA, P.J.; LUCIO, A.; SIMARD, F.; CACCONE, A.; ROSARIO, V.E.; PINTO, J.; BENITO, A. (2007). Genetic population structure of *Anopheles gambiae* in Equatorial Guinea. **Malaria Journal.** (6):137.

MORENS, D.M.; FAUCI, A.S. (2008). Dengue and hemorrhagic fever: a potential threat to public health in the United States. **JAMA.** (2):214–6.

NEI, M. (1987). **Molecular evolutionary genetics.** New York, USA: Columbia University Press.

NELSON M.J. (1986). *Aedes aegypti*: Biology and Ecology. **Pan American Health Organization.** Washington, D.C.

NOGUEIRA, L.A. ; GUSHI, L.T. ; MIRANDA, J.E.; MADEIRA, N.G.; RIBOLLA, P.E.M. (2005). Application of an alternative *Aedes* species (DIPTERA : CULICIDAE) surveillance method in Botucatu city, Sao Paulo, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** (2):309-311.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology.** (2):294-307.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Infestação de Dengue nas Américas (2013).** Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3168:dados-dengue-nas-americas-2013&Itemid=777. Acesso em: 09/2014.

PADUAN, K.S. et al. (2006). Genetic and variability in geographical populations of *Aedes aegypti* in Brazil elucidated by molecular markers. **Genet. Mol. Biol.** (2):391-395.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, (1947). Direct Council of the Pan American Health Organization. Resolution CD1.R1. **Continental *Aedes aegypti* eradication**. Disponível em: http://www.paho.org/English/GOV/CD/ftcd_1.htm#R1. Acesso em: 08/2011.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. (1997). The feasibility of eradicating *Aedes aegypti* in the Americas. **Rev. Panam. Salud. Publica.** (1): 381–388.

PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. (2006). **Number of reported cases of dengue & dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion)**.

PEDRO, A. (1923) The dengue Nichteroy. **Brazil Médico** (37): 173–177.

PESSANHA, J. E. et al. (2011). Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** (1):103-105.

PORTAL BRASIL. Governo do Brasil. (2014). **Brasil tem 340 municípios em situação de risco para dengue**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/03/brasil-tem-340-municipios-em-situacao-de-risco-para-dengue>. Acesso em: 03/2015.

POWEL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant. Sci.** (1): 215–222.

POWELL, J.R.; TABACHNICK, W.J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** (108): 11-17.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE - MG. (2014). <http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh/>. Acesso em: 09/2014.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE BELO HORIZONTE – MG (2015). **Campanha: Um tempo contra a Dengue/ Balanço da Dengue**. Disponível em: http://www.pbh.gov.br/smsa/dengue/balanco_dengue.php. Acesso em: 24/03/2015.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE BOTUCATU – SP. (2014a). <http://www.botucatu.sp.gov.br/>. Acesso em: 09/2014.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE BOTUCATU (2014b). **Infestação do mosquito da dengue é baixa, mas VAS alerta sobre potenciais criadouros**. Notícias/Saúde Ambiental. Disponível em: <http://www.botucatu.sp.gov.br/noticias>. Acesso em: 25/03/2015.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE BOTUCATU (2015). **Dengue: 53 casos confirmados em Botucatu**. Notícias/Saúde Ambiental. Disponível em: <http://www.botucatu.sp.gov.br/noticias>. Acesso em: 25/03/2015.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE CAMPO GRANDE. (2012). **INFORME DA DENGUE – Campo Grande, 2012 Informe técnico nº 06**. Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande/Diretoria de Vigilância em Saúde/Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: http://www.pmcg.ms.gov.br/sesau/canais/Texto?id_can=3414. Acesso em: 24/03/2015.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE CAMPO GRANDE – MS. (2014a). <http://www.pmcg.ms.gov.br/>. Acesso em: 09/2014.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE CAMPO GRANDE – MS. (2014b). **Prefeitura planeja ações de prevenção da dengue para o verão 2015.** Disponível em: http://www.prefeituradecampogrande.com.br/cgnoticias/noticiaCompleta?id_not=25418. Acesso em: 24/03/2015.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE CAMPO GRANDE – MS. (2015). **Saúde monta força-tarefa para atuar no combate à dengue nas Moreninhas.** Disponível em: http://www.pmcg.ms.gov.br/cgnoticias/noticiaCompleta?id_not=27576. Acesso em: 24/03/2015.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE MARINGÁ – PR. (2014). <http://www2.maringa.pr.gov.br/site/>. Acesso em 09/2014.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE MARINGÁ. (2015a). **Portal da Saúde/Vigilância Ambiental.** Disponível em: <http://www2.maringa.pr.gov.br/saude/?cod=vigilancia-ambiental-sobre>. Acesso em: 27/03/2015.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE MARINGÁ. (2015b). **Casos de dengue registrados pela Secretaria de Saúde até esta sexta-feira, 20 de março.** Disponível em: <http://www2.maringa.pr.gov.br/site/index.php?sessao=575eb7a8ad5557&id=25603>. Acesso em: 27/03/2015.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE RONDONÓPOLIS – MT. (2014). **Portal de Mato Grosso.** <http://www.mtseusmunicipios.com.br/NG/>. Acesso em 09/2014.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE RONDONÓPOLIS – MT. (2015a). **Casos de dengue caem aproximadamente 94% em 2014.** Disponível em: <http://www.rondonopolis.mt.gov.br/?pg=noticia&intNotID=40889>. Acesso em: 08/03/2015.

PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE RONDONÓPOLIS – MT. (2015b). **Equipe intensifica combate à dengue e consegue reduzir incidência da doença.** Disponível em: <http://www.rondonopolis.mt.gov.br/index.php?pg=noticia&intNotID=41134>. Acesso em: 08/03/2015.

PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. (2000). Inference of population using multilocus genotype data. **Genetics.** (155):945-59.

PUBLIC HEALTH. (1941). Prevalence of disease: United States: reports from state for week ended November 29, 1941. **Public Health Reports.** (56):2350–2361.

RAYMOND, M., ROUSSET, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. **Journal of Heredity.** (86):248-49.

REITER P.; AMADOR, M.A.; ANDERSON R.A.; CLARK, G.G. (1995). Short report: Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. **Am J Trop Med Hyg** (52): 177-179.

ROSE, R.I. (2001). Pesticides and public health integrated methods of mosquito management. **Emerg. Inf. Dis.** (7):17–23.

RUDNICK, A. (1986). Dengue fever epidemiology in Malaysia 1901–1980. In: RUDNICK, A.; LIM, T.W. (Eds). **Dengue Fever Studies in Malaysia, Bulletin.** Kuala Lumpur: Institute of Medical Research. 9-38p.

SAIKI, R.K. et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. (239): 487-491, 1988.

SAN MARTÍN, J.L. et al. (2010). The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** (1): 128–135.

SCHLÖTTERER, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**. (109): 365–371.

SCHLÖTTERER, C. (2004). The evolution of molecular markers — just a matter of fashion?. **Nature Reviews: Genetics**. (5): 63.

SCHNEIDER, J.D. (2001). A Time Line for Dengue in the Americas to December 31, 2000 and Noted First Occurrences. **Washington, DC: Pan American Health Organization**. Disponível em: www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue_finaltime.doc. Acesso em: 04/2011.

SCHUELKE, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. **Nature Biotechnology**. (18). <http://biotech.nature.com>

SECRETARIA DE SAÚDE DE MARINGÁ (2015). **Diretoria de Vigilância em Saúde Programa Municipal de Controle da Dengue. 1º Lira de 2015**. Disponível em: <http://www2.maringa.pr.gov.br/sistema/arquivos/d2e17c8c522d.pdf>. Acesso em: 27/03/2015.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. (2015). Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até a Semana Epidemiológica 9, 2015. **Ministério da Saúde**. v: 46, n:8.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL (2015). **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO Nº 09 DENGUE – SEMANA 10, MATO GROSSO DO SUL / 2015**. Disponível em: http://www.saude.ms.gov.br/index.php?templat=vis&site=116&id_comp=544&id_reg=291135&voltar=home&site_reg=116&id_comp_orig=544. Acesso em: 25/03/2015.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE – BELO HORIZONTE (2015). Campanha: Um tempo contra a Dengue/SMSA divulga resultado do LIRAA de janeiro/15. Disponível em: <http://www.pbh.gov.br/smsa/dengue/pag.php?p=2>. Acesso em 24/03/2015.

SERVICE, M.W. (1997). Mosquito (Diptera: Culicidae) Dispersal – The long and short of it. **J Med Entomol** .(34): 579-588.

SEVERO, O.P. (1955). **Eradication of the *Aedes aegypti* Mosquito from the Americas**. Disponível em:http://jdc.jefferson.edu/yellow_fever_symposium/6. Acesso em: 08/2011.

SHANNON C. 2001. A mathematical theory of communication. **ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review**. (5):3–55. Disponível em: <http://cm.bell-labs.com/cm/ms/what/shannonday/shannon1948.pdf>

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. (2007). Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **J Pediatr**. (83):22-35.

SLOTMAN, M.A.; KELLY, N.B.; HARRINGTON, L.C.; KITTHAWEE, S.; JONES, J.W.; SCOTT, T.W.; CACCONE, A.; POWELL, J.R. (2007). Polymorphic microsatellite markers for

studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. **Mol. Ecol. Not.** (7):168–171.

STAPLES, J.E.; BREIMAN, R.F.; POWERS, A.M. (2009). Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. **Clin. Infect. Dis.** (49):942–948. <http://dx.doi.org/10.1086/605496>.

STODDART J., TAYLOR J. (1988). Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. **Genetics** (118):705–711. Disponível em: <http://www.genetics.org/content/118/4/705>

TABACHNICK, W.J.; POWELL, J.R. (1979). A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Genet. Res.** (3):215-229.

TABACHNICK, W.J. (1991). Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. **American Entomologist.** (37): 14-26.

TABACHNICK, W.J.; CONNELLY C.R.; CHELSEA T. SMARTT. (2006). **Blood Feeding Insect Series: Yellow Fever.** Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu>. Acesso em: 08/2013.

TAUTZ, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucl. Acids. Res.** (17): 6463-71.

TEIXEIRA, M.G. et al. (1999). Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS.** (8):5-33.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. (2009). Diagnosis and management of dengue. **B MJ.** (339):4338.

TRPIS M.; HAUSERMANN W. (1986). Dispersal and other population parameters of *Aedes aegypti* in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne disease. **Am J Trop Med Hyg** (35): 1263-1279.

VEGA-RÚA, A.; ZOUACHE, K.; GIROD, R.; FAILLOUX, A-B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. (2014). High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of *Chikungunya* Virus. **Journal of Virology.** (88): 6294–6306

VIRGINIA DEPARTMENT OF HEALTH - VDH (2014). **Vector-borne Disease Control.** Disponível em: <http://www.vdh.state.va.us/epidemiology/dee/vectorborne/>. Acesso em: 08/2014.

WALKER, T. et al. (2011). The *wMel* *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature.** Vol: 476.

WEIR, B.S.; COCKERHAM C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution.** (38):1358-1370.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control.** 2nd ed. Geneva: WHO; 1997. 84p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014a). **Yellow Fever.** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>. Acesso em: 08/2014.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014b). **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em:08/2014.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014c). **Dengue Control**. Disponível em: http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/en/. Acesso em:08/2014.

WICKHAM, H. (2009). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. **Springer New York**.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** (18): 6531–6535.

WINTER, D.J. (2012). *MMOD: an R library for the calculation of population differentiation statistics*. **Mol. Ecol. Resour.** (6):1158-60. doi: 10.1111/j.1755-0998.2012.03174.x.

WRIGHT, S. (1922). Coefficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist**. (56):330-338.

YERGOLKAR, P.N. et al. (2006). Chikungunya outbreaks caused by african genotype. **Emerging Infectious Diseases**. (10): 1580-1583.

ZHANG, D.P.; HEWITT, G.M. (2003). Molecular DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Mol. Ecol.** (3):563-584.

ANEXOS

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Páginas 165-169:

Figura 54. Atribuição de *Membership*. *Heat colors* representam probabilidades de adesão (vermelho = 1, branco = 0); cruzeiros azuis representam o *cluster* original. Eixo x: populações em estudo; Eixo y: indivíduos de Belo Horizonte. Figuras geradas pelo *Software R*, pacote *adegenet*.

Figuras: A. *membership* para a população de BH;

B. *membership* para a população de BTU;

C. *membership* para a população de CG;

D. *membership* para a população de MAR;

E. *membership* para a população de RON.

Anexo 2. Páginas 170-172:

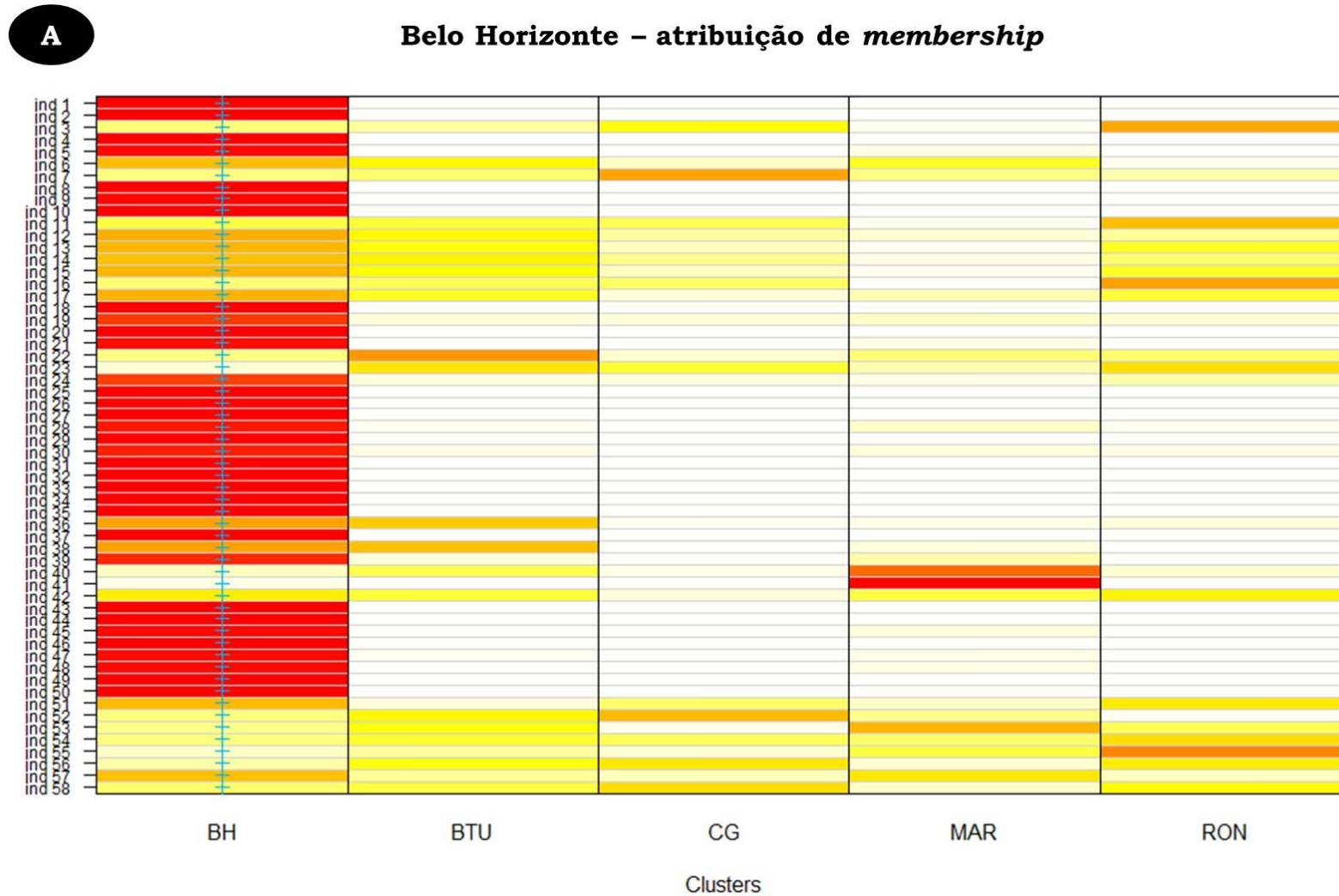
Figura 55. Dendrograma de Distância Genética de Bruvo's. Árvore de distância genética calculada pela estatística de Bruvo's após clusterização dos dados com BIC (baseado em *K-means*), *bootstrap* de 1.000. Dendrogramas gerados pelo *Software R*, pacote *poppr*.

Figuras A: Distância genética entre os indivíduos das 4 sub-regiões de BTU;

B. Distância genética entre indivíduos das 6 sub-regiões de BH;

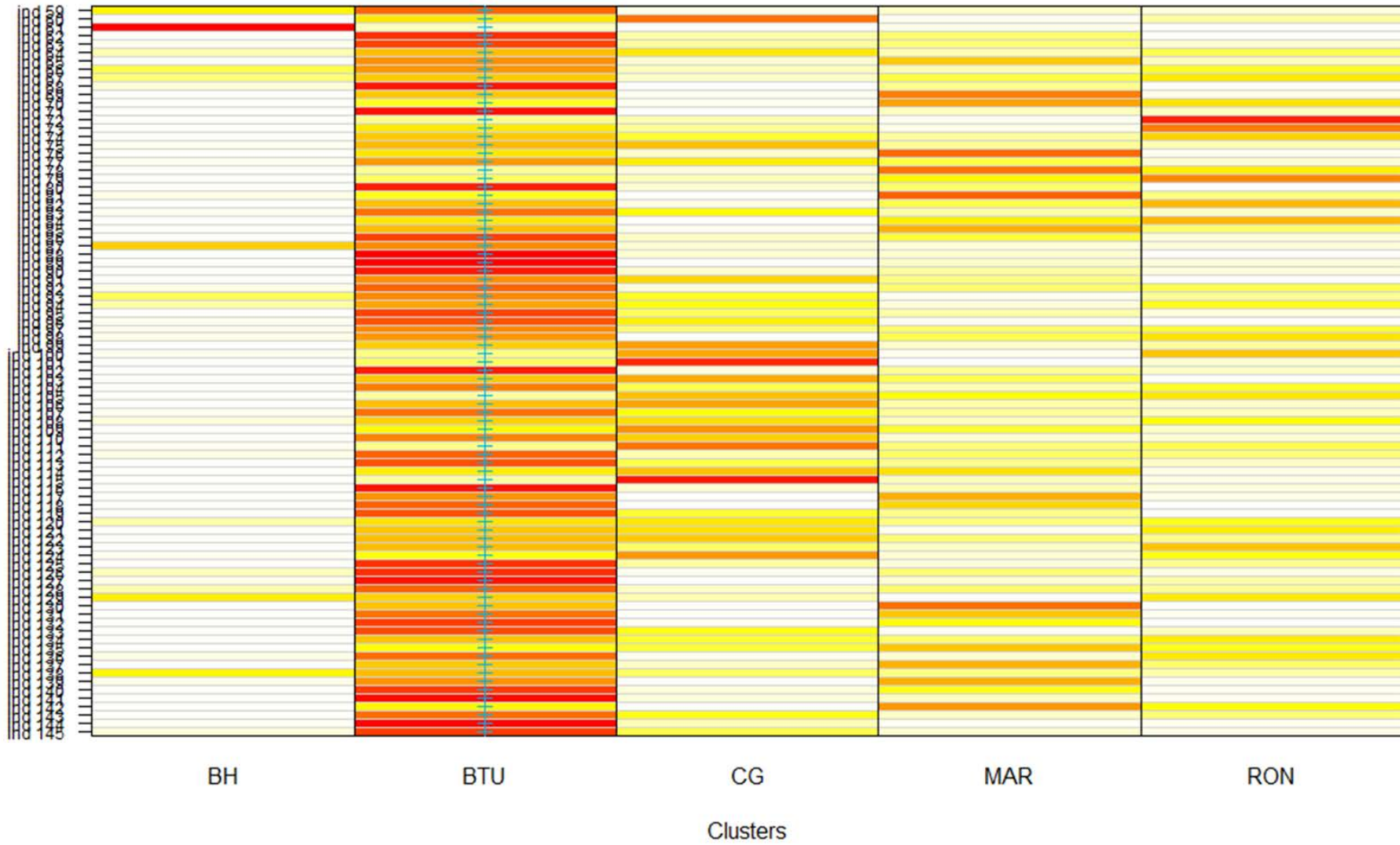
C. Distância genética entre indivíduos das 7 sub-regiões de CG.

Figura 54. Atribuição de *Membership*. *Heat colors* representam probabilidades de adesão (vermelho = 1, branco = 0); cruzes azuis representam o *cluster* original. Eixo x: populações em estudo; Eixo y: indivíduos de Belo Horizonte. Figuras: A. *membership* para a população de BH; B. *membership* para a população de BTU; C. *membership* para a população de CG; D. *membership* para a população de MAR; E. *membership* para a população de RON. Figuras geradas pelo *Software R*, pacote *adegenet*.



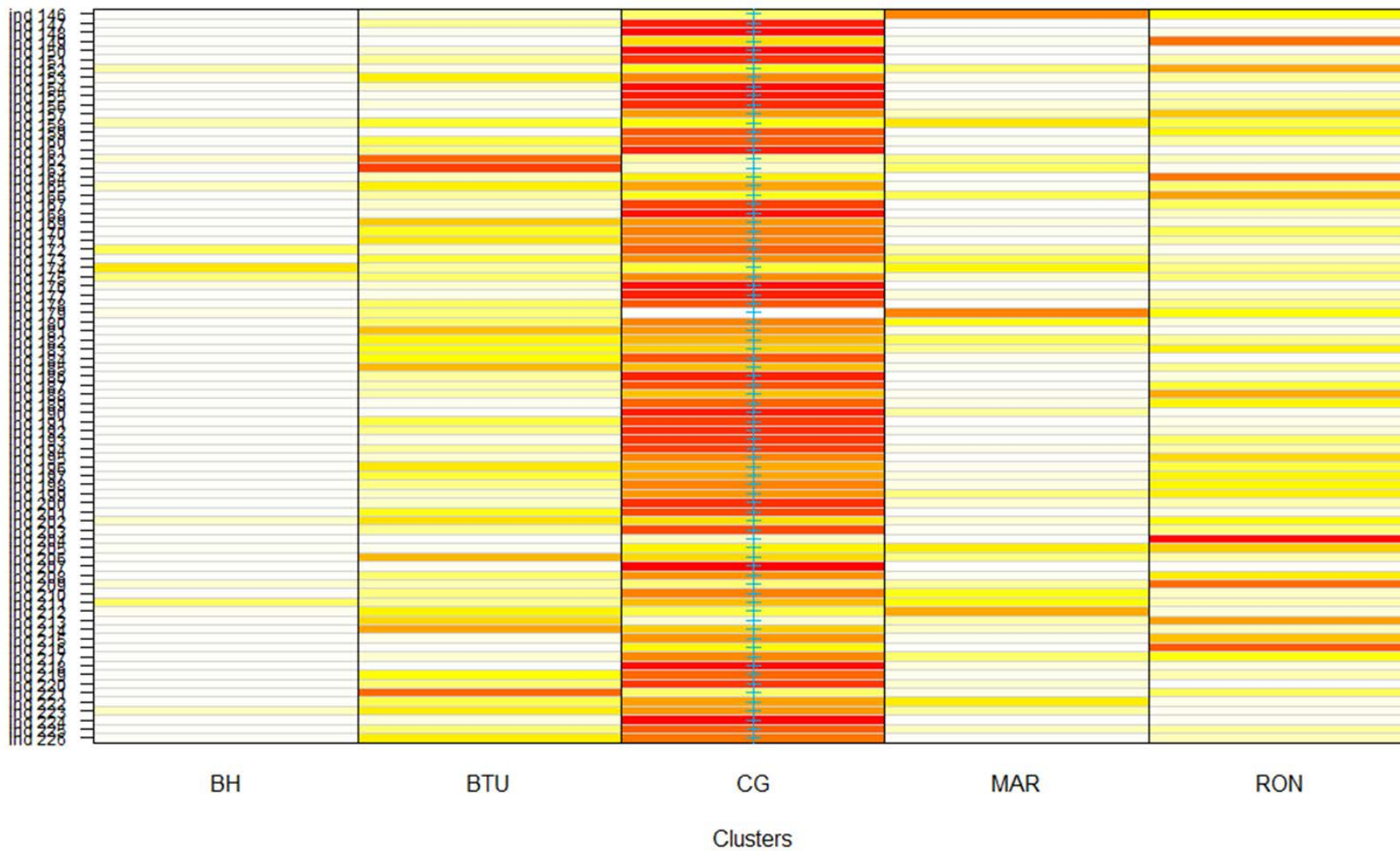
B

Botucatu- atribuição de *membership*



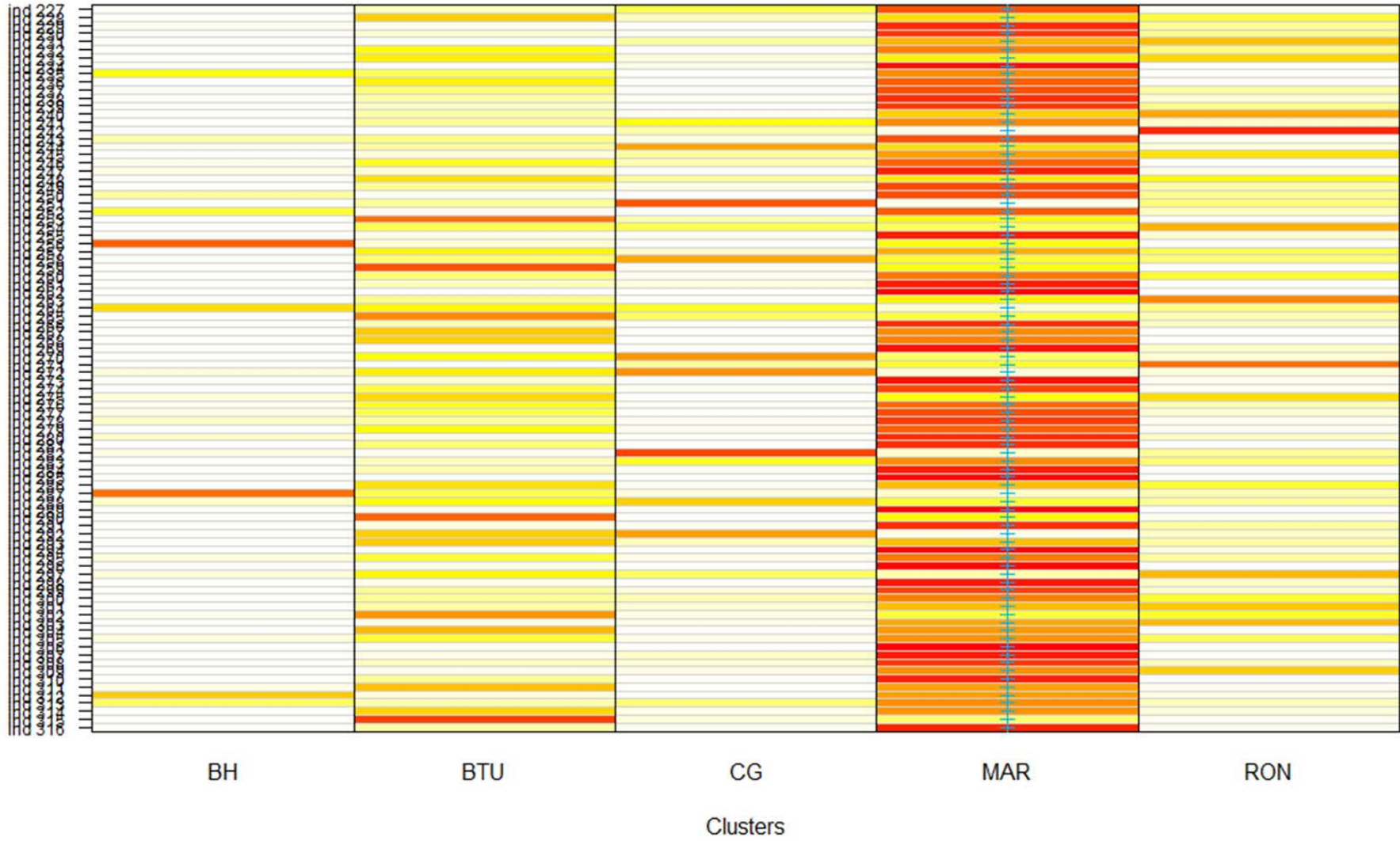


Campo Grande- atribuição de *membership*



D

Maringá- atribuição de *membership*





Rondonópolis - atribuição de *Membership*

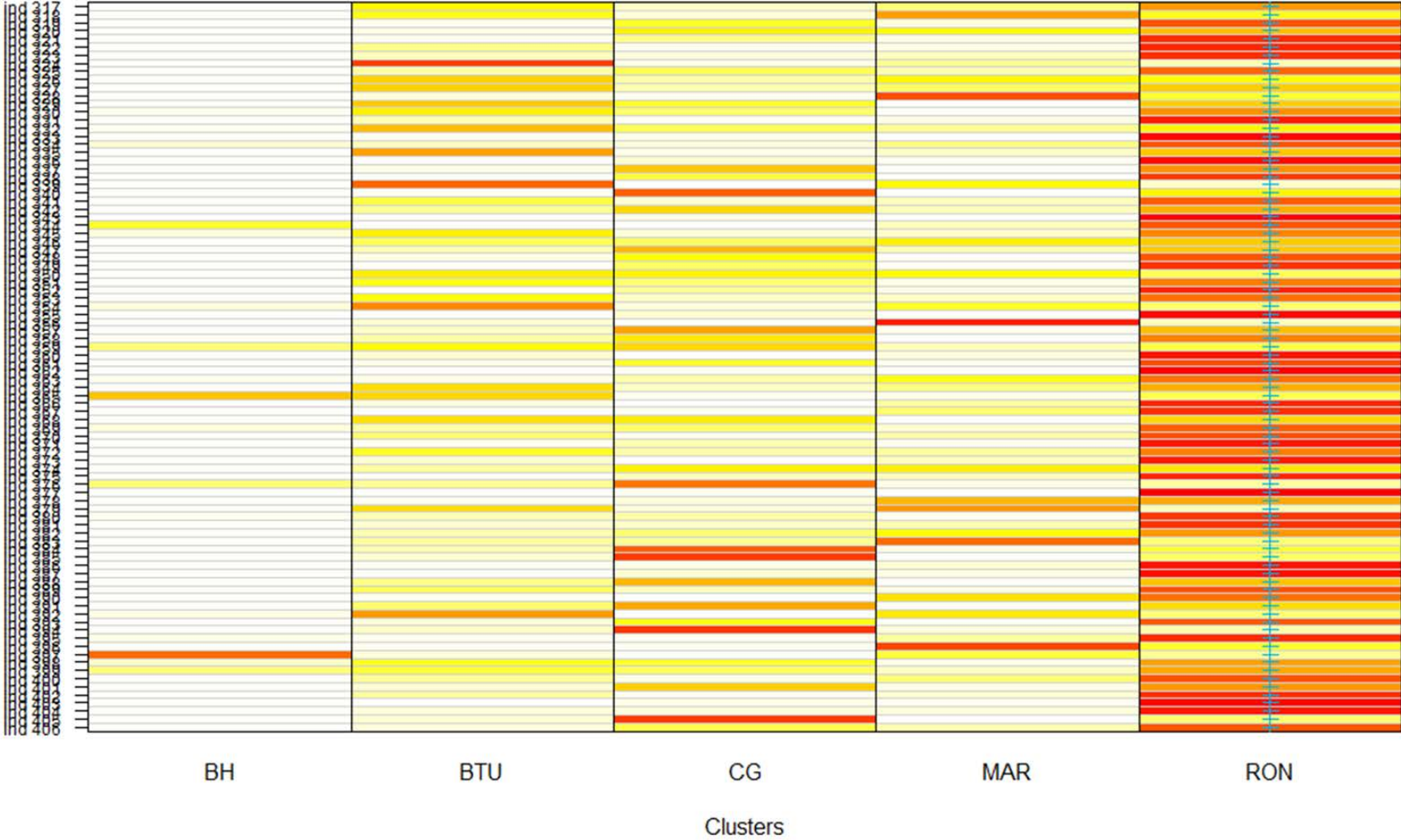
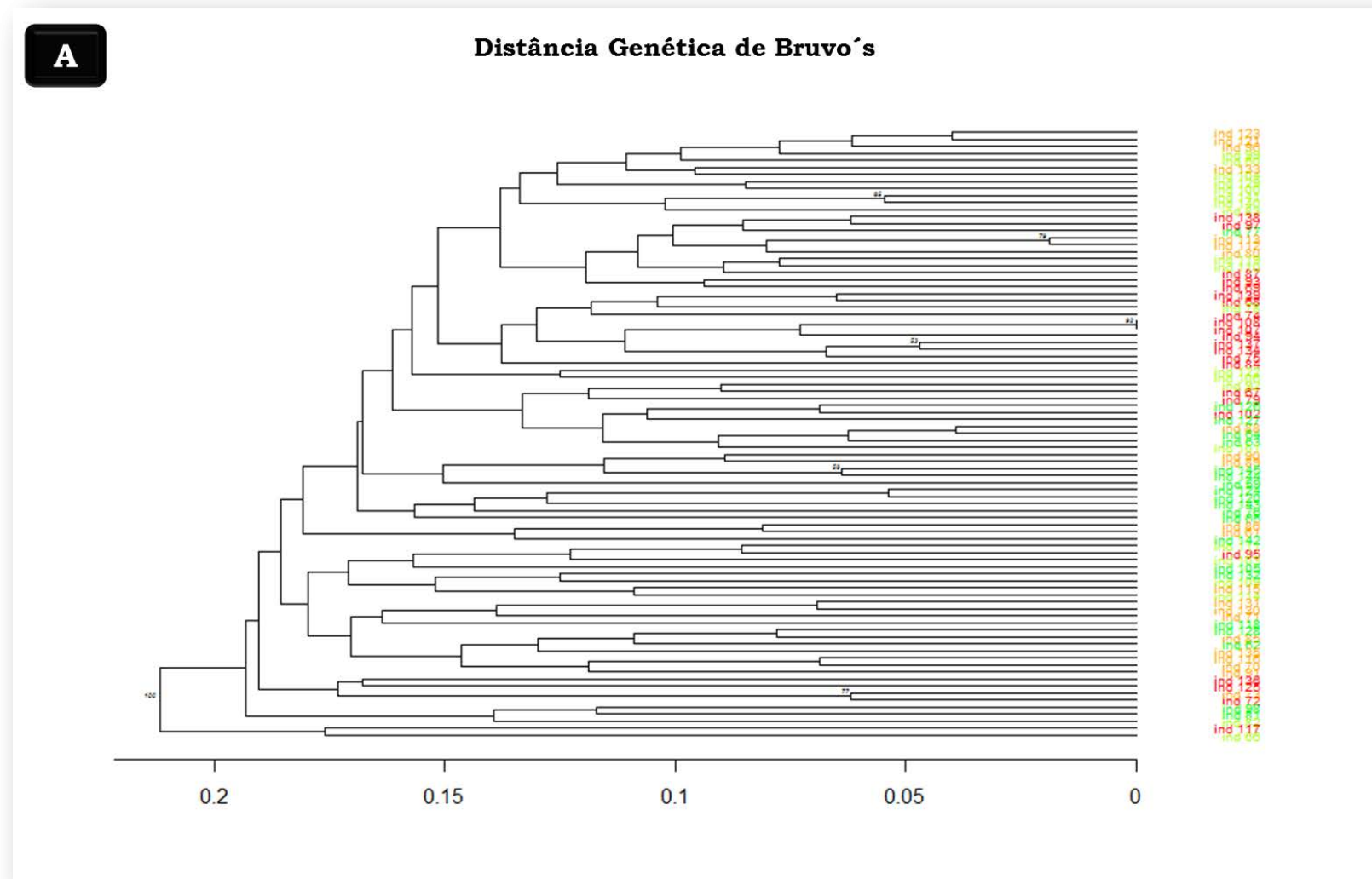
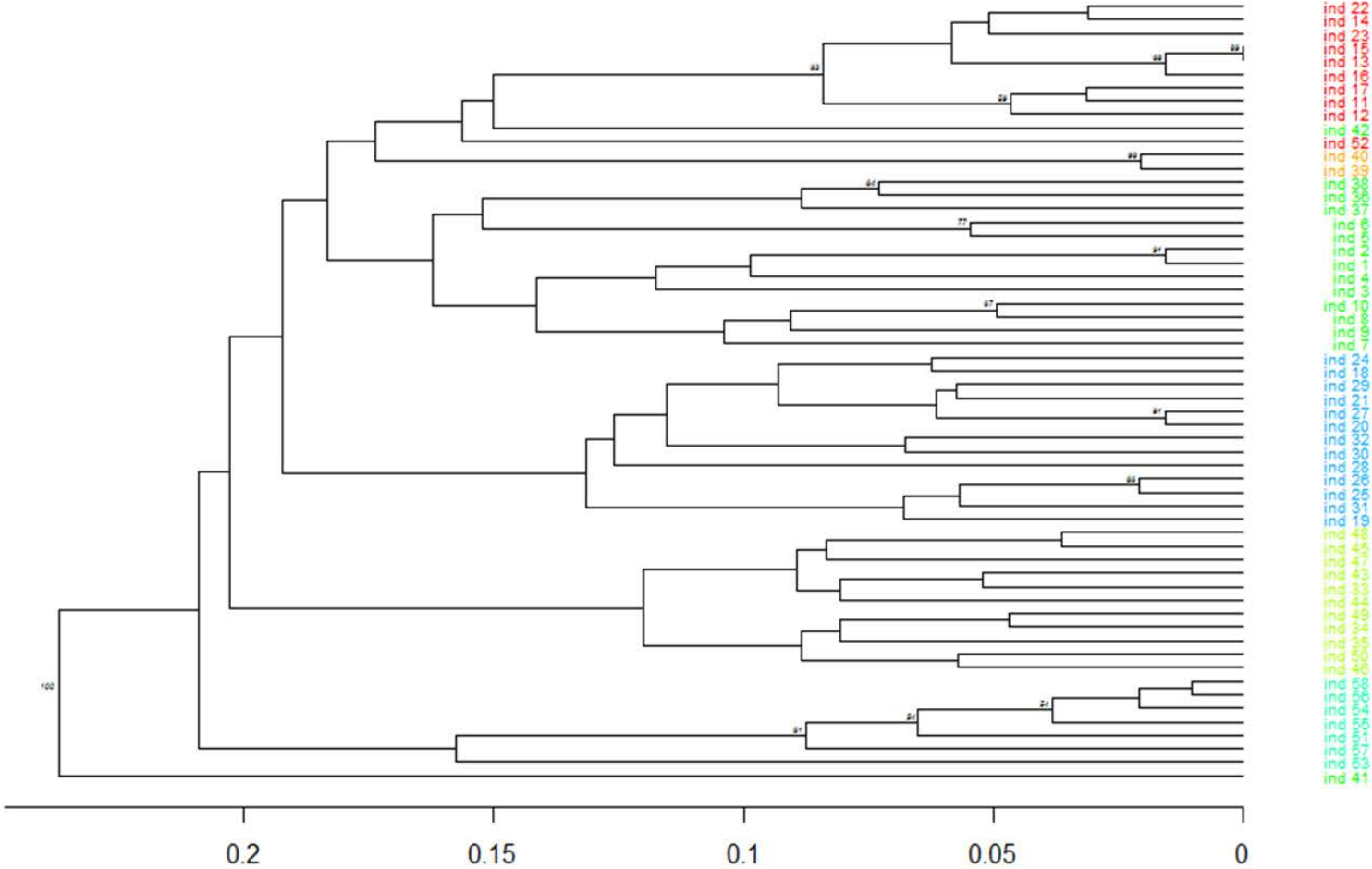


Figura 55. Dendrograma de Distância Genética de Bruvo's. Árvore de distância genética calculada pela estatística de Bruvo's após clusterização dos dados com BIC (baseado em *K-means*), *bootstrap* de 1.000. Figuras A: Distância genética entre os indivíduos das 4 sub-regiões de BTU; B. Distância genética entre indivíduos das 6 sub-regiões de BH; C. Distância genética entre indivíduos das 7 sub-regiões de CG. Dendrogramas gerados pelo *Software R*, pacote *poppr*.



B

Distância Genética de Bruvo's



C

Distância Genética de Bruvo's

