

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

MELINA AULINO DA SILVA MACHADO DE CAMPOS

Análise temporal da dinâmica populacional do mosquito *Aedes*  
*aegypti*

BOTUCATU – SP

2011

MELINA AULINO DA SILVA MACHADO DE CAMPOS

Análise temporal da dinâmica populacional do mosquito *Aedes*  
*aegypti*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção Trabalho  
de Conclusão de Curso.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

BOTUCATU – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Campos, Melina Aulino da Silva Machado.

Análise temporal da dinâmica populacional de *Aedes aegypti* / Melina Aulino da Silva Machado de Campos. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Capes: 20200005

1. Genética. 2. *Aedes aegypti*. 2. Dengue.

Palavras-chave: Genotipagem; SNPs; TaqMan.

“ Agir com sabedoria assegura o sucesso”  
Eclesiastes

## **Resumo**

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Como não há tratamento específico ou vacina eficiente, a medida de controle é o combate ao vetor, sendo o culicídeo *Aedes aegypti* o principal. Acredita-se que a densidade populacional desse vetor é maior nos períodos quentes e chuvosos do ano, do que nos períodos frios e secos. O estudo analisou geneticamente a dinâmica populacional da espécie, mediante as variações climáticas. Foram feitas coletas pelo menos uma vez em ambos os períodos ao longo de cinco anos, por armadilhas de oviposição na cidade de Botucatu. A análise genética foi viabilizada pela técnica TaqMan de discriminação alélica, utilizando SNPs de nove genes distribuídos nos três cromossomos do mosquito. Pela análise bayesiana, não houve variação na estruturação populacional das coletas, e a análise estatística apresentou percentagem de variação entre as coletas foi baixa ( $F_{ST} = 0,0028$ ;  $p=0,763$ ), além disso as frequências alélicas foram constantes. Os resultados mostram que, apesar da grande variação na densidade dos adultos, o tamanho populacional não varia. Portanto, há uma variação na prevalência da forma de vida da espécie: adultos nos meses quentes e chuvosos e, possivelmente ovos nos frios e secos; implicando em estratégias de controle diferentes para cada período. Além disso, a estimativa do tamanho populacional não deve considerar somente adultos alados, mas todas as outras formas de vida do mosquito encontradas.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*, *Single Nucleotide Polymorphisms*, populações, TaqMan.

## **Abstract**

Dengue virus is a major public health problem worldwide. *Aedes (Stegomyia) aegypti* is the main dengue vector. Since there is no specific treatment or effective vaccine, control measure is focused on vector control. It is believed that population density is higher in the warmer/rainy season than in cold/dry. The study aimed to genetically characterize population dynamics of *Ae. aegypti* during climatic variations. Collections were performed at least once in both periods over five years by oviposition traps at Botucatu city. The technique of TaqMan allelic discrimination was used for genetic analysis, in which SNPs from nine genes distributed on three chromosomes of the mosquito were genotyped. Bayesian analysis did not show variance on population structure over the five year period. The percentage of variation among samples in statistical analysis was low ( $F_{st} = 0.0028$ ,  $p = 0.7634$ ), furthermore the allele frequencies were constant. The results show that despite wide variation in the density of adults, population size does not vary. Therefore, there is variation in the prevalence of the species life stages: adults in warmer/rainy, and possibly eggs in cold/dry, resulting in different control strategies for each period. Moreover, estimation of population size should not consider only winged adults, but all other found life stages forms.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, Single Nucleotide Polymorphisms, populations, TaqMan.

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	iv
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	3
<b>3. Objetivos</b> .....	10
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	12
4.1. População do estudo .....	13
4.2. Metodologia da coleta .....	13
4.3. Estudo genético populacional por SNPs .....	14
4.3.1. Preparação do DNA .....	14
4.3.2. Diluição do DNA .....	15
4.3.3. Genes de interesse .....	15
4.3.4. Montagem das placas .....	16
4.3.5. Reação de TaqMan .....	16
4.4. Análises da estrutura genética populacional – SNPs .....	17
4.4.1. Obtenção dos dados .....	17
4.4.2. Frequências alélicas .....	17
4.4.3. Equilíbrio de Hardy- Weinberg .....	18
4.4.4. Análise da Estrutura genética populacional .....	19
4.4.5. Estruturação populacional .....	19
<b>5. Resultados</b> .....	21
5.1. Coleta de <i>Ae. aegypti</i> .....	22
5.2. Estudo genético por SNPs .....	22
5.2.1. Reação de TaqMan – Caracterização de SNPs .....	22
5.3. Análise da estrutura genética populacional .....	25
5.3.1. Frequências alélicas .....	25
5.3.2. Equilíbrio de Hardy – Weinberg .....	25
5.3.3. Análise da estrutura genética populacional .....	26
5.3.4. Estrutura populacional .....	26
<b>6. Discussão</b> .....	29
<b>7. Conclusões</b> .....	32
<b>8. Referências</b> .....	34

# *1.Introdução*



## 1. Introdução

O controle do mosquito *Aedes aegypti* é o único elo vulnerável da cadeia epidemiológica da dengue. Atualmente este vetor é encontrado em condição domiciliada em todos os Estados brasileiros (Ministério da Saúde, 1998). Estudos ecológicos de *Ae. aegypti* sugerem que a densidade vetorial exibe variação sazonal: diminui nas estações secas, e tem um pico nas estações chuvosas (Huber et al, 2000, Focks, 2003). Gargalos genéticos, devido à influência da variação sazonal e, como observado por Lerdthusnee e Chareonviriyaphap (1999), ao tratamento inseticida reduzem a variabilidade genética de populações. Além disso, as novas introduções do vetor desempenham papel fundamental na mudança na composição alélica. O conhecimento aprofundado sobre a estruturação genética e dinâmica populacional desta espécie tem, cada vez mais, se tornado crucial. Uma vez que populações geneticamente diferentes podem apresentar diferenças quanto a sua capacidade e competência vetorial.

## *2.Revisão Bibliográfica*

## 2. Revisão Bibliográfica

O *Aedes aegypti* é o mais importante vetor dos vírus da dengue e da febre amarela urbana. A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, infectando anualmente de 50 a 100 milhões de pessoas em mais de 100 países e, infelizmente, apesar de todos os esforços de pesquisa, não há vacina eficaz. O único elo vulnerável da cadeia epidemiológica são os vetores, os culicídeos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, ambos introduzidos no Brasil (Tauil, 2001).

O *Ae. aegypti* é um díptero da família Culicidae, pertencente à subfamília Culinae e ao subgênero *Stegomyia* (Gubler, 1998). Originário da África, especialmente no território onde hoje se situa a Etiópia. A partir desta localidade, o mosquito se dispersou pelo mundo ao longo das rotas comerciais durante os séculos XVII, XVIII e XIX, distribuindo-se amplamente nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, principalmente entre os paralelos de 45°N e 30°S (Slosek, 1986).

Como é possível observar, a doença foi reconhecida há aproximadamente 200 anos e tem apresentado caráter epidêmico e endêmico variado tendendo a agravar nos últimos anos. O impacto dessa doença sobre a população humana é notado, não apenas pelo desconforto que causa, como pela ocorrência de óbitos, principalmente entre crianças. Existem prejuízos econômicos expressivos em gastos com: tratamento, hospitalização, controle dos vetores, abstenção ao trabalho e perdas com turismo (WHO, 1997; Holmes et al., 1998).

Os mosquitos têm hábitos domésticos e diurnos, suas formas típicas adultas apresentam coloração castanha e são frequentemente ornamentados com manchas e desenhos de escamas claras, no tórax e nas pernas. Apresentam metamorfose completa, isto é, possuem quatro estágios de vida, sendo três deles aquáticos - ovos, larvas e pupas, e um terrestre - adulto. As fêmeas sugam sangue de mamíferos e por isso muitas acabam sendo vetores de diversas moléstias, dentre elas o dengue, destaca-se tanto pela dimensão dos agravos que provoca, como pela quantidade de recursos, em saúde pública, que demanda para seu controle.

O *Ae. albopictus* tem sua origem no sudeste da Ásia e foi descrito por Skuse em 1894. Essa espécie é observada nas áreas tropical e subtropical, assim como o *Ae. aegypti*, mas também pode resistir ao frio das áreas de clima temperado do globo. Estão distribuídos por todos os continentes, entre latitudes 35° Norte e 35° Sul em geral, faixa que apresenta temperaturas relativamente estáveis no inverno de aproximadamente 10°C (Adegas, M. G., et al., 2005). Normalmente não é encontrada em zonas acima de 1000 metros, porém foi constatada a mais de 2000 metros de altitude na Índia e Colômbia, o que demonstra sua capacidade de adaptação às variações climáticas. É encontrada em regiões urbanas e rurais das cidade, porém não apresenta uma antropofilia tão acentuada quanto *Ae. aegypti*. Realiza oviposição preferencialmente em recipientes naturais como casca de coco, ocos de árvores e bambus e axilas de plantas como bromélias e bananeiras, (SUCEN, 1997).

O ciclo evolutivo destes Dípteros é iniciado com a cópula dos adultos, normalmente em vôo e próxima aos criadouros. Uma única inseminação é suficiente para fecundar todos os ovos que a fêmea produzirá durante toda sua vida. Após o acasalamento, as fêmeas realizam o repasto sanguíneo em vertebrados, preferencialmente o homem, é necessário para a maturação dos ovos. O período entre o repasto sanguíneo e a oviposição é chamado de Ciclo Gonotrófico que, em condições favoráveis, níveis elevados de umidade relativa e temperatura (26° a 46° C), varia entre 2 e 3 dias (SUCEN, 1997).

A fêmea ovipõe de 80 a 100 ovos por vez, inicialmente, depois a quantidade diminui para 25 a 30 ovos, realiza esse processo repetidamente 12 a 14 vezes, totalizando 300 a 450 ovos (SUCEN, 1997). Os ovos são depositados a milímetros acima da superfície da água, nas bordas dos recipientes escolhidos pelas fêmeas. Os ovos eclodem em aproximadamente 30 minutos quando em água, podendo demorar dias, porém se as condições ambientais forem desfavoráveis e os ovos poderão permanecer viáveis por um período de um a dois anos.

A preferência das fêmeas pelos depósitos artificiais como locais de oviposição faz com que a concentração populacional advinda com a urbanização, ao lado da larga utilização moderna de recipientes artificiais, seja fator determinante na sua crescente proliferação nos centros urbanos. Como exemplos de criadouros artificiais podem-se citar pneus, latas, caixas d'água e piscinas. Nesses criadouros, as fêmeas depositam seus ovos, isoladamente, em um substrato úmido, próximo a água ou em local inundável. O

crescimento e desenvolvimento das larvas variam com a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro. Este ciclo geralmente se desenvolve em um curto espaço de tempo, podendo variar entre 10 a 15 dias, contribuindo para o aumento da densidade populacional da espécie (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Em meados dos anos 40, até os anos 60, a dengue foi praticamente eliminada de muitos países em quase toda a América, incluindo o Brasil, em virtude do combate ao vetor em escala continental (Soper, 1965). Contudo, devido à redução da vigilância e dos programas de controle, observou-se a reinfestação do *Ae. aegypti* em 1967, provavelmente originada dos países que não obtiveram êxito em sua erradicação (Franco, 1976). No Estado de São Paulo, os primeiros registros da presença do *Ae. aegypti* datam de 1980, na zona portuária de Santos. Em 1985, a espécie foi observada na região oeste do Estado, provavelmente introduzida a partir do Mato Grosso e/ou Paraná (Glasser, 1997). A partir deste ponto, a progressão geográfica da infestação ocorreu na direção dos municípios situados de oeste para leste. Enfim, desde a re-introdução em 1967, não houve mais sucesso na eliminação deste culicídeo, que atualmente está presente em condição domiciliada em todos os Estados brasileiros (Ministério da Saúde, 1998).

No município de Botucatu, especificamente, foram localizados os oitos primeiros focos de *Ae. aegypti* no ano de 1986, e apesar dos diversos programas de erradicação, os vetores permanecem na região. Localizado no centro sul do Estado de São Paulo, a cidade apresenta grandes oscilações do vetor durante o ano, causadas pelas características de temperatura e precipitações pluviométricas locais (Rueda, 2008).

Na tentativa de se manter estratégias efetivas de controle, é importante o desenvolvimento de novas ferramentas para o entendimento das relações entre o vetor, patógeno e o homem. Dentre estas ferramentas o entendimento de características como capacidade vetorial, resistência a inseticida e dinâmica populacional do vetor. O uso de inseticida químico tem sido largamente empregado, entretanto, de modo geral, mosquitos vetores de agentes infecciosos manifestam alto grau de plasticidade genética (Besansky et al., 1992). Uma das conseqüências desta elevada flexibilidade genética é a alta freqüência com que populações de mosquitos adquirem resistência múltipla a inseticidas químicos ou

biológicos utilizados no seu controle (Groetes & Tabachnik, 2000; Hemingway & Ranson, 2000; Ferre & Van Rie, 2002).

Muitos estudos, desde o final da década de 1970, têm demonstrado a variabilidade genética presente em populações do *Ae. aegypti* (Tabachnick & Powell, 1979). Atualmente existem vários métodos que possibilitam a análise da variabilidade genética. Loxdale & Lushai (1998) publicaram uma extensa revisão de marcadores moleculares, usualmente utilizados para examinar a variabilidade genética, em populações de mosquito. A escolha do marcador utilizado em cada estudo depende do objetivo, do nível de observação desejada e da espécie estudada (Roderick, 1996).

Os polimorfismos dos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1992) têm sido muito empregados no estudo de populações naturais de *Ae. aegypti* (Ballinger-Crabtree et al., 1992; Apostol et al., 1994; Gorrochotegui-Escalante et al., 2000). Estudo realizado em nosso laboratório, 11 populações naturais de *Ae. aegypti* foram analisadas utilizando-se marcadores RAPD. Os resultados indicam que as populações brasileiras deste vetor estão estruturadas em três regiões geográficas (Norte, Nordeste e Sudeste), sugerindo a presença de subpopulações estruturadas com indicativo de isolamento genético por distância (Paduan et al., 2005).

A utilização de genes mitocondriais como marcadores moleculares têm demonstrado grande importância no reconhecimento de espécies crípticas, estudos filogenéticos ou na estrutura genética de populações (Conn et al., 1993; Besansky et al., 1997; Gorrochotegui-Escalante et al., 2000, 2002). Análises de populações brasileiras de *Ae. aegypti* por genes mitocondriais, COI (*Citocromo Oxidase I*) e ND4 (*NADH desidrogenase subunidade 4*), foram realizadas em nosso laboratório e permitiram inferir sobre a presença de linhagens mitocondriais. Os resultados indicaram a presença de linhagens mitocondriais independentes de origem polifilética. Não há relação dos haplótipos com a localização geográfica das amostras (Paduan & Ribolla, 2009).

Uma vez que estas pesquisas permitiram inferir pouco sobre a discriminação geográfica de populações locais do mosquito *Ae. aegypti*, a inclusão de marcadores baseados em SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) no estudo de insetos vetores tem se tornado claramente necessária (Zhang & Hewit, 2003). A tecnologia disponível aliada à necessidade de maior refinamento, na detecção de polimorfismos e saturação de mapas de

análise genética, permitiu o desenvolvimento dos marcadores SNPs. Tais marcadores correspondem a diferenças na posição de um único nucleotídeo, ocorridas por substituições, deleções ou inserções, representando a forma mais frequente de variação em genomas de vertebrados e invertebrados (Taillon-Miller et al., 1998; Brookes 1999). Os esforços para se identificar SNPs têm sido acelerados pela utilidade do sequenciamento completo do genoma de algumas espécies e pela emergência de ferramentas de genotipagem de alta resolução (Syvanen, 2001).

No genoma do mosquito *Anopheles gambiae* foram identificados um total de 443.963 SNPs ao longo de 278 Mb de comprimento, representando uma frequência de  $1,6 \times 10$  (Holt et al., 2002) e, então esta quantidade de polimorfismos elevou as possibilidades de se expandir os estudos baseados nestes marcadores. SNPs localizados em regiões não-codificantes do genoma, e SNPs de sítios sinônimos em regiões codificantes sem impacto direto no genoma, fornecem ferramentas de grande utilidade para estudos de evolução e genética de populações. Enquanto que, SNPs de sítios não sinônimos que alteram a estrutura e a função potencial das proteínas codificantes, representam marcadores alvo para se identificar variações genéticas associadas com características complexas.

O método para genotipar SNPs deve fornecer estimativas acuradas da frequência de alelos, além de ter tempo e custo baixos para sua realização. Atualmente existem diferentes métodos disponíveis para genotipagem por SNPs em amostras individuais (Syvanen, 2001). Muitos métodos incluem sistemas de genotipagem *highthroughput*, que requerem equipamentos caros, não sendo, portanto viáveis para trabalhos com poucos SNPs, ou menor número de amostras. Um método simples e de baixo custo para a genotipagem de SNPs iria melhorar a acessibilidade para todos os laboratórios minimamente equipados.

Entre os simples métodos de genotipagem de SNPs, estão o CAPS (*Cleaved amplification polymorphic site*) ou PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) que são largamente aplicados (Iwaki et al. 2002; Yanaginasawa et al. 2003; Yamanaka et al. 2004). Contudo, estes métodos são demorados e não são aplicáveis para todos os SNPs, devido ao custo elevado de enzimas de restrição (Bundock et al. 2005). Um método alternativo é o PASA (*PCR allele-specific amplification*), vantajoso pela detecção do produto amplificado ser no gel de agarose. Por outro lado, a mudança de pares de base única na extremidade 3' do oligonucleotídeo muitas

vezes não é suficiente para assegurar a discriminação de confiança entre os dois alelos do SNP (Ahmadian et al. 2001), e duas reações são necessárias, uma para cada alelo (Kim et al. 2005).

O ensaio TaqMan® é considerado uma ferramenta bastante útil para a detecção de polimorfismo SNP. Nesta técnica são utilizadas moléculas *reporters* (VIC™ e FAM™), formadas por um fluoróforo na região 5' da sonda, e *quencher*, que está ligada a molécula *reporter*, absorvendo sua energia. Na clivagem da ligação da sonda alvo específico que hibridiza com a cadeia complementar cria um sinal de fluorescência, devido a degradação da sonda pela atividade nuclease da enzima *Taq* DNA polimerase. Durante a PCR, as moléculas *reporter* e *quencher* são separadas, permitindo a emissão da fluorescência do *reporter*, a detecção e quantificação garantem a genotipagem da amostra (Novais et al., 2004). Portanto, se o sinal de fluorescência é único, detecta-se homozigose, por outro lado se o sinal de fluorescência incluir dois fluoróforos, detecta-se heterozigose. Essa metodologia tem alta sensibilidade e especificidade, além de ter fácil execução, pouco sujeita a contaminações e com produção mais rápida quando comparada a PCR padrão (Holland et al., 1991).

Desta forma, o conhecimento aprofundado sobre a estruturação genética e dinâmica populacional desta espécie tem, cada vez mais, se tornado crucial. Uma vez que populações geneticamente diferentes podem apresentar diferenças quanto a sua capacidade e competência vetorial. Além disso, dados sobre o monitoramento das populações circulantes do mosquito, relacionados com dados de casos de dengue e resistência a inseticidas durante os períodos epidêmicos e inter epidêmicos, podem constituir uma alternativa eficaz para prevenir as epidemias.



### ***3. Objetivos***

### 3. Objetivos

O presente projeto visa:

- Estudar geneticamente a espécie *Ae. aegypti*, no município de Botucatu, São Paulo, Brasil.
- Observar a partir dos dados obtidos pela genotipagem por SNPs a variação sazonal do vetor *Ae. aegypti* no município de Botucatu.
- Incrementar a vigilância epidemiológica do município de Botucatu com análise genética dos espécimes coletados.

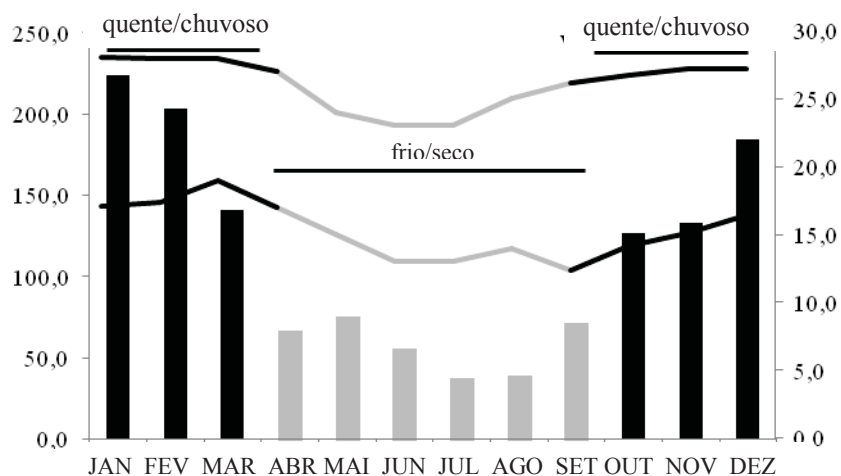
## ***4. Materiais e Métodos***

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Populações do estudo

Mosquitos *Ae. aegypti* foram coletados pelo Serviço de Vigilância Epidemiológica da Cidade de Botucatu/SP. Em 2005 as coletas foram realizadas nos meses abril, junho e novembro; em 2006, nos meses fevereiro e novembro; em 2007, nos meses março e agosto; em 2009, nos meses agosto e novembro; e em 2010, nos meses de fevereiro, maio, setembro e novembro. De um modo geral, as coletas foram realizadas anualmente em pelo menos um período com altas temperaturas e índice pluviométrico elevado (novembro a abril), e um período com temperaturas baixas e índice pluviométrico baixo (maio a outubro). Conforme mostra a tabela da climatologia da cidade.

**Tabela.** Climatologia de Botucatu. Fonte: Jornal do Tempo. temperaturas e índice pluviométrico.



### 4.2. Metodologia de coleta

Foi utilizado armadilha de oviposição (ovitrampa), proposta por Fay & Eliason (1966), na qual contém como substrato para oviposição uma palheta de Eucatex com tamanho de 2,5 x 12,5cm acondicionada dentro de um frasco preto de aproximadamente 500 mL. Foi realizada uma estimativa do número mínimo de pontos para instalação

segundo o número de imóveis do município que foi dividido em áreas, setores e quadrantes. Em cada quadrante sorteado foi instalada uma armadilha, assim a distribuição das ovitrampas cobriu toda a extensão geográfica do município. Todas as palhetas, identificadas com um número/letra referente a sua localização, foram instaladas por um período de 3 semanas. A cada semana as palhetas positivas, ou seja palhetas que continham ovos, foram retiradas e acondicionadas. Ao final do período todas as palhetas positivas foram encaminhadas ao laboratório Pangene, Departamento de Parasitologia – IBB- Unesp/ Botucatu.

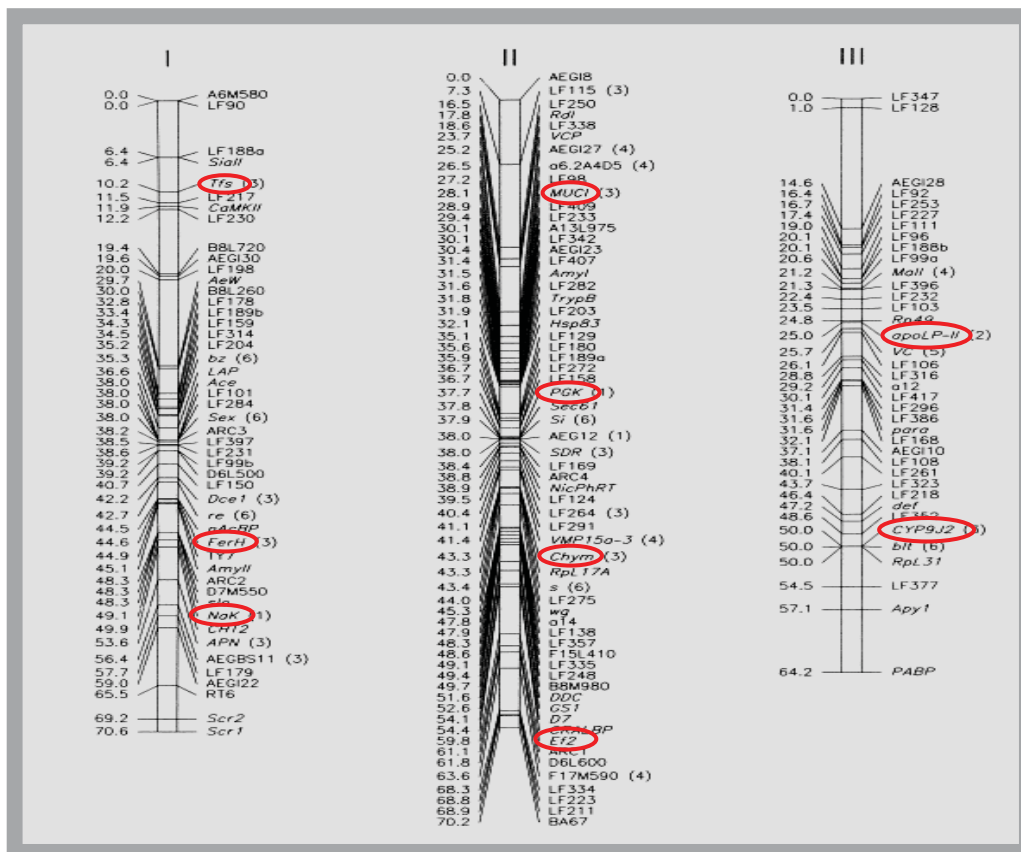
No laboratório, as palhetas positivas foram inspecionadas em lupa para análise do número de ovos por ponto de amostragem. No insetário, os ovos foram mantidos até o estágio adulto em condições controladas (temperatura de 27° C, umidade relativa de 80% e foto período de 12h). Quando atingiram o estágio de pupas foram transferidas para um copo e acondicionadas em uma gaiola de triagem para identificação individual dos insetos adultos emergidos. Depois de identificados os adultos foram congelados a 20°C até o momento da análise genética.

### **4.3. Estudo genético populacional por SNPs**

**4.3.1. Preparação do DNA** - Foi utilizado em tampão de extração resina Chelex100<sup>®</sup> *Molecular Biology Grade Resin* (Bio-Rad Laboratories), preparada a 5% conforme as recomendações do fabricante. Um volume de 300 µl da solução foi distribuído em tubos de 1,5 ml, onde cada mosquito foi individualmente triturado com auxílio de um pistilo. Após, foi seguido o protocolo de preparação; os tubos foram agitados por 10-15 s; centrifugados a alta velocidade (13000 rpm – 30 s); incubados por 30 min a 80°C em banho seco; agitados novamente por 10-15 s e centrifugados a alta velocidade (13000 rpm – 30 s). Em seguida, foi retirado o sobrenadante que foi transferido para um novo tubo. A concentração do DNA foi estimada submetendo-se 2 µl do DNA de cada amostra ao espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup> (ND-1000). Após a quantificação as amostras foram acondicionadas em freezer -20°C.

**4.3.2. Diluição das amostras** – As amostras foram diluídas com água milliQ (18.3) autoclavada em concentração padrão de 20ng/μl e acondicionadas em placas de 96 poços.

**4.3.3. Genes de interesse** - Nove marcadores SNPs para os genes *AeIMUC1* (Mucin-like protein), *apolLp-II* (Apolipoprotein II), *Ef-2* (Elongation factor), *Na/K* (Sodium/potassium channel), *PGK* (Phosphoglycerate kinase), *CYP9J2* (Cytochrome P450), *Chym* (Chymotripsin), *FerH* (Ferritin), *TSF* (Transferrin) foram previamente selecionados, para o estudo populacional do *Ae. aegypti* no Brasil (Paduan & Ribolla, 2009). Estes genes foram escolhidos por se mostrarem polimórficos neste estudo realizado no Brasil e por estarem situados em diferentes regiões dos três cromossomos do *Ae. aegypti* (Figura 1), o que minimiza o efeito de desequilíbrio de ligação; além de se mostrarem envolvidos em processos importantes como: digestão, resistência a inseticidas, susceptibilidade a patógenos, reposta imune, etc.



**Figura 1.** Localização cromossômica dos genes selecionados para o estudo de genotipagem por SNPs do mosquito *A. aegypti*. Fonte: Severson et al., (2002).

A partir destes marcadores de SNPs foram construídos oligonucleotídeos e sondas TaqMan® (*Assay-by-Design 40x*) pela Applied Biosystems. Essas sondas possuem dois diferenciais: na extremidade 3' possui o “*quencher*” que não apresenta qualquer fluorescência e uma molécula própria. Isto permite, respectivamente, uma medida mais precisa da contribuição do fluoróforo da extremidade 5' e uma ligação mais forte da sonda à cadeia complementar, aumentando, deste modo, a respectiva temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>).

**4.3.4. Montagem das placas** – Foram selecionadas 46 indivíduos obtidos pelas coletas dos anos 2005, 2006, 2007 e 2009 para amostragem. Esses foram esquematizados em duas placas de 96 poços de 200 µl, contendo portanto, indivíduos de duas coletas (uma placa incluiu amostras de 2005 e 2006 e outra amostras de 2007 e 2009), segundo número e código de identificação; mais quatro poços restantes deixados para três controles positivos e um negativo, como exemplificado na figura 4. Os controles positivos são amostras cujo genótipo é conhecido (um homocigoto para cada alelo e um heterocigoto), e o negativo contém o conjunto de reagentes sem DNA. As amostras de 2010 serão colocadas em uma única placa após o término da coleta de novembro deste ano.

#### Placa de amostras

*abril, junho e novembro de 2005; fevereiro e novembro de 2006.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	37m1A	38f1A	44f1A	44m1A	53f1A	53m1A	54f1A	54m1A	60f1A	60m1A	80f1A	83f1A
B	83m1A	86f1A	86m1A	87m1A	91f1A	91m1A	94f1A	94m1A	114f1A	2f2A	2m2A	3f2A
C	3m2A	10f2A	10m2A	16f2A	16m2A	46f2A	46m2A	78f2A	78m2A	92f2A	92m2A	5m3A
D	17f3A	17m3A	25f3A	90f3A	90m3A	99f3A	99m3A	102f3A	110f3A	110m3A	1f1B	6m1B
E	13m1B	14f1B	14m1B	17m1B	20m1B	23f1B	25f1B	25m1B	26f1B	28f1B	28m1B	Controle positivo
F	29m1B	31f1B	33m1B	36f1B	39f1B	39m1B	41f1B	42m1B	44m1B	45f1B	45m1B	Controle positivo
G	52m1B	65f1B	66f1B	67f1B	67m1B	81f1B	85f1B	91f1B	91m1B	92m1B	93m1B	Controle positivo
H	94f1B	95f1B	95m1B	96f1B	96m1B	100m1B	109f1B	109m1B	30f2B	30m2B	105m2B	No

**Figura 4.** O primeiro número que pode ser de 1 a 120, se refere ao quadrante de onde a palheta foi originada. As letras f e m, representam se o indivíduo fêmea ou macho, respectivamente. 1A – abril de 2005; 2A – junho de 2005; 3A – novembro de 2005. 1B – fevereiro de 2006; 2B – novembro de 2006.

**4.3.5. Reação TaqMan®** - O DNA de cada mosquito individual foi submetido à amplificação pela PCR em tempo real através da plataforma StepOnePlus™ v. 2.1 (Applied Biosystems) utilizando-se placas ópticas de 96 poços e sistema TaqMan® para a

discriminação alélica. As reações da PCR foram preparadas em um robô *Corbett Robotics* (Corbett Life Science), utilizando o conjunto de reagentes 2x QuantiFast Probe PCR Master Mix (Qiagen) contendo: HotStartTaq *Plus* DNA polimerase, QuantiFast Probe PCR Buffer, *desoxinucleotídeo* trifosfato (dNTPs), fluoróforo de referência passiva (ROX), de acordo com instruções do fabricante. O protocolo de reação utilizou 5 µL de 2x QuantiFast Probe PCR Master Mix, 0,5 µL do *Assay-by-Design* 20x, conjunto de oligonucleotídeos e sondas marcadas com dois fluoróforos distintos - VIC™ e FAM™, específicos para cada alelo (Applied Biosystems), aproximadamente 30 ng/µL de DNA genômico e H<sub>2</sub>O q.s.p., sendo 10 µL o volume final.

As condições iniciais de amplificação foram 3 min a 95°C (ativação *Taq* DNA polimerase) seguidos de 40 ciclos a 92°C por 3 s (desnaturação), 60°C por 30 s (anelamento/extensão). O aumento da fluorescência VIC™ e FAM™ foi monitorado em tempo real pela aquisição de cada ciclo no canal amarelo (excitação em 530nm e emissão em 555nm) e no canal verde (excitação em 470nm e emissão em 510nm) da plataforma StepOnePlus™ v. 2.1 (Applied Biosystems) respectivamente. A determinação dos alelos foi efetuada através do respectivo *software*, tendo-se obtido uma razão entre a fluorescência dos fluoróforos VIC™ e FAM™, sendo que cada um deles corresponde a um único alelo em cada ensaio.

#### **4.4. Análises da estrutura genética populacional – SNP**

**4.4.1. Obtenção dos dados** – Os SNPs dos locus de cada mosquito foram identificados automaticamente pelo *software* da plataforma StepOnePlus™ v.2.1 (Applied Biosystems), o qual exporta planilhas com as dados genotípicos diplóides em formato Excel. Com auxílio do *software* Convert (Glaubitz, 2004), que converte os arquivos para utilização de *softwares* como Arlequin v.3.1 (Excoffier et al., 2005) e Structure v.2.3.3 (Pritchard et al., 2000).

**4.4.2. Frequências alélicas** – As frequências alélicas foram calculadas através do *software* Arlequin v.3.1. Este cálculo pode ser obtido somando-se o número de indivíduos



homozigotos para um determinado alelo mais duas vezes o número de indivíduos heterzigotos, e dividindo-se o resultado pelo dobro do número total de indivíduos. De acordo com a equação:

$$F(p) = (p + 2pq)/2N$$

Onde:

F(p): frequência do alelo p;

p: número de indivíduos homozigotos do alelo p;

pq: número de indivíduos heterozigotos;

n: número de indivíduos na amostra.

A avaliação da frequência de um alelo particular em uma população, chamada frequência gênica ou alélica, é considerada fundamental nos estudos evolutivos. Uma vez que a mudança genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas frequências gênicas (Nei, 1978). As frequências alélicas e genótípicas serão obtidas por contagem direta através do pacote de programa Arlequin 3.0 (Excoffier, 2005). Este cálculo é resultado da soma do número de indivíduos heterozigotos para um determinado alelo com duas vezes o número de indivíduos homozigotos, e divisão do resultado pelo dobro do número total de indivíduos. O conhecimento da frequência de heterozigotos apresenta importância, uma vez que heterozigoto carrega diferentes alelos, demonstrando a existência de variação genética na população (Weir, 1996).

**4.4.3. Equilíbrio de Hardy- Weinberg** - A diversidade gênica é a medida que indica a heterozigosidade esperada para um dado *locus* sob equilíbrio de Hardy- Weinberg. Consiste na proporção esperada de indivíduos heterozigotos para as frequências alélicas observadas. A verificação do equilíbrio de Hardy- Weinberg (HW), calculada utilizando o programa Arlequin 3.0, que aplica o método de Guo & Thompson (1992), será feita pela comparação da frequência observada dos genótipos com a frequência esperada em equilíbrio. O  $F_{IS}$  (coeficiente de endogamia) será utilizado para estimar a redução mínima em heterozigosidade de um indivíduo devido ao cruzamento aleatório, dentro da população, sendo calculado para testar as proporções do equilíbrio de HW entre os genótipos obtidos, de acordo com a equação:

**$F_{IS} = 1 - (\text{heterozigosidade observada} / \text{heterozigosidade esperada})$**

onde:

Se existe um excesso de heterozigotos, então  $F_{IS} < 0$ ;

Se existe um excesso de homozigotos, então  $F_{IS} > 0$ ;

O Teste do qui-quadrado foi utilizado para testar a hipótese nula, onde  $F_{IS} = 0$ .

O princípio de HW que as frequências gênicas e genotípicas de um único *locus* estarão fixadas e em equilíbrio numa população numerosa, que não está em processo evolutivo franco, e após uma geração de acasalamento randômico.

**4.4.4. Análise de estrutura genética populacional** - As análises da estrutura populacional serão calculadas empregando a análise de variância molecular (AMOVA), conforme descrito por Excoffier *et al.*, (1992). O programa Arlequin 3.0, método estatístico que se baseia na geração de estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos, ou seja, permite verificar o grau de significância genética inter e intrapopulacional. Os valores de estatística  $F$ , que indicam o grau de subdivisão geográfica, também calculados pelo programa Arlequin 3.0.

Os parâmetros estatísticos foram calculados de acordo com Weir & Cockerham (1984). O  $F_{ST}$  (índice de fixação) é utilizado para estimar a extensão da diferenciação genética entre as subpopulações (agrupamentos). O índice  $F_{ST}$  entre pares de populações (*pairwise  $F_{ST}$* ) também foi calculado, e pode ser utilizado como uma estimativa da distância genética entre elas. Todos os valores foram verificados através de testes não paramétricos de permutação (Excoffier *et al.*, 1992). O valor de P igual a 0,05 foi adotado como limiar de significância para todos os testes estatísticos realizados.

**4.4.5. Estruturação populacional** - O programa Structure 2.0 (Pritchard *et al.*, 2000) será utilizado na análise de estruturação de populações com base em dados de genotipagem multi-*locus*. A utilização deste teste possibilita a construção de *clusters* genéticos, e estima a fração do genótipo de cada indivíduo que pertence a cada *cluster*, na ausência de qualquer informação prévia sobre a estrutura da população. A análise se baseia na combinação de todos os genótipos individuais *multilocus* e calcula a probabilidade de um número pré-determinado de *clusters* (k), assumindo que misturas (híbridos) podem

existir (ex. não se assume o isolamento genético). A seguir, obtém-se o valor mais provável de  $k$  convertidos para um gráfico com a probabilidade do ancestral de cada *cluster* para cada indivíduo. Este programa tem sido aplicado com sucesso em estudos de estrutura populacional de mosquitos da espécie *Anopheles gambiae* (Moreno *et al.* 2007) e *Culex* (Fonseca *et al.*, 2004).

## ***5. Resultados***

## 5. Resultados

### 5.1. Coleta de *Ae. aegypti*

Foram feitas contagens das palhetas positivas e da quantidade de ovos nelas contidos. Observamos uma notável oscilação dessas duas medidas entre as coletas, níveis maiores nos períodos quentes/chuvosos e menores nos períodos frios/secos (Figura 4).

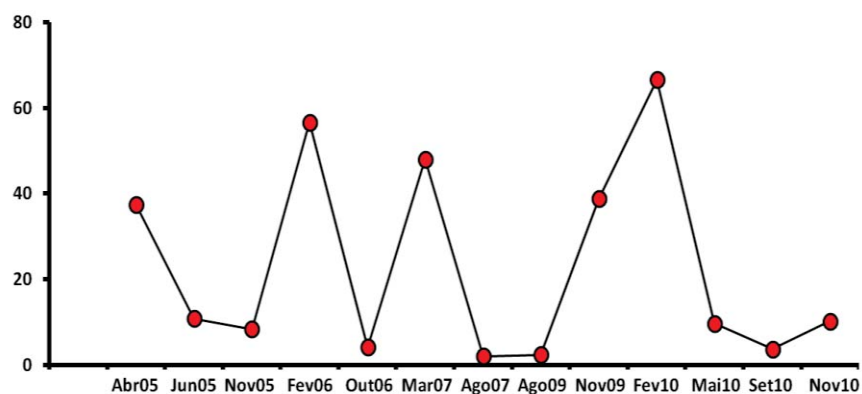
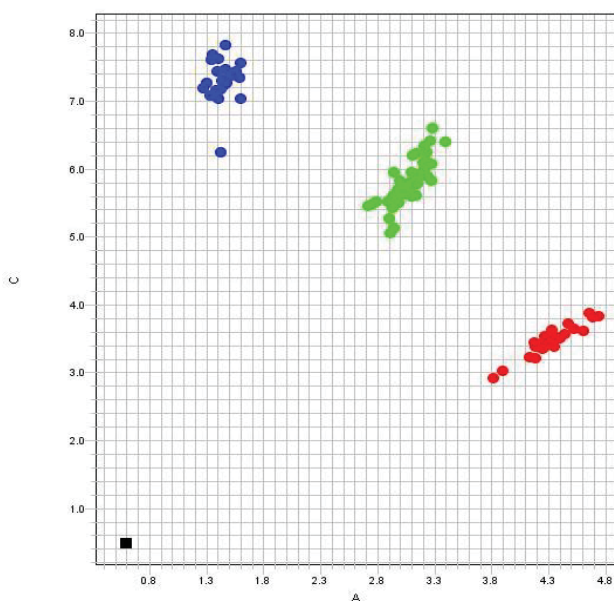


Figura 4. Índice de positividade de palhetas em cada mês de coleta.

### 5.2. Estudo genético populacional por SNPs

**5.2.1. Reação TaqMan® - Caracterização de SNPs** - Todas as reações incluíram controles positivos, amostras sequenciadas com genótipo conhecido: homozigoto VIC™, homozigoto FAM™ e heterozigoto VIC™/FAM™ além do controle negativo, de acordo com o protocolo do fabricante. Após a amplificação, a análise pelo *software* da plataforma StepOnePlus™ v. 2.1 (Applied Biosystems), gerou um gráfico com a discriminação alélica (Figura 5).

### Discriminação Alélica



**Figura 5.** Exemplo de gráfico da discriminação alélica de ensaio TaqMan®, para o polimorfismo do gene *apolLp-II* das coletas de 2007 e 2009. Os alelos C/C, cor azul, são homocigotos para FAM<sup>TM</sup>; alelos A/A, cor vermelha, são homocigotos para VIC<sup>TM</sup>; alelos A/C, cor verde, heterocigotos VIC<sup>TM</sup>/FAM<sup>TM</sup> e cor preta, o controle negativo.

Após as leituras finais de cada reação, foram geradas automaticamente tabelas pelo *software* StepOne v.2.1 (Applied Biosystems) (Figura 6). Essas tabelas foram utilizadas para construção de planilhas de discriminação alélica em formato *Excel* (Figura 7 e 8), as quais posteriormente foram analisadas por *softwares* específicos.

**Figura 6.** Exemplo de tabela gerada pelo *software* após a genotipagem; mostra a genotipagem dos *Ae. aegypti* da coleta de 2007 para o gene *apolL-II*. A tabela inclui, entre outras informações, a identificação de cada amostras, qualidade da análise (%), e discriminação dos alelos.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Block Type	96well							
2	Chemistry	TAQMAN							
3	Experiment File Name	C:\Documents and Settings\ivany\Desktop\MEL\PLACA2 APOL.eds							
4	Experiment Run End Time	2011-01-21 10:06:58 AM BRST							
5	Instrument Type	steponeplus							
6	Passive Reference	ROX							
7									
8	Well	Sample No	SNP Assa	Task	Allele1 ΔR	Allele2 ΔR	Pass. Ref	Quality(%)	Call
9	A1	Sample 1	APOL	UNKNOWN	4,688274	3,898959	4169,995	99,0485916	Homozygous A/A
10	A2	Sample 1	APOL	UNKNOWN	4,476655	3,714861	5137,733	99,7746429	Homozygous A/A
11	A3	Sample 1	APOL	UNKNOWN	1,427068	7,336213	5472,688	99,9697876	Homozygous C/C
12	A4	Sample 1	APOL	UNKNOWN	3,101807	5,852322	5340,406	99,9015045	Heterozygous A/C
13	A5	Sample 1	APOL	UNKNOWN	1,536796	7,422904	6236,012	99,6566238	Homozygous C/C
14	A6	Sample 1	APOL	UNKNOWN	1,465703	7,446147	6266,462	99,8970642	Homozygous C/C
15	A7	Sample 1	APOL	UNKNOWN	3,158071	6,071192	5059,033	99,8401642	Heterozygous A/C
16	A8	Sample 1	APOL	UNKNOWN	4,299138	3,456225	5689,475	99,9478455	Homozygous A/A
17	A9	Sample 1	APOL	UNKNOWN	3,051648	5,830601	5519,48	99,9697342	Heterozygous A/C
18	A10	Sample 1	APOL	UNKNOWN	3,220574	5,905694	5376,691	99,5580444	Heterozygous A/C
19	A11	Sample 1	APOL	UNKNOWN	3,350773	6,467581	4745,546	98,9479752	Heterozygous A/C
20	A12	Sample 1	APOL	UNKNOWN	3,11247	5,944543	5374,655	99,9268036	Heterozygous A/C
21	B1	Sample 1	APOL	UNKNOWN	4,611719	3,947378	5171,467	99,2113495	Homozygous A/A
22	B2	Sample 1	APOL	UNKNOWN	4,302132	3,616915	5098,144	99,9819946	Homozygous A/A
23	B3	Sample 1	APOL	UNKNOWN	3,09553	5,992913	5499,805	99,9512939	Heterozygous A/C
24	B4	Sample 1	APOL	UNKNOWN	2,895079	5,207514	5702,321	98,8937225	Heterozygous A/C
25	B5	Sample 1	APOL	UNKNOWN	4,203235	3,442683	5825,603	99,9538956	Homozygous A/A
26	B6	Sample 1	APOL	UNKNOWN	4,262922	3,499911	5751,027	99,9919052	Homozygous A/A
27	B7	Sample 1	APOL	UNKNOWN	4,298437	3,589842	5427,088	99,9928436	Homozygous A/A
28	B8	Sample 1	APOL	UNKNOWN	4,137166	3,45248	5769,295	99,9000397	Homozygous A/A
29	B9	Sample 1	APOL	UNKNOWN	2,940482	5,581349	5311,321	99,8035355	Heterozygous A/C
30	B10	Sample 1	APOL	UNKNOWN	3,183252	6,316086	4967,843	99,5759811	Heterozygous A/C

**Figura 7.** Exemplo de a planilha em formato *Excel*, apresenta a discriminação alélica para os nove genes analisados de alguns mosquitos da coleta de 2007. As letras **A**, **T**, **C** e **G** são os alelos presentes em cada indivíduo e seu respectivo gene, o sinal de interrogação (?) representa amostras com resultado indeterminado.

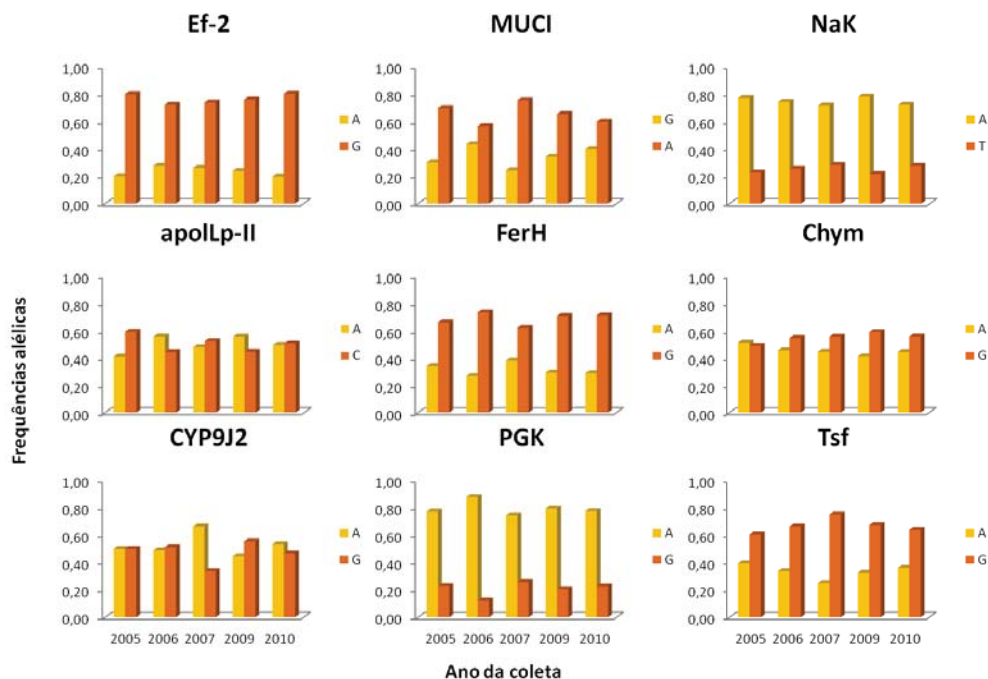
Sondas VIC/FAM	EF2 A/G	EF2 A/G	MUC G/A	MUC G/A	NAK A/T	NAK A/T	APOL A/C	APOL A/C	FERR A/G	FERR A/G	CHYM A/G	CHYM A/G	P450 A/G	P450 A/G	PGK A/G	PGK A/G	TSF C/G	TSF C/G
8f1C	A	A	A	A	T	T	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	G	G
8m1C	A	G	G	A	A	A	A	A	A	G	A	G	A	G	A	G	G	G
10f1Ca	G	G	A	A	A	A	C	C	A	G	A	G	A	A	A	A	C	G
10m1Ca	G	G	A	A	A	A	A	C	A	G	A	G	A	A	A	A	G	G
10f1C	G	G	G	A	A	A	C	C	G	G	G	G	A	G	A	A	G	G
10m1C	G	G	A	A	A	A	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	G	G
15f1C	G	G	A	A	A	T	A	C	A	G	A	G	A	A	A	A	G	G
15m1C	G	G	G	A	A	T	A	A	G	G	A	G	A	A	A	A	C	G
16f1C	A	G	G	A	A	T	A	C	A	G	A	G	A	G	A	A	G	G
16m1C	G	G	A	A	A	A	A	C	G	G	G	G	A	A	A	A	C	G
17f1C	G	G	A	A	A	T	A	C	A	A	A	G	A	G	A	A	G	G
17m1C	G	G	A	A	A	T	A	C	A	A	A	A	A	G	A	A	G	G
19f1C	A	G	A	A	A	A	A	A	A	G	A	G	A	G	A	A	G	G
19m1C	A	G	G	G	A	T	A	A	G	G	A	G	A	G	A	A	C	G
20f1Ca	A	G	A	A	A	A	A	C	A	G	A	G	A	G	A	A	G	G
20m1Ca	A	G	A	A	A	A	A	C	A	A	A	G	A	G	?	?	C	G
20f1C	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	G	A	A	C	G
20m1C	A	G	A	A	A	A	A	A	G	G	A	G	A	G	A	A	G	G
22f1C	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A	G	G
22m1C	G	G	A	A	A	T	A	A	G	G	A	G	A	G	A	G	G	G

**Figura 8.** Planilha que exemplifica a mesma discriminação alélica da figura 7, porém as letras foram substituídas por números (A=1; C=2; G=3 e T=4).

Sondas VIC/FAM	EF2 A/G	EF2 A/G	MUC G/A	MUC G/A	NAK A/T	NAK A/T	APOL A/C	APOL A/C	FERR A/G	FERR A/G	CHYM A/G	CHYM A/G	P450 A/G	P450 A/G	PGK A/G	PGK A/G	TSF C/G	TSF C/G
8f1C	1	1	1	1	4	4	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	3
8m1C	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	3	1	3	3	3
10f1Ca	3	3	1	1	1	1	2	2	1	3	1	3	1	1	1	1	2	3
10m1Ca	3	3	1	1	1	1	1	2	1	3	1	3	1	1	1	1	3	3
10f1C	3	3	3	1	1	1	2	2	3	3	3	3	1	3	1	1	3	3
10m1C	3	3	1	1	1	1	2	2	1	3	3	3	1	1	1	1	3	3
15f1C	3	3	1	1	1	4	1	2	1	3	1	3	1	1	1	3	3	3
15m1C	3	3	3	1	1	4	1	1	3	3	1	3	1	1	1	1	2	3
16f1C	1	3	3	1	1	4	1	2	1	3	1	3	1	3	1	1	3	3
16m1C	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3	1	1	1	1	2	3
17f1C	3	3	1	1	1	4	1	2	1	1	1	3	1	3	1	1	3	3
17m1C	3	3	1	1	1	4	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	3	3
19f1C	1	3	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	3	1	3	2	3
19m1C	1	3	3	3	1	4	1	1	3	3	1	3	1	3	1	1	2	3
20f1Ca	1	3	1	1	1	1	1	2	1	3	1	3	1	3	1	1	3	3
20m1Ca	1	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3	1	3	?	?	2	3
20f1C	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	1	2	3
20m1C	1	3	1	1	1	1	1	1	3	3	1	3	1	3	1	1	3	3
22f1C	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	3	3
22m1C	3	3	1	1	1	4	1	1	3	3	1	3	1	3	1	3	3	3

### 5.3. Análise da estrutura genética populacional

**5.3.1. Frequências Alélicas** - Após calcularmos as frequências alélicas e formulação dos histogramas, observamos que as frequências para os alelos de cada *locus* não variaram entre as coletas (Figura 9).



**Figura 9.** Histogramas das frequências alélicas dos nove SNPs estimados para 46 indivíduos nas coletas de 2005, 2006, 2007 e 2009; e 92 indivíduos das coletas de 2010. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X ano de coleta.

**5.3.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg** - Os nove *loci* analisados nas amostras não apresentaram desvio significativo ( $P > 0.05$ ) entre as heterozigosidades observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** As tabelas apresentam a heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada, para a quantidade de indivíduos analisados em cada ano, considerando os nove SNPs de genes nucleares de *A. aegypti*.

Botucatu 2005					Botucatu 2006					Botucatu 2007				
Locus	N	Ho	He	P-valor	Locus	N	Ho	He	P-valor	Locus	N	Ho	He	P-valor
Ef-2	45	0,22	0,32	0,05	Ef-2	45	0,38	0,41	0,713	Ef-2	46	0,35	0,39	0,463
MUCI	43	0,37	0,43	0,47	MUCI	45	0,42	0,50	0,369	MUCI	45	0,40	0,37	1,000
NaK	44	0,36	0,36	1,00	NaK	45	0,42	0,38	0,699	NaK	46	0,39	0,41	0,730
apolL-II	44	0,55	0,49	0,54	apolL-II	45	0,49	0,50	1,000	apolL-II	46	0,39	0,50	0,147
FerH	44	0,50	0,45	0,74	FerH	45	0,49	0,40	0,140	FerH	46	0,50	0,48	0,765
Chym	44	0,48	0,51	0,77	Chym	45	0,51	0,50	1,000	Chym	46	0,59	0,50	0,250
CYP9J2-1	44	0,45	0,51	0,55	CYP9J2-1	45	0,62	0,51	0,143	CYP9J2-1	46	0,50	0,45	0,523
PGK	46	0,33	0,36	0,67	PGK	45	0,20	0,22	0,500	PGK	45	0,38	0,38	1,000
TSF	43	0,56	0,48	0,35	TSF	46	0,41	0,45	0,740	TSF	46	0,28	0,38	0,111

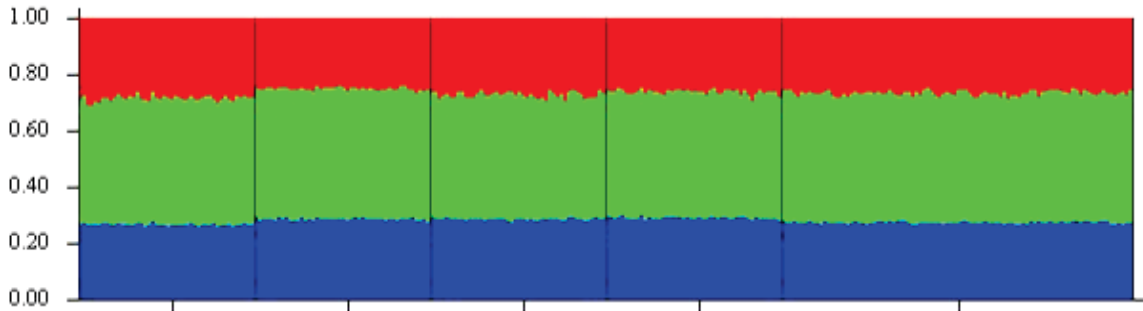
  

Botucatu 2009					Botucatu 2010				
Locus	N	Ho	He	P-valor	Locus	N	Ho	He	P-valor
Ef-2	46	0,30	0,37	0,245	Ef-2	91	0,35	0,32	0,507
MUCI	45	0,38	0,46	0,321	MUCI	90	0,47	0,48	0,826
NaK	46	0,30	0,34	0,415	NaK	90	0,33	0,40	0,115
apolL-II	46	0,50	0,50	1,000	apolL-II	90	0,43	0,50	0,210
FerH	46	0,37	0,42	0,482	FerH	90	0,42	0,41	1,000
Chym	45	0,56	0,49	0,534	Chym	90	0,44	0,50	0,392
CYP9J2-1	46	0,46	0,50	0,765	CYP9J2-1	90	0,62	0,50	0,033
PGK	39	0,36	0,33	1,000	PGK	91	0,36	0,35	1,000
TSF	46	0,43	0,44	1,000	TSF	90	0,48	0,46	0,821

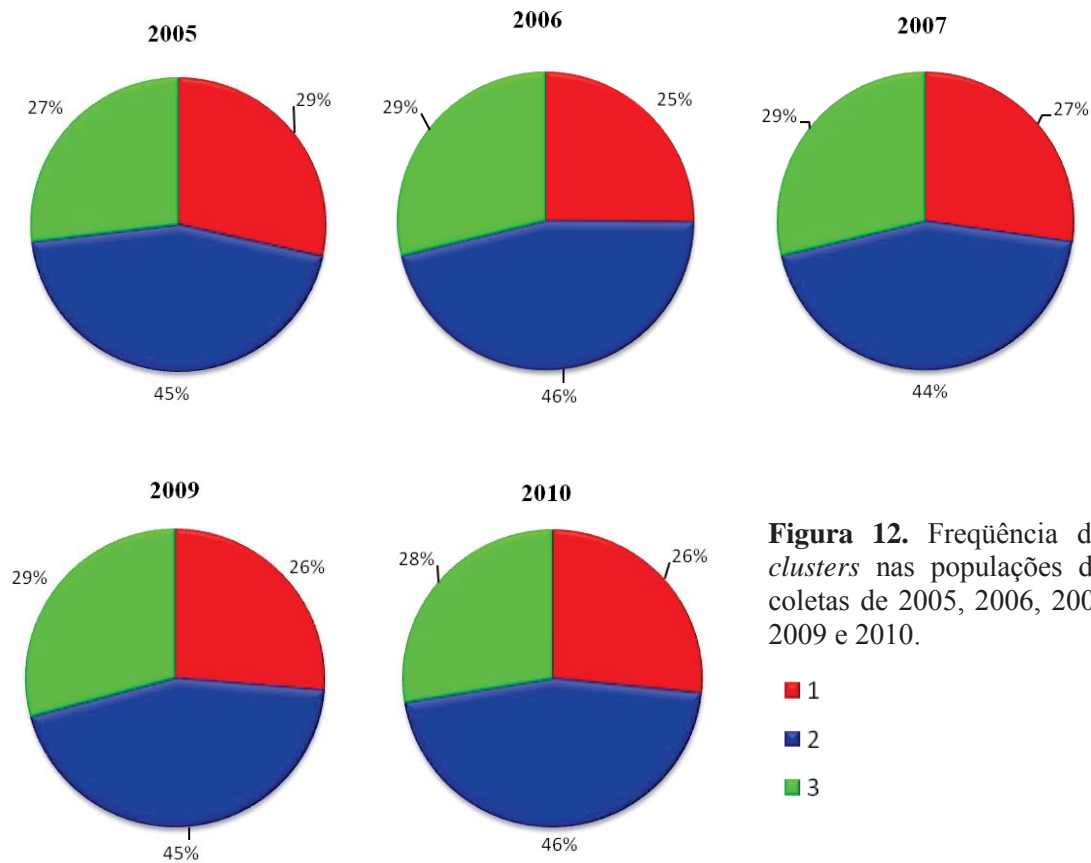
**Legenda.**  
N= números de indivíduos analisados;  
Ho= heterozigosidade observada;  
He= heterozigosidade esperada;  
P-valor= significância dos testes.

**5.3.3. Análise de estrutura genética populacional** - Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA), utilizando dados dos nove *loci* polimórficos, revelaram 0,28% de diversidade genética entre as coletas. O valor de *Fst* (0,0028,  $p=0,763$ ) mostrou semelhança entre as coletas dos anos, além disso o valor de  $p$  está acima do nível de significância de 0,05. Pela análise entre pares de coletas (*pairwise Fst*), as de 2006 e 2007 apresentam a maior variação,  $Fst = 0.01716$ ,  $p= 0,009$ . O coeficiente de endogamia, *Fis* (-0,0067,  $p=0,608$ ) também não apresentou valor significativo.

**5.3.4. Estruturação populacional** - O *software* Structure 2.3.1 (Pritchard et al., 2000) foi usado para identificar as prováveis composições genéticas das coletas de *Ae. aegypti*. A análise Bayesiana foi realizada para avaliar níveis de relação entre populações e a ocorrência de fluxo gênico entre elas. Tal análise com base no agrupamento dos nove SNPs genotipados, revelou a presença de três composições genéticas, ou seja,  $k=3$  (Figura 11). As frequências dos *clusters* não apresentaram variação entre as amostras dos anos (Figura 12).



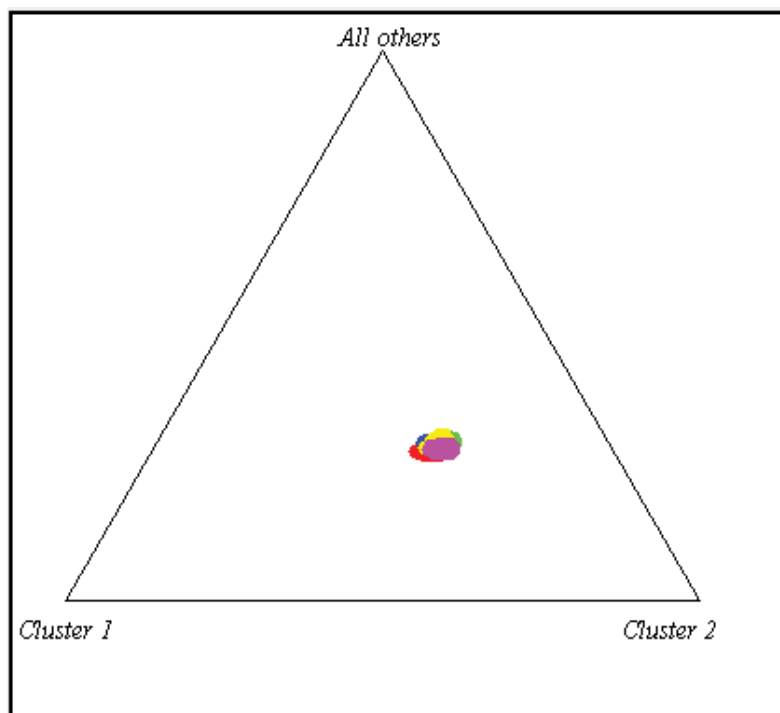
**Figura 11.** Resultado da análise Bayesiana, considerando frequências alélicas correlacionadas. Cada um dos 276 indivíduos incluídos na análise é representado por uma linha vertical, dividida em até três cores, *cluster* vermelho, verde e azul. As cores indicam os *clusters* baseado em semelhanças genotípicas, além de representar a probabilidade de o indivíduo pertencer a um dos *clusters*.



**Figura 12.** Frequência dos *clusters* nas populações das coletas de 2005, 2006, 2007, 2009 e 2010.

- 1
- 2
- 3

A análise Bayesiana também fornece informação sobre a heterogeneidade das populações através dos gráficos dos *clusters* formados em função da composição genética (Figura 13). Através de tal gráfico, é possível verificar que a população as coletas apresentam-se agrupadas.



**Figura 13.** Gráfico de agrupamento das populações em função das composições genéticas. Neste caso cada indivíduo é representado por um ponto colorido; cor vermelha representa a coleta de 2005; cor verde a coleta de 2006; cor azul a coleta de 2007; cor amarela a coleta de 2009 e a cor rosa a coleta de 2010.

## ***6. Discussão***

## 6. Discussão

A vigilância das populações de *Ae. aegypti* por ovitrampas é o método mais comum de amostragem para monitoramento (Service, 1992), é mais eficaz e mais sensível em comparação com as pesquisas convencionais de larvas, especialmente quando as taxas de infestação são muito baixas (Focks, 2003). Pesquisas ecológicas de *Ae. aegypti* na cidade de Ho Chi Minh sugerem que a densidade vetorial exhibe variação sazonal (Huber et al, 2000). Porém, a variação na densidade populacional pode ser aparente, pois os diferentes métodos se limitam em observar apenas uma das formas de vida do mosquito.

Os resultados obtidos neste e em outros estudos sugerem que a dinâmica populacional do vetor exhibe variação sazonal (Huber et al, 2000; Vezzani, 2004). A associação positiva entre precipitação e abundância de *Ae. aegypti* alados foi demonstrada em estudos realizados no Brasil e na Argentina (Vezzani et al., 2004; Dibo et al 2008). Além disso, variáveis meteorológicas, como umidade relativa e temperatura também revelaram correlação importante com índices de larvas e pupas (Favier et al., 2006). Essas relações positivas entre a precipitação, temperatura e umidade, com a abundância dos vetores da dengue são compreensíveis. As chuvas afetam o padrão de reprodução do mosquito, pois os recipientes ficam cheios de água (Moore et al., 1978), a temperatura alta acelera o crescimento das larvas atingindo mais rapidamente a fase adulta (Tun-Lin et al. 2000) e umidade alta melhora a sobrevivência do mosquito adulto, facilitando a alimentação em humanos, dispersão e postura de ovos (Hales et al. 2002). Porém, cada uma dessas três variáveis pode ter um impacto diferente nas populações de *Ae. aegypti*, pois depende da ecologia local (Azil, 2010).

A dinâmica populacional consiste no crescimento da densidade do vetor no início do período chuvoso, aumentando o tamanho populacional gradualmente até atingir um pico; e no período seco, há uma grande redução (Huber, 2002). Essas reduções são seguidas por recolonização na estação chuvosa seguinte, que de acordo com Huber (2002) são feitas pelas populações residuais e/ou por novas introduções. Nosso estudo corrobora essa hipótese, ao considerarmos somente os dados das coletas temporais, pois nossos dados genéticos sugerem outra possibilidade.

A diminuição da densidade de mosquitos devido à influência da variação sazonal e, como observado por Lerdthusnee e Chareonviriyaphap (1999), ao tratamento inseticida reduzem a variabilidade genética de populações. Além disso, as novas introduções do vetor desempenham papel fundamental na mudança na composição alélica. No entanto, os resultados da análise genética temporal deste estudo não apresentaram as variações genéticas. As frequências alélicas foram invariáveis ao longo dos anos, a variação entre as coletas foi de 0,28% ( $p= 0,763$ ) e a composição da estrutura populacional foi constante. Com estes resultados é possível concluir a possibilidade da manutenção da mesma população, sem alteração no tamanho populacional.

A aparente variação na densidade populacional estaria ocorrendo pela modificação na prevalência das formas de vida do *Ae. aegypti* nas estações. Prevalência de *Ae. aegypti* adultos nos meses quentes e chuvosos, e possivelmente um estoque de ovos mantém o tamanho populacional nos meses frios e secos. Essa dinâmica não é notada, pois os diferentes métodos de coleta se limitam a observar uma das formas de vida do mosquito, principalmente adultos e larvas, e os ovos não são diretamente computados. Portanto, para obter o tamanho populacional efetivo é necessário correlacionar os dados das metodologias de coletas, além de levar em consideração os possíveis estoques de ovos.

## ***7. Conclusões***

## **7. Conclusões**

Apesar da aparente variação na densidade dos adultos resultante das coletas entre os períodos quentes e chuvosos e, frios e secos, observamos que o tamanho populacional não varia. Há uma mudança na prevalência da forma de vida da espécie entre os períodos: adultos nos meses quentes e chuvosos e, possivelmente ovos nos frios e secos. Isto implica em estratégias de controle diferentes para cada período, focando o combate na forma de vida mais prevalente do período. Além disso, a estimativa do tamanho populacional não deve considerar somente adultos alados, mas correlacionar às metodologias de coletas envolvendo todas as outras formas de vida do mosquito encontradas.



## ***8. Referências***

## 8. Referências

ADEGAS; M. G.; KRAUSE, C. B.; LIMA, J. B. P.; VALLE, D. Parâmetros de Biossegurança para Insetários e Infectórios de Vetores. Ministério da Saúde – Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz, 2005.

AHMADIAN A; GHARIZADEH B; O’MEARA D; ODEBERG J; LUNDEBERG J. *Genotyping by apyrase-mediated allele-specific extension*. Nucl Acids Res.; 29:e121, 2001.

APOSTOL, B.L.; BLACK, W.C.; REITER, P.; MILLER, B.R. *Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number o Aedes aegypti families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico*. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.51, n.1, p.89-97, 1994.

AZIL, A.H.; LONG, S.A.; RITCHIE, S.A.; WILLIAMS, C.R. *The development of predictive tools for pre-emptive dengue vector control: a study of Aedes aegypti abundance and meteorological variables in North Queensland, Australia*. volume 15 no 10 pp 1190–1197 october 2010.

BALLINGER-CRABTREE, M.E.; BLACK, W.C.; MILLER, B.R. *Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of Aedes aegypti subspecies and populations*. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.47, n.6, p.893-901, 1992.

BESANSKY, N.J.; LEHMANN, J.A.; FAHEY, G.T.; FONTENILLE, D.; BRAACK, L.E.O.; HAWLEY, W.A.; COLLINS, F.H. *Patterns of mitochondrial DNA variation within and between African malaria vectors, Anopheles gambiae and An. arabiensis, suggest extensive gene flow*. Genetics, v.147, p.1817-1828, 1997.

BUNDOCK P.C.; CROSS M.J.; SHAPTER F.M.; HENRY R.J. *Robust allele-specific polymerase chain reaction markers developed for single nucleotide polymorphisms in expressed barley sequences*. Theor Appl Genet; 112:358-65, 2005.

CONN J.E.; COCKBURN A.F.; MITCHELL S.E. *Population differentiation of the malaria vector Anopheles aquasalis using mitochondrial DNA*. J Hered 84: 248-253, 1993.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

DIBO, M.R. ET. AL. *Study of the relationship between Aedes (Stegomyia) aegypti egg and adult densities, dengue fever and climate in Mirassol, state of São Paulo, Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 103(6): 554-560; 2008.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data*. Genetics, v.131, n.2, p.479-491, 1992.

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

FÁVARO EA, MONDINI A, DIBO MR, BARBOSA AAC, EIRAS AE, CHIARAVALLOTI-NETO F. *Assessment of entomological indicators of Aedes aegypti (L.) from adult and egg collections in São Paulo, Brazil*. J Vector Ecol 33, in press, 2008.

FAVIER C, DEGALLIER N, VILARINHOS PTR, CARVALHO MSL, YOSHIZAWA MAC, KNOX MB. *Effects of climate and difference management*

*strategies on Aedes aegypti breeding sites: a longitudinal survey in Brasília (DF, Brazil). Trop Med Inter Health 11: 1104-1118; 2006.*

FAY, R. W. & ELIASON, D. A. *A preferred oviposition site as a surveillance method for Aedes aegypti. Mosqu. News, 26: 531-5, 1966.*

FERRE, J.; VAN RIE, J. *Biochemistry and genetics of insect resistance to Bacillus thuringiensis. Ann. Rev. Entomol., v.47, p.501-533, 2002.*

FOCKS, D.A. *A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors. Gainesville, Wld. Hlth. Org. 40 pp, 2003.*

FONSECA, D.M. ET AL. *Emerging vectors in the Culex pipiens complex. Science, v.3, p.1535-1538, 2004.*

FRANCO O. *História da febre amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Departamento de Endemias Rurais, 208p, 1976.*

GLASSER, C. *Estudo da Infestação do Estado de São Paulo por Aedes aegypti e Aedes albopictus. USP, Tese de Mestrado, Departamento de Epidemiologia/USP, 1997.*

GLAUBITZ, J.C. *A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. Mol. Ecol. Notes, v.4, n.2, p.309-310, 2004.*

GORROCHOTEGUI-ESCALANT, N.; M. DE LOURDES MUNOZ; I. FERNANDEZ-SALAS, BEATY, B.J.; BLACK, W.C. *Genetic isolation by distance among Aedes aegypti populations along the northeastern coast of Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62: 200–209, 2000.*

GORROCHOTEGUI-ESCALANT, N.; GOMES-MACHORRO, C.; LOZANO-FUENTES, S.; FERNANDEZ-SALAS, L.; DE LOURDES MUNOZ, M.; FARFAN-ALE, J.A.; GARCIA-REJON, J.; BEATY, B.J.; BLACK W.C, *Breeding structure of Aedes aegypti populations in México varies by region*. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.66, n.2,p213-222, 2002.

GROETES, F.R.; TABACHNICK, B.E. *Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance*. J. Econ. Entomol., v.93, n.6, p.1580-1587, 2000.

GUBLER, D.J. *Resurgent vector-borne diseases as a global health problem*. Emerg. Infect. Dis., v.4, n.3, p.442-450, 1998.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. *“Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles”*. *Biometrics*. 48. 361-72, 1992.

HALES S, WET N, MAINDONALD J, WOODWARD A. *Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model*. *Lancet* 360: 830-834, 2002.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. *Insecticide resistance in insect vectors of human disease*. Ann. Rev. Entomol., v.45, n. p.371-391, 2000.

HOLMES, E.C.; BARTLEY, L.M.; GARNET, G.P. *The emergence of dengue past, present and future*. In: KRAUSE, R.M. (Ed). *Emerging Infectors*. London: Academic Press, p.301-325, 1998.

HOLLAND, P.M. ET AL. *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v.88, p.7276-7280, 1991.

HOLT, R.A.; SUBRAMANIAN, G.M.; HALPERN, A.; ET. AL. *The genome sequence of the malaria mosquito Anopheles gambiae*. Science, 298: 129-149, 2002.

HUBER K.; LOAN L.L.; TRAN H.H.; TRAN K.T.; RODHAIN F.; FAILLOUX A-B. *Aedes (Stegomyia) aegypti (L. 1762) (Diptera: Culicidae), le principal vecteur des virus de la dengue au Vietnam: écologie, structure génétique, compétence vectorielle et résistance aux insecticides*. Annales de la Société Entomologique de France 36, 109–120, 2000.

HUBER K.; LOAN L.L.; TRAN H.H.; TRAN K.T.; RODHAIN F.; FAILLOUX A-B. *Temporal genetic variation in Aedes aegypti populations in Ho Chi Minh City (Vietnam)*. Heredity 89, 7–14, 2002.

IWAKI K; NISHIDA J.; YANAGISAWA T.; YOSHIDA H.; KATO K. *Genetic analysis of Vrn-B1 for vernalization requirement by using linked dCAPS markers in bread wheat (Triticum aestivum L.)*. Theor Appl Genet, 104:571-6, 2002.

KIM M.Y.; VAN K.; LESTARI P.; MOON J.K.; LEE SH. *SNP identification and SNAP marker development for a GmNARK gene controlling supernodulation in soybean*. Theor Appl Genet, 110:1003-10, 2005.

LERDTHUSNEE K, CHAREONVIRIYAPHAP T. *Comparison of isozyme patterns of Aedes aegypti populations collected from preand post-Bacillus thuringiensis israelensis treatment sites in Thailand*. J Am Mosq Control Assoc 15: 48–52, 1999.

LOXDALE, H.D.; LUSHI, G. *Molecular markers in entomology*. Bull. Entomol. Res., v.88, p.577-600, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Executiva. Plano Diretor de Erradicação do *A.aegypti* do Brasil. PEAA. Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. Brasília (DF), 1998.

MOORE CG, CLINE BL, RUIZ-TIBEN E, LEE D, ROMNEY-JOSEPH H, RIVERA-CORREA E. *Aedes aegypti* in Puerto Rico: environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* 27: 1225–1231, 1978.

MORENO, M. Genetic population structure of *Anopheles gambiae* in Equatorial Guines. *Malaria J.*, v.6, p.137-147, 2007.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583–590, 1978.

NOVAIS, C.M. ET AL. PCR em tempo real. *Rev. Biotec. Ciência Des.*, n.33, p.10-13, 2004.

PADUAN, K.S. Análise da estrutura genética de *Aedes aegypti* no Brasil utilizando marcadores RAPD e genes mitocondriais. Dissertação de mestrado. Depto. De Genética. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, 95p, 2005.

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

RODERICK, G. K. *Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses*. *Ann Rev Ent*, 41: 325–352, 1996.

RUEDA, B.Z. Comparação da eficácia dos métodos “Índice de Breteau” e armadilha de ovoposição (ovitrapas) na obtenção dos índices de infestação de *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Município de Botucatu, SP, 2008.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO – SUCEN. Manual de Vigilância Entomológica de *Aedes argypti*, São Paulo, 1997.

SEVERSON, D.W.; MEECE, J.K.; LOVIN, D.D.; SAHA, G.; MORLAIS, I. *Linkage map organization of expressed sequence tags and sequence tagged sites in the mosquito, Aedes aegypti*. Insect Mol. Biol. 11:371-378, 2002.

SERVICE MW. *Mosquito ecology: field sampling methods*. 2nd ed. Essex: Elsevier Science Publishers; 1993.

SLOSEK, J. A. *Aegypti mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population*. Soc. Sci. Med., v.23, n.3, p.249-257, 1986.

SOPER, F.L. *The 1964 status of A. aegypti eradication and yellow fever in the Americas*. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.14, n.6, p.887-891, 1965.

SYVANEN, A.AC. *Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms*. Nat. Rev. Genet., 2: 930-942, 2001.

TABACHINICK, W.J; POWELL, J.R. *A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, Aedes aegypti*. Genet Res., v.34, n.3, p.215-229, 1979.

TAILLON-MILLER, P.; GU, Z.; LI, Q.; HILLIER, L.; KWOK, P. *Overlapping genomic sequences: a treasure trove of single nucleotide polymorphisms*. Genome Res., v.8, n.7, p.748-754, 1998.

TAUIL, P. L. *Urbanização e ecologia do dengue*. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17: 99-102, 2001.

TUN-LIN, BURKOT TR, KEY BH. *Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector Aedes aegypti in north Queensland, Australia*. Med Vet Entomol 14: 31-37, 2000.



VEZZANI D, VELAZQUEZ SM, SCHWEIGMANN N. *Seasonal pattern of abundance of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires city, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 351-356; 2004.

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

WEIR, B.S. *Genetic Data Analysis II – Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Sunderland., p.337, 1996.

WHO-World Health Organization. *Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment and Control*, 2nd ed., Geneva, 84 pp, 1997.

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. Res.*, v.18, p.6531-6535, 1992.

YAMANAKA, S.; NAKAMURA, I.; WATANABE, K.N.; SATO, Y.I. *Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice. Theor Appl Genet*, 108:1200-4, 2004.

YANAGISAWA, T.; KIRIBUCHI-OTOBE, C.; HIRANO, H.; SUZUKI, Y.; FUJITA, M. *Detection of single nucleotide polymorphism (SNP) controlling the waxy character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) marker. Theor Appl Genet*, 107:84-8, 2003.

ZHANG, D.X.; HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.*, v.12, n.3, p.563-584, 2003.