

Thais de França Patarro

Estudo da Variabilidade Genética de Populações de *Aedes aegypti*
(Diptera, Culicidae), Resistentes e Suscetíveis a Inseticidas.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas
(IBILCE/UNESP – São José do Rio
Preto para obtenção do título de Mestre
em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Hermione Elly Melara de Campos Bicudo.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lílian Madi-Ravazzi.

São José do Rio Preto

2010

Patarro, Thais de França.

Estudo da variabilidade genética de populações de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae), resistentes e suscetíveis a inseticidas / Thais de
França Patarro. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

71 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Co-orientador: Lílian Madi-Ravazzi

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Diferenciação populacional. 3. *Aedes aegypti* –
Genética. 4. Polimorfismo. 5. Resistência aos inseticidas. I. Bicudo,
Hermione Elly Melara de Campos. II. Madi-Ravazzi, Lílian. III.
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 575.17:595.77

Thais de França Patarro

Estudo da Variabilidade Genética de Populações de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), Resistentes e Suscetíveis a Inseticidas.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

COMISSÃO JULGADORA

Titulares

Prof. Dr. Hermione Elly Melara de Campos

Bicudo (Presidente e Orientadora) _____

Prof. Dr. Lílian Castiglioni _____

Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti Neto _____

Suplentes

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida _____

Prof. Dr. Shirlei Maria Recco-Pimentel _____

São José do Rio Preto, 24/02/2011

A meus pais, Odete e Wladimir, por me apoiarem em todas as minhas decisões e me ajudarem a tornar meus sonhos realidade;

A minhas tias Antônia e Anita por estarem ao meu lado em todos os momentos mais importantes da minha vida;

A meus familiares, tios e primos que mesmo à distância sempre torceram pelo meu sucesso.

Agradecimentos

Ao término de mais esta etapa de minha vida, não poderia deixar de agradecer à colaboração direta ou indireta das pessoas que convivem comigo, as quais contribuíram para a concretização deste trabalho. Deixo a todos a minha eterna gratidão.

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora Prof. Dr. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, por todo empenho e dedicação ao longo desses cinco anos de orientação. Obrigada por todo incentivo e confiança depositada em mim, e por contribuir de forma tão amável tanto para a minha evolução científica quanto para a pessoal.

À minha co-orientadora Prof. Dr. Lílian Madi-Ravazzi, meus sinceros agradecimentos, por me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho e por ter contribuído na minha formação acadêmica desde a graduação até os dias de hoje.

À Dr. Marlucci Monteiro Guirado, por ter transmitido-me grande parte de meus conhecimentos de bancada, desde meu início no Laboratório de Vetores, e por me auxiliar na execução deste trabalho, principalmente nos momentos de dificuldade experimental. Obrigada pela amizade e dedicação.

Aos membros da comissão julgadora, Prof. Dr. Lílian Castiglioni e Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti Neto, pela disponibilidade e aceitação em avaliar este trabalho.

À Direção do IBILCE-UNESP, ao Departamento de Biologia e à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética deste Instituto. Por propiciarem as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. E aos funcionários, por me auxiliarem sempre que necessário.

A SUCEN (Superintendência do Controle de Endemias) e a Prof. Dr. Maria de Lourdes Graça Macoris por terem fornecido as amostras das populações utilizadas neste estudo.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) e a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão de minha bolsa de mestrado durante os dois últimos anos e pelo auxílio financeiro referente ao projeto que serviu de base para o presente trabalho.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência, amizade e companheirismo, e por tornarem as disciplinas e eventos científicos mais descontraídos.

Aos colegas de laboratório André e Verônica, pela amizade, cumplicidade e confiança. Obrigado por me permitirem transmitir o conhecimento que adquiri ao longo destes anos no laboratório e por darem um significado maior ao verbo “compartilhar”.

Agradeço também à minha família, que ilumina meus caminhos, me guia, me protege e me dá força. Obrigado por estarem sempre a meu lado, mesmo quando distantes.

Aos amigos Edith, Gomes e Luís, que se tornaram parte de minha vida desde que me mudei para São José do Rio Preto.

E finalmente agradeço a Deus, por me conceder a mais magnífica e fascinante dádiva do universo: a vida.

Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia... Pois o triunfo pertence a quem
se atreve.

Charles Chaplin

RESUMO

A alta incidência da dengue no Brasil, causada pela elevada frequência de seu vetor, o *Aedes aegypti*, torna importante conhecer a organização de suas populações em termos de diferenciação genética. Esse conhecimento poderá levar a métodos de monitoramento e controle mais eficientes. No presente trabalho, a técnica RAPD-PCR foi utilizada na análise de quatro populações brasileiras de *A. aegypti*, sendo três classificadas pela SUCEN (Superintendência do Controle de Endemias) como resistentes aos inseticidas utilizados para seu controle (São Luís-SL; São José do Rio Preto- RP; Araçatuba- AR) e uma classificada como portadora de resistência em desenvolvimento (Bauru- BA). Uma quinta população, procedente dos Estados Unidos, suscetível aos mesmos inseticidas (Rockefeller- RO) foi utilizada para comparação. A aplicação dos métodos estatísticos de Nei, (1973, 1978) produziu índices que permitem considerar o conjunto de populações analisadas, no total de primers, como portador de diferenciação genética muito alta conforme a classificação de Wright (1978). Assim indicaram os valores de G_{st} (0,277), que mede a diferenciação gênica; de H_s (0,129), que mede a heterozigose média e de H_t (0,181), que mede a heterozigose total. Porém, considerando-se as comparações das populações duas a duas, verifica-se que essa diferenciação foi variável, sendo que a comparação entre as populações RP e AR mostrou que estas são as populações menos diferenciadas geneticamente, enquanto as mais diferenciadas foram SL x RO e SL x BA. Os cálculos de similaridade de Nei e Li (1979) confirmaram os dados obtidos com os índices mencionados, reforçando a idéia de maior similaridade entre RP e AR, seguida de RO e BA. De modo geral, pode-se dizer que não é fácil interpretar a estrutura das populações de *A. aegypti* quanto às causas de sua diferenciação genética, uma vez que a constituição das mesmas sofre grande interferência da atividade humana, incluindo não só o transporte passivo nas atividades comerciais, mas também a repetida redução do tamanho das populações em decorrência das ações de controle. No presente estudo, admitimos, basicamente, o envolvimento da migração passiva e da localização geográfica na diferenciação das populações analisadas. Utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) foram obtidos dendogramas agrupando as populações pela distância genética (NEI, 1978). Os primers produziram dendogramas diferentes, mas com alguns aspectos em comum, sendo que o primer 21 produziu o dendograma que mostra a maior concordância com a distribuição geográfica e a diferenciação genética observada pelos outros

parâmetros. Aproveitando a existência de classificação quanto ao grau de resistência das populações utilizadas em relação aos inseticidas, procurou-se encontrar alguns possíveis marcadores de resistência, entre os fragmentos produzidos pelos primers. Três fragmentos ou loci (L7, produzido pelo primer 18, L20 e L22, produzidos pelo primer 21) parecem ser os candidatos a marcadores mais promissores e, assim, os mais indicados para um estudo mais aprofundado.

Palavras-chave: variabilidade genética, diferenciação populacional, marcadores moleculares, similaridade genética, resistência a inseticidas.

ABSTRACT

The high incidence of dengue in Brazil, caused by the high frequency of its vector, *Aedes aegypti*, makes the organization of their populations in terms of genetic differentiation something important to know. This knowledge could lead to more efficient methods of monitoring and control of the vector. In this study, the RAPD-PCR was used in the analysis of four Brazilian populations of *A. aegypti*, three of which were classified by SUCEN (Superintencia do Controle de Endemias) as resistant to the insecticides used for its control (San Luis-SL; São Jose do Rio Preto, RP; Araçatuba-AR) and one considered in resistance development (Bauru-BA). A fifth population, from the United States, susceptible to these insecticides (Rockefeller-RO) was used for comparison. The application of the statistical methods of Nei (1973, 1978) produced indices that allowed us to consider the set of populations studied, in the total of primers, as having a very high genetic differentiation, according to the classification of Wright (1978). This is indicated by the values of G_{st} (0.277), which measure the genetic differentiation, the values of H_s (0.129), which measures the average heterozygosity and of H_t (0.181), that measure the total heterozygosity. However, considering the pair-wise comparisons of populations, this differentiation was variable, being the populations RP and AR the less differentiated genetically, while the more differentiated were SL x RO and BA x SL. The estimation of the similarity of Nei and Li (1979) confirmed the data obtained with the indices mentioned, reinforcing the idea of greater similarity between RP and AR, followed by RO and BA. In general, it is not easy to interpret the structure of *A. aegypti* populations as to on the causes of their genetic differentiation, since they are under strong interference of the human activity, which includes not only the passive transport in commercial activities, but also the repeated reduction of the population size as a result of the control actions. In this study, we assume, basically, the involvement of passive migration and geographic distribution in the differentiation of populations. Using the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) method, dendrograms were obtained by grouping the populations according to their genetic distances (NEI, 1978). The different primers produced different dendrograms, although with some features in common. The primer 21 produced the dendrogram that showed the greatest concordance with the geographical distribution and genetic differentiation observed by the other parameters. Taking advantage of that, the populations used were classified as to the degrees of insecticides resistance, we tried to find some

possible markers of resistance among the fragments produced by the primers. Three fragments or loci (L7, produced by the primer 18, and L20 and L22 produced by the primer 21) seem to be the most promising candidate for markers and thus they are the most suitable for further study.

Keywords: genetic variability, population differentiation, molecular markers, genetic similarity, insecticide resistance.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	OBJETIVOS.....	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1.	Origem das Amostras de <i>Aedes aegypti</i> e Sua Classificação Quanto ao Grau de Resistência a Inseticidas.....	22
3.2.	Obtenção dos Adultos para Extração do DNA.....	25
3.3.	A Técnica do RAPD-PCR.....	25
3.3.1.	Preparo das Amostras.....	25
3.3.2.	Quantificação do DNA e Proteínas Presentes nas Amostras Após Extração.....	26
3.3.3.	Oligonucleotídeos.....	26
3.3.4.	Amplificação do DNA.....	27
3.3.5.	Detecção dos Fragmentos.....	27
3.3.6.	Análise e Registro das Bandas.....	29
3.4.	Análise Estatística.....	29
3.4.1.	Análise da Variabilidade Genética Populacional.....	29
3.4.2.	Coefficiente de Similaridade.....	30
3.4.3.	Dendogramas de Similaridade.....	30
4.	RESULTADOS.....	31
4.1.	Análise Individual dos Primers.....	40
4.1.1.	Primer 2.....	40
4.1.2.	Primer 9.....	40
4.1.3.	Primer 10.....	40
4.1.4.	Primer 18.....	41
4.1.5.	Primer 20.....	41
4.1.6.	Primer 21.....	42
4.2.	Índices de Variabilidade Genética Populacional.....	44
4.3.	Dendogramas de Similaridade.....	47
4.4.	Marcadores de Resistência.....	47

5.	DISCUSSÃO.....	52
5.1.	Loci Monomórficos e Polimórficos.....	55
5.2.	Similaridade Genética e Dendogramas de Similaridade.....	57
5.3.	Marcadores de Resistência.....	58
6.	CONCLUSÕES.....	60
7.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti*, mosquito vetor dos vírus causadores da febre amarela, dengue e dengue hemorrágica vem sendo, principalmente nas três últimas décadas, um problema consideravelmente preocupante no âmbito da saúde pública em diversas regiões do nosso País. No Brasil, ocorrem os quatro tipos de vírus conhecidos como causadores da dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) que são transmitidos por esse vetor (FIGUEIREDO et al., 2008). O fato de não ter ainda havido o desenvolvimento de uma vacina contra essa doença, tão pouco um tratamento específico para a mesma, torna o combate aos focos de reprodução e desenvolvimento do mosquito, a forma de controle mais efetiva da doença.

O combate ao mosquito da dengue depende em grande parte do comportamento da população na eliminação dos criadouros. Contudo, a principal arma utilizada desde a reintrodução do mosquito no País, na década de 70, tem sido a aplicação de inseticidas piretróides e organofosforados, aos quais a grande maioria das populações de mosquitos já tem mostrado diferentes graus de resistência. O órgão encarregado do monitoramento e controle destas populações, SUCEN (Superintendência do Controle de Endemias), relata em publicações periódicas a evolução da resistência entre as populações do estado de São Paulo (MACORIS et al., 1995, 1999, 2003, 2007). Outros institutos também fazem isso para populações do mosquito em outros estados do Brasil (LIMA et al., 2003; BRAGA et al., 2004; CARVALHO et al., 2004; LIMA et al., 2006; BESERRA et al., 2007; MONTELLA et al., 2007). Existem também relatos do desenvolvimento de resistência em populações de *Aedes aegypti* em países da Ásia (PONLAWAT et al., 2005; KAWADA et al., 2009) e outros países da América Latina (RODRÍGUEZ et al., 2007; SECCACINI et al., 2008; DORTA et al., 2009; FLORES et al., 2009).

É consenso que não conseguiremos eliminar o *A. aegypti*, mas, com vigilância e trabalho contínuo, é possível manter suas populações em níveis suficientemente baixos para

evitar o risco de sua contaminação pelos vírus. Hoje a situação é diferente daquela existente no passado (década de 50), quando foi possível exterminar as populações do mosquito, eliminando os criadouros. Entre as razões estão o desenvolvimento dos transportes dentro do País e a globalização, que movimentam objetos contendo ovos e larvas do mosquito das regiões infestadas para as não infestadas. Tem sido muito importante também o desenvolvimento da indústria de embalagens, especialmente plásticas, que geram uma grande quantidade de lixo, geralmente jogado ao relento, acumulando água da chuva e formando criadouros.

Pelas razões expostas, o estudo da biologia desse mosquito é importante, uma vez que permite aumentar informações que eventualmente poderão ser úteis no desenvolvimento de métodos de monitoramento e controle de suas populações. Até agora, porém, nem mesmo as técnicas de biologia molecular têm conseguido colaborar no controle do mosquito. Vetores transgênicos (aqui se incluem espécies de *Anopheles* e *A. aegypti*) que não se deixam infectar pelos vírus que eles transmitem normalmente, têm demonstrado no ambiente natural, incapacidade de competir com os mosquitos “normais” (FRANZ et al., 2006; MARRELLI et al., 2007). Shaffer & Bronnikova (2009) demonstraram através de fórmulas matemáticas que apesar do mosquito transmissor da malária transgênico apresentar vantagens adaptativas quando comparado a mosquitos não transgênicos, estes não são capazes de eliminar a malária, uma vez que a vantagem adaptativa do transgene está diretamente relacionada à prevalência do *Plasmodium*; quando esta prevalência se encontra baixa, o valor adaptativo do transgênico diminui em relação ao portador do gene não modificado, de modo que este acaba sendo eliminado por seleção natural.

Desde o final da década de 80, o Laboratório de Vetores do IBILCE-UNESP vem procurando estudar esse mosquito. Inicialmente foram estudos cromossômicos e morfológicos (SOUSA e BICUDO, 1998, 1999, 2000) quando ainda não havia condições laboratoriais para

criar os mosquitos e depois, quando se passou a tê-las, foi realizada uma série de trabalhos, visando a testar o uso da cafeína e da borra-do-café, no controle alternativo dos mesmos (LARANJA et al., 2003; GUIRADO, 2004; LARANJA, 2005; GUIRADO e BICUDO, 2010). Outros estudos abordaram os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência de populações de *A. aegypti* de São José do Rio Preto e Goiânia e sua relação com os inseticidas utilizados no controle, pela SUCEN, visando a caracterizar algumas populações do mosquito quanto à variabilidade do padrão de esterases (LIMA-CATELANI et al., 2004; SOUSA-POLEZZI e BICUDO, 2004; SOUSA-POLEZZI e BICUDO, 2005).

O polimorfismo genético de populações de *Aedes aegypti* tem sido avaliado em vários estudos com o objetivo básico de conhecer a estrutura genética das populações como um requerimento essencial para compreender a dinâmica das populações e os fatores que podem interagir com elas, como a capacidade vetorial e a adaptação ecológica. Os polimorfismos: enzimático, de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), microssatélites e o de seqüências de DNA mitocondrial têm sido utilizados para esse fim. Os resultados da maioria desses estudos permitiram estimar os níveis de divergência, taxas de fluxo gênico e a estrutura genética das populações examinadas, especialmente com base em marcadores produzidos pelas técnicas utilizadas.

Hemme et al. (2010) utilizaram nove microssatélites, dois SNP's e uma seqüência presente na subunidade *COI* do gene mitocondrial da citocromo oxidase para avaliar haplótipos e marcadores genéticos em populações de *Aedes aegypti* de Trinidad e sua relações com a eficiência de barreiras urbanas que impedem o fluxo gênico entre as populações. Fora analisados mosquitos coletados dos lados leste e oeste de uma rodovia, ao logo de 900 metros. Os resultados mostraram que tais barreiras devem ser consideradas em políticas de manejo e programas de supressão populacionais. Urdaneta-Marquez et al. (2008) estudaram mosquitos

provenientes de seis regiões geográficas da Venezuela. Foram utilizados neste estudo marcadores genéticos do gene mitocondrial NADH e SNPs de 11 loci nucleares. Os resultados sugeriram isolamento por distância entre as coleções e susceptibilidade dos mosquitos à infecção pelo vírus tipo 2 da dengue. Huber et al. (2002) utilizaram marcadores de microssatélites para diferenciar populações de *A. aegypti* de uma cidade do Vietnam. O trabalho mostrou que as populações centrais são panmíticas, enquanto as populações periféricas apresentam maior variabilidade genética, mostrando a influência das atividades humanas nos processos de modelagem da estrutura genética das populações.

Zhong et al. (2006) construíram um mapa de linkage molecular, em *A. aegypti* utilizando 148 fragmentos amplificados pela técnica de AFLP e seis marcadores polimórficos de conformação única (SSRP). Este mapa mostrou que seis loci de traço quantitativo (QTL) afetavam a susceptibilidade à infecção por *Plasmodium galinaceum* (parasita causador da malária aviária) de dois cruzamentos recíprocos de *A. aegypti*. Merrill et al. (2005) também utilizaram marcadores AFLP visando a inferir a estrutura geográfica, taxas de migração efetiva, e diferenciações gênica entre populações de *A. aegypti* do estado do Arizona, EUA. Os resultados observados sugeriram padrões de migração compatíveis com as rotas de movimentação de pessoas e transporte de mercadorias. Julio et al. (2009), utilizando marcadores de RAPD, também observaram a relação entre a proximidade das vias rodoviárias e as similaridades genéticas das populações do mosquito na região de Córdoba na Argentina, mostrando o papel do transporte passivo no fluxo gênico entre as populações.

A análise enzimática foi utilizada por Sukonthabhirom et al. (2009) para estudar variações em populações de sete províncias da Tailândia. Os resultados mostraram baixa diferenciação gênica entre as populações de *A. aegypti* avaliadas, porém uma variação genética maior foi encontrada dentro das populações, de modo que foi possível concluir que as populações aparentavam ser panmíticas com barreiras que pouco impediam o fluxo gênico

entre elas. Fraga et al. (2003) a fim de compreender a estrutura populacional de linhagens de *A. aegypti* da região de Manaus, estudaram o polimorfismo de 18 loci enzimáticos. As análises mostraram que a população do mosquito encontrada na região central da cidade apresentava maior polimorfismo em relação a populações de regiões mais afastadas. Também foi observado que grande parte da variabilidade observada dentro das populações ocorria devido a microbarreiras geográficas que dificultavam os cruzamentos ao acaso, levando a uma diminuição do fluxo gênico.

Entre os muitos métodos, presentemente disponíveis para estudos de variabilidade genética, o RAPD-PCR tem sido bastante utilizado, revelando um alto grau de polimorfismo em muitos casos, tanto em plantas como em animais (REYES et al. 2009; SHARMA et al., 2009; ABDEL-AZIEM et al., 2010; AHMAD et al., 2010; AMORÍN et al., 2010; AUAD et al., 2010; MAROUELLI et al., 2010; PEREIRA et al., 2010; SINGH et al., 2010). Devido ao fato de que a técnica de RAPD explora muitos loci, ela é considerada apropriada para análise de distância genética e relações filogenéticas (CASTIGLIONI e BICUDO, 2005; ANUNTALABHOCHAI et al., 2008; SIVARAMAN et al., 2008; NIKNEJAD et al., 2009). Além disso, tem também permitido a obtenção e isolamento de fragmentos que constituem marcadores quanto à origem e dispersão de populações (BIRON et al., 2000).

A técnica RAPD utiliza geralmente primers curtos e baixas temperaturas de anelamento. A técnica, descrita por Williams et al. (1990), envolve a amplificação gênica e permite acessar o fingerprinting do DNA, sendo adequada para a análise de sua variabilidade em larga escala (HILLIS et al., 1996). Na aplicação da técnica assume-se que, se dois indivíduos exibem fragmentos com mobilidades idênticas, suas seqüências identificam segmentos homólogos de DNA. A técnica RAPD utiliza primers únicos de seqüência nucleotídica arbitrária, consistindo de 9 ou 10 nucleotídeos, com um conteúdo geralmente variável de 50 a 80% GC. Os primers submetidos ao PCR originam polimorfismos

reproduzíveis de segmentos casuais do DNA genômico. A análise em gel de poliacrilamida submetidos á eletroforese, mostra bandas que são consideradas loci dominantes e avaliadas como presença ou ausência. A técnica tem sido utilizada para muitos fins, como determinar graus de parentesco e hibridização, bem como estimar a heterozigose de populações, distância genética entre populações e a diversidade genética inter e intrapopulacional (HOY, 1994). As bandas produzidas por RAPD-PCR podem ainda fornecer marcadores potenciais para identificar e localizar loci específicos, como genes de resistência a doenças e inseticidas. Uma grande vantagem da técnica é que não há necessidade de conhecimento prévio da seqüência de genes específicos para obter os marcadores de DNA. Os níveis de discriminação e tipos de dados obtidos incluem as diferenças gênicas em nucleotídeos simples e dados de freqüência gênica.

Utilizando essa técnica muitos estudos têm produzido marcadores importantes na identificação de variedades de plantas (PAMIDIMARRI et al., 2008), na discriminação de espécies de bactérias de um mesmo grupo (KIM et al., 2007), e em estudos de resistência e suscetibilidade a infecções (SPADA et al., 2002; AMIRI et al. 2009). Mumtaz et al. (2009) obtiveram aproximadamente 150 marcadores genéticos para um cluster de genes que conferem resistência à ferrugem do trigo utilizando a técnica de RAPD. As bandas ou fragmentos RAPD têm servido também para gerar SCARS (Sequence Characterized Amplified Region) com o objetivo de aumentar a reprodutibilidade de marcadores (RAY e ROY, 2008). A fim de avaliar as relações genéticas entre duas espécies de plantas medicinais da Indonésia, Jiang et al. (2009) utilizaram o RAPD para obter seqüências polimórficas. As seqüências exclusivas de cada espécie foram clonadas e convertidas em marcadores SCARS.

Ayres et al. (2003) utilizaram marcadores genéticos de RAPD para avaliar a estrutura genética de 15 populações de *A. aegypti* de cinco estados do Brasil. A partir dos 47 fragmentos polimórficos produzidos foi possível obter informações relacionadas ao fluxo

gênico em níveis macro e microgeográficos. Utilizando também marcadores de RAPD, Hiragi et al. (2009) estudaram populações de *A. aegypti* de laboratório e recém coletadas na região do Distrito Federal. Foi verificada a existência de variabilidade genética inter e intrapopulacionalmente. Seus resultados podem ser usados para verificar possíveis relações entre a variabilidade destes marcadores nas dadas populações e a manifestação de resistência a inseticidas específicos pelas mesmas. Santos et al. (2003) a fim de compreender os padrões de infestação do *Aedes aegypti* utilizaram marcadores de RAPD para identificar populações de diferentes regiões geográficas do estado de São Paulo. Os resultados mostraram que mosquitos da região noroeste do estado tiveram origem diferente dos mosquitos da costa litorânea.

Em *Hematobia irritans* a técnica de RAPD já foi testada tanto em nosso laboratório quanto em outras instituições. Castiglioni e Bicudo (2005) utilizaram dez seqüências decaméricas aleatórias para estudar a variabilidade genética de populações do Brasil e Estados Unidos. Foram encontrados um total de 117 fragmentos em cinco populações de *H. irritans*, e 81 fragmentos em *Drosophila prosaltans* (organismo usado como grupo externo) sendo que 43 destes fragmentos eram compartilhados por ambas as espécies. Um aspecto interessante encontrado foi o baixo número de fragmentos produzidos pela população de Rio Branco no Acre. Isso se deve ao fato do isolamento por distância ao qual esta população estava submetida, dando a ela maior homogeneidade genética e maior diferenciação quando comparada às demais populações estudadas. Tal fato também foi observado no trabalho de Britto et al. (2008), que utilizam 15 fragmentos aleatórios decaméricos para avaliar a variabilidade genética de populações do Brasil, Colômbia e República Dominicana. Assim como a população de Rio Branco, moscas de origem colombiana também apresentaram maior homogeneidade genética indicando baixo fluxo gênico desta população em relação às outras estudadas.

Alguns autores criticam a técnica de RAPD, alegando falta de repetibilidade dos perfis produzidos. Contudo, esse problema pode ser contornado se forem tomados os cuidados necessários, tais como manutenção constante das condições dos experimentos, evitar contaminação, selecionar, entre primers inicialmente testados, aqueles que produzem resultados claros, com boa repetibilidade, e só considerar, para análise, as bandas ou fragmentos RAPD com frequências iguais ou superiores a 10%, para evitar bandas eventualmente resultantes de amplificação inespecífica.

Muitos trabalhos têm utilizado RAPD juntamente com outras técnicas para estudo comparado de determinado problema e os resultados têm reiterado a validade da técnica. Por exemplo, Sarwat et al. (2008) utilizaram marcadores de RAPD conjuntamente com os de AFLP, SAMPL (Selective Amplified Microsatellite Polymorphic Loci), e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) para o estudo da diversidade genética de *Tribulus terrestris* (espécie erva medicinal). Hoang et al. (2009) também utilizaram a técnica de RAPD-PCR com outra técnica para comparação. Nesse caso foi aplicada a RAMP-PCR (Amplificação Randômica de Microsatélites Polimórficos) com o objetivo de estudar a tolerância à salinidade em mutantes de linhagens de arroz. Aindá, Mohanty et al. (2010) estudaram a diversidade genética de 28 espécies selvagens do gênero de leguminosas *Cassia* pelas técnicas de RAPD, ISSR e SSR para encontrar marcadores genéticos. Essas técnicas produziram respectivamente um total de 178, 66 e 111 marcadores genéticos polimórficos. Os índices de polimorfismo encontrados foram maiores nos primers de RAPD do que nos de ISSR. A partir das informações produzidas pelas três técnicas, foram feitos dendogramas que possibilitaram a verificação de proximidade genética entre espécies pertencentes a grupos taxonômicos distintos. Além disso, também puderam ser inferidas informações sobre a evolução de determinados aspectos ecológicos destes grupos. Vários desses trabalhos avaliam positivamente a utilização da técnica de RAPD. Por exemplo, Gupta et al. (2010) utilizaram marcadores RAPD e ISSR

concluindo que os primeiros constituíram marcadores moleculares melhores do que o segundo.

Assim, a ampla utilização da técnica, e o respaldo dado por diversos trabalhos comparativos, aliados ainda à aceitação de artigos para publicação em revistas de bom impacto reforçam a validade de seu uso para estudo da variabilidade genética de populações, com diferentes objetivos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: avaliar a variabilidade genética de populações de *Aedes aegypti*, utilizando a técnica de RAPD-PCR.

Objetivo específico: analisar populações classificadas pela SUCEN (Superintendência do Controle de Endemias) quanto à resposta a inseticidas, como suscetíveis, resistentes ou portadoras de resistência em desenvolvimento, para tentar a obtenção de marcadores de resistência ou suscetibilidade. Esses marcadores permitirão conhecer alguns aspectos da estrutura das populações, bem como poderão colaborar para que os órgãos de saúde responsáveis estabeleçam novas técnicas de monitoramento e controle do mosquito.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem das Amostras de *Aedes aegypti* e Sua Classificação Quanto ao Grau de Resistência a Inseticidas.

No presente trabalho foram utilizadas amostras de populações de *A. aegypti* consideradas resistentes e suscetíveis como mostra a Tabela 1 e Figura 1. Essas amostras foram fornecidas pelo Laboratório da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) de Marília ou, no caso das amostras de São José do Rio Preto e Araçatuba, pela SUCEN ou Secretaria da Saúde desses municípios.

A caracterização das populações como suscetíveis ou resistentes a inseticidas é parte do Programa Nacional de Monitoramento coordenado pelo Ministério da Saúde e executado pelo laboratório de Marília, considerado como laboratório de referência. O método utilizado para essa classificação bem como os inseticidas utilizados nessa classificação estão descritos em Macoris et al. (2003). Conforme mencionam os autores, os testes são realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde - WHO (1976,1978). A linhagem de laboratório suscetível Rockefeller é usada como controle, e doses diagnósticas constituídas de 8 µg/l e 10µg/l são utilizadas para os inseticidas organofosforados temefós (usado pela SUCEN para eliminar as larvas do *Aedes*) e fenitrothion (usado pelo mesmo órgão para controle dos adultos do mosquito). A população é considerada suscetível se a porcentagem média de mortalidade for maior que 98% e resistente se for menor que 80%. A resistência é considerada incipiente quando a porcentagem de mortalidade estiver entre os dois valores.

Tabela 1. Sigla e origem das populações, classificação quanto ao grau de resistência a inseticidas, e número de mosquitos analisados em cada população para os primers 2, 9, 10, 18, 20 e 21.

Sigla	Origem da População	Classificação*	N° de Mosquitos Analisados/primer					
			2	9	10	18	20	21
SL	São Luís, MA	Resistente	12	13	13	10	12	13
RO	Rockefeller, USA	Suscetível	10	20	23	18	15	17
BA	Bauru, SP	Suscetibilidade Diminuída	24	20	21	18	17	19
RP	São José do Rio Preto, SP	Resistente	16	20	19	7	7	19
AR	Araçatuba, SP	Resistente	14	21	15	8	13	20

* SUCEN de Marília, 2007



Figura 1. Localização geográfica das populações brasileira utilizadas.

3.2. Obtenção dos Adultos para Extração do DNA

Os ovos das amostras obtidas foram colocados para desenvolver em recipientes de vidro contendo água da torneira, colocados em gaiolas especiais, constituídas de uma estrutura de madeira recoberta por tela, exceto por uma pequena entrada, recoberta por tecido que possibilita a manipulação do conteúdo da gaiola. Essas gaiolas foram mantidas em sala especial, no Laboratório de Vetores do IBILCE-UNESP desta cidade, que possui as devidas medidas de segurança para este fim (telas nas janelas e ante-sala). Os mosquitos produzidos a partir destes ovos foram mantidos nas gaiolas e alimentados com solução aquosa de açúcar a 0,08 g/ml até o momento em que foram separados por sexo e congelados. Apenas os machos foram utilizados para subsequente extração do DNA, isso se deve ao fato de que, por ventura, as fêmeas poderiam conter ovos fecundados e isso interferiria no conteúdo de DNA das amostras, uma vez que o presente estudo analisou amostras de mosquitos individualmente. O total de mosquitos analisados por primer também consta na Tabela 1.

3.3. A Técnica do RAPD-PCR

3.3.1. Preparo das Amostras

O protocolo de extração de DNA genômico, a partir de um único indivíduo, segue a técnica de Ayres et al. (2003).

Em cada *ependorff* foi colocado um macho de *A. aegypti*, previamente congelado, e adicionados 400 µl de Tampão de Lise (Tris 10mM, NaCl 0,4M e EDTA 2mM), 72 µl de SDS 10% e 7 µl de Proteinase K (10 mg/mL) em que o mesmo foi macerado, com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, os *ependorffs* foram agitados por inversão e incubados a 60°C overnight. Após este procedimento, foram adicionados 420 µl de NaCl 5M e os tubos

agitados no vortex por 30 segundos, e em seguida centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs e adicionaram-se 700 µl de isopropanol, para precipitação do DNA. Em seguida foram agitados no vórtex e deixados no congelador por 1 hora. Após este período, foram centrifugados por 20 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionaram-se 500 µl de etanol 70% para lavar o pellet. Os tubos foram novamente agitados no vórtex e centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos deixados para secar por 20 minutos em temperatura ambiente. Por fim, o pellet foi ressuspensionado com 200 µl de H₂O UP.

3.3.2. Quantificação do DNA e Proteínas Presentes nas Amostras Após Extração

Antes que as amostras sejam submetidas à reação de RAPD-PCR, é necessário avaliá-las quanto à quantidade e qualidade do DNA extraído. Esta avaliação foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop ND-100), utilizando-se $\lambda=260/280$ nm para leitura do DNA e $\lambda=260/230$ nm para quantificação de proteína presente. Para as análises do DNA, foram utilizadas amostras contendo no mínimo 30 ng/µl de DNA, índice $\lambda=260/280$ nm mínimo de 1,80, e índice $\lambda=260/230$ nm de no máximo 2,0. Índices $\lambda=260/28$ inferiores a 1,8 representam uma alta taxa de degradação do DNA e $\lambda=260/230$ nm superiores a 2,0 representam alta quantidade de proteína na amostra, o que interfere nas reações de amplificação do DNA

3.3.3. Oligonucleotídeos

A princípio, 22 primers aleatórios foram testados para a amplificação do DNA e verificação dos polimorfismos RAPD e também sua repetibilidade. Os primers foram

sintetizados artificialmente pela IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.) e estão discriminados na Tabela 2, com os códigos de referência e seu conteúdo de G-C (em %).

Entre esses, foram selecionados seis primers que apresentaram maior repetibilidade. Esses primers selecionados foram os de números 2, 9, 10, 18, 20 e 21, indicados na Tabela 2. Os primers 2 e 20 apresentam 70% de nucleotídeos GC, os primers 9 e 10 contêm 60%, o primer 18 contêm 50%, e o primer 21, 20%.

Fragmentos de difícil detecção, tamanho superiores a 7000bp ou com frequências inferiores a 10% foram desconsiderados das análises.

3.3.4. Amplificação do DNA

O DNA genômico extraído foi amplificado de acordo com o protocolo descrito em Williams et al. (1990), com modificações. As amostras foram preparadas em volumes de 30 µl contendo a seguinte mistura de reagentes e concentração: MgCl₂ (1,5mM), KCl (50mM), dNTP's (0,2mM), *primer* (400 pmol), DNA (10 ng) e Taq polimerase (5U), além de tampão de reação e H₂O UP (AYRES et al., 2003).

Os ciclos de amplificação consistem em uma etapa inicial de 94°C por um minuto, seguido de 40 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), um minuto na temperatura de anelamento do primer utilizado (36°, 34°, 32°C, 30°C ou 24°C), dois minutos a 72°C (extensão), finalizando com 10 minutos a 72°C. Os produtos amplificados são mantidos a 4°C até a sua utilização (AYRES et al., 2003).

3.3.5. Detecção dos Fragmentos

Para a identificação dos fragmentos amplificados, 10 µl de amostra amplificada por PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% (Bis-Acrilamida 30%, TBE 10X, Glicerol,

Tabela 2. Seqüência de nucleotídeos e porcentagens em CG dos primers utilizados.

Primers	Seqüência 5' – 3'	% CG
2	CTC CCT GAG C	70% CG
9	GAG CAC CAG T	60% CG
10	GAG CAC TAG C	60% CG
18	CCA TTT ACG C	50% CG
20	ATC GGG TCC G	70% CG
21	ATT CTA TTT C	20% CG

Persulfato de Amônio 10% e TEMED), e submetida à eletroforese em cuba vertical, a 90 volts, por 3 horas, na presença de tampão TBE 1X (Triz Base, Ácido Bórico e EDTA 0,5M pH 8,0). Os fragmentos gerados foram visualizados após fixação (Etanol 10%, Ácido Acético Glacial 0,75%) e coloração do gel com nitrato de prata, seguida de revelação (Hidróxido de Sódio e Formaldeído). Os géis foram secos e preservados envoltos em película de celofane (CERON et al., 1992).

3.3.6. Análise e Registro das Bandas

As bandas produzidas em cada amplificação e para cada indivíduo foram analisadas quanto à presença ou ausência e tamanho do fragmento em pb, calculado pela distância do mesmo em relação à banda mais próxima presente no marcador de tamanho molecular (1Kb DNA Ladder GIBCO BRL®).

3.4. Análise Estatística

Os indivíduos, genotipados pelos produtos visualizados nos géis (bandas) geraram uma matriz de 1 e 0 (respectivamente presença e ausência) que serviu de base para as análises estatísticas descritas à seguir.

3.4.1. Análise da Variabilidade Genética Populacional

Os valores de Diferenciação gênica (G_{st}), Fluxo gênico (N_m), Heterozigose média (H_s) e total (H_t), foram calculados pelo software POPGENE 1.32 (YEH, et al., 1999). Todos esses índices foram calculados conforme Nei (1987).

3.4.2. Coeficiente de Similaridade

Os Índices de similaridade genética. foram calculados utilizando-se o coeficiente de Nei e Li (1979), que compara-se o número de bandas partilhadas entre os indivíduos e as populações, segundo a equação:

$$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

onde x e y = populações comparadas, N_{xy} = número de bandas partilhadas por x e y, N_x e N_y = número de bandas em x e y, respectivamente. Os índices de similaridade foram calculados separadamente para cada primer e para o conjunto completo de primers usando a média dos índices de similaridade.

3.4.3. Dendogramas de Similaridade

Para detectar as relações de proximidade genética entre as populações, matrizes de 1 e 0 correspondentes aos fragmentos produzidos por cada um dos primers analisados, foram submetidas a cálculos de distância genética pelo software POPGENE 1.32 (YEH, et al., 1999). Os cálculos de distâncias genéticas foram realizados conforme Nei (1978). Os valores produzidos serviram de base para a construção de dendogramas de similaridade pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), que agruparam as cinco populações avaliadas neste estudo.

4. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho referem-se à utilização de seis primers, pela técnica RAPD-PCR para a análise da variabilidade genética de cinco populações. Quatro delas são brasileiras, sendo três resistentes ao inseticida utilizado para seu controle (São Luís, São José do Rio Preto e Araçatuba) e uma portadora de suscetibilidade reduzida (Bauru). A última é procedente dos Estados Unidos, classificada como suscetível e considerada padrão para estudos de resistência.

Foi analisado o número e a frequência das bandas produzidas por cada primer, o que permitiu separar as bandas monomórficas e polimórficas em cada população e primer. Na análise dos fragmentos produzidos por cada primer foram considerados apenas os fragmentos que apresentaram tamanho entre 500 e 7000 pb e frequência mínima de 10% na população. Fragmentos de difícil detecção foram também desconsiderados.

No total de primers, os produtos de amplificação variaram de tamanho entre 506 e 6871 bp. Para cada primer, as bandas foram denominadas, em ordem crescente, como L1 (para o fragmento de menor tamanho) a Ln (enésima banda de maior tamanho que a primeira). As figuras 2 e 3 mostram os idiogramas que ilustram os padrões de bandas obtidos, enquanto as Tabelas 3 a 8 mostram o número de fragmentos produzidos por primer e suas frequências para cada população estudada. As observações por primer são descritas a seguir.

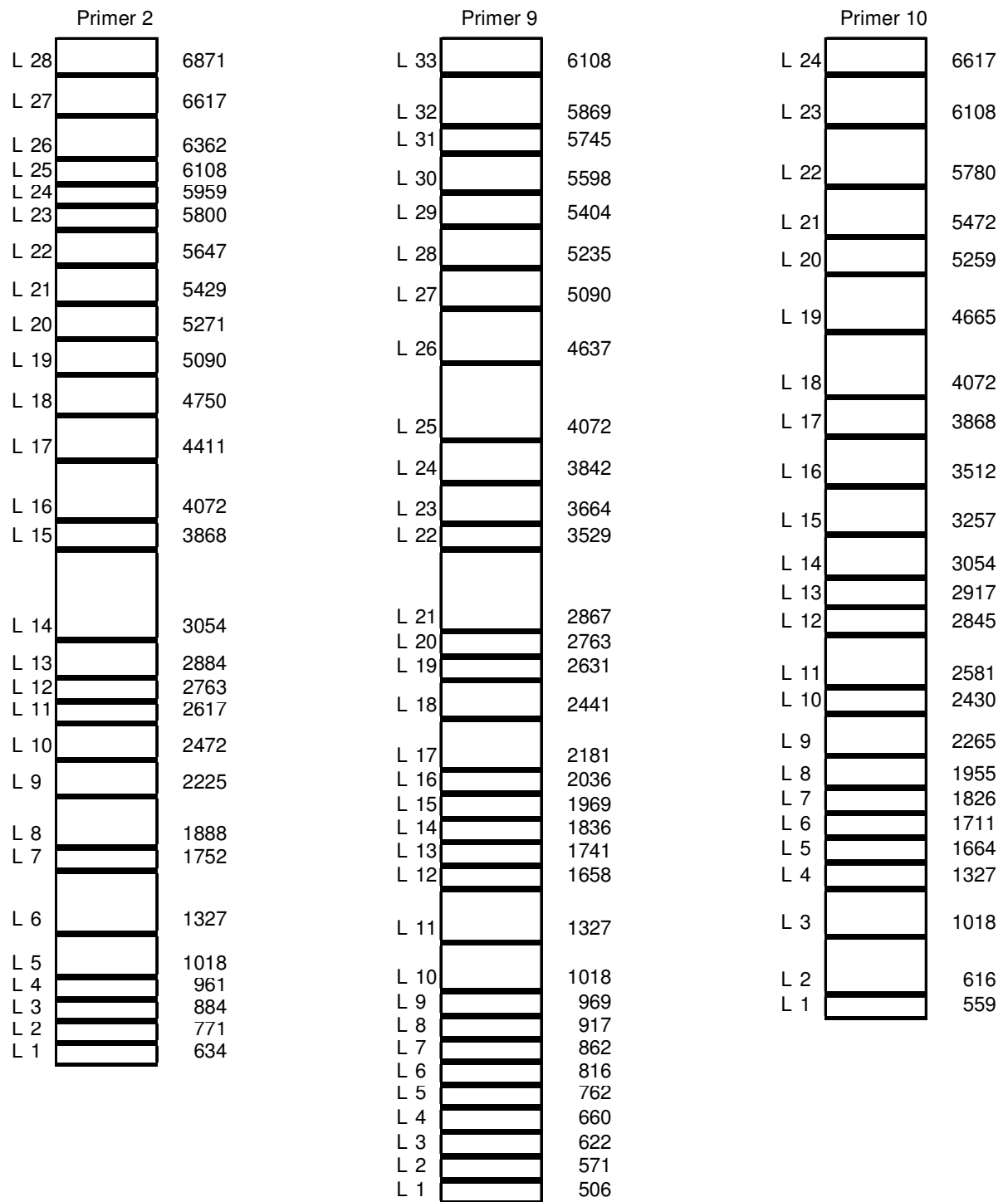


Figura 2. Idiogramas dos loci produzidos pelos primers 2, 9 e 10. A denominação de cada locus é apresentada à esquerda, e o tamanho em pares de base de cada fragmento é apresentado à direita.

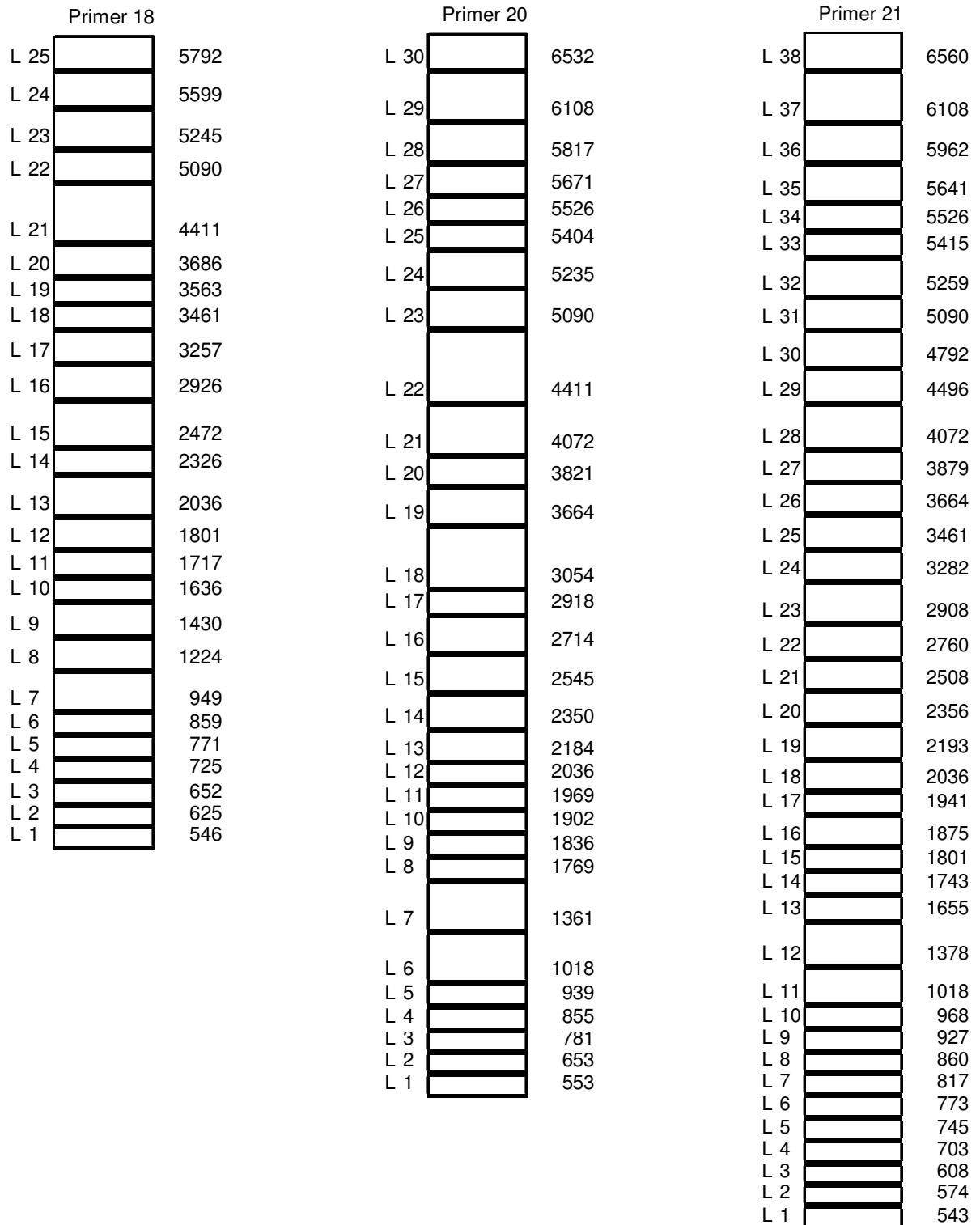


Figura 3. Idiogramas dos loci produzidos pelos primers 18, 20 e 21. A denominação de cada locus é apresentada à esquerda, e o tamanho em pares de base de cada fragmento é apresentado à direita.

Tabela 3. Frequências das bandas produzidas pelo primer 2 nas populações de São Luís (SL), Rockefeller (RO), Bauru (BA), Rio Preto (RP) e Araçatuba (AR). Valores em negrito correspondem a loci de frequências inferiores a 10%, sendo considerados ausentes na população.

Locus	Tamanho (pb)	Frequências (%)				
		SL	RO	BA	RP	AR
L1	634	92	40	92	0	0
L2	771	92	0	42	0	0
L3	884	0	30	63	0	0
L4	961	100	50	79	0	0
L5	1018	100	0	0	0	0
L6	1327	0	40	21	0	0
L7	1752	67	0	58	0	0
L8	1888	33	40	38	0	0
L9	2225	50	0	54	0	43
L10	2472	0	30	17	0	0
L11	2617	0	20	0	0	0
L12	2763	0	0	50	0	0
L13	2884	67	0	0	0	0
L14	3054	0	30	29	0	0
L15	3868	0	0	58	0	7
L16	4072	58	0	0	13	50
L17	4411	0	30	13	0	0
L18	4750	67	0	0	0	0
L19	5090	0	60	0	6	7
L20	5271	50	10	29	0	0
L21	5429	0	0	0	31	0
L22	5647	0	20	50	13	50
L23	5800	0	60	0	38	29
L24	5959	25	0	0	13	0
L25	6108	0	60	33	13	29
L26	6362	0	0	0	38	57
L27	6617	0	30	0	0	0
L28	6871	0	0	0	50	57

Tabela 4. Frequências das bandas produzidas pelo primer 9 nas populações de São Luís (SL), Rockefeller (RO), Bauru (BA), Rio Preto (RP) e Araçatuba (AR). Valores em negrito correspondem a loci de frequências inferiores a 10%, sendo considerados ausentes na população.

Locus	Tamanho (pb)	Frequências (%)				
		SL	RO	BA	RP	AR
L1	506	15	20	30	45	0
L2	571	0	5	0	30	0
L3	622	15	0	0	10	0
L4	660	23	0	15	10	5
L5	762	31	10	40	60	43
L6	816	8	10	5	10	5
L7	862	8	0	15	15	10
L8	917	15	25	35	25	0
L9	969	0	0	0	10	5
L10	1018	8	0	15	0	10
L11	1327	15	10	5	0	0
L12	1658	8	10	15	15	10
L13	1741	23	25	5	15	52
L14	1836	54	35	40	0	52
L15	1969	15	15	45	0	24
L16	2036	8	15	5	30	14
L17	2181	8	10	20	5	0
L18	2441	77	65	55	20	90
L19	2631	8	0	0	25	0
L20	2763	15	5	40	0	0
L21	2867	38	25	20	20	48
L22	3529	54	45	40	10	67
L23	3664	15	15	15	0	19
L24	3842	15	5	5	5	0
L25	4072	8	5	10	5	19
L26	4637	38	25	20	15	33
L27	5090	38	35	25	20	48
L28	5235	31	15	30	20	10
L29	5404	23	5	5	0	24
L30	5598	46	25	30	0	19
L31	5745	0	5	5	10	0
L32	5869	31	30	25	0	10
L33	6108	8	15	10	5	19

Tabela 5. Frequências das bandas produzidas pelo primer 10 nas populações de São Luís (SL), Rockefeller (RO), Bauru (BA), Rio Preto (RP) e Araçatuba (AR). Valores em negrito correspondem a loci de frequências inferiores a 10%, sendo considerados ausentes na população.

Locus	Tamanho (pb)	Frequências (%)				
		SL	RO	BA	RP	AR
L1	559	77	13	10	0	0
L2	616	8	0	29	26	0
L3	1018	0	13	5	37	0
L4	1327	15	13	0	0	0
L5	1664	0	9	29	37	20
L6	1711	8	9	5	0	13
L7	1826	0	13	10	21	40
L8	1955	8	0	10	21	20
L9	2265	23	17	10	5	7
L10	2430	0	0	24	16	27
L11	2581	31	39	29	21	27
L12	2845	0	30	19	26	40
L13	2917	8	48	38	37	80
L14	3054	0	4	5	26	0
L15	3257	0	13	10	21	20
L16	3512	0	39	38	47	27
L17	3868	23	22	14	0	13
L18	4072	0	35	38	53	67
L19	4665	0	0	0	0	27
L20	5259	8	52	52	74	100
L21	5472	31	13	10	0	0
L22	5780	31	22	19	5	33
L23	6108	15	43	24	16	53
L24	6617	23	13	5	11	7

Tabela 6. Frequências das bandas produzidas pelo primer 18 nas populações de São Luís (SL), Rockefeller (RO), Bauru (BA), Rio Preto (RP) e Araçatuba (AR). Valores em negrito correspondem a loci de frequências inferiores a 10%, sendo considerados ausentes na população.* locus monomórfico comum a SL e BA

Locus	Tamanho (pb)	Frequências (%)				
		SL	RO	BA	RP	AR
L1	546	0	6	44	0	0
L2	625	100	94	0	0	0
L3	652	0	0	17	0	0
L4	725	90	0	0	0	0
L5	771	0	33	61	0	13
L6	859	0	83	50	0	0
L7	949	100	0	78	29	13
L8	1224	0	100	0	0	0
L9	1430	0	0	0	43	75
L10	1636	100	0	100	0	0
L11	1717	0	50	0	0	0
L12	1801	0	0	22	0	50
L13	2036	90	72	22	0	0
L14	2326	0	0	0	0	13
L15	2472	0	0	0	29	13
L16	2926	40	0	0	0	0
L17	3257	40	0	0	0	0
L18	3461	0	0	0	0	13
L19	3563	0	0	0	43	13
L20	3686	0	33	61	57	75
L21	4411	0	0	0	0	38
L22	5090	0	39	0	0	0
L23	5245	0	0	22	14	38
L24	5599	0	0	0	43	13
L25	5792	0	0	17	43	75

Tabela 7. Frequências das bandas produzidas pelo primer 20 nas populações de São Luís (SL), Rockefeller (RO), Bauru (BA), Rio Preto (RP) e Araçatuba (AR). Valores em negrito correspondem a loci de frequências inferiores a 10%, sendo considerados ausentes na população.

Locus	Tamanho (pb)	Frequências (%)				
		SL	RO	BA	RP	AR
L1	553	0	0	18	0	0
L2	653	83	93	65	0	0
L3	781	0	0	18	0	0
L4	855	100	47	0	0	15
L5	939	0	0	35	0	0
L6	1018	0	0	35	0	0
L7	1361	100	80	47	0	0
L8	1769	0	0	35	0	0
L9	1836	42	0	0	0	0
L10	1902	0	100	41	0	8
L11	1969	0	0	0	0	46
L12	2036	33	0	0	0	0
L13	2184	0	0	59	0	0
L14	2350	17	80	0	14	54
L15	2545	0	0	24	0	0
L16	2714	0	40	18	0	0
L17	2918	75	93	0	14	8
L18	3054	0	0	59	0	0
L19	3664	100	0	0	0	31
L20	3821	0	13	65	0	31
L21	4072	0	33	12	0	8
L22	4411	0	0	29	0	8
L23	5090	0	0	0	14	8
L24	5235	0	0	0	29	23
L25	5404	0	100	0	29	31
L26	5526	0	0	0	14	0
L27	5671	0	0	35	0	0
L28	5817	0	0	29	0	0
L29	6108	0	0	0	43	23
L30	6532	0	0	35	14	54

Tabela 8. Frequências das bandas produzidas pelo primer 21 nas populações de São Luís (SL), Rockefeller (RO), Bauru (BA), Rio Preto (RP) e Araçatuba (AR). Valores em negrito correspondem a loci de frequências inferiores a 10%, sendo considerados ausentes na população.

Locus	Tamanho (pb)	Frequências (%)				
		SL	RO	BA	RP	AR
L1	543	0	94	0	0	0
L2	574	0	0	16	0	0
L3	608	0	0	47	0	0
L4	703	15	0	0	0	0
L5	745	0	0	37	0	0
L6	773	0	100	11	0	0
L7	817	15	0	63	0	0
L8	860	31	0	0	0	0
L9	927	38	0	0	42	25
L10	968	0	0	21	16	0
L11	1018	0	94	0	0	0
L12	1378	0	0	68	0	30
L13	1655	8	0	47	42	25
L14	1743	0	65	26	0	0
L15	1801	38	0	0	42	40
L16	1875	0	53	0	0	5
L17	1941	62	0	5	32	15
L18	2036	0	0	32	0	5
L19	2193	0	94	16	16	0
L20	2356	46	0	53	37	25
L21	2508	8	0	5	53	25
L22	2760	23	0	53	21	45
L23	2908	0	0	0	47	45
L24	3282	69	0	0	5	15
L25	3461	0	0	0	5	30
L26	3664	8	94	5	58	60
L27	3879	0	0	42	0	40
L28	4072	0	0	5	32	30
L29	4496	77	0	0	47	15
L30	4792	0	41	0	0	0
L31	5090	0	12	0	0	0
L32	5259	0	0	0	21	10
L33	5415	0	76	0	63	35
L34	5526	0	0	0	0	20
L35	5641	8	0	21	37	60
L36	5962	0	0	0	0	15
L37	6108	31	0	0	0	0
L38	6560	0	0	0	79	65

4.1. Análise Individual dos Primers

4.1.1. Primer 2

O primer 2 produziu um total de 28 loci ou fragmentos, que variaram de tamanho entre 634 e 6871 pb. Apenas a população de São Luís apresentou loci monomórficos (L4 e L5). O número de loci polimórficos para as populações SL, RO, BA, RP e AR foi, respectivamente, 10, 15 e 16, 9 e 9.

As populações de SL e RO produziram um total de três loci exclusivos cada uma (L5, L13 e L18 em SL e L11, L19 e L27 em RO), BA produziu dois loci exclusivos (L12 e L15), e a de RP produziu apenas um locus (L21). Os indivíduos de AR não produziram loci exclusivos para esse primer.

4.1.2. Primer 9

O primer 9 gerou 33 fragmentos de tamanhos entre 506 e 6108 pb. Com relação a loci polimórficos foram observados, respectivamente para as populações SL, RO, BA, RP e AR um total de 30, 27, 29, 24 e 24. Esse primer não produziu loci monomórficos em nenhuma das populações. Foram observados loci exclusivos apenas nas populações de SL e RP, sendo um na primeira população (L24) e quatro na segunda (L2, L9, L19 e L31).

4.1.3. Primer 10

O primer 10 produziu um total de 24 fragmentos ou loci, com tamanho entre 559 e 6617 pb. Foram observados, respectivamente, para as populações SL, RO, BA, RP e AR, 14, 20, 22, 18 e 17 loci polimórficos. Nenhuma das populações apresentou loci monomórficos. As

populações de AR e RP foram as únicas a apresentaram loci exclusivos, respectivamente dois (L6 e L19) e um (L14) loci .

4.1.4. Primer 18

A partir do primer 18 foram obtidos 25 fragmentos com tamanho entre 546 e 5792 pb. Foram encontrados três loci monomórficos em SL (L2, L7 e L10), um em RO (L8) e um em BA (L10). Este primer produziu um total de quatro loci polimórficos para a população SL, oito para RO, 10 para BA, oito para RP e 13 para AR.

As populações de SL, RO e AR produziram, cada uma três loci exclusivos (L4, L16 e L17 em SL; L8, L11 e L22 em RO; e L14, L18 e L21 em AR); e população de BA produziu dois loci exclusivos (L1 e L3).A população de RP não produziu loci exclusivos.

4.1.5. Primer 20

O primer 20 produziu no total 30 fragmentos, cujo tamanho variou de 553 a 6532 pb. Foram encontrados três loci monomórficos na população de SL (L4, L7 e L19), e dois loci (L10 e L25) na população de RO. Com relação aos loci polimórficos, foram encontrados respectivamente cinco, oito, 18, oito e 14 para SL, RO, BA, RP e AR.

O primer 20 produziu dois loci exclusivos nas populações de SL (L9 e L12) e RP (L23 e L26), 11 na população de BA (L1, L3, L5, L6, L8, L13, L15, L18, L22, L27 e L28), e um locus na população de AR (L11).

4.1.6. Primer 21

Foram produzidos, por este primer, 38 fragmentos de tamanhos que variaram entre 543 e 6560 pb. A população RO apresentou um único locus monomórfico (L6), sendo que as demais populações apresentaram apenas loci polimórficos. O total de loci polimórficos nas populações SL, RO, BA, RP e AR foi respectivamente, 15, nove, 19, 19 e 23.

Com o uso deste primer foram obtidos, três loci exclusivos em SL (L4, L8 e L37), cinco em RO (L1, L11, L16, L30 e L31), quatro em BA (L2, L3, L5, e L18), e três em AR (L25, L34 e L36). A população RP não produziu loci exclusivos.

Fazendo uma análise geral, o primer 9 foi o que apresentou o maior número de bandas polimórficas, sendo 134 no total, seguido do primer 10 com 91 fragmentos. Os primers 20 e 21 foram os que produziram o maior número de fragmentos exclusivos, sendo 15 para cada população. De uma forma geral, todas as populações apresentaram alto polimorfismo, sendo o polimorfismo médio mais baixo observado na população de São Luís (42,9%), e o mais alto observado na população de Bauru (64,5%). A Tabela 9 resume os dados quanto ao número e porcentagem das bandas polimórficas, em cada população, o total por primer e as médias considerando todos os primers por população e todas as populações por primer. A população BA apresentou a média mais elevada de bandas polimórficas considerando todos os primers, por população, e o primer 10 foi o que no total de populações, produziu a maior porcentagem das mesmas.

Tabela 9. Bandas polimórficas: total (N) e porcentagem (P) em cada população, total por primer (NT), porcentagem média de polimorfismo em cada população (MP) e média geral desses valores, por população.

Primers	Populações											
	SL		RO		BA		RP		AR		NT	MP
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P		
2	10	35,7	15	53,6	16	57,1	9	32,1	9	32,1	59	42,12
9	30	90,9	27	81,8	29	87,9	24	72,7	24	72,7	134	81,2
10	14	58,3	20	83,3	22	91,7	18	75	17	70,8	91	75,82
18	4	16	8	32	10	40	8	32	8	32	43	34,4
20	5	16,7	8	26,7	18	60	8	26,7	14	46,7	53	35,36
21	15	39,5	9	23,7	19	50	19	50	23	60,5	85	44,74
Média	13	42,85	15	50,18	19	64,45	14	48,08	17	55,8		

4.2. Índices de Variabilidade Genética Populacional

Utilizando os métodos estatísticos de Nei (1978;1987) foi possível calcular os índices G_{st} (diferenciação gênica), N_m (fluxo gênico), H_t (heterozigose total) e H_s (heterozigose média).

Como mostra a Tabela 10, comparando-se as populações brasileiras duas a duas, obteve-se o maior valor de G_{st} para SL x RP e o menor para AR x RP. Na comparação das populações brasileiras com RO, o maior valor foi obtido para SL x RO e o menor para BA x RO. Wright (1978) apresenta uma classificação da diferenciação gênica seguindo os valores: 0 a 0,05, representam baixa diferenciação; 0,05 a 0,15, diferenciação moderada; 0,15 a 0,25, alta diferenciação; e os valores maiores que 0,25, diferenciação muito alta.

O índice de fluxo gênico (N_m) foi maior na comparação de AR X RP. De modo geral o valor deste parâmetro mostrou-se inversamente proporcional aos valores de G_{st} . Com relação às distâncias geográficas, as populações mais próximas apresentaram maior valor de fluxo gênico. Uma exceção é a comparação de SL x BA, que mostram a maior distância geográfica, mas sua diferenciação gênica é intermediária e o fluxo gênico, maior do que, por exemplo, BA x AR que distam aproximadamente 200 Km. A Tabela 11 apresenta os valores de H_t , H_s , G_{st} e N_m por primer e suas médias considerando os primers separadamente e juntos. A heterozigose total (H_t) variou de 0,155 ($\pm 0,009$) no primer 9 a 0,201 ($\pm 0,021$) no primer 18, com uma média geral de 0,181 ($\pm 0,016$). A heterozigose média (H_s) variou de 0,100 ($\pm 0,004$) para o primer 20 a 0,162 ($\pm 0,007$) para o primer 10. A diferenciação gênica média total foi de 0,277, correspondente ao valor 2,627 para o fluxo gênico médio.

Tabela 10. Distâncias geográficas, valores médios de diferenciação Gênica (G_{st}) e fluxo Gênico (N_m) para cada comparação.

Comparações	Distância Geográfica (Km)	G_{st}	N_m
SL X BA	2.800	0,187	6,860
SL X RP	2.600	0,286	2,830
SL X AR	2.700	0,279	2,562
BA X RP	170	0,125	8,826
BA X AR	200	0,160	4,881
AR X RP	230	0,044	341,580
Média	1.450	0,180	61,256
SL X RO	4.000	0,289	8,232
BA X RO	6.400	0,189	13,113
RO X RP	6.500	0,209	5,787
RO X AR	6.600	0,207	3,727
Média	5.875	0,224	7,715

Tabela 11. Heterozigose total (H_t), heterosigose média (H_s), diferenciação gênica (G_{st}) e fluxo gênico (N_m), por primer, considerando as cinco populações analisadas. MG= média geral considerando todos os primers.

Primer	Parâmetros			
	H_t (DP)	H_s (DP)	G_{st}	N_m
2	0,197 (0,011)	0,136 (0,004)	0,308	1,122
9	0,155 (0,009)	0,146 (0,007)	0,056	8,444
10	0,184 (0,013)	0,162 (0,007)	0,119	3,700
18	0,201 (0,021)	0,108 (0,006)	0,463	0,581
20	0,174 (0,021)	0,100 (0,004)	0,428	0,670
21	0,175 (0,021)	0,125 (0,004)	0,286	1,246
MG	0,181 (0,016)	0,129 (0,006)	0,277	2,627

Com a aplicação do método de Nei e Li (1979) obtiveram-se os índices de similaridade entre as populações comparadas duas a duas, para cada primer e para o total de primers (Tabela 12).

As médias dos índices de similaridade, considerando todos os primers, em cada comparação entre populações variaram de 0,31 entre SL X RP a 0,71 entre RP X AR.

4.3. Dendogramas de Similaridade

Com o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) foram construídos dendogramas que também permitem estimar as relações genéticas entre as populações. A Figura 4 mostra os dendogramas construídos, individualmente, para cada um dos primers.

4.4. Marcadores de Resistência

Foram feitas comparações entre as populações resistentes (SL, RP e AR) e a população portadora de suscetibilidade diminuída (BA) a fim de se observar a existência de bandas compartilhadas entre elas que fossem, conseqüentemente, possíveis candidatas a marcadores de resistência (Tabela 13). Para isso foram consideradas apenas bandas que apresentassem frequências mínimas de 40% e que estivessem ausentes na população suscetível (RO). O primer 2 apresentou o maior número de bandas compartilhadas entre as populações comparadas (L2, L7, L9, L16 e L28), sendo três na comparação SL X BA (L2, L7 e L9). No primer 21, foram observadas quatro bandas compartilhadas e no primer 18, três bandas. Duas das bandas comuns a SL e BA apresentaram frequências superiores a 70% (L7 e L10).

Tabela 12. Índices de Similaridade para as comparações entre as populações, em cada primer e a média dos índices encontrados para cada primer, em uma mesma comparação (NEI e LI, 1979).

	Primers						Média
	2	9	10	18	20	21	
SL x BA	0,50	0,74	0,52	0,34	0,15	0,15	0,40
SL x RP	0,20	0,58	0,24	0,14	0,25	0,43	0,31
SL x AR	0,21	0,68	0,32	0,10	0,35	0,44	0,35
BA x RP	0,17	0,57	0,76	0,42	0,07	0,38	0,40
BA x AR	0,26	0,81	0,82	0,50	0,15	0,34	0,48
RP x AR	0,80	0,55	0,75	0,76	0,59	0,79	0,71
SL x RO	0,29	0,76	0,69	0,27	0,56	0,00	0,43
RO x BA	0,71	0,79	0,80	0,42	0,43	0,24	0,57
RO x RP	0,26	0,63	0,67	0,12	0,34	0,22	0,37
RO x AR	0,27	0,78	0,67	0,19	0,42	0,13	0,41

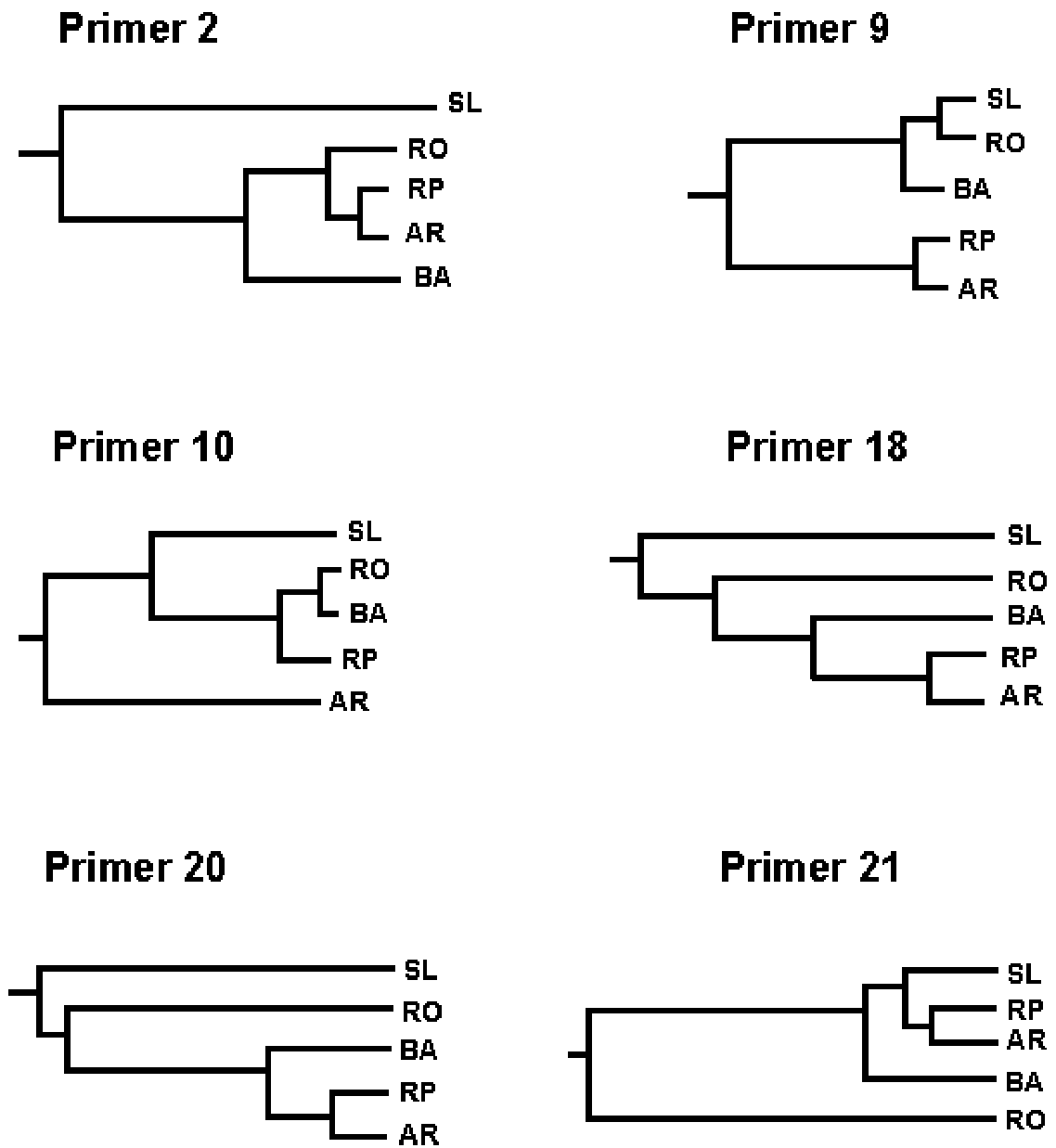


Figura 4. Dendogramas de similaridade construídos utilizando-se o método UPGMA e valores de distância gênica calculados conforme Nei (1978) para os primers 2, 9, 10, 18, 20 e 21.

Tabela 13. Bandas compartilhadas que apresentaram frequência mínima de 40% nas populações resistentes (SL, RP, AR) e na população com suscetibilidade diminuída (BA). SL= São Luís, BA= Bauru, RP= Rio Preto, AR= Araçatuba. Essas bandas não foram produzidas em Rockefeller. * Frequência superior a 70% em pelo menos um das populações comparadas. ■ Frequência superior a 70% em ambas as populações comparadas.

Primer	Comparações				
	SL x BA	SL x AR	RP x AR	BA x AR	SL x RP
2	2*,7,9	16	28	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
18	7 [■] ,10 [■]	-	9*	-	-
20	-	-	-	-	-
21	20	-	38*	27	29*

Três bandas merecem destaque pela presença nas quatro populações e ausência em RO: L22 do primer 21, cuja frequência variou entre as populações de 21% a 53% e L20 do mesmo primer 21, cujas frequências variaram de 25 a 53%. A terceira banda foi produzida pelo primer 18 (L7) com frequências variáveis entre 13 a 100%, exclusivamente nas populações resistentes.

5. DISCUSSÃO

A maioria das populações apresenta diferenças genéticas entre os indivíduos que as constituem, tanto em plantas como em animais, bem como ocorrem diferenças entre as populações ao longo da distribuição de cada espécie. Os padrões de como a diversidade genética das espécies é distribuída ou organizada têm sido objeto de vários estudos.

Por definição, os indivíduos dentro de uma dada espécie partilham uma porcentagem de alelos, ou não seriam considerados membros de uma mesma espécie. Esse partilhamento de parte do conjunto gênico inclui duas classes básicas de genes; os genes que são monomórficos dentro de uma espécie, que são comuns a todas as populações e em uma população entre todos os indivíduos. A frequência desses genes varia ao redor de 85% do genoma total entre os grupos taxonômicos. O restante dos loci (em média 15%, nos animais) são polimórficos, variando entre os indivíduos de uma população e entre populações dentro de uma espécie.

Como foi mencionado, o perfil genético das populações geralmente varia de lugar para lugar ao longo da distribuição de uma espécie. Essas diferenças podem surgir por ocorrências ao acaso, como a composição genética dos indivíduos que se dispersam criando uma nova população (efeito do fundador), ou modificações nas frequências dos alelos que resultam de cruzamentos casuais em populações muito pequenas (deriva genética). Diferenças entre as populações podem também surgir especialmente se o meio ambiente em várias localidades, expõe os indivíduos a diferentes condições ótimas para sobrevivência e reprodução (valor adaptativo). Por essas e outras razões as populações frequentemente divergem umas das outras em sua composição genética. Essa divergência é especialmente forte quando há pouco fluxo gênico entre as populações. Com o tempo, tais diferenças genéticas entre as populações podem acumular-se e eventualmente resultar no desenvolvimento de uma nova espécie (especiação alopátrica).

A distribuição da diversidade genética em cada espécie reflete tanto sua biologia quanto sua história. Mesmo que a variação dentro de uma população seja baixa pode haver uma variabilidade considerável entre populações. Em cada uma de duas populações isoladas, os indivíduos em cada população podem ser quase geneticamente idênticos entre si, mas, devido ao isolamento, eles podem ser muito diferentes entre as duas populações. Neste caso, a maioria da variação da espécie existe entre as populações, sendo que dentro da população ela é baixa ou inexistente. O oposto pode acontecer, isto é, a espécie ter uma alta proporção de variação distribuída dentro da população, enquanto a variação entre as populações é relativamente pequena. Isso pode ocorrer quando os habitats disponíveis são próximos, ou mesmo contínuos e ocorre dispersão entre as populações. Neste caso, pode ocorrer uma grande variação entre os indivíduos de cada população, mas devido ao fluxo gênico ser alto entre os locais, a maioria das populações são semelhantes, devido a que a maioria dos alelos polimórficos são amplamente distribuídos. Uma revisão de como a diversidade genética está distribuída nas populações naturais pode ser encontrada em Falk et al. (2011).

Uma série de medidas são usadas com o objetivo de quantificar a distribuição da variação genética entre os indivíduos dentro das populações e entre elas, as quais constituem a base para descrever a organização da variação genética dentro da espécie. As diferenças entre as populações são comumente quantificadas pelo uso de algumas estatísticas entre as quais está o coeficiente de Nei da variação gênica (G_{st}), o qual é uma função de como a heterozigose está dividida dentro e entre populações, com base nas diferenças de frequências dos alelos (NEI et al., 1975). Então a proporção da variação total que é distribuída nas populações é igual a $1 - (H_s/H_t)$, onde H_s e H_t são respectivamente a heterozigose média dentro das populações e na população toda. O valor de G_{st} varia de zero a um.

Os índices G_{st} de Nei (1975; 1987) e F_{st} de Wright (1969) na prática são usados de modo semelhante como índices de diferença genética entre as populações. Considera-se que

G_{st} tem propriedades úteis, porque pode ser usado para um ou mais loci, as taxas de mutação não alteram significativamente a estatística, o número exato de populações não necessita ser especificado e a estatística responde bem a modificações das frequências alélicas no tempo (CROW, 1986). Ryman e Leimar (2009), em um trabalho mais recente, também destacam a utilidade desse índice como medida da diferenciação genética.

H_s e H_t são menores do que uma unidade (1) e $H_t \geq H_s$, o que implica em que G_{st} tende ao valor zero quando H_s se aproxima de uma unidade (1), e que G_{st} não pode ultrapassar $1 - H_s$. Por exemplo, se H_s vale 0,80, G_{st} não pode exceder 0,20 mesmo em situações onde todas as populações estão segregando conjuntos de alelos que não se sobrepõem completamente (RYMAN e LEIMAR, 2009).

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor da febre amarela e da dengue e seu controle tem sido realizado principalmente pelo uso de inseticidas. Estudos da genética de populações deste vetor são, portanto, importantes também por fornecerem dados que podem eventualmente levar a novas estratégias de controle.

A técnica de RAPD-PCR (Random Amplified Polimorphic DNA) tem sido utilizada para a obtenção de dados populacionais de muitos organismos entre os quais o *A. aegypti*. A amplificação ao acaso de regiões do DNA genômico utilizando primers decaméricos, o que constitui basicamente a técnica de RAPD-PCR, tem sido utilizada para identificar e diferenciar populações do mosquito e verificar, as relações genéticas e os possíveis padrões de colonização do vetor.

A literatura registra resultados de estudos populacionais de *A. aegypti* por RAPD-PCR para populações do Brasil (AYRES, et al., 2003; PADUAN et al., 2006; HIRAGI et al., 2009), de Porto Rico (APOSTOL et al., 1996), México (GARCIA-FRANCO, et al. 2002), e da Argentina e Uruguai (SOUSA, et al, 2001; JULIO et al., 2009; SOLIANI et al., 2010).

No presente trabalho, o estudo da variabilidade genética visando à caracterização populacional foi baseado em seis primers aplicados a cinco populações desse mosquito, sendo quatro brasileiras e uma proveniente dos Estados Unidos. Como essas populações têm sido classificadas anualmente pela SUCEN (Superintendência do Controle de Endemias), quanto ao grau de resistência em relação aos inseticidas, utilizados para seu controle, pretendeu-se, além dos objetivos mencionados, buscar entre os fragmentos marcadores que eventualmente pudessem ser usados visando a aplicação nos processos de monitoramento e controle.

5.1. Loci Monomórficos e Polimórficos

Os seis primers aplicados nas cinco populações resultaram em um número considerável de loci, 178, de tamanhos entre 506 e 6871 pb. Fragmentos monomórficos (isto é, os presentes em 100% dos indivíduos) foram detectados apenas intrapopulacionalmente, exceto um caso envolvendo as populações SL e BA (L10, primer 18).

A análise do polimorfismo nas populações considerando as médias de todos os primers mostrou porcentagens mais elevadas para BA, seguida em ordem decrescente de AR, RO, RP e SL. Por outro lado, a porcentagem média mais elevada considerando os primers individualmente foi obtida com o primer 9, seguida em ordem decrescente pelo primer 10, sendo que os demais mostraram um polimorfismo médio que se aproxima da metade desses valores.

As comparações das populações brasileiras, entre si, forneceram valores de G_{st} cuja média foi igual a 0,180, enquanto as comparações entre as populações brasileiras e a população americana produziu um valor médio de G_{st} igual a 0,224. Esses valores refletem a distância geográfica da localização das populações sendo os valores de G_{st} maiores nas comparações de localidades mais distantes, mesmo quando se considera só as comparações de RO com as populações brasileiras.

A estimativa de G_{st} serviu de base para inferir o fluxo gênico (N_m). As medidas N_m entre as populações mostraram em várias comparações que os menores valores de G_{st} correspondem aos valores maiores de N_m . O caso mais acentuado foi observado na comparação de AR e RP que apresentou o menor valor de G_{st} (0,044) e o maior valor de N_m (341,580). Ambas são geograficamente próximas e apresentam comércio ativo.

O *A. aegypti* tem uma capacidade de vôo de 50 a 800m, portanto, a sua dispersão à longas distancias, só pode ser explicada por migração passiva, através da atividade humana e rotas comerciais, podendo assim influenciar a estrutura genética do vetor nas diferentes regiões (SCARPASSA et al., 2008).

O fluxo gênico (N_m) entre populações estabelecidas reduz a diferenciação genética entre elas, sendo um dos mecanismos responsáveis pela introdução de novas variações genéticas na população receptora (WRIGHT, 1931). Scarpassa et al. (2008) consideraram que as introduções múltiplas têm um impacto epidemiológico muito grande sobre a dengue porque o fluxo gênico pode facilitar a dispersão dos genes relacionados com a transmissão do vírus, e assim aumentar a competência para a transmissão da dengue ou febre amarela.

É interessante notar que, embora a distância geográfica de RP e AR não difira muito de BA e RP, e BA e AR, os valores de G_{st} , nessas comparações, são maiores e os de N_m muito menores, o que poderia ser explicado por maior contato entre as duas localidades.

Entre AR e RP a dispersão passiva poderia estar gerando múltiplas introduções que lhes confeririam essa grande semelhança. Por outro lado, os valores obtidos na comparação das populações mais distantes sugerem que a diferenciação gênica poderia ser decorrente principalmente da diferenciação geográfica.

A avaliação da heterozigose média dentro das populações (H_s) para o total de primers foi igual a $0,129 \pm 0,006$, enquanto o valor médio de H_t isto é, heterozigose no conjunto das populações ser igual a $0,181 \pm 0,016$. A estatística de Nei prevê que G_{st} não pode exceder $1 -$

H_s , o que ocorre nos presentes resultados. O fluxo gênico (N_m), avaliado para cada primer, também mostrou valores inversamente proporcionais. O primer com menor G_{st} e maior N_m foi o de número 9, que aproxima especialmente AR e RP.

A comparação dos dados obtidos no presente trabalho com os dados de outros autores para populações brasileiras de *A. aegypti* mostra, no caso de Ayres et al. (2003), que diferenças macrogeográficas (populações de estados diferentes) apresentam valores de $G_{st} = 0,317$, $N_m = 0,54$, $H_s = 0,274$. Com relação aos dados de Paduan et al. (2006), foram encontrados níveis mais altos de diferenciação ($G_{st}=0,430$; $H_s=0,224$). Hiragi et al. (2009), por sua vez, obtiveram valores de $G_{st} = 0,3689$ e $H_t = 0,2653$.

Com base em Wright (1978) conclui-se que as populações brasileiras mostram altos níveis de diferenciação genética, incluindo também os dados do presente trabalho.

5.2. Similaridade Genética e Dendogramas de Similaridade

A similaridade entre as populações com base em cada primer de acordo com o método estatístico de Nei e Li (1979) reafirmou a menor diferenciação entre RP e AR, seguida da comparação RO X BA.

O agrupamento das populações utilizando o método UPGMA, calculado individualmente para cada primer pelo programa POPGENE 1.31 mostrou variações na produção dos clusters. Os primers 18 e 20 produziram dendogramas que agruparam as populações de forma idêntica, apenas diferindo nas distâncias gênicas entre os clusters. As demais produziram dendogramas diferentes e únicos. O primer que deu origem ao dendograma que melhor representou os dados obtidos quanto à diferenciação gênica, origem geográfica e classificação quanto ao grau de resistência das populações foi o primer 21. O dendograma produzido por este primer agrupou as populações brasileiras em um grande cluster, isolando-as de RO. Dentro do cluster das populações brasileiras foi formado um

cluster menor contendo as populações resistentes, separando-as da população portadora de suscetibilidade diminuída (BA). E finalmente, dentro do cluster que abrange as populações resistentes, houve a formação de um subcluster que agrupou as populações AR e RP, que são geograficamente mais próximas, isolando-as da população SL, que se encontra geograficamente distante dessas duas populações.

5.3. Marcadores de Resistência

Com o objetivo de detectar possíveis candidatos a marcadores de resistência procurou-se em cada primer, por bandas que fossem comuns exclusivamente às populações resistentes e ausentes na população suscetível. Três apresentaram essa possibilidade, L7 gerado pelo primer 18 e L20 e L22 gerados pelo primer 21, cujas frequências variaram entre 13 a 100% (L7, primer 18), 25 a 53 % (L20, primer 21) e 21 e 53% (L22, primer 21). Entendemos que esses três loci merecem um estudo mais aprofundado com outras técnicas, porque eventualmente podem constituir marcadores de resistência.

A característica de *A. aegypti* no que se refere ao deslocamento passivo, dificulta estabelecer as causas da diferenciação ou proximidades genéticas entre suas populações. No presente trabalho, estamos admitindo que o fluxo gênico pela movimentação passiva esteja atuando mais fortemente entre São José do Rio Preto e Araçatuba e a diferenciação das demais populações esteja mais ligada à origem geográfica. Os dados ainda permitem sugerir que a população de Araçatuba tenha sido originada da população de São José do Rio Preto, ou vice-versa, e isto está de acordo com a atividade comercial entre as duas cidades. Não se pode também descartar a possibilidade de que as populações tenham sido derivadas de uma mesma população simultaneamente.

De acordo com Ayres et al. (2003), a alta diferenciação genética das populações brasileiras de *A. aegypti* pode refletir diferenças importantes de competência vetorial, ou

mesmo resistência a inseticidas, de modo que populações de diferentes áreas do Brasil devem ser tratadas como unidades epidemiológicas independentes.

6. CONCLUSÕES

- 1- As cinco populações de *Aedes aegypti* e os seis primers utilizados na técnica RAPD-PCR produziram 178 loci de tamanhos entre 506 e 6871 bp;
- 2- O total de loci polimórficos e exclusivos, para todas as populações e primers, foi igual a 166 e 59 respectivamente. Loci monomórficos só foram observados intrapopulacionalmente, sendo o seu total igual a 12;
- 3- Utilizando o método de Nei (1987) foram obtidos os índices G_{st} (diferenciação gênica), H_t (heterozigose total), H_s (heterozigose média) e N_m (fluxo gênico), cujos valores indicaram alta diferenciação gênica entre as populações;
- 4- Os índices de Nei (1978) para a diferenciação gênica (G_{st}), obtidos na análise comparada das populações duas a duas, bem como os índices de similaridade de Nei e Li (1979) mostraram variações da diferenciação genética entre as comparações, sendo a de Araçatuba e São José do Rio Preto a que apresentou o menor valor de G_{st} , e de São Luís e Rockefeller a que apresentou o maior valor para este índice. As comparações entre São Luís e São José do Rio Preto, e Araçatuba e São José do Rio Preto foram as que apresentaram, respectivamente, o menor e o maior valor para os índices de similaridade;

- 5- A diferenciação menor entre Araçatuba e São José do Rio Preto sugere uma maior interferência do homem pelo processo de deslocamento passivo, o que propicia um maior fluxo gênico entre essas populações. Não se descarta também a possibilidade de que a população São José do Rio Preto tenha dado origem à de Araçatuba, ou vice-versa. A maior diferenciação das demais populações comparadas (São Luís, Bauru e Rockefeller) sugere um peso maior da origem geográfica;

- 6- Os dendogramas construídos com o uso de método estatístico UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), que se baseia nas medidas de distancia gênica entre as populações, de Nei (1978), mostraram diferentes agrupamentos para cada um dos primers, sendo que os primer 18 e 20 apresentaram agrupamentos mais semelhantes e o primer 21 foi o que deu origem ao dendograma mais concordante com a distribuição geográfica das populações;

- 7- Entre os fragmentos obtidos, três podem ser considerados candidatos a marcadores de resistência (L7, do primer 18, e L20 e L22, do primer 21), uma vez que ocorreram nas populações classificadas como resistentes, e foram ausentes na linhagem suscetível. Esses fragmentos devem ser submetidos a um estudo mais aprofundado a fim de checar esta possibilidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIEH, S. H.; SALEM, L. M.; HASSANANE, M. S.; MAHROUS, K. F. Genetic analysis between and within three Egyptian water buffalo Populations using RAPD-PCR. **Journal of American Science**, v. 6, n. 6, p. 217-226, 2010.

AHMAD, F.; KHAN, A. I.; AWAN, F. S.; SADIA, B.; SADAQAT, H. A.; BAHADUR, S. Genetic diversity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm in Pakistan as revealed by RAPD analysis. **Genetic and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1414-1420, 2010.

AMIRI, R.; MESBAH, M.; MOGHADDAM, M.; BIHAMTA, M. R.; MOHAMMADI, S. A.; NOROUZI, P. A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in *Beta vulgaris*. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 1, p. 112-119, 2009.

AMORÍN, M. A.; VILA, M.; RIVERA, A. C. Population genetic structure of two threatened dragonfly species (Odonata: Anisoptera) as Revealed by RAPD analysis. **Relict Species: Phylogeography and Conservation Biology**, Part IV, p. 295-308, 2010.

ANUNTALABHOCHAI, S.; PHROMTHEP, W.; SITTHIPHROM, S.; CHUNDET, R.; CUTLER, R. W. Phylogenetic diversity of *Ficus* species using HAT-RAPD markers as a measure of genomic polymorphism. **The Open Agriculture Journal**, v. 2, p. 62-67, 2008.

APOSTOL, B. L.; BLACK, W. C.; REITER, P.; MILLER, B. R. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. **Heredity**, v. 76, p. 325-334, 1996.

AUAD, A. M.; DOMINGUES, R.; MACHADO, M. A.; SOUZA, L. S.; CARVALHO, G. S.; PAULA-MORAES, S. V. Genetic variability of *Mahanarva* sp (Hemiptera: Cercopidae) collected from different sites in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 2, p. 1005-1010, 2010.

AYRES, C. F. J.; MELO-SANTOS, M. A. V.; SOLÉ-CAVA, A. M.; FURTADO, A. F. Genetic Differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the Major Dengue Vector in Brazil. **Journal Of Medical Entomology**, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R.M.; QUEIROGA, M. F. C.; CASTRO-JR, F.P. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 303-307, 2007.

BIRON, D. G.; LANDRY, B. S.; NÉNON, J. P.; CODERRE D.; BOIVIN, G. Geographical origin of an introduced pest species, *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae), determined by RAPD analysis and egg micromorphology. **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, p. 23–32, 2000.

BRAGA, I. A.; LIMA; J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in Several municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

BRITO, L. G.; REGITANO, L. C. A.; HUACCA, M. E. F.; CARRILHO, E; PAES; M. J.; MOYA- BORJA, G. E. Genotype characterization of the *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) from Brazil, Dominican Republic and Colombia based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 179-184, 2008.

CARVALHO, M. S. L.; CALDAS, E. D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide Temephos in the Federal District, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 1-6, 2004.

CASTIGLIONI, L.; BICUDO, H. E. M. C. Molecular characterization and relatedness of *Haematobia irritans* (Horn Fly) populations, by RAPD-PCR. **Genetica**, v. 124, n. 11-21, 2005.

CERON, C. R; SANTOS, J. R; CAMPOS-BICUDO, H. E. M; The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Revista Brasileira de Genética**, v. 15, p. 201-203, 1992.

CROW, J. F. *Basic concepts in population, quantitative, and evolutionary genetics*. W.H. Freeman: New York, 1986. 273p.

DORTA, D.M.; SILVA, M. L.; LEYA, Y. S.; FERNÁNDEZ, M. C. M.; RODRÍGUEZ, M. C. Susceptibilidad de 3 cepas de *Aedes aegypti* asociada con la aplicación de 3 insecticidas. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 61, n. 2, p. 1-10, 2009.

FALK, D. A.; KNAPP, E.; GUERRAN, E. O. How is genetic diversity distributed in natural populations? Disponível em: <<http://www.nps.gov./plants/restore/pubs/restgene/2.htm>>. Acesso em: 2 fev. 2011.

FIGUEIREDO, R. M. P.; NAVECA, F. G.; BASTOS, M. S.; MELO, M. N.; VIANA, S. S.; MOURÃO, M. P. G.; COSTA, C. A.; FARIAS, I.P. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p. 667-669, 2008.

FLORES, A. E.; SOLIS, G. R.; SALAS, I. F.; RAMOS, F. J. S.; GARCIA, G. P. Resistance to Permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in Northern Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 34, n. 2, p. 167-177, 2009.

FRAGA, E. C.; SANTOS, J. M. M.; MAIA, J. F. Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Manaus-AM, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 2, p. 181-187, 2003.

FRANZ, A. W. E.; SANCHEZ-VARGAS, I.; ADELMAN, Z. N.; BLAIR, C. D.; BEATY, B. J.; JAMES, A. A.; OLSON, K. E. Engineering RNA Interference-based resistance to Dengue Virus Type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 4198-4203, 2006.

GARCÍA-FRANCO, F.; MUÑOZ, M. L.; LOZANO-FUENTES, S.; FERNANDEZ-SALAS, I.; GARCIA-REJON, J.; BEATY, B. J.; BLACK, W. C. Large genetic distances among *Aedes aegypti* populations along the south pacific coast of Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 5, p. 594-598, 2002.

GUIRADO, M. M. Outros Aspectos do Efeito da Cafeína e da Borra do Café em *Aedes aegypti*. São José do Rio Preto, SP. 2004, 148 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP.

GUIRADO, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. . Effect of caffeine on larval mortality of *Aedes aegypti*. Efficiency related to solution concentration and age. **Journal of Entomological Research**, v. 34, p. 0974-4576, 2010.

GUPTA, R.; VERMA, K.; JOSHI, D. C.; YADAV, D.; SINGH, M. Assessment of genetic relatedness among three varieties of finger millet with variable seed coat color using RAPD and ISSR markers. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2010, p.1-9, 2010.

HEMME, R. R.; THOMAS, C. L.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Influence of urban landscapes on population dynamics in a short-distance migrant mosquito: evidence for the Dengue vector *Aedes aegypti*. **Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 1-9, 2010.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sunderland, 1996. 656p.

HIRAGI, C.; SIMÕES, K.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; LIMA, L.; MONNERAT, R. Variabilidade genética em populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 542-547, 2009.

HOANG, T. M. L.; DE-FILIPPIS, L. F.; LE, X. T. Salt tolerance and screening for genetic changes in rice mutants after gamma irradiation using RAPD and microsatellite (RAMP) markers. **The Open Horticulture Journal**, v. 2, p. 62-69, 2009.

HOY, M. A. *Insect Molecular Genetics: an introduction to principles and applications*. California: San Diego, 1994. 546p.

HUBER, K.; LE LOAN, L.; HOANG, T. H.; RAVEL, S.; RODHAIN, F.; FAILLOUX, A. B. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 9, p. 1629–1635, 2002.

JIANG, S.; JIANHUA, X.; LI, X. A Study on the RAPD and SCAR Molecular markers of piper species. **Journal of Agriculture and Rural Development in in the Tropics and Subtropics**, v. 110, n. 2, p. 127–135, 2009.

JULIO, N. B.; CHIAPPERO, M. B.; ROSSI, H. J.; DUEÑAS, J. C. R.; GARDENAL, C. N. Genetic structure of *Aedes aegypti* in the city of Córdoba (Argentina), a recently reinfested area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, 626-631, 2009.

KAWADA, H.; HIGA, Y.; KOMAGATA, O.; KASAI, S.; TOMITA, T.; YEN, N. T.; LOAN, L. L.; SÁNCHEZ, R. A. P.; TAKAGI, M. Widespread distribution of a newly found point mutation in Voltage-Gated Sodium Channel in Pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. **Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 1-7, 2009.

KIM, T. H.; SEO, G. M.; JUNG, K. H.; KIM, S. J.; KIM, J. C.; OH, K. G.; KOO, B. S.; CHAI, Y. G. J. Generation of a specific marker to discriminate *Gacillus anthracis* from other bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 806-811, 2007.

LARANJA, A. T.; MANZATO, A. J.; BICUDO, H. E. M. C. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera; Culicidae) and their possible use in Alternative Control, **Genetics and. Molecular Biology**. 26, 419-429. , 2003

LARANJA, A.T. Estudo complementar sobre a cafeína como agente alternativo no controle de *Aedes aegypti*: comparação e interação com o inseticida larval Temefós, desenvolvimento de resistência e resposta a drogas relacionadas com mecanismos de ação. São José do Rio

Preto, SP. 2005, 124 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Concentração em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas/UNESP.

LIMA, J. B. P.; DA-CUNHA, M. P.; SILVA-JÚNIOR, R. C.; GALARDO, A. K. R.; SOARES, S. S.; BRAGA, I. A.; RAMOS, R. P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes Aegypti* to Organophosphates in several municipalities in the state of Rio De Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LIMA, E. P.; OLIVEIRA-FILHO, A. M.; LIMA, J. W. O.; RAMOS-JÚNIOR, A. N.; CAVALCANTI, L. P. G.; PONTES, R. J. S. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em municípios do estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.

LIMA-CATELANI, A. R. A.; CERON, C. R.; BICUDO, H. E. M. C. Variation of genetic expression during development revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Biochemical Genetics**, v. 42, p. 69-84, 2004.

MACORIS, M.L.G.; CAMARGO, M. F.; SILVA, I. G.; TAKAKU, L.; ANDRIGHETTI, M. T. Modificação da suscetibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temephos / Susceptibility modifications of *Aedes aegypti* to temephos. **Revista De Patologia Tropical**, v. 24, n. 1, p. 31-40, 1995.

MACORIS M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO; V. C.; CIRINO, V. C. B. Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to Organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 1, p. 521-522, 1999.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C.; BRACCO, J.E. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 703-708, 2003.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T.; OTRERA, V. C. G.; CARVALHO, L. R.; CALDAS-JÚNIOR, A. L.; BROGDON, W. G. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 895-900, 2007.

MAROUELLI, L. P.; INGLIS, P. W.; FERREIRA, M. A.; BUSO, G. S. C. Genetic relationships among *Heliconia* (Heliconiaceae) species based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1377-1387, 2010.

MARRELLI, M. T.; LI, C.; RASGON, J. L.; JACOBS-LORENA, M. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on plasmodium-infected blood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 5580-5583, 2007.

MERRILL, S. A.; RAMBERG, F. B.; HAGEDORN, H. H. Phylogeography and population structure of *aedes aegypti* in Arizona. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, p. 304-310, 2005.

MOHANTY, S.; DAS, A. B.; GHOSH, N.; PANDA, B. B.; SMITH, D. W. Genetic diversity of 28 wild species of fodder legume *Cassia* using RAPD, ISSR and SSR markers: a novel breeding strategy. **Journal of Biotech Research**, v. 2, p. 44-55, 2010.

MONTELLA, I. R.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; LIMA, J. B. P.; BRAGA, I. A.; VALLE, D. Insecticide resistance mechanisms of brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.

MUMTAZ, S.; KHAN, I. A.; ALI, S.; ZEB, B.; IQBAL, A.; SHAH, Z.; SWATI, Z. A. Development of RAPD based markers for wheat rust resistance gene cluster (*Lr37-Sr38-Yr17*) derived from *Triticum ventricosum* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1188-1192, 2009.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v.29, p.1-10, 1975.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 5269-5273, 1979.

NEI, M.; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

NEI M. Genetic variation within species. In: *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press: New York, 1987. p 220-221.

NIKNEJAD, A.; KADIR, M. A.; KADZIMIN, S. B.; ABDULLAH, N. A. P.; SORKHEH, K. Molecular characterization and phylogenetic relationships among and within species of *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae) based on RAPD analysis. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 20, p. 5225-5240, 2009.

PADUAN, K. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. P.; RIBOLLA, P. E. M. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 391-395, 2006.

PAMIDIMARRI, D. V. N. S.; SINGH, S.; MASTAN, S. G.; PATEL, J.; REDDY, M. P. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 6., p. 1357-1364, 2008.

PEREIRA, J. C.; LINO, P. G. LEITÃO, A.; JOAQUIM, S.; CHAVES, R.; POUSO-FERREIRA, P.; GUEDES-PINTO, H.; SANTOS, M. N. Genetic differences between wild and hatchery populations of *Diplodus sargus* and *D. vulgaris* inferred from RAPD markers: implications for production and restocking programs design. **Journal of Applied Genetics**, v. 51, n. 1, p. 67–72, 2010.

PONLAWAT, A.; SCOTT, J. G.; HARRINGTON, L. C. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. **Journal Of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 821-825, 2005.

RAY, T.; ROY, S. C. Genetic diversity of *Amaranthus* species from the Indo-gangetic plains revealed by RAPD analysis leading to the development of ecotype-specific SCAR marker. **Journal of Heredity**, v. 100, n. 3, p. 338-347, 2008.

REYES, D.; ALCALÁ, R. E.; ARIAS, D.; OSORIO-BERISTAIN, M. Genetic structuring at a fine scale in the russet-crowned motmot (*Momotus mexicanus*) in a tropical dry forest in Central Mexico. **Western North American Naturalist**, v. 69, n. 2, p.171-174, 2009.

RODRÍGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; FERNÁNDEZ, D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American Countries. **Journal of the Mosquito Control Association**, v. 23, n. 4, p. 420-429, 2007.

RYMAN, N.; LEIMAR, OLOF Gst is still a useful measure of genetic differentiation — a comment on Jost's D. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 2084–2087, 2009.

SANTOS, V. M.; MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; AVILA, P. E.; KIRCHGATTER, K. Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 99-101, 2003.

SARWAT M.; DAS, S.; SRIVASTAVA, P. S. Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 519-528, 2008.

SCARPASSA, V. M.; CARDOZA, T. B.; CARDOS- JUNIOR, R. P. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 895-903, 2008.

SCHAFFER, W.M.; BRONNIKOVA, T. V. Controlling malaria: competition, seasonality and 'slingshotting' transgenic mosquitoes into natural populations. **Journal of Biological Dynamics**, v. 3, n. 2-3, p. 286–304, 2009.

SECCACINI, E.; LUCIA, A; ZERBA, E.; LICASTRO, S.; MASUH, H. *Aedes aegypti* resistance to Temephos in Argentina. **Journal of the Mosquito Control Association**, v. 24, n. 4, p. 608-609, 2008.

SHARMA, A.K.; MENDKI, M.J.; TIKAR, S.N.; CHANDEL, K.; SUKUMARAN, D.; PARASHAR, B.D.; VEER, V.; AGARWAL, O.P.; PRAKASH, S. Genetic variability in geographical populations of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from India based on random amplified polymorphic DNA analysis. **Acta Tropica**, v. 112, p. 71–76, 2009.

SINGH, D.; MEHTA, R.; TALATI, J G. RAPD as a molecular tool for identification of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, parents and hybrid. **Indian Journal of Agricultural Biochemistry**, v. 23, n.1, 2010.

SIVARAMAN, G. K.; SANJEEV, K. Estimation of genetic distance between specialized broiler chicken lines selected divergently for immunocompetence index using RAPD-PCR data. **The Indian Journal of Veterinary Research**, v. 17, n. 2, p.1-8, 2008.

SOLIANI, C.; RONDAN-DUEÑAS, J.; CHIAPPERO, M. B.; MARTINEZ, M.; GARCIA DA ROSA, E.; G ARDENAL, C. N. Genetic relationships among populations of *Aedes aegypti* from Uruguay and northeastern Argentina inferred from ISSR-PCR data. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, p. 316–323, 2010.

SOUSA, R. C.; BICUDO, H. E. M. C. X chromosome heterochromatic pattern and nucleolar synthesis in pupal ovaries of *Aedes aegypti*. **Cytobios**, v. 93, p. 185 –193, 1998.

SOUSA, R. C.; BICUDO, H. E. M. C. Heterochromatic banding pattern in two brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Genetica**, v. 105, p. 93-99, 1999.

SOUSA, R. C.; BICUDO, H. E. M. C. Morphometric changes associated with sex and development in the malpighian tubules of *Aedes aegypti*. **Cytobios**, v. 102, p. 173-186, 2000.

SOUSA, G. B.; BLANCO, A.; GARDENAL, C. N. Genetic relationships among *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Argentina using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction markers. **Journal Of Medical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 371-375, 2001.

SOUSA-POLEZZI, R. C.; BICUDO, H. E. M. C. Effect of phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti* (Díptera; Culicidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 275-283, 2004.

SOUSA-POLEZZI, R. C.; BICUDO, H. E. M. C. Genetic variation along time in a brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by changes in the esterase patterns. **Genetica**, v. 125, p. 43-53, 2005.

SPADA, R. G. M.; SILVA, D.; ABDEL-HAMID, A-Z.; SOBRAL-HAMAGUCHI, S. S.; ZUIM, N. R. B.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; RIBEIRO-PAES, J. T. Genetic markers between biomphalaria glabrata snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 53-58, 2002.

SUKONTHABHIROM, S.; SAENGTHARATIP, S.; JIRAKANCHANAKIT, N.; RONGNOPARUT, P.; YOKSAN, S.; DAORAI, A.; CHAREONVIRIYAPHAP, T. Genetic structure among Thai populations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Vector Ecology**, v. 34, n. 1, p. 43-49, 2009.

URDANETA-MARQUEZ, L.; BOSIO, C.; HERRERA, F.; RUBIO-PALIS, Y.; SALASEK, MICHAEL; BLACK, W. C. Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by mitochondrial DNA variation and nuclear single nucleotide polymorphisms. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 3, p. 479-491, 2008.

WILLIAMS, J. G. K; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. *Evolution and genetics of populations: the theory of gene frequencies*. University of Chicago Press: Chicago, 1969.

WRIGHT, S. *Evolution and the genetics of populations*. University of Chicago Press: Chicago, 1978.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T., 1999. POPGENE version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetics analysis. University of Alberta, Edmonton. Free program distributed by the authors at <http://www.ualberta.ca/fyeh/index.htm>.

ZHONG, D.; MENGE, D. M.; TEMU, E. A; CHEN, H.; YAN, G. Amplified fragment length polymorphism mapping of quantitative trait loci for malaria parasite susceptibility in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics Society of America**, v. 173, p. 1337-1345, 2006.