

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Desenvolvimento de metodologia *high-throughput*
para estudo populacional do mosquito *Aedes aegypti* e
comparação de dados de genes nucleares com dados de
genes mitocondriais

Carine Spenassatto

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-Orientadora: Dra. Karina dos Santos Paduan

Botucatu - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Desenvolvimento de metodologia *high-throughput*
para estudo populacional do mosquito *Aedes aegypti* e
comparação de dados de genes nucleares com dados de
genes mitocondriais

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Aluna: Carine Spenassatto

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-Orientadora: Dra. Karina dos Santos Paduan

Botucatu - SP

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus de Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Spenassatto, Carine.

Desenvolvimento de metodologia *high-throughput* para estudo populacional do mosquito *Aedes aegypti* e comparação de dados de genes nucleares com dados de genes mitocondriais / Carine Spenassatto. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Instituto de Biociência Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-orientador: Karina dos Santos Paduan

Capes: 20202008

1. *Aedes aegypti* - Genética.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Genética de populações; NADH desidrogenase subunidade 4; Single Nucleotide Polymorphisms; TaqMan®; Variabilidade genética

*Dedico esta dissertação aos meus amores:
Meus pais Marivaldo e Carmelinda Spenassatto,
minhas avós, meus irmãos e
meu namorado Thiago Revers Dreyer por todo amor, carinho e incentivo.*

Agradecimientos

A Deus, por me possibilitar alcançar mais uma grande conquista, por me acompanhar e me dar toda sabedoria e entendimento necessário para concluir mais esta etapa em minha vida.

Ao professor Paulo Ribolla pela oportunidade que me foi dada para realizar um trabalho sob sua orientação, pelo apoio, ensinamento e incentivo, durante o desenvolvimento desta pesquisa que foram fundamentais para meu aprendizado.

A minha co-orientadora Karina Paduan, que acima de tudo foi uma grande amiga, me ajudando em todos os momentos, agradeço muito por sua amizade, apoio, ensinamentos, sugestões e auxílio nesses anos de convivência. Você foi uma das pessoas mais importantes para que eu pudesse obter essa conquista.

Aos meus pais, irmãos, cunhadas, avós, enfim, a toda minha família que sempre me deram muito amor e carinho me ajudando e consolando nas horas difíceis. Vocês foram a minha força e por isso nunca desisti dos meus sonhos. Meus agradecimentos nunca serão suficientes por tudo que todos vocês tem feito por mim. Obrigada pela compreensão ao entender minha ausência e por serem meus incentivadores.

Ao meu namorado Thiago, pelo seu amor, apoio, carinho, compreensão, e companheirismo, por estar sempre ao meu lado. Sua ajuda foi essencial. Graças ao seu incentivo estou alcançando mais está vitória em minha vida. Você é meu maior incentivador em tudo que me proponho a fazer. Obrigada por tudo meu amor.

A Pauli e Alceo que já fazem parte da minha família, por todo apoio, incentivo e carinho demonstrados.

A todos os colegas do Laboratório: Karina, Aline, Diego, Leticinha, Cris, Soneca, Melina, Leticia (IC), a todos os outros que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, pela amizade, troca de experiências e convívio.

A todos os colegas do Departamento Adriano, Tati, Denise e tantos outros, pela amizade e agradável convivência. Aos professores e funcionários do Departamento de Parasitologia pela atenção e amizade. Meu carinho e gratidão a todos que de alguma forma participaram desta minha trajetória!!!

À FAPESP pelo apoio para a realização desta pesquisa com a concessão da bolsa de estudo.

Resumo

O *Aedes aegypti*, culicídeo de hábitos diurnos, é originário do continente africano e está globalmente distribuído pelos trópicos em associação com as populações humanas. É considerado de grande importância epidemiológica por ser o principal vetor dos quatro sorotipos do vírus da dengue e da febre amarela. Uma das primeiras detecções da presença do mosquito no Estado de São Paulo aconteceu na década de 80 na cidade de Santos. Atualmente não há disponível nenhuma vacina ou medicamento eficiente contra a dengue, assim o controle da doença está restrito ao controle do vetor. Uma das alternativas de controle e entendimento das relações vetor-patógeno-homem se baseiam no desenvolvimento de ferramentas moleculares que utilizam técnicas baseadas em PCR, as quais têm possibilitado o estudo genético das populações do *Ae. aegypti*. Em tais estudos, vários marcadores foram envolvidos, tais como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e marcadores mitocondriais. Nós desenvolvemos ensaios utilizando metodologia TaqMan® para o estudo genético populacional de duas populações do mosquito *Aedes aegypti* de cidades portuárias do Estado de São Paulo, utilizando nove marcadores SNPs. Verificamos que esta metodologia é reprodutível, rápida, de baixo custo e eficiente para estudos em larga escala. Pela análise AMOVA encontramos uma baixa, mas significativa diferenciação genética entre as populações do estudo ($F_{ST} = 0,0324$; $P < 0,01$), e uma alta taxa de migrantes por geração (8,72 entre as populações 2007 e 5,39 entre as populações 2008), indicando fluxo gênico entre as populações. A análise implementada no *software* Structure 2.3.1, evidenciou a existência de três *clusters* baseados em semelhanças genotípicas, distribuídos em dois grupos, confirmando uma moderada estruturação populacional. Verificamos através da análise de fragmentos do gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4 (ND4) uma alta diferenciação genética entre as duas populações do estudo ($F_{ST} = 0,18034$; $P < 0,01$), e uma taxa de migrantes por geração considerada alta (1,75 entre as populações 2007 e 2,84 entre as populações 2008), porém inferior a encontrada pelos marcadores SNPs. O presente estudo evidenciou que apesar das populações de Santos e São Sebastião apresentarem respostas semelhantes aos inseticidas comumente utilizados, e certa estruturação populacional, estas são geneticamente diferentes, pois se verificou a existência de diferenças significativas por ambos os marcadores moleculares utilizados (SNPs e fragmento do gene ND4). Estes resultados se mostram importantes para auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o controle e manejo do mosquito vetor, uma vez que a estratégia de prevenção da dengue tem se baseado no controle do vetor, com ênfase ao uso de inseticidas químicos os quais tem sido largamente empregados. Tal prática tem gerado processos de resistência, os quais têm sido detectados, afetando diretamente as estratégias de controle e aumentando o risco de epidemias a cada ano em nosso país. Desta forma, o conhecimento aprofundado sobre a estruturação genética e dinâmica populacional desta espécie é crucial, uma vez que populações geneticamente diferentes podem apresentar diferenças quanto a sua capacidade e competência vetorial. Além disso, um conjunto de dados (monitoramento das populações circulantes do mosquito, dados de casos de dengue e resistência a inseticidas) constituem uma alternativa eficaz para prevenir as epidemias.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; DNAm; Genética de populações; NADH desidrogenase subunidade 4; *Single Nucleotide Polymorphisms*; TaqMan®; Variabilidade genética.

Abstract

Aedes aegypti, is a diurnal mosquito, originated from the African continent and is globally distributed through the tropics in association with human populations. It is considered of great epidemiological importance for being the main vector of the four serotypes of Dengue and Yellow Fever. One of the first detections of the presence of the mosquito in the State of São Paulo happened in the 80's, in the city of Santos. Currently there is no available vaccine or effective medicine against dengue fever, and disease control is restricted to vector control. An alternative to control and understanding of vector-pathogen-man relationships are based on the development of molecular tools that use PCR-based techniques, which have enabled the genetic study of populations of *Ae. aegypti*. In such studies, several markers were involved, such as SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) and mitochondrial ones. We have developed assays using TaqMan® methodology for population genetic studies of two populations of *Aedes aegypti* from the port cities of São Paulo, using nine SNPs markers. We found that this methodology is reproducible, fast, inexpensive and efficient for large-scale studies. AMOVA analysis found a low but significant genetic differentiation between the studied populations ($F_{ST} = 0.0324$, $P < 0.01$), and a high rate of migrants per generation (8.72 among populations in 2007 and 5.39 among populations in 2008), indicating gene flow between populations. The analysis implemented in software Structure 2.3.1, revealed the existence of three clusters based on genotypic similarities, divided into two groups, confirming a moderate population structure. We verified through the analysis of the mitochondrial gene fragments NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) a high genetic differentiation between the two study populations ($F_{ST} = 0.18034$, $P < 0.01$), and a rate of migrants per generation considered high (1.75 between 2007populations and 2.84 between 2008), but lower than found by SNP markers. The present study showed that although populations of Santos and São Sebastião make similar responses to commonly used insecticides, and have some population structure, they are genetically different, since we detected significant differences in both molecular markers used (SNPs and ND4 gene fragment). These results are important to assist in the strategies development for the control and management of the mosquito vector, since the strategy for dengue prevention have been based on vector control, with emphasis on the use of chemical insecticides which have been widely used. This practice has generated resistance processes, which have been detected, directly affecting the control strategies and increasing the risk of epidemics every year in our country. This way, detailed knowledge about the genetic structure and population dynamics of this species is crucial, since genetically different populations may present differences in their vectorial capacity and competence. In addition, a set of data (monitoring of circulating populations of the mosquito, the dengue case data and insecticide resistance) are an effective alternative to prevent epidemics.

Key-words: *Aedes aegypti*; DNAm; Population genetics; NADH dehydrogenase subunit 4; Single Nucleotide Polymorphisms; TaqMan®; genetic variability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Fonte: Centers for Disease Control and Prevention.. 2
Figura 2	Criadouros naturais e artificiais do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Fonte: http://portal.saude.gov.br 4
Figura 3	Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Adaptado de: Centers for Disease Control and Prevention 6
Figura 4	Ciclo de transmissão do dengue 7
Figura 5	Países com risco de transmissão de dengue, 2007. As áreas em amarelo indicam risco de transmissão de dengue e os círculos vermelhos representam a extensão geográfica da dengue entre 2000 e 2007. Fonte: Organização Mundial de Saúde 9
Figura 6	Casos de dengue notificados, em todos os estados do Brasil, entre 1990 e 2009. Fonte: Ministério da Saúde13
Figura 7	Distribuição espacial por sorotipo circulante isolado de acordo com o Estado brasileiro em 2009. Fonte: Ministério da Saúde14
Figura 8	Representação da proporção dos criadouros predominantes do mosquito <i>Ae. aegypti</i> encontrados na cidade de Santos/SP20
Figura 9	Representação da proporção dos criadouros predominantes do mosquito <i>Ae. aegypti</i> encontrados na cidade de São Sebastião/SP23
Figura 10	Mapa da localização e distância entre os municípios de Santos/SP e São Sebastião/SP. Fonte: Google Earth, 201035

- Figura 11** Representação da discriminação alélica de um ensaio TaqMan® com concentração de DNA inferior a 30ng/μL, onde não se obteve eficiência (o símbolo X representa amostras indeterminadas) para o polimorfismo do gene Na/K48
- Figura 12** Representação da discriminação alélica de um ensaio TaqMan® para o polimorfismo do gene PGK com concentração de DNA de 30ng/μL . (Cor azul, alelos G/G; Cor vermelha, alelos A/A, Cor verde, ambos os alelos A/G; Cor preta, controle negativo).....49
- Figura 13** Histogramas das frequências alélicas dos nove SNPs estimados para 742 indivíduos das populações de Santos e São Sebastião, coletadas nos anos de 2007 e 2008. (O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X as populações) 53
- Figura 14** Resultado da análise Bayesiana (considerando frequências alélicas correlacionadas). Cada um dos 742 indivíduos incluídos na análise é representado por uma linha vertical, dividida em até três cores. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas, e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*64
- Figura 15** Frequência de cada cluster nas populações de São Sebastião (2007 - 2008) e Santos (2007 - 2008). Cada cor indica um cluster (vermelho = cluster 1; verde = cluster 2 e azul = cluster 3)64
- Figura 16** Gráfico de agrupamento das populações em função das composições genéticas. (Cada indivíduo é representando por um ponto colorido; cor vermelha representa a população de São Sebastião – coleta 2007; cor verde representa a população de São Sebastião – coleta 2008; cor azul representa a população de Santos – coleta 2007; cor amarela representa a população de Santos – coleta 200865

- Figura 17** Frequência dos 6 haplótipos encontrados nas populações de *Ae. aegypti* de Santos e São Sebastião67
- Figura 18** Diagrama de haplótipos encontrados em populações de *Aedes aegypti* de Santos (cor Azul) e São Sebastião (cor vermelha). O tamanho do círculo representa o número de indivíduos e as cores representam a frequência de cada população no referido haplótipo. Haplótipos (H1 à H6) são apresentados junto aos círculos. Números entre as esferas representam os sítios polimórficos, como descrito na tabela 14 69
- Figura 19** Árvore de *Neighbor-Joining* baseada na análise da distância genética das espécies. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap* (apenas valores acima de 50 são mostrados). (As esferas azuis ● haplótipos das populações de *Ae. aegypti* de Santos e São Sebastião (2007 – 2008); triângulos amarelos ▲ haplótipos encontrados na população de Santos/SP no estudo realizado por Bracco e colaboradores (2007); os losangos em vermelho ◆ haplótipos encontrados na população de Santos/SP por Paduan e colaboradores (2006); e os quadrados (■ e ■) representam populações externas - *Ae. albopictus* e *An. darlingi*)70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de casos de dengue, coeficiente de incidência e sorotipo circulante, 1997-2009, Santos-SP	19
Tabela 2	Número de casos de dengue, 2001-2009, São Sebastião-SP	22
Tabela 3	Número de ovitrampas instaladas, segundo o número de imóveis do município	36
Tabela 4	Oligonucleotídeos e sondas utilizadas para genotipagem de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs). (Nucleotídeos marcados em vermelho indica o polimorfismo presente na sonda marcação VIC™; o nucleotídeo marcado em azul indica o polimorfismo presente na sonda marcada com FAM™).....	38
Tabela 5	Dados obtidos após a genotipagem das populações do mosquito <i>Ae. aegypti</i> para o gene Na/K, gerada automaticamente pelo software StepOne v. 2.1(Applied Biosystems). A tabela apresenta todos os dados gerados no ensaio, como: amostra e posição, qualidade (%), discriminação dos alelos, entre outros.....	50
Tabela 6	Planilha representativa da discriminação alélica para os genes analisados, a qual apresenta o genótipo de cada indivíduo das populações do estudo. (As letras A, T, C e G representam os alelos presentes em cada indivíduo e seu respectivo gene, o sinal de interrogação (?) representa amostras com resultado indeterminado)	51
Tabela 7	Planilha de discriminação alélica onde as letras representando os SNPs foram substituídas por números (A = 1; C = 2; G = 3 e T = 4), para a utilização no software Convert	52

Tabela 8	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de FIS (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para 9 SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de São Sebastião em 2007.....	58
Tabela 9	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de FIS (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para 9 SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de São Sebastião em 2008.....	59
Tabela 10	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de FIS (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para 9 SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de Santos em 2007.....	60
Tabela 11	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de FIS (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para 9 SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de Santos em 2008.....	61
Tabela 12	Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos marcadores SNPs entre as populações de <i>Aedes aegypti</i> de São Sebastião e Santos, sem agrupamento	62
Tabela 13	Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos marcadores SNPs entre as coletas (2007-2008) da população de <i>Aedes aegypti</i> de São Sebastião, sem agrupamento	62
Tabela 14	Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos marcadores SNPs entre as coletas (2007-2008) da população de <i>Aedes aegypti</i> de Santos, sem agrupamento	62

Tabela 15	Matriz de diferenciação genética (FST pairwise) das populações de <i>Aedes aegypti</i> calculado a partir do método da estatística F	63
Tabela 16	Haplótipos encontrados nas populações de Santos e São Sebastião (2007), com o número de sítios polimórficos e as posições das mutações em cada haplótipo	66
Tabela 17	Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos haplótipos entre as populações de <i>Aedes aegypti</i> (Santos e São Sebastião coletas 2007-2008)	67
Tabela 18	Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos haplótipos entre as coletas (2007 e 2008) de <i>Aedes aegypti</i> da população de Santos	68
Tabela 19	Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos haplótipos entre as coletas 2007 e 2008 de <i>Aedes aegypti</i> da população de São Sebastião	68
Tabela 20	Haplótipos encontrados na população de Santos (2007 - 2008), com o número de sítios polimórficos, posições das mutações e a frequência (%) de cada haplótipo	71
Tabela 21	Haplótipos encontrados na população de São Sebastião (2007 - 2008), com o número de sítios polimórficos, posições das mutações e a frequência (%) de cada haplótipo	72

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
1. Revisão Bibliográfica	1
1.1. <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	2
1.2. Dengue	6
1.3. Dengue no mundo	10
1.4. Dengue e o mosquito <i>Aedes aegypti</i> no Brasil	11
1.5. Vigilância e controle do <i>Aedes aegypti</i>	14
1.6. Município de Santos	17
1.7. Município de São Sebastião	20
1.8. Estudos genéticos	23
1.9. Marcadores moleculares	24
1.10. Metodologia Taqman®	30
2. Objetivos	31
2.1. Objetivos principais	32
2.2. Objetivos	32
3. Material e Métodos	33
3.1. Populações do estudo	34
3.2. Amostragem de <i>Ae. aegypti</i> através de ovitrampas	35
3.3. Formação da colônia	36
3.4. Estudo genético populacional por SNPs	37
3.4.1. Preparação e quantificação do DNA	37
3.4.2. Marcadores SNPs	37
3.4.3. Genotipagem por SNPs (Reação TaqMan®)	39
3.5. Análises da estrutura genética populacional - SNP	40
3.5.1. Obtenção dos dados	40
3.5.2. Frequências alélicas	40

3.5.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	41
3.5.4. Análise da estrutura genética populacional	41
3.5.5. Estruturação populacional	42
3.6. Estudo genética populacional por análise mitocondrial	42
3.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	42
3.6.2. Purificação dos produtos de PCR	43
3.6.3. Quantificação dos produtos de PCR purificados	44
3.6.4. Reação de sequenciamento	44
3.6.5. Precipitação das reações de sequenciamento	44
3.6.6. Análise de polimorfismo molecular e filogenia	45
4. Resultados	47
4.1. Caracterização de SNPs por metodologia TaqMan®	48
4.2. Análise de estrutura genética populacional por SN	53
4.2.1. Frequências alélicas	53
4.2.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	57
4.2.3. Análise da estrutura genética populacional	61
4.2.4. F_{ST} pairwise	63
4.2.5. Estruturação populacional	63
4.3. Estudo genético populacional por análise mitocondrial	65
4.3.1. Análise de polimorfismo molecular e filogenia	65
5. Discussão	73
6. Conclusão	79
7. Referências bibliográficas	81

1. Introdução

1. Revisão bibliográfica

1.1. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

O *Aedes aegypti* é um mosquito pertencente à ordem Díptera, subordem Nematóceras, família Culicidae, e subfamília Culicinae, destaca-se por ser o principal vetor da febre amarela (FA) urbana e dos vírus dengue sorotipos 1- 4 (DEN 1- 4) em humanos (Gubler, 2002).

Este culicídeo apresenta coloração escura (do castanho pálido ao enegrecido), frequentemente ornamentado com manchas de escamas branco-prateadas no tórax e nas pernas, e um desenho em forma de “lira” no mesonoto. Existem duas subespécies baseadas na morfologia e na distribuição geográfica. O *Ae. aegypti formosus*, de coloração mais escura e usualmente encontrado em áreas silvestres, com distribuição ao sul do deserto do Saara. O *Ae. aegypti aegypti* apresenta coloração castanha, é encontrado em ambientes domiciliares, com distribuição nas planícies costeiras da África e em localidades geográficas fora do Continente Africano (Figura 1) (Tabachnick & Powell, 1979).



Figura 1. Mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention.

Evidências sugerem que este inseto é oriundo do Continente Africano, provavelmente na região da Etiópia, tendo sido originalmente descrito no Egito, de onde acompanhou o homem em sua migração pelo mundo, e permaneceu nos locais

em que as alterações antrópicas propiciaram sua proliferação (Mattingly, 1957; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Autores acreditam que esta espécie tornou-se doméstica em ambiente africano, adaptando-se ao ambiente humano e procriando em reservatórios de água estocada nos povoados. A partir desta localidade o mosquito se dispersou pelo mundo de forma passiva através das rotas comerciais entre os séculos XVII e XIX. No continente americano sua presença está associada ao intenso tráfego de navios negreiros provenientes da África Ocidental na época precoce da colonização (Forattini, 1965; Tabachnick, 1991). Próximo do ano de 1800, o *Ae. aegypti* já tinha se estabelecido em muitas cidades tropicais, especialmente no Novo Mundo (Smith, 1956). Hoje é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, cujas condições climáticas associadas aos hábitos da população, favorecem a presença do vetor e do vírus, possibilitando o surgimento de endemias (Lines et al, 1994).

Embora o *Ae. aegypti* possa ser encontrado longe de aglomerados humanos em algumas áreas do Velho Mundo, em nosso país está restrito às cidades, sempre ligado ao peridomicílio e ao domicílio humano. Nas cidades brasileiras é encontrado nos locais de maior concentração humana e raramente em ambientes semi-silvestres ou onde há menor densidade demográfica, por adaptar-se perfeitamente ao ambiente domiciliar, mais especialmente ao meio urbano, através de um processo conhecido como domiciliação (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

São insetos de hábitos diurnos, período no qual as fêmeas restringem seus hábitos hematófagos. Muito eclético quanto ao hospedeiro, suga grande variedade de animais tendo predileção pelo homem (antropofilia). Seus picos de maior atividade acham-se, geralmente, situados no amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino, mas ataca o homem, e por vezes animais domésticos, a qualquer hora do dia. À noite, embora raramente, podem ser oportunistas, atacando o homem se este se aproxima de seu abrigo (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A domesticidade desta espécie é ressaltada pelo fato de que ambos os sexos são encontrados em proporções semelhantes dentro das casas e nos abrigos peridomiciliares. Logo após a emergência dos adultos, ambos os sexos se dirigem e/ou

permanecem no domicílio ou peridomicílio e ali copulam, obtêm seus alimentos e desovam.

Seu habitat está intimamente ligado às condições domiciliares ou peridomiciliares, decorrentes da ação humana. Sua preferência pelos depósitos artificiais como local de ovoposição faz com que a concentração populacional advinda com a urbanização, ao lado da larga utilização de recipientes artificiais, seja fator determinante na sua crescente proliferação nos centros urbanos das regiões tropicais e subtropicais do planeta. Como exemplos de criadouros artificiais podemos citar: pneus, latas, vasos de plantas, caixas d'água, piscinas (Figura 2). Nesses criadouros, as fêmeas depositam seus ovos, isoladamente, em um substrato úmido, próximo à água ou em local inundável (Gadelha & Toda, 1985; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Além dos recipientes artificiais oferecidos pelo homem, parece existir uma correlação entre a presença do mosquito adulto e as condições gerais das moradias. Nogueira e colaboradores (2005) mostraram correlação significativa entre a presença de adultos de *Ae. aegypti* e a condição das casas sob três aspectos: condição geral da moradia, sombreamento e limpeza do quintal. Casas onde estes três itens se apresentavam insatisfatórios (má condição da casa, quintal muito sombreado e sujo) apresentaram um número maior de ovitrampas com ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, quando comparadas com casas em boas condições.



Figura 2. Criadouros naturais e artificiais do mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kkitdengue/epidemiologia/imagens.html>.

O *Ae. aegypti* tem um ciclo de vida dividido em quatro fases (Figura 3):

- ✚ Ovos – de formato alongado e fusiforme, são depositados pela fêmea nas paredes internas dos criadouros, próximos à superfície da água. Em condições favoráveis de temperatura e umidade, sua eclosão se dá em dois a três dias após a postura. Sem o contato com a água, podem resistir a longos períodos de dessecação (até 450 dias);
- ✚ Larva – fase essencialmente aquática apresenta quatro estádios (L1, L2, L3 e L4). É a fase de alimentação e crescimento (se alimentam de material orgânico acumulado nas paredes e no fundo dos criadouros). Em condições favoráveis, seu desenvolvimento larval completo se dá em 5 a 10 dias;
- ✚ Pupa – fase aquática, não requer alimentação, apenas respira, é o período de transição onde ocorrem transformações que levam a formação do adulto e à mudança do hábito aquático pelo terrestre. Este estágio dura cerca de 2 a 3 dias;
- ✚ Adulto – representa a fase reprodutiva do inseto, onde ocorre a dispersão. Vive em média 45 dias.

Este ciclo geralmente se desenvolve em um curto espaço de tempo, podendo variar entre 10 e 15 dias, o qual está intimamente ligado a temperatura, disponibilidade de alimento e densidade populacional do criadouro (Honório, 1999).

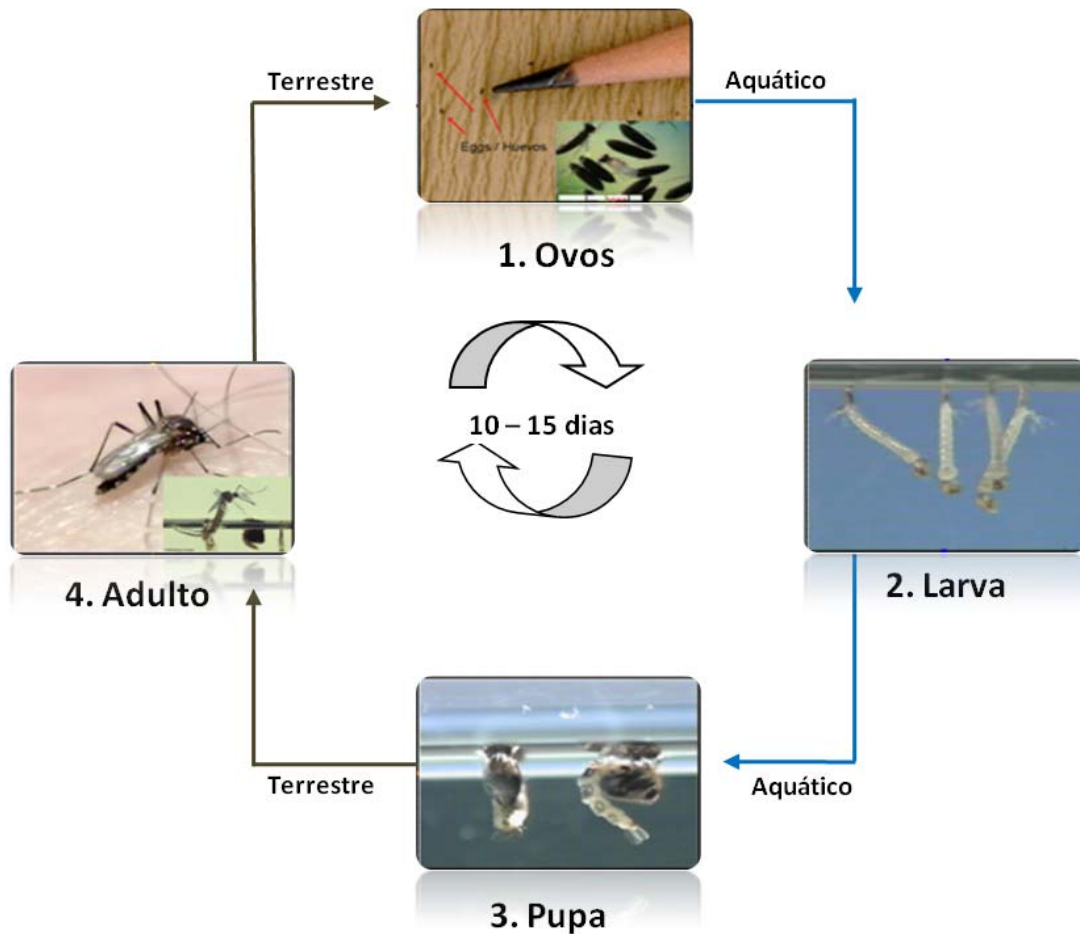


Figura 3. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Adaptado de: Centers for Disease Control and Prevention.

1.2. Dengue

O termo dengue é provavelmente, derivado da frase swahili “ki dengu pepo”, que descreve os ataques causados por maus espíritos e, inicialmente, era utilizado para descrever enfermidades que acometeram ingleses durante uma epidemia que afetou as Índias Ocidentais em 1927-1928 (Holmes et al., 1998).

Atualmente, a dengue é a arbovirose mais comum que atinge o homem. O termo arbovirose deriva da expressão inglesa “*ARthropod BORne VIRUSES*”, adotada em 1942, para designar grupos de infecções virais cujos agentes foram isolados de animais que tinham participação na etiologia das encefalites. Já a denominação

"arbovírus" foi recomendada internacionalmente em 1963 para designar um grupo de vírus capaz de se multiplicar em artrópodes e de ser transmitido aos hospedeiros vertebrados através da picada desses (WHO, 1997). O ciclo de transmissão do dengue inclui o homem infectado por qualquer dos quatro sorotipos, o mosquito vetor do gênero *Aedes* e o homem susceptível (Figura 4).

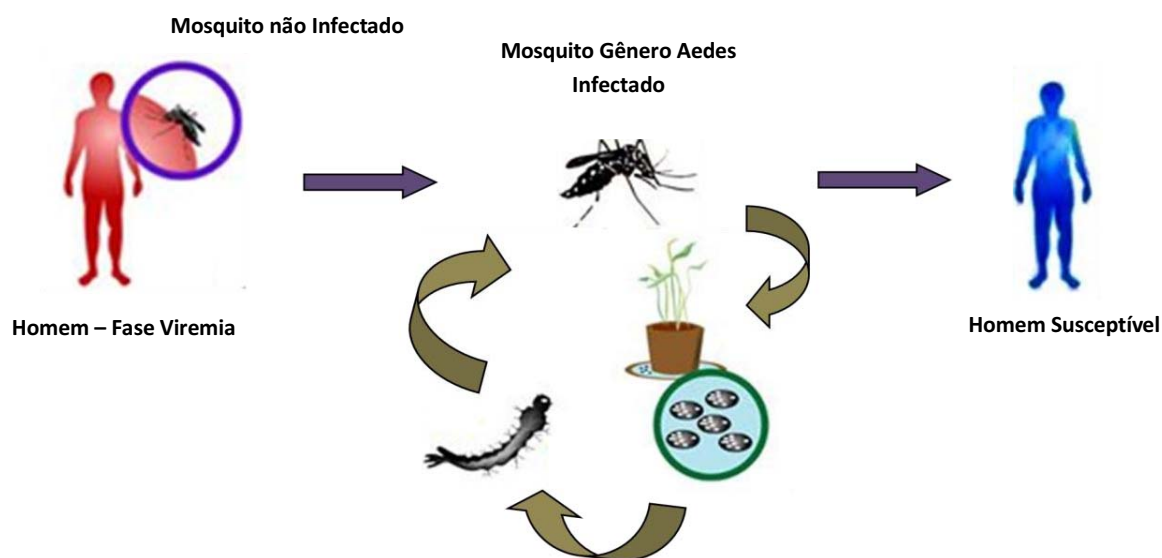


Figura 4. Ciclo de transmissão do dengue. Adaptado de: Apoena Pinheiro/UnB Agência.

Os arbovírus multiplicam-se nos tecidos dos organismos artrópodes, que se infectam tornando-se vetores depois de sugarem sangue de hospedeiros em período de viremia (quando há circulação do vírus no sangue periférico), que tem duração de aproximadamente sete dias (Rigau-Pérez, 2001). O período de desenvolvimento do arbovírus, que ocorre dentro do organismo do artrópode é denominado “período de incubação extrínseco” (PIE), após o qual, o vírus poderá ser transmitido a novos hospedeiros susceptíveis. No organismo do hospedeiro vertebrado, o período de incubação do vírus é denominado “período de incubação intrínseco” (PII) (Gubler, 1998a). Sabe-se que os mosquitos, uma vez infectados, são capazes de manter a circulação dos vírus sem a participação dos hospedeiros humanos através de um mecanismo denominado transmissão transovariana (ou vertical), no qual o vírus é

transmitido da mãe infectada para os ovos. Adicionalmente, a sobrevivência dos vírus pode ser mantida por longos períodos devido ao estado de diapausa dos ovos (Joshi et al., 1996; Rosen et al., 1983).

A dengue caracteriza-se por uma doença febril aguda, cujo agente etiológico é um vírus da família Flaviviridae, gênero Flavivírus. São conhecidos atualmente quatro sorotipos, antigenicamente distintos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. O vírus dengue é composto por RNA simples fita, mede 40-50nm de diâmetro e possui genoma de aproximadamente 11 kilobases (kb), tem como hospedeiro vertebrado o homem e outros primatas, mas somente o primeiro apresenta manifestação clínica da infecção e período de viremia. Nos demais primatas a viremia é baixa e de curta duração. Não existe imunidade cruzada, isto é, a infecção por um dos sorotipos só confere imunidade permanente, ou no mínimo duradoura, para aquele sorotipo (Gubler, 1998b).

Clinicamente, as manifestações do dengue no homem caracterizam-se por um amplo espectro clínico que variam de uma síndrome viral infectante, inespecífica e benigna (infecção assintomática) ou de febre indiferenciada, até as graves formas de hemorragia e/ou choque. Os casos típicos da dengue podem ser agrupados em duas categorias principais:

- ✚ dengue clássico - caracteriza-se por uma febre alta de início abrupto, cefaléia intensa, dor retroorbitária, dores articulares e musculares, prostração, podendo ocorrer exantema (fenômenos hemorrágicos) sem maiores consequências;
- ✚ dengue hemorrágico/síndrome de choque do dengue - é caracterizado por um quadro de febre alta, inicialmente indiferenciável do dengue clássico que, após a normalização da temperatura, entre o terceiro e o quinto dia da enfermidade, evolui com fenômenos hemorrágicos (petéquias, púrpura, equimose, epistaxe, sangramento gengival, sufusões hemorrágicas, hematêmese, melena) e/ou insuficiência circulatória com ou sem choque hipovolêmico (OMS, 1987).

São fatores de risco para casos graves: a cepa do sorotipo do vírus infectante, o estado imunitário e genético do paciente, a concomitância com outras doenças e a

infecção prévia por outro sorotipo viral da doença (Figueiredo & Fonseca, 1966; Pinheiro & Travassos-da-Rosa, 1996).

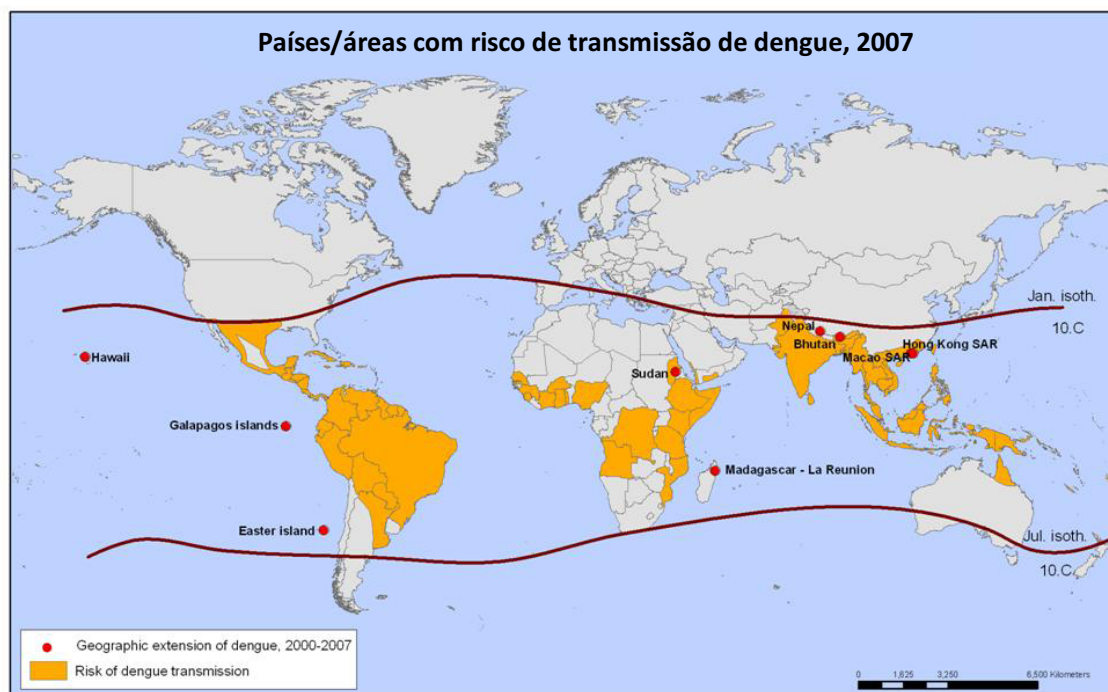


Figura 5. Países com risco de transmissão de dengue, 2007. As áreas em amarelo indicam risco de transmissão de dengue e os círculos vermelhos representam a extensão geográfica da dengue entre 2000 e 2007. Fonte: Organização Mundial de Saúde.

A origem exata desta doença não está clara. Alguns indícios sugerem que ela tenha se originado na África e depois se espalhado pelo mundo com o comércio de escravos (Ehrenkranz et al., 1971; Smith, 1956). Entretanto, uma vez que os vírus são altamente adaptados ao hospedeiro invertebrado, tem sido proposto que estes podem ter se originado em ciclos silvestres envolvendo primatas inferiores e mosquitos habitantes da copa das árvores na Península Malaia (Smith, 1956; Rudnick, 1986; Halstead, 1992).

A dengue é hoje a arbovirose mais importante do mundo. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão sob risco de contaminação, principalmente em regiões tropicais compreendidas entre os paralelos (latitudes) 35°N e 35°S ou mesmo fora desses limites, mas dentro das zonas isotermias de 20°C (Slosek, 1986; Jacobbs, 1999), onde

a temperatura e umidade favorecem a proliferação do mosquito. Entre as doenças re-emergentes, é a que constitui em mais grave problema de saúde pública (Tauil, 2002). Na figura 5 estão representadas as áreas com risco de transmissão de dengue.

1.3. Dengue no mundo

Descrições do quadro clínico de epidemias compatíveis com essa enfermidade estão registradas em uma enciclopédia chinesa datada de 610 d.C. (Howe, 1977; Gubler, 1998b).

Surtos epidêmicos de doença febril aguda no oeste da Índia Francesa, em 1635, e no Panamá, em 1699, têm sido relacionados à dengue, porém sem muito consenso quanto a ser por esse agente etiológico ou pelo vírus Chikungunya (Martinez-Torres, 1990). No final do século XVIII surgiram relatos de uma enfermidade semelhante à dengue, descritos simultaneamente em 1779 em três distintos continentes: Batávia (Indonésia- Ásia), Cairo (Egito- África) e Filadélfia (Estados Unidos da América-América do Norte). Tais fatos indicam que tanto o dengue vírus (DENV), quanto o mosquito vetor já apresentavam uma distribuição mundial na região dos trópicos (Henchal & Putnak, 1990).

Até a Segunda Guerra Mundial a dengue era considerada uma doença benigna, mas passou a exibir outras características, pois esse evento propiciou a circulação de vários sorotipos em uma mesma área geográfica, favorecendo a ocorrência de uma febre hemorrágica grave (FHD), posteriormente relacionada à forma grave da doença. Em 1953, nas Filipinas, foi registrado o primeiro surto de FHD, mas a confirmação de que se tratava de doença hemorrágica causada pelo vírus da dengue só se deu em 1958, com a epidemia de Bangkok/Tailândia (Martinez-Torres, 1990). A partir de então, vários países do Sudeste Asiático foram sendo acometidos por epidemias de FHD, tais como Vietnã do Sul (1960), Cingapura (1962), Malásia (1963), Indonésia (1969) e Birmânia (atual Mianmar) (1970) (Gubler, 1997).

Entre 1980 e 1990, houve agravamento da situação, com a expansão geográfica da virose para a Índia, Sri Lanka, Maldivas e leste da China, entre outros países, e também pela circulação hiperendêmica com registro de milhares de casos e óbitos

causados pelas formas hemorrágicas da doença, predominantemente em crianças (Gubler, 1997).

Nas Américas, o dengue como entidade clínica é conhecido há pelo menos 200 anos. A primeira pandemia registrada na região, tomando como referência critérios clínicos e epidemiológicos, ocorreu nas Antilhas-Golfo do México-Atlântico, em 1827-28. Porém a primeira pandemia laboratorialmente documentada ocorreu na década de 60, quando em 1963 foi isolado o DEN-3, do qual se observou a transmissão no Caribe e na Venezuela (Medronho, 1993). A partir desta década até os dias atuais observou-se intensificação da atividade do dengue no continente americano, verificando-se intervalos mais curtos entre os períodos pandêmicos, e o envolvimento de novas áreas geográficas anteriormente não atingidas como a América do Sul (Ehrenkranz, 1971; Pinheiros, 1989; OPAS, 1992). Atualmente a dengue é endêmica em países tropicais do Pacífico Sul, Ásia, África, Américas, Caribe, Oceania e Austrália, indicando crescente disseminação do dengue no mundo (PAHO, 2006).

1.4. Dengue e o mosquito *Aedes aegypti* no Brasil

Faz-se referência a dengue no Brasil desde o ano de 1846, na região sudeste, norte e nordeste do país (Mariano, 1917; Braga & Valle, 2007). Os primeiros casos de dengue baseados em critérios clínicos no Brasil foram relatados em Niterói (Rio de Janeiro), em 1923 (Osanai, 1984). Entre as décadas de 40 e 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). O Brasil conseguiu a erradicação em 1955, referendada oficialmente pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) em 1958. Por questões econômicas, sociais e políticas, os países das Américas que erradicaram o *Ae. aegypti*, em virtude da necessidade de eliminar a febre amarela urbana, não utilizaram oportunamente e com o rigor necessário, os conhecimentos técnicos e científicos adquiridos durante a execução daquela campanha (Teixeira et al., 1999). A erradicação foi difícil de ser sustentada e a re-introdução do culicídeo no Brasil ocorreu em 1967, possivelmente originada a partir de países vizinhos, que não obtiveram êxito em sua erradicação (Monath, 1994; Gubler, 1997).

As primeiras re-infestações por este culicídeo verificadas no Brasil, depois de alcançada a erradicação, ocorreram em Belém (Pará) em 1967, e em São Luiz (Maranhão) em 1968, tendo sido eliminados os respectivos focos em 1973. No ano de 1976 constatou-se a presença do mosquito vetor em Salvador (Bahia) e em 1977 no Rio de Janeiro (Rio de Janeiro) (Ministério da Saúde, 1991). Nessa época, somente a partir de novembro de 1981 até o mês de março de 1982, ocorreu uma epidemia na região norte da Amazônia Brasileira, na cidade de Boa Vista (Território de Roraima), com cerca de 11 mil casos da doença e circulação dos sorotipos DEN1 e DEN4 (Osanai, 1984; Teixeira, 1999).

No estado de São Paulo, os primeiros registros da presença do *Ae. aegypti* datam de 1980 e 1981 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 progressão geográfica da infestação pelo *Ae. aegypti* ocorreu na direção dos municípios situados de oeste para leste. 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 ano de 1986, nova epidemia de dengue volta a ocorrer no Brasil, na região metropolitana do Rio de Janeiro e municípios vizinhos (Schatzmayr et al., 1986; Nogueira et al., 1988). Logo após, em 1987, mais quatro Estados foram atingidos: Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e São Paulo. Em 1990 o dengue chega ao Mato Grosso do Sul e atinge novamente com grande intensidade o Estado de São Paulo; em 1991 é introduzido no Estado do Tocantins e, em 1992, no Mato Grosso. Pode-se considerar, tomando como referência as séries históricas de dados de notificação para o período 1980-1991, divulgados pelo Ministério da Saúde, que o dengue tomou-se endemo-epidêmico na maioria dos Estados do Brasil onde houve sua introdução (Ministério da Saúde, 1992).

Em decorrência dos grandes aglomerados populacionais nas cidades, associados às precárias condições de vida e socioambientais presentes no Brasil, o vetor da doença (*Ae. aegypti*) encontrou as condições ideais para sua proliferação e manutenção no meio urbano. Na figura 6 estão apresentados dados de notificações de

dengue no Brasil de 1990 a 2009, demonstrando que a dengue vem mantendo elevados índices de infecção no decorrer dos anos.

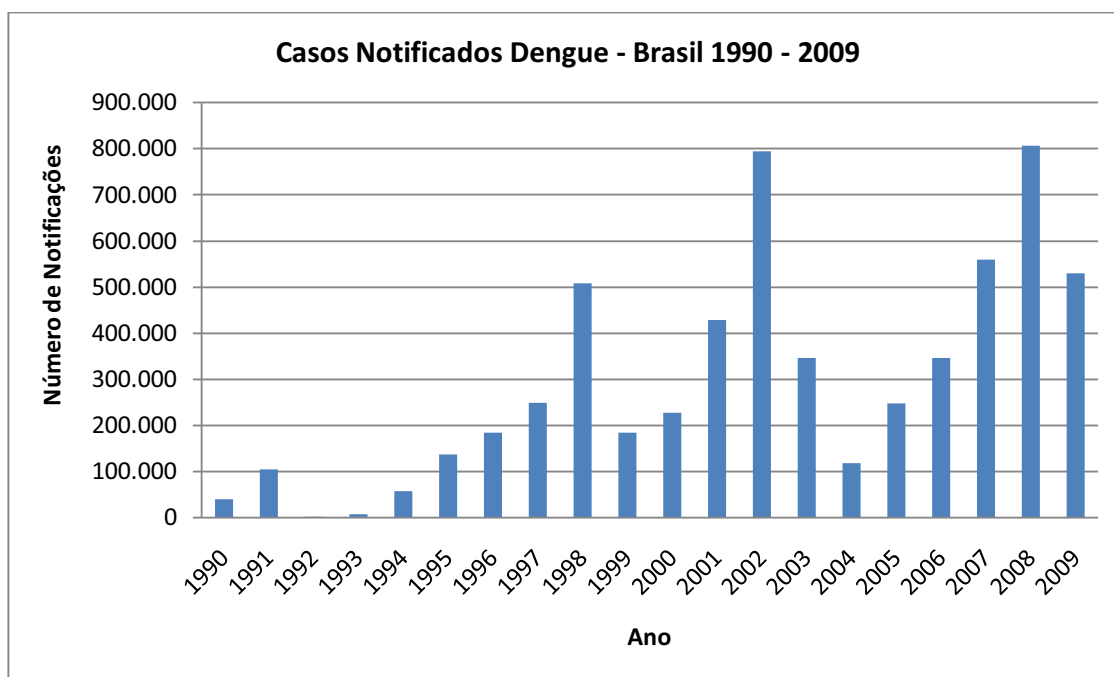


Figura 6. Casos de dengue notificados, em todos os estados do Brasil, entre 1990 e 2009. Fonte: Ministério da Saúde.

Em 2010, até 16 de outubro, foram notificados 936.260 casos de dengue clássica no país, dos quais 14.342 foram classificados como graves, ocasionando 592 óbitos. No mesmo período de 2009, foram 489.819 notificações, com 8.714 casos graves e 312 óbitos. (Ministério da Saúde, 2010).

Até o ano de 2009 encontrava-se confirmada a circulação de três sorotipos do vírus: DEN-1, DEN-2 e DEN-3 (Figura 7) (Ministério da Saúde, 2009). Porém, em julho de 2010, após 28 anos sem circulação deste sorotipo no Brasil, o DEN-4 foi detectado em Boa Vista (RR). Até o momento, dez casos foram confirmados, mas desde setembro não há suspeita de novos casos pelo sorotipo 4 (Ministério da Saúde, 2010).

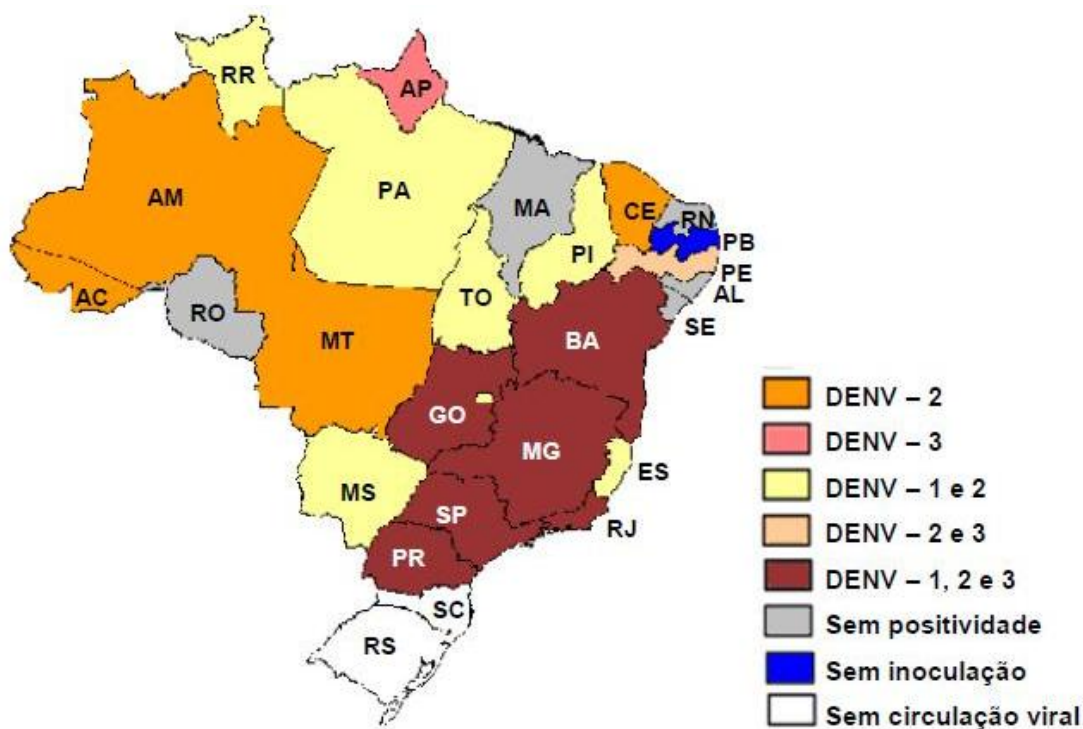


Figura 7. Distribuição espacial por sorotipo circulante isolado de acordo com o Estado brasileiro em 2009. Fonte: Ministério da Saúde.

O impacto da dengue sobre a população humana é notado não apenas pelos sintomas que causa como também pela ocorrência de óbitos, principalmente entre crianças. Os prejuízos econômicos são expressivos em decorrência de gastos com: tratamento, hospitalização, controle dos vetores, abstenção ao trabalho e perdas com turismo (WHO, 1997).

1.5. Vigilância e controle do *Aedes aegypti*

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países, em todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 22 mil morrem em consequência da dengue (WHO, 2010).

A transmissão dos arbovírus é dependente da presença de populações de mosquitos vetores, a falta de um tratamento específico e uma vacina eficaz e segura, juntamente com a intensa morbidade do agente infeccioso e a alta competência vetorial do *Ae. aegypti*, tornam a prevenção da dengue restrita ao controle do vetor. Desta forma os programas de controle ainda são o mecanismo de maior sucesso na prevenção dessas doenças (Malavige, 2004).

No Brasil, na atual situação, onde é elevado o número de municípios infestados pelo mosquito *Aedes aegypti*, torna-se imprescindível a implementação de mecanismos para a intensificação das políticas de saúde, saneamento e meio ambiente, que venham contribuir para a redução do número de potenciais criadouros e conseqüentemente do mosquito (Funasa, 2002).

Atualmente uma das metodologias mais adotadas como parte do controle de vetores em Saúde Pública é uso de inseticidas de origem orgânica ou inorgânica (Kuno, 1995; Reiter & Gubler, 1997; Rose, 2001, Macoris, 2007). Apesar do uso de inseticidas químicos ser a principal forma de controle realizada a décadas, na maioria das vezes não pode ser considerada como a melhor estratégia, pois muitas doenças, como por exemplo malária e dengue, persistem como endêmicas no Brasil, mesmo após a utilização de inseticidas químicos (Adegas et al., 2005). Além disso, os insetos sobreviventes são resistentes aos inseticidas utilizados e conseqüentemente as próximas gerações também o serão, o que diminui a eficiência deste método de controle.

No estado de São Paulo, a Superintendência de Controle de Endemias (Sucen), órgão atuante desde 1985, ciente da gravidade deste problema, criou o “Programa de Monitoramento da Susceptibilidade das Populações de *Aedes aegypti* no Estado de São Paulo” para conhecer a resposta das populações desta espécie aos inseticidas empregados e propor a sua substituição ou restrição do uso no controle em diversas regiões, as quais são denominadas Municípios Sentinelas (Alves, et al., 1991).

No modelo atual, além do controle de susceptibilidade, equipes municipais e/ou estaduais vem desenvolvendo outras atividades de monitoramento tal como: levantamento periódico de focos de *Aedes*; Índice de Breteau (IB) e Índice Predial (IP) larvário, seguindo as diretrizes do LIRAA (Levantamento de Índice Rápido de

Infestação por *Aedes aegypti*); busca ativa de casos, bloqueio químico (focal e perifocal) de domicílios suspeitos de dengue e vizinhança (uso de inseticidas ou larvicidas); controle mecânico (eliminação de criadouros); controle biológico (utilizando bactérias ou peixes larvófagos); avaliação periódica de pontos estratégicos (cemitérios, ferros-velho, borracharias) utilizando larvitrapas e atividades para o incentivo a participação da comunidade. Tais medidas vêm sendo adotadas para minimizar o problema da dengue, porém, mesmo com a adoção destas medidas, anualmente é registrada transmissão de dengue em vários municípios do Estado de São Paulo (Glasser & Gomes, 2000).

Sendo assim, na seleção do método mais adequado de controle do vetor, ou combinação de métodos, deve-se considerar a ecologia local e comportamento das espécies alvo, os recursos disponíveis para a implementação, o contexto cultural em que as intervenções de controle serão realizadas, a viabilidade de aplicá-las em tempo hábil, bem como a adequação de cobertura (WHO, 2009).

Os serviços de controle de vetores devem estar intimamente ligados aos serviços epidemiológicos para verificar a ocorrência de casos de dengue (informação temporal e espacial), visando identificar aumentos transitórios e sazonais na incidência da doença e prevenir o surto de dengue (WHO, 2009).

O diagnóstico preciso da dengue também é de extrema importância, tanto para os cuidados clínicos (detecção precoce de casos graves, confirmação de caso e diagnóstico diferencial de outras doenças infecciosas), como para a vigilância epidemiológica, controle de surtos e patogenia. Também com o objetivo de detectar precocemente a ocorrência de epidemias e o risco de ocorrência do dengue hemorrágico, faz-se necessárias pesquisas para desenvolvimento de vacinas, testes clínicos e métodos de diagnóstico laboratorial para confirmar a infecção pelo vírus dengue (detecção do vírus, de ácido nucléico viral, antígenos ou anticorpos (WHO, 2009).

Atualmente, o desenvolvimento de ferramentas moleculares que possibilitem o entendimento das relações entre o vetor, patógeno e o homem tem se mostrado cada vez mais necessário. Uma das estratégias atualmente utilizadas para se conhecer melhor as populações naturais deste vetor, tem sido estudar a diferenciação genética

espacial destas populações utilizando-se ferramentas moleculares (Gorrochotegui-Escalante et al., 2002; Paduan et al., 2006; Paduan & Ribolla, 2008, Sessions et al., 2009). A biologia molecular é uma importante ferramenta para diversas áreas da biologia, auxiliando na resolução de questões de taxonomia, filogenia, ecologia e dinâmica populacional. Tanto marcadores de DNA como de proteínas têm revolucionado as ciências biológicas em muitas áreas de estudo (Loxdale & Lushai, 1998).

A integração de diversas áreas com pesquisas envolvendo o mosquito *Ae. aegypti* e as doenças veiculadas por ele, poderão contribuir como um importante avanço para a genética molecular, no desenvolvimento de marcadores genéticos e de técnicas mais eficientes, tendo em vista a alta diversidade genética das populações de mosquito e as condições ambientais presentes no Brasil. Para tanto o conhecimento aprofundado sobre a estruturação genética e dinâmica populacional desta espécie é fundamental, 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.

1.6. Município de Santos

O município está localizado no litoral do Estado de São Paulo, sob os Trópicos de Capricórnio, a 23°56'27" de latitude sul e 45°19'48" a oeste do Meridiano de Greenwich, a 72km da capital paulista. O município estende-se por uma área de 280,9 km², sendo 39,4 km² na parte insular e 241,5 km² na parte continental. Está limitado ao norte por Santo André e Mogi das Cruzes; ao sul pelo Oceano Atlântico e Ilha de Santo Amaro (Guarujá), a leste por Bertioga, e a oeste por Cubatão e São Vicente. A população é de 417.098 habitantes e durante as temporadas de verão, férias e feriados prolongados, estima-se uma população flutuante de aproximadamente 1,5 milhões de pessoas. A densidade demográfica é de 1.493,89 hab/km² e taxa de urbanização de 99,47%, tendo 150 km² (55.71%) de área preservada. A cidade está apenas a dois metros acima do nível do mar (IBGE, 2010; Viva Santos, 2010).

A região apresenta clima litorâneo de transição. Registra temperaturas extremas de 42°C e mínimas inferiores a 10°C, sendo a temperatura média anual de 20°C, com índice pluviométrico elevado, prevalecendo o clima quente e úmido, tipicamente tropical (Viva Santos, 2010).

A cidade de Santos abriga o maior porto da América Latina, suas instalações ocupam 7,7 milhões de metros quadrados e cerca de 14 km de extensão, o que traz para a cidade grande fluxo de pessoas de várias partes do país e de outros continentes, transportando produtos e/ou materiais por via terrestre ou marítima, os quais serão exportados ou estão sendo importados. Também é importante pólo turístico, recebendo milhares de pessoas de diversas origens geográficas nacionais ou internacionais, especialmente nos meses de verão (Ministério do Turismo, 2010). Tem alta cobertura de saneamento básico: abastecimento de água 99,66%, esgoto sanitário 94,42% e coleta de lixo 99,62%.

No município foram feitas as primeiras notificações de casos autóctones de dengue a partir de 1997, quando houve a notificação dos primeiros casos autóctones, com a circulação do sorotipo DEN-1. A partir de então inúmeros casos foram notificados e a introdução de novos sorotipos DEN-2 e DEN-3 foram detectadas (Tabela 1). Atualmente o sorotipo circulante nesta localidade é o DEN-3, o qual vem sendo notificado desde 2002, porém houve ressurgimento do sorotipo 1 acarretando inúmeros casos de dengue. Segundo o Centro de vigilância epidemiológica no ano de 2010, foram notificados 8.273 casos autóctones de dengue no município de Santos (CVE, 2010). Apesar das atividades de vigilância e controle, o município apresenta grandes problemas no controle do mosquito vetor da dengue, agravados pelo intenso fluxo de pessoas em período de veraneio e pela grande movimentação portuária, sendo verificada infestação domiciliar pelo *Ae. aegypti* desde 1995 (Glasser et al., 1999).

Tabela 1. Número de casos de dengue, coeficiente de incidência e sorotipo circulante, 1997-2009, Santos-SP.

Ano	Sorotipo Circulante	Casos Autóctones	Coeficiente de Incidência (100 mil)
1997	1	829	203,1
1998	1,2	3576	884,2
1999	1,2	7179	1737,5
2000	-	50	11,9
2001	1,2	10596	2567,9
2002	1,2,3	7504	1803,6
2003	3	874	201,4
2004	3	396	95,4
2005	3	1238	296,2
2006	3	2574	615,2
2007	3	839	200,5
2008	3	88	21,07
2009	3	135	32,36

Fonte: SINAN /SMS, 1997-2009.

Apesar dos esforços, a situação epidemiológica da dengue ainda é preocupante. As condições sócio-ambientais favoráveis à expansão do *Ae. aegypti* possibilitaram a dispersão do vetor e o avanço da doença, pois o vetor apresenta alta capacidade de adaptação ao ambiente criado pela urbanização acelerada (SMS, 2009).

Segundo dados da rede LIRAA (Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *Aedes aegypti*), a maioria dos criadouros do mosquito neste município estão dentro ou no peri-domicílio, em depósitos domiciliares artificiais (vasos, pratos, bromélias, ralos, lages, piscina, etc.) (Figura 8). O município vem apresentando índices de infestação predial (IIP) acima de 5%, sendo considerada situação de alerta ao surto da dengue (Ministério da Saúde, 2010). Os programas de controle e prevenção da dengue merecem total atenção, pois qualquer descontinuidade nas ações de controle

pode alterar o quadro de alerta para situação de risco favorecendo a ocorrência de surtos. Para prevenir tal problema tem se intensificado as atividades educativas dirigidas à população e à participação comunitária e intersetorial, visando a diminuição do percentual de recusas registradas pelos agentes no momento da atividade casa a casa. Porém imóveis fechados e de temporada também são identificados como um dos grandes problemas para o controle dos criadouros (SMS, 2009).

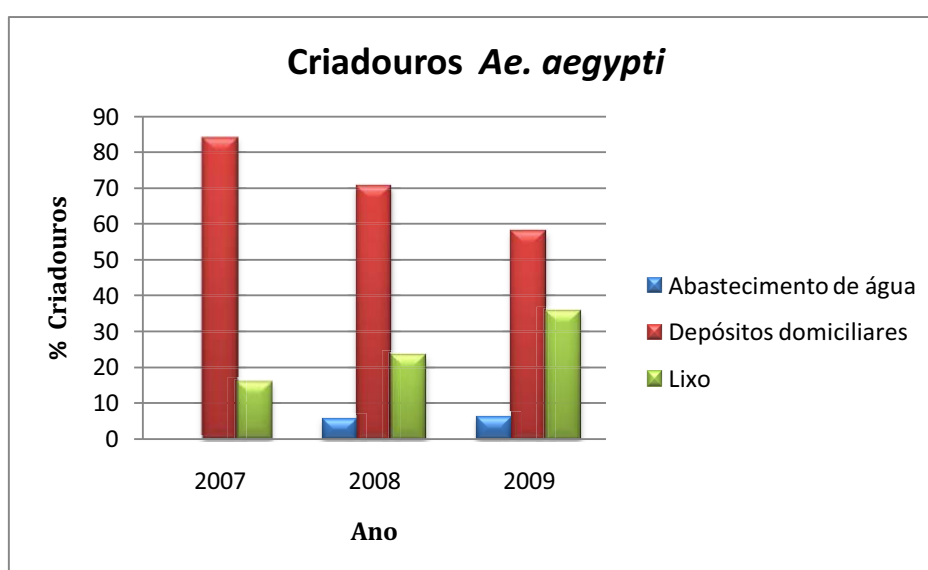


Figura 8. Representação da proporção dos criadouros predominantes do mosquito *Ae. aegypti* encontrados na cidade de Santos/SP.

O intenso fluxo de pessoas junto ao grande número de imóveis com criadouros artificiais do mosquito *Ae. Aegypti* tem favorecido o surgimento de casos de dengue, pela disponibilidade de alimento diante à intensa movimentação populacional, aumentando assim o número de pessoas infectadas, fator este, importante na introdução de novas linhagens do mosquito e novos sorotipos do vírus no Brasil.

1.7. Município de São Sebastião

Localizado no litoral norte do estado de São Paulo, São Sebastião apresenta latitude 23^o21'20" sul e longitude 45^o21'00" oeste, a 220 km da capital paulista. Sua superfície territorial é de 520 km², sendo aproximadamente 300 km² cobertos por

Mata Atlântica. Seus limites são Caraguatatuba a Norte, o Oceano Atlântico a Leste e Sul, Bertioga a Oeste e Salesópolis a Noroeste (Passos et al., 2003). Segundo o censo demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a população estimada no ano de 2009, nesse município, era de 73.631 habitantes, apresenta densidade demográfica de 167,95 hab/km² (IBGE, 2010). A cidade está apenas a um metro acima do nível do mar. Atualmente, sua área urbana extrapola os limites das planícies, invadindo as montanhas costeiras. Esse processo intenso e desordenado de ocupação, exercido pelo crescimento da população urbana e, principalmente, da flutuante, colabora para o agravamento da prestação dos serviços de saneamento básico como: abastecimento de água, rede coletora de esgoto, limpeza urbana e coleta de lixo (Lefèvre et al., 2007).

A cidade possui clima oceânico, com uma temperatura média anual de 24°C. A maior parte das montanhas e das ilhas são cobertas pela Mata Atlântica.

O Porto de São Sebastião, graças às condições de calado e abrigo à navegação, é considerado a terceira melhor região portuária do mundo. Movimenta em torno de 400 mil toneladas/ano e sua produtividade mensal pode ser de 50.000 veículos, 40.000 toneladas de granel sólido e 20.000 toneladas de carga geral fracionada (Prefeitura de São Sebastião, 2010).

São Sebastião é um dos 15 municípios paulistas considerados estâncias balneárias do estado de São Paulo, por cumprirem determinados pré-requisitos definidos por lei estadual. Tal status garante a esses municípios uma verba maior por parte do Estado para a promoção do turismo regional, recebendo milhares de pessoas de diversas localidades.

Esse município apresenta grandes problemas no controle do mosquito da dengue, agravados pelo intenso fluxo de pessoas em período de veraneio e pela grande movimentação portuária, sendo verificada infestação domiciliar pelo *Ae. aegypti* desde 2000. Apesar das atividades de vigilância e controle, um estudo epidemiológico realizado na cidade, identificou as primeiras notificações de casos autóctones da dengue a partir de 2001, com circulação simultânea de três sorotipos virais (DEN-1, 2 e 3), os quais vem se mantendo até os dias de hoje, acarretando inúmeros casos da doença. Tal perfil epidemiológico pode favorecer a ocorrência de

casos de dengue hemorrágica (Ribeiro et al., 2006). Desde a infestação do município pelo *Ae. aegypti* não se obteve sucesso em sua eliminação, e a transmissão do dengue se mantém até os dias de hoje, atingindo centenas de pessoas (Tabela 2).

Tabela 2. Número de casos de dengue, 2001-2009, São Sebastião-SP.

Ano	Casos Autóctones de Dengue
2001	450
2002	969
2003	7
2004	35
2005	5
2006	505
2007	824
2008	83
2009	117

Fonte: Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE

No ano de 2010 foram notificados 1.614 casos autóctones de dengue nesta localidade.

De acordo com a rede LIRAA, o lixo (resíduos sólidos) é o criadouro predominante do mosquito, seguido pelos depósitos domiciliares (vasos, pratos, bromélias, ralos, lages, piscina, etc.) (Figura 9). A cidade apresentou índices de infestação predial (IIP) acima de 3%, considerado situação de alerta ao surto do dengue (Ministério da Saúde, 2010).

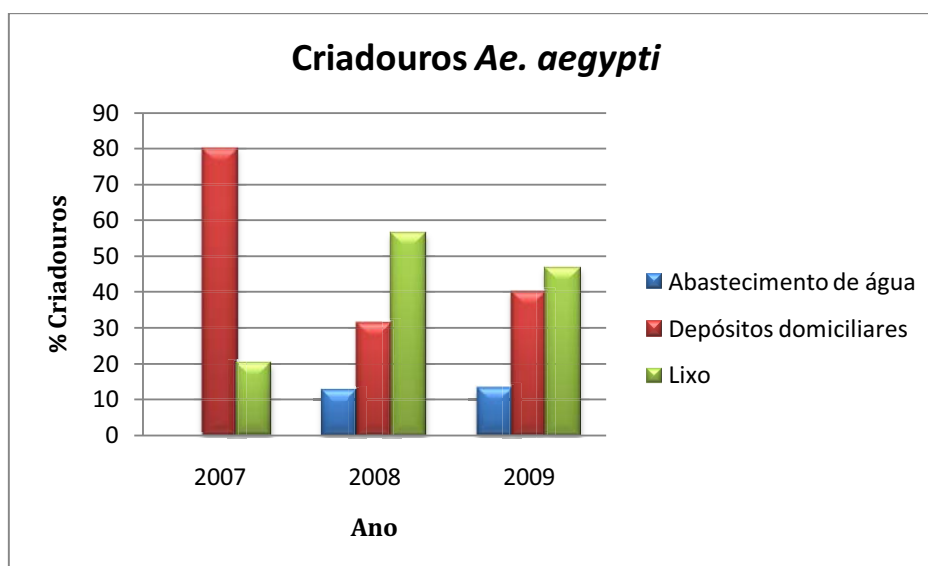


Figura 9. Representação da proporção dos criadouros predominantes do mosquito *Ae. aegypti* encontrados na cidade de São Sebastião/SP.

1.8. Estudos genéticos

Nos últimos anos, um elevado número de estudos envolvendo genética de populações tem sido realizado com *Ae. aegypti*. Os primeiros estudos realizados para avaliação da variabilidade genética foram baseados em técnicas de eletroforese em gel de amido e poliacrilamida. Townson (1969) foi um dos pioneiros, pois realizou estudos isoenzimáticos em mosquitos de Liverpool. O uso de marcadores isoenzimáticos também foi importante na caracterização e diferenciação genética entre as duas subespécies: *Ae. aegypti formosus* e *Ae. aegypti aegypti* (Tabachnick & Powell, 1979; Powell & Tabachnick, 1980; Wallis *et al.*, 1983; Wallis & Tabachnick, 1990).

Mosquitos vetores de agentes infecciosos manifestam alto grau de 'plasticidade' genética, geram mutantes resistentes a diversas condições ambientais (Besansky *et al.*, 1992), conseqüentemente causam elevada diversidade genética, fazendo com que populações de mosquito adquiram resistência múltipla a inseticidas químicos ou biológicos utilizados no seu controle (Groetes & Tabachnik, 2000; Hemingway & Ranson, 2000; Ferre & Van Rie, 2002). Diferenças genéticas podem ser responsáveis por diferenças na capacidade e na competência vetorial ou na susceptibilidade do

vetor aos agentes infecciosos ou aos inseticidas (Lourenço-de-Oliveira et al., 2002). Dessa maneira, a avaliação da variação genética de populações locais de um vetor pode ajudar a planejar medidas de controle adequadas às condições reais de cada área de interesse.

Atualmente existem vários métodos que possibilitam a análise desta variabilidade. Loxdale & Lushai (1998) publicaram uma extensa revisão sobre marcadores moleculares usualmente utilizados para examinar a variabilidade genética em populações de mosquito.

1.9. Marcadores moleculares

De acordo com Ferreira & Gattapaglia (1996), marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas e proteínas, ou um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma.

Até o ano de 1966, o estudo de polimorfismos das populações era realizado com base nos fenótipos dos organismos. Como os variantes fenotípicos são raros, as populações eram frequentemente classificadas como homogêneas (Futuyma, 1992).

Em um dos primeiros ensaios de variação genética envolvendo o uso de um marcador molecular, foi observado que cerca de 30% dos *loci* de cinco populações de *Drosophila pseudoobscura* eram polimórficos (Lewontin & Hubby, 1966). A técnica utilizada por esses autores foi a eletroforese de isoenzimas, demonstrada primeiramente por Harris (1966) e Hubby & Lewontin (1966), iniciando a era dos marcadores moleculares. Entretanto, o poder de detecção da variabilidade existente diretamente ao nível do DNA só foi alcançado com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular na década de 80. O desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase (PCR) concebido por Kary Mullis e representou um grande avanço na detecção de polimorfismos genéticos (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). A partir daí, diversas técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas, e estão hoje disponíveis para o estudo genético.

Os marcadores mais empregados em estudos de polimorfismos são: Isoenzimas, Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente (RAPD), Polimorfismo de

Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP), Microsatélites, Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP), além do Sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA) e de genes de RNA ribossomal (rRNA). Entretanto, a escolha do marcador depende do objetivo do estudo, do nível de observação desejada e da espécie estudada (Roderick, 1996).

Marcadores dominantes como RAPD (Williams et al., 1990) têm sido muito empregados no estudo de populações naturais nos últimos anos. Eles permitem o estudo de um grande número de *loci* e fornecem uma amostragem aleatória do DNA, entretanto, têm limitações significativas quando comparados com marcadores codominantes e/ou haplóides (Lynch & Milligan, 1994). Em recente estudo, 11 populações de *Ae. aegypti* foram analisadas utilizando-se marcadores RAPD. Os resultados indicaram que as populações brasileiras deste vetor estão estruturadas em regiões geográficas, sugerindo a presença de subpopulações estruturadas com significativo nível de isolamento genético por distância. Apesar dos resultados significativos, não foi possível detectar nenhuma diferenciação genética entre os espécimes dentro de uma mesma localidade (Paduan et al., 2006).

Microsatélites têm sido utilizados como marcadores genéticos codominantes para um grande número de artrópodes vetores de doenças humanas. No entanto, um número limitado destes marcadores tem sido identificado para mosquitos do gênero *Culex* (Fonseca et al., 2004; Keyghobadi et al., 2004) e para a espécie *Ae. aegypti* (Barbazan et al., 1999; Huber et al., 2001). Costa-Ribeiro et al. (2006) testaram marcadores microsatélites descritos por Huber et al. (2001) em populações de *Ae. aegypti* de cinco distritos no Rio de Janeiro. Apesar da obtenção de resultados promissores em relação aos marcadores isoenzimáticos, um dos seis *loci* testados foi monomórfico e outro apresentou déficit de heterozigotos. Além do que, o grau de polimorfismo em populações brasileiras do mosquito *Ae. aegypti* foi muito menor quando comparado com as populações do mosquito estudadas na Ásia (Huber et al., 2004).

Muitas regiões do DNA de espécies vetoras já foram clonadas, sequenciadas e caracterizadas. Entre elas estão sequências de genes do DNA mitocondrial que apresentam grande variabilidade e são úteis para o reconhecimento de espécies

críticas, estudos filogenéticos ou de estrutura genética de populações (Walton et al., 2001)

Uma característica relevante do DNA mitocondrial é a frequência de ocorrência de mutações, sendo que a taxa de mutação do DNAm_t é dez vezes maior que a do DNA nuclear. Assim, o DNAm_t evolui cerca de cinco a dez vezes mais rápido que o DNA nuclear (Brown et al., 1982; Cann & Wilson 1983). Esta variação se deve, em primeiro lugar, ao fato da mitocôndria ser uma grande geradora de radicais livres, proporcionando um ambiente favorável a mutações no seu DNA. Outra causa seria a ausência de histonas, que exercem um papel protetor no DNA nuclear (Yakes & van Houten, 1997). Além disso, a enzima DNA polimerase mitocondrial possui baixa atividade corretora quando comparada à DNA polimerase nuclear (Brown et al., 1982; Cann & Wilson 1983) e o reparo do DNA por excisão de nucleotídeos não está presente em mitocôndrias (Croteau et al., 1999).

Outra característica do DNA mitocondrial que lhe confere grande vantagem é o alto número de cópias por célula. Enquanto o DNA nuclear está presente em apenas duas cópias por célula diplóide, em humanos, estima-se que um óvulo maduro contenha milhares de mitocôndrias e mais de 100.000 cópias de DNAm_t (Michaels et al., 1982). No geral, existem entre duas a dez cópias de DNAm_t por mitocôndria e entre 100 e 1.000 mitocôndrias por célula, dependendo do tipo de tecido.

Em animais multicelulares o DNAm_t possui aproximadamente 16.000 pares de bases, sendo o mesmo para muitas espécies (Brown, 1983). Ele é circular e codifica cinco proteínas conhecidas e, nestes genes não existem íntrons. O DNA mitocondrial é altamente conservado entre filós, de herança materna (forma haplóide) e não sofre recombinação gênica. Além disso, suas variantes segregam rapidamente entre as gerações, levando a taxas relativamente altas de polimorfismo (Jenuth et al., 1996). Como o DNAm_t tem tamanho efetivo de apenas um quarto do DNA nuclear, ele é mais sensível ao fenômeno de deriva genética e, isto resulta em maior polimorfismo podendo ser utilizado como marcador genético espécie-específico (Awise, 1994). As mudanças evolutivas do DNAm_t ocorrem principalmente através da substituição de nucleotídeos, embora deleções e inserções sejam conhecidas por ocorrer mais frequentemente em regiões não-codificantes (Brown & Simpson, 1981). Brown et al.,

(1982) mostraram que as substituições de nucleotídeos por transição são mais frequentes do que as taxas de substituição por transversão (~ 92% do total de mudanças). Kikuno & Miyata (1986) estimaram as taxas de substituições sinônimas para *Drosophila* e sugeriram que o modelo de substituição de nucleotídeos no DNAm dos mamíferos é excepcional e, que em espécies invertebradas ele evolui na mesma proporção que os genes nucleares. Tendo em vista todos estes fatores, o DNAm tem sido extensivamente utilizado em estudos de genética de populações (Besansky et al., 1992; Conn et al., 1993; Fonseca et al., 2000).

Padrões de variação na frequência de determinados haplótipos podem ser utilizados para estimar a estruturação genética de populações de mosquitos (Walton et al., 2000).

Análises genéticas do *Ae. aegypti* tem sido conduzidas, em particular, com os locus ND4 (NADH desidrogenase subunidade 4) e ND5 (NADH desidrogenase subunidade 5), apresentando-se altamente polimórficos (Gorochotegui-Escalante et al., 2000, 2002). Gorochotegui-Escalante et al. (2002) analisaram 38 populações de *Ae. aegypti* coletadas ao longo da costa do México utilizando-se do mesmo marcador mitocondrial do gene ND4, utilizando-se a técnica de SSCP "Single-Strand Conformation Polymorphism". Foram identificados 25 haplótipos com isolamento genético significativo. Diferente do estudo realizado em 2000, as análises filogenéticas indicaram origem monofilética entre estes haplótipos detectados.

Diversas pesquisas têm sido realizadas em populações de diferentes partes do mundo utilizando esta classe de marcadores, todavia, os resultados têm permitido inferir principalmente sobre a presença de linhagens mitocondriais e filogeografia destas populações (Gorochotegui-Escalante et al., 2002; Bosio et al., 2005). Estudos realizados com populações de *Ae. aegypti* no Brasil têm revelado que existem duas linhagens mitocondriais que evoluem de forma independente e com origem histórica distinta (Bracco et al., 2007; Paduan & Ribolla, 2008).

Paduan & Ribolla (2008) realizaram estudo com 12 populações coletadas em diferentes Estados, utilizando o sequenciamento de fragmentos dos genes COI (citocromo oxidase 1) e ND4. Os resultados indicaram a presença de duas linhagens mitocondriais independentes com origem polifilética, além de relação dos haplótipos

com a localização geográfica das amostras em determinadas localidades. Apesar disso, os mosquitos coletados na cidade de Santos apresentaram 7 haplótipos diferentes de todas as outras localidades, o que poderia indicar a introdução de novas linhagens em nosso país (Paduan & Ribolla, 2008).

Assim, com relação aos processos de resistência a inseticidas, reinvasão e caracterização de populações, os marcadores moleculares utilizados em pesquisas recentes não permitiram inferir sobre a discriminação genética em populações locais do mosquito *Ae. aegypti*. Na tentativa de se obter resultados que possibilitem estudar os processos comportamentais, evolucionários e históricos das populações, a inclusão de dados genealógicos de *loci* nucleares como, por exemplo, os marcadores multi-*locus* codominante SNPs (Polimorfismos de Único Nucleotídeo) tem se tornado claramente necessária (Zhang & Hewitt, 2003).

SNP é uma variação na sequência do DNA que ocorre quando um único nucleotídeo – A, T, C, ou G – no genoma difere entre membros de uma espécie, ou entre pares de cromossomos de um indivíduo. Por exemplo, duas sequências de um fragmento de DNA de diferentes indivíduos, GGGG**C**CG e GGGG**T**CG; contém uma diferença em um único nucleotídeo. Neste caso diz-se que existem dois alelos: C ou T. Esses marcadores são denominados bialélicos devido ao fato de que, geralmente, apenas dois alelos são observados (Brookes, 1999).

Os SNPs apresentam ainda outras características importantes como serem codominantes e de fácil detecção quando comparados, por exemplo, aos microssatélites (Taillon-Miller et al., 1998). São gerados por substituições de uma única base ou pequenos eventos de deleção/inserção, ocorrendo a uma taxa muito baixa, de aproximadamente 10^{-7} alterações por sítio por geração, ou menos. SNPs podem estar presentes dentro de sequências codificantes, regiões de genes não-codificantes, ou em regiões intergênicas. Como apenas uma pequena porcentagem dos genomas codifica proteínas, a maior parte deles localiza-se fora do DNA codificador. SNPs localizados dentro desta região têm particular importância porque é mais provável que as variações tenham um significado funcional, em nível do fenótipo. Entretanto, SNPs de sequências codificantes não necessariamente acarretarão em

mudanças na sequência de aminoácidos de uma proteína que é produzida, devido à degeneração do código genético (Hammer, 1995).

Polimorfismos de único nucleotídeo são abundantes e representam a maior fonte de variabilidade genética entre organismos individuais. Estudos recentes com o mosquito *Ae. aegypti* demonstraram que a densidade média de SNPs em linhagens de laboratório é de 12 SNPs/kb (Morlais & Severson, 2003) e em populações naturais varia de 30 a 124 SNPs/kb (Urdaneta-Marques et al., 2008).

Recentemente, a tecnologia disponível e a emergência de ferramentas de genotipagem de alta resolução, têm acelerado o desenvolvimento de um grande número de programas de pesquisa, gerados a partir de projetos genoma, incluindo ferramentas de genotipagem *high-throughput* para identificar polimorfismos de único nucleotídeo (Syvanen, 2001). Uma ampla variedade de metodologias podem ser aplicadas para a genotipagem por SNPs, tais como: *SnaPshot*[™] (Applied Biosystems), análise de curva de “*melting*” e *TaqMan*[®] (Applied Biosystems). Isto os tem tornado marcadores genéticos para o mapeamento de alta-resolução, genética de populações e estudos de associação alélica (Berger et al. 2001; Black et al. 2001; Botstein & Risch 2003).

A descoberta de SNPs que afetam a atividade biológica tem se tornado cada vez mais importante e vem sendo facilitada pela disponibilidade de um vasto mapeamento. Além disso, os estudos que empregam a detecção dos SNPs são utilizados para mapear e identificar genes específicos associados aos mosquitos de importância médica como *Ae. aegypti* (Morlais & Severson, 2003), *Anopheles gambiae* (Morlais et al., 2004) e *An. funestus* (Wondji et al., 2007).

Investigações de variação em sequências entre linhagens de *Ae. aegypti* exibindo fenótipos divergentes com relação a resistência por inseticidas, auxiliariam a diferenciar os processos de resistência e reinvasão de populações naturais do mosquito em pequenas distâncias geográficas. Informações desta natureza se tornam cada vez mais cruciais para se identificar ferramentas capazes de direcionar o controle genético da dengue. Amplas análises de genomas utilizando-se marcadores nucleares SNPs poderiam facilitar a descoberta de fatores genéticos associados com características complexas desenvolvidas por mecanismos de resistência. Estudando as

variações genéticas em populações naturais do mosquito poderíamos correlacionar as características genéticas com a capacidade vetorial, o que auxiliaria na obtenção de dados para o desenvolvimento de estratégias para se reduzir a transmissão da dengue.

1.10. Metodologia Taqman®

O ensaio TaqMan® é considerado uma ferramenta bastante útil para a detecção de polimorfismo SNP. Baseia-se na atividade exonuclease 5' → 3' da Taq DNA polimerase (enzima termoestável utilizada na amplificação de fragmentos de DNA através da técnica de PCR). Nesta técnica ocorre a clivagem da ligação da sonda alvo-específica que hibridiza com a cadeia complementar, criando um sinal de fluorescência. Na forma livre, a transferência de energia fluorescente ocorre de forma que a emissão pelo *reporter* (molécula formada por um fluoróforo de alta taxa de emissão fluorescente presente na região 5' da sonda) é absorvida pelo *quencher* (molécula que absorve a energia do fluoróforo em forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Quando ocorre a degradação da sonda pela atividade nuclease da enzima Taq DNA polimerase, durante a PCR, os corantes *reporter* e *quencher* são separados e a emissão de fluorescência do *reporter* não será mais absorvida pelo *quencher* resultando em um aumento de emissão de fluorescência pelo *reporter* que será detectada e quantificada (Novais et al., 2004).

A genotipagem de cada amostra é efetuada através da determinação da intensidade da fluorescência emitida. Um aumento do sinal de fluorescência de um dos fluoróforos indica que um dos alelos é homocigoto, e é identificado conforme a cor da fluorescência utilizada na marcação do respectivo alelo. O aumento das duas cores será indicativo da presença de heterocigoto.

Esta metodologia é designada de homogênea ou em “tubos fechados” (Onofri, et al., 2006), em que todos os reagentes necessários para a amplificação e genotipagem são adicionados simultaneamente. É uma metodologia com alta sensibilidade e especificidade, de fácil execução, pouco sujeita a contaminações e com produção mais rápida quando comparada a PCR padrão (Holland et al., 1991).

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

1. Desenvolver uma metodologia de genotipagem *high-throughput* para a caracterização de populações naturais do mosquito *Ae. aegypti*, utilizando marcadores nucleares.
2. Realizar a caracterização populacional de mosquitos *Ae. aegypti* coletados nos municípios de Santos/SP e São Sebastião/SP, nos anos de 2007 e 2008, utilizando um fragmento do gene mitocondrial ND4.

2.2. Objetivos específicos

1. Realizar estudo populacional do *Ae. aegypti* através de análise multi-*loci* utilizando marcadores SNPs e metodologia TaqMan®.
2. Genotipar populações de *Ae. aegypti* em escalas micro-geográficas nas cidades portuárias de Santos/SP e São Sebastião/SP utilizando marcadores nucleares e marcadores do DNA mitocondrial.
3. Realizar análise nos anos de 2007 e 2008 das populações de *Ae. aegypti* com os marcadores citados nos itens 1 e 2.
4. Estudar a partir dos dados obtidos pela genotipagem a introdução do *Ae. aegypti* no país a partir dos portos de Santos/SP e São Sebastião/SP.

3. Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Populações do estudo

As populações do mosquito *Ae. aegypti* utilizadas nesta pesquisa foram coletadas das cidades portuárias de Santos/SP e São Sebastião/SP, com o auxílio de ovitrampas, pelas regionais de cada município do órgão de Superintendência de Controle de Endemias (Sucen). Embora tenham sido colonizadas em épocas diferentes, Santos 1995 e São Sebastião no ano de 2000 (Glasser et al., 1999; Lefèvre et al., 2007), ambas as linhagens têm apresentado perfis de resistência aos inseticidas, detectados durante ensaios bioquímicos e biológicos realizados pela Sucen/Marília (Macoris, 1999; Macoris et al., 2007). Para o estudo de caracterização genética foram analisados mosquitos provenientes das coletas realizadas nos anos de 2007 e 2008. Pela proximidade geográfica, aproximadamente 166 km (Figura 10), e pela semelhança de resposta biológica, há suspeita de que a população de São Sebastião tenha sido colonizada a partir da população de Santos. Alguns estudos (Marques dos Santos et al., 2003; Paduan et al. 2006; Paduan & Ribolla, 2008) relatam que a população de Santos apresenta um padrão genético diverso das demais populações do Estado de São Paulo. Assim, esta análise visa caracterizar se esta população, cuja origem pode ser distinta das demais populações do Estado, tem as mesmas características que a população de São Sebastião. Este dado se mostra fundamental para questões de manejo da resistência, uma vez que caracterizadas semelhanças ou diferenças entre as populações, as medidas de controle e manejo poderão ser otimizadas.

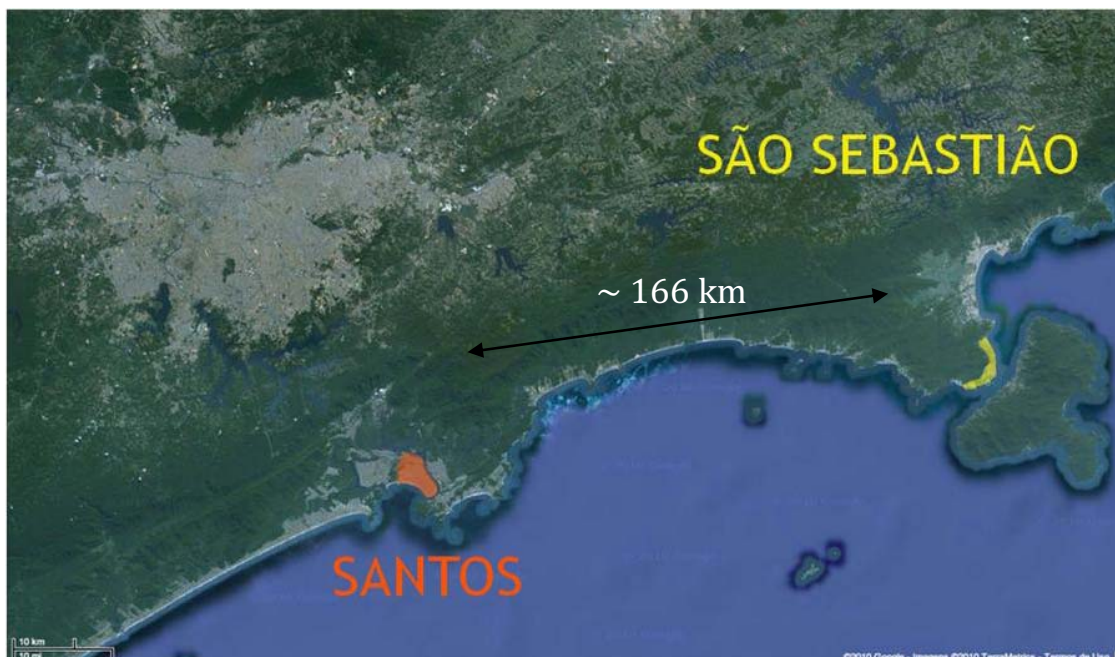


Figura 10. Mapa da localização e distância entre os municípios de Santos/SP (cor laranja) e São Sebastião/SP (cor amarela). Fonte: Google Earth, 2010.

3.2. Amostragem de *Ae. aegypti* através de ovitrampas

Baseia-se na proposta do Programa Nacional de Monitoramento da susceptibilidade de *Ae. aegypti* (Funasa, 1999). A armadilha utilizada, denominada ovitrampa, foi a proposta por Fay & Eliason (1966). Como substrato para oviposição utilizou-se uma palheta de eucatex com tamanho de 2,5 x 12,5 cm acondicionada dentro de um frasco preto de aproximadamente 500 mL. A distribuição das ovitrampas foi realizada cobrindo toda a extensão geográfica dos municípios selecionados. Para tanto, foi realizada uma estimativa do número mínimo de pontos para instalação segundo o número de imóveis dos municípios (Tabela 3). O mapa do município foi dividido em quadrantes, e em cada quadrante foi instalada uma armadilha. A amostragem foi realizada com a instalação destas armadilhas por um período de 4 semanas. A cada semana as palhetas contendo ovos foram retiradas e acondicionadas. Ao final do período todas as palhetas positivas foram encaminhadas para o laboratório Sucen/Marília.

Tabela 3. Número de ovitrampas instaladas, segundo o número de imóveis do município.

NÚMERO DE IMÓVEIS	OVITRAMPAS INSTALADAS
01 a 20.000	50 Ovitrapas
20.001 a 60.000	100 Ovitrapas
60.001 a 120.000	150 Ovitrapas
120.001 a 500.000	200 Ovitrapas
>500.000	300 Ovitrapas

3.3. Formação da colônia

Após o recebimento das palhetas, foi realizada uma análise do número de ovos por ponto de amostragem e, a seguir, a escolha das palhetas para formação da colônia com seleção de, no mínimo, uma palheta por ponto de amostragem. No insetário da Sucen/Marília os ovos de cada linhagem foram mantidos até o estágio adulto em condições controladas (temperatura de 27° C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12h). Ao atingir o estágio de pupa, estas foram transferidas para um copo e acondicionadas em uma gaiola de triagem, que consiste na identificação individual dos insetos adultos emergidos. Cerca de 2.000 exemplares, fêmeas e machos de *Ae. aegypti*, foram transferidos para a gaiola de formação da colônia. Cada colônia foi mantida com alimentação energética constante (água com mel, disposta em flaconetes de algodão) e repasto sanguíneo (camundongo imobilizado) a cada três dias. Em cada gaiola fica disponível um sítio para postura dos ovos que consiste de um copo de cor âmbar, com água, acondicionado no interior de um pote plástico negro e revestido de papel de filtro para fixação dos ovos. Os ovos postos (P₁) foram contados até a obtenção de 40.000 ovos P₁ para realização dos ensaios de avaliação da susceptibilidade e provas bioquímicas. Após a emergência, uma parte dos mosquitos adultos foi submetida aos testes bioquímicos e biológicos para identificação de resistência aos inseticidas, e uma parte foi separada e mantida em etanol P.A. 100% até o uso. Foram utilizados para pesquisa de caracterização genética 200 mosquitos de cada uma das populações (Santos e São Sebastião) coletadas.

3.4. Estudo genético populacional por SNPs

3.4.1. Preparação e quantificação do DNA

O DNA genômico foi extraído de mosquitos inteiros, triturados com auxílio de um pistilo, em tampão de extração utilizando-se resina Chelex100® *Molecular Biology Grade Resin* (Bio-Rad Laboratories), preparada a 5% conforme as recomendações do fabricante. Depois de homogeneizados com pistilo os mosquitos foram agitados em vortex por 15s, submetidos à centrifugação (13.000 *xg*) por 20s e colocados por 30min em banho seco a 80°C. Em seguida vortex por 15s e centrifugação (13.000 *xg*) por 20s, o sobrenadante foi retirado, colocado em novo tubo e armazenado a -20°C. A concentração do DNA foi estimada submetendo-se 2 µL do DNA de cada amostra ao espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000). Após quantificação uma parte de cada amostra foi diluída a 10 ng/µL e acondicionadas em placas de 96 poços.

3.4.2. Marcadores SNPs

Para a caracterização das populações foram utilizados nove marcadores SNPs referentes aos genes *Ef-2* (*Elongation factor*), *AeIMUC1* (*Mucin-like protein*), *Na/K* (*Sodium/potassium channel*), *PGK* (*Phosphoglycerate kinase*), *apolLp-II* (*Apolipoprotein II*), *FerH* (*Ferritin heavy chain*), *CYP9J2* (*Cytocrome P450*), *TSF* (*Transferrin*) e *Chym* (*Chymotrypsin*), que foram previamente selecionados para o estudo populacional do *Ae. aegypti* no Brasil (Paduan & Ribolla, 2009). Tais genes foram escolhidos por três razões: 1) por estarem espalhados no genoma do *Ae. aegypti*, na tentativa de se evitar a ligação genética; 2) por se mostrarem envolvidos em processos importantes como: digestão, resistência a inseticidas, susceptibilidade a patógenos, resposta imune, etc; 3) para possibilitar estudos de associação. A partir destes marcadores SNPs foram construídos oligonucleotídeos e sondas TaqMan® (*Assay-by-Design 40x*) pela Applied Biosystems (Tabela 4). As sondas utilizadas são sondas TaqMan® *MGB* (*Minor Groove Binder*), as quais apresentam duas características particulares que as distinguem das outras sondas TaqMan®. O “*quencher*” na extremidade 3' destas sondas não apresenta qualquer fluorescência, o que permite uma medida mais precisa da

Tabela 4. Oligonucleotídeos e sondas utilizadas para genotipagem de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs). (Nucleotídeos marcados em vermelho indica o polimorfismo presente na sonda marcação VIC™; o nucleotídeo marcado em azul indica o polimorfismo presente na sonda marcada com FAM™)

Gene	Oligonucleotídeo F (5' - 3')	Oligonucleotídeo R (5' - 3')	Sonda VIC™ (5' - 3')	Sonda FAM™ (5' - 3')
AeIMUC1	AAGCCAGCGTTTGTGATTGG	GGCACAGAACTTCCACCACTA	CATCCGGCCA C CTC	CATCCGGCCA A CTC
apolLp-II	CCGGTGCCTCCGTTGAA	TTTGGGTCAGATACCTCCTTGTT	TTTGGCCAATCT A TACAAG	TTTGGCCAATCT C TACAAG
Ef2	TGTGCGTACAGACCGAAACC	ACAGACCGGCTTGATACG	TTCCGG A ATGGCCT	TCGGC G ATGGCCT
Na/K	GCTACCGGAGTCGCCAAAA	GGGCAGAGGGAAGAAATGATAGTTT	CCCTCCAAC A TTAACA	CCCTCCAAC T TTAACA
PGK	TGATCATTTGGAGGTGGAATGGC	GTCGAACAATGATCCTCCAATTCC	AATACCTTAAGGA A CGTAAAT	CCTTAAGGA C CGTAAAT
Chym	CGAACAGCGTCGTTTGGTT	GGCAATGTATCGGGACTGA	CGGAAATTCATC A TCCAC	CGGAAATTCATC G TCCAC
CYP9J2	GGTGTTTGGCTGGAACCTGAAG	GCCAGTAGATAAACCCATTCCATCA	CTAGACCGAA A GGCTTA	CTAGACCGAA E GGCTTA
TSF	GGAAGTTACGCAGAGTTTGATCTTG	GCCCAGTACAAGGACGTGATC	AACGGACC C TCGGGCT	CGGACC G TCGGGCT
FerH	CCGTCGACAAGCACTTCAAG	AGGAGGATTTCTTCACCGATGTG	ACCGACTTAC A TAGTTC	ACCGACTTAC G TAGTTC

contribuição do fluoróforo da extremidade 5'. Estas sondas *MGB* possuem também na mesma extremidade 3' uma molécula própria, que permite uma ligação mais forte da sonda à cadeia complementar, aumentando, deste modo, a respectiva temperatura de "melting" (T_m).

Para a realização da genotipagem em larga escala dos mosquitos individuais de cada uma das populações previamente selecionadas foram utilizados aproximadamente 400 indivíduos de cada uma das populações descritas anteriormente.

3.4.3. Genotipagem por SNPs (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 de PCR foram preparadas utilizando-se o robô - *CAS-1200 Liquid Handling Robot (Corbett Life Science)*, utilizando o conjunto de reagentes Maxima™ Probe qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences) contendo: Maxima™ Hot Start Taq DNA polimerase, Maxima® Probe qPCR Buffer, desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), fluoróforo de referência passiva (ROX) e dUTP, de acordo com instruções do fabricante. O protocolo de reação utilizou 5 µL de Maxima™ Probe qPCR 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), aproximadamente 30 ng/µL de DNA genômico e H₂O q.s.p., sendo 10 µL o volume final.

As condições iniciais de amplificação foram 10 min a 95°C (ativação Taq DNA polimerase) seguidos de 40 ciclos a 92°C por 15 s (desnaturação), 60°C por 1 min (anelamento/extensão).

Antes e após a realização deste protocolo de amplificação, no StepOnePlus™, é necessária a leitura dos níveis de fluorescência nos tubos utilizados para a reação, através de um ciclo de 1 min a 60°C.

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.

3.5. Análises da estrutura genética populacional - SNP

3.5.1. Obtenção dos dados

Após a corrida eletroforética, os SNPs foram identificados automaticamente com auxílio do *software* da plataforma StepOnePlus™ v. 2.1 (Applied Biosystems). Planilhas com dados genotípicos diplóides foram montadas no formato Excel, sendo convertidas 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).

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

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

em que:

- ✚ F(p): frequência do alelo p;
- ✚ p: número de indivíduos homocigotos do alelo p;
- ✚ pq: número de indivíduos heterocigotos;
- ✚ 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, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas frequências gênicas (Nei, 1978). O conhecimento da frequência de heterocigotos apresenta importância na medida em que cada heterocigoto carrega

diferentes alelos, os quais demonstram a existência de variação genética na população (Weir, 1996).

3.5.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A diversidade gênica é a medida que indica a heterozigosidade esperada para um dado *locus* sob equilíbrio de Hardy-Weinberg e, consiste na proporção esperada de indivíduos heterozigotos para as frequências alélicas observadas. A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foi realizada pela comparação da frequência observada dos genótipos com a frequência esperada em equilíbrio, calculada utilizando o software Arlequin v. 3.1, que aplica o método de Guo & Thompson (1992). O F_{IS} (coeficiente de endogamia) foi 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:

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

em que,

- ✚ 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 afirma 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.

3.5.4. Análise da estrutura genética populacional

As análises da estrutura populacional foram calculadas empregando a análise de variância molecular (AMOVA), conforme descrito por Excoffier e colaboradores (1992) utilizando o software Arlequin v. 3.1, que permite verificar o grau de significância genética inter e intrapopulacional. Este método estatístico se baseia na geração de estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos, ou seja, de como a diversidade genética encontra-se distribuída dentro das

populações e entre as populações, além de valores de estatística F , que indicam o grau de subdivisão geográfica.

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.

3.5.5. Estruturação populacional

O *software* Structure v. 2.3.1 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado na análise de estruturação de populações com base em dados de genotipagem *multilocus*. 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* (κ), assumindo que misturas (híbridos) podem existir (ex. não se assume o isolamento genético). A seguir, obtém-se o valor mais provável de κ pela análise das probabilidades e distribuição dos genótipos. Os resultados são 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).

3.6. Estudo genética populacional por análise mitocondrial

3.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Parte do gene que codifica a subunidade quatro da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH4) mitocondrial foi amplificada utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR). A região do DNA mitocondrial que corresponde ao gene NADH4 tem 1343 pares de bases, entre as posições 8027 – 9370 do genoma mitocondrial de *Ae. aegypti*.

As reações de amplificação foram realizadas a partir do DNA extraído de 96 mosquitos referentes à coleta de 2007, de cada uma das populações do estudo. As reações foram realizadas com volume final de 30 μL , contendo aproximadamente 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ do DNA molde, Tampão PCR 10X *Taq* Platinum® (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL) fornecido pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies), MgCl_2 1,5mM, 2,5 mM de dNTPs (GE Healthcare), 1 U de Platinum® *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e 0,6 μL na concentração de 10 pmol de cada oligonucleotídeo específico do gene NADH4 denominadas ND4F (5'-TGATTGCCTAAGGCTCATGT-3') e ND4R (5'-TTCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT-3') (Invitrogen Life Technologies) baseados em Gorrochoteghi-Escalante e colaboradores (2000). As reações foram realizadas em termociclador *Eppendorf MasterCycler Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os ciclos de amplificação foram programados para: 3 ciclos de 94°C por 2 min, 37°C por 2 min, 72°C por 1 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, 72°C por 1 min, com um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min. Dez microlitros do produto de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™ 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Biotium). Os fragmentos amplificados foram comparados com o DNA *Ladder* de 1kb (Fermentas), utilizado como padrão e a visualização das bandas foram feitas em transluminador UVDI (Major Science). O restante dos produtos da PCR foi utilizado para purificação e posterior sequenciamento.

3.6.2. Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos de PCR de mosquitos individuais foram purificados através de colunas com membrana vertical *Amicon® Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters* (Millipore), conforme instruções do fabricante. As colunas foram encaixadas a microtubos de 1,5 mL e então se adicionou todo volume da PCR em colunas individuais completando com TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) para um volume final de 500 μL , os tubos foram centrifugados a 14.000 xg por 15 minutos. O filtrado presente no microtubo foi descartado. Em seguida, a coluna foi anexada invertida a um novo tubo, passando por nova centrifugação a 1.000 xg por 2 minutos, o produto final foi o DNA purificado (aproximadamente 30 μL), pronto para uso.

3.6.3. Quantificação dos produtos de PCR purificados

Os produtos de PCR purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com GelRed™ (Biotium). Os fragmentos purificados foram comparados com o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen Life Technologies) utilizado como padrão de massa. A visualização das bandas e a verificação de possíveis resíduos de *primers* foram feitas em um transluminador UVDI (Major Science). O restante dos produtos foi utilizado para o sequenciamento.

3.6.4. Reação de sequenciamento

As sequências de DNA foram determinadas em sequenciador capilar 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) utilizando-se 1,9 µL de 5 x *Save Money* (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 0,5 µL BigDye™ *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,5 pmol do oligonucleotídeo *forward*, 4 ng/µL do produto de PCR purificado e H₂O q.s.p para completar o volume final de 10 µL. As reações foram realizadas em termociclador *Eppendorf MasterCycler Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min, com rampa de 1°C/s, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foi realizada uma única reação com o oligonucleotídeo *forward*.

3.6.5. Precipitação das reações de sequenciamento

Às reações de sequenciamento foram adicionados 1 µL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3M, 25 µL de etanol 100% e incubadas a temperatura ambiente (T.A.) por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 3.000 *xg* por 30 min a 4°C. O etanol foi removido invertendo os tubos e, a seguir, adicionou-se 35 µL de etanol 70% e centrifugou-se a velocidade de 1.659 *xg* por 15 min a 4°C. Todo o etanol foi removido com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. As amostras foram secas em T.A. e o produto ressuspense em 10 µL de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems). Após serem ressuspensas, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5

min, rapidamente transferidas para o gelo e então colocadas no sequenciador capilar 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) para dar início ao sequenciamento.

3.6.6. Análise de polimorfismo molecular e filogenia

As sequências *forward* do gene ND4 foram alinhados utilizando o *software* CLUSTALX v. 1.8 (Thompson et al., 1997).

Análises filogenéticas e moleculares foram conduzidas utilizando-se o programa MEGA “Molecular Evolutionary Genetics” v. 4.0.2 (Kumar et al., 2001). Métodos de distância (Neighbor Joining – NJ) e parcimônia foram utilizados na construção das árvores filogenéticas (Saitou e Nei, 1987). Para a análise filogenética de NJ foi utilizada a distância gamma (Kimura 2 – parâmetros) com o parâmetro gamma ($a=1$). Na análise de parcimônia foi realizada uma busca heurística para encontrar todas as árvores mais parcimoniosas. O teste de bootstrap com 1000 réplicas foi aplicado para estimar o índice de consistência da árvore de NJ (Felsenstein, 1985).

As sequências de nucleotídeos e as frequências de cada haplótipo, foram estimadas utilizando-se o *software* DnaSP v. 5 (Librado e Rozas, 2009). Foi estimado o número de sítios polimórficos, o número médio de diferenças nucleotídicas (κ), a diversidade de nucleotídeos (π_1), a diversidade de nucleotídeos com *jukes* e correção cantor (π_2), os sítios sinônimos e não sinônimas e diversidade haplotípica (Hd).

Os testes D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu & Li, 1993) foram usados para testar a hipótese de que todas as mutações são seletivamente neutras (Kimura, 1983), ambos são baseados no modelo infinito de ilhas sem recombinação. O teste D de Tajima utiliza a variação genética dentro das populações no nível de DNA. Esta variação é calculada a partir da relação entre o número de sítios segregantes e o número médio de diferenças nucleotídicas estimado pela comparação par-a-par. O teste F_s de Fu também utiliza polimorfismo de DNA, porém este teste leva em consideração o fator temporal das mutações que geram sítios polimórficos, classificando-as como antigas ou recentes. Para calcular os testes de neutralidade foram utilizadas ferramentas disponíveis no *software* DnaSP v.5 (Librado e Rozas, 2009).

A variação das frequências haplotípicas dentro e entre as populações foi examinada através da análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992). O *software* Arlequin v.3.1 foi usado para calcular a significância dos componentes de variância associada a cada nível de estrutura genética através de um teste não paramétrico de permutação e estimar valores de F_{ST} pairwise e $F_{ST}/(1-F_{ST})$ entre as populações (Excoffier et al. 1992).

A genealogia entre os haplótipos foi inferida por meio da construção de uma rede de haplótipos elaborada com o auxílio do *software* TCS versão 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Este programa estima a relação entre haplótipos com base no método de parcimônia, agrupando-os a partir das mutações obtidas em suas sequências. Tal genealogia é baseada no cálculo da frequência destes haplótipos nas populações amostradas, usando um algoritmo descrito por Templeton et al. (1992). Portanto, a rede de haplótipos gerada é uma reconstrução da história genealógica das sequências do gene ND4 de *Ae. aegypti*, que foram obtidos em duas localidades geográficas e em momentos distintos (2007 e 2008).

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Caracterização de SNPs por metodologia TaqMan®

As reações testadas para a padronização das sondas TaqMan® foram realizadas com volumes de 5, 10 e 25µL e com concentração de DNA variando de 10 a 30ng/µL. Todas as sondas foram testadas utilizando controles positivos (amostras sequenciadas com genótipo conhecido - homozigoto VIC™, homozigoto FAM™ e heterozigoto VIC™/FAM™) e negativo (sem DNA), de acordo com o protocolo do fabricante. Uma vez amplificados, os produtos foram então analisados através do sistema StepOnePlus™ v. 2.1 (Applied Biosystems). As reações com concentração de DNA entre 10 e 20ng/µL, independente do volume final da reação, não foram eficientes para todos os genes do estudo (Figura 11), enquanto as reações com concentração de DNA de 30ng/µL e volume final de 10µL se mostraram as mais eficientes para todos os genes (Figura 12).

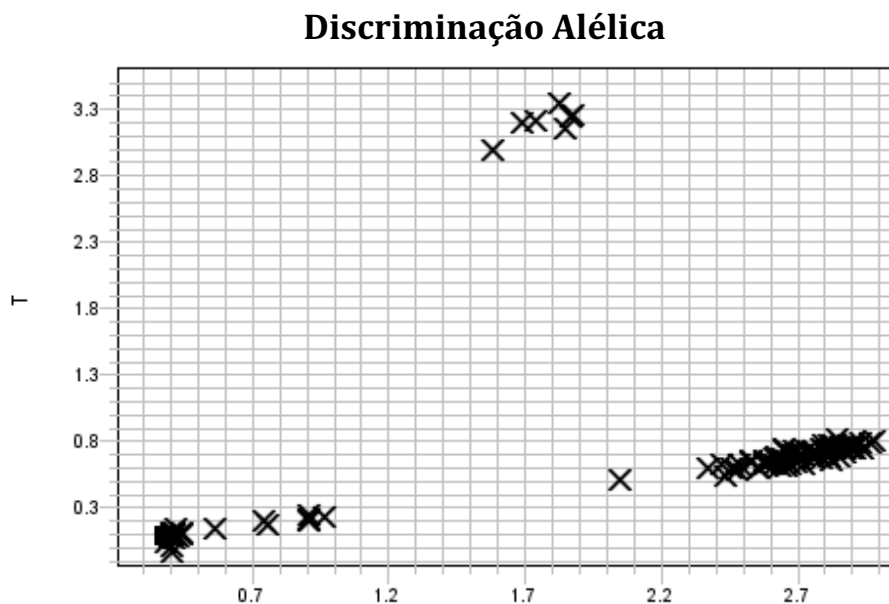


Figura 11. Representação da discriminação alélica de um ensaio TaqMan® com concentração de DNA inferior a 30ng/µL, onde não se obteve eficiência (o símbolo X representa amostras indeterminadas) para o polimorfismo do gene Na/K.

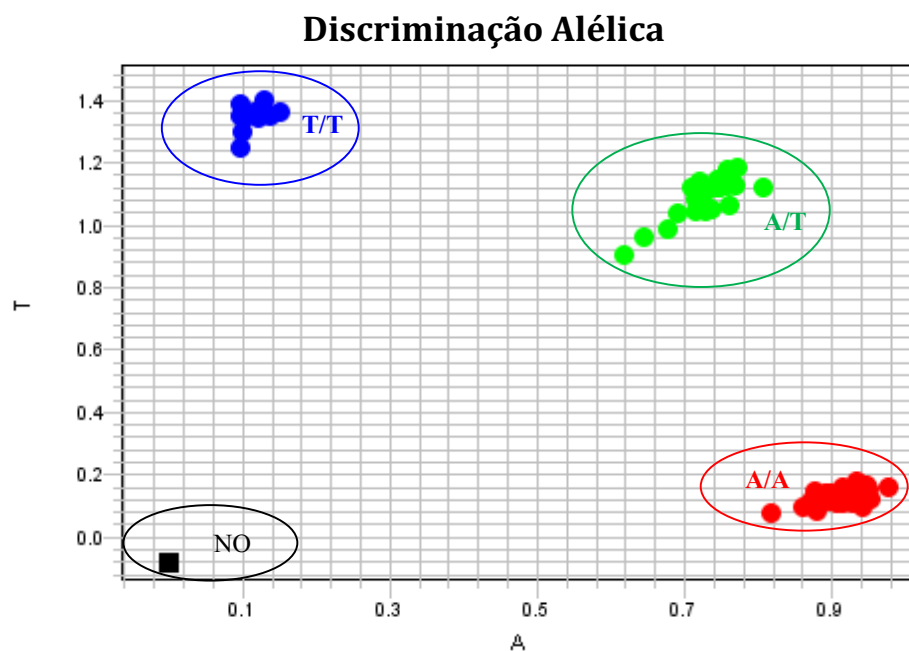


Figura 12. Representação da discriminação alélica de ensaio TaqMan® para o polimorfismo do gene Na/K com concentração de DNA de 30ng/ μ L. (Cor azul ●, alelos T/T; Cor vermelha ●, alelos A/A; Cor verde ●, ambos os alelos A/T; Cor preta ■, controle negativo).

Após a realização das leituras finais de cada ensaio os resultados são gerados automaticamente em forma de uma tabela (Tabela 5). Tais resultados foram utilizados na construção de planilhas em formato *Excel* (Tabela 6 e 7), e então analisadas em *softwares* específicos.

Tabela 5. Dados obtidos após a genotipagem das populações do mosquito *Ae. aegypti* para o gene Na/K, gerada automaticamente pelo software StepOne v. 2.1 (Applied Biosystems). A tabela apresenta todos os dados gerados no ensaio, como: amostra e posição, qualidade (%), discriminação dos alelos, entre outros.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Block Type	96well												
2	Chemistry	TAQMAN												
3	Experiment File Name	C:\Users\note1\Desktop\StepOne\NAK 8.eds												
4	Experiment Run End Time	2010-04-23 05:06:51 AM BRT												
5	Instrument Type	steponeplus												
6	Passive Reference	ROX												
7														
8	Well	Sample Name	SNP Assa Task	Allele1 ΔR	Allele2 ΔR	Pass. Ref.	Quality(%)	Call	Method	Allele1 Automat	Allele1 Ct	Allele1 Automati	Allele1 Ba:	
9	A1	Sample 1	UNKNOWN	2,729156	0,81684	6418,632	99,42074	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
10	A2	Sample 2	UNKNOWN	2,905243	0,893375	6881,068	99,99361	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
11	A3	Sample 3	UNKNOWN	2,863201	0,82077	5956,066	99,96469	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
12	A4	Sample 4	UNKNOWN	2,943148	0,841282	5759,345	99,95602	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
13	A5	Sample 5	UNKNOWN	2,900496	0,873618	7675,158	99,99925	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
14	A6	Sample 6	UNKNOWN	2,757778	0,796719	7082,286	99,57948	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
15	A7	Sample 7	UNKNOWN	2,886381	0,804164	5625,929	99,97614	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
16	A8	Sample 8	UNKNOWN	2,817561	0,795818	6398,109	99,84167	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
17	A9	Sample 9	UNKNOWN	0,358218	0,135177	6765,813	0,012862	Undetermined	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
18	A10	Sample 10	UNKNOWN	2,974348	0,901642	6698,415	99,87075	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
19	A11	Sample 11	UNKNOWN	2,733834	0,783107	6739,819	99,42072	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
20	A12	Sample 12	UNKNOWN	2,984889	0,890102	6649,814	99,84105	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
21	B1	Sample 13	UNKNOWN	2,870332	0,976941	7379,144	99,91573	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
22	B2	Sample 14	UNKNOWN	0,344759	4,464302	8192,342	99,73172	Homozygous T/T	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
23	B3	Sample 15	UNKNOWN	2,785008	0,785027	5886,48	99,70532	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
24	B4	Sample 16	UNKNOWN	2,846326	0,842495	6909,973	99,94496	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
25	B5	Sample 17	UNKNOWN	2,873662	0,876472	7700,231	99,98854	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
26	B6	Sample 18	UNKNOWN	1,890268	3,548806	7336,319	99,98052	Heterozygous A/T	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
27	B7	Sample 19	UNKNOWN	2,811929	0,899015	6765,208	99,85183	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
28	B8	Sample 20	UNKNOWN	2,997987	0,914592	6053,471	99,77863	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
29	B9	Sample 21	UNKNOWN	2,912005	0,785901	5947,822	99,96145	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	
30	B10	Sample 22	UNKNOWN	2,990783	0,902252	6024,392	99,81413	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,021502	VERDADEIRO	3	

Tabela 6. Planilha representativa da discriminação alélica para os genes analisados, a qual apresenta o genótipo de cada indivíduo das populações do estudo. (As letras **A**, **T**, **C** e **G** representam 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	PGK A/G	PGK A/G	PGK A/G	APOL A/C	APOL A/C	FERR A/G	FERR A/G	P450 A/G	P450 A/G	TSF C/G	TSF C/G	CHYM A/G	CHYM A/G
SA1	G	G	A	A	A	T	A	A	C	C	G	G	A	A	G	G	A	A	G
SA2	G	G	A	A	T	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	G	G	A	G
SA3	G	G	G	G	T	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	G	G	G	G
SA4	A	G	A	A	A	A	A	A	?	?	A	A	A	A	A	G	G	A	A
SA5	G	G	A	A	A	A	A	G	C	C	G	G	A	A	G	G	G	A	A
SA6	G	G	A	A	T	T	A	A	?	?	G	G	A	A	G	G	G	A	G
SA7	G	G	A	A	T	T	A	G	A	A	G	G	A	A	G	G	G	G	G
SA8	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	A	G
SA9	A	G	A	A	A	A	A	A	C	C	G	G	A	A	G	G	G	A	G
SA10	G	G	G	G	T	T	A	A	C	C	G	G	A	A	G	G	G	A	G
SA11	G	G	A	A	T	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	G	G	G	G
SA12	A	A	G	G	T	T	A	A	C	C	G	G	A	A	G	G	G	G	G
SA13	A	A	A	A	T	T	A	A	C	C	A	A	A	A	G	G	G	A	A
SA14	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	A	A
SA15	A	G	A	A	A	A	A	A	?	?	A	A	A	A	G	G	G	A	G
SA16	G	G	A	A	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G
SA17	G	G	A	A	T	T	A	A	A	A	G	G	A	A	G	G	G	G	G
SA18	A	G	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	A	A	G	G	G	G	G
SA19	G	G	A	A	A	A	G	A	A	C	G	G	A	A	G	G	G	A	G
SA20	G	G	A	A	A	A	A	A	A	C	G	G	A	G	G	G	G	A	A
SA21	A	G	G	G	A	A	A	A	C	C	G	G	A	A	G	G	G	G	G
SA22	G	G	A	A	A	A	A	A	C	C	A	A	A	A	G	G	G	A	G
SA23	G	G	A	A	T	T	A	G	A	C	G	G	A	A	G	G	G	A	G

SA = Santos.

Tabela 7. Planilha de discriminação alélica onde as letras representando os SNPs foram substituídas por números (A = 1; C = 2; G = 3 e T = 4), para a utilização no software *Convert*.

Sondas	EF2	EF2	MUC	MUC	NAK	NAK	NAK	PGK	PGK	APOL	APOL	FERR	FERR	P450	P450	TSF	TSF	CHYM	CHYM
VICIFAM	A/G	A/G	G/A	G/A	A/T	A/T	A/T	A/G	A/G	A/C	A/C	A/G	A/G	A/G	A/G	C/G	C/G	A/G	A/G
SA1	3	3	3	1	1	4	1	1	1	2	2	3	3	1	1	3	3	1	3
SA2	3	3	3	1	1	4	1	1	1	1	1	3	3	1	3	3	3	1	3
SA3	3	3	3	3	1	4	1	1	1	1	1	3	3	1	3	3	3	3	3
SA4	1	3	3	1	1	1	1	1	1	?	?	1	3	1	1	3	3	1	1
SA5	3	3	1	1	1	1	1	1	3	2	2	3	3	1	3	3	3	1	1
SA6	3	3	3	1	1	4	1	1	1	?	?	3	3	1	1	3	3	1	3
SA7	3	3	3	1	1	4	1	1	3	1	1	3	3	1	3	3	3	3	3
SA8	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	3	3
SA9	1	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	1	3	3	3	1	3
SA10	3	3	3	3	1	4	1	1	1	2	2	3	3	1	1	3	3	1	3
SA11	3	3	3	1	1	4	1	1	1	1	1	3	3	1	3	3	3	3	3
SA12	1	1	3	3	1	4	1	1	1	2	2	3	3	1	3	3	3	3	3
SA13	1	1	1	1	4	4	1	1	1	2	2	1	3	1	3	3	3	3	3
SA14	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	1	1	1
SA15	1	3	3	1	1	1	1	1	1	?	?	1	3	1	1	3	3	1	3
SA16	3	3	3	1	4	4	1	1	1	1	1	1	3	1	3	3	3	3	3
SA17	3	3	3	1	1	4	1	1	1	1	1	3	3	1	3	3	3	3	3
SA18	1	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	3	3	3	3	3
SA19	3	3	1	1	1	1	1	1	3	1	2	3	3	1	3	3	3	1	3
SA20	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3	3	3	1	1
SA21	1	3	3	3	1	1	1	1	1	2	2	3	3	1	3	3	3	3	3
SA22	3	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	1	3	1	1	3	3	1	3
SA23	3	3	3	1	1	4	1	1	3	1	2	3	3	1	3	3	3	1	3

SA = Santos.

4.2. Análise de estrutura genética populacional por SNP

4.2.1. Frequências alélicas

Após o cálculo das frequências alélicas e dos histogramas, observamos que as frequências para os alelos de cada *locus* variaram entre as duas populações do estudo e entre os anos de coleta (Figura 13).

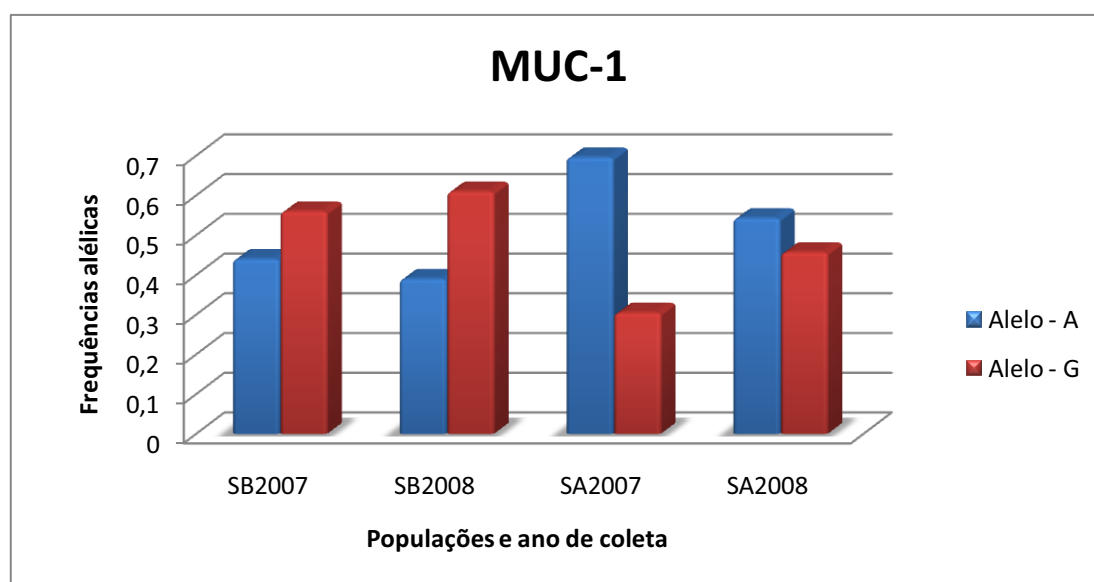
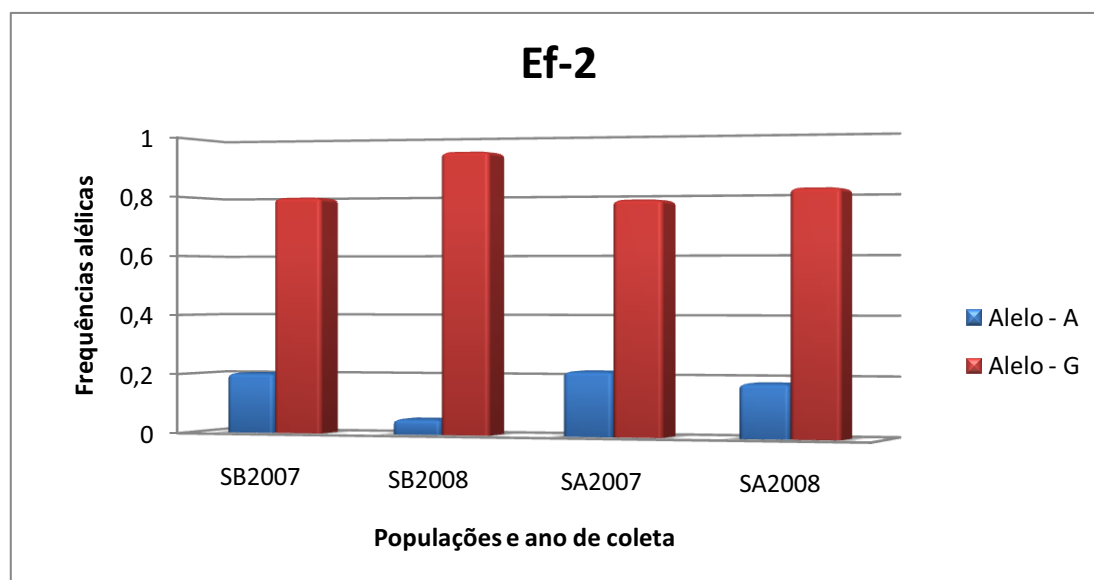


Figura 13. Histogramas das frequências alélicas dos nove SNPs estimados para 742 indivíduos das populações de São Sebastião (SB) e Santos (SA), coletadas nos anos de 2007 e 2008. (O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X as populações e respectivo ano de coleta). (Continua)

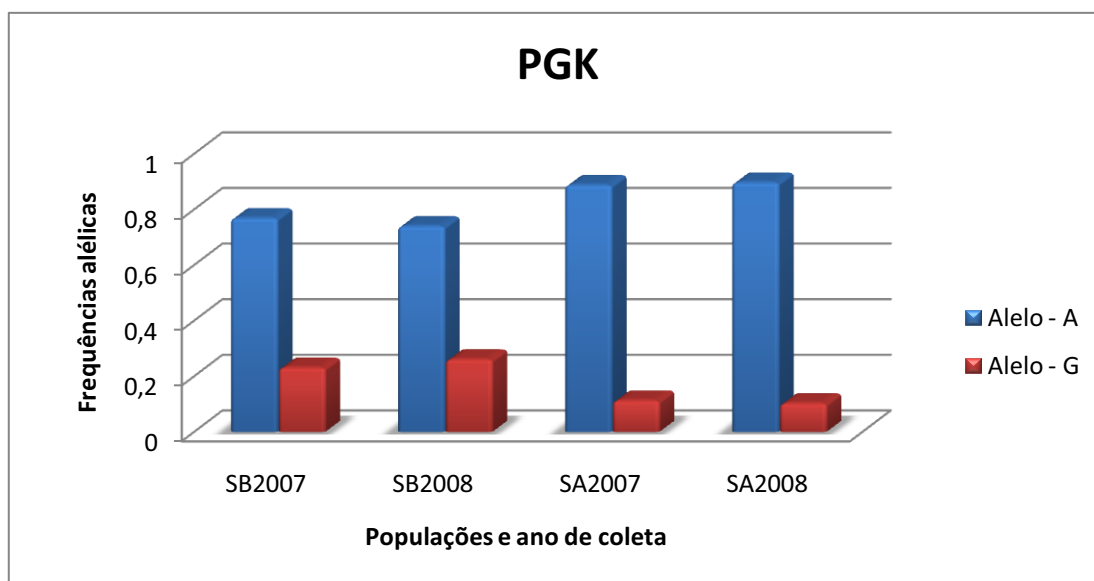
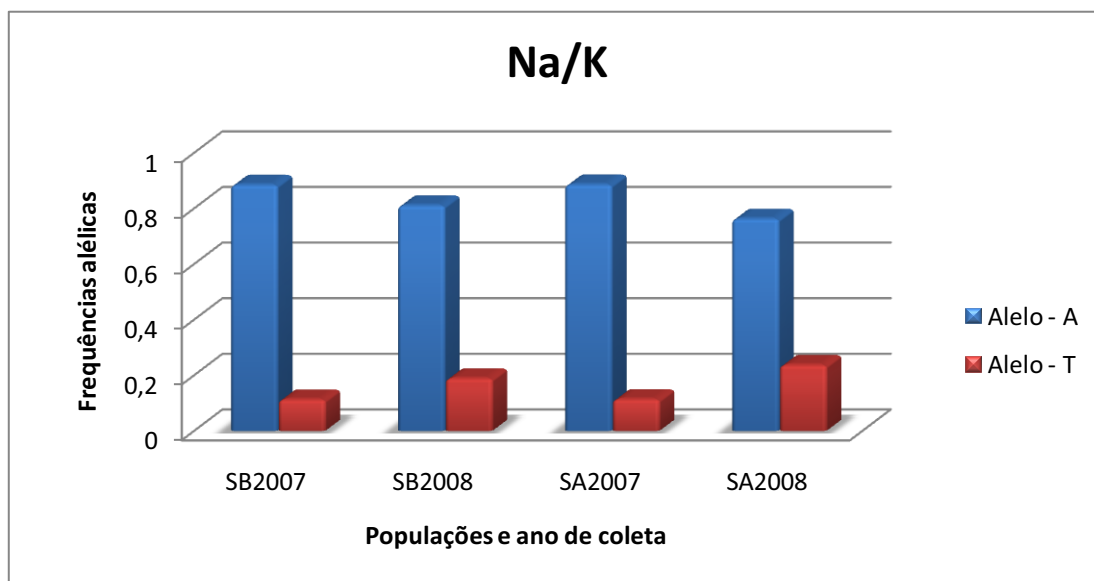


Figura 13. (continuação)

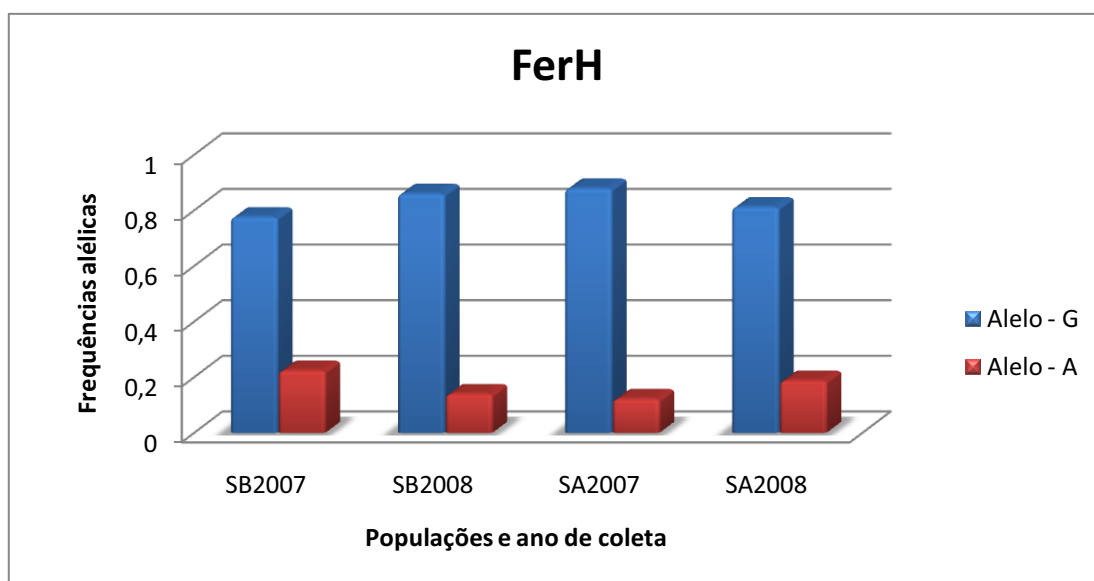
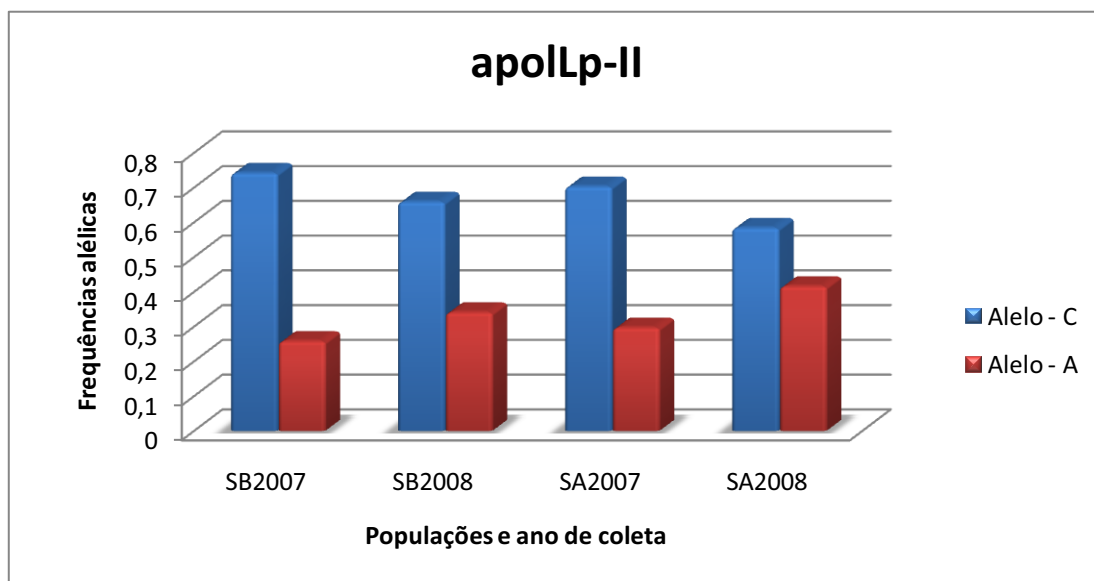


Figura 13. (continuação)

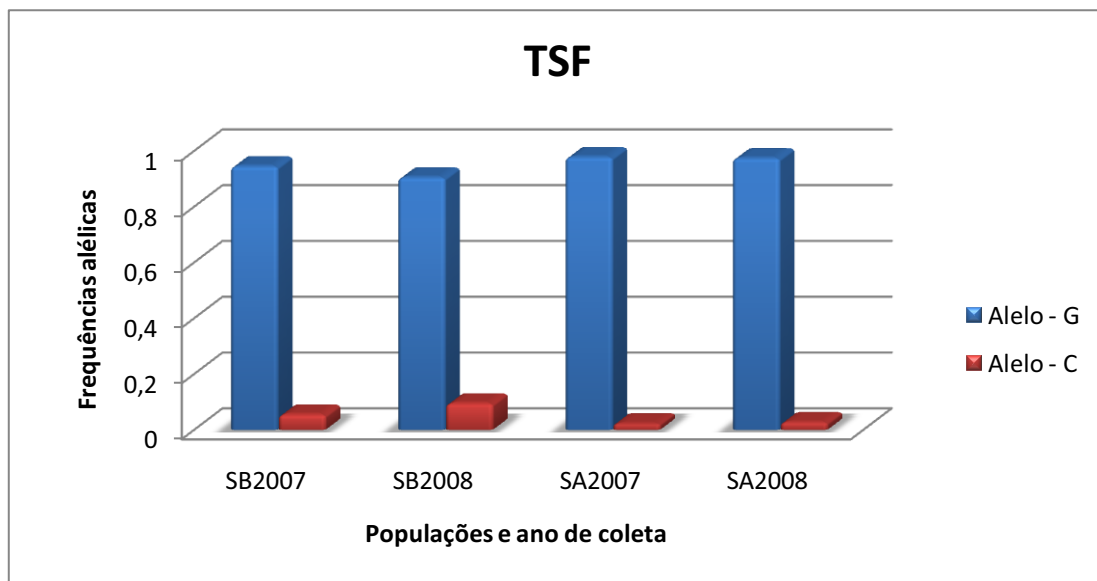
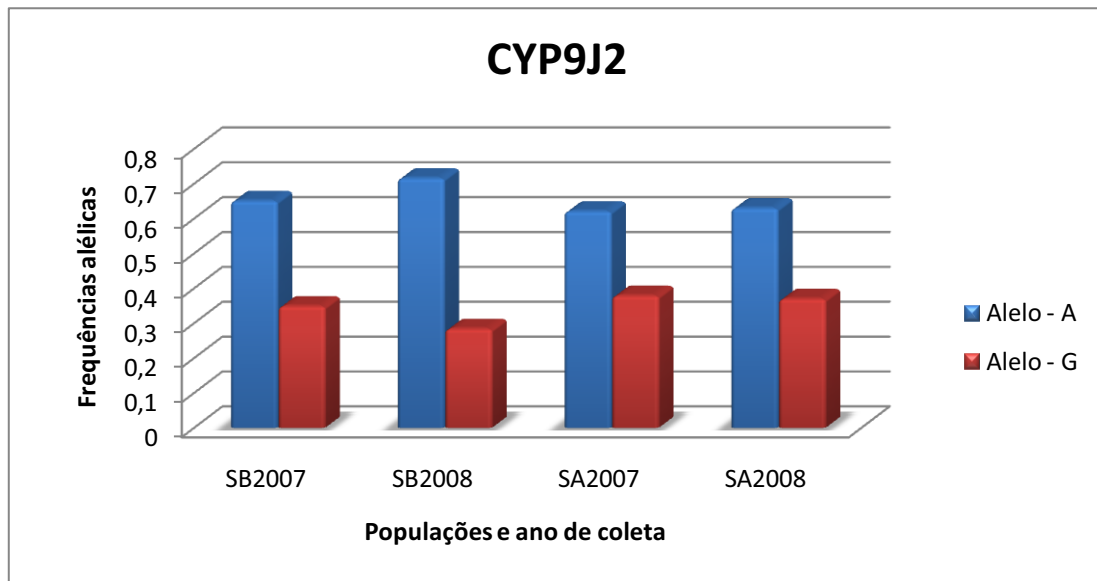


Figura 13. (continuação)

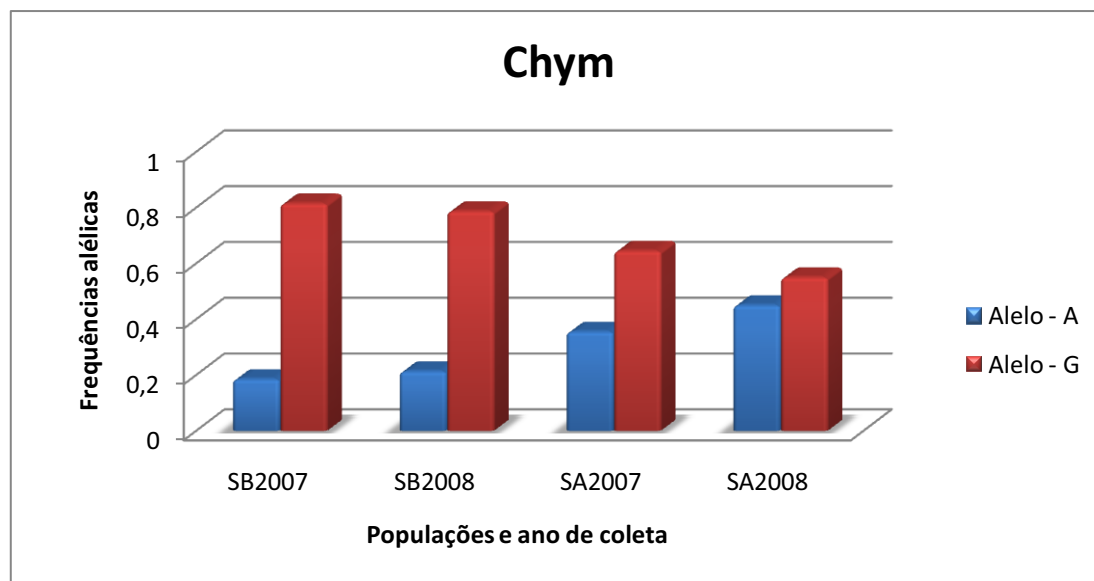


Figura 13. (continuação)

4.2.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Alguns dos 9 *loci* analisados das populações de Santos e São Sebastião apresentaram desvios entre as heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E), mas apenas os *loci* MUC-1, Na/K, FerH e Tsf da população de São Sebastião (coleta 2007)(tabela 8); MUC-1, Na/K e apolLp-II da população de São Sebastião (coleta 2008)(tabela 9); MUC-1, apolLp-II e FerH da população de Santos (coleta 2007)(tabela 10); e Ef2, Na/K, apolLp-II e CYP9J2 da população de Santos (coleta 2008)(tabela 11) foram significativos estatisticamente ($P < 0.05$), mostrando que nessas populações estes marcadores não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 8. Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de F_{IS} (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para 9 SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de São Sebastião em 2007.

São Sebastião 2007						
<i>Locus</i>	N	R	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>P</i>
Ef2	200	0.784	0.365	0.324	-0.128	0.08
MUC-1	175	0.655	0.263	0.494	+0.469	0.00
Na/K	178	0.198	0.152	0.204	+0.258	0.00
PGK	201	0.187	0.393	0.356	-0.103	0.17
apolLp-II	190	0.736	0.400	0.383	-0.042	0.70
FerH	192	0.841	0.135	0.348	+0.612	0.00
CYP9J2	195	0.365	0.430	0.455	-0.054	0.53
Tsf	201	0.952	0.076	0.104	+0.233	0.01
Chym	195	0.817	0.297	0.302	-0.015	0.81

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; H_E e H_O = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; F_{IS} = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; P = significância dos testes.

Tabela 9. Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de F_{IS} (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para 9 SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de São Sebastião em 2008.

São Sebastião 2008						
<i>Locus</i>	N	R	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>P</i>
Ef2	189	0.951	0.085	0.100	+0.158	0.08
MUC-1	182	0.683	0.286	0.477	+0.402	0.00
Na/K	172	0.358	0.122	0.307	+0.603	0.00
PGK	190	0.229	0.416	0.386	-0.077	0.35
apolLp-II	186	0.688	0.371	0.451	+0.178	0.02
FerH	190	0.852	0.268	0.241	-0.116	0.14
CYP9J2	190	0.241	0.453	0.408	-0.110	0.16
Tsf	190	0.903	0.179	0.172	-0.041	1.00
Chym	190	0.778	0.363	0.336	-0.080	0.39

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; H_E e H_O = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; F_{IS} = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; P = significância dos testes.

Tabela 10. Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de F_{IS} (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para 9 SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de Santos em 2007.

Santos 2007						
<i>Locus</i>	N	R	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>P</i>
Ef2	161	0.796	0.298	0.341	+0.127	0.11
MUC-1	156	0.376	0.327	0.425	+0.231	0.00
Na/K	158	0.159	0.177	0.203	+0.125	0.12
PGK	160	0.112	0.200	0.200	+0.002	1.00
apolLp-II	150	0.766	0.233	0.419	+0.444	0.00
FerH	156	0.902	0.128	0.215	+0.403	0.00
CYP9J2	161	0.325	0.547	0.472	-0.158	0.05
Tsf	161	0.978	0.043	0.043	-0.019	1.00
Chym	159	0.639	0.472	0.460	-0.026	0.86

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; H_E e H_O = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; F_{IS} = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; P = significância dos testes.

Tabela 11. Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de F_{IS} (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para 9 SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de Santos em 2008.

Santos 2008						
Locus	N	R	H_o	H_E	F_{IS}	P
Ef2	190	0.833	0.247	0.298	+0.170	0.03
MUC-1	188	0.450	0.511	0.498	-0.026	0.77
Na/K	188	0.300	0.293	0.362	+0.193	0.01
PGK	189	0.103	0.185	0.186	+0.002	1.00
apolLp-II	178	0.649	0.326	0.487	+0.332	0.00
FerH	189	0.817	0.291	0.306	+0.049	0.48
CYP9J2	188	0.231	0.633	0.467	-0.356	0.00
Tsf	189	0.976	0.042	0.052	+0.181	0.12
Chym	190	0.571	0.447	0.496	+0.099	0.19

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; H_E e H_o = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; F_{IS} = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; P = significância dos testes.

4.2.3. Análise da estrutura genética populacional

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA), utilizando dados dos 9 *loci* polimórficos, revelaram 3.74% de diversidade genética interpopulacional, 0,63% intrapopulacional e grande parte da variabilidade genética intraindividual com 95.63% do total de variações (Tabela 12). O valor de F_{ST} (0,0374) mostrou diferenciação entre as populações de Santos e São Sebastião ($P = 10^{-5}$) em um nível de significância de 0,05. Pela análise entre as coletas (2007 e 2008) as populações de São Sebastião e Santos apresentam variações semelhantes com $F_{ST} = 0.01754$ e $F_{ST} = 0.0164$, respectivamente (Tabelas 13 e 14).

Tabela 12. Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos marcadores SNPs entre as populações de *Aedes aegypti* de São Sebastião e Santos, sem agrupamento.

Fonte de variação	GL	SQ	Porcentagem total da variação	P	Estatística F
Entre populações	1	26.060	3.24%	< 0,01)	$F_{ST} = 0.0324$
Dentro das populações	740	651.680	0.63%	> 0,05)	
Dentro dos indivíduos	742	645.000	95.63%	> 0,05)	
Total	1483	1322.740	100%		

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados.

Tabela 13. Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos marcadores SNPs entre as coletas (2007-2008) de São Sebastião, sem agrupamento.

Fonte de variação	GL	SQ	Porcentagem total da variação	P	Estatística F
Entre as coletas	1	8.451	1.75%	(< 0,01)	$F_{ST} = 0.01754$
Dentro das populações	389	417.109	1.34%	(> 0,05)	
Dentro dos indivíduos	391	408.000	96,91%	(> 0,05)	
Total	1483	833.560	100%		

Tabela 14. Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos marcadores SNPs entre as coletas (2007-2008) de Santos, sem agrupamento.

Fonte de variação	GL	SQ	Porcentagem total da variação	P	Estatística F
Entre as coletas	1	8.470	1.64%	(< 0,01)	$F_{ST} = 0.0164$
Dentro das populações	349	442.866	2.36%	(> 0,05)	
Dentro dos indivíduos	351	424.500	96%	(> 0,05)	
Total	701	875.836	100%		

4.2.4. F_{ST} pairwise

A diferenciação genética entre os pares da população através de estimativas F_{ST} revelou que a média dos valores F_{ST} pairwise entre populações variou de +0,02615 a +0,05816. A população de Santos e São Sebastião coletadas no ano de 2007, se mostraram geneticamente mais próximas (+0.02615) e as coletadas no ano de 2008 as menos próximas (+0.05816). Na análise de diferenciação entre as coletas na mesma população, São Sebastião variou +0.00454 de 2007 para 2008, enquanto Santos variou +0.01912 (2007-2008). Todos os valores de diferenciação genética entre pares de populações foram significativos ($P < 0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15. Matriz de diferenciação genética (F_{ST} pairwise) das populações de *Aedes aegypti* calculado a partir do método da estatística F .

Populações	Santos (2007)	São Sebastião (2007)	Santos (2008)	São Sebastião (2008)
Santos (2007)	-			
São Sebastião (2007)	0.02615	-		
Santos (2008)	0.01912	0.04431	-	
São Sebastião (2008)	0.04242	0.00454	0.05816	-

4.2.5. Estruturação populacional

O *software* Structure 2.3.1 (Pritchard et al., 2000) foi usado para identificar as prováveis composições genéticas das populações de *Ae. aegypti*, considerando as duas localidades amostradas (São Sebastião e Santos). 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 ($k = 3$) em ambas as populações do estudo (Figura 14). As frequências dos clusters apresentaram maior variação interpopulacional, observando uma grande representação no cluster 2 (verde) para a população de São Sebastião, e no cluster 3 (azul) para Santos. Embora também tenha ocorrido variação intrapopulacional (temporalmente), porém em menor escala (Figura 15).

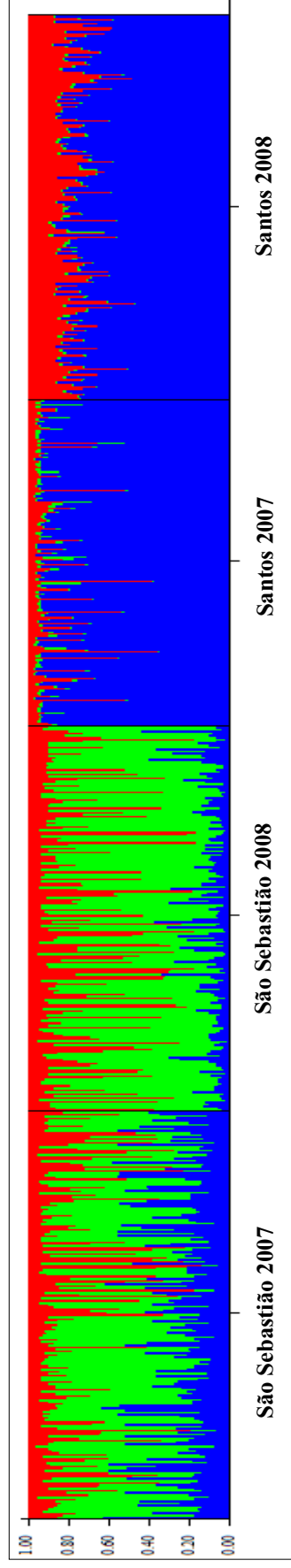


Figura 14. Resultado da análise Bayesiana (considerando frequências alélicas correlacionadas). Cada um dos 742 indivíduos incluídos na análise é representado por uma linha vertical, dividida em até três cores. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas, e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*.

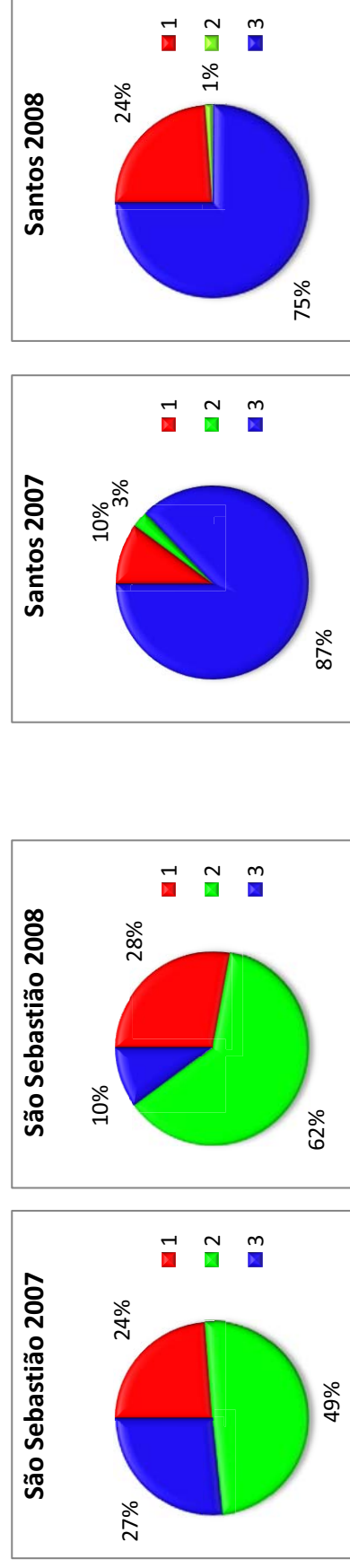


Figura 15. Frequência de cada cluster nas populações de São Sebastião (2007 - 2008) e Santos (2007 - 2008). Cada cor indica um cluster (vermelho = cluster 1; verde = cluster 2 e azul = cluster 3).

A análise Bayesiana também fornece informação sobre a heterogeneidade das populações através dos gráficos dos clusters formados em função da composição genética (figura 16). Através de tal gráfico, é possível verificar que a população de Santos apresenta-se mais agrupada, enquanto a de São Sebastião mais dispersa, indicando maior heterogeneidade nesta população.

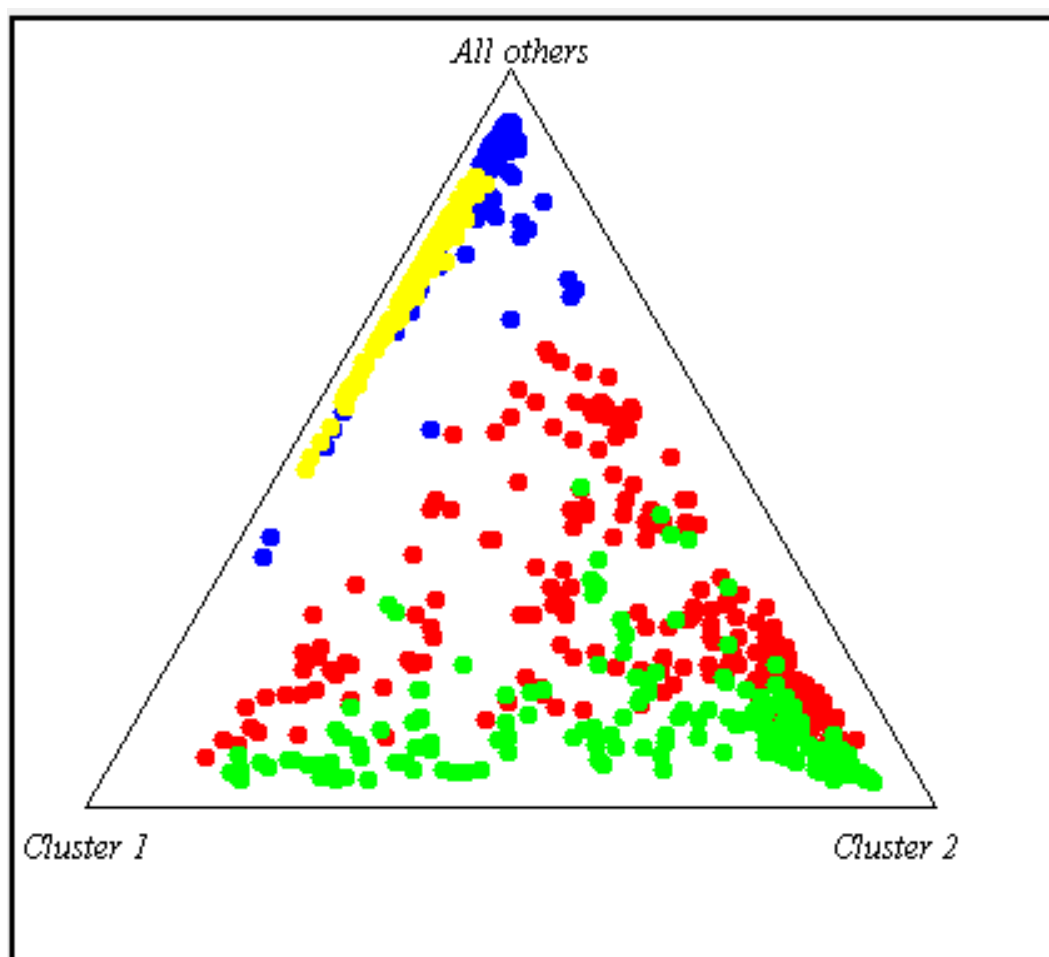


Figura 16. Gráfico de agrupamento das populações em função das composições genéticas. (Cada indivíduo é representando por um ponto colorido; cor vermelha representa a população de São Sebastião – coleta 2007; cor verde representa a população de São Sebastião – coleta 2008; cor azul representa a população de Santos – coleta 2007; cor amarela representa a população de Santos – coleta 2008.

4.3. Estudo genético populacional por análise mitocondrial

4.3.1. Análise de polimorfismo molecular e filogenia

Parte do gene mitocondrial ND4 foi analisado e das 384 amostras sequenciadas, 363 foram viáveis para as análises. Destas, 181 representam a população de Santos/SP (coletas 2007 - 2008) e 182 a população de São

Sebastião/SP (coletas 2007 - 2008). Os 376 pares de base (pb) das sequências do gene ND4 foram alinhadas utilizando o *software* CLUSTALX v. 1.8. Um fragmento de 314 pb foi utilizado para as análises.

A composição média de nucleotídeos foi de 23,12% para citosina; 36,07% para timina; 26,47% para adenina e 14,34% para guanina. Dos 314 pb utilizados na análise das 363 sequências através do *software* DnaSP v. 5, quatorze sítios foram polimórficos, sendo todas mutações sinônimas, representadas por 13 transições C ↔ T ou A ↔ G e por uma única transversão A ↔ T, na posição 225, e com um número total de 6 haplótipos (Tabela 16). O número médio de diferenças nucleotídicas foi $k = 5,542$, com índice de diversidade nucleotídica $\pi_1 = 0,01765$, diversidade de nucleotídeos empregando o modelo de Jukes com correção Cantor $\pi_2 = 0,01797$ e diversidade haplotípica $Hd = 0,813$.

Tabela 16. Haplótipos encontrados nas populações de Santos e São Sebastião (2007), com o número de sítios polimórficos e as posições das mutações em cada haplótipo.

Haplótipos	Posição das mudanças nucleotídicas														N	
	2	6	8	9	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2		2
	7	6	7	6	5	4	1	9	2	5	1	7	3	7		
H1	C	A	T	C	A	C	G	T	G	A	T	A	C	T	58	
H2	G	.	.	C	.	.	.	G	T	.	98	
H3	C	.	.	C	.	T	.	60	
H4	T	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.	43	
H5	T	G	C	T	.	T	.	.	A	T	.	.	T	C	29	
H6	T	.	C	T	.	T	A	.	A	T	.	.	T	C	75	

O haplótipo H2 foi o mais frequente, representando 27% do total de indivíduos, o qual está presente em ambas as populações, bem como o H1 (16%), H4 (12%), H5 (8%) e H6 (21%). O haplótipo H3, com 16% do total de indivíduos, foi detectado somente na população de Santos. A frequência dos 6 haplótipos para as duas populações de *Ae. aegypti* estão representadas graficamente na figura 17.

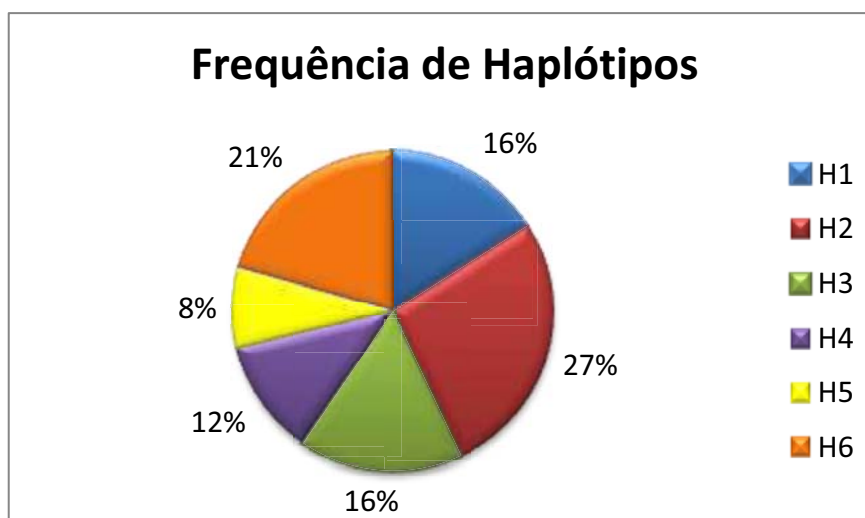


Figura 17. Frequência dos 6 haplótipos encontrados nas populações de *Ae. aegypti* de Santos e São Sebastião (coletas 2007 – 2008).

A análise de variância molecular (AMOVA) indica que 13,70% das variações nas frequências dos haplótipos surgiram entre as populações e 84,14% dentro das populações. A diferenciação por F_{ST} resultou num valor de $F_{ST} = 0,18034$, considerado altamente significativo ($P < 0,01$) indicando que estas populações encontram-se estruturadas (Tabela 17).

Tabela 17. Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos haplótipos entre as populações de *Aedes aegypti* (Santos e São Sebastião coletas 2007-2008).

Fonte de variação	GL	SQ	Porcentagem total da variação	P	Estatística F
Entre as populações	1	13.082	13,70%	(< 0,01)	$F_{ST} = 0.18034$
Entre as populações dentro dos grupos	2	4.194	4,33		
Dentro das populações	359	129.950	81,97%		
Total	362	147.226	100%		

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados.

Os resultados obtidos pela AMOVA entre as coletas (2007 – 2008) mostram que a população de Santos apresenta maior variação ($F_{ST} = 0,07572$) do que a população de São Sebastião ($F_{ST} = 0,0214$) (Tabelas 18 e 19).

Tabela 18. Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos haplótipos entre as coletas (2007 e 2008) de *Aedes aegypti* da população de Santos.

Fonte de variação	GL	SQ	Porcentagem total da variação	P	Estatística F
Entre as coletas	1	3.150	7,57%	(< 0,01)	$F_{ST} = 0.07572$
Dentro das populações	179	67.060	92,43%		
Total	180	70.210	100%		

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados.

Tabela 19. Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos haplótipos entre as coletas 2007 e 2008 de *Aedes aegypti* da população de São Sebastião.

Fonte de variação	GL	SQ	Porcentagem total da variação	P	Estatística F
Entre as coletas	1	1.044	2,14%	(< 0,05)	$F_{ST} = 0.0214$
Dentro das populações	180	62.890	97,86%		
Total	181	63.934	100%		

GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados.

Realizamos a construção de um diagrama utilizando o *software* TCS v. 1.21, o qual infere a relação entre os haplótipos, onde o tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo e a proporção em que cada população está presente no mesmo. O diagrama sugere que o haplótipo H2 provavelmente é o haplótipo ancestral entre os indivíduos estudados. A maioria das variações entre os haplótipos não ocorre mais do que 2 ou 3 passos de mutação. A análise mostra a presença de dois clados distintos, separados por 6 passos mutacionais, o clado 1 compreendendo os haplótipos H1, H2 e H3, e o clado 2 composto pelos haplótipos H3, H4 e H5 (Figura 18).

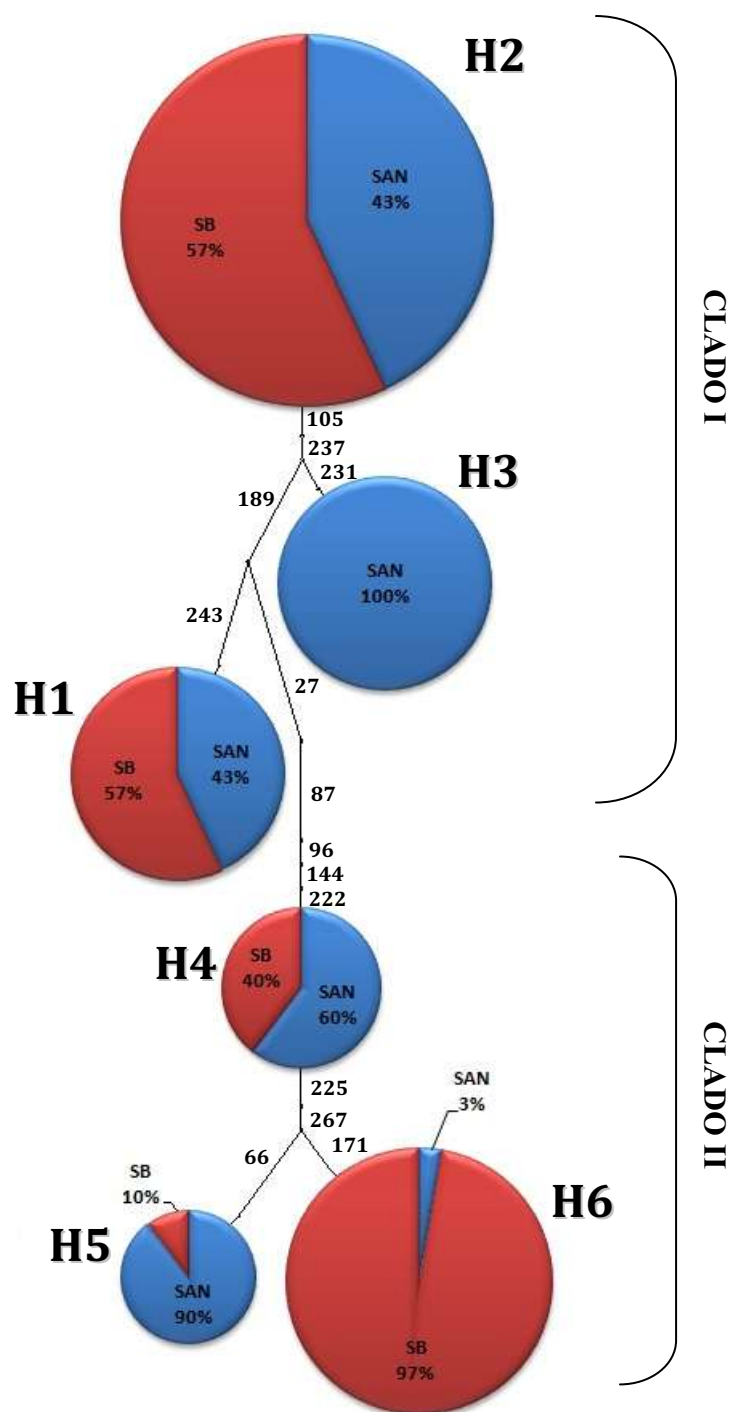


Figura 18. Diagrama de haplótipos encontrados em populações de *Aedes aegypti* de Santos (cor azul) e São Sebastião (cor vermelha). O tamanho do círculo representa o número de indivíduos e as cores representam a frequência de cada população no referido haplótipo. Haplótipos (H1 à H6) são apresentados junto aos círculos. Números entre as esferas representam os sítios polimórficos, como descrito na tabela 16.

Utilizamos amostras representativas de cada um dos haplótipos encontrados em nosso estudo e comparamos com amostras depositadas no GenBank por Bracco e colaboradores (2007): acessos DQ176834, DQ176835, DQ176841 e DQ176842; bem como os acessos AY906838, AY906842, AY906845-AY90685, depositados por Paduan e colaboradores (2008), para as análises filogenéticas e moleculares realizadas pelo *software* MEGA (Figura 19). A topologia de verossimilhança máxima mostrou que as populações estão separadas em dois grupos (clados) confirmando o encontrado pela análise através do *software* TCS.

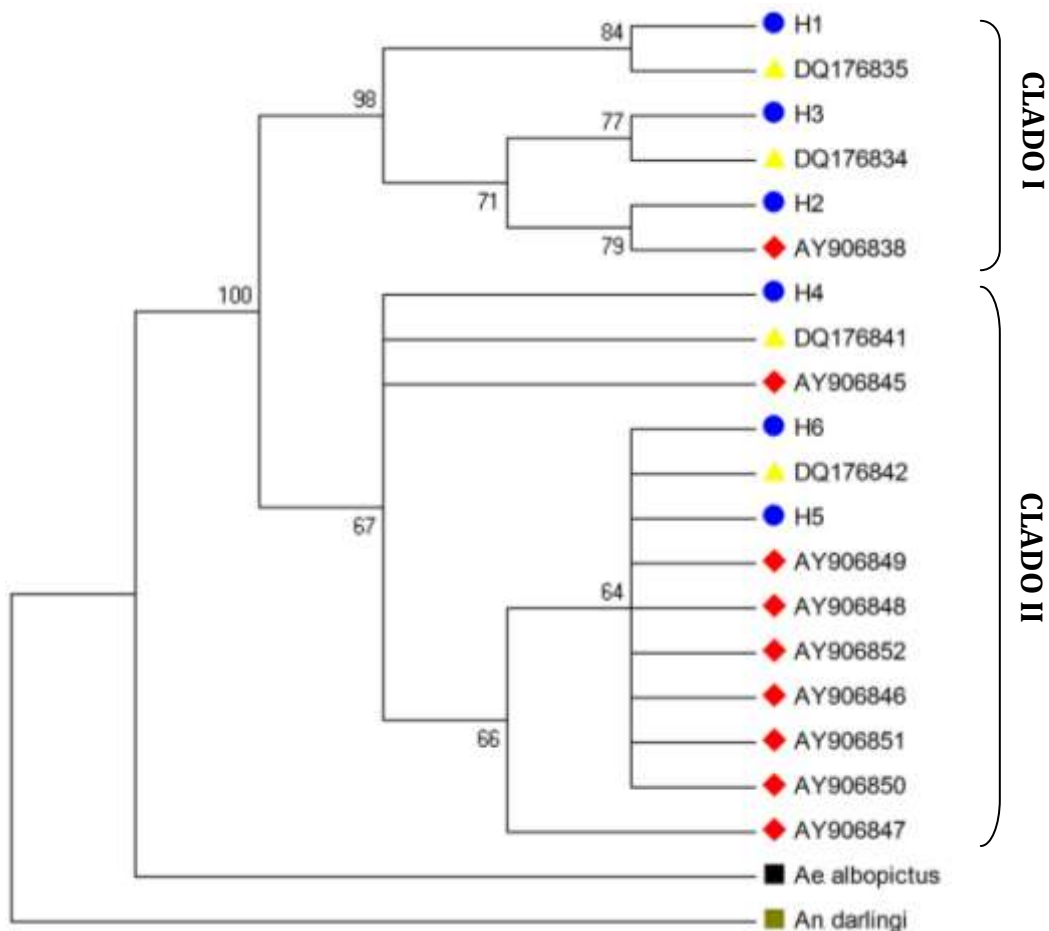


Figura 19. Árvore de *Neighbor-Joining* baseada na análise da distância genética das espécies. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap* (apenas valores acima de 50 são mostrados). (As esferas azuis (●) representam os haplótipos das populações de *Ae. aegypti* de Santos e São Sebastião (2007 – 2008); triângulos amarelos (▲), haplótipos encontrados na população de Santos/SP no estudo realizado por Bracco e colaboradores (2007); losangos em vermelho (◆), haplótipos encontrados na população de Santos/SP por Paduan e colaboradores (2008); e os quadrados (■ e ■) representam populações externas - *Ae. albopictus* e *An. darlingi*.

Quando analisamos as populações (Santos e São Sebastião coletas 2007 - 2008) separadamente, a análise das 181 sequências representativas da população de Santos/SP, verificamos a existência dos 6 haplótipos (H1, 2, 3, 4, 5 e 6), onde o H6 é o menos frequente, com apenas 2 indivíduos, e o H3, o mais frequente com 60 indivíduos (Tabela 20). O número total de sítios polimórficos é 14, sendo todas mutações sinônimas, representadas por 1 transversão A ↔ T, na posição 225 e 13 transições C ↔ T ou A ↔ G, dentre estas, 1 sítio (posição 231) está presente somente nesta população. O número médio de diferenças nucleotídicas foi ($k = 4,797$), com índice de diversidade nucleotídica $\pi_1 = 0,01528$, diversidade de nucleotídeos pelo modelo de Jukes com correção Cantor $\pi_2 = 0,01553$ e diversidade haplotípica $Hd = 0,78011$

Tabela 20. Haplótipos encontrados na população de Santos (2007 - 2008), com o número de sítios polimórficos, posições das mutações e a frequência (%) de cada haplótipo.

	Posição das mudanças nucleotídicas													N 2007	N 2008	%		
	2 7	6 6	8 7	9 6	0 5	1 4	1 7	1 1	1 9	2 2	2 5	2 1	2 7				2 3	2 4
H1	C	A	T	C	A	C	G	T	G	A	T	A	C	T		8	17	14
H2	G	.	.	C	.	.	.	G	T	.		21	21	23
H3	C	.	.	C	.	T	.		43	17	33
H4	T	.	C	T	.	T	.	.	A	.	.	.	T	.		4	22	14,5
H5	T	G	C	T	.	T	.	.	A	T	.	.	T	C		12	14	14,5
H6	T	.	C	T	.	T	A	.	A	T	.	.	T	C		0	2	1

H = Haplótipos; N = número de indivíduos por haplótipo.

Para a população de São Sebastião/SP, as sequências do gene ND4 de 182 indivíduos revelaram a existência de 5 diferentes haplótipos (H1, 2, 4, 5 e 6) (Tabela 21). O número total de sítios polimórficos foram 13, sendo todas mutações sinônimas, representadas por 1 transversão A ↔ T e 12 transições C ↔ T ou A ↔ G. O número médio de diferenças nucleotídicas foi $k = 5,590$, com índice de

diversidade nucleotídica $\pi_1 = 0,0178$, diversidade de nucleotídeos pelo modelo de Jukes com correção Cantor $\pi_2 = 0,01816$ e diversidade haplotípica $Hd = 0,70645$.

Tabela 21. Haplótipos encontrados na população de São Sebastião (2007 - 2008), com o número de sítios polimórficos, posições das mutações e a frequência (%) de cada haplótipo.

	Posição das mudanças nucleotídicas														N 2007	N 2008	%
	2 7	6 6	8 7	9 6	1 5	1 4	1 7	1 8	2 2	2 5	2 3	2 4	2 6	2 7			
H1	C	A	T	C	A	C	G	T	G	A	A	C	T	12	21	18	
H2	G	.	.	C	.	.	G	T	.	30	26	31	
H4	T	.	C	T	A	T	.	T	A	.	A	.	.	16	1	9	
H5	T	G	C	T	.	T	.	.	A	T	.	T	C	0	3	2	
H6	T	.	C	T	A	T	A	T	A	T	A	.	C	33	40	40	

H = Haplótipos; N = número de indivíduos por haplótipo.

5. Discussão

5. Discussão

Atualmente, são várias as tecnologias disponíveis para a genotipagem de SNPs (Okimoto & Dodgson, 1996; Wang et al., 2005; Chen et al., 2005; Shen et al., 2008) e mesmo as existentes encontram-se em constante evolução. A escolha da melhor tecnologia a se utilizar para diferentes aplicações irá depender dos objetivos do estudo, isto é, do número de marcadores a caracterizar e do número de amostras a analisar. No que diz respeito à genotipagem em larga escala, são vários os aspectos a se levar em conta: a sensibilidade do método, reprodutibilidade, precisão, capacidade para a realização de PCR multiplex, tempo necessário e os custos envolvidos, considerando-se a plataforma utilizada e o preço da genotipagem, além de problemas com quantidade e qualidade do DNA disponível.

Dentre as novas tecnologias desenvolvidas para a análise de SNPs, uma das mais promissoras é a PCR em Tempo Real, a qual é utilizada com diversas finalidades, em particular para a quantificação de ácidos nucleicos e para caracterização de determinados polimorfismos. A peculiaridade desta tecnologia é o fato do processo de amplificação ser monitorado em tempo real através da utilização de técnicas de fluorescência.

A estratégia para a genotipagem de SNPs seguida neste trabalho, a PCR em Tempo Real com utilização de sondas TaqMan®, apresentou-se viável para genotipagem *high-throughput*. O protocolo elaborado, relativo à concentração de DNA, constituição da reação de amplificação e às condições da PCR utilizadas, mostrou ser eficiente para a caracterização dos SNPs de nosso estudo.

Em relação à concentração do DNA, foi possível a detecção de SNPs para concentrações de até 10ng/μL, porém, pela baixa reprodutibilidade apresentada nesta concentração, todas as genotipagens efetuadas neste trabalho, para os diferentes polimorfismos, foram realizadas com DNA na concentração de aproximadamente 30ng/μL e volume final de 10μL. Tal protocolo possibilitou a detecção dos 9 marcadores SNPs sem dificuldades.

Chen e colaboradores (2010) referem a caracterizados de SNPs por PCR em Tempo Real com concentrações de DNA de 5ng/μL, evidenciando a elevada

sensibilidade da técnica, porém a maioria dos trabalhos utilizam concentração de DNA de 10 a 20ng/ μ L (Lareu et al., 2001, Bass et al., 2007; Walker, 2007),

Uma maior concentração de DNA utilizada em nosso estudo possivelmente está relacionada à qualidade do DNA, pois os mosquitos utilizados foram armazenados por alguns meses em temperatura ambiente imersos em etanol 100%, o que pode ter causado degradação do DNA. Um estudo realizado por Grutzmacher e colaboradores (2006), revelou ocorrer degradação do DNA de formigas da espécie *Acromyrmex heyeri* armazenadas em etanol por longo período, que explicaria a diferença na qualidade do DNA quando se compara a uma amostra fresca.

Com o objetivo de validar um protocolo para a caracterização de SNPs pela técnica TaqMan® por PCR em Tempo Real, foram caracterizadas neste estudo um total de 742 amostras de *Ae. aegypti* referentes às populações de Santos/SP e São Sebastião/SP, utilizando 9 marcadores SNPs.

Esta análise permitiu a obtenção de resultados em sistema automatizado, com alta sensibilidade, precisão, facilidade de execução, além da rapidez em que os resultados foram gerados. Esta técnica elimina alguns passos intermediários à PCR padrão, possibilitando a genotipagem *high-throughput*. Apesar de ter um custo relativamente alto, a padronização otimizada tornou o custo compatível a outras metodologias disponíveis.

Já existem diversos estudos utilizando ensaios TaqMan® para a caracterização de insetos por SNP (Daborn et al., 2004; Bass et al., 2007; Walker et al., 2007; Chen et al., 2010), porém para populações de *Ae. aegypti* ainda não há descrição, sendo este o primeiro trabalho a ser realizado para genotipar populações de *Ae. aegypti* utilizando tal ensaio.

Além dos aspectos técnicos evidenciados neste trabalho, importa também referir sobre a caracterização das populações de *Ae. aegypti* de Santos e São Sebastião realizada através da metodologia TaqMan® utilizando os 9 SNPs, bem como sequenciamento de fragmento do gene mitocondrial ND4.

A utilização de marcadores SNPs em estudos de genética de populações em mosquitos *Ae. aegypti* visa fornecer ferramentas para análise da variabilidade genética ao longo do genoma. Em um estudo anterior, realizado em nosso laboratório, foram

identificados de 2 a 45 SNPs/kb nos 9 genes nucleares pesquisados. Esta alta diversidade detectada demonstra que os SNPs podem ser extremamente úteis como marcadores genéticos, principalmente em estudos com tecnologias *high-throughput*, estudos de ligação e de caracterizações complexas (Paduan, 2008).

O DNA mitocondrial é outra ferramenta amplamente utilizada em estudos de evolução molecular de insetos (Tang et al., 1996) e genética populacional de *Ae. Aegypti* de diferentes regiões geográficas e endêmicas de dengue (Bosio, 2005; Paduan & Ribolla, 2008; Urdaneta-Marquez et al., 2008; Lozano-Fuentes et al., 2009).

Em nosso estudo, na análise através de 9 marcadores SNP, alguns *loci* das populações de Santos e São Sebastião apresentaram desvios entre as heterozigosidades observadas e esperadas, decorrentes do excesso de homozigotos. Paduan e Ribolla (2009) também verificaram excesso de homozigoto para os *loci* em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Huber e colaboradores (2002) analisando o equilíbrio de Hardy-Weinberg em populações da Ásia encontraram alguns *loci* em desequilíbrio genético e todos estavam relacionados com excesso de homozigotos. É possível que esses *loci* estejam passando por forte pressão de seleção, endogamia ou efeito Wahlund.

Considerando as estimativas do número total de heterozigosidades para todas as amostras populacionais, o *locus* Tsf mostrou os menores valores de heterozigosidades observadas e esperadas, enquanto que, o *locus* CYP9J2 revelou os maiores valores.

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou uma diversidade genética de 3,24% ($F_{ST} = 0,0324$) entre as populações do estudo, porém, apesar da baixa porcentagem foi significativo nos testes de permutação ($P = 10^{-5}$), sendo que a maior diferença (95,63%) foi verificada dentro dos indivíduos. Resultados obtidos por Paduan (2008) no estudo genético populacional do mosquito *Ae. aegypti* de 3 localidades do Brasil (Botucatu, Maceió e Juazeiro do Norte), utilizando 9 marcadores SNPs e analisando um total de 76 mosquitos, verificou uma diversidade genética de 23,65% ($F_{ST} = 0,2364$) entre as populações, muito maior quando comparado ao resultado obtido em nosso estudo. Porém um estudo realizado por Urdaneta-Marquez e colaboradores (2008) no qual analisa 9 populações de *Ae. aegypti* com um total de 619 mosquitos, utilizando 11 marcadores SNPs, verificaram que 2,9% da diversidade

genética ocorre entre as populações ($F_{ST} = 0,029$), valores estes menores, se comparados, aos encontrados em nosso estudo.

Na análise que estima o número de migrantes por geração (Nm) (Slatkin, 1995), foi obtida a taxa de migrantes reprodutivos por geração onde se verificou 8,72 migrantes entre as populações coletadas em 2007 e 5,39 entre as coletadas em 2008. Tal taxa é considerada alta, o que corrobora nosso resultado de diversidade genética baixa, pois as populações estariam com alta taxa de migração e conseqüente troca gênica.

Os resultados obtidos pela análise bayesiana de estrutura populacional mostram diferenças significativas entre as populações de Santos e São Sebastião. Ocorre uma grande variação na frequência alélica dos clusters e evidências da ocorrência de migração entre as cidades, bem como uma maior heterogeneidade na população de São Sebastião. Na análise temporal verificou-se uma pequena mudança na frequência dos clusters 2007-2008, em ambas as populações. Para a população de Santos ocorreu um aumento de 14% no cluster 1 e para São Sebastião um aumento de 17% para o cluster 2. Estas diferenças podem indicar um aumento de uma das composições já existentes nestas localidades, ou que novas introduções podem ter ocorrido. Novas introduções podem favorecer a entrada de mosquitos já infectados com o vírus dengue, acarretando em grande impacto sobre a epidemiologia da dengue, pois possibilita a entrada de novo sorotipo no Brasil. Os resultados também revelam que, provavelmente, as introduções são independentes entre estas duas cidades.

As análises utilizando-se 363 seqüências do fragmento do gene mitocondrial ND4 referentes às populações de Santos e São Sebastião (coletas 2007 - 2008) revelaram uma alta diferenciação entre as populações ($F_{ST} = 0,18034$), demonstrando que estão geneticamente bem estruturadas. Verificou-se também a presença de 6 haplótipos, dos quais 2 (H3 e H5) são exclusivos da população de Santos (coleta 2007) e representam 63% do total dos indivíduos analisados nesta localidade. O restante (37%) estão distribuídos em outros 3 haplótipos (H1, 2 e 4), os quais são compartilhados com São Sebastião. A população de São Sebastião também apresenta 1 haplótipo exclusivo (H6) que corresponde a 36% do total de indivíduos desta localidade. Já na coleta de 2008, Santos apresentou 1 haplótipo (H3) exclusivo com

33% do total dos haplótipos encontrados. O restante dos haplótipos é compartilhado com São Sebastião, cidade que não apresenta haplótipo exclusivo. Estes resultados indicam diferenças entre as populações bem como possível migração. Alguns estudos (Marques dos Santos et al., 2003; Paduan et al. 2006; Paduan & Ribolla, 2008) relatam que a população de Santos apresenta um padrão genético diverso das demais populações do Estado de São Paulo. Porém em nosso estudo, Santos compartilha a maioria dos haplótipos com São Sebastião.

Através da análise Nm (Slatkin, 1995), obtivemos a taxa de 1,75 migrantes por geração entre as populações coletadas em 2007 e 2,84 migrantes por geração entre as coletadas em 2008, enquanto a análise *F* de Wright (Wright, 1965) apresentou elevada diferenciação entre as populações (13,7%). A taxa de Nm obtida é considerada alta, mas quando comparada à taxa encontrada na análise dos SNPs, ela é menor. No caso do gene ND4, os haplótipos exclusivos podem ter se fixado nestas populações, mesmo com alto fluxo gênico. Por outro lado, os marcadores SNPs podem não ser discriminantes ao ponto de terem suas frequências alteradas, mas quando observamos a distribuição destas pelo método bayesiano, podemos claramente observar diferenças significativas nas duas populações.

Estes resultados se mostram importantes para auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o controle e manejo do mosquito vetor, uma vez que a estratégia de prevenção da dengue tem se baseado no controle do vetor, com ênfase ao uso de inseticidas químicos, os quais tem sido largamente empregados. Tal prática tem gerado processos de resistência, os quais têm sido detectados, afetando diretamente as estratégias de controle e aumentando o risco de epidemias a cada ano em nosso país. Desta forma, o conhecimento aprofundado sobre a estruturação genética e dinâmica populacional desta espécie é crucial, uma vez que populações geneticamente diferentes podem apresentar diferenças quanto a sua capacidade e competência vetorial. Além disso, um conjunto de dados (monitoramento das populações circulantes do mosquito, dados de casos de dengue e resistência a inseticidas) constituem uma alternativa eficaz para prevenir as epidemias.

6. Conclusão

6. Conclusão

- ✚ O método de genotipagem utilizando ensaios TaqMan® se mostrou eficiente, rápido e uma ótima ferramenta para estudos em larga escala.
- ✚ Os marcadores de único nucleotídeo se mostraram eficientes para estudos de genética populacional nas duas populações naturais do *Ae. aegypti*.
- ✚ A análise Bayesiana revelou diferenças significativas entre as populações estudadas, sendo que a população de São Sebastião apresentou-se mais heterogênea.
- ✚ Os marcadores mitocondriais reforçam os resultados identificados pela análise Bayesiana, pois também indicaram diferenças significativas entre as populações do estudo.
- ✚ A hipótese de que a população de Santos tenha originado a população de São Sebastião, pelo fato de ambas apresentarem resistência aos inseticidas comumente utilizados, e resposta semelhante em ensaios bioquímicos e biológicos não se confirmou em nossos estudos, pois se verificou a existência de diferenças significativas entre as populações por ambos os marcadores moleculares utilizados (SNPs e fragmento do gene ND4).

7. Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- 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.
- ALVES, M.C.G.P.; GURGEL, S.M.; ALMEIDA, M.C.R.R. Plano amostral para cálculo de densidade larvária de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 25, n. 4, 1991.
- APOENA PINHEIRO/UnB Agência Disponível em:
<<http://elisabethjf.blogspot.com/2010/04/dengue-mata-ii.html>>>, acesso em: 09 de fevereiro de 2010.
- AVISE, J.C. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York, 1994.
- BARBAZAN, P. et al. Characterization of three microsatellite loci for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their use for population genetic study. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v.30, n.3, p.482–483, 1999.
- BASS, C.; WILLIAMSON, M.S.; WILDING, C.S.; DONNELLY, M.J.; FIELD, L.M. Identification of the main malaria vectors in the *Anopheles gambiae* species complex using a TaqMan real-time PCR assay. **Malar. J.**, v.6, n.155, 2007.
- BERGER, J.; SUZUKI, T; SENTI, K.A. Genetic mapping with SNP markers in *Drosophila*. **Nat. Genet.**, v.29, p.475–481, 2001.
- BESANSKY, N.J.; FINNERTY, V.; COLLINS, F.H. Molecular perspectives on the genetics of mosquitoes. **Adv. Genet.**, v.30, p.123-184, 1992.
- BLACK, W.C. et al. Population genomics: genome-wide sampling of insect populations. **Ann. Rev. Entomol.**, v.46, p.441–469, 2001.
- BOSIO, C.F. et al. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.72, n.4, p.434-442, 2005.
- BOTSTEIN, D.; RISCH, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nat. Genet. Suppl.**, v.33, p.228–237, 2003.

- BRACCO, J.E. et al. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, n.5, p.573-580, 2007.
- BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: History of Control in Brazil. **Epidemiol. e Serv. de Saúde**, v.16, p.113-118, 2007.
- BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, v.234, p.177-186, 1999.
- BROWN, G.G.; SIMPSON, M.W. Intra and inter-specific variation of the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: restriction enzyme of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships. **Genetics**, v.97, p.125-143, 1981.
- BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A.; WILSON, A.C. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode evolution. **J. Mol. Evol.**, v.18, p.225-239, 1982.
- BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In M. Nei and R. Koehn, eds., Evolution of genes and proteins, p.65-88, 1983.
- CANN, R.L.; WILSON, A.C. Length mutation in human mitochondrial DNA. **Genetics**, v.104, p.99-711, 1983.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – CVE. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/coque_dados.html>, acesso em: 14 de novembro de 2010.
- CHEN, Y., YU, Y.X.; LIU, X.X.; WEI, L. [SNaPshot technique for detection of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in HBV polymerase gene region of HBV gene] **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**, v.19, n.2, p.162-164, 2005.
- CHEN, L.; ZHONG, D.; ZHANG, D.; SHI, L.; ZHOU, G.; et al. Molecular Ecology of Pyrethroid Knockdown Resistance in *Culex pipiens pallens* Mosquitoes. **PLoS ONE**, v.5, n.7, 2010.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Mol. Ecol.**, v.9, n.10, p.1657-1660, 2000.
- CONN, J.; COCKBURN, A.F.; MITCHELL, S.E. Population differentiation of the malaria vector *Anopheles aquasalis* using mitochondrial DNA. **J. Heredit.**, v.84, p.248-253, 1993.

- CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 225p, 1994.
- COSTA-RIBEIRO, M.C.V.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A.B. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.8, p.917-921, 2006.
- CROTEAU, D.L.; STIERUM, R.H.; BOHR, V.A. Mitochondrial DNA repair pathways. **Mutation Research**, 434:137-148. 1999.
- DABORN, P.; MCCART, C.; WOODS, D.; RICHARD, H.F.C. Detection of insecticide resistance-associated mutations in cat flea *Rdl* by TaqMan-allele specific amplification. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.79, p.25-30, 2004.
- EHRENKRANZ, J.N. Pandemic dengue in Caribbean countries and the Southern United States Past: present and potential problems. *New Engl. J. Med.*, v.285, n.26, p.1460-1469, 1971.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinf.** Online, v.1, p.47-50, 2005.
- 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.
- FAY, R.W.; ELIASON, D.A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosq. News**, v.26, p.531-535, 1966.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783, 1985.
- FERRE, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Entomol.**, v.47, p.501-533, 2002.
- FERREIRA, M.E. & GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p.220, 1996.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. **Dengue**. In: Tratado de Infectologia (R. Veronesi & R. Focacia, org.), São Paulo: Editora Atheneu, p. 201-214, 1966.

- FONSECA, D.M.L.A.; POINTE, D.A; FLEISCHER, R.C. Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. **Mol. Ecol.**, v.9, p.1803-1814, 2000.
- FONSECA, D.M. et al. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. **Science**, v.3, p.1535-1538, 2004.
- FORATTINI, O.P. **Entomologia médica**. 2ed. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 506p., 1965.
- FU, Y.K. & LI, W.H. Statistical tests of neutrality mutations. **Genetics**, v. 133, p. 609-709, 1993.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Informe Epidemiológico do SUS**. Ministério da Saúde, v.11, n.4, 2002.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Reunião técnica para discutir status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil**. Brasília: 1999.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992, 613p.
- GADELHA, D.P.; TODA, A.T. Biologia e comportamento de *Aedes aegypti*. Ver. Brasil **Malariol D. Trop.**, v.37, p.29-36, 1985.
- GLASSER, C.M. Estudo da infestação do Estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. 1997. 130f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GLASSER, C.M. et al. Dengue no Estado de São Paulo: exemplo da complexidade do problema neste final de século. **Rev. CIP**. São Paulo, n.4, p.11-20, 1999.
- GLASSER, C.M & GOMES, A.C. Infestação do Estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Rev. Saúde Pública**. v.34, n3, p570-577, 2000.
- 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-ESCALANTE, N.; MUNOZ, M.L.; FERNANDEZ-SALAS, I.; 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.**, v.62, p.200-209, 2000.

- GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N. et al. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.66, p.213-222, 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, p.1580-1587, 2000.
- GRUTZMACHER, D.D.; LOECK, A.E.; OLIVEIRA, A.C.; FISCHER, S.; ELIAS, S.A.A. Efeito do período de armazenamento em etanol sobre a qualidade e quantidade de DNA extraído de *acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) (hymenoptera: formicidae) **R. Bras. Agrocência**, v. 12, n. 1, p. 105-106, 2006.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever; its history and resurgence as a global public health problem, *In* D. J. Gubler and G. Kuno (eds.), *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, New York. p.1-22, 1997.
- GUBLER, D.J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, n.3, p.442-450, 1998a
- GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clin. Microb. Rev.**, v.11, n.3, p.480-495, jul. 1998b.
- GUBLER, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol.**, v.10, n.2, p.100-103, 2002.
- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, n.2, p.361-372, 1992.
- HALSTEAD, S.B. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **World Health Stat. Q.**, v.45, p.292-298, n.2/3, 1992.
- HAMMER, M.F. A recent common ancestry for human Y chromosomes. **Nature**, v.378, n.6555, p.376-378, 1995.
- HARRIS, H. Enzyme polymorphisms in man. **Proc. R. Soc. London**, v.164, p.298-310, 1966.
- HEMINGWAY, J. & RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Ann. Rev. Entomol.**, v.45, p.371-391, 2000

- HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.3, n.4, p.376-396, 1990.
- 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.
- HOLMES, E. C.; BARTLEY, L. M.; GARNETT, G. P. The Emergence of Dengue: Past Present and Future. **Biom. Res. Rep.**, v.1, p. 301-325, 1998.
- HONÓRIO, N.A. Estudos de aspectos da biologia do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1984), em área endêmica de dengue, no estado do Rio de Janeiro. 1999. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.
- HOWE, G.M. A World geography of human diseases. **Academic Press**, Inc, New York, N.Y., 1977.
- HUBER, K. et al. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. **Mol. Ecol. Notes**, v.1, n.4, p.219-222, 2001.
- HUBER, K.; LOAN, L.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 microsatellites marker. **Heredity**, v. 89, p.7-14. 2002.
- HUBER, K. et al. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. **Acta Trop.**, v.90, n.1, p.23-29, 2004.
- HUBBY, J.L.; LEWONTIN, R.C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v.54, p.577-594, 1966.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=354850>>, acesso em: 16 de agosto de 2010.
- JACOBBS, M. Dengue: emergences a global public health problem and prospect for control. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicien and Hygiene**, v. 94, p. 7- 8, 1999.

- JENUTH, J.P.; PETERSON, A.C. F.U. K.; SHOUBRIDGE, E.A. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. **Nat. Genet.**, 14: 146-151, 1996.
- JOSHI, V.; SINGHI, M.; CHAUDHARY, R.C. Transovarial transmission of dengue 3 virus by *Aedes aegypti*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** n.90, p.643-644, 1996.
- KEYGHOBADI, N., et al. Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. **Mol. Ecol. Notes.**, v.4, p.20-22, 2004.
- KIKUNO, R. & MIYATA, T. Slowly evolving *Drosophila* mitochondrial genes. In: M. Nei (eds), **Mol. Evol. Genet.**, 1986.
- KIMURA, M. The Neutral Theory of Molecular Evolution. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1983.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, **Bioinformatics**, v.17, p.1244-1245, 2001.
- KUNO, G. Review of the factors modulating dengue transmission. **Epidemiol. Ver.**, v.17, n.2, 1995.
- LAREU, M.; PUENTE, J.; SOBRINO, B.; QUINTANS, B.; BRION, M.; CARRACEDO, A. The use of the LightCycler for the detection of Y chromosome SNPs, **Forensic Sci. Int.**, v.118, p.163- 168, 2001.
- LEFÈVRE, A.M.C. et al . Representações sobre dengue, seu vetor e ações de controle por moradores do município de São Sebastião, litoral Norte do Estado de São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 7, p.1696-1706, 2007.
- LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v.54, p.595-609, 1966.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. DnaSP v. 5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v.25, p.1451-1452, 2009.
- LINES, J.; HARPHAM, T.; LEAKE, C.; SCHOFIELD, C. Trends, priorities and policy directions in the control of vector-borne diseases in urban environments. **Health Policy Plann.**, v.9, p.113-129, 1994.

- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.98, p.43-54, 2002.
- LOZANO-FUENTES, S.; FERNANDEZ-SALAS, I.; MUNOZ, M.L.; GARCIA-REJON, J.; OLSON, K.E.; BEATY, B.J.; BLACK, W.C. The neovolcanic axis is a barrier to gene flow among *Aedes aegypti* populations in Mexico that differ in vector competence for dengue 2 virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n.6, p. 1-10, 2009.
- LOXDALE, H.D. & LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bull. Entomol. Res.**, n.88, p.577-600, 1998.
- LYNCH, M. & MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Mol. Ecol.**, v.3, p.91-99, 1994.
- MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.; TAKAKU, .L; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C.; CIRINO, V.C.B. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, n.5, v.33, p.521-522, 1999.
- MACORIS, M.L.G. et al. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 895-900, 2007.
- MALAVIGE, G.N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D.J.; SENEVIRATNE, S.L. Dengue Viral Infections. Postgrad. **Med. J.** n.80, p.588-601, 2004.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res.**, v. 27, p.209-220, 1967.
- MARIANO, F. A dengue: Considerações a respeito de sua incursão no Rio Grande do Sul, em 1916. **Arch. Bras. de Med.** p.272-277, 1917.
- MARQUES DOS SANTOS, V. et al. Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.45, n.2, p.99-101, 2003.
- MARTINEZ-TORRES, M. E. **Dengue hemorrágico em crianças: editorial.** Havana: José Martí, p.180, 1990.
- MATTINGLY, P.E. General aspects of the *Aedes aegypti* problem. In Taxonomy and Bionomics. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.51, p.392-408, 1957.

- MEDRONHO, R. A. A geografia do dengue no município do Rio de Janeiro: uma análise por geoprocessamento. Rio de Janeiro, 111p, 1993.
- MICHAELS, G.S.; HAUSWIRTH, W.W.; LAIPIS, P.J. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. **Dev. Biol.**, v.94, p.246-251, 1982.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório final de Reunião Técnica do Programa de Combate à Febre Amarela e Dengue. Brasília, 1991.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Séries históricas de agravos e doenças transmissíveis. **Inf. Epidemiol. SUS**, v.1, p.25, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Informe Epidemiológico da Dengue, semanas 1 a 52 de 2009., p. 1-28, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde divulga novo mapa de infestação pelo mosquito da dengue e lança campanha nacional de combate à doença. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11839>, Acesso em: 12 de novembro de 2010.
- MINISTÉRIO DO TURISMO. Portal Brasileiro do Turismo. Disponível em: <http://www.embratur.gov.br/site/pl/cidades/materia.php?id_cidade=8723®ioes=1022&estados=1245>, acesso em: 21 de outubro de 2010.
- MONATH, T. P. Yellow fever and dengue - the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. **Semin. Virol.**, v.5, p.133-145, 1994.
- MORENO, M. Genetic population structure of *Anopheles gambiae* in Equatorial Guinea. **Malaria J.**, v.6, p.137-147, 2007.
- MORLAIS, I. & SEVERSON, D.W. Intraspecific DNA variation in nuclear genes of the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, n.12, p.631-639, 2003.
- MORLAIS, I. et al. A targeted approach to the identification of candidate genes determining susceptibility to *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. **Mol. Genet. Genomics**, v.269, n.6, p.753-764, 2003.
- MORLAIS, I.; NICOLAS, P.; FREDERIC, S.; COHUET, A.; FONTENILLE, D. Intraspecific nucleotide variation in *Anopheles gambiae*: new insights into the biology of malaria vectors. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.71, n.1, p.795-802, 2004.

- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzymol.**, v.155, p.335-350, 1987.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, n.3, p.583-590, 1978.
- NOGUEIRA, R.M.R. et al. Virological study of a dengue type I epidemic at Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.83, p.219-25, 1988.
- NOGUEIRA, L.A.; GUSHI, L.T.; MIRANDA, J.E.; MADEIRA, N.G.; RIBOLLA, P.E.M. Application of an alternative *Aedes* species (DIPTERA: CULICIDAE) surveillance method in Botucatu city, São Paulo, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.73, n.2, p.309-311, 2005.
- NOVAIS, C.M. et al. PCR em tempo real. **Rev. Biotec. Ciência Des.**, n.33, p.10-13, 2004.
- OKIMOTO R. & DODGSON J. B. Improved PCR Amplification of Multiple Specific Alleles (PAMSA) Using Internally Mismatched Primers. **BioTechniques**, v.21, p.20-26, 1996.
- OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle. Genebra, 1987.
- ONOFRI, V.; ALESSANDRINI, F.; TURCHI, C.; PESARESI, M.; BUSCEMI, L.; TAGLIABRACCI, A. Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs. **Forensic Sci. Int.** v.157, p. 23-35, 2006.
- OPAS - Organización Panamericana de La Salud. El dengue y la fiebre hemorrágica de dengue em las Américas: una visión general Del problema. **Bol. Epidemiol.**, v.13, n.1, p.9-10, 1992.
- OSANAI, C.H. A epidemia de dengue em Boa Vista, Território Federal de Roraima, 1981-1982. 1984. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro.
- PADUAN, K.S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.P.; RIBOLLA, P.E.M. Genetic and variability in geographical populations of *Aedes aegypti* in Brazil elucidated by molecular markers. **Genet. Mol. Biol.**, v.29, n.2, p.391-395, 2006.
- PADUAN, K.S.; RIBOLLA, P.E.M. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v.45, n.1, p.59-67, 2008.

- PADUAN, K.S. Desenvolvimento de marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) para estudos populacionais do mosquito *Aedes aegypti* no Brasil. 2008. Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu-SP.
- PADUAN, K.S.; RIBOLLA, P.E.M. Characterisation of 8 single nucleotide polymorphism markers in *Aedes aegypti*. **Mol Ecol. Notes**, v. 9, n.1, p. 114–116, 2009.
- PAHO - Pan American Health Organization. Number of reported cases of dengue & dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion), 2006.
- PASSOS, R.A.; MARQUES, G.R.A.M.; VOLTOLINI, J.C.; CONDINO, M.L.F. Dominância do *Aedes aegypti* sobre o *Aedes albopictus* no litoral sudeste do Brasil. **Rev. de Saúde Publ.**, v.36, n.6, p.729-734, 2003.
- PINHEIRO, F.P. & TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S. Febres hemorrágicas viróticas. Febre hemorrágica do dengue. In: **Tratado de Infectologia** (R. Veronesi & R. Focacia, org.), São Paulo: Editora Atheneu, p. 258-263 1996.
- PINHEIROS, P.P. Dengue in the Americas: 1980-1987. **Epidemiol. Bull.**, v.10, n.1, p.1-8, 1989.
- POWELL, J.R. & TABACHNICK, W.J. Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. **Science**, v.208, p. 1385-1387, 1980.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO SEBASTIÃO. Disponível em: <<http://www.santos.sp.gov.br>>, acesso em: 25 de outubro de 2010.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, n.2, p.945-959, 2000.
- REITER, P. & GUBLER, D.J. Surveillance and control of urban dengue vectors. In: Gubler DJ, Kuno G Editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever. New York: CAB International, p. 45-60, 1997.
- RIBEIRO, A.F. et al. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Rev. Saúde Pública**, v.40, n.4, p.671-676, 2006.
- RIGAU-PÉREZ, J.G. et al. The dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.64, n.1, p.67-74, 2001.
- RODERICK, G.K. Geographic structure of insect population: gene flow, phylogeography and their uses. **Ann. Rev. Entomol.**, v.41, p.325-352, 1996.

- ROSE, R. I. Pesticides and public health integrated methods of mosquito management. **Emerg. Inf. Dis.** v.7, p.17-23, 2001.
- ROSEN, L.; SHROYER, D.A.; TESH, R.B.; FREIER, J.E.; LIEN, J.C. Transovarial transmission for dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.32, n.5, p.1108-1119, 1983.
- ROSEN, L.; TESH, R.B.; LIEN, J.C.; CROSS, JH. Transovarial transmission of Japanese encephalitis virus by mosquitoes. **Science**, v.199, p. 909. 1978.
- RUDNICK, A. Dengue fever epidemiology in Malaysia 1901-1980. In: RUDNICK, A.; LIM, T.W. (Eds). Dengue Fever Studies in Malaysia, Bulletin. Kuala Lumpur: Institute of Medical Research, p.9-38, 1986.
- SAIKI, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.4839, p.487-491, 1988.
- SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v.4, p. 406-425, 1987.
- SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M.R.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.81, p.245-246, 1986.
- SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE (SMS) – Santos/SP. Doenças Endêmicas e Epidêmicas. Disponível em: <<http://www.santos.sp.gov.br/frame.php?pag=/saude/saude.php>>, acesso em: 04 de outubro de 2010.
- SESSIONS, O.M.; BARROWS, N.J.; SOUZA-NETO, J.A.; OBINSON, T.J.; HERSHEY, C.L.; RODGERS, M.A.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G.; YANG, P.L.; PEARSON, J.L.; GARCIA-BLANCO, M.A. Discovery of insect and human dengue virus host factors. **Nature**, v.458, n.23, p.1047-1050, 2009.
- SHEN, G.Q.; ABDULLAH, K.G.; WANG, Q.K. The TaqMan Method for SNP Genotyping **Methods Mol. Biol.**, v.578, p. 293-306, 2008.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v.139, p. 457-462, 1995.
- SLOSEK, J. *Aedes 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.

- SMITH, C.E.G. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.5, n.2, p.243-251, 1956.
- SOPER, F.L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.14, n.6, p.887-891, 1965.
- SYVANEN, A.C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.*, v.2, n.12, p.930-942, 2001.
- TABACHNICK, 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.
- TABACHNICK, W.J. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease. The yellow fever mosquito. **Am. Entomologist.**, v.37, n.1, p.14-24, 1991.
- TAJIMA, F. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v.123, p. 585-595, 1989.
- TAILLON-MILLER, P. et al. Overlapping genomic sequences: a treasure trove of single nucleotide polymorphisms. **Genome Res.**, v.8, n.7, p.748-754, 1998.
- TANG, J.; PRUESS, K.; CUPP, E.W., UNNASH, T.R. Molecular phylogeny and typing of blackflies (Diptera: *Simuliidae*) that serves as vectors of human or bovine onchocerciasis. **Med. Vet. Entomol.**, v.10, p. 228-234, 1996.
- TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle da dengue no Brasil. **Cad. de Saúde Públ.**, v.18, n.3, p.867-871, 2002.
- TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data: III. Cladogram estimation. **Genetics**, v.132, p.619-633, 1992.
- TEMPLETON, A. R. Using phylogeographic analyses analyses of gene trees to test species status and processes. **Molecular Ecol.**, v.10, p.779-791, 2001.
- TEIXEIRA, M.G. et al. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. Informe Epidemiológico do SUS, n.8, p.5-33, 1999.
- THOMPSON, J.D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v.25, n.24, p.4876-4882, 1997.
- TOWNSON, H. Esterase isozymes of individual *Aedes aegypti*. **Ann. Trop. Me. Parasit.**, v.63, n.4, p.413-418, 1969.

- URDANETA-MARQUEZ, L. et al. Genetic Relationships among *Aedes aegypti* Collections in Venezuela as Determined by Mitochondrial DNA Variation and Nuclear Single Nucleotide Polymorphisms. **AM. J. Trop. Med. Hyg.**, v.78, n.3, p. 479-491, 2008.
- VIVA SANTOS. Disponível em: <<http://www.vivasantos.com.br/03/03a.htm>>, acesso em: 10 de agosto de 2010.
- WALKER, E.D.; THIBAUT, A.R.; THELEN, A.P.; BULLARD, B.A.; HUANG, J.; ODIERE, M.R.; BAYOH, N.M.; WILKINS, E.E.; VULULE, J.M. Identification of field caught *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* by TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping. **Malar. J.**, v.6, n.23, p.1-9, 2007.
- WALLIS, G.P.; TABACHNICK, W.J.; POWELL, J.R. Macrogeographic genetic variation in a human commensal: *Aedes aegypti* the yellow fever mosquito. **Genetical Research**, v. 41, p. 241-258, 1983.
- WALLIS, G.P. & TABACHNICK, W.J. Genetic analysis of rock hole and domestic *Aedes aegypti* on Caribbean island of Anguilla. **J. Am. Moq. Control Assoc.**, v.6, p. 625-630, 1990.
- WALTON, C.; HANDLEY, J.M.; TUN-LIN, W. et al. Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. **Mol. Biol. Evol.**, v.17, p.962-974, 2000.
- WALTON, C. et al. Genetic population structure and introgression in *Anopheles dirus* mosquitoes in South-east Asia. **Mol. Ecol.**, v.10, n.3, p.569-580, 2001.
- WANG, J.; CHUANG, K.; AHLUWALIA M.; PATEL, S.; UMBLAS, N., MIREL, D.; HIGUCHI, R.; GERMER, S. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. **BioTechniques**, v.39, p.885-893, 2005
- 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. 1996. 337p.
- WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids. Res.**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

- WONDJI, C.S. et al. Identification and analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the mosquito *Anopheles funestus*, malaria vector. **BMC Genomics**, v.8, n.5, p.5-18, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2nd ed. Geneva: WHO. p.84, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. New edition, ed. Geneva: WHO; p.160, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Impact of Dengue. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>>, acesso em 09 de setembro de 2010.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evol.**, v.19, p. 395-420, 1965.
- YAKES, M.F.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94:514-519. 1997.
- ZHANG, D.X.; HEWITT, G.M. Molecular DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Mol. Ecol.**, v.12, n.3, p.563-584, 2003.