

**Universidade Federal de Sergipe
Pró-reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Biologia Parasitária**

**Variabilidade genética de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae) no estado de Sergipe**

Lizandra Makowski Steffler

**São Cristóvão
2012**

Lizandra Makowski Steffler

Variabilidade genética de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) no estado de Sergipe

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária na área de concentração Biologia Parasitária.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Roseli La Corte dos Santos

Co-orientador:

Prof.^o Dr.^o Silvio Santana Dolabella

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S817v Steffler, Lizandra Makowski
Variabilidade genética de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) no
Estado de Sergipe / Lizandra Makowski Steffler ; orientadora
Roseli La Corte dos Santos. – São Cristóvão, 2012.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Universidade
Federal de Sergipe, 2012.

1. *Aedes aegypti* – Sergipe. 2. Genética animal. 3. Genética
de populações. 4. Variação (Biologia) – Sergipe. I. Santos,
Roseli La Corte dos, orient. II. Título.

CDU 595.771(813.7)

Lizandra Makowski Steffler

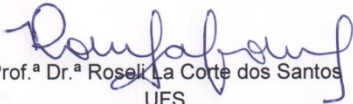
Variabilidade genética de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) no estado de Sergipe

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária na área de concentração Biologia Parasitária.

APROVADA em 30 de julho de 2012

Prof.^a. Dr.^a. Luciane Moreno Storti de Melo - UFS

Pro.^o. Dr.^o. Edilson Divino de Araujo - UFS


Prof.^a Dr.^a Roseli La Corte dos Santos
UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Roseli La Corte pela orientação dada em mais essa etapa, pela confiança, pela compreensão e por contribuir para meu crescimento científico.

Ao professor Silvio Dolabella pela co-orientação e por todo acompanhamento e trabalho conjunto nos experimentos.

À professora Luciene Barbosa por aceitar que eu realizasse meu tirocínio docente em sua disciplina e por todo apoio e carinho durante nossa convivência.

Ao professor Paulo Ribolla por abrir seu laboratório no Departamento de Parasitologia no Instituto de Biociências - UNESP para a realização de parte de nosso trabalho, nos recebendo com muito carinho e dedicação. À sua aluna Carine Spenassatto pela colaboração na prática e análise da técnica SNP, sendo muito atenciosa com minhas dúvidas.

Ao professor Edilson Divino por colaborar com a análise dos dados de ISSR, pela paciência e por todas as explicações dadas durante as reuniões.

Ao professor Leandro Cardamone por ceder espaço e equipamento para quantificações de DNA na Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju-SE).

À Secretaria Estadual de Saúde de Sergipe e Secretarias Municipais de Saúde das cidades onde coletamos as amostras pelo auxílio no processo de instalação das armadilhas.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Letícia, Lynna, Túlio, Jonathas, Juci, Thales, Helaina, Ranna, Mássia, Danilo e Dhanylle pela manutenção do insetário, pela ajuda no trabalho de campo e pela companhia com boas conversas e lanchinhos, sentirei muita falta dessa rotina.

Às técnicas Lenuce e Dani por atenderem meus pedidos de ajuda.

Aos colegas do Mestrado, pelo companheirismo nos estudos e discussões de artigos, partilhamos alegrias de tarefas cumpridas e o desespero diante dos prazos se encerrando. Agradeço em especial aos colegas Ricardo Vieira pela paciência e ensinamento de biologia molecular dado durante meus experimentos, Márcio pela companhia, carinho, bom humor (menos quando estava com fome) e à Paty que se tornou uma irmã, dividindo seu cantinho comigo, pelas comidinhas, vinhos, risadas, choros, pedaladas, por tudo, muito obrigada!

À minha família por compreender minha ausência, pela torcida e pelo orgulho que sente de mim.

Ao Roberto pelo amor, apoio e incentivo para meu crescimento pessoal e profissional.

Enfim, agradeço a todos os amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Área de estudo	11
3.2. Obtenção dos ovos	13
3.3. Estabelecimento das colônias	14
3.4. Avaliação do polimorfismo genético	14
3.4.1. Extração de DNA	14
3.4.2. Marcador molecular ISSR	15
3.4.2.1. PCR	15
3.4.2.2. Eletroforese	16
3.4.2.3. Análise dos dados de ISSR	16
3.4.3. Marcador molecular SNP	17
3.4.3.1. PCR	17
3.4.3.2. Análise dos dados de SNP	19
4. RESULTADOS	21
4.1. Obtenção dos ovos	21
4.2. Avaliação do polimorfismo genético	22
4.2.1. Extração de DNA	22
4.2.2. Marcador molecular ISSR	23
4.2.2.1. Seleção de bandas para a análise	23

4.2.2.2. Análise da estrutura genética populacional	24
4.2.3. Marcador molecular SNP	27
4.2.3.1. Caracterização de SNPs por metodologia TaqMan®	27
4.2.3.2. Frequência alélica	29
4.2.3.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	32
4.2.3.4. Análise da estrutura genética populacional	37
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa do estado de Sergipe dividido em territórios de planejamento. Os pontos representam os Municípios selecionados para o estudo. Fonte: CODISE – Companhia de Desenvolvimento Industrial do Estado de Sergipe.....	12
Figura 2	Seleção de bandas amplificadas dos géis analisados para os <i>primers</i> (CA) ₈ RY e (GA) ₈ RY com auxílio do <i>software</i> GelAnalyzer v. 2010a.....	23
Figura 3	Perfil de bandas amplificadas com marcador molecular ISSR para 20 amostras de <i>Ae. aegypti</i> da população de Pinhão. A: perfil de bandas para o iniciador (CA) ₈ RY. B: perfil de bandas para o iniciador (GA) ₈ RY. PM = peso molecular; pb = pares de base.....	24
Figura 4	Dendograma gerado pelo método UPGMA com a matriz de similaridade genética de pares de populações de <i>Ae. aegypti</i> analisadas pelo marcador molecular ISSR.....	25
Figura 5	Representação da discriminação alélica de ensaio TaqMan®. Cor azul●, alelos T/T; Cor vermelha●, alelos A/A; Cor verde●, ambos os alelos A/T; Cor preta■, controle negativo.....	27
Figura 6	Dados obtidos após a genotipagem das populações do mosquito <i>Ae. aegypti</i> para o gene <i>AelMUC1</i> , gerada automaticamente pelo <i>software</i> StepOne v. 2.1 (Applied Biosystems). A tabela apresenta todos os dados gerados no ensaio, como: posição da amostra, qualidade (%), discriminação dos alelos, entre outros.....	28
Figura 7	Planilha representativa da discriminação alélica (A , T , C e G) para os genes analisados, a qual apresenta o genótipo de cada indivíduo das populações do estudo.....	28
Figura 8	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 <i>software</i> <i>Convert</i>	28
Figura 9	Frequências alélicas dos nove SNPs estimados para as populações do estudo. Aju = Aracaju (Porto Dantas); Umb = Umbaúba; Pi = Pinhão; Ma = Maruim; Neo = Neópolis; Ca = Carira; CSF = Canindé de São Francisco.....	29
Figura 10	Resultado da análise de <i>clusters</i> . Cada um dos 140 indivíduos incluídos na análise é representado por uma linha vertical, dividida em duas cores. Estas cores representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos <i>clusters</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos e sondas utilizadas para genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em <i>Aedes aegypti</i> . Nucleotídeo destacado em vermelho indica o polimorfismo presente na sonda marcada com fluoróforo VIC™; o nucleotídeo marcado em azul indica o polimorfismo presente na sonda marcada com fluoróforo FAM™.....	18
Tabela 2	Positividade de armadilhas e total de ovos de <i>Aedes aegypti</i> coletados nos municípios sergipanos. Sergipe, 2012.....	21
Tabela 3	Variação mínima e máxima da concentração de DNA de <i>Aedes aegypti</i> para as populações dos municípios selecionados no estado de Sergipe, 2012.....	22
Tabela 4	Matriz de dissimilaridade genética das populações de <i>Aedes aegypti</i> calculado para a análise dos iniciadores (CA) ₈ RY e (CA) ₈ RY.....	25
Tabela 5	Comparação entre matrizes de distâncias genéticas, geográfica linear, geográfica rodoviária e número de habitantes, aplicando o teste de Mantel, utilizando 5000 permutações.....	26
Tabela 6	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de <i>Fis</i> (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de Aracaju (Porto Dantas).....	33
Tabela 7	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de <i>Fis</i> (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de Umbaúba.....	34
Tabela 8	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de <i>Fis</i> (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de Pinhão.....	34
Tabela 9	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de <i>Fis</i> (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de Maruim.....	35
Tabela 10	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de <i>Fis</i> (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de Neópolis.....	35

Tabela 11	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de <i>F_{is}</i> (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de Carira.....	36
Tabela 12	Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de <i>F_{is}</i> (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de <i>Aedes aegypti</i> de Canindé de São Francisco.....	36
Tabela 13	Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos marcadores SNPs entre populações de <i>Aedes aegypti</i> , sem agrupamento.....	37
Tabela 14	Matriz de diferenciação genética (<i>F_{ST} pairwise</i>) das populações de <i>Aedes aegypti</i> calculado por meio da análise de nove SNPs de genes nucleares.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMOVA** – Análise da variância molecular
- DENV (dengue vírus)** – vírus Dengue
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- Equilíbrio HW** – equilíbrio de Hardy-Weinberg
- Fis** – coeficiente de endogamia
- F_{ST}** – índice de fixação
- F_{ST} pairwise** – índice de fixação entre os pares de populações
- Gene apoLP-II** – Apolipoporphin II
- Gene Chym** – Chymiotrypsin
- Gene CYP9J2** – Citocrome P450
- Gene Ef-2** – Elongation Factor 2
- Gene FerH** – Ferritin heavy chain
- Gene MUCI** – Mucin-like protein
- Gene NaK** – Sodium/potassium channel
- Gene PGK** – Phosphoglycerate Kinase
- Gene Tsf** – Tranferrin
- HJ** – Hormônio juvenil
- ISSR** – inter- sequência simples repetida
- IP** – infestação predial
- LIRAA** – levantamento de índice rápido por infestação de *Aedes aegypti*
- PCR** – Reação em cadeia pela polimerase
- RAPD** – Polimorfismo de DNA amplificado randomicamente
- RFLP** – Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição
- RIDL (release of insect carrying a dominant lethal gene)** – liberação de insetos carregando um gene letal dominante
- RR** – razão de resistência
- SIT (sterile insect technique)** – técnica do inseto estéril
- SNP** – Polimorfismo de nucleotídeo único
- SSCP** – Polimorfismo de conformação de fita simples

RESUMO

STEFFLER, L. M. **Variabilidade genética de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) no estado de Sergipe**. 2012. 69f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2012.

Aedes aegypti é um importante vetor de graves arboviroses humanas como dengue, febre amarela e chikungunya em diversos países tropicais e subtropicais. O número de estudos envolvendo genética de população com *Ae. aegypti* vem crescendo nos últimos anos, sendo utilizados diversos marcadores moleculares para avaliar a variabilidade genética deste vetor. Entre os marcadores utilizados estão os ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) baseados na utilização de microssatélites como *primers* inespecíficos, e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) que detectam mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas. O objetivo do estudo foi determinar a variabilidade genética de populações de *Ae. aegypti* do estado de Sergipe por meio dos marcadores moleculares ISSR e SNP. Foram capturadas amostras do mosquito por meio de armadilhas ovitrampas de sete municípios sergipanos: Canindé de São Francisco, Carira, Pinhão, Neópolis, Maruim, Aracaju e Umbaúba. Para avaliação do polimorfismo genético foi extraído o DNA do mosquito adulto e amplificado com dois *primers* para ISSR e nove marcadores de SNP. Para o marcador ISSR a análise AMOVA resultou em 32% de variação genética entre as populações e 68% dentro das populações. O valor de ϕ_{ST} foi igual a 0,3225 indicando alta estruturação genética entre as populações. O dendograma gerado pelo método UPGMA agrupou as populações em dois *clusters* que apresentaram 61% de similaridade. O teste de Mantel por meio de correlação parcial entre as distâncias genética e rodoviária excluindo a interferência do tamanho da cidade foi significativo ($r = -0,5399$ e $p = 0,0359$), supondo a ocorrência de fluxo gênico entre as populações de *Ae. aegypti* de forma passiva pela ação humana. Para o marcador SNP a análise AMOVA revelou diferenciação genética entre as populações de $F_{ST} = 0,07354$ ($p < 0,01$) e diversidade genética entre as populações de 7,35%. A análise por meio do *software* Structure 2.3.1, evidenciou a existência de dois *clusters* baseados em semelhanças genotípicas. Por essa análise foi observada uma diferenciação genética entre populações localizadas no interior do estado e populações mais próximas do litoral. Ambos marcadores moleculares foram eficientes no estudo genético de populações naturais de *Ae. aegypti*, sendo possível diferenciar amostras numa escala geográfica entre 30km a 240km.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Variabilidade genética; ISSR; SNP.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Roseli La Corte dos Santos – UFS.

Co-orientador: Prof.^o Dr.^o Silvio Santana Dolabella – UFS.

ABSTRACT

STEFFLER, L. M. Genetic variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in the State of Sergipe. 2012. 69f. Dissertation (Master of Parasitic Biology) - Federal University of Sergipe, Sergipe, 2012.

Aedes aegypti is an important vector of human arboviruses as dengue, yellow fever and chikungunya in several tropical and subtropical countries. Studies of population genetic on *Ae. aegypti* has been growing in recent years and several molecular markers has been used to assess genetic variability of this vector. Among the molecular markers used is the ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) based on the use of nonspecific primers as microsatellites, and SNP (Single Nucleotide Polymorphism) that detect single base mutations in the chain of nitrogenous bases. The aim of this study was to determine the genetic variability in *Ae. aegypti* populations in the State of Sergipe through the molecular markers ISSR and SNP. Mosquito samples were caught using ovitraps in seven cities of Sergipe State: Canindé de São Francisco, Carira, Pinhão, Neópolis, Maruim, Aracaju and Umbaúba. DNA from adult mosquitoes was extracted and amplified with two ISSR primers and nine SNP markers. For ISSR marker analysis AMOVA resulted in 32% of genetic variation among populations and 68% within the population. The value of ϕ_{ST} was equal to 0.3225 indicating high genetic structure among populations. The dendrogram generated by UPGMA grouped the populations into two clusters that showed 61% similarity. The Mantel test by means of partial correlation between genetic distances and road excluding the interference of population size of the city was significant ($r = -0.5399$, $p = 0.0359$), assuming the occurrence of gene flow between *Ae. aegypti* populations passively by human action. For the marker SNP AMOVA analysis revealed genetic differentiation of $F_{ST} = 0.07354$ ($p < 0.01$) and genetic diversity of 7.35% among populations. The analysis, showed the existence of two clusters based on genotypic similarities. For this analysis we found genetic differentiation between populations located in the countryside and on the coast. Both markers were efficient for the genetic study of natural populations of *Ae. aegypti* and able to differentiate among samples on a geographic scale from 30km to 240km.

Keywords: *Aedes aegypti*, genetic variation; ISSR; SNP.

1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* é um importante vetor de graves arboviroses humanas como febre amarela, dengue e chikungunya em diversos países tropicais e subtropicais. É um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna que utiliza, preferencialmente, depósitos artificiais de água limpa para oviposição (TAUIL, 2002), já sendo observada a presença de ovos e larvas em recipientes com água salobra (RAMASAMY et al., 2011). As fêmeas necessitam de sangue como fonte de proteína para a oogênese, alimentando-se de vários hospedeiros humanos durante um único ciclo gonotrófico, aumentando tanto a probabilidade de serem infectadas como de disseminar o vírus (WEAVER e REISEN, 2010).

A interação dos fatores abióticos como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação estão diretamente relacionadas com a sobrevivência dos adultos e disponibilidades de sítios de oviposição (HEMME et al., 2010). A proliferação de *Ae. aegypti* também é auxiliada pela urbanização precária, quando a falta de serviços públicos de abastecimento hídrico proporciona o armazenamento de água em recipientes intradomiciliares e a falta de coleta de lixo resulta no acúmulo de resíduos capazes de armazenar água da chuva servindo assim de criadouro (WEAVER e REISEN, 2010). No Brasil, o vetor pode ser encontrado em todos os estados e o número de municípios nos quais tem sido verificada sua presença tem aumentado rapidamente, evidenciando dificuldades dos programas e ações de controle (SOUZA-SANTOS e CARVALHO, 2000).

Ae. aegypti é o vetor primário da dengue, a arbovirose mais comum e significativa no mundo. O agente etiológico da doença é o vírus pertencente ao gênero *Flavivirus* que apresenta quatro sorotipos distintos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), não conferindo imunidade cruzada ao hospedeiro. A infecção pode se apresentar de forma assintomática; clássica, com febre aguda; febre hemorrágica, apresentando sangramentos espontâneos; ou como síndrome de

choque por dengue, caracterizada pela falência circulatória (SOUZA, 2008). Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco de transmissão de dengue, com incidência anual de cerca de 50 a 100 milhões de casos, incluindo 500.000 casos de febre hemorrágica e 22.000 mortes, principalmente crianças (CDC, 2012). Com o aumento da frequência de epidemias de dengue nas últimas décadas e o risco da reurbanização da febre amarela, são necessárias medidas mais efetivas pelo serviço de saúde pública do Brasil, para enfrentar os complexos aspectos ecológico-epidemiológicos do vetor (LIMA et al., 2006).

No Brasil circulam os quatro sorotipos da dengue. Nos últimos 20 anos o país passou por quatro grandes epidemias associadas à mudança do sorotipo viral predominante: 1998 – DENV 1; 2002 – DENV 3; 2008 – DENV 2; 2010 – DENV 1 (MS, 2012). Em 2008 foi isolado o sorotipo DENV 4 no estado do Amazonas, sendo o primeiro estudo a isolar o vírus após 25 anos do seu primeiro relato, no estado de Roraima em 1982 (FIGUEIREDO et al., 2008). Em 2012, os sorotipos DENV 1 e DENV 4 foram os mais comuns, com 59,3% e 36,4% respectivamente, de 2.098 amostras positivas avaliadas. No entanto, essa distribuição apresenta variações no percentual de predomínio do sorotipo circulante entre as cinco regiões brasileiras: Norte (85,5% - DENV 4); Nordeste (81,5% - DENV 4); Centro-Oeste (53,3% - DENV 1); Sul (83,8% - DENV 1); Sudeste (49,7% - DENV 4) (SVS, 2012).

O Brasil registrou queda de 62% nos casos de dengue no início de 2012 quando comparado ao mesmo período do ano anterior (01 de janeiro a 11 de fevereiro), e diminuição de 86% nos casos graves – que passaram de 1.345 (2011) para 183 (2012) - e de 66% nos óbitos, que reduziram de 95 (2011) para 32 (2012). Porém, o Levantamento de Infestação de *Aedes aegypti* (LIRAA 2012) mostrou que 356 municípios têm alta presença do mosquito, sendo 91 classificados em situação de risco de surto, dos quais dois municípios são sergipanos (SVS, 2012a). Também foi observado aumento na incidência de casos de dengue em alguns estados como Sergipe, Tocantins, Mato Grosso do Sul e Pernambuco. Em Sergipe a incidência de casos de dengue por 100 mil habitantes aumentou de 11,0 (2011) para 36,3 (2012) (SVS, 2012a). No atual ano Sergipe

registrou em janeiro 53,09 casos de dengue para cada 100 mil habitantes; em fevereiro foram 62,38; em março 76,01; e abril 37,28 (SES/SE, 2012a).

O vírus chikungunya pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus* foi isolado pela primeira vez na Tanzânia, em 1953 (KULARATNE et al., 2012). Os sintomas gerais são febre, dor de cabeça, náuseas, vômitos, mialgia, erupção cutânea, e grave artralgia. Pelo fato de apresentar sintomas parecidos e ocorrer em regiões endêmicas de dengue, possivelmente tem ocorrido um subdiagnóstico da doença causada pelo vírus chikungunya, subestimando uma importante arbovirose (WEAVER e REISEN, 2010). Diversos surtos têm ocorrido em regiões da África e Ásia, sendo relatada uma epidemia na Índia em 2006 onde foram notificados mais de 1,39 milhão de casos suspeitos de chikungunya, afetando 210 municípios em 13 estados (NAGPAL et al., 2012). No Brasil não há registro da circulação do vírus chikungunya, sendo relatados apenas três casos importados (MS, 2010a; ALBUQUERQUE et al. 2012).

Existe uma vacina eficaz para a febre amarela, porém não se dispõem de vacina nem antivirais para o combate à dengue e ao chikungunya, sendo o vetor o elo vulnerável da cadeia epidemiológica. Sendo assim, o controle está centrado na redução da densidade vetorial, baseado em medidas como manejo ambiental, saneamento básico, coleta de resíduos sólidos, participação comunitária a fim de evitar a infestação domiciliar e o uso excessivo de produtos químicos (SVS, 2009).

No Brasil, os programas de controle de *Ae. aegypti* utilizam principalmente inseticidas químicos, nos quais se destacam os larvicidas organofosforados, como o temephos, e os piretróides cipermetrina e deltametrina, utilizados no controle das formas adultas. É necessário o monitoramento desses produtos químicos, pois o uso contínuo pode desencadear a resistência do vetor, o que favorece o aumento da população vetorial resultando no acréscimo dos casos de dengue (LUNA et al., 2004; LIMA et al., 2006; BRAGA e VALLE, 2007). Na perspectiva de alternativas de controle de mosquitos, pode-se citar, além do methoprene, um dos mais antigos análogos de hormônio juvenil desenvolvidos, o pyriproxifen, também quimicamente relacionado ao hormônio juvenil natural (HJ), de grande eficácia. Existem outros compostos, os inibidores da síntese de quitina, que, apesar de não

quimicamente relacionados ao HJ, produzem efeitos similares. Os mais conhecidos são o diflubenzuron e o triflumuron, que atuam sobre as larvas ocasionando sua morte durante a ecdise (BRAGA e VALLE, 2007).

Com a detecção de resistência a produtos químicos e o conhecimento genético de vetores de doenças, estão sendo desenvolvidas novas estratégias, como exemplo, o controle genético baseada na técnica do inseto estéril. Uma delas consiste na liberação de machos esterilizados por radiação (*sterile insect technique* - SIT), a outra, na integração de um gene letal dominante associado a um promotor específico de fêmeas imaturas (*release of insect carrying a dominant lethal gene* – RIDL). Entre as vantagens sobre outras técnicas biológicas e químicas de controle de vetores estão: alta especificidade, não prejudicial ao meio ambiente, baixo custo de produção e alta eficácia, podendo vir a ser uma importante ferramenta do manejo integrado de vetores (WILKE et al., 2009).

O mosquito adulto voa distâncias aproximadas de 100 metros (HONÓRIO et al., 2003), sendo que em ambientes urbanos, manipulações antropogênicas podem resultar na fragmentação do habitat, atuando como barreiras significativas para migração do mosquito e, assim, influenciar na dispersão do vetor. Esse fato pode afetar o fluxo de genes relacionados à competência vetorial e à resistência aos inseticidas (HEMME et al., 2010).

A conclusão do projeto genoma de *Ae. aegypti* (NENE et al., 2007), tem auxiliado os estudos moleculares com o objetivo de ampliar a compreensão da biologia do mosquito. Tais estudos podem vir a identificar novos alvos de controle populacional do vetor, como o desenvolvimento de estratégias para introdução de características refratárias em populações naturais (CATTERUCCIA, 2007). A caracterização detalhada do desenvolvimento do mosquito e o conhecimento de genes relacionados à regulação desse processo, assim como a identificação de genes envolvidos na busca por repasto sanguíneo, na digestão, na reprodução, na susceptibilidade/refratariedade a agentes patogênicos e resistência a inseticidas podem auxiliar na obtenção de novas abordagens para o controle de doenças transmitidas por mosquitos (CHEN et al., 2008; CLEMONS et al., 2010).

O número de estudos envolvendo genética de população com *Ae. aegypti* vem crescendo nos últimos anos. Diversos marcadores moleculares podem ser empregados no estudo da variabilidade genética deste vetor. Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular advindo de um gene expresso ou de uma sequência de DNA, correspondente a uma região codificante ou não (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O desenvolvimento de marcadores genéticos para *Ae. aegypti* tem facilitado o acompanhamento de grupos de genes ou de segmentos do genoma relacionados a um fenótipo de interesse. Nos últimos anos, estudos genéticos com *Ae. aegypti* baseados em tecnologia de marcadores como isoenzimas, Polimorfismo de DNA amplificado Randomicamente (RAPD), Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP), Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP), Polimorfismo de Único Nucleotídeo (SNPs) e Microssatélites resultaram na construção de mapas genéticos (CLEMONS et al., 2010).

Os microssatélites, também chamados de SSR (Repetições de Sequências Simples), foram isolados e descritos, simultaneamente por três grupos de cientistas, como pequenas sequências repetidas em tandem com um a quatro nucleotídeos (LITT e LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER e MAY, 1989). São tipicamente de natureza co-dominante, possuem riquezas de alelos por loco, alta heterozigosidade, e elevado conteúdo informativo (LEOI, 2003). O alto nível de polimorfismo em seus locos (LITT e LUTY, 1989; TAUTZ, 1989; WEBER e MAY, 1989), proporciona sua utilização em diversos tipos de estudos populacionais, permitindo analisar desde indivíduos até espécies relacionadas (BRONW et al., 1996).

As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Quando os microssatélites são individualmente amplificados, usando o par de *primers* complementar às sequências únicas que os flanqueiam quase que invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho. Esta variação nos tamanhos dos produtos de PCR é consequência da ocorrência de diferentes

números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; McCOUCH et al., 1997; CREGAN et al., 1999; ASHKENAZI et al., 2001).

Apesar do esforço na descoberta de novos *loci* polimórficos, um número limitado tem sido identificado para mosquitos da espécie *Ae. aegypti* (HUBER et al., 2001; CHAMBERS et al., 2007; SLOTMAN et al., 2007; LOVIN et al., 2009). As pesquisas por novos *loci* de microssatélites em *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, demonstraram que microssatélites parecem ser mais abundantes, em termos de percentual de frequência no genoma, em *An. gambiae* (0.75%) do que nas demais espécies, sendo que *Ae. aegypti* (0.109%) possui o menor percentual (HICKNER et al., 2010).

Costa-Ribeiro et al. (2006) testaram marcadores microssatélites 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. Microssatélites *loci* específicos também se revelaram úteis para detectar diferenciação genética em amostras dos cinco continentes do mundo, porém foi necessária a utilização de 12 *loci* polimórficos para diferenciar populações do mosquito em localidades da África de populações fora da África (BROWN et al., 2011).

A utilidade dos microssatélites para identificar diferenças entre populações de *Ae. aegypti* em escala microgeográfica e para avaliar a variação temporal de populações do vetor foi demonstrada em estudo realizado na Costa do Marfim, no entanto alguns *loci* mostraram baixo polimorfismo e em parte de uma população do estudo não houve amplificação de bandas com a utilização de um *primer* específico (RAVEL et al., 2002). Também foi possível observar variação genética entre as subespécies de *Ae. aegypti* no Senegal com a utilização de oito *loci* específicos de microssatélites, embora eles não tenham sido suficientes para detectar diferença genética entre larvas que apresentavam diferença morfológica e ecológica dependendo do sítio de criação (PAUPY et al., 2010). Estes mesmos oito *loci* específicos de microssatélites foram utilizados para avaliar a diversidade genética de populações de *Ae. aegypti* silvestres e domésticas no norte de

Senegal, constatando alto grau de variabilidade entre as populações silvestres, o que não foi observado entre as populações domésticas, indicando um fluxo gênico heterogêneo entre elas (PAUPY et al., 2008).

A aplicação de microssatélites como *primers* não específicos foi utilizada inicialmente por Meyer et al. (1993) para a diferenciação de cepas de fungos. Tal procedimento, entretanto, produziu um maior número de bandas que o esperado, provavelmente devido ao anelamento do iniciador em posições diferentes dentro das sequências repetidas. Zietkiewicz et al. (1994) contornaram esse problema ancorando repetições CA na extremidade 5' ou 3' do *primer*, reduzindo assim o número de possíveis alvos de anelamento e aumentando a especificidade. Os autores denominaram esta técnica de *Inter-Simple Sequence Repeat* -PCR (ISSR-PCR) e obtiveram excelentes resultados em uma variedade de eucariotos, principalmente com o *primer* (CA)₈RY, ancorado na extremidade 3', onde R é uma purina qualquer e Y uma pirimidina.

A técnica de ISSR-PCR possui característica dominante e amplifica regiões entre microssatélites, não impedindo que na região amplificada estejam inseridos alguns microssatélites. Duas características importantes são observadas na técnica ISSR-PCR: revela alto nível de polimorfismo, o que é particularmente importante para estudos intraespecíficos em pequena escala geográfica que visam identificar geneticamente diferentes populações de uma espécie; e elevada temperatura de anelamento dos *primers*, resultando em uma alta repetibilidade dos padrões obtidos (SOLIANI et al., 2010).

Estudos de variabilidade genética e identificação de cepas de protozoários e helmintos têm mostrado bons resultados por meio da técnica ISSR-PCR (VOLPINI et al., 2001; ANOU et al., 2002; FERREIRA et al., 2004), sendo uma alternativa para estudo de variabilidade genética com menor custo de trabalho que os microssatélites *loci* específicos (OLIVEIRA, 2010). Em geral, a eficiência do marcador molecular está associada ao polimorfismo detectado no conjunto analisado. A técnica ISSR-PCR aplicada com insetos *Mayetiola* exibiram alto polimorfismo quando comparados com a técnica RAPD e maior distância genética em comparação aos marcadores mitocondriais, fornecendo dados de uma alta

diversidade genética que pode ser investigada a nível inter ou intra- espécies (KHEMAKHEM et al., 2005).

O ISSR-PCR também se demonstrou útil em detectar maior distância genética em populações de mariposas com o aumento da altitude e distância geográfica (PRADEEP et al., 2011), assim como uma divisão de grupos genéticos associados a origem geográfica em espécies de cártamos (GOLKAR et al., 2011). Estudo com abelhas *Melipona quadrifasciata* indicaram que o marcador ISSR-PCR possui potencial para estudos de estruturação genética, embora os agrupamentos genéticos formados não correspondessem às características morfológicas, poderiam estar relacionados ao isolamento geográfico (NASCIMENTO et al., 2010). O marcador ISSR-PCR foi utilizado para analisar o nível de diferenciação genética e fluxo gênico de *Ae. aegypti* provenientes do Uruguai e nordeste da Argentina para identificar possíveis padrões de colonização, sendo o primeiro estudo a relatar o uso desse marcador para análise genética desse vetor. A técnica produziu padrões altamente polimórficos e repetíveis, capaz de diferenciar populações de escala geográfica pequena (SOLIANI et al., 2010).

Avanços tecnológicos recentes trouxeram metodologias de alto desempenho, baixo custo e mão de obra para prospecção, caracterização e genotipagem de marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Os marcadores SNP tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina (A), Citosina (C), Timina (T) e Guanina (G)). As mutações mais comuns são as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A/G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C/T). Menos frequentes, as transversões ocorrem quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (C/T - A/G). Normalmente, os marcadores SNP são bi-alelicos, pois geralmente são encontrados apenas dois variantes em uma espécie, como exemplo, um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um G/C.

Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada. São abundantes nos genomas de

espécies não endogâmicas e suas bases moleculares permitem que haja uma distribuição homogênea de SNPs pelo genoma (CAETANO, 2009). A procura de SNPs no genoma de *Ae. aegypti* indicou que a sua frequência varia conforme a função do gene, sendo observados mais SNPs em genes de expressão específica de algum tecido ou que estejam relacionados com a defesa contra parasito (MORLAIS e SEVERSON, 2003). Estudo realizado no Senegal para avaliar a competência vetorial, a distribuição das subespécies *Ae. aegypti aegypti* e *Ae. aegypti formosus* e a variabilidade genética por meio de marcadores SNP, demonstrou que este marcador revelou grande diferença na frequência alélica nas amostras coletadas. Pequena quantidade dessa variação (3,2%) podia ser atribuída à distância geográfica entre o sítio de coleta e a característica fitogeográfica da região em que as coletas foram realizadas, demais variações foram atribuídas ao ano de coleta, ao tipo de habitat, entre outros (SYLLA et al., 2009). Em estudo realizado para o mapeamento de regiões cromossômicas relacionadas com a variação fenotípica de características quantitativas denominadas QTL (*Quantitative trait loci*) relacionados com resistência à permetrina em populações de *Ae. aegypti*, foram identificados SNPs em 22 *loci* com potencial atividade de resistência, incluindo genes que codificam o citocromo P450s, esterases, ou glutathione transferase (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008). O sequenciamento de parte de sete genes de *Ae. aegypti* revelou a existência de 53 SNPs polimórficos, dos quais oito foram utilizados para delinear a estrutura populacional de três populações do mosquito, demonstrando ser um marcador bastante polimórfico e útil para o estudo (PADUAN e RIBOLLA, 2009).

A habilidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética. A informação da variação genética dentro e entre as populações é importante para compreender a história evolutiva de populações de mosquitos e da epidemiologia da doença (YAN et al., 1998). O estudo da estrutura genética da população é essencial para o entendimento da dinâmica das populações do *Ae. aegypti* e para a análise de fatores responsáveis pela resistência e adaptação ecológica (HIRAGI et al. 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- ✚ Determinar a variabilidade genética de populações de *Aedes aegypti* no Estado de Sergipe.

2.2. Objetivos específicos:

- ✚ Genotipar populações naturais de *Aedes aegypti* por meio de marcadores moleculares SNPs;
- ✚ Analisar a variabilidade genética e o fluxo gênico de populações naturais de *Aedes aegypti* por meio de marcadores moleculares ISSR e SNP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

O estudo foi realizado em Sergipe, abrangendo municípios de diferentes territórios do estado. Sergipe, apesar de ser o menor estado da federação brasileira, apresenta áreas com diferentes condições ambientais. A extensão territorial é de 21.918 Km², onde se encontram 2.068.017 habitantes (IBGE, 2010). O Estado de Sergipe está localizado nas coordenadas geográficas 9°31'S a 11°33'S e 36°25'W a 38°14'W. De acordo com Centro Meteorológico de Sergipe - CEMESE/ SEMARH - (2012), o estado encontra-se na faixa tropical e possui como problema climático a irregularidade espacial e temporal da distribuição da precipitação pluviométrica anual, sendo decrescente do litoral, onde atinge precipitação superior a 1600mm, em direção ao semi-árido, onde são registradas precipitações inferiores a 500mm. O período chuvoso no estado se concentra entre os meses de abril a agosto, com o máximo concentrado nos meses de maio, junho e julho.

O estado de Sergipe se encontra dividido em oito territórios de planejamento: Agreste Central, Alto Sertão, Médio Sertão, Baixo São Francisco, Centro Sul, Leste, Sul e Grande Aracaju. Foram colhidas amostras de mosquitos de sete municípios (Fig.1):

- Carira: localizada no agreste central, possui uma superfície territorial de 636,400 Km² e uma população estimada de 20.007 habitantes (IBGE, 2010).
- Pinhão: localizada no agreste central, possui uma superfície territorial de 155,887 Km² e uma população estimada de 5.973 habitantes (IBGE, 2010).
- Canindé de São Francisco: localizada no alto sertão, possui uma superfície territorial de 902,241 Km² e uma população estimada de 24.686 habitantes (IBGE, 2010).

- Neópolis: localizada no baixo São Francisco, possui uma superfície territorial de 265,951 Km² e uma população estimada de 18.506 habitantes (IBGE, 2010).
- Maruim: localizada na grande Aracaju, possui uma superfície territorial de 93,770 Km² e uma população estimada de 16.343 habitantes (IBGE, 2010).
- Aracaju: localizada na grande Aracaju, possui uma superfície territorial de 181,856 Km² e uma população estimada de 571.149 habitantes (IBGE, 2010).
- Umbaúba: localizada no sul do estado, possui uma superfície territorial de 121,100 Km² e uma população estimada de 22.434 habitantes (IBGE, 2010).



Figura 1: Mapa do estado de Sergipe dividido em territórios de planejamento. Os pontos representam os Municípios selecionados para o estudo. Fonte: CODISE – Companhia de Desenvolvimento Industrial do Estado de Sergipe.

A seleção dos municípios foi feita com a intenção de abranger a maior parte do estado considerando as diferentes regiões morfoclimáticas. A proximidade entre os municípios de Carira e Pinhão e entre Aracaju e Maruim servirão para observar se o marcador molecular escolhido é sensível o suficiente para diferenciar populações geograficamente próximas.

3.2. Obtenção dos ovos

A coleta de ovos foi realizada por meio de visitas aos municípios selecionados para instalação de armadilhas de oviposição, conhecidas no Brasil como ovitrampas. Cada município foi dividido em quadrantes, com instalação de armadilhas, de modo aleatório, para incluir áreas com diferentes níveis de infestação e emprego rotineiro de inseticidas. Por tratar-se de municípios pequenos (<50.000 imóveis), com exceção de Aracaju, foram instaladas 100 ovitrampas em cada município, sendo estabelecido que em uma quadra só devesse ter uma armadilha. No caso de Aracaju, a coleta envolveu a instalação de 30 ovitrampas no bairro Porto Dantas, local com monitoramento da resistência a inseticidas pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Sergipe desde 2007. As armadilhas permaneceram em campo por um período de até quatro semanas. Para aumentar o rendimento da ovitrampa foi utilizada infusão de gramíneas na água da armadilha. Após a instalação, as armadilhas foram monitoradas semanalmente. As palhetas foram retiradas e a solução da armadilha foi examinada e descartada para eliminar larvas que podiam ter eclodido, em caso de postura. As palhetas coletadas em campo foram levadas para o Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Sergipe e permaneceram em copos na posição vertical para secagem, à temperatura ambiente, e para garantir que o embrião completasse seu desenvolvimento. Após esse período foi realizada a contagem de ovos das palhetas, utilizando microscópio estereoscópico.

3.3. Estabelecimento das colônias

As criações das populações de *Ae. aegypti* foram realizadas no insetário do Laboratório de Parasitologia em ambiente climatizado com temperatura e umidade monitoradas (temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $80\% \pm 20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12hs).

Os ovos colhidos no campo foram postos para eclodir em bandejas brancas com as dimensões de 30cm x 20cm x 6cm. A alimentação das larvas foi feita diariamente com ração de gato triturada, devidamente pesada na proporção de 1 grama de ração para 1000 larvas. Ao atingir o estágio de pupa, estas foram transferidas para gaiolas de alumínio cuja dimensão é 40 cm x 40 cm x 40 cm, onde emergiram os adultos. Os adultos não foram alimentados nem com solução açucarada, nem com alimentação sanguínea para que não houvesse contaminação na etapa de extração de DNA. Após emergirem, os adultos foram aspirados e mortos à -20°C . Foram selecionadas 50 fêmeas de cada população e armazenadas em *eppendorf* com álcool 70% até a etapa de extração de DNA.

3.4. Avaliação do polimorfismo genético

3.4.1. Extração de DNA

Para cada município foram analisadas 20 fêmeas de *Ae. aegypti* da população selvagem, a qual foi gerada a partir de ovos coletados em campo, totalizando 140 indivíduos utilizados na avaliação da variabilidade genética por marcadores moleculares SNPs e ISSR.

Os DNAs genômicos foram extraídos conforme protocolo descrito por Ayres et al. (2002) com algumas modificações: insetos individuais foram macerados em 500 μl de tampão de lise (NaCl 5 M, Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0 e EDTA 0,5 M, pH 8,0), 3,6 μl de proteinase K (0,5mg/ml) e 60 μl de SDS 10%. O macerado foi incubado a 60°C por cinco horas. Após este tempo, foi adicionado 67 μl de NaCl 5M, a mistura foi colocada no vórtex por 30 segundos, seguida de

centrifugação a 14.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi retirado e colocado em um novo microtubo. O DNA foi precipitado do sobrenadante pela adição de igual volume de isopropanol, incubado a -20°C “*overnight*” e centrifugado a 14.000 rpm por 20 min. O *pellet* foi lavado com etanol 70%, centrifugado a 14.000 rpm por 10 min, seco e ressuspendido em 30 µl de TE (TRIS-EDTA, 10:1 mM). Após a extração, as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até sua utilização nas reações de PCR. As concentrações de DNA foram obtidas por análise espectrofotométrica em aparelho NanoDrop 2000C (*Thermo Scientific*) com leitura de densidade ótica de 260 e 280 nanômetros.

3.4.2. Marcador molecular ISSR

3.4.2.1. PCR

Para a técnica ISSR foram utilizados dois *primers* denominados (CA)₈RY e (GA)₈RY (Invitrogen) para avaliar o polimorfismo genético das populações. Os *primers* possuem uma purina (R) e pirimidina (Y) quaisquer ancorados na porção 3’.

O *premix* para PCR da técnica ISSR consistiu em uma reação de 15µL, contendo 50ng DNA genômico, tampão RB 10X (10mM Tris-HCL pH8.5, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂), 1,5u de *Taq polimerase* (5u/µL Invitrogen), 0,2mM de dNTPs, e 1µM dos *primers* (CA)₈RY ou (GA)₈RY. As misturas dos iniciadores foram incubadas em termociclador *Veriti 96 well thermal cycler* (Applied Biosystems) programado para três etapas: a primeira etapa de desnaturação a 95°C por 5min; a segunda etapa de 39 ciclos, consistindo cada ciclo de uma etapa de desnaturação a 95°C por 30s, de anelamento a 47,5°C para o *primer* (CA)₈RY e 45,2°C para o *primer* (GA)₈RY por 30s e de extensão a 72°C por 2min; e a terceira etapa de extensão final por 72°C por 5min.

3.4.2.2 Eletroforese

Quatro microlitros do produto de PCR homogeneizados com um microlitro de *blue juice* (Invitrogen) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE (Tris-borato de EDTA), utilizando brometo de etídio como corante para verificação do produto das amplificações. Os fragmentos amplificados foram comparados com o DNA *Ladder* de 1kb (Invitrogen) e visualizados por meio do transluminador.

3.4.2.3 Análise dos dados de ISSR

Os resultados obtidos foram analisados através da estatística multivariada. A seleção das bandas foi realizada com auxílio do programa GelAnalyser v. 2010a e computadas como 1 (presença) e 0 (ausência) em planilhas do Excel v. 2007. Cada banda foi considerada como um *loco*. Por meio do programa FAMD v. 1.25 (*Fingerprint Analysis with Missing Data*) foi realizada a análise da média de bandas por população, número de bandas polimórficas, análise da variância molecular (AMOVA) e gerada a matriz triangular de similaridade (S) genética entre os pares de populações que compõem a análise, a qual foi transformada em coeficiente de dissimilaridade (D) a partir de $D=1-S$, e usada para estimar a diversidade genética da população estudada. Com auxílio do *software* NTSYS v. 2.0 foi gerado o dendrograma com a matriz de similaridade pelo critério de SAHN (*Sequencial, Agglomerative, Hierarchic, Monoverlapping clustering methods*) e o método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*) (SNEATH e SOKALI, 1973), que não considera a estrutura de subdivisão do grupo, dando pesos iguais a cada indivíduo e recalculando a similaridade média de um indivíduo que se pretende juntar ao grupo pré-existente. Com o mesmo programa também foi calculada correlação cofenética (SOKAL e ROHLF, 1962), uma análise que estabelece uma correlação entre a matriz de similaridade (ou dissimilaridade) com o dendrograma gerado através desta, que pode ser empregada para verificar a confiabilidade das conclusões frente a interpretação dos dendrogramas. A correlação cofenética apresenta valores entre 0 e 1, assim, quanto mais próximo de um, menor será a distorção provocada pelo agrupamento

dos indivíduos pelo método UPGMA, sendo considerado significativo valores acima de 0,7. Pelo teste de Mantel, com 5.000 permutações, foram calculadas as correlações lineares simples (comparação entre duas matrizes) e as correlações parciais de primeira ordem (comparação de três matrizes, controlando-se o efeito de uma). A análise da correlação linear simples foi entre as matrizes de distâncias genéticas versus as matrizes de distâncias geográficas linear ou rodoviária. Para a análise da correlação parcial, foram utilizadas as matrizes já citadas e a matriz do número de habitantes de cada município analisado, a qual serviu para a análise da correlação parcial para controlar o efeito da influência da diferença do tamanho da população entre os municípios.

3.4.3. Marcador molecular SNP

3.4.3.1. PCR

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* (*Cytochrome P450*), *TSF* (*Transferrin*) e *Chym* (*Chymotrypsin*), que foram previamente selecionados para o estudo populacional do *Ae. aegypti* no Brasil (PADUAN e RIBOLLA, 2009) (Tab.1). Tais genes foram escolhidos por estarem espalhados no genoma do *Ae. aegypti*, na tentativa de se evitar a ligação genética, e por se mostrarem envolvidos em processos importantes como: digestão, resistência a inseticidas, susceptibilidade a patógenos, resposta imune, etc.

O DNA de cada mosquito foi submetido a 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), com o conjunto de reagentes *QuantiFast*

Tabela 1: Oligonucleotídeos e sondas utilizadas para genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em *Aedes aegypti*. Nucleotídeo destacado em vermelho indica o polimorfismo presente na sonda marcada com fluoróforo VIC™; o nucleotídeo marcado em azul indica o polimorfismo presente na sonda marcada com fluoróforo FAM™.

Gene	Oligonucleotídeo F (5' – 3')	Oligonucleotídeo R (5' - 3')	Sonda VIC™ (5' - 3')	Sonda FAM™ (5' - 3')
AelMUC1	AAGCCAGCGTTTGTGATTGG	GGCACAGAACTTCCACCACTA	CATCCGGCCA G CTC	CATCCGGCCA A CTC
apolLp-II	CCGGTGCCTCCGTTGAA	TTTGCGTCAGATACCTCCTTGTT	TTTGGCCAATCT A TACAAG	TTTGGCCAATCT C TACAAG
Ef2	TGTGCGTACAGACCGAAACC	ACAGCACCGGCTTGATACG	TTCGGC A ATGGCCT	TCGGC G ATGGCCT
Na/K	GCTACCGGAGTCGCCAAAA	GGGCAGAGGGAAGAAATGATAGTTT	CCCTCCAAC A TTAACA	CCCTCCAAC T TTAACA
PGK	TGATCATTGGAGGTGGAATGGC	GTCGAACAATGATCCTCCAATTTCC	AATACCTTAAGGA A CGTAAAT	CCTTAAGGA G CGTAAAT
Chym	CGAACAGCGTCGTTTGGTT	GGCAATGTCATCGGGACTGA	CGGAATTCATC A TCCAC	CGGAATTCATC G TCCAC
CYP9J2	GGTGTGTTGGCTGGAAGTGAAG	GCCAGTAGATAAACCCATTCCATCA	CTAGACCGAA A GCTTA	CTAGACCGAA G GCTTA
TSF	GGAAGTTACGCAGAGTTTGATCTTG	GCCCAGTACAAGGACGTGATC	AACGGACC C TCGCGCT	CGGACC G TCGCGCT
FerH	CCGTCGACAAGCACTTCAAG	AGGAGGATTTCTTCACCGATGTG	ACCGACTTAC A TAGTTC	ACCGACTTAC G TAGTTC

Probe PCR kit contendo: *Hot Start Taq Plus* DNA polimerase, *QuantiFast Probe PCR Buffer* (contendo Q-Bond, que confere a característica *fast* ao *master mix*), dNTPs, fluoróforo de referência passiva (ROX). O protocolo de reação utilizou 5µL de *QuantiFast Probe PCR kit*, 0,5µL 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 free *RNAse*, sendo 10µL o volume final.

As condições iniciais de amplificação foram 30s a 25°C (pré-leitura do equipamento); 3min a 95°C (ativação *Taq* DNA polimerase); 40 ciclos a 95°C por 3s (desnaturação), 60°C por 30s (anelamento/extensão); e uma etapa final de 25°C por 30s (leitura final do equipamento). A determinação dos alelos foi efetuada por meio do respectivo *software* da plataforma StepOnePlus™ v. 2.1 (Applied Biosystems), 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.

3.4.3.2. Análise dos dados de SNP

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). A verificação da frequência alélica, do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW), e da estrutura genética populacional (calculado empregando a análise da variância molecular - AMOVA) foi obtida por meio do programa Arlequin v. 3.1. A verificação do equilíbrio de HW foi realizada pela comparação da frequência observada dos genótipos com a frequência esperada em equilíbrio, que aplica o método de Guo e 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:

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

em que,

- Se existe um excesso de heterozigotos, então $Fis < 0$;
- Se existe um excesso de homozigotos, então $Fis > 0$.

As análises da estrutura populacional calculadas por AMOVA, conforme descrito por Excoffier e colaboradores (1992), 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 e Cockerham (1984). O F_{ST} (índice de fixação) é utilizado para estimar a extensão da diferenciação genética entre as populações ou subgrupos populacionais (agrupamentos). O índice F_{ST} entre pares de populações ($F_{ST} \text{ pairwise}$) também foi calculado, e pode ser utilizado como uma estimativa da distância genética entre elas. O valor de p igual a 0,05 foi adotado como limiar de significância para todos os testes estatísticos realizados.

O *software* Structure v. 2.3.1 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.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos ovos

A instalação das ovitrampas nos municípios sergipanos revelou a alta infestação pelo mosquito *Ae. aegypti* no estado, com a positividade das armadilhas chegando a 91% do total de armadilhas instaladas durante seu tempo máximo de permanência no campo. Verificou-se que cinco dos sete municípios analisados apresentaram percentual de armadilhas positivas superior a 50%, indicando alta infestação do vetor (Tab. 2).

Tabela 2: Positividade de armadilhas e total de ovos de *Aedes aegypti* coletados nos municípios sergipanos. Sergipe, 2012.

Município	Período de coleta	Armadilhas instaladas (nº)	Armadilhas positivas (%)	Total de ovos
Aracaju (P. Dantas)	Mar/2010	30	56	1.540
Neópolis	Mar/2010	100	28	2.801
Canindé de São Francisco	Jun/2010	100	51	2.302
Carira	Out/2010	100	80	6.161
Pinhão	Nov/2010	100	39	2.367
Maruim	Fev/2011	100	91	21.896
Umbaúba	Abr/2012	100	76	2.287

4.2. Avaliação do polimorfismo genético

4.2.1. Extração de DNA

Após a extração de DNA de cada população, as amostras foram quantificadas em duplicata por meio do NanoDrop 2000C (Thermo Scientific) e calculado o valor médio de concentração. A concentração de DNA apresentou valor mínimo de 40ng/μL para as populações de Maruim, Carira e Canindé de São Francisco e máximo de 410ng/μL para população de Aracaju (Porto Dantas) (Tab. 3).

Tabela 3: Variação mínima e máxima da concentração de DNA de *Aedes aegypti* para as populações dos municípios selecionados no estado de Sergipe, 2012.

População	Concentração de DNA (ng/ μL)	
	Mínimo	Máximo
Aracaju (P. Dantas)	130	410
Pinhão	90	330
Umbaúba	86	374
Neópolis	50	215
Carira	40	230
Maruim	40	150
Canindé de São Francisco	40	110

4.2.2. Marcador molecular ISSR

4.2.2.1. Seleção de bandas para análise

Por meio do *software* GelAnalyser v. 2010a foram analisados os géis e selecionadas as bandas que melhor amplificaram, seguindo o critério de selecionar as bandas que apresentavam um pico definido no gráfico representativo da imagem do gel (Fig. 2). Foram selecionadas 17 bandas para o *primer* (CA)₈RY, que variaram entre 450 a 2.230 pares de base (pb) e 13 bandas para o *primer* (GA)₈RY, que variaram de 350 a 1.700pb, resultando em 30 bandas selecionadas para a análise, das quais, 29 foram polimórficas. A banda monomórfica encontrada foi para o iniciador (CA)₈RY e apresentou peso molecular de 1200pb. A média de bandas encontradas por indivíduo variou de oito para a população de Maruim a 12,4 para a população de Aracaju (Porto Dantas). Exemplo do perfil de bandas amplificadas pelos *primers* (CA)₈RY e (GA)₈RY são demonstrados na figura 3.

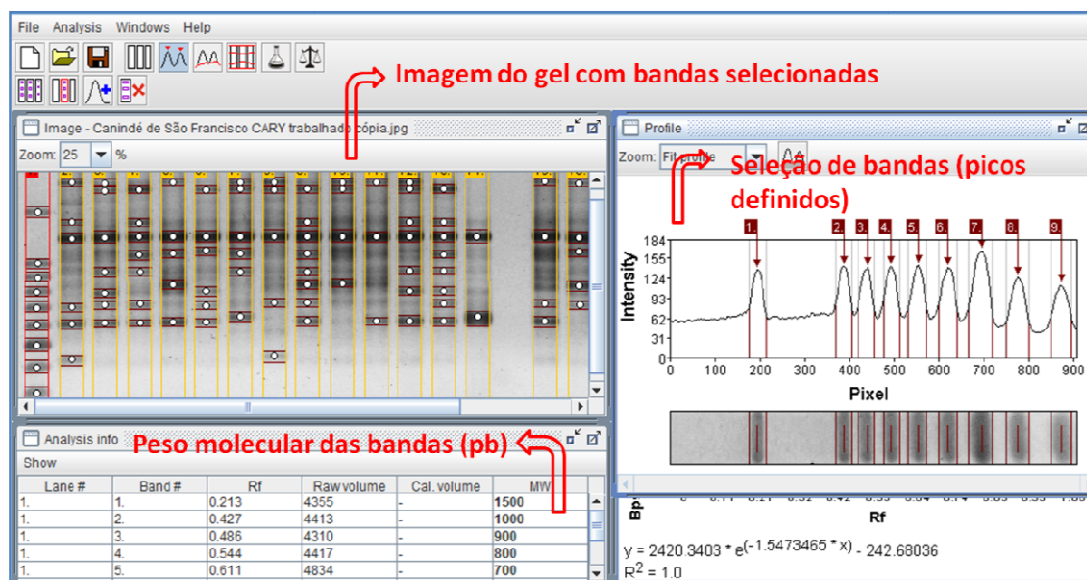


Figura 2: Seleção de bandas amplificadas dos géis analisados para os *primers* (CA)₈RY e (GA)₈RY com auxílio do *software* GelAnalyser v. 2010a.

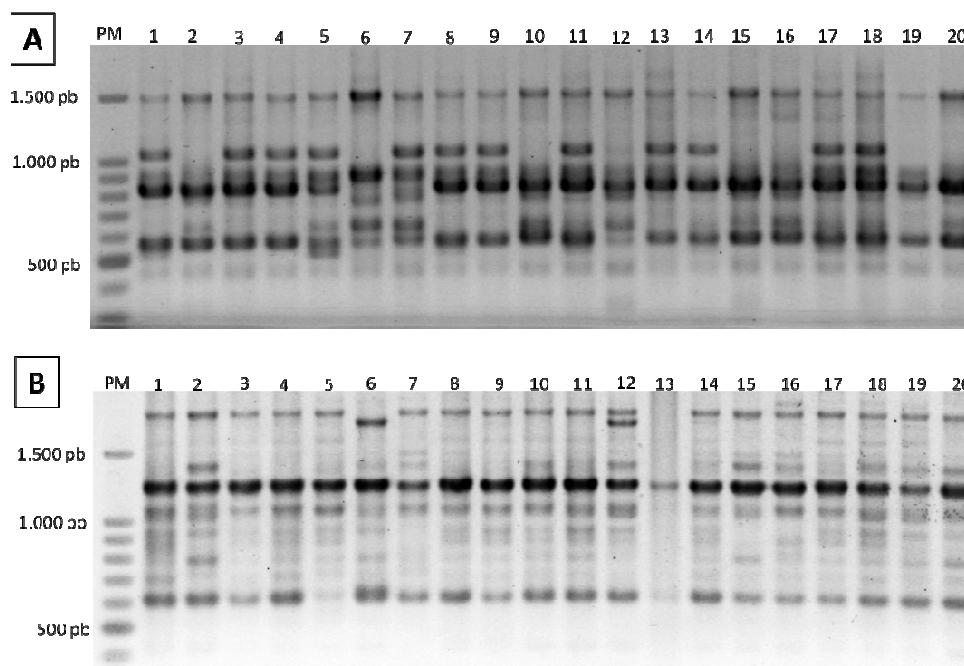


Figura 3: Perfil de bandas amplificadas com marcador molecular ISSR para 20 amostras de *Ae. aegypti* da população de Pinhão. **A:** perfil de bandas para o iniciador (GA)₈RY. **B:** perfil de bandas para o iniciador (CA)₈RY. PM = peso molecular; pb = pares de base.

4.2.2.2. Análise da estrutura genética populacional

Por meio da análise utilizando o teste AMOVA, verificou-se que do total de diversidade genética, 32% está entre as populações e 68% dentro da população, sendo o valor de *phiST* igual a 0,3225, indicando diferenciação genética entre as populações avaliadas. A matriz de dissimilaridade genética entre populações apresentou o menor valor (0.171) entre as populações de Canindé de São Francisco e Aracaju e um maior valor (0.490) entre as populações de Pinhão e Umbaúba, indicando maior diferença entre esses municípios. (Tab. 4)

Foi gerado o dendograma por meio do programa NTSYS v. 2.0 com a matriz de similaridade genética (Fig. 4) o qual separou as populações em dois grupos que compartilharam 61% de similaridade onde Pinhão está separado dos demais municípios. As populações de Canindé de São Francisco e Aracaju ficaram no mesmo ramo apresentando maior similaridade (83%) entre todas as localidades analisadas. Para o dendograma construído foi obtido um valor de correlação cofenética de 0,77, sendo aceitáveis valores acima de 0,7.

Tabela 4: Matriz de dissimilaridade genética das populações de *Aedes aegypti* calculado para a análise dos iniciadores (CA)₈RY e (GA)₈RY.

Populações	Canindé de São Francisco	Carira	Maruim	Pinhão	Aracaju	Neópolis	Umbaúba
Canindé de São Francisco	-						
Carira	0.274	-					
Maruim	0.217	0.389	-				
Pinhão	0.337	0.475	0.333	-			
Aracaju	0.171	0.331	0.279	0.427	-		
Neópolis	0.186	0.321	0.227	0.252	0.219	-	
Umbaúba	0.263	0.313	0.358	0.490	0.359	0.392	-

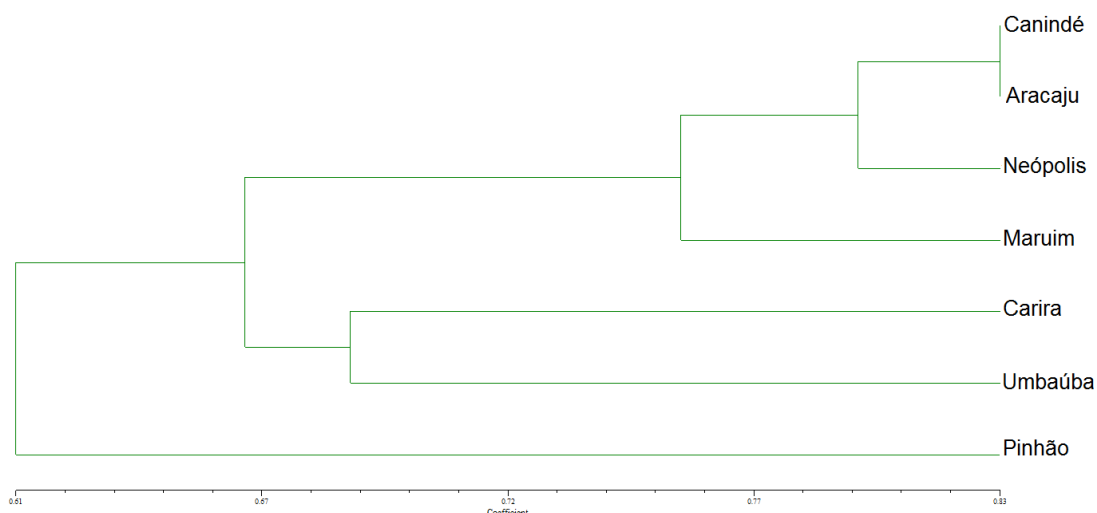


Figura 4: Dendrograma gerado pelo método UPGMA com a matriz de similaridade genética de pares de populações de *Ae. aegypti* analisadas pelo marcador molecular ISSR.

A análise da correlação linear simples pelo teste de Mantel entre as matrizes triangulares da distância genética (dissimilaridade) e da distância geográfica linear entre os municípios não foi significativa ($r = -0,4118$, $p > 0,05$), já

entre a distância genética e distância geográfica rodoviária foi considerada significativa ($r = -0,4941$, $p = 0,05$). As análises de correlação parcial, envolvendo três matrizes, possibilitam que o efeito de uma das matrizes seja controlado. Assim, foi possível isolar o efeito do tamanho da população dos municípios para uma melhor estimativa da correlação entre as matrizes da distância genética e distâncias geográficas (Tab. 5).

Tabela 5: Comparação entre matrizes de distâncias genéticas, geográfica linear, geográfica rodoviária e número de habitantes, aplicando o teste de Mantel, utilizando 5000 permutações.

Matrizes Comparadas	Efeito Controlado	r	p
Dist. Genética x Dist. Geográfica Linear (Dispersão Ativa)	Nenhum	- 0.41	0.079
Dist. Genética x Dist. Geográfica Rodoviária (Dispersão passiva)	Nenhum	-0.49	0.051
Dist. Genética x Dist. Geográfica linear – n° de hab.	Tamanho da população	-0.45	0.058
Dist. Genética x Dist. Geográfica rodoviária – n° de hab.	Tamanho da população	- 0.54	0.035

p: considerando a margem de erro de 5%

Desta forma, observa-se que parte do fluxo gênico entre as populações analisadas pode estar sendo realizado de forma passiva, provavelmente por meio de transporte de formas imaturas, já que apenas as correlações com a distância geográfica rodoviária apresentam-se significativa.

4.2.3. Marcador molecular SNPs

4.2.3.1. Caracterização de SNPs por metodologia TaqMan®

As reações com concentração de DNA de aproximadamente 30ng/μL e volume final de 10μL foram realizadas 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 (Fig. 5), os produtos foram então analisados através do sistema StepOnePlus™ v. 2.1 (Applied Biosystems).

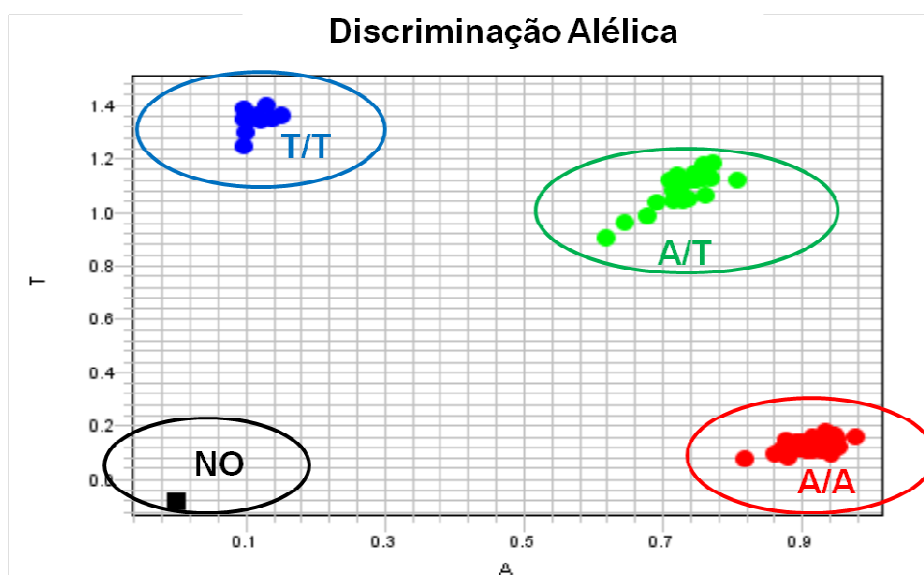


Figura 5: Representação da discriminação alélica de ensaio TaqMan®. Cor azul ●, alelos T/T; Cor vermelha ●, alelos A/A; Cor verde ●, ambos os alelos A/T; Cor preta ■, controle negativo.

Após a realização das leituras finais de cada ensaio os resultados foram gerados automaticamente em forma de uma tabela (Fig. 6). Tais resultados foram utilizados na construção de planilhas em formato *Excel* v. 2007 (Fig. 7 e 8), e então analisados em *softwares* específicos.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Block Type	96well										
2	Chemistry	TAQMAN										
3	Experiment	C:\Users\Silvio\Desktop\Lizandra\Lizandra - Placa I - Muc.eds										
4	Experiment	2012-04-15 04:36:11 AM BRT										
5	Instrument	steponeplus										
6	Passive Re	ROX										
7												
8	Well	Sample Name	SNP Assay Name	Task	Allele1 ΔR	Allele2 ΔR	Pass Ref	Quality(%)	Call	Method	Allele1 Automatic	Allele1 Ct
9	A1	Sample 1	MUC	UNKNOWN	-0,05195	8,864476	4143,944	99,73814	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,024667
10	A2	Sample 2	MUC	UNKNOWN	0,439461	5,21742	5449,545	99,39556	Heterozygous G/A	Auto	VERDADEIRO	0,024667
11	A3	Sample 3	MUC	UNKNOWN	0,401221	4,531677	5096,554	99,24747	Heterozygous G/A	Auto	VERDADEIRO	0,024667
12	A4	Sample 4	MUC	UNKNOWN	1,113584	8,17426	4731,551	99,48904	Heterozygous G/A	Auto	VERDADEIRO	0,024667
13	A5	Sample 5	MUC	UNKNOWN	1,044738	8,101314	5527,084	99,67035	Heterozygous G/A	Auto	VERDADEIRO	0,024667
14	A6	Sample 6	MUC	UNKNOWN	-0,03061	9,008843	5836,554	99,52121	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,024667
15	A7	Sample 7	MUC	UNKNOWN	1,117456	8,345072	4869,349	99,50514	Heterozygous G/A	Auto	VERDADEIRO	0,024667
16	A8	Sample 8	MUC	UNKNOWN	1,180582	8,425132	4909,973	99,3195	Heterozygous G/A	Auto	VERDADEIRO	0,024667
17	A9	Sample 9	MUC	UNKNOWN	1,910191	5,177822	4757,552	99,16082	Homozygous G/G	Auto	VERDADEIRO	0,024667
18	A10	Sample 10	MUC	UNKNOWN	-0,05369	6,619	5459,244	98,82906	Homozygous A/A	Auto	VERDADEIRO	0,024667
19	A11	Sample 11	MUC	UNKNOWN	0,005214	2,603513	5132,508	63,44926	Undetermined	Auto	VERDADEIRO	0,024667
20	A12	Sample 12	MUC	UNKNOWN	0,027464	2,923971	5593,339	64,07436	Undetermined	Auto	VERDADEIRO	0,024667

Figura 6: Dados obtidos após a genotipagem das populações do mosquito *Ae. aegypti* para o gene *AelMUC1*, gerada automaticamente pelo *software* StepOne v. 2.1(Applied Biosystems). A tabela apresenta todos os dados gerados no ensaio, como: posição da amostra, qualidade (%), discriminação dos alelos, entre outros.

Sondas	EF2	EF2	MUC	MUC	NAK	NAK	PGK	PGK	APOL	APOL	FERR	FERR	P450	P450	TSF	TSF	CHYM	CHYM
VIC/FAM	A/G	A/G	G/A	G/A	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
CANIN1	G	G	G	G	A	A	A	A	A	C	G	G	A	G	G	G	A	A
CANIN2	A	G	G	A	A	T	A	A	C	C	G	G	A	G	G	G	G	G
CANIN3	G	G	G	G	A	A	A	G	C	C	A	G	A	G	G	G	G	G
CANIN4	G	G	A	A	A	A	A	A	C	C	G	G	A	A	C	G	A	A
CANIN5	G	G	G	A	A	A	A	G	C	C	G	G	A	G	G	G	A	G
CANIN6	G	G	A	A	A	T	A	G	C	C	G	G	A	A	G	G	A	A
CANIN7	G	G	G	G	A	A	A	A	C	C	G	G	A	G	C	G	A	G
CANIN8	G	G	G	G	A	A	A	A	A	C	A	G	A	A	G	G	A	G
CANIN9	A	G	G	A	A	A	A	A	C	C	A	A	G	G	G	G	A	A
CANIN10	G	G	G	A	A	A	A	A	A	C	A	G	A	G	G	G	A	A
CANIN11	A	A	G	A	A	A	A	A	C	C	A	G	A	G	C	G	A	A
CANIN12	G	G	G	G	A	A	A	G	C	C	A	G	A	G	G	G	G	G
CANIN13	A	G	G	G	A	A	A	G	A	C	A	G	A	G	G	G	A	A
CANIN14	A	G	G	A	A	A	A	G	A	C	A	G	A	G	G	G	A	G
CANIN15	A	G	G	A	A	A	A	A	C	C	A	G	A	G	G	G	A	G
CANIN16	G	G	A	A	A	A	A	A	C	C	A	A	G	G	G	G	A	A
CANIN17	A	G	G	A	A	A	G	G	A	C	A	G	G	G	G	G	A	G
CANIN18	G	G	G	G	A	A	A	A	A	C	G	G	A	G	C	G	A	G
CANIN19	A	G	G	A	A	T	A	A	C	C	G	G	A	G	G	G	A	A
CANIN20	A	G	G	A	A	A	A	G	C	C	A	G	A	G	G	G	A	G

Figura 7: Planilha representativa da discriminação alélica (**A**, **T**, **C** e **G**) para os genes analisados, a qual apresenta o genótipo de cada indivíduo das populações do estudo.

Sondas	EF2	EF2	MUC	MUC	NAK	NAK	PGK	PGK	APOL	APOL	FERR	FERR	P450	P450	TSF	TSF	CHYM	CHYM
VIC/FAM	A/G	A/G	G/A	G/A	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
CANIN1	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	1	3	3	3	1	1
CANIN2	1	3	3	1	1	4	1	1	2	2	3	3	1	3	3	3	3	3
CANIN3	3	3	3	3	1	1	1	3	2	2	1	3	1	3	3	3	3	3
CANIN4	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	1	1	2	3	1	1
CANIN5	3	3	3	1	1	1	1	3	2	2	3	3	1	3	3	3	1	3
CANIN6	3	3	1	1	1	4	1	3	2	2	3	3	1	1	3	3	1	1
CANIN7	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	1	3	2	3	1	3
CANIN8	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	1	3	1	1	3	3	1	3
CANIN9	1	3	3	1	1	1	1	1	2	2	1	1	3	3	3	3	1	1
CANIN10	3	3	3	1	1	1	1	1	1	2	1	3	1	3	3	3	1	1
CANIN11	1	1	3	1	1	1	1	1	2	2	1	3	1	3	2	3	1	1
CANIN12	3	3	3	3	1	1	1	3	2	2	1	3	1	3	3	3	3	3
CANIN13	1	3	3	3	1	1	1	3	1	2	1	3	1	3	3	3	1	1
CANIN14	1	3	3	1	1	1	1	3	1	2	1	3	1	3	3	3	1	3
CANIN15	1	3	3	1	1	1	1	1	2	2	1	3	1	3	3	3	1	3
CANIN16	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	3	3	3	3	1	1
CANIN17	1	3	3	1	1	1	3	3	1	2	1	3	3	3	3	3	1	3
CANIN18	3	3	3	3	1	1	1	1	1	2	3	3	1	3	2	3	1	3
CANIN19	1	3	3	1	1	4	1	1	2	2	3	3	1	3	3	3	1	1
CANIN20	1	3	3	1	1	1	1	3	2	2	1	3	1	3	3	3	1	3

Figura 8: 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.

4.2.3.2. Frequência alélica

As populações apresentaram diferente proporção de alelos para os genes analisados, embora tenha sido observada frequência maior de um alelo sobre o outro para determinados genes. A população de Pinhão diferiu das demais populações apresentando maior frequência do alelo **A** para o gene *Ef-2*, assim como Umbaúba diferiu apresentando maior frequência de alelo **G** para o gene *Chym* do que as demais populações. Embora apresentassem homozigotos para ambos os alelos e heterozigotos na análise, as populações de Carira, Umbaúba e Canindé de São Francisco apresentaram igual proporção dos alelos para os genes *AelMUC1*, *apolP-II* e *CYP9J2* respectivamente. Também foi observado a existência de apenas homozigotos nas populações de Pinhão para o gene *Na/K*, Carira para o gene *PGK* e Neópolis para o gene *FerH*. (Fig. 9)

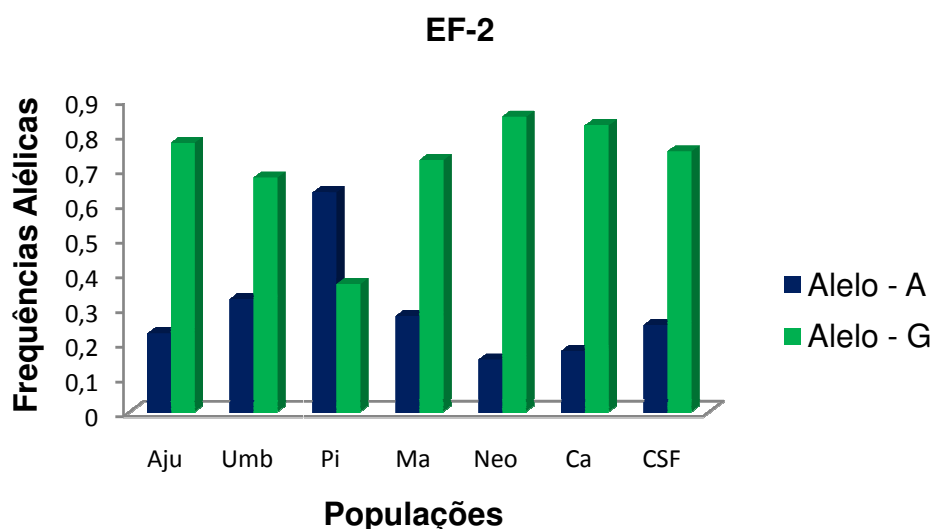


Figura 9: Frequências alélicas dos nove SNPs estimados para as populações do estudo. Aju = Aracaju (Porto Dantas); Umb = Umbaúba; Pi = Pinhão; Ma = Maruim; Neo = Neópolis; Ca = Carira; CSF = Canindé de São Francisco. (Continua)

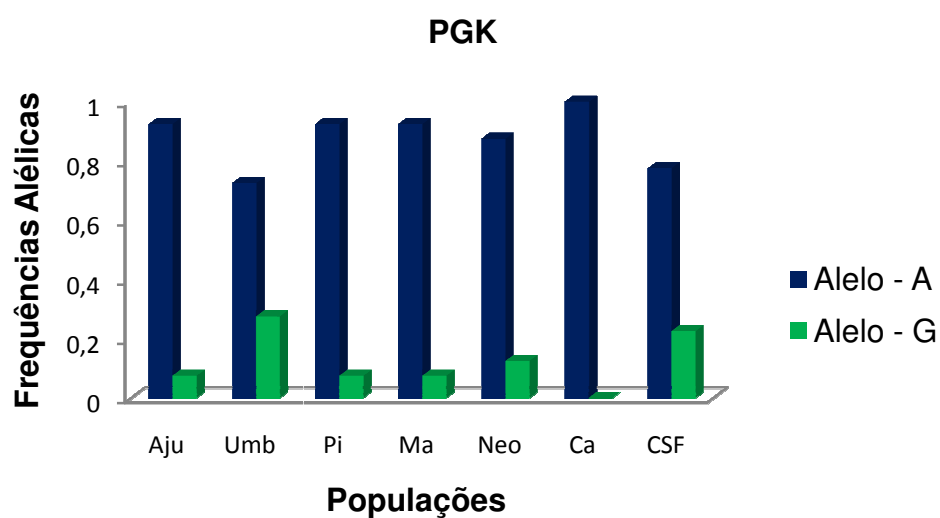
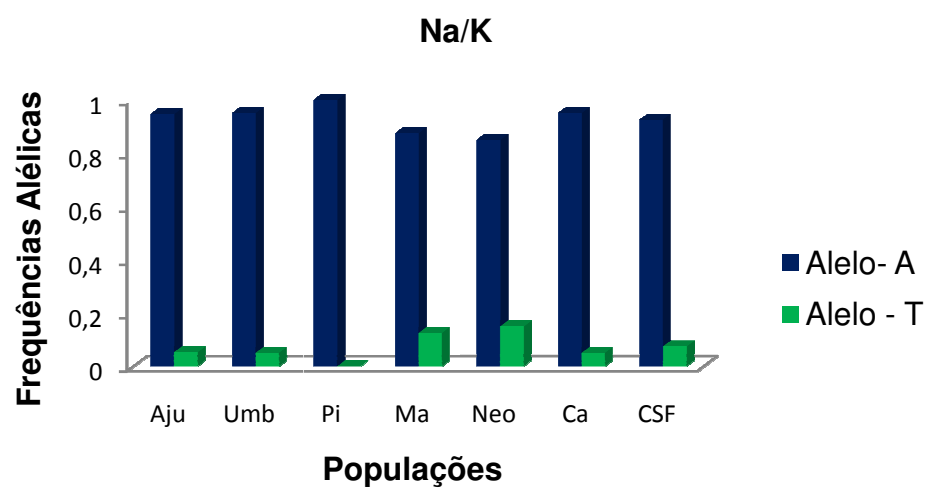
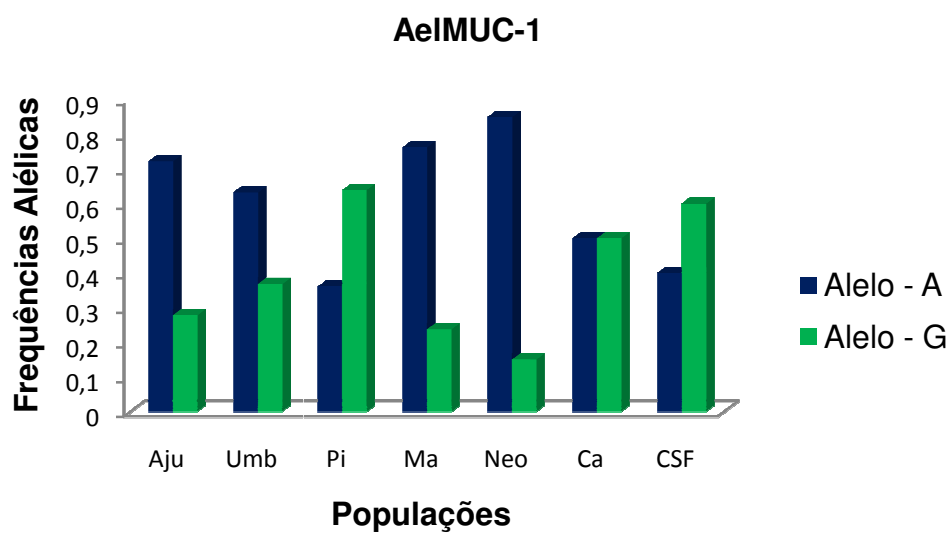


Figura 9: (continuação)

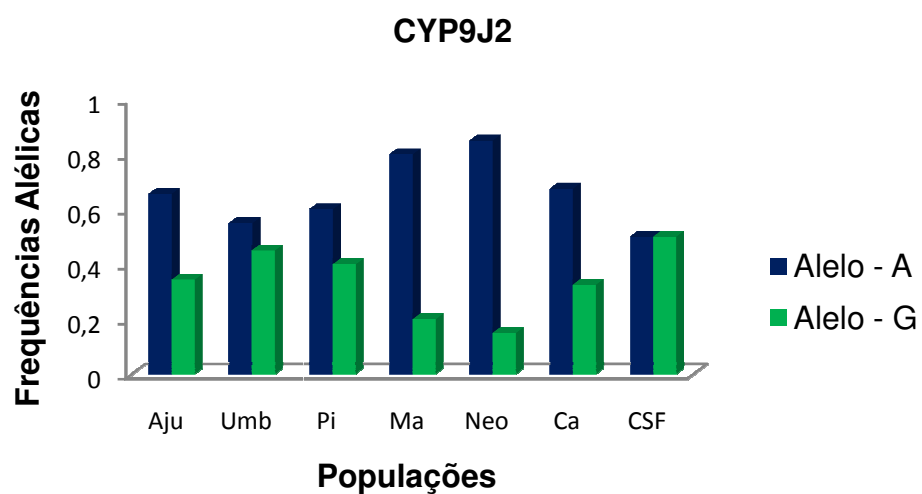
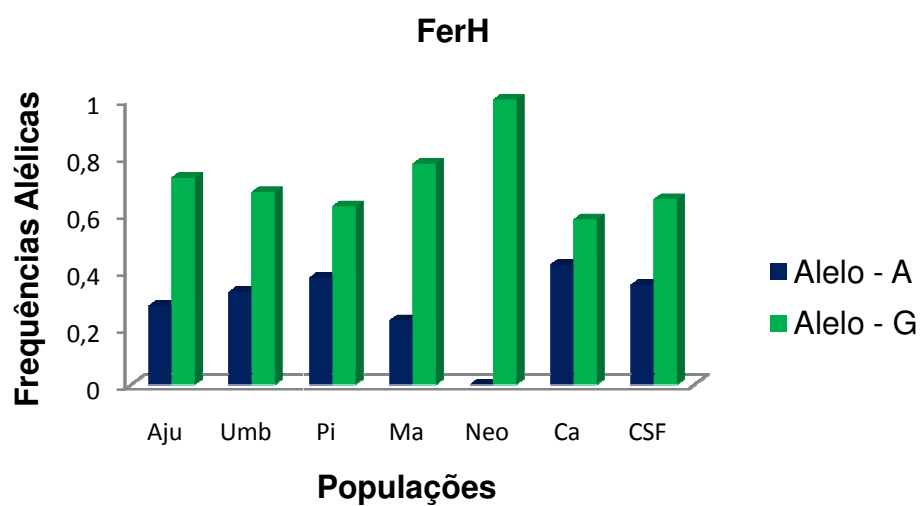
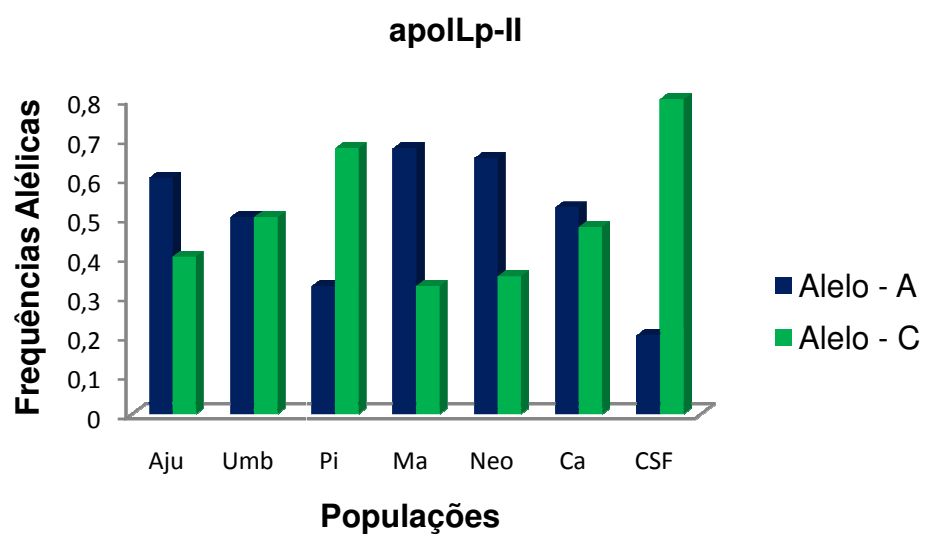


Figura 9: (continuação)

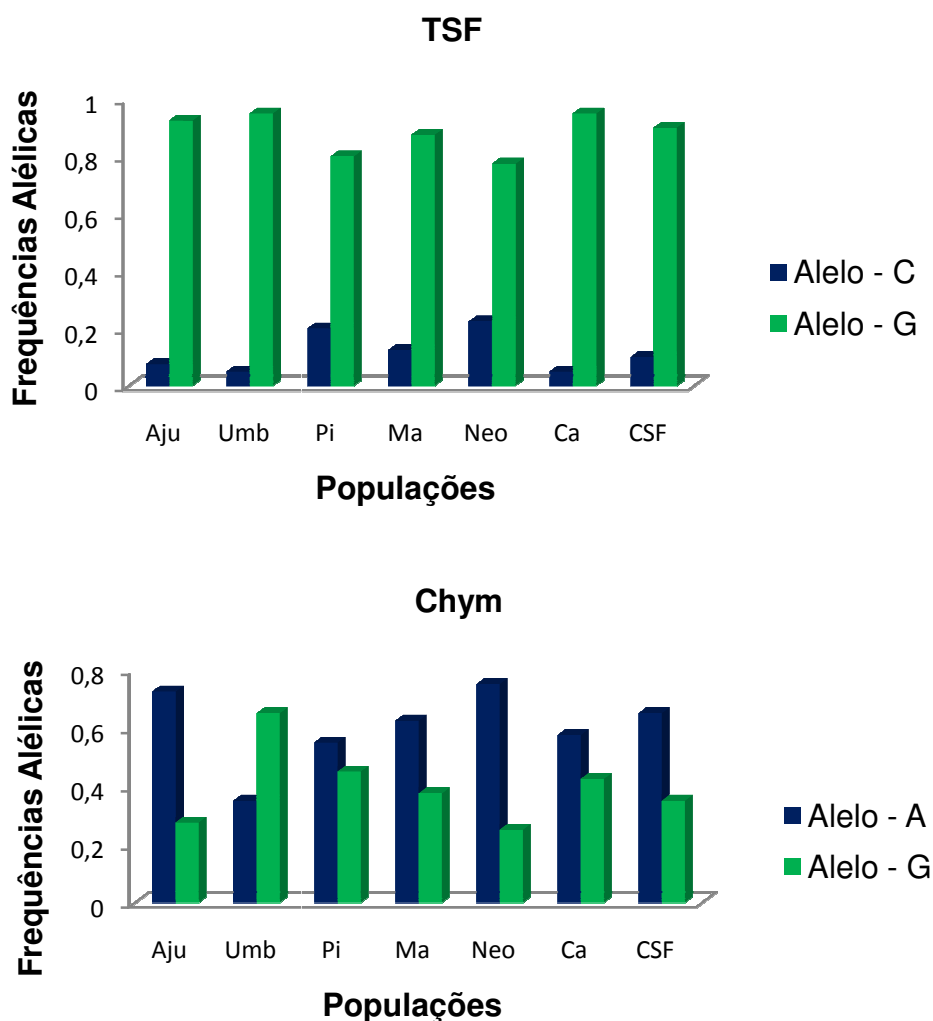


Figura 9: (continuação)

4.2.3.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para todas as populações a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foi realizada pela comparação da frequência observada dos genótipos com a frequência esperada em equilíbrio (Tabs. 6 a12). Três dos nove *loci* analisados apresentaram-se monomórficos, são eles: Na/K para população de Pinhão (Tab. 8), FerH para Neópolis (Tab. 10) e PGK para Carira (Tab. 11). A maioria dos SNPs genotipados nas sete populações analisadas não apresentou desvio significativo entre a heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), apenas os *loci* AelMUC1 para a população de Umbaúba (Tab. 7); FerH para a população

de Pinhão (Tab. 8); Na/K, CYP9J2 e Chym para Neópolis (Tab. 10); e apolLp-II para Carira (Tab. 11) foram significativos estatisticamente ($p < 0.05$), mostrando que nessas populações estes marcadores não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 6: Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de *Fis* (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de Aracaju (Porto Dantas).

Aracaju (Porto Dantas)						
<i>Locus</i>	N°	R	Ho	He	<i>Fis</i>	p
Ef-2	20	0.774	0.350	0.357	0.022	1.000
AelMUC1	18	0.235	0.444	0.412	-0.079	1.000
Na/K	19	0.000	0.105	0.102	-0.028	1.000
PGK	20	0.000	0.150	0.142	-0.055	1.000
apolLp-II	20	0.447	0.400	0.492	0.191	0.639
FerH	20	0.741	0.350	0.408	0.147	0.592
CYP9J2	16	0.433	0.312	0.465	0.336	0.276
TSF	20	0.922	0.150	0.142	-0.055	1.000
Chym	20	0.223	0.450	0.408	-0.103	1.000

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; He e Ho = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; *Fis* = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; p = significância dos testes.

Tabela 7: Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de *Fis* (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de Umbaúba.

Umbaúba						
<i>Locus</i>	N°	R	Ho	He	<i>Fis</i>	p
Ef-2	20	0.591	0.650	0.450	-0.461	0.057
AelMUC1	19	0.513	0.210	0.477	0.566	0.021
Na/K	20	0.000	0.100	0.097	-0.027	1.000
PGK	20	0.000	0.550	0.408	-0.357	0.259
apolLp-II	20	0.387	0.700	0.512	-0.378	0.175
FerH	20	0.707	0.350	0.450	0.226	0.351
CYP9J2	20	0.447	0.500	0.507	0.015	1.000
TSF	20	0.948	0.100	0.097	-0.027	1.000
Chym	20	0.707	0.300	0.466	0.363	0.149

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; He e Ho = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; *Fis* = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; p = significância dos testes.

Tabela 8: Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de *Fis* (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de Pinhão.

Pinhão						
<i>Locus</i>	N°	R	Ho	He	<i>Fis</i>	p
Ef-2	10	0.229	0.631	0.477	-0.333	0.320
AelMUC1	18	0.707	0.277	0.474	0.421	0.124
Na/K			<i>Locus</i> monomórfico			
PGK	20	0.000	0.150	0.142	-0.055	1.000
apolLp-II	20	0.632	0.550	0.450	-0.229	0.602
FerH	20	0.500	0.750	0.480	-0.583	0.015
CYP9J2	20	0.387	0.500	0.492	-0.016	1.000
TSF	20	0.774	0.400	0.328	-0.225	0.547
Chym	20	0.387	0.600	0.507	-0.187	0.646

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; He e Ho = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; *Fis* = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; p = significância dos testes.

Tabela 9: Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de *Fis* (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de Maruim.

Maruim						
<i>Locus</i>	N°	R	Ho	He	<i>Fis</i>	p
Ef-2	20	0.741	0.350	0.408	0.147	0.589
AelMUC1	19	0.324	0.263	0.371	0.296	0.234
Na/K	20	0.000	0.250	0.224	-0.117	1.000
PGK	20	0.000	0.150	0.142	-0.055	1.000
apolLp-II	20	0.223	0.550	0.450	-0.229	0.605
FerH	20	0.741	0.450	0.357	-0.266	0.530
CYP9J2	20	0.223	0.300	0.328	0.088	1.000
TSF	20	0.866	0.250	0.224	-0.117	1.000
Chym	20	0.387	0.450	0.480	0.065	1.000

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; He e Ho = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; *Fis* = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; p = significância dos testes.

Tabela 10: Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de *Fis* (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de Neópolis.

Neópolis						
<i>Locus</i>	N°	R	Ho	He	<i>Fis</i>	p
Ef-2	20	0.866	0.200	0.261	0.240	0.355
AelMUC1	20	0.223	0.200	0.261	0.240	0.352
Na/K	20	0.316	0.100	0.261	0.623	0.030
PGK	20	0.000	0.250	0.224	-0.117	1.000
apolLp-II	20	0.223	0.600	0.466	-0.295	0.328
FerH		<i>Locus</i> monomórfico				
CYP9J2	20	0.316	0.100	0.261	0.623	0.030
TSF	20	0.806	0.250	0.357	0.306	0.214
Chym	20	0.447	0.100	0.384	0.744	0.002

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; He e Ho = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; *Fis* = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; p = significância dos testes.

Tabela 11: Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de *Fis* (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de Carira.

Carira						
<i>Locus</i>	N°	R	Ho	He	<i>Fis</i>	p
Ef-2	20	0.806	0.350	0.296	-0.187	1.000
AelMUC1	20	0.447	0.600	0.512	-0.175	0.653
Na/K	20	0.000	0.100	0.097	-0.027	1.000
PGK	<i>Locus</i> monomórfico					
apollp-II	20	0.632	0.150	0.511	0.712	0.002
FerH	19	0.648	0.315	0.500	0.375	0.159
CYP9J2	20	0.316	0.450	0.450	0.000	1.000
TSF	20	0.948	0.100	0.097	-0.027	1.000
Chym	20	0.500	0.350	0.501	0.307	0.209

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; He e Ho = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; *Fis* = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; p = significância dos testes.

Tabela 12: Frequência do alelo raro, heterozigosidades observada e esperada, estimativas de *Fis* (coeficiente de endogamia) e significância dos testes, para nove SNPs de genes nucleares na população de *Aedes aegypti* de Canindé de São Francisco.

Canindé de São Francisco						
<i>Locus</i>	N°	R	Ho	He	<i>Fis</i>	P
Ef-2	20	0.741	0.400	0.384	-0.041	1.000
AelMUC1	20	0.591	0.500	0.492	-0.016	1.000
Na/K	20	0.000	0.150	0.142	-0.055	1.000
PGK	20	0.223	0.350	0.357	0.022	1.000
apollp-II	20	0.774	0.400	0.328	-0.225	0.548
FerH	20	0.632	0.500	0.466	-0.073	1.000
CYP9J2	20	0.387	0.700	0.512	-0.378	0.175
TSF	20	0.894	0.200	0.184	-0.085	1.000
Chym	20	0.387	0.400	0.466	0.146	0.635

N = número de indivíduos analisados; R = frequência do alelo raro; He e Ho = heterozigosidade esperada e observada para genes nucleares; *Fis* = teste exato para as proporções de Hardy-Weinberg; p = significância dos testes.

4.2.3.4. Análise da estrutura genética populacional

Através da análise utilizando o teste AMOVA, com base nos dados dos nove *loci* polimórficos, verificou-se que do total de diversidade genética, 7,35% está entre populações, e apenas 1,57% dentro das populações, sendo o valor de F_{ST} igual a 0,0735 ($p = 10^{-5}$). Grande parte da variabilidade genética (91,08%) foi identificada dentro dos indivíduos, provavelmente por este ser um marcador diplóide de análise *multilocus* (Tab.13).

Os valores F_{ST} *pairwise* entre populações apresentou menor valor entre as populações de Maruim e Aracaju (0.000), indicando menor distância genética entre as duas, as quais se encontram geograficamente mais próximas ($p = 0.658$). O maior valor encontrado de F_{ST} *pairwise* foi entre as populações de Neópolis e Pinhão (+0,208; $p < 10^{-5}$), indicando maior diferenciação genética entre elas. (Tab. 14)

Tabela 13: Análise de variância molecular (AMOVA) da frequência dos marcadores SNPs entre populações de *Aedes aegypti*, sem agrupamento.

Fonte de Variação	GL	SQ	Porcentagem total de variação	p	Estatística F
Entre as populações	6	37.736	7.35%	(< 0,01)	$F_{ST} = 0.0735$
Dentro das populações	133	202.925	1.57%	(> 0,05)	
Dentro dos indivíduos	140	206.500	91.08%	(< 0,05)	
Total	279	447.161	100%		

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

Tabela 14: Matriz de diferenciação genética (F_{ST} pairwise) das populações de *Aedes aegypti* calculado por meio da análise de nove SNPs de genes nucleares.

Populações	Aracaju	Umbaúba	Pinhão	Maruim	Neópolis	Carira	Canindé de São Francisco
Aracaju	-						
Umbaúba	0.040*	-					
Pinhão	0.097*	0.059*	-				
Maruim	0.000	0.050*	0.113*	-			
Neópolis	0.041*	0.131*	0.208*	0.014	-		
Carira	0.006	0.033*	0.066*	0.031	0.120*	-	
Canindé de São Francisco	0.066*	0.045*	0.038*	0.113*	0.177*	0.042*	-

* = $p < 0,05$

O *software* Structure 2.3.1 (PRITCHARD et al., 2000) foi usado para analisar a estruturação genética das populações de mosquitos *Ae. aegypti* com base na informação individual dos genótipos para cada *locus*. O agrupamento com base nos nove SNPs genotipados, revelou a presença de duas composições genéticas ($k = 2$) para as sete populações do estudo (Fig. 10). As populações de Umbaúba, Pinhão, Carira e Canindé de São Francisco apresentaram maior frequência do *cluster* 2 (verde) e as populações de Maruim e Neópolis tiveram maior prevalência do *cluster* 1 (vermelho). Aracaju se apresentou como um grupo híbrido, embora tenha prevalecido a frequência do *cluster* 2 (53%).

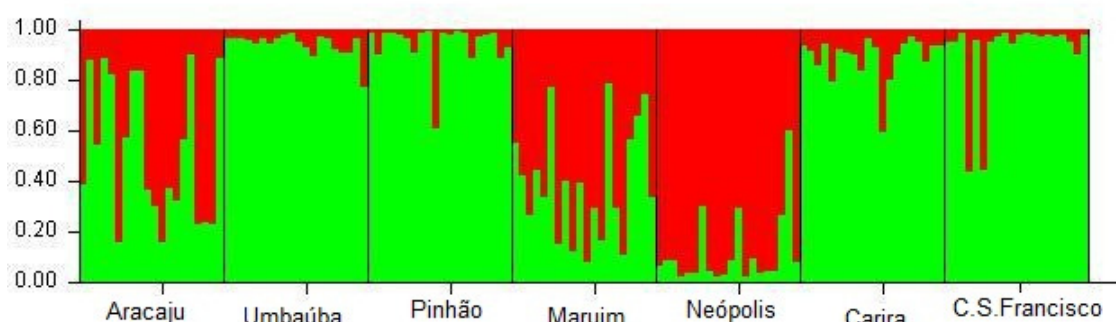


Figura 10: Resultado da análise de *clusters*. Cada um dos 140 indivíduos incluídos na análise é representado por uma linha vertical, dividida em duas cores. Estas cores representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*.

5. DISCUSSÃO

A positividade das ovitrampas instaladas nos municípios sergipanos revelou alta infestação por *Ae. aegypti* no estado. Embora essas armadilhas indiquem a infestação através do número de ovos coletados, dado este que não é indicador direto do tamanho da população de mosquitos adultos, a positividade das armadilhas atesta o elevado número de imóveis em cada município com presença da fêmea de *Ae. aegypti* em busca de recipientes apropriados para realizar a postura e a ampla dispersão do mosquito nas cidades. Assim, os moradores estão expostos à infecção ao vírus da dengue pelas investidas das fêmeas para realizar a hematofagia.

Para o monitoramento da densidade populacional do mosquito é realizado no Brasil o levantamento de índice rápido por infestação de *Ae. aegypti* (LIRAA), o qual considera que índices de infestação predial (IP) de até 1% são satisfatórios, entre 1 e 3,9% a área está em situação de alerta e acima de 4% há risco de surto de dengue (MS, 2010). A média anual do LIRAA no ano de 2011, indicou que a maioria dos municípios analisados estavam em situação de alerta (Aracaju IP = 1,58%; Neópolis IP = 1,40%; Caria IP = 2,08%; Pinhão IP = 1,46%; Canindé de São Francisco IP = 1,59%), com exceção de Umbaúba (IP = 0,95%) classificado como satisfatório e Maruim que não possui registro desse dado (SES/SE, 2012). Apesar desse levantamento ser correspondente ao ano de 2011, um ano após a maioria das coletas realizadas para este estudo e sabendo que a infestação pelo mosquito é dinâmica, os dados do LIRAA parecem não estar de acordo com o alto percentual de armadilhas ovitrampas apresentado neste estudo. Para o LIRAA realizado em Sergipe no ano de 2012 foi observado maior valor de IP para o município de Maruim (5,70%), comparado aos demais municípios analisados (SES/SE, 2012). Este dado de situação de risco está mais próximo ao obtido em nosso estudo, pois o município apresentou maior percentual (91%) das armadilhas ovitrampas instaladas em 2011 para esta pesquisa. Outro município que registrou risco de surto de dengue pela alta infestação do mosquito no ano atual foi Neópolis (IP = 4,17%). Para o município de Umbaúba, cuja colocação de ovitrampas e o LIRAA são do mesmo período, a mesma discrepância foi

observada, com IP indicando condição satisfatória ao mesmo tempo que as ovitrampas demonstraram 76% de positividade. Os demais municípios apresentaram variação no percentual de IP, com algumas semanas sendo satisfatório e outras apresentando situação de alerta (SES/SE, 2012). Tais dados demonstram a presença do mosquito nos municípios analisados, em densidades que podem causar surtos de dengue, e exemplificam a dificuldade existente no controle desse vetor e também na confiabilidade dos indicadores entomológicos em uso.

A avaliação da resistência ao larvicida temephós em municípios sergipanos, incluindo os selecionados para este estudo com exceção de Umbaúba, demonstrou que todas as populações são resistentes. A razão de resistência (RR), que define o grau de resistência de cada população analisada em relação à população de referência (Rockefeller), apresentou maior valor para a população de Pinhão (RR = 297.8) e menor para Porto Dantas, bairro de Aracaju (RR = 22.2) (MARTEIS, 2012, p.52). O fenômeno da resistência aos inseticidas e o impacto ambiental e à saúde que eles causam faz com que novas estratégias de controle vetorial sejam propostas, para as quais estudos da biologia, ecologia e genética de populações de *Ae. aegypti* são imprescindíveis.

O marcador molecular ISSR tem sido usado no estudo genético de várias espécies, apresentando resultados significativos para estruturação e variabilidade genética (REDDY et al., 2009; GOLKAR et al., 2011; NEAL et al., 2011). Neste estudo foram usados apenas dois iniciadores, os quais se demonstraram polimórficos o suficiente para diferenciar populações geograficamente próximas. O *primer* (GA)₈YG, similar ao usado neste estudo ((GA)₈RY), foi o mais informativo em uma análise de variedades de arroz tolerantes a seca, inundação e salinidade, pois com seu uso as amostras foram subdivididas em três *clusters* distintos dentro do grupo de variedades tolerantes (REDDY et al., 2009). Na análise de cepas de *Trypanossoma cruzi* com marcadores moleculares RAPD e ISSR, enquanto foram usados três iniciadores para a primeira técnica, apenas o uso do iniciador (CA)₈RY foi suficiente para diferenciar as cepas em dois grupos assim como a técnica RAPD (ZALLOUM et al., 2007). O marcador molecular ISSR apresentou-se como uma técnica relativamente simples, produzindo

padrões altamente polimórficos e repetíveis que permitiu diferenciar populações de *Ae. aegypti* do Uruguai e do nordeste da Argentina em uma escala geográfica que variou de 25km a 580km (SOLIANI et al., 2010).

Para os municípios sergipanos a análise da variância molecular (AMOVA) para o marcador ISSR indicou percentual de 32% da diversidade genética entre as populações e maior percentual (68%) dentro da população. Com o uso do mesmo marcador molecular foi observado diversidade genética de 89% dentro da população de *Ae. aegypti* procedentes do nordeste da Argentina e do Uruguai e percentual de 11% foi atribuído a diferença genética entre as populações (SOLIANI et al., 2010). Um padrão de variação genética diferente do observado nesse estudo foi identificado com uso de marcador RAPD, que possui característica dominante como o ISSR, entre três populações mantidas em laboratório sendo encontrada maior diversidade entre as populações (55%) do que dentro da população (45%) de *Ae. aegypti* (HIRAGI et al., 2009). O valor de estruturação genética *phiST* foi igual a 0,3225 indicando alta diferenciação genética entre as populações avaliadas quando comparado com outros estudos que utilizam este coeficiente de fixação para avaliação (LUNARDI et al., 2007 (*phiST* = 0,131); BERTONI et al., 2010 (*phiST* = 0,188)) .

A similaridade variou de 61% entre Pinhão e as demais populações a 83% entre Aracaju e Canindé de São Francisco. No agrupamento gerado pelo dendograma não foi observado maior similaridade genética entre as populações mais próximas geograficamente. O teste de Mantel aplicado para correlação das matrizes de distância genética e distância geográfica linear não foram significativas ($r = -0,41$; $p > 0,05$). Porém, as correlações calculadas com as distâncias geográficas rodoviárias foram significativas ($r = -0,4941$, $p = 0,5$), principalmente quando o efeito do tamanho da população é retirado ($r = -0,54$; $p = 0,03$). Esses resultados apontam que o fluxo de mosquitos entre as localidades não é ativo e sim passivo pela ação do homem decorrente da movimentação de pessoas entre os municípios. O estado de Sergipe possui duas rodovias federais, a BR - 101 (sentido norte-sul, passando pelos municípios de Umbaúba, Aracaju e Maruim) e BR - 235 (sentido leste-oeste, passando pelos municípios de Carira e Aracaju). A BR - 101 interliga Sergipe ao estado da Bahia no sul e ao estado de

Alagoas no norte, já a BR - 235 atravessa horizontalmente o estado de Sergipe, ligando o litoral sergipano no leste ao estado da Bahia ao oeste. O fluxo intenso por essas rodovias, comparadas às demais, pode contribuir com o alto valor de similaridade apresentado para as populações. Os municípios de Aracaju e Canindé de São Francisco são muito visitados pelos seus pontos turísticos, onde muitos turistas saem da capital em direção a Canindé de São Francisco para conhecer o Cânion de Xingó, um dos pontos turísticos mais famosos do estado, podendo ser um fator adicional para explicar a alta similaridade genética entre essas cidades.

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. Foram identificados de 2 a 45 SNPs/kb em nove genes nucleares pesquisados, assim, esta alta diversidade detectada demonstra que os SNPs podem ser extremamente úteis como marcadores genéticos (PADUAN, 2008).

Em nosso estudo, na análise através de nove marcadores SNP, seis *loci* apresentaram desvios entre as heterozigosidades observadas e esperadas, decorrentes do excesso de homozigotos. Foi observado um *locus* em desequilíbrio para as populações de Umbaúba, Pinhão e Carira e três para a população de Neópolis. Paduan e Ribolla (2009) também verificaram excesso de homozigotos em dois *loci* dos oito SNPs analisados evidenciando desequilíbrio de Hardy-Weinberg para três populações brasileiras de *Ae. aegypti*. Urdaneta-Marquez e colaboradores (2008) identificaram um *locus* que apresentou déficit de heterozigotos em sete das nove populações analisadas. Os autores sugerem a falta de sensibilidade pelo método utilizado; ou ainda variação no sítio de anelamento do *primer* para o alelo específico; mas não descartam a possibilidade de que o *locus* possa estar sujeito a algum tipo de seleção de tal forma que um dos alelos seja favorecido em diferentes ambientes. O método utilizado no presente estudo apresenta alta sensibilidade e a evidência de que o desequilíbrio de HW não ocorreu em apenas um *locus* descarta o problema no sítio de anelamento dos iniciadores utilizados. Sugere-se que os desvios no equilíbrio de HW possam ser devidos as diferenças ambientais que conferem pressões

seletivas variadas. Embora o estado possua dimensão geográfica pequena, apresenta diferenças climáticas relevantes como longo período de seca e temperaturas elevadas na região do semiárido. Diferença nos níveis de resistência também pode estar associada aos desequilíbrios observados. Um exemplo a ser considerado é o caso do município de Pinhão que apresentou alta e discrepante resistência ao temephós quando compara as demais populações analisadas (MARTEIS, 2012, p. 52). Destaca-se que o mesmo município foi monomórfico para o *locus* Na/K, gene associado à resistência à pitetróides.

Foi observada diversidade genética de 7,35% entre as populações do estudo e valor de $F_{ST} = 0,07354$ significativo nos testes de permutação ($p = 10^{-5}$), sendo que a maior diferença (91,08%) foi verificada dentro dos indivíduos. Esse padrão de variação inter e intrapopulacional foi observado em outros estudos utilizando marcadores SNPs com mosquitos *Ae. aegypti* (PADUAN, 2008; SPENASSATTO, 2011). Resultados obtidos por Paduan (2008) no estudo genético populacional do mosquito *Ae. aegypti* de três localidades do Brasil (Botucatu, Maceió e Juazeiro do Norte), utilizando nove marcadores SNPs, verificou uma diversidade genética de 23,65% ($F_{ST} = 0,2364$) entre as populações, muito maior quando comparado ao resultado obtido nesse estudo. Porém, Spenassatto (2011), analisando duas populações de São Paulo (Santos e São Sebastião) obteve valores menores de diversidade genética entre esses municípios (3,24%; $F_{ST} = 0,0324$) do que o observado no presente estudo. A diferença do percentual de variação genética entre os estudos citados pode estar relacionada com o distanciamento geográfico das populações analisadas. A maior distância entre os municípios sergipanos analisados foi de aproximadamente 240km (Umbaúba - Canindé de São Francisco), muito menor que a distância entre as populações analisadas por Paduan (2008), aproximadamente 2.500km (Botucatu/SP – Juazeiro do Norte/CE) e maior do que as populações estudadas por Spenassatto (2011), aproximadamente 166km (Santos/SP – São Sebastião/SP).

Estudo realizado aplicando teste AMOVA por agrupamento, no qual as populações foram reunidas em grupos referentes a cinco regiões fitogeográficas da área de estudo, apresentou valor significativo indicando que 3,2% da variação

da frequência alélica surgiram entre essas regiões (SYLLA et al., 2009). Seguindo o mesmo modelo de análise Urdaneta-Marquez e colaboradores (2008) verificaram que 2,2% da variação foram atribuídas a diferentes regiões geográficas. Embora não tenha sido realizada uma análise por agrupamento com as populações estudadas, algum percentual de variabilidade genética encontrado entre elas pode estar associado às diferentes características dos domínios morfoclimáticos presentes no estado. Também foi observada uma diferença de criadouros frequentes em alguns municípios analisados, como a presença de tanques de lavar roupas para o município de Aracaju e de grandes reservatórios, denominados cisternas, no município de Pinhão, que pode ser outro fator associado à variabilidade genética. Sylla et al. (2009) detectaram 0,9% ($p > 0.5$) de variabilidade entre populações de *Ae. aegypti* de três diferentes habitat (urbano, vila rural e mata de galeria).

O resultado obtido pela análise da estrutura populacional mostrou uma divisão das sete populações analisadas em dois *clusters*. Observou-se maior percentual do *cluster* 2 nas populações localizadas no interior do estado e uma maior frequência do *cluster* 1 para as populações mais litorâneas. Esse dado indica que pode estar ocorrendo pressão seletiva de natureza climática na expressão alélica de alguns genes que os agrupem desse modo. O clima de Sergipe apresenta três regiões distintas de acordo com a temperatura e pluviosidade: 1) Litoral com precipitação média anual de 1.355mm, umidade relativa do ar de 80% e temperatura média de 25°C; 2) Agreste com precipitação média anual de 1.000mm, umidade relativa do ar de 70% e temperatura média anual de 25°C e; 3) Semiárido com precipitação média anual de 700mm, umidade relativa do ar de 65% e temperatura média anual de 26°C (SIRHSE, 2012). Embora praticamente não ocorra variação na temperatura média anual entre os três climas, as temperaturas máximas podem diferir em até 10°C entre o semiárido e litoral, além disso, o agreste e o semiárido apresentam épocas de seca mais extensas o que pode ser fator de seleção de espécimes com maior resistência à dessecação, refletindo em diferenciação genética em relação às populações litorâneas e gerado a divisão dos *clusters*. O município de Aracaju apresentou padrão híbrido, exibindo quase 50% de cada *cluster*. Por ser a capital do estado e não ter longas distâncias com os municípios do interior é comum

alguns habitantes residirem no interior e desenvolverem suas atividades de trabalho em Aracaju. Esse deslocamento pode contribuir para o transporte passivo do mosquito, favorecendo a ocorrência observada da mistura dos *clusters*. Esse fator estaria de acordo com os resultados significativos pelo teste de Mantel relacionados às distâncias rodoviárias apresentado pelo marcador ISSR.

Ambos os marcadores moleculares apresentaram-se polimórficos suficientes para diferenciar as populações que compõem o estado de Sergipe numa escala geográfica entre 30km e 240km. Tanto ISSR ($\phi_{ST} = 3225$) quanto SNPs ($F_{ST} = 0,07354$) indicaram que as populações estão estruturadas geneticamente, provavelmente pelas características climáticas, porém essas diferenças seriam reduzidas pelo fluxo gênico, sugerido pelo transporte passivo decorrente da ação humana, para explicar a alta similaridade observada entre populações tão distantes e com características climáticas distintas como Aracaju e Canindé de São Francisco.

Os dois marcadores apresentaram a separação das sete populações em dois *clusters* principais. Tanto SNPs como ISSR indicam que populações litorâneas (Maruim, Neópolis e Aracaju) possuem uma maior semelhança genética entre elas assim como as populações situadas no interior (Carira, Pinhão e Umbaúba). Porém, Canindé de São Francisco foi classificado de maneira discordante entre os marcadores utilizados. Para SNP o município possui maior similaridade com as populações interioranas, o que corresponde com sua localização geográfica, mas para ISSR, essa população possui maior semelhança com populações litorâneas. Pode ser que a característica do marcador tenha sido o fator de discordância para essa população, já que ISSR é dominante e pode amplificar regiões genômicas codificantes ou não e SNP amplificam *locus* específicos, sendo assim, cada marcador analisou diferentes partes do genoma.

Estes resultados podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o controle e manejo do mosquito vetor. Essas estratégias têm sido a base para prevenção de epidemias de dengue com ênfase no uso de inseticidas químicos, os quais tem sido largamente empregados. Tal prática tem gerado processos de resistência no mosquito, afetando diretamente as estratégias de controle e

aumentando o risco de epidemias a cada ano. 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, o que pode lhes conferir habilidade para adaptarem-se a novas situações, bem como auxiliar a explicar o insucesso ou variações quando novos métodos de controle baseados em manipulação genética vierem a ser implantados.

6. CONCLUSÃO

- Foi observada alta infestação pelo mosquito *Ae. aegypti* em todos os municípios pesquisados, indicando dificuldades no controle do vetor. Essa infestação oferece risco de novas epidemias de dengue no estado.
- A técnica ISSR com uso de apenas dois iniciadores apresentou alto polimorfismo, repetibilidade e baixo custo, necessitando apenas de mais tempo de trabalho laboratorial quando comparada a técnica SNP, que também se mostrou eficiente, sensível, rápida e uma ótima ferramenta para estudos em larga escala.
- As informações geradas neste estudo demonstram que ambos marcadores moleculares foram eficientes no estudo genético de populações naturais de *Ae. aegypti*, sendo possível diferenciar amostras numa escala geográfica entre 30km a 240km.
- A genotipagem de SNPs pela metodologia TaqMan® revelou a presença de dois alelos para todas as populações em seis dos nove genes analisados.
- Foi sugerida para a técnica ISSR a existência de um fluxo gênico do mosquito de forma passiva para explicar a alta similaridade observada entre as populações, principalmente entre as populações de Canindé de São Francisco e Aracaju, distantes geograficamente.
- O marcador molecular SNP evidencia a separação das sete populações em dois *clusters* principais indicando que populações litorâneas possuem uma maior semelhança genética entre elas assim como as populações situadas no interior, corroborando com o fluxo gênico apresentado pela técnica ISSR quando apresenta a cidade de Aracaju como híbrida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, I. G. C.; MARANDINO, R.; MENDONÇA, A. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; VASCONCELOS, P. F. C.; GUERRA, L. R.; BRANDÃO, B. C.; MENDONÇA, A. P. P.; AGUIAR, G. R.; BACCO, P. A. M. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 128-129, jan/fev 2012.

ANOU, N.; YANWEN, X.; YOUREN, F. Schistosoma japonicum strains: differentiation by RAPD and SSR-PCR. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. v.33, n. 4, p. 720-724, 2002.

ASHKENAZI, V.; CHANI, E.; LAVI, U.; LEVY, D.; HILLEL, J.; VEILLEUX, E. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*, Ottawa, v. 44, p. 50-62, 2001.

AYRES, C. F. J. *et al.* Genetic diversity in brazilian population of *Aedes albopictus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.

BERTONI, B. W.; SOUZA, A. V.; BIONDO, R.; FRANÇA, S. C.; TELLES, M. P. C.; PEREIRA, M. A. S. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. *Horticultura Brasileira*, v. 28, p. 209-213, 2010.

BRAGA, I. M.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 16, n. 4, p. 295-302, out/dez 2007.

BROWN, S. M.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; SENIOR, M. L.; WANG, T. Y.; DUNCAN, R. R.; GONZALES-CANDELAS, F.; KRESOVICH, S. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 93, p. 190-198, 1996.

BROWN, J. E.; McBRIDE, C. S.; JOHNSON, P.; RITCHIE, S.; PAUPY, C.; BOSSIN, H.; LUTOMIAH, J.; FERNANDEZ-SALAS, I.; PONLAWAT, A.; CORNEL, A. J.; BLACK IV, W. C.; GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N.; URDANETA-MARQUEZ, L.; SYLLA, M.; SLOTMAN, M.; MURRAY, K. O.; WALKER, C.; POWELL, J. R. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc. R. Soc. B*. doi:10.1098/rspb.2010.2469, jan 2011.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *R. Bras. Zootec.*, v.38, p.64-71, 2009.

CATTERUCCIA, F. Malaria vector control in the third millennium: progress and perspectives of molecular approaches. *Pest Manag Science*, v. 63, p. 634–640, 2007.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. *Dengue*. USA. Disponível em: <www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html> Acesso em: abril de 2012.

CEMSE/SEMARH – Centro Meteorologia da Secretaria do Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos. *Caracterização Climática*. 2012. Disponível em: <<http://www.semarh.se.gov.br/meteorologia/modules/tinyd0/index.php?id=45>> Acesso em : julho 2012.

CHAMBERS, E. W.; MEECE, J. K.; MCGOWAN, J. A.; LOVIN, D. D.; HEMME, R. R.; CHADEE, D. D.; MCABEE, K.; BROWN, S. E.; KNUDSON, D. L.; SEVERSON, D. W. Microsatellite Isolation and Linkage Group Identification in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Heredity*, v. 98, n. 3, p. 202–210, 2007.

CHEN, X.; MATHUR, G.; JAMES, A. A. Gene Expression Studies in Mosquitoes. *Adv Genet*, v. 64, p. 19-50, dez 2008.

CLEMONS, A.; HAUGEN, M.; FLANNERY, E.; TOMCHANAY, M.; KAST, K.; JACOWSKI, C.; LE, C.; MORI, A.; HOLLAND, W. S.; SARRO, J.; SEVERSON, D.; DUMAN-SCHEEL, M. *Aedes aegypti*: an Emerging Model for Vector Mosquito Development. *Cold Spring Harb Protoc*, nov 2010.

COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p. 917-921, dez 2006.

CREGAN, P. B.; MUDGE, J.; FICKUS, E. W.; MAREK, L. F.; DANESH, D.; DENNY, R.; SHOEMAKER, R. C.; MATTHEWS, B. F.; JARVIK, T.; YOUNG, N. D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 98, p. 919-928, 1999.

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

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso dos marcadores moleculares em análise genética*. 3a edição. Brasília: EMBRAPA - CENAGEN. p. 220, 1998.

FERREIRA, A. M.; VITOR, R. W. A.; CARNEIRO, A. C. A. V.; BRANDÃO, G. P.; MELO, M. N. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR), *Infection, Genetics and Evolution*, v. 4, p. 131-142, 2004.

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

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.

GOLKAR, P.; ARZANI, A.; REZAEI, A. M. Genetic Variation in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) for Seed Quality-Related Traits and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 12, p. 2664-2677, 2011.

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.

HEMME, R. R.; THOMAS, C. L.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Influence of Urban Landscapes on Population Dynamics in a Short-Distance Migrant Mosquito: Evidence for the Dengue Vector *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 3, p. e634-e643, mar 2010.

HICKNER, P. V.; DEBRUYN, B.; LOVIN, D. D.; MORI, A.; BEHURA, S. K.; PINGER, R.; SEVERSON, D. W. Genome-Based Microsatellite Development in the *Culex pipiens* Complex and Comparative Microsatellite Frequency with *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *PLOS ONE*, v. 5, n. 9, p. e13062-e13070, set 2010.

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

HONÓRIO, N. A.; SILVA, W. C.; LEITE, P. J.; GONÇALVES, J. M.; LOUNIBOS, L. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 2, p. 191-198, mar 2003.

HUBER, K.; MOUSSON, L.; RODHAIN, F.; FAILLOUX, A. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. *Molecular Ecology*, v. 1, p. 219-222, 2001.

IBGE. *Estados*. 2010. Disponível em: <
<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=se>> Acesso em: junho 2012.

KHEMAKHEM, M. M.; MARRAKCHI, M.; MAKNI, H. Genetic diversity of *Mayetiola destructor* and *Mayetiola hordei* (Diptera: Cecidomyiidae) by intersimple sequence repeats (ISSRs). *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 7, p. 601-606, jul 2005.

KULARATNE, S. A. M.; WEERASINGHE, S. C.; GIHAN, C.; WICKRAMASINGHE, S.; DHARMARATHNE, S.; ABEYRATHNA, A.; JAYALATH, T. Epidemiology, Clinical Manifestations, and Long-Term Outcomes of a Major Outbreak of Chikungunya in a Hamlet in Sri Lanka, in 2007: A Longitudinal Cohort Study. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2012, 2012.

LEOI, L. C. T. Desenvolvimento de marcadores microssatélites (SSR) em *Arachis hypogaea*. 2003. 145f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília, Brasília. 2003.

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

LITT, M.; LUTY, J. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetic*, v. 44, p. 398-401, 1989.

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

LUNA, J. E. D.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; SILVA, M. A. N. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 842-843, 2004.

LUNARDI, V. O.; FRANCISCO, M.R.; GALETTI JR., P.M. Population structuring of the endemic black-cheeked gnateater, *Conopophaga melanops melanops* (Vieillot, 1818) (Aves, Conopophagidae), in the Brazilian Atlantic Forest. *Braz. J. Biol.*, v. 67, n. 4, p. 867-872, 2007.

MARTEIS, L. S. Aspectos da capacidade vetorial e perfil de susceptibilidade ao temephós de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de diferentes regiões do estado de Sergipe, Brasil. 2012. 81f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 2012.

MEYER, W.; LIECKFELDER, E.; KUTHS, K. DNA – and PCR fingerprinting in fungi. *Birkhauser Verlag*, p. 311-320, 1993.

McCOUCH, S. R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y. G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology*, Oxford, v. 35, p. 89-99, 1997.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as makers in plant genetics. *The Plant Journal*, Gainesville, v. 3, p. 175-182, 1993.

MORLAIS, I.; SEVERSON, D. W. Intraspecific DNA variation in nuclear genes of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, v. 12, n. 6, p. 631-639, 2003.

MS - Ministério da Saúde. *Entenda a Dengue*. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html> Acesso em: maio 2012.

MS – Ministério da Saúde. *Levantamento de Índice Rápido de Infestação por Aedes aegypti (LIRAa)*. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/campanha_final111110.pdf> Acesso em: julho 2012.

MS - Ministério da Saúde. *Ministério da Saúde vai monitorar a doença chikungunya no País*. 2010a. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2010/12/9/ministerio-da-saude-vai-monitorar-a-doenca-chikungunya-no-pais>> Acesso em: julho 2012.

NAGPAL, B. N.; SAXENA, R.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, N.; GHOSH, S.K.; SHARMA, S. K.; KUMAR, A.; KUMAR, H.; SHARMA, A. S.; CHAND, S. K.; OJHA, V. P.; MOHANTY, S. S.; MOHANTY, A. K.; DASGUPTA, R. K.; DHILLON, G. P. S.; DASH, A. P. Retrospective study of chikungunya outbreak in urban areas of India. *Indian Journal of Medical Research*, v. 135, n. 3, p. 351-358, mar 2012.

NASCIMENTO, M. A.; BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A. M.; TAVARES, M. G.; CAMPOS, L. A. O.; SALOMÃO, T. M. F. Variation and genetic structure of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae) populations based on ISSR pattern. *Genetics and Molecular Biology*, v. 33, n. 2, p. 394-397, 2010.

NEAL, C. O.; RICHARDSON, A. O.; HURST, S. F.; TORTORANO, A. M.; VIVIANI, M. A.; STEVENS, D. A.; BALAJEE, S. A. Global population structure of *Aspergillus terreus* inferred by ISSR typing reveals geographical subclustering. *BMC Microbiology*, v. 11, n. 203, 2011.

NENE, V.; et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, jun 2007.

OLIVEIRA, R. G. Polimorfismo genético de microssatélites em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) das cidades de Caratinga e Governador Valadares, Minas Gerais. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e da Saúde). Centro Universitário de Caratinga, Caratinga. 2010.

PADUAN, K. S. *Desenvolvimento de marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) para estudos populacionais do mosquito Aedes aegypti no Brasil*. 2008. 130f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Genética)). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatú. 2008.

PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. E. M. Characterization of eight single nucleotide polymorphism markers in *Aedes aegypti*. *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 114–116, 2009.

PAUPY, C.; BRENGUES, C.; KAMGANG, B.; HERVÉ, J.; FONTENILLE, D.; SIMARD, F. Gene Flow Between Domestic and Sylvan Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. *J. Med. Entomol.*, v. 45, n. 3, p. 391- 400, 2008.

PAUPY, C.; BRENGUES, C.; NDIATH, O.; TOTY, C.; HERVÉ, J.; SIMARD, F. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 10, p. 473–480, 2010.

PRADEEP, A. R.; JINGADE, A. H.; SINGH, C. K.; AWASTHI, A. K.; KUMAR, V.; RAO, G. C.; PRAKASH, N. B. V. Genetic analysis of scattered populations of the Indian eri silkworm, *Samia cynthia ricini* Donovan: Differentiation of subpopulations. *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, n. 3, p. 502-510, 2011.

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

RAMASAMY, R.; SURENDRAN, S. N.; JUDE, J. P.; DHARSHINI, S.; VINOBABA, M. Larval Development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Peri-Urban Brackish Water and Its Implications for Transmission of Arboviral Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 11, p. 1369-1379, nov 2011.

RAVEL, S.; HERVÉ, J. P.; DIARRASSOUBA, S.; KONE; CUNY, G. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Côte d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouaké. *Acta Trop.*, v. 82, n. 1, p. 39-49, 2002.

REDDY, C. S.; BABU, A. P.; SWAMY, B. P. M.; KALADHAR, K.; SARLA, N. ISSR markers based on GA and AG repeats reveal genetic relationship among rice varieties tolerant to drought, flood, or salinity. *J Zhejiang Univ Sci B*, v. 10, n. 2, p. 133-141, 2009.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K.; STRODE, C.; SUAREZ, A. F.; SALAS, I. F.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; BLACK IV, W. C. Quantitative Trait Loci Mapping of Genome Regions Controlling Permethrin Resistance in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, v. 180, p. 1137–1152, out 2008.

SES/SE – Secretaria de Estado da Saúde / Sergipe. *Sala de situação da dengue*. 2012. Disponível em: <http://www.ses.se.gov.br/sala_de_situacao_da_dengue/> Acesso em: julho 2012.

SES/SE – Secretaria de Estado da Saúde / Sergipe. *Sergipe não registra nenhuma morte por dengue em 2012*. 2012a. Disponível em: <<http://www.ses.se.gov.br/hotsite/dengue2008/index.php?act=leitura&codigo=7435>> Acesso em: agosto 2012.

SIRHSE – Sistema de Informações de Recursos Hídricos / Sergipe. *Clima*. 2012. Disponível em: <http://sirhse.semarh.se.gov.br/sirhse/index.php/macroplanejamento/bacias_hidrograficas/estadoClima/estado> Acesso em: julho 2012.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. *Numeric taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. 1973. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, Berlin, v.11, p.30-40, 1962.

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. *Brasil reduz em 84% o número de mortes por dengue em 2012*. Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/5152/785/brasil-reduz-em-84-o-numero-de-mortes-por-dengue-em-2012.html>> Acesso em: junho 2012.

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. *Brasil registra queda de 62% nos casos da doença*. Ministério da Saúde, 2012a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4259/162/brasil-registra-queda-de-62-nos-casos-da-doenca.html>> Acesso em: agosto 2012.

SLOTMAM, M. A.; KELLY, N. B.; HARRINGTON, L. C.; KITTHAWEE, S.; JONES, J. W.; SCOTT, T. W.; CACCONE, A.; POWELL, J. R. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. *Molecular Ecology*, v. 7, p. 168-171, 2007.

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

SOUZA, L. J. de. *Dengue – diagnóstico, tratamento e prevenção*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2008. 45-55 p.

SOUZA-SANTOS, C.; CARVALHO, M. S. Análise da distribuição espacial de larvas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 31-42, jan/mar 2000.

SPENASSATTO, C. Desenvolvimento de metodologia *high-throughput* para estudo populacional do mosquito *Aedes aegypti* e comparação de dados de genes nucleares com dados de genes mitocondriais. 2011. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Genética)). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 2011.

SYLLA, M.; BOSIO, C.; URDANETA-MARQUEZ, L.; NDIAYE, M.; BLACK IV, W. C. Gene Flow, Subspecies Composition, and Dengue Virus-2 Susceptibility among *Aedes aegypti* Collections in Senegal. . *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 4, p. e408-e422, 2009.

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

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, v. 17, p. 6463- 6471, 1989.

URDANETA-MARQUEZ, L.; BOSIO, C.; HERRERA, F.; RUBIO-PALIS, Y.; SALASEK, M.; BLACK IV, W. C. 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.

VOLPINI, A. C.; DE AZEREDO PASSOS, V. M.; ROMANHA, A. J. Attempt to differentiate *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, L. (L.) *chagasi*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and L. (V.) *guyanensis* using the SSR-PCR technique, *Parasitology Research*, v. 87, n. 12, p. 1056-1059, 2001.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, v. 85, p. 328-345, 2010.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction, *American Journal Human Genetic*, v. 44, p. 273-283, 1989.

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

WILKE, A. B. B.; GOMES, A. C.; NATAL, D. Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. *Rev Saúde Pública*, v. 43, n. 5, p. 869-874, 2009.

YAN G., CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics*, v. 148, p. 793-800, 1998.

ZALLOUM, L.; GOMES, M. L.; KINOSHITA, A. T.; TOLEDO, M. J. O.; PRIOLI, A. J.; ARAÚJO, S. M. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* natural

populations in Paraná state, southern Brazil. *Acta Sci. Health Sci.*, Maringá, v. 29, n. 1, p. 25-31, 2007.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDAD, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – Anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v. 20, p.176-183, 1994.