



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS  
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**GILMAR SEIXAS DA SILVA**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E A INFLUÊNCIA DA  
TEMPERATURA E DO CO<sub>2</sub> EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* NA CIDADE DE  
MANAUS, POR MEIO DO GENE *Kdr* E MARCADORES RAPD**

**MANAUS  
2017**

**GILMAR SEIXAS DA SILVA**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E A INFLUÊNCIA DA  
TEMPERATURA E DO CO<sub>2</sub> EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* NA CIDADE DE  
MANAUS, POR MEIO DO GENE *Kdr* E MARCADORES RAPD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientadora: Profa. Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos**

**MANAUS  
2017**

**GILMAR SEIXAS DA SILVA**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E A INFLUÊNCIA DA  
TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO DE CO<sub>2</sub> EM POPULAÇÕES DE  
*Aedes aegypti* NA CIDADE DE MANAUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Joselita Maria Mendes dos Santos  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

---

Miriam Silva Rafael  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

---

Maria da Conceição Freitas dos Santos  
Universidade do Estado do Amazonas

**MANAUS  
2017**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UEA)

Seixas da Silva, Gilmar

*S457a* Análise da variabilidade genética e a influência da temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> em populações de *Aedes aegypti* na cidade de Manaus / Gilmar Seixas da Silva. - Manaus: UEA, 2017.

98 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) — Universidade do Estado do Amazonas, 2017.

Orientador: Profa. Dra Joselita Maria Mendes dos Santos

1. Mosquitos – Variabilidade - Estudo 2. Culicídeos – Manaus 3. *Aedes* – Genética de populações 4. Ácido desoxirribonucléico RAPD I. Santos, Maria Joselita Mendes dos II. Universidade do Estado do Amazonas IV. Título

**CDU 598.13(043.2)**

*Aos meus pais e amigos pelo apoio e incentivo*

*“Só sei que nada sei”*  
Sócrates

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, da Universidade do Estado do Amazonas, pela oportunidade de cursar o Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais e realizar mais uma etapa da minha carreira acadêmica;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pelo suporte financeiro e logístico no desenvolvimento dessa pesquisa.

À Capes pelo auxílio financeiro;

À Dra. Joselita Maria Mendes do Santos, minha orientadora, por ser a responsável pelo meu ingresso no campo da Genética, assim como pelo incentivo constante a me aprofundar nos estudos, por acreditar em meu potencial, sempre disponível e disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver o máximo de conhecimento. Pela paciência, dedicação, os valiosos ensinamentos e lições de vida e por tudo o que com ela aprendi;

A meus queridos pais, **Osmar Cavalcante** e **Jaci Seixas**, meu infinito agradecimento pela vida, pelo incentivo a estudar e pelo ensinamento de valores, sem os quais não teria chegado aqui. Sempre acreditaram em mim e me deram todos os subsídios materiais e emocionais para que eu pudesse seguir adiante nos estudos;

À minha querida namorada, Samira Bernardes, pelo apoio e companhia durante todo o curso e nos momentos difíceis. Devido à sua amizade, paciência e compreensão, este trabalho pôde ser concretizado;

Ao MsC. Juracy, pela valiosa colaboração na execução deste trabalho, fornecendo subsídios intelectuais e práticos, fundamentais para o esclarecimento de inúmeras questões e interpretação dos resultados, sem os quais esse trabalho não seria possível, além da amizade;

A toda minha família, especialmente ao meu irmão Wiliansmar, pelo incentivo e por ter sido minha inspiração desde a infância a seguir a vida acadêmica;

Ao professor e grande amigo Roberto Carlos pelo apoio e ajuda, tendo sido um grande referencial de força e coragem nos momentos de dúvida, muitas vezes priorizando meu prosseguimento nos estudos, em detrimento de seu descanso;

Ao professor Jonssen Freitas pela compreensão e apoio nas fases difíceis em que tinha que conciliar o trabalho com a pesquisa, muitas vezes abrindo mão de seu conforto profissional e se colocando à disposição para solucionar impasses;

A todos os professores, com quem tive contato ao longo da minha vida acadêmica, em especial aos da Pós-Graduação por me iluminarem a mente ao longo desses dois anos de mestrado;

Ao meu colegas de tuma e agora amigos, Alessandra Silva, Paola Ortiz, Elizângela Tavares, Jairo Rocha, Jéssica Varela, Jonas Gama, Katiane Pereira, Luciana Aires, Alexandre Lima, Henrique Freitas e Vanderlei Saboia, pelo dia a dia de convivência e momentos divididos juntos, pelo apoio que me deram e pela amizade que me dedicam;

Aos grandes amigos, Emerson Bacellar e André Miasato, com quem tive a oportunidade de aprender, ao longo de nosso convívio, ideias extremamente valiosas para toda a vida.

Ao meu nobre amigo William Lima, pela valiosa contribuição intelectual e material, sem as quais esse trabalho não teria se concretizado, e pela amizade sincera;

À professora Maria Valdecy pela sua compreensão nos momentos em que precisei me ausentar do trabalho, me dando apoio moral e psicológico para seguir na execução deste projeto.



## RESUMO

*Aedes aegypti* é a principal vetora dos vírus da febre amarela, chikungunya, dengue e zika em regiões tropicais e subtropicais, constituindo importante problema de saúde pública. Essa espécie tem demonstrado alta capacidade adaptativa diante das mais diversas condições, como o desenvolvimento de resistência a piretróides e outros inseticidas, em resposta à elevada capacidade adaptativa a esses compostos químicos. Essa resistência é decorrente de mutações em diferentes sítios do gene do canal de sódio, entre elas a do tipo *Kdr* (*Knockdown resistance*) no sítio 1016, onde o resultado é a substituição de uma Valina por uma Isoleucina (*Val1016Ile*). Estima-se um aumento de 1,4 °C a 5,8 °C na temperatura média global e de 855 a 1300 ppm na concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera até 2100. Essas condições podem ter influência sobre a variabilidade genética do *A. aegypti*, afetando sua capacidade adaptativa, havendo, também, uma grande preocupação quanto à influência que essas condições podem exercer sobre essa mutação (*Val1016Ile*). Nesse trabalho foi analisada a variabilidade genética de quatro populações dessa espécie em quatro bairros de Manaus (Novo Aleixo, Morro da Liberdade, Jorge Teixeira e Lírio do Vale) e de outras duas populações em condições simuladas de aumento de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> (Sala 03: +2,5 °C; +400 ppm e Sala 04: +4,5 °C; +800 ppm), utilizando cinco marcadores RAPD e a mutação *Val1016Ile* do gene *Kdr*. Os resultados mostram que das quatro populações naturais, para RAPD, a de Jorge Teixeira foi a que apresentou maior variabilidade genética ( $P = 82,00$ ;  $H_o = 0,3245$ ;  $H_e = 0,3297$ ) e a de Lírio do Vale, a menor variabilidade ( $P = 74,00$ ;  $H_o = 0,2667$ ;  $H_e = 0,2712$ ). Das populações do Microcosmos (ambiente em condições controladas), a da Sala 03 mostrou maior variabilidade ( $P = 86,00$ ;  $H_o = 0,3293$ ;  $H_e = 0,3336$ ). No entanto, considerando todas as populações analisadas, esta última, mesmo nas condições +2,5 °C e +400 ppm de CO<sub>2</sub>, continuou com maior variabilidade. Este resultado deve-se provavelmente, por essa população ter sido oriunda da mistura de três populações diferentes, e por não ter sua capacidade adaptativa afetada nessas condições de temperatura e pressão de CO<sub>2</sub>. Os dados para estrutura genética das populações mostraram diferenciação genética ( $F_{st} = 0,1331 \pm 0,1072$ ), possivelmente, decorrente do isolamento das populações das salas 03 e 04. A maior similaridade genética observada entre as populações naturais foi entre os bairros Morro da Liberdade e Jorge Teixeira ( $D = 0,0289$ ) e a menor entre Morro da Liberdade e Lírio do Vale ( $D = 0,0831$ ). Para o gene *Kdr*, a frequência do alelo mutante *1016Ile* foi menor que a do alelo selvagem *Val1016* em todas as populações naturais, variando de 0,2069 a 0,4118, sendo completamente ausente nas populações do Microcosmos, mostrando que esse alelo pode estar sendo afetado por seleção negativa das condições do Microcosmos. Esses resultados mostram que os níveis de variabilidade genética dessas populações naturais analisadas foram elevados, estando de acordo com outros trabalhos, registrados anteriormente, em outras populações de Manaus. Os resultados podem estar relacionados a fatores como, seleção natural, deriva genética, endogamia e controle químico. Nas populações do Microcosmos, a menor variabilidade da Sala 04 deve estar relacionada às condições extremas de temperatura e pressão de CO<sub>2</sub>, que excedem os limites toleráveis à capacidade adaptativa do *A. aegypti*.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*, Variabilidade genética, RAPD, *Kdr*.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is the main vector of dengue, zika, chikungunya and yellow fever viruses in tropical and subtropical regions and is an important public health problem. This species has demonstrated high adaptive capacity in the most diverse conditions, such as the development of resistance to pyrethroids and other insecticides, in response to the high adaptive capacity of these chemical compounds. This resistance is due to mutations at different sites of the sodium channel gene, including *Kdr* (*Knockdown resistance*) at site 1016, where the substitution of a Valine by an Isoleucine (*Val1016Ile*) occurs. It is estimated an increase of 1,4 °C a 5,8 °C in the average global temperature and of 855 to 1300 ppm in the concentration of CO<sub>2</sub> in the atmosphere by 2100. These conditions may have influence on the genetic variability of *A. aegypti*, affecting its adaptive capacity, Also, a great concern as to the influence that these conditions can exert on this mutation. In this work, the genetic variability of four populations of this species in Manaus (Novo Aleixo, Morro da Liberdade, Jorge Teixeira and LÍrio do Vale) and two others in simulated conditions of temperature increase and CO<sub>2</sub> concentration: Room 03 (+2.5 °C; +400 ppm) and Room 04 (+4.5 °C; +800 ppm) using five RAPD markers and the *Val1016Ile* mutation of the *Kdr* gene. The results show that of the four natural populations, for RAPD, that of Jorge Teixeira presented the highest genetic variability ( $P = 82.00$ ;  $H_o = 0.3245$ ;  $H_e = 0.3297$ ) and the LÍrio do Vale, the lowest variability ( $P = 74.00$ ;  $H_o = 0.2667$ ;  $H_e = 0.2712$ ). Of the populations of the Microcosmos, that of Room 03 showed greater variability ( $P = 86.00$ ;  $H_o = 0.3293$ ;  $H_e = 0.3336$ ). However, considering all the analyzed populations, the latter, even under the conditions +2.5 °C and +400 ppm of CO<sub>2</sub>, continued with greater variability. This result is probably because this population originated from the mixture of three different populations and because its adaptive capacity was not affected in these conditions of CO<sub>2</sub> temperature and pressure. The genetic structure data of the populations showed genetic differentiation ( $F_{st} = 0.1331 \pm 0.1072$ ), possibly due to the isolation of the populations of rooms 03 and 04. The greatest genetic similarity observed among the natural populations was between the Morro da Liberdade and Jorge Teixeira ( $D = 0.0289$ ) and the lowest between Morro da Liberdade and LÍrio do Vale ( $D = 0.0831$ ). For the *Kdr* gene, the frequency of the *1016Ile* mutant allele was lower than that of the wild-type *Val1016* allele in all natural populations, ranging from 0.2069 to 0.4118, being completely absent in the Microcosm populations. These results show that the levels of genetic variability of these natural populations analyzed were high, according to other studies previously recorded in other populations of Manaus. The results may be related to factors such as natural selection, genetic drift, inbreeding and chemical control. In the populations of the Microcosmos, the lower variability of Room 04 should be related to extreme conditions of CO<sub>2</sub> temperature and pressure, which exceed the limits tolerable by the adaptive capacity of *A. aegypti*. In relation to the *Kdr* gene, the mutant allele (*1016Ile*) presented low frequency in the analyzed natural populations and was absent in the Microcosmos, showing that this allele may be affected by negative sealing of the conditions in the Microcosmos.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, Variabilidade genética, RAPD, *Kdr*.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Primers</i> selecionados para o estudo populacional de <i>A. aegypti</i> por meio de RAPD-PCR.....	30
Tabela 2 – Número de locos (bandas) por <i>primer</i> obtidos em populações de <i>A. aegypti</i> na cidade de Manaus, Amazonas.....	35
Tabela 3 – Estimativa da variabilidade genética em populações de <i>A. aegypti</i> na cidade de Manaus, Amazonas.....	38
Tabela 4 – Matriz de distância e similaridade genética entre populações de <i>A. aegypti</i> da Cidade de Manaus (AM) para RAPD. Valores acima da diagonal correspondem à similaridade genética não enviesada e abaixo da diagonal correspondem à distância genética não enviesada (Nei, 1978).....	39
Tabela 5 – Estimativa da variabilidade genética e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, com base no gene <i>Kdr</i> ( <i>Knockdown resistance</i> ). .....	41
Tabela 6 – Matriz de distância e similaridade genética entre populações de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus (AM) para o gene <i>Kdr</i> . Valores acima da diagonal correspondem à similaridade genética não enviesada e abaixo da diagonal correspondem à distância genética não enviesada (Nei, 1978).....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fêmea de <i>A. aegypti</i> em hematofagia. Detalhe: padrão de lira no dorso. Fonte: Fiocruz.....	4
Figura 2– Mapa da dengue em 2016. As regiões com pontos vermelhos indicam áreas de risco para a doença em 2016, definidas pelo <i>Center for Disease Control and Prevention</i> (CDC), conforme relatos obtidos por organizações de saúde internacionais. Fonte: CDC – <i>Health Map Colaboration</i> – 2016. Disponível em: <a href="http://www.healthmap.org/Dengue/pt/">http://www.healthmap.org/Dengue/pt/</a> .....	5
Figura 3– Ciclo de vida do <i>A. aegypti</i> , mostrando as formas de cada estágio de desenvolvimento. Fonte: <a href="http://www.casadaciencia.com.br/">http://www.casadaciencia.com.br/</a> .....	6
Figura 4 – Esquema de uma sinapse nervosa, indicando as classes de inseticidas que atuam na transmissão axônica (PY e OC) e sináptica (OP, CA e SP). A seta dentro dos neurônios indica o sentido da transmissão do impulso nervoso. $Na_v$ = Canal de sódio-voltagem dependente. Fonte: Aguirre-Obando, (2016) adaptado da <i>Encyclopedia of Insects</i> (2009).....	11
Figura 5 – Topologia transmembranosa do canal de sódio. A subunidade $\alpha$ , formadora do poro, consiste numa cadeia polipeptídica simples formada por quatro domínios internos homólogos (I–IV), cada um possuindo três hélices membranosas (S1 – S6). Os domínios se arranjam para formar um poro central, aquoso, revestidos pelas hélices S5 e S6 e seus linkers (P-loops). As hélices S1 – S4 são responsáveis pela parte sensível à voltagem do canal e se arranjam de modo a formar quatro domínios independentes (VSD). (Apenas dois mostrados na figura) (DAVIES <i>et al.</i> , 2007).....	13
Figura 6– Posição relativa da área de estudo. Fonte: Raphael Lorenzeto de Abreu (2006).....	25
Figura 7– Ovitrapa com infusão de capim colônia ( <i>M. maximus</i> ) e paleta de Eucatex. ....	27
Figura 8– Manutenção dos mosquitos para obtenção das amostras: a) recipiente para desenvolvimento de larva a adulto, b) identificação de adultos, c) diferenças morfológicas entre <i>A. aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> ( <i>Flórida Medical Entomology Laboratory</i> , 1999), d) gaiolas para criação de adultos. ....	28
Figura 9 – Centro de Estudos do projeto Adaptações da Biota Aquática da Amazônia (Adapta) no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (Leem), no Inpa. Salas 03 e 04 do Microcosmos, utilizadas no experimento. ....	29
Figura 10 – Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. aegypti</i> na cidade de Manaus, baseado em análise de RAPD, usando <i>primer</i> OPH-02. De 1 a 5 (Novo Aleixo), de 6 a 10 (Morro da Liberdade), de 11 a 14 (Jorge Teixeira), de 15 a 18 (Lírio do Vale), de 19 a 22 (Sala 03); de 23 a 26 (Sala 04); M = marcador molecular (Ladder100 pb).....	36

Figura 11– Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. aegypti</i> na cidade de Manaus, baseado em análise de RAPD, usando <i>primer</i> OPH-04. De 1 a 5 (Novo Aleixo), de 6 a 10 (Morro da Liberdade), de 11 a 14 (Jorge Teixeira), de 15 a 18 (Lírio do Vale), de 19 a 22 (Sala 03); de 23 a 26 (Sala 04); M = marcador molecular (Ladder100 pb).....	36
Figura 12 – Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. aegypti</i> na cidade de Manaus, baseado em análise de RAPD, usando <i>primer</i> OPH-06. De 1 a 5 (Novo Aleixo), de 6 a 10 (Morro da Liberdade), de 11 a 14 (Jorge Teixeira), de 15 a 18 (Lírio do Vale), de 19 a 22 (Sala 03); de 23 a 26 (Sala 04); M = marcador molecular (Ladder100 pb).....	37
Figura 14 – Dendrograma agrupando as populações de <i>A. aegypti</i> na cidade de Manaus, com base na distância genética, obtida por análise dos marcadores de RAPD. Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética – UPGMA (NEI, 1978). .....	40
Figura 15– Dendrograma agrupando as populações de <i>A. aegypti</i> na cidade de Manaus, com base na distância genética, obtida por análise da mutação <i>Val1016Ile</i> no gene <i>Kdr</i> . Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética – UPGMA (NEI, 1978).....	43

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Considerações gerais .....	4
2.2 Biologia do <i>A. aegypti</i> .....	6
2.3 Controle vetorial de <i>A. aegypti</i> .....	8
2.4 Resistência a inseticidas .....	10
2.5 Variabilidade genética em populações de <i>A. aegypti</i> .....	15
2.6 Influência das mudanças climáticas sobre a variabilidade genética de <i>A. aegypti</i> .....	21
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Geral .....	24
3.2 Específicos.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Caracterização da área de estudo.....	25
4.2 Coleta e obtenção das amostras .....	26
4.3 Estabelecimento e manutenção das populações .....	27
4.3.1 Populações naturais .....	27
4.3.2 Populações experimentais ( <i>Microcosmos</i> ) .....	28
4.4 Análise do material genético .....	29
4.4.1 Extração do DNA genômico .....	30
4.4.2 Amplificação com primers (iniciadores) RAPD.....	30
4.4.3 Amplificação gênica alelo específica do códon 1016 .....	31
4.4.4 Perfil eletroforético dos produtos de RAPD-PCR.....	32
4.4.5 Perfil eletroforético.....	32
4.5 Análises estatísticas .....	32
4.5.1 Determinação das frequências genotípicas e alélicas para marcadores RAPD .....	33
4.5.2 Determinação das frequências genotípicas e alélicas para o gene <i>Kdr</i> (Knockdown resistance) .....	33
4.5.3 Parâmetros genéticos .....	33
4.5.3.1 Estimativa do número de locos polimórficos .....	33
4.5.3.2 Análise de dendrograma .....	33
5 RESULTADOS .....	35
5.1 Análise descritiva dos locos RAPD.....	35
5.2 Análise da variabilidade genética dos marcadores RAPD .....	37
5.3 Estrutura e diferenciação genética das populações.....	38
5.4 Análise da Variabilidade do gene <i>Kdr</i> ( <i>Knockdown Resistance</i> ).....	40

6 DISCUSSÃO .....	44
6.1 Análise descritiva dos locos RAPD.....	44
6.2 Análise da variabilidade genética dos marcadores RAPD .....	46
6.3 Estrutura e diferenciação genética das populações.....	49
6.4 Análise da variabilidade do gene <i>Kdr</i> ( <i>Knockdown resistance</i> ).....	53
7 CONCLUSÃO.....	56

## 1 INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor de arboviroses como febre chikungunya, febre amarela, febre zika e dengue em áreas tropicais e subtropicais, onde sua presença e densidade populacional estão relacionadas ao modo de vida do ser humano e às condições climáticas, constituindo importante problema de saúde pública (SIMOY *et al.*, 2015; BENELLI, 2015).

A dispersão deste mosquito está diretamente ligada a questões sociais e ambientais, como por exemplo elevada densidade populacional humana, expansão urbana, baixo índice educacional e ausência de saneamento básico. Além das questões sociais e ambientais, sabe-se que as questões climáticas desempenham um papel chave na ecologia, desenvolvimento, comportamento e sobrevivência dos mosquitos vetores e dos agentes etiológicos transmitidos por eles e, conseqüentemente, também exercem uma grande influência no risco de transmissão de arboviroses (THAI e ANDERS, 2011).

*A. aegypti* tem demonstrado alta capacidade adaptativa diante das mais diversas situações. Essa capacidade se deve às altas taxas de variabilidade genética encontradas nas populações, uma vez que a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro dessas populações, em função da adaptação ao ambiente (HARTL, 1981).

A variabilidade genética em mosquitos é responsável por diferenças encontradas em populações de uma mesma espécie, de acordo com a região onde está localizada. Tal variabilidade pode ser atribuída à adaptação a diversos fatores, tais como: temperatura, umidade relativa do ar, índice pluviométrico, vegetação; ou até mesmo por ações antrópicas como urbanização, poluição ambiental, desmatamento e o uso de produtos químicos. As condições ambientais, tais como, as variações climáticas desempenham um importante papel para a adaptação de populações de diversos organismos, tornando-os diferentes quando comparamos diferentes populações (HODKINSON, 2005).

As mudanças climáticas têm profunda ligação com os aspectos biológicos e com a adaptabilidade desta espécie (HOFFMANN e SGRÒ, 2011), além de ser um dos principais fatores ambientais capazes de influenciar a epidemiologia das doenças transmitidas por vetores (TABACHNICK 2010). Dessa maneira, diversos trabalhos descrevem a relação entre variáveis climáticas e a incidência de arboviroses (VIANA e IGNOTTI, 2013; BOUZID *et al.*, 2014; CAMPBELL-LENDRUM *et al.*, 2015).



Os estudos demonstram que os principais fatores que estão intimamente associados com a incidência de arboviroses são a temperatura, pluviosidade e umidade do ar, pois estes interferem na reprodução, desenvolvimento, sobrevivência e distribuição do vetor da doença (CÂMARA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2015).

Projeções estimam um aumento de 1,4 °C a 5,8 °C na temperatura média da superfície global até o ano de 2100 (em relação à média 1961-1990), considerando que o uso intensivo de combustíveis fósseis siga o mesmo padrão de anos anteriores (PATZ *et al.*, 2005; IPCC, 2007; IPCC, 2010). O aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico pode causar um impacto nas comunidades ecológicas e em suas interações (planta-animal), provocando uma redução na concentração de nitrogênio e carbono (SMITH *et al.*, 2013), podendo reduzir o crescimento e a sobrevivência do estágio larval, por reduzir a qualidade e a quantidade de alimento nos criadouros (WALTON e REISEN, 2013).

O aumento na temperatura previsto para a Amazônia poderá ser de até 3°C, sendo esperada uma redução de 5% a 20% nos índices de precipitação em vários locais da região. É previsto para o período 2020-2029, que 3,1% da floresta tropical seja substituída por formações do tipo savana, e para o final do século (2090-2099), a área a ser substituída aumentará para 18% (NOBRE *et al.*, 2001; FEARNSIDE, 2008).

O *A. aegypti* tem alta competência vetorial e elevado grau de sinantropia, o que facilita a ocorrência de epidemias, uma vez que as condições favoráveis à sua proliferação são criadas pelo próprio homem. As formas de controle deste vetor sofrem diversas limitações e carecem de maiores informações para o fortalecimento de suas ações. Este mosquito tem demonstrado alta capacidade adaptativa diante das mais diversas situações. Um dos exemplos dessa capacidade é a resistência *Knockdown resistance (Kdr)*.

O meio ambiente influencia fortemente o processo adaptativo do *A. aegypti*, impondo-lhe pressão seletiva. Um dos fatores que poderá afetar sua distribuição e, em consequência, a epidemiologia das doenças que ele transmite é a alteração do clima em cenários futuros.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta um estudo sobre a variabilidade genética em seis populações de *A. aegypti*, onde foram utilizados marcadores moleculares conhecidos como *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* e a mutação *Knockdown resistance (Kdr)*, que leva à substituição de uma Valina por uma Isoleucina no gene codificador dos canais de sódio dependente de voltagem (*AaNa<sub>v</sub>*). Esses marcadores foram avaliados em populações do ambiente natural e de ambientes que simulam cenários de aumento de temperatura e

concentração de CO<sub>2</sub>, para a análise do efeito dessas condições sobre a variabilidade genética das populações.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Considerações gerais

O *A. aegypti* é o principal vetor do dengue (sorotipos D1, D2, D3 e D4), chikungunya, febre amarela e zika, constituindo importante problema de saúde pública. É uma espécie urbanizada, amplamente distribuída em áreas tropicais e subtropicais, cuja presença e densidade populacional estão relacionadas ao modo de vida do ser humano e às condições climáticas (SIMOY *et al.*, 2015).

Este inseto, da ordem Diptera, pertence à família Culicidae, cujo mosquito é conhecido como, pernilongo, muriçoca ou carapanã. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e em geral praticam a hematofagia. Seu desenvolvimento é holometábolo, dividido em quatro estágios bem definidos: ovo, larva (subdividido em quatro estádios), pupa e adulto. Está incluído também na subfamília Culicinae, tribo Aedini, gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia*, espécie *Aedes (Stegomyia) aegypti* (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Na forma adulta é facilmente reconhecido por sua coloração marron-escura e escamas prateadas que formam um padrão semelhante a uma lira em seu dorso, além das escamas brancas que revestem seus fêmures, tíbias e artículos tarsais, formando anéis brancos nas extremidades basais (Figura 1) (SILVA *et al.*, 1997).



Figura 1 – Fêmea de *A. aegypti* em hematofagia. Detalhe: padrão de lira no dorso. Fonte: Fiocruz.

De origem africana, foi descrito pela primeira vez no Egito. Após ter desenvolvido, em seu ambiente primário, elevado grau de sinantropia e antropofilia, essa espécie acompanhou a permanente migração do homem pelo mundo, tornando-se cosmopolita (SILVA *et al.*, 1997).

Sua faixa de ocorrência e distribuição está entre às latitudes 45° Norte e 35° Sul, correspondente à isoterma de inverno de 10° C, coincidindo com as regiões mundiais com risco de dengue (KRAEMER *et al.*, 2015), embora já se tenha registrado sua presença fora dessa faixa, possivelmente, em razão de alterações climáticas (Figura 2). É encontrado em altitudes normalmente abaixo de 1.000 metros, embora sua presença já tenha sido registrada em altitudes acima de 2.000 metros (SUÁREZ e NELSON, 1981).

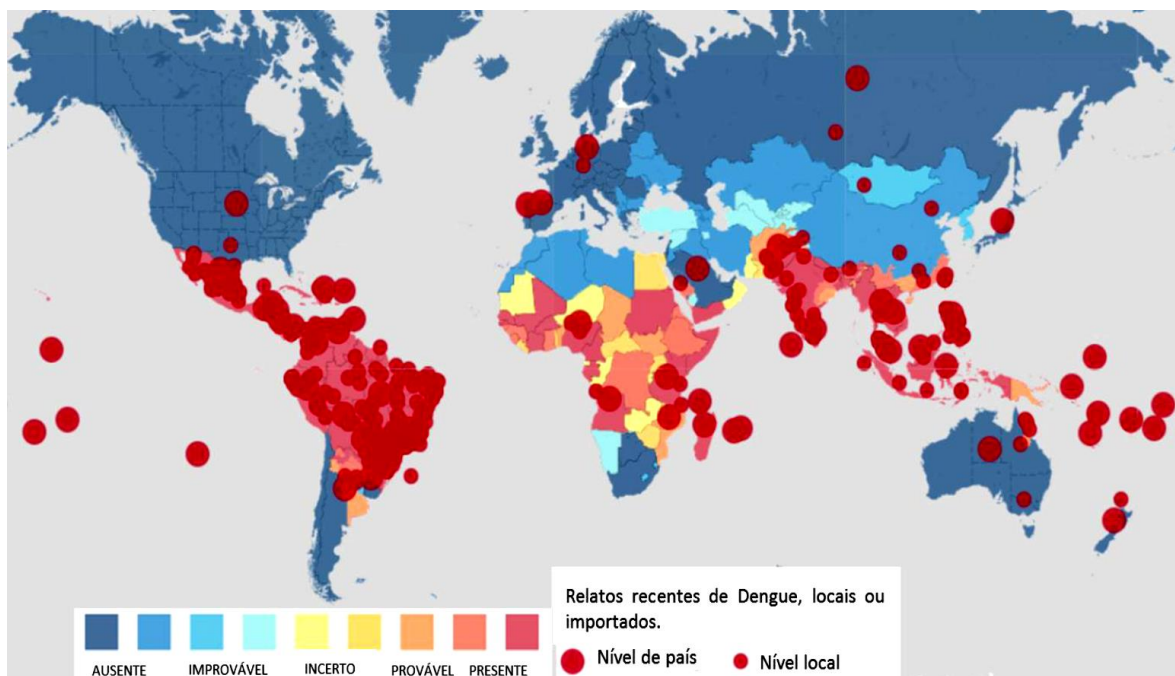


Figura 2– Mapa da dengue em 2016. As regiões com pontos vermelhos indicam áreas de risco para a doença em 2016, definidas pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), conforme relatos obtidos por organizações de saúde internacionais. Fonte: CDC – *Health Map Collaboration* – 2016. Disponível em: <http://www.healthmap.org/Dengue/pt/>

Graças ao intenso comércio mundial, esse vetor foi disseminado pelo mundo, tendo muito provavelmente, sido introduzido nas Américas a bordo de barcos vindos da Europa, que cruzavam o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações europeias ao Novo Mundo (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Os primeiros registros de sua identificação em terras do Brasil foram em 1898, por Lutz, e em 1899, por Ribas (BRAGA e

VALLE, 2007b). O primeiro registro dessa espécie na cidade de Manaus data de 1996 (PINHEIRO e TADEI, 2002).

## 2.2 Biologia do *A. aegypti*

O ciclo de vida do *A. aegypti*, desde o ovo até a forma adulta leva entre oito e dez dias aproximadamente, variando de acordo com a temperatura e a disponibilidade de nutrientes (Figura 3)(CHRISTOPHERS, 1960).

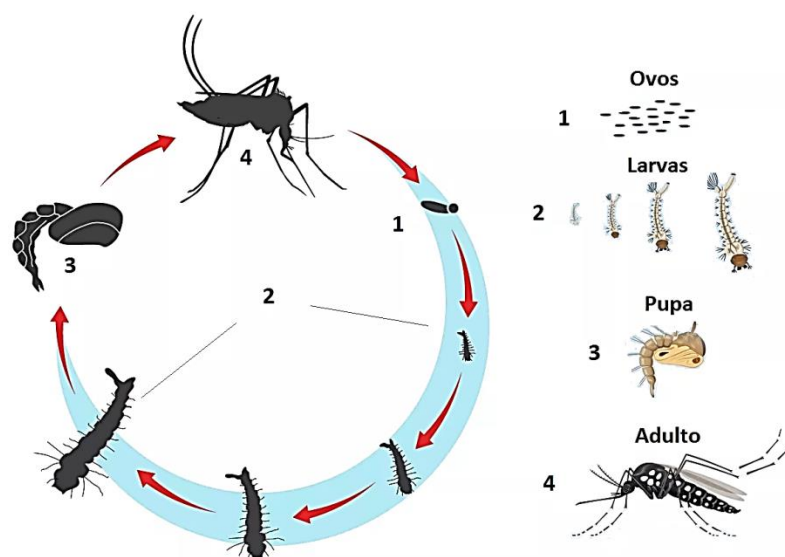


Figura 3– Ciclo de vida do *A. aegypti*, mostrando as formas de cada estágio de desenvolvimento. Fonte: <http://www.casadaciencia.com.br/>.

Os ovos têm aproximadamente um milímetro de comprimento e são depositados em locais úmidos, normalmente acima da linha d'água ou, raramente, na superfície (MADEIRA *et al.*, 2002), de preferência em recipientes artificiais de fundo ou paredes escuras, onde possa haver acúmulo de água. Há indícios da existência de atividade olfativa na escolha dos criadouros, nos quais a água pode variar de limpa até intensamente poluída, de acordo com o grau de atividade bacteriana (REITER *et al.*, 1991; CHADEE *et al.*, 1993). Valença *et al.* (2013) relataram criadouros altamente produtivos, tais como pias de cimento, tanques de água, barris, pneus e outros.

Após o desenvolvimento embrionário (30 a 40 horas depois da oviposição), se as condições não forem favoráveis e a água dos criadouros secar, os ovos podem entrar em diapausa, estado caracterizado pela suspensão temporária da eclosão, resistindo a longos

períodos de seca. A resistência pode ser muito prolongada, podendo chegar a mais de um ano, mantendo-se viáveis até que o contato com a água faça eclodir. A incidência da diapausa tem sido relacionada a fatores extrínsecos que atuam ainda durante a fase larvária da fêmea, tais como, fotoperiodicidade, temperatura e nutrição (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A fase larval, que dura em média seis a oito dias, é a fase de crescimento, na qual as larvas alimentam-se basicamente de microrganismos presentes em seu habitat. Divide-se em quatro estádios. As mudanças de estágio acontecem com a troca da pele, ou exúvia, à medida que seu tamanho aumenta. Embora sendo aquáticas, as larvas utilizam o ar atmosférico como fonte de oxigênio, respirando através de uma estrutura chamada sifão, o qual está ligado ao oitavo segmento abdominal. As larvas de *A. aegypti* possuem um comportamento de fuga da luz, denominado fotofobia, que pode ser utilizado como forma de reconhecimento da espécie (FORATTINI, 1996).

Após o quarto estágio, as larvas transformam-se em pupas. As pupas têm aspecto de vírgula e quando perturbadas, são bastantes móveis, mas em contato com a superfície da água permanecem paradas, a maior parte do tempo. Nesse estágio não há alimentação e a respiração ocorre por estruturas chamadas trompas. Ao final de aproximadamente 48 a 72 horas emerge a forma alada, cuja função primordial é a dispersão e perpetuação da espécie pelo acasalamento, que na fêmea acontece geralmente apenas uma vez durante seu curto período de vida, que dura em média 45 dias (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

*A. aegypti* é considerada uma espécie estenogâmica, ou seja, é capaz de se acasalar em pequenos espaços durante o voo ou pousado sobre uma superfície. O acasalamento pode ocorrer antes ou depois do repasto sanguíneo, mas geralmente é anterior a este. Após a cópula, as fêmeas saem em busca de sangue para maturação de seus ovos. Seu hábito hematógafo se restringe a horários diurnos, sendo seus picos de maior atividade, o amanhecer e o crepúsculo vespertino. Essa espécie é dotada de certo ecletismo em relação à fonte sanguínea para alimentação, mas a espécie humana é a preferida. De acordo com McBride *et al.* (2014) essa preferência está relacionada a modificações adaptativas nos receptores odoríferos, que ajudaram a diferenciar o ser humano de outros mamíferos, através do reconhecimento de um componente do suor humano, a sulcatona (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O).

### 2.3 Controle vetorial de *A. aegypti*

Apesar de vacinas contra febre amarela e dengue já terem sido desenvolvidas, outras para as demais doenças ainda se encontram em fase de testes. No Brasil, o Instituto Butantan em parceria com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos estão na terceira fase de testes clínicos para a produção de uma vacina tetravalente contra a dengue (PRECIOSO *et al.*, 2015). Como ainda não há imunização contra as demais, o combate se baseia essencialmente no controle do vetor.

As medidas de controle do *A. aegypti* incluem: a) controle físico – o acesso do *A. aegypti* é bloqueado pelo armazenamento adequado ou descarte dos materiais que possam acumular água e cobertura dos recipientes de armazenamento de água; b) controle biológico – espécies de peixes do gênero *Poecilia* ou algumas espécies de crustáceos tais como, copépodes ciclopóides podem ser adicionados a tanques, cisternas e tambores de armazenamento de água; c) controle químico – uso de inseticidas/larvicidas em casos de epidemias (WHO, 2006).

Outras medidas alternativas de controle incluem a introdução de indivíduos geneticamente modificados em populações naturais, visando a redução da fertilidade ou da suscetibilidade aos patógenos, além do uso de outros organismo para controle das larvas de *A. aegypti* (DONALÍSIO e GLASSER, 2002).

O uso do inseticida bacteriano, *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *B. sphaericus* teve um aumento em resposta à demanda por compostos seguros e específicos para pragas. Embora estes compostos sejam considerados bioinseticidas, a OMS os inclui com inseticidas químicos como larvicidas para controle de mosquitos (WHO,2006).

Pesquisas em biotecnologia têm proporcionado resultados promissores no combate ao *A. aegypti*. Hoffmann *et al.* (2011) substituíram com sucesso populações de dois bairros de uma cidade da Austrália, por outras de mosquitos infectados com a bactéria *Wolbachia pipientis*, que inibe a transmissão do sorotipo DENV-2.

Harris *et al.* (2012) relataram redução de aproximadamente 80% dos casos de dengue nas ilhas Caimã, ao modificarem geneticamente machos de *A. aegypti*, para que sua prole morresse ainda na fase larval. Experiência similar em Juazeiro do Norte, na Bahia, registrou redução de 96% do número de pessoas infectadas.

DeGennaro *et al.* (2013) ao modificarem um gene específico, ligado à percepção de que esses insetos têm pelos odores, diminuíram sua preferência pelo sangue humano. Abad-Franch *et al.* (2015) utilizaram o próprio mosquito para disseminar Pyriproxyfen (PPF) em

criadouros inacessíveis ao ser humano, e alcançaram uma taxa de mortalidade larval superior a 90% em um bairro da cidade de Manaus.

Os métodos de controle genético ainda não puderam ser incorporados de maneira efetiva a nenhum programa de controle integrado, em grande parte porque dependem de estudos sobre variabilidade genética, uma vez que sua aplicação sofre forte influência de fatores como tamanho e estrutura, bem como, do fluxo gênico entre populações naturais (ENDERSBY *et al.*, 2011).

Apesar dos métodos físicos simples de evitamento do mosquito e do avanço no desenvolvimento de medidas alternativas, os inseticidas ou larvicidas químicos ainda são bastante empregados em programas de controle, devido a sua eficácia e baixo custo, principalmente, em períodos de epidemias (ROSE, 2001).

O desenvolvimento de inseticidas de atividade prolongada ou efeito residual, representou um importante avanço no controle de insetos no século XX, sendo o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), o primeiro deles. Quando aplicado em paredes e tetos de casas, o DDT permanece ativo por vários meses (ROZENDAAL, 1997). Há outros compostos orgânicos como organofosforados, carbamatos e piretróides disponíveis no mercado, os quais têm sido usados nos programas de controle de vetores (MELLON e GEORGHIOU, 1985; RATHBURN JÚNIOR, 1985; PALCHICK, 1996).

Para o controle de larvas, o Ministério da Saúde recomenda os biolarvicidas, reguladores de crescimento (inibidores de síntese de quitina e análogos do hormônio juvenil), espinosinas, organofosforados e piretróides. Para água potável recomenda-se o diflubenzuron, novaluron, BTi, espinosader e o piriproxyfen em substituição ao temefós (organofosforado). O controle de alados é feito por meio da borrifação de deltametrina, lambdacioalotrina e malathion, porém somente durante epidemias ou surtos de dengue. Nas aplicações residuais é usado o bendiocarb (BRASIL, 2014).

O principal problema que surge com o uso indiscriminado dos inseticidas é a resistência das populações de mosquitos a esses compostos (POLANCZYK *et al.*, 2003; LUNA *et al.*, 2004). Existe a necessidade de compreensão dos mecanismos de adaptação e resistência aos inseticidas (BRAGA e VALLE, 2007b).



## 2.4 Resistência a inseticidas

A resistência é definida como a habilidade de um grupo de indivíduos de uma espécie tolerar determinada dose de tóxico que, em condições normais, levaria à morte grande parte dos indivíduos dessa espécie (POLETTI e OMOTO, 2003). Braga e Valle (2007a) explicaram que essa resistência – dita fisiológica – ocorre devido a existência de indivíduos com alelos que lhes conferem resistência a determinados produtos químicos na população. O uso intensivo desses compostos pode atuar como forte pressão seletiva, tendo como consequência a sobrevivência de indivíduos que possuem esses alelos.

A redução da penetração de inseticidas pode ocorrer em função de modificações na composição protéica do integumento (APPERSON e GEORGHIOU, 1975). Esse mecanismo confere baixo nível de resistência, sendo considerado de importância secundária. No entanto, segundo Braga e Vale (2007a), quando associado a outras formas, pode resultar em um incremento da resistência.

Embora ainda não esteja totalmente esclarecido o mecanismo pelo qual ocorre, a alteração comportamental pode ser resultado do processo de seleção natural (PICCOLI, 2010). Nesse tipo de mecanismo, os insetos tornam-se capazes de reconhecer superfícies tratadas com inseticidas, evitando-as. Pode haver redução da invasão domiciliar, ou ainda, modificação do horário de repasto sanguíneo (MATHENGE *et al.*, 2001; PAIVA, 2006).

Enzimas preexistentes em pequenas quantidades em insetos susceptíveis, podem ser alteradas, tornando-se mais eficazes, ou aumentando em quantidade devido a alteração dos processos de regulação que controlam sua produção. Esses mecanismos são responsáveis pela resistência metabólica e aumentam a atividade detoxificante dessas enzimas, capazes de degradar inseticidas a compostos inertes (MATHENGE *et al.*, 2001; PAIVA, 2006).

As enzimas relacionadas com o processo de resistência metabólica são as esterases, oxidases, transferases e outras. A atuação dessas enzimas no aumento da resistência é diretamente proporcional ao nível de expressão das mesmas. De acordo com o tipo de inseticida, um tipo de enzima vai estar relacionada ao processo. Pode-se dividir as enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos em dois grupos: de fase 1 e de fase 2. As de fase 1, como as monooxigenases e esterases atuam diretamente sobre o substrato exógeno, inserindo um grupo polar reativo, preparando-as para as enzimas de fase 2, tais como, as glutathione S-transferases (POLETTI e OMOTO, 2003).

As diferentes classes de compostos químicos inseticidas atuam em diferentes regiões do sistema nervoso central dos insetos. Organoclorados (OC) e piretríóides (PY) agem no axônio, enquanto que organofosforados (OP), carbamatos (CA) e spinosinas (SP) agem na fenda sináptica (Figura 4).

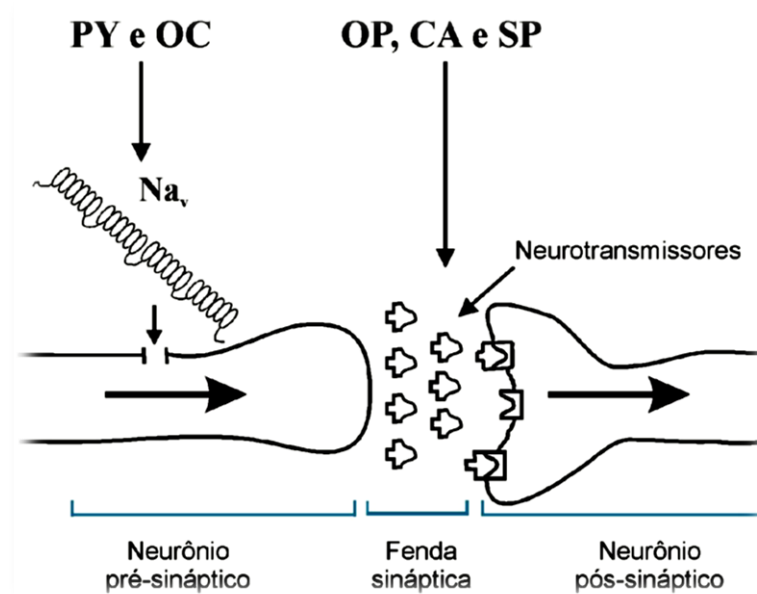


Figura 4 – Esquema de uma sinapse nervosa, indicando as classes de inseticidas que atuam na transmissão axônica (PY e OC) e sináptica (OP, CA e SP). A seta dentro dos neurônios indica o sentido da transmissão do impulso nervoso.  $Na_v$  = Canal de sódio dependente de voltagem. Fonte: Aguirre-Obando, (2016) adaptado da *Encyclopedia of Insects* (2009).

O metabolismo oxidativo é implicado como principal mecanismo de resistência em várias classes de inseticidas, além de ser o mecanismo mais comum. As monooxigenases dependentes de citocromo P450 estão associadas ao metabolismo oxidativo. As esterases atuam especificamente na detoxificação de compostos organofosforados (CONYERS *et al.*, 1998).

Todos os inseticidas químicos atuam sobre o sistema nervoso central (SNC), em diferentes sítios-alvo. Mudanças nas estruturas destes sítios, provocadas por alterações nos genes que os codificam, diminuem a afinidade por inseticidas, dificultando ou mesmo impedindo a ligação do composto. Tais mudanças caracterizam outro tipo de resistência, presente na enzima acetilcolinesterase (AChE), nos receptores neuronais do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e nos canais de sódio dependente de voltagem ( $Na_v$ ) (HEMINGWAY *et al.*, 2004).

A acetilcolina abre os canais de sódio nas células pós-sinápticas, promovendo a propagação do impulso nervoso. Em condições normais, o estímulo cessa com a recaptação ou com a degradação enzimática deste neurotransmissor pela acetilcolinesterase (AChE). A ação de carbamatos e organofosforados inibe esta enzima e o impulso não cessa, levando o inseto à morte. A resistência nestes casos, decorre da redução da afinidade da AChE pelo inseticida, permitindo o ciclo normal ou quase do estímulo nervoso (FERRARI, 1996; FRENCH-CONSTANT *et al.*, 1998; HEMINGWAY e RANSON, 2000).

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) aumenta a permeabilidade das membranas aos íons cloro para dentro da célula nervosa, retornando o sistema nervoso ao estado de repouso, após excitação. Os ciclodienos e os policloroterpenos (organoclorados) têm como sítios-alvos os receptores do GABA, presentes em junções sinápticas neuromusculares e do SNC de insetos. O inseticida impede a passagem de íons cloro para o meio intracelular, provocando contração muscular, paralisia e morte. A resistência decorre da insensibilidade dos receptores de GABA ao inseticida e, se verificou que está relacionada à mutação de um único par de bases do receptor, onde ocorre a substituição de alanina por serina (HEMINGWAY e RANSON, 2000).

O uso de inseticidas em larga escala e sem controle rigoroso da aplicação favoreceu o aparecimento de distintos mecanismos de resistência (DIAS e MORAES, 2014). Entre os mecanismos biológicos associados à resistência aos inseticidas químicos, dois são os mais frequentes: o aumento na taxa de metabolismo do inseticida pelo inseto e as alterações nos sítios-alvo de ação dos compostos químicos, diminuindo sua afinidade por eles. Esse último é conferido ao inseto por uma ou várias mutações, sendo que uma das mais importantes, conhecida como *Knockdown resistance (Kdr)*, confere resistência aos inseticidas piretróides e ao DDT. A ligação destes inseticidas com os canais  $Na_v$  prolonga a abertura das portas de ativação e atrasa o fechamento das portas de inativação, levando à contínua propagação do impulso nervoso e consequente morte do inseto.

O funcionamento normal dos canais  $Na_v$  é fundamental para a propagação de impulsos nervosos. Esses canais são proteínas transmembranares formadas por quatro domínios iguais entre si, com seis segmentos cada (Figura 5) (LOUGHNEY *et al.*, 1989; MARTINS *et al.*, 2009). Uma despolarização torna a membrana mais positiva e abre as portas de ativação dos canais para entrada de sódio. Próximo ao grau máximo de despolarização, as portas de inativação se fecham, cessando o estímulo.

Esses canais são os principais sítios-alvos de piretróides e alguns organoclorados como o DDT e o hexaclorociclohexano (BHC). A ligação destes inseticidas com os canais  $Na_v$

prolonga a abertura das portas de ativação e atrasa o fechamento das portas de inativação, levando à contínua propagação do impulso nervoso e consequente morte do inseto. Uma redução na sensibilidade dos canais  $Na_v$  a inseticidas causa o fenótipo da resistência (BLOOMQUIST, 1993; HEMINGWAY e RANSON, 2000; WARE e WHITACRE, 2004).

Esse importante mecanismo de resistência, conhecido como *Knockdown resistance* ou *Kdr*, ocorre devido a uma redução de 10 a 20 vezes na sensibilidade dos canais  $Na_v$  a piretróides (DAVIES *et al.*, 2008) e já foi relatado em várias espécies de insetos (VAIS *et al.*, 2000). O termo *Kdr* é empregado quando o inseto perde a coordenação, após exposição ao inseticida, e recupera-se logo em seguida (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; GARCÍA *et al.*, 2009).

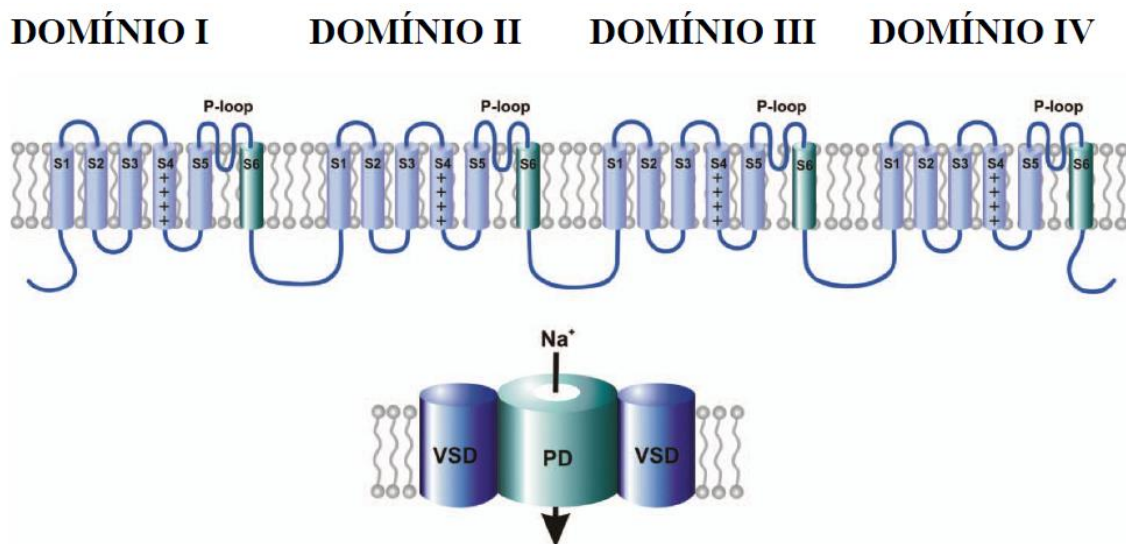


Figura 5 – Topologia transmembranosa do canal de sódio. A subunidade  $\alpha$ , formadora do poro, consiste numa cadeia polipeptídica simples formada por quatro domínios internos homólogos (I–IV), cada um possuindo três hélices membranas (S1 – S6). Os domínios se arranjam para formar um poro central, aquoso, revestidos pelas hélices S5 e S6 e seus *linkers* (P-loops). As hélices S1 – S4 são responsáveis pela parte sensível à voltagem do canal e se arranjam de modo a formar quatro domínios independentes (VSD). (Apenas dois mostrados na figura) (DAVIES *et al.*, 2007).

O *Kdr* em *A. aegypti* ocorre devido a mutações nos códons do gene que codifica os canais de sódio dependente de voltagem ( $AaNa_v$ ), impedindo que o inseticida mantenha aberto esses canais nas membranas das células nervosas do inseto, levando a uma redução na sensibilidade do  $Na_v$  a inseticidas, causando o fenótipo da resistência (DONG *et al.*, 2014; ISHAK *et al.*, 2015). Saavedra-Rodrigues *et al.* (2008) demonstraram, em um estudo para

detecção de loci controladores de características quantitativas (QTL), que o gene do canal de sódio em *A. aegypti* está localizado no cromossomo III.

Os estudos sobre as alterações genéticas associadas ao *Kdr* revelaram diversas mutações associadas à piretróides (mais de 20) em diferentes posições do gene e em várias espécies de insetos como, *Musca domestica* (WILLIAMSON *et al.*, 1996), *Anopheles gambiae* (MARTINEZ-TORRES *et al.*, 1998) e *Blattella germanica* (TAN *et al.*, 2002). A maioria dessas mutações ocorre no domínio II dos canais de  $Na_v$  (SODERLUND e KNIPPLE, 2003). A mais comum associada à resistência a piretróides é a substituição de uma leucina por uma fenilalanina no segmento 6 (S6) (WILLIAMSON *et al.*, 1996; MARTINEZ-TORRES *et al.*, 1998).

No entanto, ao analisar genes de populações de *A. aegypti* de várias regiões do mundo, Brengues *et al.* (2003) verificaram ausência da substituição da leucina por fenilalanina e detectaram outras mutações no S6 do domínio II em mosquitos resistentes. Também encontraram *Ile1011Met* associada a *Gly923Val* em populações de Belém/PA e a *Leu982Trp* em populações do Vietnã, ambas as substituições correlacionadas com baixa susceptibilidade a piretróides.

Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007) e Rajatileka *et al.* (2008) encontraram, além da alteração *Ile1011Met*, a alteração *Ile1011Val* em populações da América Latina e da Tailândia. Estas mutações, no entanto, quando submetidas à pressão seletiva com piretróides não mostraram relação com resistência. Martins *et al.* (2009) identificaram a mesma alteração *Ile1011Met* em populações do Nordeste e Sudeste do Brasil.

Outras alterações foram identificadas no sítio 1016, *Val1016Ile* e *Val1016Gly* em populações da América Latina e da Ásia, respectivamente. A frequência do alelo *1016Ile* elevou-se drasticamente em poucas gerações, quando populações de *A. aegypti* de Cuba e México foram submetidas a pressão seletiva em laboratório (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

Outras mutações como *Asp1794Tyr* em conjunto com *Val1016Gly* foram identificadas fora do domínio II (CHANG *et al.*, 2009). *Val1016Gly* já havia sido descrita em populações de *A. aegypti* da Ásia (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

As mutações que conferem resistência a inseticidas químicos fornecem elementos pontuais para a análise da variabilidade genética, além de servirem de base para tomada de

decisões em políticas públicas de controle do *A. aegypti* em determinados locais, onde há aumento da resistência a determinado composto (LINSS *et al.*, 2014).

A razão pela qual as medidas de controles físico, biológico e químico não têm conseguido reduzir com sucesso a população de *A. aegypti*, em grande parte se deve à alta capacidade adaptativa desta espécie às modificações ambientais. Essa capacidade é reflexo das altas taxas de variabilidade genética das populações. Os métodos de controle genético ainda não puderam ser incorporados de maneira efetiva a nenhum programa de controle integrado, em grande parte porque dependem de estudos sobre variabilidade genética, uma vez que sua aplicação sofre forte influencia de fatores como tamanho e estrutura, bem como do fluxo gênico entre populações naturais (ENDERSBY *et al.*, 2011).

## **2.5 Variabilidade genética em populações de *A. aegypti***

Em geral, os alelos de um gene em uma população não estão em frequências iguais e diferem entre as populações ao longo da distribuição da espécie. Alguns alelos são mais comuns que outros e suas frequências podem ser alteradas pela ação de forças externas, tais como, seleção por variação ambiental, cruzamentos aleatórios em populações de tamanho pequeno (deriva genética) e fluxo gênico por migração. O conhecimento do padrão de distribuição da diversidade genética das espécies é fundamental para compreensão de sua biologia e história evolutiva (PATARRO *et al.*, 2013).

A variabilidade genética em mosquitos é responsável por diferenças encontradas em populações de uma mesma espécie de acordo com a região onde está localizada. Tal variabilidade pode ser atribuída à adaptação a diversos fatores, tais como: temperatura, umidade relativa do ar, índice pluviométrico, vegetação; ou até mesmo por ações antrópicas como urbanização, poluição ambiental, desmatamento e o uso de produtos químicos. As condições ambientais, tais como, as variações climáticas desempenham um importante papel para a adaptação de populações de diversos organismos, tornando-os diferentes quando comparamos diferentes populações (HODKINSON, 2005).

O *A. aegypti* têm demonstrado alta capacidade adaptativa diante das mais diversas situações. Essa capacidade deve-se às altas taxas de variabilidade encontradas nas populações, uma vez que a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro dessas populações, em função da adaptação ao ambiente (HARTL, 1981). As mudanças climáticas têm profunda

ligação com os aspectos biológicos e a evolução adaptativa desta espécie (HOFFMANN e SGRÒ, 2011).

Nas últimas décadas, vários marcadores moleculares vêm sendo utilizados pelos geneticistas no desenvolvimento da genética de população, citogenética e biologia molecular de várias espécies de mosquitos transmissores de doenças. Entre elas, *A. aegypti* tem sido uma das mais estudadas neste aspecto, por ser facilmente mantida e manipulada em laboratório (RAI *et al.*, 1974).

Fraga *et al.* (2003) ao avaliar dezoito locos enzimáticos em populações de *A. aegypti* de quatro bairros (Compensa, Cidade Nova, Centro e Coroado) de Manaus-AM, detectaram que 45% dos locos analisados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a maioria deles na Compensa. Essas populações apresentaram diferenciação interpopulacional significativa (4,88%), embora as populações tenham apresentado elevada similaridade genética ( $D = 0,003$  a  $0,016$ ).

Santos *et al.* (2003) estudando as relações genéticas entre populações de *A. aegypti* de diferentes regiões do Estado de São Paulo, utilizando este mesmo marcador, baseado em seis *primers*, detectaram 58 locos. No entanto, Ayres *et al.* (2003) analisando a diferenciação genética de populações dessa espécie procedentes de cinco estados brasileiros e uma da Florida, Estados Unidos detectaram menor número de locos (47) variando de 120 a 2200 pb, utilizando apenas quatro *primers*. Corroborando com estes dados, Sousa *et al.* (2001) estudaram a estrutura genética desta espécie na Argentina, selecionando três *primers* que revelaram 17 bandas variando de 500 a 2000 pb. Entretanto, Paduan *et al.* (2006), também por meio de RAPD, estudaram a variabilidade desta espécie com populações provenientes de seis estados brasileiros e uma de Rockefeller, Porto Rico. Os cinco *primers* selecionados revelaram 21 bandas variando de 250 a 1500 pb.

Bracco *et al.* (2007)), em um estudo sobre variabilidade genética de *A. aegypti* nas Américas, analisaram o parentesco genético e a estrutura filogeográfica dessa espécie das Américas, África e Ásia e identificaram 14 haplótipos exclusivos para as Américas, quatro para África/Ásia, um para Américas/África e um para Américas/Ásia. Foram realizados testes para inferir os processos históricos e evolutivos e para estimar as relações filogenéticas entre estes haplótipos. Testes com esses haplótipos apontaram 3% de divergência, que pode apoiar a ocorrência de duas espécies de *A. aegypti* nas Américas.

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

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

Endersby *et al.* (2011) analisando populações de *A. aegypti* a partir de oito marcadores genéticos, sendo três microssatélites (Gyp8, AC1 e AG5), duas proteínas ribossomais (Rps20b e RpL30) e três locos (BbA10, BbhH08 e BbB07), durante as estações seca e úmida, nas cidades australianas de Chillagoe, Charters Tower e Ingham, verificaram que essas cidades apresentaram populações parcialmente isoladas geneticamente, em ambas as estações. Essa característica populacional torna estes locais ideais para lançamentos de estirpes benignas, em estudos de substituição da espécie. Essa forma de controle sofre influência do tamanho e estrutura, bem como, do fluxo gênico das populações selvagens de *A. aegypti*.

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



variações de temperatura e pluviosidade anuais, o que indica que novas perspectivas em métodos de controle deste vetor, devem ser adquiridas.

Patarro *et al.* (2013) estimaram a variabilidade genética de cinco populações de *A. aegypti*, sendo quatro do Brasil e uma dos EUA, e obtiveram 165 locos polimórficos de DNA. As análises mostraram elevado valor da diversidade genética interpopulacional ( $G_{st} = 0,277$ ), segundo a classificação de Wright. Quando comparadas aos pares, essas populações apresentaram valores de  $G_{st}$  que variaram de 0,044 – 0,289. Esse padrão, além de acompanhar o distanciamento geográfico entre as populações, pode estar relacionado com a atividade comercial intensiva em algumas das cidades daquelas populações. Outro fator que pode ter influenciado no alto valor da diversidade interpopulacional é a resistência a inseticidas, pois as populações estudadas foram previamente selecionadas de acordo com esse critério.

Brown *et al.* (2014) obtiveram amostras de *A. aegypti* de 21 localidades, que representavam 13 países em torno do mundo, para investigar a dispersão global destes mosquitos. Foram utilizados quatro genes nucleares e 1.504 SNPs para testar a hipótese de que essa espécie originou na África, onde uma forma doméstica surgiu e se espalhou por todo o mundo tropical e subtropical, com o comércio e movimentação humana. Os resultados confirmaram ascendência africana das espécies, e indicaram um único evento de subespeciação pantropical. Além disso, os dados genéticos apoiaram fortemente a hipótese de que as rotas comerciais humanas transportaram *A. aegypti* domiciliado para fora da África em direção ao Novo Mundo, e posteriormente ocorreu uma nova invasão destes mosquitos do Novo Mundo para o Sudeste da Ásia e do Pacífico.

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

No estudo de variabilidade genética, um método baseado na amplificação do polimorfismo do DNA usando *primers* (iniciadores) arbitrários (RAPD), tem sido bastante utilizado. Essa técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos, mas Williams *et al.* (1990) patentearam a tecnologia. É uma variação da técnica de PCR, caracterizada por utilizar apenas um *primer*, ao invés de um par, sendo este arbitrário,

que amplifica regiões desconhecidas da molécula de DNA, utilizadas para a verificação de polimorfismo genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Essa técnica não necessita do conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada, possibilita um maior número de marcadores possíveis de serem mapeados, aumentando a possibilidade de identificar grupos de ligação (linkage) relacionados a caracteres quantitativos (QTL's) (WILLIAMS *et al.*, 1990). Além disso, ela permite:

- A análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, em populações de melhoramento e bancos de germoplasma;
- O estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies;
- A construção de mapas genéticos (RAFALSKI *et al.*, 1991; CAETANO-ANNÓLES *et al.*, 1991; WILLIAMS *et al.*, 1993).

A estratégia é utilizar um oligonucleotídeo de 10-15 bases, como iniciador para amplificar o DNA genômico, empregando a reação em cadeia da polimerase (desnaturação, anelamento e extensão enzimática) (KAMBHAMPATI *et al.*, 1992).

Para que haja amplificação, é necessário que a seqüência nucleotídica reconheça um sítio de homologia em uma das fitas com a mesma seqüência, porém com orientação invertida na outra fita da molécula de DNA dentro do intervalo limite da PCR – 4 Kilobases (Kb). Os oligonucleotídeos dispostos nas extremidades da seqüência a ser amplificada fornecem a extremidade 3' livre para a atuação da DNA Polimerase. A reação é aquecida a 90-95°C, para permitir a desnaturação dos oligonucleotídeos aos sítios apropriados no DNA molde. Sofre um resfriamento entre 36-42°C para permitir o anelamento dos oligonucleotídeos, que irão se ligar nas fitas originais de DNA e também nas sintetizadas nos ciclos anteriores (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Em função da grande quantidade de DNA produzido pela reação, os segmentos podem ser visualizados diretamente na forma de bandas num gel de eletroforese. A eletroforese é geralmente conduzida em gel de agarose e a visualização é feita com brometo de etídeo, em luz ultravioleta (KAMBHAMPATI *et al.*, 1992).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do *primer* com o sítio de iniciação, e assim, impedir a amplificação de um segmento (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que permite a DNA Polimerase percorrer ( $< 4000$  pares de bases - pb). Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Uma caracterização fundamental dos marcadores RAPDs é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes. Dominância, nesse caso, não se refere ao conceito clássico da interação gênica entre os alelos de um mesmo loco, e sim puramente do ponto de vista da interpretação relativa entre o genótipo e o fenótipo de um indivíduo. Portanto, ao se observar uma banda RAPD no gel, não é possível distinguir se aquele segmento se originou a partir de uma ou de duas cópias da seqüência amplificada (PUTERKA *et al.*, 1993).

Ayres *et al.* (2003), investigando níveis de estrutura genética em populações de *A. aegypti* de estados brasileiros, inclusive do Amazonas, a partir de marcadores RAPD, revelaram valores maiores de polimorfismo, com percentagem de locos polimórficos de até 100% e heterozigosidade média esperada similar, variando de 0,243 a 0,300

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

Santos *et al.* (2011), ao analisar a variabilidade genética de quatro populações dessa espécie, procedentes de Manaus/AM, revelaram 52 bandas (locos), com variação entre 300 a 2.072 pb, utilizando também cinco *primers*. Todavia, Apostol *et al.* (1996), quando analisaram populações coletadas em 16 bairros de seis cidades, em Porto Rico, utilizando também cinco *primers*, revelaram 57 locos RAPD variando de 184 a 1531 pb.

Ashraf *et al.* (2016) utilizando marcadores RAPD em populações de *A. aegypti* nas cidades de Faisalabad and Lahore no Paquistão mostraram que a relação genética e o valor de Nm (número de migrantes) apontam que essas populações exibem fluxo gênico intrapopulacional, embora ambas as cidades exibem padrão distinto na estrutura genética. No entanto, poucas áreas em ambas as cidades mostram semelhança genética.

Os fatores que alteram o padrão de variabilidade genética do *A. aegypti* são de especial interesse porque suas características biológicas o tornam intimamente relacionado com o modo

de vida humano. Sua distribuição e expansão é altamente influenciada pela atividade humana, principalmente, pelo transporte de ovos e larvas por meio do transporte de objetos tais como, pneus e outros recipientes. Além do mais, suas populações estão sujeitas a pequenas variações devido à aplicação de programas de controle, principalmente, pelo uso de inseticidas e eliminação de criadouros. Em consequência, os fatores que afetam diretamente sua variabilidade podem ser diretamente influenciada pelo comportamento humano (PATARRO *et al.*, 2013).

Dos fatores que influenciam a variabilidade genética de populações de *A. aegypti*, o clima merece destaque. Estudos têm mostrado que esta espécie sofrerá profundas alterações em seus aspectos biológicos, comportamentais e na sua distribuição geográfica, favorecendo epidemias de doenças em cenários futuros de mudanças climáticas. As mudanças climáticas têm profunda ligação com os aspectos biológicos e a evolução adaptativa desta espécie (HOFFMANN e SGRÒ, 2011).

## **2.6 Influência das mudanças climáticas sobre a variabilidade genética de *A. aegypti***

A preocupação com as condições climáticas e a propagação de doenças remonta ao Século XVI a.C. A partir desse período, para os filósofos pré-socráticos, o meio ambiente passou a ser entendido como desempenhando um papel importante na saúde e doenças. Um século depois, a obra *Ares, Águas e Lugares*, de Hipócrates, correlacionou uma série de sintomas e doenças, como a malária, por exemplo, com as condições geográficas e meteorológicas. Segundo Hipócrates, essas doenças ocorriam devido ao efeito das mudanças sazonais em águas paradas de locais pantanosos.

Esses conceitos resultaram na crença de que um estado patológico da atmosfera está associado a doenças infecciosas. Esta linha de pensamento se desenvolveu e resultou na Teoria Miasmática do Contágio. O ar tornaria-se contaminado com “miasmas”, vapores tóxicos produzidos pela putrefação da matéria orgânica e uma pessoa poderia se infectar ao entrar em contato com esse ar. Essa teoria perdurou até o século XIX, quando o químico Louis Pasteur (1822-1895) propôs a Teoria dos Germes de Doenças, sustentando que os microrganismos são a causa de várias doenças (KARAMANOU e PANAYIOTAKOPOULOS, 2012).

Embora hoje se saiba que microrganismos sejam a causa, sabe-se também que as condições climáticas continuam a desempenhar papel relevante na propagação de doenças. Isso porque, com frequência, esses microrganismos necessitam de outros organismos como vetores.

Populações naturais estão respondendo às mudanças climáticas, deslocando sua distribuição geográfica, época de crescimento e reprodução. Essas mudanças, por sua vez, alteram a composição das comunidades e a natureza das interações entre as espécies (HOFFMANN; SGRÒ, 2011).

Os mosquitos são organismos pecilotérmicos, sujeitos à variação climática, que sofrem influência direta em sua temperatura corporal e são altamente adaptáveis às alterações extremas do ambiente (HAWLEY, 1988; JOSH, 1996; JULIANO, 2009; COURET e BENEDICT, 2014; BREAUX *et al.*, 2014). Entre as características que sofrem alteração está a competência vetorial, controlada por fatores genéticos e ambientais (WHO, 2012; LANA *et al.*, 2014).

Desde o final do século XIX, a superfície terrestre aqueceu cerca de 0,6 °C. Com base na tendência de aumento do uso de combustíveis fósseis, conforme em anos anteriores, Patz *et al.* (2005) estimaram que temperatura média da superfície global se elevaria entre 1,4 °C a 5,8 °C até 2100. Para a Amazônia esse aumento pode atingir até 3 °C, com redução do índice de precipitação de 5% a 20% em várias regiões e substituição de 3,1% da floresta tropical por savana até 2029 e de 18% até o final do século (NOBRE e SALAZAR, 2007; FEARNESIDE, 2008).

A temperatura tem efeito direto sobre a biologia do *A. aegypti*. O período de desenvolvimento do mosquito e o tempo de incubação do vírus tornam-se mais curtos em ambientes mais quentes, o que pode levar a um aumento da população e do número de ovos produzidos em curto espaço de tempo (MOHAMMED e CHADEE, 2011; CHAVES *et al.*, 2014). Como consequência da redução do ciclo desse vetor, pode ocorrer aumento do número de infecções e da duração das epidemias (SHOPE, 1991).

Um importante fator atmosférico que tem impacto sobre as comunidades ecológicas e nas interações planta-animal é o CO<sub>2</sub>. Seu aumento reduz a quantidade de carbono e nitrogênio disponível (SMITH *et al.*, 2013) e pode levar a uma redução do crescimento e da taxa de sobrevivência das larvas de *A. aegypti*, devido à baixa qualidade e quantidade de alimento nos criadouros (WALTON e REISEN, 2013).

Outro parâmetro climático é a umidade relativa do ar, que está associado ao índice de precipitação. Essa relação interfere na quantidade de criadouros, havendo influência no vôo, na busca pelo hospedeiro para o repasto sanguíneo (KHORMI *et al.*, 2011) e também sobre o tamanho corporal do mosquito, ainda durante o estágio de ovo (VARGAS *et al.*, 2010).

Rowley e Graham (1968) verificaram que, em respostas a essas alterações ambientais, houve redução no número e na viabilidade dos ovos, nas taxas de eclosão e no tempo de vida das fêmeas. A interferência destes fatores se dá tanto para a dinâmica populacional do mosquito, quanto para os patógenos por ele transmitidos (MOHAMMED e CHADEE, 2011), principalmente, alterando a distribuição dessas populações e sua relação com outros organismos (HOFFMANN e SGRÒ, 2011).

Ainda são poucos os estudos sobre aspectos da biologia do *A. aegypti*, principalmente, sobre a sua estrutura populacional sob os efeitos das mudanças climáticas (TSUDA and TAKAGI, 2001; VARGAS *et al.*, 2010; HUGO *et al.*, 2014).

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças do Clima (IPCC) prevê que o aquecimento global seja contínuo e acelerado, resultando em um aumento de 2° a 4°C na temperatura média global, durante o próximo século (IPCC, 2007; IPCC, 2010). O ano de 2014 foi considerado o mais quente de todos os tempos, atingindo 0,57 °C a mais, sem influência do *El Niño*, que eleva naturalmente as temperaturas nos trópicos (World Meteorological Organization, 2015). Alterações climáticas resultarão em mudanças significativas nas paisagens e nos padrões ecológicos das doenças infecciosas (CIOTA *et al.*, 2014). Loetti *et al.* (2011) verificaram que em decorrência do aumento na temperatura global, haverá maior sensibilidade aos patógenos transmitidos por vetores. Chaves (2012, 2014) estudando a frequência dos casos de dengue ao longo de três anos, encontraram relação entre as mudanças no clima com a ocorrência de surtos e o aumento da população do mosquito.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Analisar a variabilidade genética do *Aedes aegypti* em quatro populações naturais e duas submetidas a condições experimentais (Microcosmos) de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub>, com base na frequência da mutação *Val1016Ile* no gene do canal de sódio e de cinco marcadores RAPD.

#### 3.2 Específicos

- ✓ Estimar a variabilidade genética, utilizando marcadores RAPD e verificar o nível de diferenciação genética entre as populações.
- ✓ Relacionar a presença/ausência da mutação *Val1016Ile* no gene do canal de sódio nas amostras estudadas com a ocorrência ou não de resistência do tipo *Kdr*;
- ✓ Estimar a frequência do alelos *Val1016* e *1016Ile* no gene que codifica o canal de sódio nas populações estudadas;
- ✓ Analisar a influência da temperatura e da concentração de CO<sub>2</sub> na variabilidade genética das populações naturais e das populações do Microcosmos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Inpa), na cidade de Manaus-AM, e desenvolvido em quatro etapas: (1) Coleta, (2) Estabelecimento e manutenção das populações, (3) Extração e análise do material genético e (4) Análises estatísticas.

De modo geral, as populações de *A. aegypti* analisadas foram agrupadas em duas classes, uma natural e outra mantida de maneira experimental. As populações naturais foram obtidas a partir de coletas de ovos em quatro bairros de Manaus e, as experimentais, de populações mantidas em ambientes experimentais no Centro de Estudos do projeto Adaptações da Biota Aquática da Amazônia (Adapta) no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (Leem), no Inpa.

### 4.1 Caracterização da área de estudo

O município de Manaus, com área de 11.401,08 km<sup>2</sup>, está localizado ao Norte do Brasil e a Leste do Estado do Amazonas (Latitude: -3.10719 Sul, longitude: -60.0261 Oeste) (Figura 6). Possui 63 bairros, divididos entre seis zonas urbanas: Norte, Sul, Centro-Sul, Leste, Oeste e Centro-Oeste (MANAUS, 2014). Em 2015, sua população era estimada em 2.057.711 de habitantes, cerca de 14% maior que em 2010. Sua densidade demográfica é de 158,06 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2016).

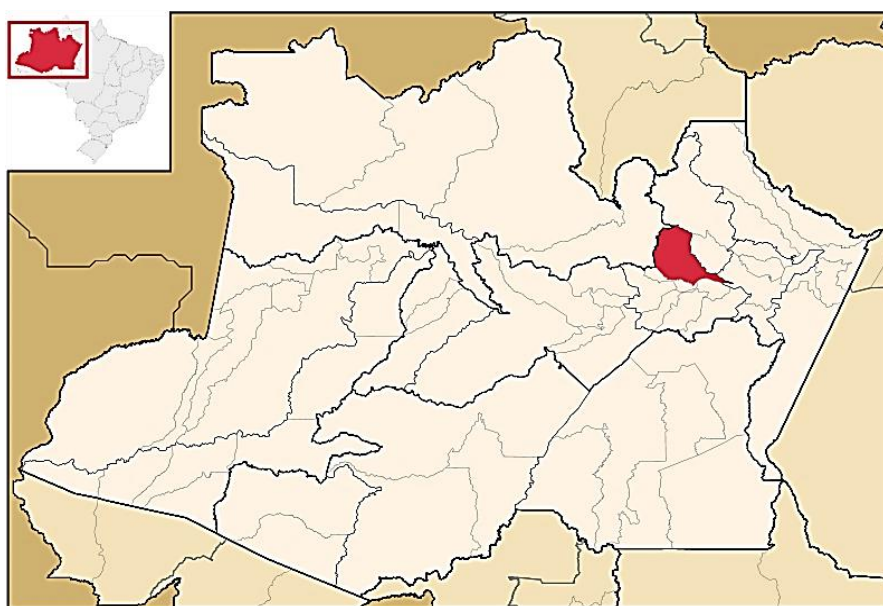


Figura 6– Posição relativa da área de estudo. Fonte: Raphael Lorenzeto de Abreu (2006).



De acordo com a classificação de Köppen-Geiger o clima da região é caracterizado como tropical de monção (AM), apresentando chuvas no verão e temperaturas médias elevadas entre 25,6 °C a 27,6 °C, com precipitação anual entre 1.355 a 2.839 mm e umidade relativa do ar variando de 84% a 90% ao longo do ano; os meses mais chuvosos são de dezembro a maio, e os mais secos de agosto a novembro (RADAM, 1978).

## 4.2 Coleta e obtenção das amostras

A coleta das populações naturais foi realizada nos meses de dezembro de 2015 a maio de 2016 (período de maior índice pluviométrico na região), levando-se em consideração a série de resultados do Levantamento Rápido de Índices para *A. aegypti* (LIRAA) no triênio 2013 – 2015, para escolha dos bairros. O LIRAA fornece os índices de infestações larvários predial (IIP) e de Breteau (IB) e inclui dados referentes aos tipos de recipientes. Esses levantamentos identificam bairros, onde há maior concentração de focos de reprodução do mosquito e é usado para determinação do grau de risco para dengue, chikungunya e zika.

De cada zona (Norte, Sul, Leste e Oeste) foi selecionado o bairro que manteve IIP e IB mais alto durante 2013 – 2015, de modo a permitir uma abrangência e um distanciamento amplo entre os pontos de coleta. Os bairros selecionados para as coletas estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Bairros selecionados de acordo com o LIRAA (2013-2015)

<b>Zona</b>	<b>Bairro</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>
Norte	Novo Aleixo	
Sul	Morro da Liberdade	
Leste	Jorge Teixeira	
Oeste	Lírio do Vale	

Foram distribuídas 10 armadilhas de oviposição em cada bairro, no peri e intradomicílio das residências e lá permaneceram por cinco dias. Estas armadilhas, conhecidas como ovitrampas (FAY e PERRY, 1965), são compostas por recipientes escuros, contendo infusão de capim colônio (*Megathyrus maximus*) (REITER *et al.*, 1991) e um material áspero fixado em seu interior (neste trabalho foram usadas paletas de Eucatex), que permite a aderência dos ovos depositados (Figura 7).

Após cinco dias, as ovitrampas foram recolhidas e levadas ao Insetário da Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS/INPA) para triagem das paletas e verificação da presença/ausência de ovos, com auxílio de uma lupa.



Figura 7– Ovitrapa com infusão de capim coloniã (*M. maximus*) e paleta de Eucatex.

### 4.3 Estabelecimento e manutenção das populações

#### 4.3.1 Populações naturais

Três dias após o recolhimento das ovitrampas, tempo necessário para a formação do embrião, as paletas foram colocadas em recipientes com água desclorada e nutrientes (ração para peixes TetraMin<sup>®</sup>) para induzir à eclosão das larvas.

Após a eclosão, as larvas foram transferidas para outros recipientes protegidos com tecido de malha fina, também com água desclorada e nutrientes para sua alimentação. Sempre que necessário, era realizada a troca da água e do alimento. Nesses recipientes, ocorreu todo o desenvolvimento até a fase adulta do mosquito. Os adultos foram identificados por meio da chave de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) e acondicionados em gaiolas, separadas de acordo com a população (Figura 8).

Nessas gaiolas, foi colocada solução de sacarose a 10% para alimentação contínua de machos e fêmeas. Em condições ótimas de temperatura e luminosidade, os cruzamentos ocorriam naturalmente. O repasto sanguíneo era realizado uma vez por semana em um hamster

(*Mesocricetus auratos*) anestesiado. 24 horas antes do repasto, a solução de açúcar era retirada para garantir que as fêmeas buscassem o sangue no hamster.

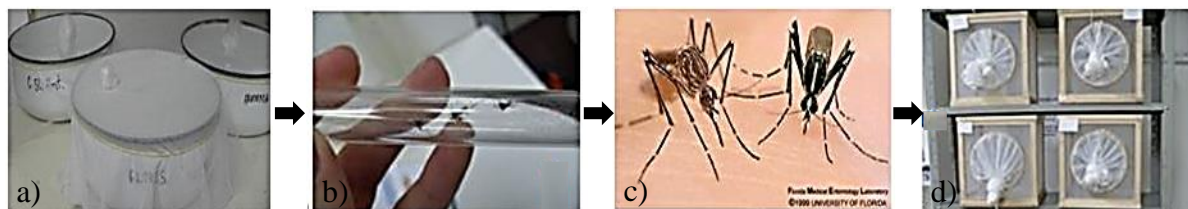


Figura 8– Manutenção dos mosquitos para obtenção das amostras: a) recipiente para desenvolvimento de larva a adulto, b) identificação de adultos, c) diferenças morfológicas entre *A. aegypti* e *A. albopictus* (Flórida Medical Entomology Laboratory, 1999), d) gaiolas para criação de adultos.

Logo após o repasto sanguíneo, as fêmeas de cada gaiola foram isoladas individualmente em copos descartáveis e telados, contendo internamente papel filtro umedecido para receber as oviposições. Após a confirmação da presença de ovos, estes foram transferidos para um novo copo e preenchidos com água desclorada e nutrientes para eclosão das larvas.

De cada desova, dez indivíduos (larva de 4ºestádio, pupa ou adulto) foram selecionados e depositados em microtubos de 1,5 ml com a identificação da população e da desova a qual eles pertenciam e armazenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração de DNA. De cada população, foram selecionadas 50 desovas para compor a amostragem.

#### 4.3.2 Populações experimentais (Microcosmos)

O Microcosmos é composto por quatro salas, nas quais são simulados diferentes cenários de mudanças climáticas. Na sala 01 são simuladas as condições meteorológicas atuais de Manaus-AM, obtidas a cada intervalo de dois minutos, e nas demais previstas até 2100 pelo IPCC. A sala 3 representa o cenário intermediário, com um aumento de aproximadamente  $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e de  $+400\text{ ppm}$  de  $\text{CO}_2$  e a sala 4 representa as condições extremas, com  $+4,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $+850\text{ ppm}$  de  $\text{CO}_2$ . A umidade relativa do ar é a única variável ambiental não simulada pelo Microcosmos, sendo a mesma em todos os cenários.

No presente trabalho, foram estudadas as populações estabelecidas nas salas 03 e 04 (Figura 9). Essas populações vinham sendo mantidas nesses ambientes há muitas gerações e

neste trabalho foram coletados, de forma aleatória, 50 indivíduos adultos de cada uma das populações. Os indivíduos da Sala 03 estavam na 51ª geração, enquanto os da Sala 04 na 41ª.

As populações, mantidas no Microcosmos desde 2013, são resultantes da mistura de três populações da cidade de Manaus: Coroadó, São José e Zumbi. Inicialmente, essas três populações foram mantidas juntas em insetário fora do Microcosmos, para que os cruzamentos ocorressem. Uma parte dos ovos resultantes desses cruzamentos (F1) foi utilizada para dar início às populações das salas e o restante foi armazenado em condições adequadas para novo estabelecimento, caso a população inicial viesse a se extinguir.



Figura 9 – Centro de Estudos do projeto Adaptações da Biota Aquática da Amazônia (Adapta) no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (Leem), no Inpa. Salas 03 e 04 do Microcosmos, utilizadas no experimento.

#### **4.4 Análise do material genético**

De cada uma das 50 desovas de cada uma das seis populações de *A. aegypti* foram extraídas duas amostras de DNA, uma para a análise da variabilidade genética a partir dos marcadores moleculares RAPD e a outra para estudo da mutação *Val1016Ile* no gene do canal de sódio.

#### 4.4.1 Extração do DNA genômico

Etapa 1: Para obtenção do DNA utilizou-se os procedimentos descritos por Williams *et al.* (1990) e Wilkerson *et al.* (1995). Cada amostra (larva, pupa ou adulto) foi homogeneizada em 50  $\mu\text{L}$  de tampão de lise – TL (SDS 1%, Tris - HCL 50mM, pH 8.0, EDTA 25mM, pH 8,0 e NaCl 25mM) com um bastão de acrílico, em microtubos de 1,5 ml. Em seguida adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de TL para remover os resíduos das paredes do tubo e do bastão. Os tubos foram incubados a 65°C por 60 minutos (após os primeiros 30 minutos foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de RNase) e centrifugados a 14000 rpm por 30 segundos. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio, misturou-se em vórtex e foi deixado em gelo por 1 hora. Foi novamente centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto e deixado a -20° C em *over nighth*.

Etapa 2: O material foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos e descartado o sobrenadante. Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de etanol a 70% e centrifugado novamente a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi secado. Após isso, o precipitado foi resuspendido em 15  $\mu\text{L}$  de água deionizada (água *Milli-Q*) autoclavada.

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro específico para DNA, marca Thermo Scientific, modelo NanoDrop 2000c, com absorbância entre 260 e 280 nm.

Para as reações de amplificação com os marcadores RAPD, o DNA foi diluído para 10 ng/ $\mu\text{L}$  em água *Milli-Q* autoclavada e armazenado a -20 °C. Para a amplificação do gene *Kdr* o DNA foi utilizado nas concentrações normais, encontradas na quantificação.

#### 4.4.2 Amplificação com primers (iniciadores) RAPD

Os *primers* com dez bases foram fornecidos em kits pela Operon Technologies, Inc, USA, na forma de *pellets* liofilizados. Foram feitos testes com 20 *primers*, sendo selecionados cinco (Tabela 1) que apresentaram melhor perfil de bandas. Cada *primer* foi resuspendido numa concentração de 10 ng/ $\mu\text{L}$  em água *Milli-Q* autoclavada e armazenado a -20 °C até sua utilização. A molaridade de cada *primer* foi fornecida pelo fabricante.

Tabela 2 –*Primers* selecionados para o estudo populacional de *A. aegypti* por meio de RAPD-PCR.

<i>Primers</i>	Sequência
OPH-02	5'TCGGACGTGA3'
OPH-04	5'GGAAGTCGCC3'

OPH-06	5'ACGCATCGCA3'
OPH-12	5'ACGCGCATGT3'
OPH-19	5'CTGACCAGCC3'

Os *primers* que não produziram bandas polimórficas claramente amplificadas foram eliminados para reduzir a ambiguidade.

Cada reação de amplificação foi realizada no volume total de 25 µL, contendo 1 µL DNA genômico (10 ng/µL), 5 µL de tampão 1X [50 mM Tris-HCl (pH 9.0); 50 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>], 2,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 2,5 µL de *primer* (10 ng/µL) e 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase(5u/µL) (Promega).

As amplificações seguiram os procedimentos de Williams *et al.* (1990) e Wilkerson *et al.* (1995) e foram efetuadas em termociclador marca Eppendorf, modelo Mastercycler Gradient programado para 45 ciclos. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1 minuto a 94 °C, anelamento dos *primers* de 1 minutos a 36 °C e extensão de 2 minutos a 72 °C. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C. Os produtos das amplificações foram armazenados a -20 °C até que fosse realizada a eletroforese.

#### 4.4.3 Amplificação gênica alelo específica do códon 1016

Para analisar a presença da mutação, foram utilizados três iniciadores, um específico para o alelo selvagem *Val* (5'-GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A-3'), um específico para o alelo mutante *Ile* (5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC CAC CCG CAC CGG-3') e um terceiro *reverse* (5'-GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA AAG C-3') (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009).

Cada reação de amplificação foi realizada no volume total de 12,5 µL, contendo 0,5 µL DNA genômico, 2,5 µL de tampão 1X [50 mM Tris-HCl (pH 9.0); 50 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>], 1 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,3 µL do *primer Val* (5 mM), 0,3 µL do *primer Ile* (5 mM), 0,6 µL do *primer reverse* (5 mM) e 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase(5u/µL) (Promega).

As amplificações foram efetuadas em termociclador da marca Kiratec, modelo SC300, sob as seguintes condições: 3 minutos a 95 °C, seguidos por 30 ciclos. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 30 segundos a 95 °C, anelamento dos *primers* de 40 segundos a 61 °C e extensão de 45 segundos a 72 °C. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão

final de 5 minutos a 72 °C. Os produtos das ampliações foram armazenados a -20 °C até que fosse realizada a eletroforese.

#### 4.4.4 Perfil eletroforético dos produtos de RAPD-PCR

Cada amostra foi resuspendida com corante GelRed (diluído 500 vezes em tampão de carregamento Blue Juice 5X) na proporção de 12:4 µL, respectivamente, e fracionada em gel de agarose 1,5%, em tampão TEB 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 4h a 170 V. Em seguida, o perfis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 300 nm. A documentação fotográfica foi feita utilizando-se o sistema AlphaView for FluorChem™ (ProteinSimple). Em todos os géis, marcadores de massa molecular (100 bp Ladder – INVITROGEN) foram usados para determinação do peso molecular dos fragmentos amplificados.

#### 4.4.5 Perfil eletroforético dos produtos de PCR para o gene *Kdr*

Cada amostra foi resuspendida com corante GelRed (diluído 500 vezes em tampão de carregamento Blue Juice 5X) na proporção de 4:2 µL, respectivamente, e fracionada em gel de acrilamida 10%, em tampão TEB 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM) durante 90 min. a 70 V. Os genótipos das populações foram comparados aos genótipos controle selvagem (*Val/Val*, com 98 pb), heterozigoto (*Val/Ile*) e mutante (*Ile/Ile*, com 78 pb), cedidos pela FIOCRUZ-RJ, e confirmados a partir de comparação com um marcador de massa molecular *Ladder* (O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder – Thermo Scientific), corado com gel *red*, misturado ao tampão de carregamento (4 µL), inserido no gel juntamente com a PCR, na proporção 1:1.

### 4.5 Análises estatísticas

Os dados das análises moleculares dos marcadores RAPD e do gene *Kdr*, tanto das populações naturais quanto das populações do Microcosmos foram analisados através dos programas estatísticos *Tools for Population Genetics Analyses* – TFPGA (MILLER, 1997) e POPGENE versão 1.3 (YEH *et al.*, 1999), de acordo com o caráter de cada marcador. Ambos os programas realizaram também o teste do qui-quadrado para verificar se as frequências genóticas estavam de acordo com o modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

#### 4.5.1 Determinação das frequências genóticas e alélicas para marcadores RAPD

Os fragmentos amplificados dos marcadores RAPD foram contados, utilizando-se critério de natureza binária (presença de banda = 1 ou ausência = 0), e suas massas moleculares determinadas por comparação com um marcador de massa molecular (100 bp Ladder – INVITROGEN). Com os dados da genotipagem de cada marcador foram construídas matrizes para a formação do banco de dados dos programas utilizados.

Para a análise da variabilidade genética das populações de *A. aegypti* em ambos os programas, TFPGA e POPGENE, foi marcada a opção “marcadores dominantes para organismos diploides”. Nesse caso, cada banda é assumida como sendo um loco. A presença de banda indica o genótipo dominante, podendo ser homozigoto ou heterozigoto, enquanto a ausência de banda indica o genótipo homozigoto recessivo.

#### 4.5.2 Determinação das frequências genóticas e alélicas para o gene *Kdr* (Knockdown resistance)

Os padrões de alelos, obtidos a partir da análise molecular para o gene *Kdr* nas populações, foram analisados quanto à presença ou não da mutação no sítio 1016, em comparação aos genótipos controles. A análise da variabilidade foi realizada marcando-se em ambos os programas, TFPGA e POPGENE, a opção “marcadores co-dominantes para organismos diploides”. Nessa situação, o padrão de bandas produzido é explicado por mecanismo simples de herança mendeliana e as frequências alélicas foram estimadas diretamente a partir dos dados da frequência absoluta dos diferentes genótipos.

#### 4.5.3 Parâmetros genéticos

##### 4.5.3.1 Estimativa do número de locos polimórficos

A variabilidade em populações naturais pode ser expressa numericamente pela proporção de locos polimórficos, ou seja, pelo polimorfismo da população (AYALA e KIGER, 1984). Via de regra, a definição de loco polimórfico é baseada na frequência dos alelos. Em



nossas análises, adotamos o critério baseado em Ayala (1982) segundo o qual um loco é polimórfico quando o alelo mais comum tem frequência igual ou menor que 0,95.

O cálculo da porcentagem de locos polimórficos (P) de cada população foi obtido a partir da média aritmética entre o número de locos polimórficos pelo total de locos amostrados:

$$P = \frac{\text{n}^\circ \text{ de locos polimórficos}}{\text{n}^\circ \text{ total de locos amostrados na população}}$$

#### 4.5.3.2 Estimativa de heterozigosidade média

A heterozigosidade média intrapopulacional esperada foi calculada a partir das frequências alélicas em todos os locos gerados pelos marcadores RAPD e no loco único do gene *Kdr*, supondo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, por estimativa não enviesada (NEI, 1978), de acordo com a seguinte fórmula:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

Onde  $x_i$  = frequência do alelo  $i$  e  $k$  = número de alelos.

A heterozigosidade média interpopulacional esperada foi obtida a partir das frequências  $p^2$  e  $q^2$  dos genótipos observados:

$$H_e = 2pq$$

Onde:  $p$  e  $q$  são as frequências alélicas para todos os locos.

No caso dos marcadores RAPD, como a detecção dos fragmentos não tem sensibilidade quantitativa suficiente para discriminar indivíduos homozigotos dominantes ou heterozigotos, uma estimativa potencial da frequência do alelo recessivo foi obtida a partir da raiz quadrada das frequências das bandas ausentes observadas. As heterozigosidades média

intra ( $H_{o1}$ ) e interpopulacional ( $H_{o2}$ ) observadas foram obtidas diretamente a partir dos genótipos encontrados:

$$H_{o1} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de heterozigotos}}{\text{n}^\circ \text{ de indivíduos na população}}$$

$$H_{o2} = \frac{\sum H_{o1}}{\text{n}^\circ \text{ total de indivíduos}}$$

#### 4.5.3.3 Análise da estrutura genética das populações

As estatísticas F de Wright baseiam-se em um modelo de estrutura populacional, onde a população total está subdividida em subpopulações, que podem encontrar-se isoladas ou não. Para Wright (1940; 1943; 1951), as populações de organismos diploides podem ser definidas em termos de heterozigosidades observada e esperada, e suas estruturas genéticas descritas a partir dos valores do F estatístico ( $F_{is}$ ,  $F_{it}$  e  $F_{st}$ ), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$F_{is} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

$$F_{it} = \frac{H_t - H_o}{H_t}$$

$$F_{st} = \frac{H_t - H_e}{H_t}$$

Onde  $H_e$  e  $H_o$  são as heterozigosidades esperada e observada, respectivamente, nas subpopulações e  $H_t$  é a heterozigosidade total. Os valores do F estatístico estão, ainda, teoricamente relacionados de acordo com a equação:  $(1 - F_{it}) = (1 - F_{st}) \cdot (1 - F_{is})$ .

$F_{is}$  e  $F_{it}$  medem os desvios das frequências genótípicas do equilíbrio de Hardy-Weinberg nas subpopulações e na população total, respectivamente. O  $F_{is}$  é, ainda, o coeficiente de *inbreeding* entre indivíduos dentro da subpopulação. O valor de  $F_{st}$  mede o grau de diferenciação genética entre as subpopulações (Nei, 1978). Segundo Kimura e Ohta (1971) este valor é o efeito da diferenciação das frequências gênicas entre as subpopulações.

#### 4.5.3.4 Análise de similaridade e distância genética

A similaridade genética (I) entre as populações foi obtida calculando-se a probabilidade de se retirar alelos idênticos entre duas populações dividida pela de se retirar em cada uma delas, de acordo com a seguinte fórmula:

$$I = \frac{x \cdot y}{\sqrt{(x \cdot y)}}$$

Onde  $x$  é a frequência do alelo  $A$  na população  $X$  e  $y$  a frequência do mesmo alelo na população  $Y$ . Se duas populações  $X$  e  $Y$  são monomórficas para o mesmo alelo, dizemos que a identidade é igual a 1. Porém, quando as populações  $X$  e  $Y$  são monomórficas para alelos diferentes, a identidade é igual a 0.

Já a distância genética foi obtida a partir do valor negativo do logaritmo natural da similaridade genética:

$$D = -\log_e I$$

A similaridade genética segue uma escala com valores que vão de 0 a 1 e a distância genética com valores de 0 a  $\infty$  (infinito).

#### 4.5.4 Análise de dendrograma

Com base na matriz de distância e similaridade genética entre as populações foi construído um dendrograma, mostrando o agrupamento das mesmas a partir de suas frequências alélicas. Na construção do dendrograma foi utilizado o método *Unweighted Pairing Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

Neste método, o critério utilizado para formação dos grupos é a média das distâncias entre todos os pares de itens que formam cada grupo, como a própria denominação informa. A distância inter-*cluster* é definida como sendo a média entre todas as distâncias pareadas dos membros dos dois grupos (ALFENAS *et al.*, 1998).

Algebricamente, a distância entre os itens  $i$  e  $j$ , para  $i \neq j$ , é dada por:

$$d_{(ij)} = \text{mín} (d_{ij})$$

A distância do item  $k$  em relação ao primeiro grupo formado por  $i$  e  $j$ , com  $k \neq i, j$ , fica definido por:

$$d_{(ij)k} = \frac{(d_{ik} + d_{jk})}{2}$$

E a distância entre dois grupos  $(ij)$  e  $(kl)$ , com  $i, j \neq k, l$ , é dada por:

$$d_{(ij)(kl)} = \frac{(d_{ik} + d_{il} + d_{jk} + d_{jl})}{4}$$

Através deste método, as populações com menores distâncias foram sucessivamente agrupadas até construir um diagrama hierárquico que representou a proximidade das diferentes populações a diferentes níveis de distância genética. (MILLER, 1997).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise descritiva dos locos RAPD

Os dados obtidos a partir dos marcadores RAPD, com base em cinco *primers*, revelaram 50 locos, dos quais, 98% foram polimórficos, gerando em média 10 locos (bandas) por *primer*. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados variou de 400 pb a 2.070 pb em OPH-02, 450 pb a 1.800 pb em OPH-04, 350 pb a 2.072 pb em OPH-06, 200 pb a 1.600 pb em OPH-12 e 310 a 2.500 pb em OPH-19, mostrando uma grande amplitude de variação, que foi de 200 pb a 2.500 pb. O maior número de locos (13) foi detectado no *primer* OPH-19 e o menor (08) foi no OPH-02 (Tabela 2). Verifica-se nessa tabela que quanto maior foi a amplitude de variação do número de pares de base, maior foi o número de locos revelados. No entanto, não foi detectado nenhum loco exclusivo por nenhum dos *primers*.

Tabela 3 – Número de locos (bandas) por *primer* obtidos em populações de *A. aegypti* na cidade de Manaus, Amazonas.

<i>Primer</i>	Número de locos (bandas)	Variação de pares de bases (pb)
OPH 02	8	400 a 2.070
OPH 04	9	450 a 1.800
OPH 06	11	350 a 2.072
OPH 12	9	200 a 1.600
OPH 19	13	310 a 2.500
Total: 05	50	Variação total = 200 a 2.500

A Figura 10 mostra o perfil eletroforético das populações de *A. aegypti* usando o *primer* OPH02. Para esse *primer* foram selecionados oito bandas (locos), que variaram de 400 a 2.070 pb. Observou-se que todas as populações apresentaram um padrão de bandas semelhante, na região de 1.000 a 1.400 pb. Dos oito locos revelados, apenas o de 550 pb não foi detectado em todas as populações, estando presente nas populações do Lírio do Vale e das salas 03 e 04.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 M

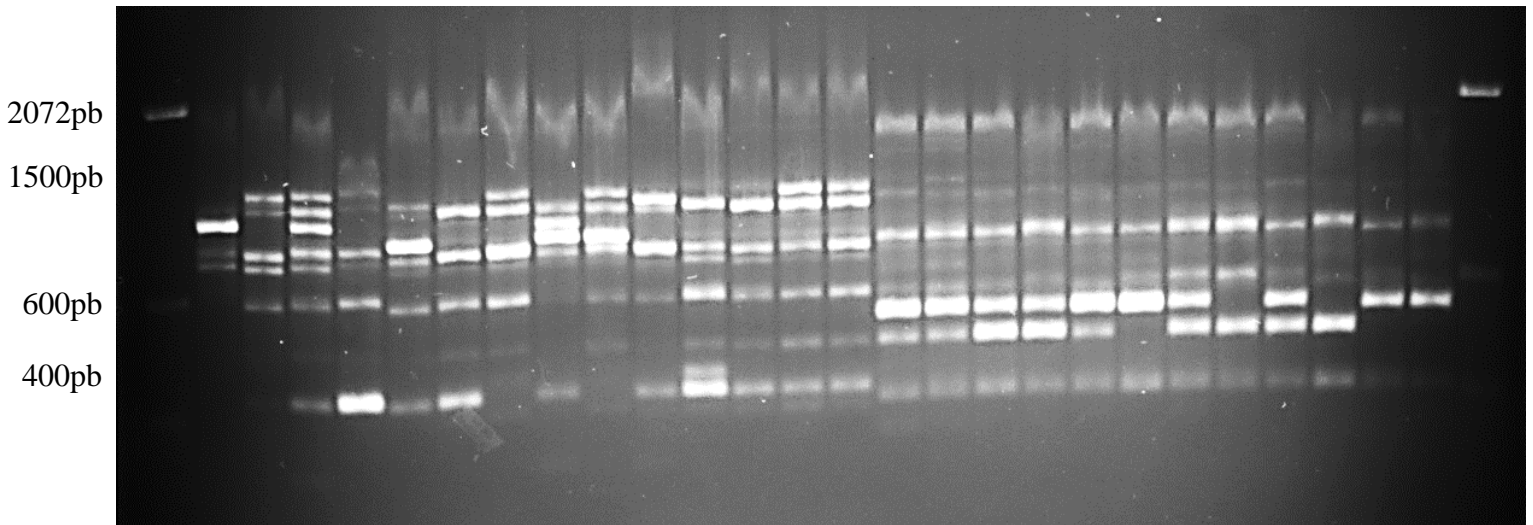


Figura 10 – Perfil da variabilidade genética em populações de *A. aegypti* na cidade de Manaus, baseado em análise de RAPD, usando *primer* OPH-02. De 1 a 5 (Novo Aleixo), de 6 a 10 (Morro da Liberdade), de 11 a 14 (Jorge Teixeira), de 15 a 18 (Lírio do Vale), de 19 a 22 (Sala 03); de 23 a 26 (Sala 04); M = marcador molecular (Ladder100 pb).

A Figura 11 mostra o perfil eletroforético das populações de *A. aegypti* usando o *primer* OPH-04, revelando padrões de bandas diferenciais. Para esse *primer* foram selecionados nove bandas (locos), que variaram de 450 a 1.800 pb. Observou-se que pelo menos uma banda na região de 500 pb foi revelada em todas as populações. A população do Novo Aleixo não apresentou a maioria das bandas observadas nas demais populações, além de um fragmento específico na região de 2072 pb.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 M

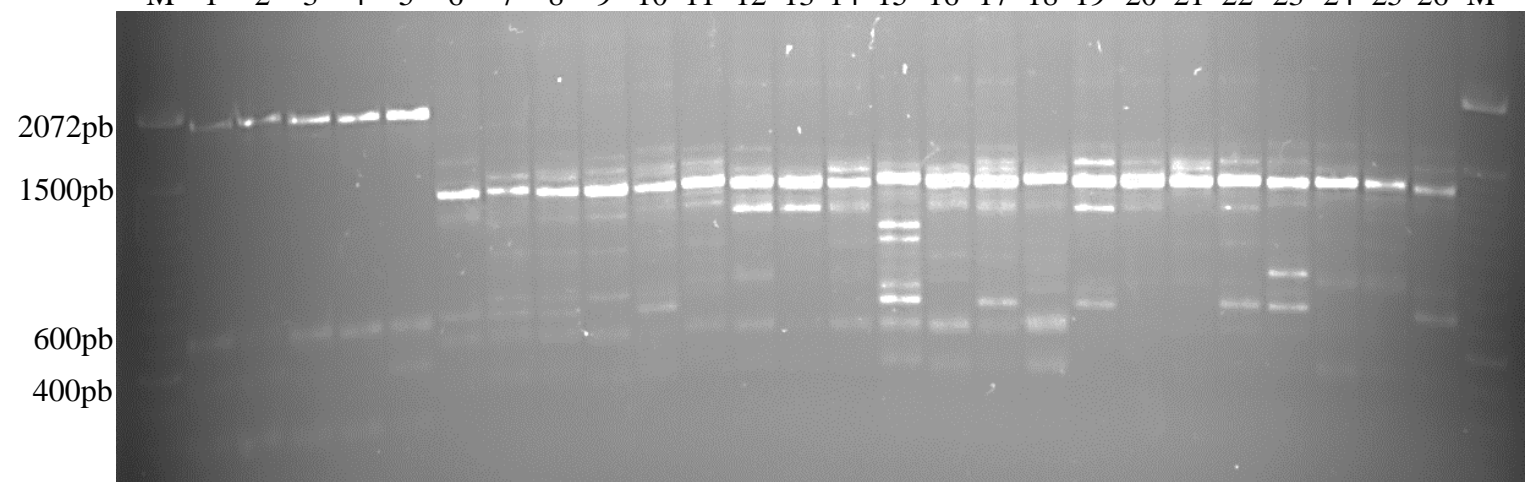


Figura 11– Perfil da variabilidade genética em populações de *A. aegypti* na cidade de Manaus, baseado em análise de RAPD, usando *primer* OPH-04. De 1 a 5 (Novo Aleixo), de 6 a 10 (Morro da Liberdade), de 11 a 14 (Jorge Teixeira), de 15 a 18 (Lírio do Vale), de 19 a 22 (Sala 03); de 23 a 26 (Sala 04); M = marcador molecular (Ladder100 pb)

A Figura 12 mostra o perfil eletroforético das populações de *A. aegypti* usando o *primer* OPH-06, revelando amplo número de fragmentos amplificados e padrões de bandas semelhantes. Para esse *primer* foram selecionados 11 locos, que variaram de 350 a 2.072 pb. Desses, um de cerca de 550 pb foi detectado em todas as populações. A população do Lírio do Vale não amplificou nenhuma banda quando a concentração de DNA foi de 10 ng/μl.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 M

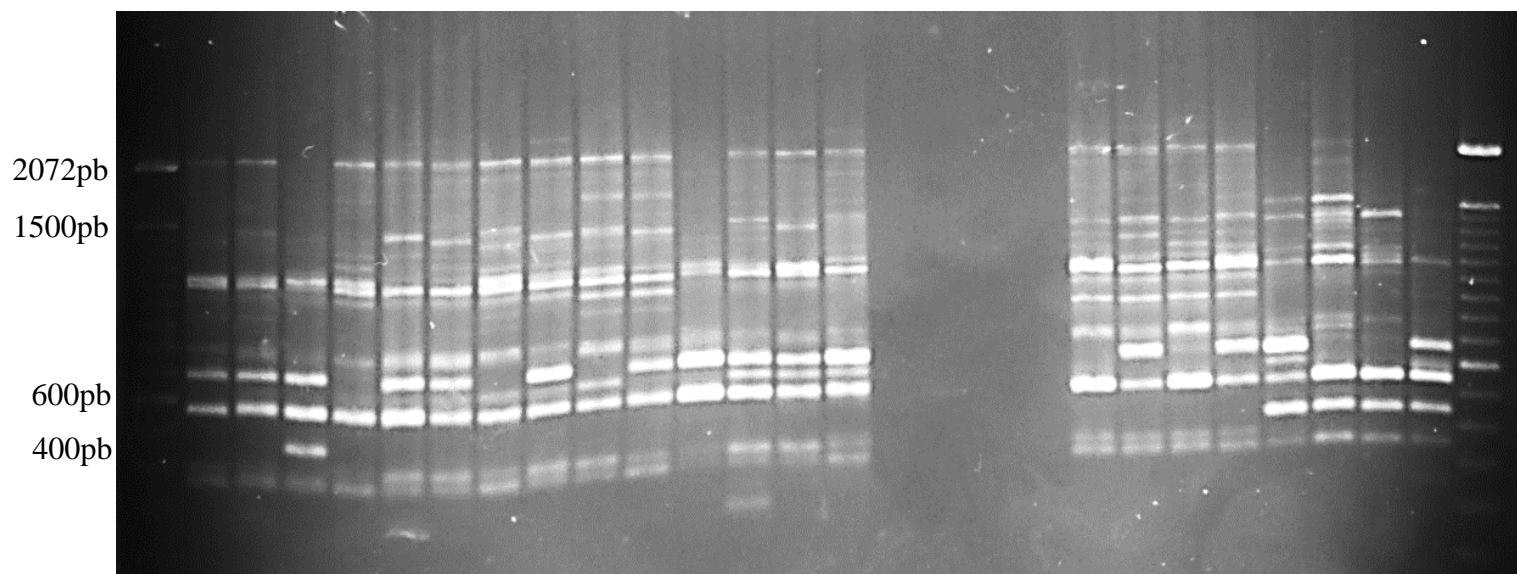


Figura 12 – Perfil da variabilidade genética em populações de *A. aegypti* na cidade de Manaus, baseado em análise de RAPD, usando *primer* OPH-06. De 1 a 5 (Novo Aleixo), de 6 a 10 (Morro da Liberdade), de 11 a 14 (Jorge Teixeira), de 15 a 18 (Lírio do Vale), de 19 a 22 (Sala 03); de 23 a 26 (Sala 04); M = marcador molecular (Ladder100 pb)

## 5.2 Análise da variabilidade genética dos marcadores RAPD

Com base nos dados apresentados na tabela 3, verificou-se o nível de variabilidade genética elevado, obtido a partir dos valores de locos polimórficos (P) e de heterozigosidade média observada ( $H_o$ ). Das quatro populações naturais analisadas, a do Jorge Teixeira foi a que apresentou a maior variabilidade genética ( $P = 82$ ;  $H_o = 0,3245$ ), enquanto que a do Lírio do Vale apresentou menor variabilidade ( $P = 74$ ;  $H_o = 0,2667$ ). No entanto, a maior variabilidade genética nas populações do Microcosmos foi detectada na população da Sala 03 ( $P = 86$ ;  $H_o = 0,3293$ ).

Considerando as populações como um todo (naturais e experimentais), a da Sala 03 apresentou a variabilidade genética um pouco mais elevada ( $P = 86$ ;  $H_o = 0,3293$ ) e a menor continuou sendo a do Lírio do Vale ( $P = 74$ ;  $H_o = 0,2667$ ). Mesmo assim, o nível de

variabilidade genética nas populações do Novo Aleixo ( $P = 86$ ;  $H_o = 0,2989$ ) e do Morro da Liberdade ( $P = 70$ ;  $H_o = 0,2903$ ), assim como entre a população do Jorge Teixeira ( $P = 82$ ;  $H_o = 0,3245$ ) e da Sala 03 ( $P = 86$ ;  $H_o = 0,3293$ ) foram similares.

Tabela 4 – Estimativa da variabilidade genética em populações de *A. aegypti* na cidade de Manaus, Amazonas.

População	Número Médio de Amostras por Loco	Porcentagem de Locos Polimórficos *	Heterozigosidade Média	
			Observada	Esperada **
Novo Aleixo	44,64	86	0,2989	0,3056
Morro da Liberdade	33	70	0,2903	0,2961
Jorge Teixeira	37,98	82	0,3245	0,3297
Lírio do Vale	28,92	74	0,2667	0,2712
Sala 3	37,60	86	0,3293	0,3336
Sala 4	42	80	0,3086	0,3121

\* Freqüência do alelo mais comum menor ou igual a 0,95 (Ayala, 1982).

\*\* Heterozigosidade esperada de Hardy-Weinberg, estimativa não enviesada (Nei, 1978).

### 5.3 Estrutura e diferenciação genética das populações

O teste para determinar se existe diferença nas frequências alélicas entre as populações naturais, a partir do *ExactTest* (RAYMOND e ROUSSET, 1995) não foi significativo ( $\chi^2 = 682,4241$ ; GL= 100;  $P = 0,000$ ), indicando que o fluxo gênico entre as populações pode não estar sofrendo redução. A estrutura genética foi testada com base no método ( $\theta$ ) para verificar o coeficiente de endocruzamento, sendo que o índice de fixação ( $F_{st} = 0,1331 \pm 0,1072$ ) revelou baixa diferenciação genética entre as populações. O índice de consistência do *bootstrapping* para 10.000 replicações foi de 95%.

A similaridade genética entre as populações naturais foi elevada, sendo que das populações naturais, as que apresentaram maior valor foram a do Morro da Liberdade e a do Jorge Teixeira ( $I = 0,9715$ ), enquanto que, a do Morro da Liberdade e a do Lírio do Vale apresentaram menor valor ( $I = 0,9203$ ) (Tabela 4).



Tabela 5 – Matriz de distância e similaridade genética entre populações de *A. aegypti* da Cidade de Manaus (AM) para RAPD. Valores acima da diagonal correspondem à similaridade genética não enviesada e abaixo da diagonal correspondem à distância genética não enviesada (Nei,1978).

População	1	2	3	4	5	6
1- Novo Aleixo	*****	0,9392	0,9519	0,9655	0,8920	0,9570
2- Morro da Liberdade	0,0627	*****	0,9715	0,9203	0,9079	0,9314
3- Jorge Teixeira	0,0493	0,0289	*****	0,9486	0,9203	0,9424
4- Lírio do Vale	0,0351	0,0831	0,0528	*****	0,8701	0,9547
5- Sala 3	0,1143	0,0966	0,0830	0,1392	*****	0,8877
6- Sala 4	0,0439	0,0711	0,0593	0,0464	0,1191	*****

Com base nos resultados obtidos, foi possível construir um dendrograma de similaridade e distância genética (Figura 14), o qual separou as populações em dois grandes *clusters* (I e II). O *cluster* I está subdividido em três outros *clusters*: 1 – Morro da Liberdade e Jorge Teixeira; 2 – Novo Aleixo e Lírio do Vale e 3 – Sala 04, o qual se conecta ao *cluster* 2. E por último, o *cluster* II formado apenas pela população da Sala 03, que ficou separado das demais populações. Analisando esses *clusters*, observa-se que a dispersão passiva de mosquitos talvez esteja influenciando diretamente no fluxo gênico entre essas populações de *A. aegypti*.

Morro da Liberdade e Jorge Teixeira estão suficientemente distantes entre si e suas populações estão agrupadas dentro do mesmo *cluster*. Os bairros do Novo Aleixo e do Lírio do Vale também estão distantes entre si, em zonas diferentes, e mesmo assim suas populações foram agrupadas dentro do mesmo *cluster*. Embora as populações da Sala 03 e da Sala 04 tenham a mesma origem, essa última sofreu maior impacto das condições de temperatura e pressão de CO<sub>2</sub> em sua variabilidade, aumentando a distância genética entre elas (D= 0,119). Isso provavelmente possa explicar o agrupamento dessas duas populações em diferentes *clusters*.

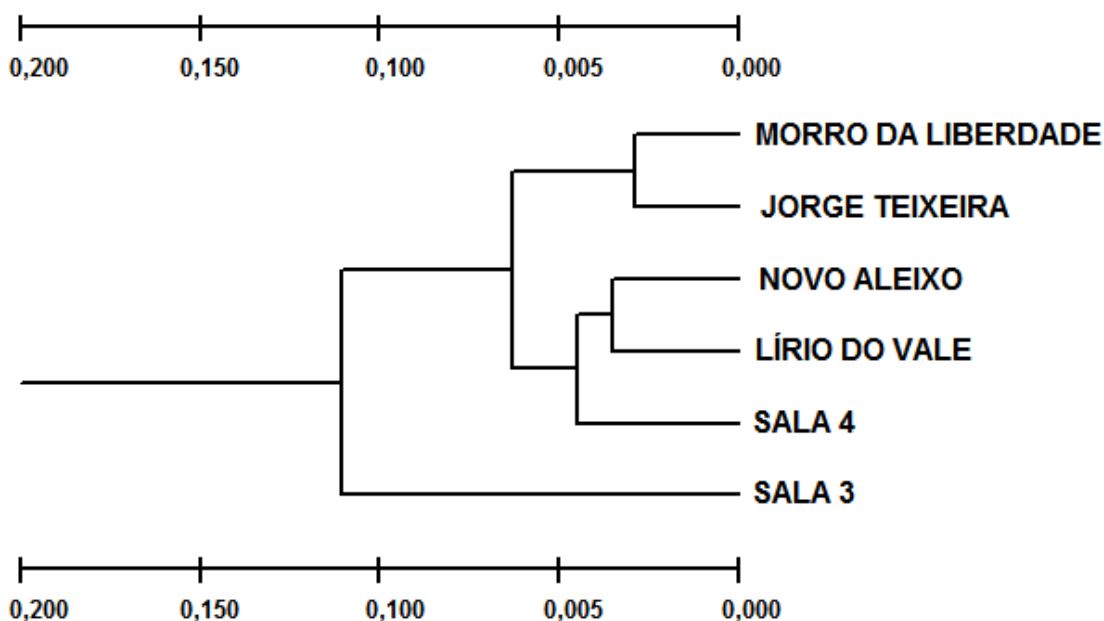


Figura 13 – Dendrograma agrupando as populações de *A. aegypti* na cidade de Manaus, com base na distância genética, obtida por análise dos marcadores de RAPD. Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética – UPGMA (NEI, 1978).

#### 5.4 Análise da Variabilidade do gene *Kdr* (*Knockdown Resistance*)

Todas as populações analisadas, tanto as naturais quanto as do Microcosmos, apresentaram indivíduos com genótipo homocigoto selvagem (*Val/Val*) no total de 144, sendo 39 da Sala 04, 35 da Sala 03, 27 do Novo Aleixo, 17 do Lírio do Vale, 16 do Jorge Teixeira e 10 do Morro da Liberdade. Somente as populações naturais tiveram indivíduos com genótipo heterocigoto (*Val/Ile*) e homocigoto mutante (*Ile/Ile*). O número de indivíduos heterocigotos foi de 65 ao todo, sendo 20 do Morro da Liberdade, 17 do Novo Aleixo, 16 do Jorge Teixeira e 12 do Lírio do Vale. O número de indivíduos mutantes foi 9 ao todo, sendo que na população do Novo Aleixo foi detectado apenas 1, enquanto na do Morro da Liberdade e na do Jorge Teixeira, foram revelados 4 em cada uma. A população do Lírio do Vale não apresentou nenhum indivíduo mutante.

Em todas as populações, a frequência do alelo selvagem *Val1016* foi maior que a do mutante *1016Ile*, variando de 0,5882 na população do Morro da Liberdade a 1,0000 nas populações das Salas 03 e 04; enquanto a heterocigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,0000 nas populações das Salas 03 e 04 a 0,5882 na população do Morro da Liberdade (Tabela 5).

Tabela 6 – Estimativa da variabilidade genética e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg, com base no gene *Kdr* (*Knockdown resistance*).

	Alelo	Genótipo	População					
			Novo Aleixo	Morro da Liberdade	Jorge Teixeira	Lírio do Vale	Sala 03	Sala 04
(N)			(45)	(34)	(36)	(29)	(35)	(39)
	<i>Val</i>		0,7889	0,5882	0,6667	0,7931	1,0000	1,0000
	<i>Ile</i>		0,2111	0,4118	0,3333	0,2069	0,0000	0,0000
Observados		<i>Val/Val</i>	27	10	16	17	35	39
		<i>Val/Ile</i>	17	20	16	12	0	0
		<i>Ile/Ile</i>	1	4	4	0	0	0
		<i>Val/Val</i>	28,0056	11,7647	16,0000	18,2414	35,0000	39,0000
Esperados		<i>Val/Ile</i>	14,9889	16,4706	16,0000	9,5172	0,0000	0,0000
		<i>Ile/Ile</i>	14,9889	16,4706	4,0000	9,5172	0,0000	0,0000
	$\chi^2$		0,8101	1,5612	0,0000	9,5172	-----	-----
	P		0,3681	0,2115	1,0000	9,5172	-----	-----
	H <sub>o</sub>		0,3778	0,5882	0,4444	0,2069	0,0000	0,0000
	H <sub>e</sub>		0,3368	0,4917	0,4507	0,7931	1,0000	1,0000

Índices de fixação:  $F_{is} = -0,1271$ ;  $F_{it} = 0,0619$ ;  $F_{st} = 0,0619$ .

Na mesma tabela, verifica-se que os valores de  $\chi^2$  para as populações naturais estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg e que as probabilidades (P) para cada uma delas indica que são populações panmíticas, onde nesse momento, essas populações de *A. aegypti* estão geneticamente estáveis. As populações do Microcosmos apresentaram apenas o alelo selvagem (*Val*), ou seja, elas foram totalmente monomórficas para este loco, não apresentando variabilidade. Por essa razão não foi possível o cálculo dos valores de  $\chi^2$  ou de probabilidades (P) para essas populações.

O índice de fixação ( $F_{st}$ ) foi de 0,0619, indicando baixa diferenciação genética entre as populações, apesar desse valor de  $F_{st}$  ser maior que o  $F_{is} = -0,1271$ , revelando diferenciação genética interpopulacional maior que intrapopulacional, devido ao excesso de heterozigotos nessas populações.

Quanto à similaridade genética, as populações naturais apresentaram ampla variação ( $D = 0,0000$  a  $0,0532$ ), sendo as populações do Novo Aleixo e Lírio do Vale ( $D = 0,0000$ ), Morro da Liberdade e Jorge Teixeira ( $D = 0,0000$ ) as que mostraram maior similaridade genética, enquanto as populações do Morro da Liberdade e Lírio do Vale ( $D = 0,0532$ ), menor similaridade (Tabela 6).

Tabela 7 – Matriz de distância e similaridade genética entre populações de *A. aegypti* da Cidade de Manaus (AM) para o gene *Kdr*. Valores acima da diagonal correspondem à similaridade genética não enviesada e abaixo da diagonal, correspondem à distância genética não enviesada (Nei, 1978)

População	1	2	3	4	5	6
1- Novo Aleixo	*****	0,9490	0,9880	1,0000	0,9687	0,9687
2- Morro da Liberdade	0,0524	*****	1,0000	0,9482	0,8250	0,8250
3- Jorge Teixeira	0,0121	0,0000	*****	0,9882	0,8995	0,8995
4- Lírio do Vale	0,0000	0,0532	0,0119	*****	0,9718	0,9718
5- Sala 3	0,0318	0,1923	0,1059	0,0286	*****	1,0000
6- Sala 4	0,0318	0,1923	0,1059	0,0286	0,0000	*****

Como dito anteriormente, a diferença na intensidade do fluxo de veículos pode estar se sobrepondo à distância geográfica, influenciando o fluxo gênico entre essas populações de Manaus. As populações do Microcosmos revelaram 100% de similaridade genética para o alelo selvagem do gene *Kdr* ( $D = 0,0000$ ). As condições de temperatura e concentração de  $CO_2$ , embora diferentes entre as duas salas, pode estar afetando igualmente esse gene, apesar da origem comum das populações das salas 03 e 04, oriundas dos bairros Coroado, São José e Zumbi. Isso explicaria o fato de elas apresentarem valor de similaridade genética elevado.

Considerando todas as populações, a do Morro da Liberdade e a da Sala 03, e do Morro da Liberdade e da Sala 04, foram as que apresentaram maior distância ( $D = 0,1923$ ), uma vez que o alelo mutante (*1016Ile*) foi ausente nas duas populações do Microcosmos.

Nenhuma das populações analisadas foram submetidas à bioensaios com piretróides. Isso pode explicar a maior frequência do alelo selvagem *Vall1016*. Desse modo, como as populações do Microcosmos não estão submetidas a nenhuma pressão de seleção por parte de inseticidas, a frequência tende a diminuir até chegar a zero. Por outro lado, o aumento da temperatura e da pressão de  $CO_2$ , a partir dos valores encontrados na Sala 03 ( $+2,5$  °C;  $+400$ ppm

de CO<sub>2</sub>), por exemplo, parece ser uma condição desfavorável à manutenção do alelo mutante *1016Ile*, podendo estar atuando como fator de seleção negativa para este, o que explicaria a total ausência desse alelo nas populações do Microcosmos.

A Figura 15 mostra o dendrograma das seis populações analisadas, construído a partir dos valores de distância genética (NEI, 1978), o qual separou essas populações em dois grandes *clusters* (I e II). O *cluster* I está dividido em dois grupos: 1 – formado pelas populações do Microcosmos e 2 – formado pelas populações do Novo Aleixo e Lírio do Vale. No *cluster* II ficaram as populações do Morro da Liberdade e Jorge Teixeira.

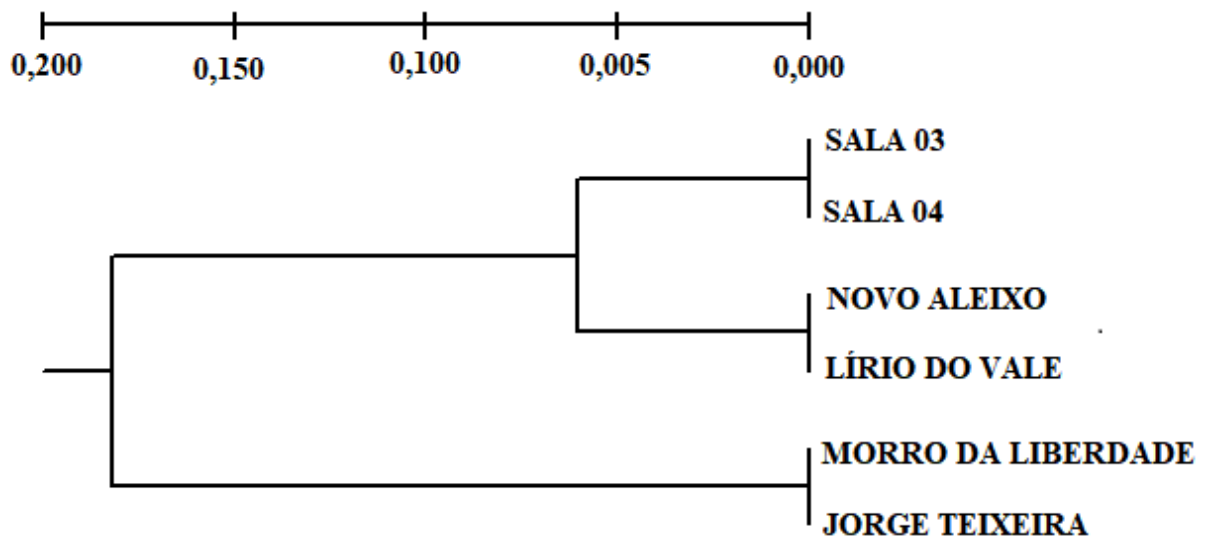


Figura 14– Dendrograma agrupando as populações de *A. aegypti* na cidade de Manaus, com base na distância genética, obtida por análise da mutação *Val1016Ile* no gene *Kdr*. Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética – UPGMA (NEI, 1978).

Aqui se observa que o grupo formado pelas populações do Microcosmos; assim como, os formados por Novo Aleixo e Lírio do Vale; Morro da Liberdade e Jorge Teixeira são geneticamente próximos. Mesmo assim, houve uma distância genética elevada que separou o grupo do Microcosmos do grupo formado pelas populações do Novo Aleixo e Lírio do Vale e outra distância genética ainda maior que separou o *cluster* formado pelas populações do Morro da Liberdade e Jorge Teixeira, das demais populações.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Análise descritiva dos locos RAPD

As taxas de mutação apresentam variação entre as diferentes regiões do genoma. Isso tem sido demonstrado por estudos de variabilidade genética em nível molecular (CALVO *et al.*, 2004). Em geral, genes que apresentam cópia única têm taxas relativamente baixas de substituição. Provavelmente, porque mudanças nas regiões codificadoras de proteínas podem produzir um defeito sério no produto final, do mesmo modo que mudanças na região regulatória podem ter efeito deletério. O DNA repetitivo, ao contrário dessas regiões, não está aparentemente, sujeito a restrições funcionais e a variabilidade nessa região do genoma é maior que a encontrada nos genes de cópia única, o que o torna um dos principais alvos de estudos moleculares (LI e GRAUR, 1991).

Os perfis eletroforéticos de DNA amplificados por RAPD-PCR revelaram um grande número de fragmentos polimórficos. A natureza molecular do polimorfismo dos marcadores RAPD não é inteiramente conhecida. Evidências experimentais indicam que diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para provocar a não complementaridade do *primer* com os sítios de iniciação e assim impedir a amplificação de um segmento (WILLIAMS *et al.*, 1990). Essas diferenças podem ser detectadas por essa técnica e, por isso, grande número de polimorfismo pode ser revelado em indivíduos estreitamente relacionados. Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995).

Apostol *et al.* (1993), estimando o número de famílias formadas por irmãos de *A. aegypti* encontraram diferenças quanto ao padrão de bandas geradas entre progênes e até mesmo entre indivíduos irmãos. Os resultados da análise de RAPD-PCR, a partir de cinco *primers* (iniciadores) revelaram 50 bandas (locos) nas seis populações de *A. aegypti* (quatro naturais e duas experimentais), com variação entre 200 a 2.500 pb. Esses autores analisaram o perfil eletroforético da amplificação do DNA genômico de indivíduos dessa espécie, obtidos nos mesmos locais de oviposição distribuídos em Porto Rico. Os resultados revelaram que as amostras apresentaram alguns fragmentos detectados em todas as progênes. Por outro lado, outros se mostraram exclusivos a determinado indivíduo ou progênie.

Resultados similares foram encontrados por Santos *et al.* (2011), ao analisar a variabilidade genética de quatro populações dessa espécie, procedentes de Manaus/AM, revelando 52 bandas (locos), com variação entre 300 a 2.072 pb, utilizando também cinco *primers*. Todavia, Apostol *et al.* (1996), quando analisaram populações coletadas em 16 bairros de seis cidades, em Porto Rico, utilizando também cinco *primers*, revelaram 57 locos RAPD variando de 184 a 1531 pb. Nesse trabalho, os autores, avaliaram a utilidade desses marcadores na definição da estrutura reprodutiva dessa espécie. No entanto, Hiragi *et al.* (2009) revelaram um número bem maior de locos (127) quando analisaram populações de *A. aegypti* resistentes a inseticidas, em três condições ambientais, utilizando 10 *primers*, mas com menor variação (200 a 2.000 pb). Ashraf *et al.* (2016), analisando a variabilidade genética de 18 populações das cidades de Faisalabad e Lahore, no Paquistão, utilizaram quatro *primers* de RAPD e revelaram 40 locos, variando de 200 a 2.000 pb. Os resultados destes autores assemelham-se em parte aos observados no presente trabalho, possivelmente, porque eles utilizaram número semelhante de *primers*, demonstrando que o número de locos está relacionado ao número de *primers*. O mesmo não foi observado com a variação.

Em relação às populações naturais, pode-se atribuir a maior variabilidade da população do Jorge Teixeira à baixa infraestrutura e existência de muitos estabelecimentos de conserto de veículos e armazenamento de peças, tais como depósito de sucatas, pneus, etc, favorecendo a manutenção de certa densidade populacional de *A. aegypti*, mesmo em períodos de baixa pluviosidade.

Apesar da população da Sala 03 estar sob condições elevadas de temperatura e pressão de CO<sub>2</sub> em relação à natureza (+2,5 °C; +400ppm de CO<sub>2</sub>), sua maior variabilidade genética em relação às demais populações pode estar relacionada ao baixo efeito dessas condições sobre a densidade populacional, possibilitando a manutenção da heterozigosidade média, já que esta população é oriunda da mistura de três populações: Coroadó, São José e Zumbi. Além do mais, populações naturais estão sujeitas às campanhas de controle de *A. aegypti*, com o uso de inseticidas, como é o caso do Lírio do Vale, que possivelmente, seja uma população jovem resultante de um efeito fundador, por ser um dos locais dessas ações de controle, que apresentou elevados índices de infestação pelo *Aedes aegypti* nos últimos LIRAs até 2015.

No entanto, na Sala 04, a baixa variabilidade pode estar relacionada com a redução do tamanho efetivo da população, provocada pelas condições extremas (+4,5 °C; +850ppm de CO<sub>2</sub>) e essas condições talvez possam fazer com que essa população seja recomposta por

poucos indivíduos (Efeito do Fundador), e quanto maior a taxa de extinção e recolonização da população, menor a variância nas frequências alélicas.

Considerando-se os padrões eletroforéticos obtidos neste estudo, verifica-se que as populações de *A. aegypti* de Manaus analisadas, mostraram o número de bandas (locos) e a variação do peso molecular destes fragmentos semelhantes aos de populações de *A. aegypti* do Brasil, e de outros países.

## 6.2 Análise da variabilidade genética dos marcadores RAPD

A variabilidade genética é considerada um fenômeno biológico de grande importância, sendo um pré-requisito para que haja evolução adaptativa de uma espécie, uma vez que a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações, em função da adaptação ao ambiente (HARTL, 1981).

Conforme assinala Nevo (1978), a variabilidade genética interespecífica, intrapopulacional e interpopulacional são condições fundamentais para a evolução, levando à seleção de genótipos, mediante pressões ambientais, como por exemplo, mudanças climáticas e o uso de inseticidas, que podem causar considerável efeito sobre a estrutura genética populacional de *A. aegypti* (HUBER *et al.*, 2002; PAUPY *et al.*, 2005; SCARPASSA *et al.*, 2008). Sendo assim, a variabilidade genética pode ser medida por três parâmetros: o número de locos polimórficos, heterozigosidade média (esperada/observada) e tamanho amostral. Segundo Nei (1972), ela também pode ser medida pela distância genética. Estudos de *A. aegypti*, sem levar em conta o tipo de marcador (RAPD, mtDNA, microssatélites, isoenzimas,) têm detectado níveis elevados de variabilidade genética (AYRES *et al.*, 2003; BRACCO *et al.*, 2007; ENDERSBY *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011; FRAGA *et al.*, 2013), apresentando na maioria, valores maiores do que esses dados obtidos nas seis populações desse mosquito aqui analisadas.

Nas populações naturais de *A. aegypti* analisadas em Manaus, no presente trabalho, a percentagem de locos polimórficos (P) teve variação de 70% a 86% e a heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) de 0,2667 a 0,3245, onde os maiores valores de variabilidade genética estimados foram encontrados no bairro de Jorge Teixeira ( $P = 82\%$ ;  $H_o = 0,3245$ ) e os menores no de Lírio do Vale ( $P = 74\%$ ;  $H_o = 0,2667$ ).

Ayres *et al.* (2003), investigando níveis de estrutura genética em populações de *A. aegypti* de estados brasileiros, inclusive do Amazonas, a partir de marcadores RAPD, revelaram valores maiores de polimorfismo, com percentagem de locos polimórficos de até 100% e



heterozigosidade média esperada similar, variando de 0,243 a 0,300. Ainda de acordo com estes autores, os níveis de polimorfismo mais baixos encontrados em algumas populações, podem estar relacionados ao uso frequente de inseticidas em áreas de campanha de controle, propiciando o estabelecimento de ciclos de extinção e recolonização.

Fraga *et al.* (2003), ao realizarem estudo sobre a variabilidade genética de *A. aegypti*, por meio marcadores isoenzimáticos em populações de quatro bairros (Compensa, Cidade Nova, Coroadó e Centro) da cidade de Manaus, encontraram menor variabilidade genética, cujos valores de locos polimórficos, variaram de 44,4% a 55,6% e heterozigosidade observada de 0,109 a 0,152. Para estes autores, os valores de variabilidade genética obtidos com isoenzimas são geralmente mais baixos do que os obtidos diretamente do DNA, pois neste revela-se maior número de locos. Mesmo assim, tais valores obtidos com marcadores isoenzimáticos indicam a não ocorrência de efeito fundador recente. De acordo com Nei *et al.* (1975), uma população iniciada por dois a dez indivíduos necessitaria de até 105 gerações para que sua heterozigosidade voltasse a níveis iniciais.

Santos *et al.* (2011), ao estudarem a diversidade genética de populações de *A. aegypti*, realizaram análise comparativa com marcadores RAPD e isoenzimas, em quatro bairros (Coroadó, Compensa, Cidade Nova e Praça 14) de Manaus. Para RAPD, foram obtidos valores ligeiramente mais elevados com percentagem de locos polimórficos variando de 82,69% a 94,23% e heterozigosidade média observada de 0,338 a 0,387. A diversidade genética com os marcadores RAPD foi significativamente maior do que a diversidade calculada com base nos marcadores de isoenzimas ( $P = 44,40 - 55,60$ ;  $H_o = 0,109 - 0,152$ ). É importante salientar que os valores de polimorfismos e heterozigosidades obtidos diretamente do DNA, como é o caso do RAPD, correspondem aproximadamente a duas vezes, ou mais, o nível encontrado em aloenzimas (APOSTOL *et al.*, 1996).

Estudos realizados em populações de outra espécie do gênero *Aedes*, mostraram níveis de variabilidade genética menores aos encontrados no presente estudo. Essas populações de *A. albifasciatus*, procedentes da Argentina Central, foram analisadas por Sousa *et al.*, (1999), usando marcadores RAPD e foram encontrados valores de porcentagem de locos polimórficos variando de 60,7% a 89,3% e heterozigosidade média esperada de 0,19 a 0,31. Já em populações de *A. aegypti* da Argentina, os valores de polimorfismo a partir de marcadores RAPD foram maiores, com locos polimórficos chegando até 100% e heterozigosidade média esperada de 0,279 a 0,411.

Apesar das populações naturais estarem localizadas relativamente próximas, dentro do perímetro urbano da cidade de Manaus, a variabilidade genética apresentada por elas foi diferente. No Jorge Teixeira, os maiores valores obtidos de variabilidade genética ( $P = 82,00\%$ ;  $H_o = 0,3245$ ) podem estar relacionados, principalmente, com os efeitos da Seleção Natural, que favorece populações altamente variáveis. A população do Lírio do Vale apresentou menor variabilidade genética ( $P = 74\%$ ;  $H_e = 0,2667$ ), e isso pode estar relacionada com a ação antrópica. Na cidade são realizadas intensas atividades de combate ao mosquito, e essas medidas podem estar contribuindo para a redução no tamanho efetivo dessa população, que para se reestabelecer, deve ser recomposta por poucos indivíduos (Efeito do Fundador). Quanto maior a taxa de extinção e recolonização da população, menor será a variância nas frequências alélicas (FUTUYMA, 1992). Outro fator que pode contribuir para a redução da variabilidade genética na população é a deriva genética e endogamia.

Considerando-se os dados de locos polimórficos e heterozigosidade média obtidos neste estudo, verifica-se que as populações de *A. aegypti* de Manaus, demonstram níveis de variabilidade genética similares aos de outras populações deste mosquito e, inclusive, as populações de *A. aegypti*, analisadas com vários marcadores moleculares no Brasil, e em diferentes partes do mundo (FRAGA *et al.*, 2003; AYRES *et al.*, 2003; SOUSA *et al.*, 2001). Nesse contexto, supõe-se que essas populações estejam sofrendo efeitos de seleção natural e pressões antrópicas em níveis diferentes, o que pode estar provocando a perda de alelos que favorecem os heterozigotos em algumas delas, resultante do Efeito Fundador (*bottleneck*).

Em relação às populações do Microcosmos, a que apresentou maior estimativa de variabilidade foi a Sala 03 ( $P = 86$ ;  $H_o = 0,3293$ ), enquanto que, a Sala 04 apresentou os menores valores ( $P = 80$ ;  $H_o = 0,3086$ ). A variabilidade genética está diretamente relacionada a parâmetros biológicos, uma vez que fatores genéticos são responsáveis pela maioria das características que contribuem para o sucesso dos insetos vetores (AYRES *et al.*, 2003). Os dados do Microcosmos estão de acordo com as análises de Jia *et al.* (2017), que avaliaram o comportamento de parâmetros biológicos da população de *A. albopictus* de Guangzhou, na China, sob alterações térmicas ao longo das quatro estações anuais. Segundo estes autores, o aumento da temperatura em até  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  não interferiu no desenvolvimento dos mosquitos em nenhuma das fases do seu ciclo de vida. Ao contrário, variações térmicas dentro desse intervalo, podem ser favoráveis à expansão dessa espécie para áreas até então não colonizadas. No entanto, o aumento da temperatura acima desse valor pode aumentar a taxa de mortalidade. Azevedo (2015), estudando os parâmetros biológicos das mesmas populações de *A. aegypti*

analisadas no presente trabalho, observou que a população da Sala 04 teve fecundidade, número de ovos, eclosão e longevidade inferiores aos da Sala 03.

Mweya *et al.* (2016) analisando o efeito de mudanças climáticas na distribuição de *A. aegypti* na Tanzânia, observou que até o ano 2050 ocorrerá um aumento na emergência de áreas com risco de transmissão de dengue, em consequência da grande influência que cenários futuros de mudanças climáticas têm sobre essa espécie. Em Manaus não foram realizados estudos anteriores para prever o papel das condições climáticas na variabilidade genética de populações desse mosquito e transmissão de doenças.

### 6.3 Estrutura e diferenciação genética das populações

A estrutura genética das populações é uma consequência dos padrões de cruzamento e da magnitude do fluxo gênico entre as subpopulações. A tendência para o cruzamento aleatório e taxas elevadas de fluxo gênico entre as subpopulações podem levar a uma diminuição da estrutura genética. Por outro lado, o aumento da estruturação genética é ocasionado por taxas elevadas de endocruzamento e redução do fluxo gênico. (EANES e KOEHN, 1978).

Os dados de estrutura genética, a partir do índice de fixação ( $F_{st}$ ) – coeficiente de ancestralia ( $\theta$ ) – indicaram baixa diferenciação genética ( $F_{st} = 0,1331 \pm 0,1072$ ) e elevado nível de fluxo gênico entre as populações naturais, cujo índice de consistência do *bootstrapping* para 10.000 replicações foi de 95%. Os valores obtidos neste trabalho são baixos quando comparados com os de Sousa *et al.* (2001), que estudaram o relacionamento genético entre populações de *A. aegypti* da Argentina por meio de RAPD. Estes autores encontraram valores de  $F_{st}$ , bem mais elevados utilizando métodos estatísticos diferentes ( $F_{st}$  de Wright = 0,250; método  $\theta = 0,249$ ; e  $F_{st}$  de Lynch e Milligan = 0,300). Estes valores encontrados foram atribuídos à distância geográfica entre as populações argentinas, o que teria possibilitado a redução no fluxo gênico e, conseqüentemente, maior estruturação genética entre as populações, de forma que, as mesmas durante o processo evolutivo tornaram-se cada vez mais diferenciadas.

Valores maiores ( $F_{st} = 0,303$ ) foram obtidos por Ayres *et al.* (2003), em populações desse mosquito em vários estados do Brasil, e por Ashraf *et al.* (2016) ( $F_{st} = 0,341$ ), estudando variações genéticas em populações de *A. aegypti* no Paquistão com esse mesmo marcador. De acordo com estes autores, os valores encontrados são condizentes com os encontrados em algumas populações da Argentina e do Brasil. Esses resultados indicam elevado nível de

estruturação genética das populações, podendo estar relacionados às distâncias geográficas entre as populações analisadas ( $\cong 1.000$  km de distância).

Estudando a variabilidade genética em populações de *A. aegypti* de Manaus, usando análise isoenzimática, Fraga *et al.* (2003) encontraram valores de  $F_{st}$  menores (0,048) do que os obtidos nesse trabalho. Segundo esses autores, a variabilidade das frequências alélicas detectadas foi maior dentro do que entre as populações, o que indicou um desequilíbrio resultante do excesso de homozigotos nas populações. Santos *et al.* (2011), em outro estudo realizado com populações da mesma espécie na cidade de Manaus, encontraram valores de  $F_{st}$  (0,032) não significativos. Para estes autores esses resultados são, em grande parte, devido às análises terem sido realizadas com marcadores dominantes (RAPD), que consideram as frequências dos alelos das populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O baixo valor de  $F_{st}$  foi principalmente, resultante da baixa proporção de variância interpopulacional em relação à intrapopulacional, indicando uma alta taxa de migração e que as populações possuem uma estrutura de metapopulação, ou seja, há fluxo gênico entre elas.

Comparando-se os dados obtidos nesse trabalho com os encontrados para outras espécies do gênero *Aedes*, usando esse mesmo marcador, verifica-se que há diferença quanto aos valores de  $F_{st}$ . Menor valor ( $F_{st} = 0,098$ ) foi obtido em estudos realizados com populações de *A. albifasciatus* da Argentina (SOUSA *et al.*, 1999). O mesmo foi observado por Ayres *et al.* (2002), quando descreveram que os níveis de  $G_{st}$  das populações de *A. albopictus* dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro são baixos (0,077). Valores menores de  $F_{st}$  (0,072) também foram descritos por Manni *et al.* (2015) analisando populações de *A. albopictus* da Argentina, com uso de marcadores microssatélites.

Os dados de distância e similaridade genética analisados nesse estudo indicaram que o fluxo gênico entre as populações podem estar ocorrendo em níveis elevados. A maior distância genética entre as populações naturais foi observada no Morro da Liberdade e no Lírio do Vale ( $D = 0,0827$ ) e a menor entre as populações do Jorge Teixeira e do Morro da Liberdade ( $D = 0,0290$ ).

Utilizando isoenzimas, Fraga *et al.* (2003) observaram similaridade genética elevada em outras populações de *A. aegypti* de Manaus, onde a maior distância genética foi entre as populações do Centro e Compensa ( $D = 0,016$ ) e a menor entre as populações do Centro com as do Coroadó e Cidade Nova ( $D = 0,003$ ). Esses valores mostraram um baixo nível de

diferenciação genética entre as populações analisadas, possivelmente, devido à elevada capacidade adaptativa aos mais variados habitats e resistência a inseticidas.

Utilizando marcadores RAPD em populações de *A. aegypti* de cinco estados brasileiros (Amazonas, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e São Paulo), Ayres *et al.* (2003) detectaram baixos valores de similaridade entre as populações com distância genética variando entre 0,047 e 0,381. Tais valores mostram que o alto nível de diferenciação genética entre estas populações pode estar relacionado à distância geográfica ou ao uso contínuo de inseticidas, que leva a ciclos de extinção e recolonização, tendo como consequência a deriva genética.

Santos *et al.* (2011), utilizando marcadores RAPD, em outras populações de Manaus, obtiveram similaridade genética elevada, onde a maior distância genética foi entre as populações da Cidade Nova com as da Compensa e Praça 14 (0,0166) e a menor distância foi entre as populações do Coroado e Cidade Nova (0,0122). Esses valores indicam que os níveis de fluxo gênico entre as populações podem ser elevados.

A elevada variabilidade genética e os baixos valores do índice de fixação ( $F_{st}$ ) e da distância genética indicam níveis elevados de fluxo gênico entre as populações estudadas. Isso pode estar relacionado às altas taxas de dispersão passiva do *A. aegypti*, aumento da densidade populacional humana, baixo índice educacional e ausência de saneamento básico, apesar das aplicações sistemáticas de inseticidas, que reduzem o tamanho das populações dessa espécie.

Considerando a relação direta entre distâncias genéticas e tempo de evolução de *Aedes aegypti*, pode-se inferir que a divergência entre as populações analisadas é bastante recente, sendo possivelmente, o resultado de uma única introdução em Manaus, em novembro de 1996, e por sua alta capacidade de dispersão e de adaptação, a espécie se propagou em outros distritos da cidade (PINHEIRO e TADEI, 2002; FIGUEIREDO *et al.*, 2004).

Em populações naturais, espera-se que quanto mais próximas geograficamente elas estejam, mais semelhantes elas sejam, em termos de base genética, provocadas, principalmente, pelo fluxo gênico (IBD). No entanto, nem sempre isso ocorre. Entre Morro da Liberdade e Lírio do Vale a distância genética foi maior do que entre Morro da Liberdade e Jorge Teixeira, embora as duas primeiras populações estejam mais próximas geograficamente (Figura 13). Em termos geográficos, as populações analisadas são relativamente distantes, sendo Jorge Teixeira e Lírio do Vale as mais distantes e Jorge Teixeira e Novo Aleixo as menos distantes em linha reta. No entanto, diferenças na intensidade do tráfego de veículos entre os bairros de Manaus

podem favorecer o fluxo gênico entre determinadas populações de *A. aegypti*, tornando-as mais próximas geneticamente.

No Microcosmos, as condições extremas a que está submetida à população da Sala 04 pode ter ocasionado uma alta taxa de mortalidade, com redução drástica no número de indivíduos, favorecendo a endogamia. Esses e outros efeitos, tais como baixos índices de acasalamento, inseminação e postura, podem ser os responsáveis pela diferenciação genética entre essa população e a da Sala 03 ( $D = 0,1191$ ), embora ambas tenham sido fundadas com indivíduos das mesmas populações naturais. Possivelmente, essa diferença está relacionada à sobreposição dos efeitos das condições da Sala 04 ( $+4,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $+800\text{ ppm de CO}_2$ ) sobre o *fitness* da população. Esses parâmetros climáticos podem estar provocando sucessivos eventos de Efeito Fundador (*bottleneck*) naquela população. Já na Sala 03, a capacidade adaptativa do *A. aegypti*, aparentemente, está superando as condições ( $+2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $+400\text{ ppm de CO}_2$ ), embora estejam acima das encontradas no ambiente natural.

As relações genéticas entre as populações indicaram que as do Morro da Liberdade e Jorge Teixeira, são geneticamente próximas, pois estão agrupadas em um mesmo *cluster*, embora as distâncias entre essas populações excedam a capacidade de dispersão ativa do *A. aegypti* (3 km) (REITER *et al.*, 1995). Provavelmente, o fluxo gênico entre essas populações esteja sendo favorecido por dispersão passiva, por via terrestre (rodoviária), através de ovos depositados em pneus usados, caixas de papelão, ou através de adultos que se abrigam dentro de veículos (ônibus, caminhões, etc.), que ao saírem de uma região, levam as formas aladas para outras áreas da cidade.

As populações do Microcosmos apresentaram menor similaridade do que as naturais (dos bairros), com maior distância genética ( $D = 0,1181$ ), embora a população da Sala 03 estivesse na 51ª geração e a da Sala 04 (41ª), ambas foram oriundas das mesmas populações (Coroadó, São José e Zumbi). Essas duas populações do Microcosmos foram separadas em um *cluster* cada uma. Sabe-se que por estarem fisicamente separadas entre si e das demais, não há fluxo gênico entre elas e nem com as populações naturais. Embora a barreira física por si só imponha condições para o isolamento reprodutivo, as condições climáticas diferentes podem também contribuir para essa divergência em poucas gerações (JIA *et al.*, 2017). Alfenas (1998), relata que a redução no tamanho de uma população têm efeito sobre as gerações subsequentes, pois esta será iniciada por poucos indivíduos, e sua variabilidade genética dependerá da amostra de alelos trazida por estes. Um efeito fundador pode estar causando a redução da variabilidade genética e diferenças significantes na população da Sala 04, separando-a em outro *cluster*.

Os mosquitos são organismos peclotérmicos, sujeitos à variação externa do clima, influenciando diretamente sua temperatura corporal, capazes de se adaptar às alterações extremas do ambiente (BREAUX *et al.*, 2014). Apesar de parâmetros climáticos exercerem influência, geralmente positiva, sobre a adaptabilidade do *A. aegypti*, favorecendo sua dispersão e estabelecimento, o aumento acima de 2,5 °C na temperatura e acima de 400 ppm na concentração de CO<sub>2</sub> parecem ser desfavoráveis à manutenção da densidade populacional, e conseqüentemente, na variabilidade genética. No entanto, para Beebe *et al.* (2009), a distribuição potencial de *A. aegypti* no futuro estará mais relacionada ao ambiente favorável criado pelo homem, o que irá se sobrepor à pressão de seleção imposta pelas condições climáticas extremas, e em particular pelo aumento de temperatura. Para Hoffmann e Sgrò (2011) as populações terão dificuldades em se adaptar, devido à baixa hereditariedade de algumas características, efeitos ambientais primordiais sobre fenótipos e fortes pressões.

#### **6.4 Análise da variabilidade do gene *Kdr* (*Knockdownresistance*)**

Para o controle do *A. aegypti* ainda são empregados inseticidas químicos. Essa utilização pode selecionar linhagens resistentes, ocasionando falhas no controle. Diversos trabalhos científicos relacionam mutações no gene codificante do canal de sódio e a resistência a inseticidas piretróides e DDT (BRENGUES *et al.*, 2003; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2009). Introduzido no início dos anos 2000, devido ao aparecimento de populações resistentes aos organofosforados, utilizados no controle vetorial, o piretróide deltametrina é o inseticida utilizado atualmente em todo país, por se tratar de um produto mais eficiente, menos nocivo, com baixa toxicidade aos mamíferos e limitada persistência no solo (SODERLUND, 2008). Porém, em menos de dez anos de uso foram detectadas populações resistentes a este inseticida (PEREIRA-DA-CUNHA *et al.*, 2005; MONTELLA, 2007).

A resistência a piretróides relacionada ao desenvolvimento de mutações tipo *Kdr*, tem sido reportada há muito tempo, em diversas espécies de insetos como em moscas doméstica (WILLIAMSON *et al.*, 1993), em insetos pragas ou vetores, como a mosca do chifre *Haematobia irritans* (MCDONALD e SCHMIDT, 1987), a praga do tabaco *Heliothis virescens* (TAYLOR *et al.*, 1993), a barata *Blattella germanica* (DONG e SCOTT, 1994) além dos mosquitos *A. aegypti* (SEVERSON *et al.*, 1997), *Anopheles gambiae* e *Anopheles arabiensis* (DABIRÉ *et al.*, 2014).

Neste trabalho foi possível detectar a alta frequência com que o alelo mutante *1016Ile* aparece nas populações naturais, variando de 0,2069 em Lírio do Vale a 0,4118 no Morro da Liberdade. A elevada frequência desse alelo (*1016Ile*) encontrada nessas populações de Manaus, num tempo relativamente curto, quando se trata de evolução, indica que essa mutação está sendo favorecida nas condições atuais, mesmo quando o uso do inseticida não é tão intenso, como na população do Lírio do Vale. No entanto, Martins *et al.* (2012) reportaram um *fitness* negativo dessa mutação *Kdr* em populações de *A. aegypti* do estado do Rio de Janeiro, na ausência de pressão de seleção por inseticida.

Sendo assim, a alta frequência do alelo mutante (*1016Ile*) na população do Morro da Liberdade, duas vezes maior que a do Lírio do Vale, pode possivelmente, estar associada à proximidade dessa população com a da Praça 14 de Janeiro, onde foi o primeiro bairro a ser registrada a presença do *A. aegypti* em Manaus, no ano de 1996 (PINHEIRO e TADEI, 2002), além do uso intensivo de inseticidas no controle deste mosquito, desde esta época, havendo tempo suficiente para o desenvolvimento da resistência aos inseticidas, bem como o *fitness* dessa espécie. No entanto, considerando que as populações analisadas não foram submetidas a testes de resistência, as frequências encontradas para todas as populações indicam que o uso continuado de inseticidas está expondo as populações de *Aedes aegypti* à intensa pressão de seleção, indicando a necessidade de acompanhamento da frequência de mutações no gene do canal de sódio paralelamente, a realização de bioensaios para detecção de suscetibilidade aos piretróides. Informações que podem auxiliar na eficiência dos programas de controle do vetor.

Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007) verificaram em ensaios de pressão de seleção com piretróides, que populações de Cuba e México mostraram aumento drástico da frequência do alelo *1016Ile* em poucas gerações. Martins *et al.* (2009) sugeriram a ocorrência de uma dispersão do alelo *1016Ile* por todo o Brasil, proveniente de municípios localizados na região Centro-Oeste, na fronteira com outros países.

Os resultados encontrados mostram que para o gene *Kdr*, essas populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ocorrendo fluxo gênico entre elas e baixa diferenciação genética revelada, como mostra o índice de fixação ( $F_{st} = 0,0619$ ), apesar do controle massivo com deltametrina em todos os bairros, devido a detecção de altos níveis de infestação obtidas nos LIRAA, realizados periodicamente pelos agentes de controle da Fundação de Vigilância em Saúde.

De acordo com o LIRAA de 2015, nos Bairros Morro da Liberdade e Jorge Teixeira, os recipientes predominantes foram depósitos ao nível do solo, como barris, tambores, tanques;



lixo, como recipientes plásticos, garrafas, latas, sucatas em pátios, ferros velhos, recicladoras e entulhos. Já no bairro Novo Aleixo foi predominante apenas os depósitos ao nível do solo. No Lírio do Vale, além de todos os recipientes acima citados, foram encontrados também em caixas d'água ligadas à rede de abastecimento, depósitos elevados e também em pneus descartados.

Toda esta disponibilidade de criadouros, aliada aos altos índices pluviométricos observados na região, influenciam diretamente o aumento da densidade de *A. aegypti*, e consequentemente, dos casos de dengue e outras arboviroses, como por exemplo, zika e chikungunya.

A frequência do alelo *1016Ile* (mutante) nas populações do Microcosmos foi zero. Tanto na Sala 03 quanto na Sala 04, predominou o alelo *Val1016* (selvagem). Para Hoffmann e Sgrò (2011), os organismos terão dificuldades em se adaptar a cenários futuros, devido à baixa hereditariedade de alguns traços sob efeitos ambientais primordiais e pressões de seleção forte. Os dados encontrados indicam que aumentos de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub>, a partir de +2,5 °C e +400 ppm, respectivamente, criam condições desfavoráveis à manutenção do alelo mutante nas populações. Esse alelo mostrou ser um traço que apresenta baixa hereditariedade sob condições elevadas de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub>. As condições climáticas extremas, encontradas nas Salas do Microcosmos, possivelmente estão atuando como um fator de seleção negativa para o alelo mutante. Esse alelo pode ter baixa expressão gênica com aumentos de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> a partir de +2,5 °C e +400 ppm, respectivamente.

Do mesmo modo que o uso continuado de piretróides seleciona indivíduos resistentes, provocando o aumento da frequência do alelo *1016Ile* nas populações (Lima *et al.*, 2003), a ausência desses compostos no ambiente pode estar provocando a diminuição da frequência desse alelo no Microcosmos. As populações das salas 03 e 04 estão há muitas gerações isoladas do ambiente natural (51<sup>a</sup> e 41<sup>a</sup>, respectivamente), não estando sujeitas ao contato com compostos piretróides. Nessas circunstâncias, o alelo *1016Ile* pode estar sofrendo uma redução drástica.

Mais estudos considerando os cenários futuros de mudanças climáticas são necessários para o entendimento da composição genética de populações de *A. aegypti*. Para Williams *et al.* (2014), esses trabalhos devem se concentrar em modelagens de riscos de transmissão de doenças, fazendo uso de abordagens mais mecanicistas que levem em conta mudanças previstas nas características biológicas do mosquito, tais como tamanho corporal, taxa de incubação do vírus, etc., associados a aspectos da estrutura genética das populações.

## 7 CONCLUSÃO

### 7.1 Marcadores RAPD

A análise dos dados das populações naturais de *A. aegypti*, com base no estudo de RAPD, possibilitou propor que as seis populações estudadas apresentaram variabilidade genética elevada. Embora essas populações sejam da mesma cidade (Manaus), não apresentaram variabilidade genética similar. No ambiente Microcosmos, a população da Sala 03 foi a que mostrou maior variabilidade genética.

As populações foram agrupadas em quatro *clusters*: um constituído por Morro da liberdade e Jorge Teixeira; outro por Novo Aleixo e Lírio do Vale e os dois últimos pelas salas 04 e 03, respectivamente. As populações do Microcosmos ficaram isoladas das demais e em um *cluster* cada uma, provavelmente, devido a seu isolamento da natureza a várias gerações e às condições mais severas de temperatura e CO<sub>2</sub>.

Não houve uma correlação clara entre distância genética e distância geográfica entre as populações analisadas. É possível que o fluxo gênico seja favorecido em pequena escala pelo transporte terrestre, que serve como meio de dispersão das populações desse mosquito. Ou ainda é possível que a distância genética esteja relacionada com a recente colonização desta espécie na cidade de Manaus, a partir de 1996.

### 5.2 Gene *Kdr* (*Knockdown resistance*)

As análises genéticas revelaram a presença do alelo mutante *1016Ile* somente nas populações naturais analisadas, estando ausente nas do Microcosmos. Em homozigose recessiva, esse alelo confere resistência a piretróides em *A. aegypti*.

A maior frequência do alelo mutante foi observada na população do Morro da liberdade.

Por outro lado, a própria ausência de pressão de seleção por inseticidas piretróides, devido ao isolamento das populações do Microcosmos do ambiente natural, pode estar levando a uma diminuição na frequência do alelo *1016Ile*.

Os valores de  $\chi^2$  não foram significativos para as quatro populações naturais, indicando que as mesmas encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com excesso de heterozigotos

e diferenciação genética interpopulacional moderada, sendo as populações Morro da Liberdade e Lírio do Vale as mais distantes geneticamente. Estes resultados podem ser explicados, em decorrência do tempo de infestação, pressão de seleção no controle da dengue e elevado *fitness* desse mosquito.

Assim, diante dos resultados obtidos, faz-se necessário o monitoramento do uso desses inseticidas nas ações de controle, empregando rodízios com diferentes classes de inseticidas.

## REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; ZAMORA-PEREA, E.; FERRAZ, G.; PADILLA-TORRES, S. D.; LUZ, S. L. B. Mosquito-Disseminated Pyriproxyfen Yields High Breeding-Site Coverage and Boosts Juvenile Mosquito Mortality at the Neighborhood Scale. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 4, p. e0003702, 2015.
- ALFENAS, A.C.; DUSI, A.; ZERBINI JÚNIOR, F.C.; ROBINSON, I.P.; MICALES, J.A.; OLIVEIRA, J.R. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 574 p., 1998.
- APOSTOL, B.; BLACK, W.; MILLER, B.; REITER, P.; BEATY, B. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 86, n. 08, p. 991-1000, 1993.
- APOSTOL, B. L.; BLACK IV, W. C.; REITER, P.; MILLER, B. R. Populations genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. **Heredity**, v. 76, p. 325–334, 1996.
- APPERSON, C. S.; GEORGHIOU, G. P. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. **Journal Economic Entomology**, v. 68, n. 2, p. 153-7, 1975.
- ASHRAF, H. M.; ZAHOOR, M. K.; NASIR, S.; MAJEED, H. N.; ZAHOOR, S. Genetic analysis of *Aedes aegypti* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from dengue outbreaks in Pakistan. **Journal of Arthropod-Born Disease**, v. 10, n. 4, p. 546–559, dez. 2016.
- AZEVEDO, J. B. **Análise do ciclo biológico do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposto a cenários de mudanças climáticas previstas pelo IPCC**. 2015. 52 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2015.
- AYALA, F. J. **Population and evolutionary genetics. A primer**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, Califórnia, 268 pp., 1982.
- AYALA, F.J.; KIGER, J.A. **Genética moderna**. México: Fondo Educativo Interamericano, 836 pp., 1984.
- AYRES C. F. J.; ROMÃO, T. P. A.; MELO-SANTOS, M. V. A. ; FURTADO, A. F. Genetic Diversity in Brazilian Populations for *Aedes albopictus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 871–875, 2002.

AYRES, C. F. J.; MELO-SANTOS, M. A. B.; SOLE-CAVA, A. M.; FURTADO, A. F. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. **Journal Medical Entomology**, v. 40, n. 4, p. 430–435, 2003.

BEEBE, N. W.; COOPER, R. D.; MOTTRAM, P.; SWEENEY, A. W. Australia's dengue risk driven by human adaptation to climate change. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 5, p. e429, 2009.

BENELLI, G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitology Research**, v.114, n. 8, p 2801–2805, 2015.

BLOOMQUIST, J. R. Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 2, p. 301-314, 1993.

BRACCO, J. E.; CAPURRO, M. L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SALLUM, M. A. M. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 05, p.573–580, 2007.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 179–293, dez. 2007a.

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

BRASIL, Ministério da Saúde **Controle de Vetores/Inseticidas e Larvicidas**. 2014  
Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/control-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

BREAUX, J. A.; SCHUMACHER, M. K.; JULIANO, S. A. What does not kill them makes them stronger: larval environment and infectious dose alter mosquito potential to transmit filarial worms. **Proceedings. Biological sciences**, v. 281, n. 1786, 2014.

BRENGUES, C. HAWKES, N. J.; CHANDRE, F.; MCCARROLL, L.; DUCHON, S.; GUILLET, P.; MANGUIN, S.; MORGAN, J. C.; HEMINGWAY, J. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p. 87–94, 2003.

BROWN, J. E. *et al.* Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple ‘domestications’ of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, p. rspb20102469, 2011.

BROWN, J. E. *et al.* Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514–525, 2014.

BOUZID, M.; COLÓN-GONZÁLEZ, F. J.; LUNG, T.; LAKE, I. R.; HUNTER, P. R. Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. **BMC Public Health**. v. 14, n. 1, p. 781, 2014.

CALVO, E.; ANDERSEN, J.; FRANCISCHETTI, I.M.; CAPURROT, M.; BIANCHI, A.G.; JAMES, A.A.; RIBEIRO, J.M.C.; MARINOTTI, O. The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. **Insect Molecular Biology**, v.13, n.1, p.73-88, 2004.

CÂMARA, F. P.; GOMES, A.; SANTOS, G.; CÂMARA, DANIEL. Clima e epidemias de dengue no Estado do Rio de Janeiro Climate and dengue epidemics in State of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 137–140, 2009.

CAMPBELL-LENDRUM, D.; MANGA, L.; BAGAYOKO, M.; SOMMERFELD, J. Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy? **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 370, n. 1665, 2015.

CAMPOS, M.*et al.* Seasonal population dynamics and the genetic structure of the mosquito vector *Aedes aegypti* in Sao Paulo, Brazil. **Ecology and evolution**, v. 2, n. 11, p. 2794–2802, 2012.

CIOTA, Alexander T. *et al.* The effect of temperature on life history traits of *Culex* mosquitoes. **Journal of medical entomology**, v. 51, n. 1, p. 55–62, 2014.

CHADEE, D. D. *et al.* Oviposition response of *Aedes aegypti* mosquitoes to different concentrations of hay infusion in Trinidad, West Indies. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 9, p. 346–346, 1993.

CHANG, C.; SHEN, W.K.; WANG, T. T.; LIN, Y. H.; HSU, E. L.; DAI, S. M. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with *Knockdown resistance* to permethrin in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 39, p. 272–8, 2009.

CHAVES, L. F. *et al.* Nonlinear impacts of climatic variability on the density-dependent regulation of an insect vector of disease. **Global Change Biology**, v. 18, n. 2, p. 457-468, 2012.

CHAVES, L. F. *et al.* Hot temperatures can force delayed mosquito outbreaks via sequential changes in *Aedes aegypti* demographic parameters in autocorrelated environments. **Acta tropica**, v. 129, p. 15-24, 2014.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994.

CONYERS, C. M.; MACNICOLL, A. D.; PRICE, N. R. Purification e characterization de an esterase involved in resistance to organophosphorous insecticides in the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 28, p. 435-448, 1998.

COURET, J.; BENEDICT, M. Q. A meta-analysis of the factors influencing development rate variation in *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae). **BMCEcol**. Vol. 14, p. 3, 2014.

CHRISTOPHERS, R. *Aedes aegypti* (L.): The Yellow Fever Mosquito. Cambridge University Press, 1960.

DABIRÉ, R. K. NAMOUNTOUNGOU, M.; DIABATÉ, A.; Soma, D. D.; BADO, J.; TOÉ, H. K.; BASS, C.; COMBARY, P. Distribution and frequency of *Kdr* mutations within *Anophelesgambiae* s.l. populations and first report of the ace.1 G119S mutation in *Anophelesarabiensis* from Burkina Faso (West Africa). **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101484, 2014.

DAVIES, T. G. E.; FIELD, L. M.; USHERWOOD, P. N. R.; WILLIAMSON, M. S. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **Life**, v. 59, n. 03, p. 151–162, 2007.

DAVIES, T. E.; O'REILLY, A. O.; FIELD, L. M.; WALLACE, B.; WILLIAMSON, M. S. *Knockdown resistance* to DDT and Pyrethroids: From Target-Site Mutations to Molecular Modelling. **Pest Management Science**, v. 64, n. 11, p. 1126–1130, 2008.

DEGENNARO, M.; MCBRIDE, C. S.; SEEHOLZER, L.; NAKAGAWA, T.; DENNIS, E. J.; GOLDMAN, C.; JASINSKIENE, N.; JAMES, A. A.; VOSSHALL, L. B. Orco Mutant Mosquitoes Lose Strong Preference for Humans and Are Not Repelled by Volatile DEET. **Nature**, v. 498, n. 7455, p. 487–491, 2013.

DIAS C. N.; MORAES, D. F. C. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti*L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitology Research**. v. 113, n. 02, p. 565-592, 2014.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259–279, 2002.

DONG, K.; SCOTT, J. G. Linkage of *Kdr*-Type resistance and the para-homologous sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, n. 7, p. 647–654, 1994.

DONG, K.; DU, Y.; RINKEVICH, F.; NOMURA, Y.; XU, P.; WANG, L.; SILVER, K.; ZHOROV, B. S. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 50, p. 1-17, 2014.

EANES, W. F.; KOEHN, R. K. An analysis of genetic structure in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* L. **Evolution**, v. 32, n. 4, p. 784–797, 1978.

ENDERSBY, N. M.; HOFFMANN, A. A.; WHITE, V. L.; RITCHIE, S. A.; JOHNSON, P. H.; WEEKS, A. R. Changes in the Genetic Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations in Queensland, Australia, Across Two Seasons: Implications for Potential Mosquito Releases. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 5, p. 999–1007, 2011.

FAY, R.; PERRY, A. S. W. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. **Mosquito News**. v. 25, p. 270–281, 1965.

FERRARI J. A. **Insecticide resistance In: The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado; 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Embrapa, 220 pp., Brasília, 1995.

FEARNSIDE, P. M. Mudanças climáticas globais e a floresta amazônica. In: BUCKERIDGE, M. S. (ed.). *Biologia e mudanças climáticas globais no Brasil*. RiMa Editora, São Paulo, p. 131-150, 2008.



FFRENCH-CONSTANT, R. H.; PITTENDRIGH, B.; VAUGHAN, A.; ANTHONY, N. Why there so few resistance-associated mutation target genes? **Philosophical Transactions of the Royal Society London**, v. 353, p.1685-1693, 1998.

FIGUEIREDO, R. M. P. de; THATCHER, B. D.; LIMA, M. L. de; ALMEIDA, T. C.; ALECRIM, W. D.; GUERRA, M. V. de F. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 476–479, 2004.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia**. vol. 2, São Paulo: EdUSP, 1996.

FRAGA, E. C.; Oliveira, D. R. S.; ARAGÃO, SCHNEIDER, D. G.; SAMPAIO, H. I.; BARROS, M. C. Genetic variability and evidence of two distinct lineages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) on São Luís island in Maranhão, Brazil. **The Open Tropical Medicine Journal**, v. 6, p. 11–18, 2013.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. 646 pp., 1992.

GARCÍA, G. P.; FLORES, A. E.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; SAAVEDRA-RODRÍGUEZ, K.; REYES-SOLIS, G.; *et al.* Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 3, n. 10, p. 531, 2009.

GOMES, A. F.; NOBRE, A. A.; CRUZ, O. G. Análise temporal da relação entre dengue e variáveis meteorológicas na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, no período de 2001 a 2009. **Caderno de Saúde Pública**, v. 28, n. 11, p. 2189-2197, 2012.

HARRIS, A. F.; MCKEMEY, A. R.; NIMMO, D.; CURTIS, Z.; BLACK, I.; MORGAN, S. A.; OVIEDO, M. N.; LACROIX, R.; NAISH, N.; MORRISON, N. I.; COLLADO, A.; STEVENSON, J.; SCAIFE, S.; DAFA'ALLA, T.; FU, G.; PHILLIPS, C.; MILES, A.; RADUAN, N.; KELLY, N.; BEECH, C.; DONNELLY, C. A.; PETRIE, W. D.; ALPHEY, L. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. **Nat Biotech**, v. 30, n. 9, p. 828–830, set. 2012.

HARTL, D. L. **A primer of population genetics**. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. Publishers, 191 pp., 1981.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review Entomology**, v. 45, p. 371-391, 2000.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, J. N.; MCCARROLL, L.; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 653–665, 2004.

HAWLEY, William A. The biology of *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement**, v. 1, p. 1-39, 1988.

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.

HODKINSON, I. D. Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. **Biological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 489–513, 2005.

HOFFMANN, A. A.; MONTGOMERY B. L.; POPOVICI, J.; ITURBE-ORMAETXE, I.; JOHNSON, P. H.; MUZZI, F.; GREENFIELD, M.; DURKAN, M.; LEONG, Y. S.; DONG, Y.; COOK, H.; AXFORD, J.; CALLAHAN, A. G.; KENNY, N.; OMODEI, C.; MCGRAW, E. A.; RYAN, P. A.; RITCHIE, S. A.; TURELLI, M.; O’neill, S. L. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 454, 2011.

HOFFMANN, A. A.; SGRÒ, C. M. Climate Change and Evolutionary Adaptation. **Nature**, v. 470, n. 7335, p. 479–485, 2011.

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

HUGO, L. E. *et al.* Adult survivorship of the dengue mosquito *Aedes aegypti* varies seasonally in central Vietnam. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2669, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades**, 2016. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/am/manaus/panorama>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

IPCC. Climate Change: An Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Synthesis Report. Valencia – Spain, 2007. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/meetings/ar4-workshops-express-meetings/uncertainty-guidance-note.pdf> 27. Acesso em: março de 2016.

IPCC. Scope, content and process for the preparation of the synthesis report (syr) of the ipcc fifth assessment report (AR5), 2010.

ISHAK, I. H.; JAAL, Z.; RANSON, H.; WONDJI, C. S. Contrasting patterns of insecticide resistance and *Knockdown resistance (Kdr)* in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. **Parasites e Vectors**. v. 8, n. 181, p. 1–13, 2015.

JIA, P.; CHEN, X.; CHEN, J.; LU, L.; LIU, Q.; TAN, X. How does the dengue vector mosquito *Aedes albopictus* respond to global warming? **Parasites e Vectors**, v. 10, 2017.

JOSH, D. S. Effect of fluctuating and constant temperatures on development, adult longevity and fecundity in the mosquito *Aedes krombeini*. **J. trherm. Bid.** Vol. 21, p. 151–154, 1996.

JULIANO, S. A. Species interactions among larval mosquitoes: context dependence across habitat gradients. **Annu. Rev. Entomol.**, vol. 54, p. 37–56, 2009.

KANTOR, I. N. Dengue, zika and chikungunya. **Medicina**. v. 76, n. 02, p. 93–97, 2016.

KARAMANOU, M.; PANAYIOTAKOPOULOS, G. From miasmas to germs: A historical approach to theories of infectious disease transmission. **Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive**, v. 20, n. 1, p. 58–62, 2012.

KIMURA, M.; OHTA, T. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. **Nature**, v. 229, p. 235–237, 1971.

KHORMI, H. M.; LALIT, K.; RAMZE, A. E. Describing and analysing the association between meteorological variables and adult *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Journal of Food, Agriculture & Environment** 9:954–59, 2011.

KRAEMER, M. U.; SINKA, M. E.; DUDA, K. A.; MYLNE, A. Q.; SHEARER, F. M.; BARKER, C. M.; MOORE, C. G.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E.; BORTEL, W. V.; HENDRICKX, G.; SCHAFFNER, F.; ELYAZAR, I. R.; TENG, H.-J.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; PIGOTT, D. M.; SCOTT, T. W.; SMITH, D. L.; WINT, G. W.; GOLDING, N.; HAY, S. I. The Global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **Life**, v. 4, p. e08347, 2015.

LANA, R. M.; CARNEIRO, T. G. S.; HONÓRIO, N. A.; CODEÇO, C. T. Seasonal and nonseasonal dynamics of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro, Brazil: fitting mathematical models to trap data. **ActaTropica**, vol. 129, p. 25–32, 2014.

LI, W. H.; GRAUR, D. **Fundamentals of molecular evolution**. Sinderland: Sinauer. 1991.

LIMA, J. B. P. *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LIMA JÚNIOR, R. S.; SCARPASSA, V. M. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 414-422, 2009.

LINSS, J. G. B.; BRITO, L. P.; GARCIA, G. A.; ARAKI, A. S. BRUNO, R. V.; LIMA, J. B. P.; VALLE, D.; MARTINS, A. J. Distribution and dissemination of the *Val1016Ile* and *Phe1534Cys Kdr* mutations in *Aedes aegypti* brazilian natural populations. **Parasites e Vectores**, v. 7, n. 25, 2014.

LOETTI, V.; SCHWEIGMANN, N. J.; BURRONI, N. E. Temperature effects on the immature development time of *Culex eduardoi* Casal & García (Diptera: Culicidae). **Neotropical entomology**, v. 40, n. 1, p. 138-142, 2011.

LOUGHNEY, K.; KREBER, R.; GANETZKY, B. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. **Cell**, v. 58, n. 6, p. 1143-1154, 1989.

LUNA, J. E. D.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F. dos; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 842–843, 2004.

MADEIRA, N. G.; MACHARELLI, C. A.; CARVALHO, L. R. Variation of the Oviposition Preferences of *Aedes aegypti* in Function of Substratum and Humidity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 415–420, 2002.

MANAUS, Lei complementar n° 002, de 16 de janeiro de 2014. **Dispõe sobre o Plano Diretor Urbano e Ambiental do Município de Manaus e dá outras providências**. Diário oficial, Manaus, AM, 16 jan. 2014.

MANNI, M.; GOMULSKI, L. M.; AKETARAWONG, N.; TAIT, G.; SCOLARI, F.; SOMBOON, P.; GUGLIELMINO, C. R.; MALACRIDA, A. R.; GASPERI, G. Molecular markers for analyses of intraspecific genetic diversity in the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*. **Parasites e vectors**, v. 8, p. 188, 2015.

MARTINEZ-TORRES, D.; F. CHANDRE; M.S. WILLIAMSON e F. DARRIET. Molecular characterization of pyrethroid *Knockdown resistance (Kdr)* in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, v. 7, n. 2, p. 179–184, 1998.

MARTINS, A. J.; LINS, R. M. M. A.; LINSS, J. G. B.; PEIXOTO, A. A.; Valle, D. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 1, p. 108-115, 2009.

MARTINS, A. J.; RIBEIRO, C. D. M.; BELLINATO, D. F.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D.; LIMA, J. B. P. Effect of Insecticide Resistance on Development, Longevity and Reproduction of Field or Laboratory Selected *Aedes aegypti* Populations. **Plos ONE**, v. 7, n. 03, p. e31889, 2012.

MATHENGE, E. M. GIMNIG, J. E.; KOLCZAK, M.; OMBOK, M.; IRUNGU, L. W.; HAWLEY, W. A. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 4, p. 531–536, 2001.

MCBRIDE, C. S.; BAIER, F.; OMONDI, A. B.; SPITZER, S. A.; LUTOMIAH, J.; SANG, R.; IGNELL, R.; VOSSHALL, L. B. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. **Nature**, v. 515, p. 222–237, 2014.

MCDONALD, P. T.; SCHMIDT, C. D. Genetics of Permethrin Resistance in the Horn Fly (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 80, n. 2, p. 433–437, 1987.

MELLON, R. B.; GEORGHIOU, G. P. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. *In: Proceedings and papers of the fifty-second annual Conference of the California and Vector Control Association*. p. 65-67. 1984.

MENDONÇA, Barbara Alessandra Alves *et al.* Temporal genetic structure of major dengue vector *Aedes aegypti* from Manaus, Amazonas, Brazil. **Acta Tropica**, v. 134, p. 80-88, 2014.

MILLER, M.P. Tools for population genetic analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, 1997.

MONTELLA, I. R.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; LIMA, J. B. P.; BRAGA, I. A.; VALLE, D. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 467–477, 2007.

VARGAS, R. E. M. *et al.* Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 580-585, 2010.

MWEYA, C. N.; KIMERA, S. I.; STANLEY, G.; MISINZO, G.; MBOERA, L. E. G. Climate Change Influences Potential Distribution of Infected *Aedes aegypti* Co-Occurrence with Dengue Epidemics Risk Areas in Tanzania. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162649, 2016.

NEI, M. Genetic Distance between Populations. **The American Naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283–292, 1972.

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

NEI, M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583–590, jul. 1978.

NEVO, E. Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. **Theoretical Population Biology**, v.13, p. 121–177, 1978.

NOBRE, C. A.; SAMPAIO, G.; SALAZAR, L. Mudanças climáticas e amazônia. **Mudanças Climáticas**, p. 22–27, 2001.

PAIVA, M. H. S. **Monitoramento do gene que codifica a esterase envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil.** Dissertação de Mestrado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Recife, 89 p. 2006.

PAIVA, P. R. S.; BRANDAO, C. B.; MIRANDA, R. A. C. Associação entre a incidência de dengue e os elementos climáticos na XVI Região Administrativa de Jacarepaguá. Revista Eletrônica do Curso de Geografia, n. 24, 2015. Disponível em <http://revistas.ufg.br/index.php/geoambiente/index>. Acesso em: julho de 2017.

PAUPY, C.; CHANTHA, N.; REYNES, J. M.; FAILLOUX, A. B. Factors influencing the population structure of *Aedes aegypti* from the main cities in Cambodia. **Heredity**, v. 95, n. 02, p.144, 2005.

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

PEREIRA DA-CUNHA, M.; LIMA, J. B. P.; BROGDON, W. G.; MOYA, G. E.; VALLE, D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 441–444, 2005.

PALCHICK, S. **Chemical Control of Vectors In: The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado; 1996.

PATARRO, T. de F.; GUIRADO, M. M.; RAVAZZI, L. M.; BICUDO, H.E.M. de C. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations determined using pairwise comparisons. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3775–3787, 2013.

PATZ, J. A. CAMPBELL-LENDRUM, D.; HOLLOWAY, T. FOLEY, J. A. Impact of regional climate change on human health. **Nature**, v. 438, p. 310–317, 2005.

PICCOLI, C. F. **Análise de mutações no fragmento do gene que expressa a proteína transmembrana de canal de sódio (*Kdr*) e da suscetibilidade a inseticidas em populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. 2010. 83 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, 2010.

PINHEIRO, V. C. S.; TADEI, W. P. Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 245–250, out. 2002.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. de O.; ALVES, S. B. Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 813–816, dez. 2003.

POLETTI, M.; OMOTO, C. Resistência de inimigos naturais a pesticidas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 16–26, 2003.

PRECIOSO, A. R. PALACIOS, R.; THOMÉ, B.; MONDINI, G.; BRAGA, P.; KALIL, J. Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7121–7125, 2015.

RADAM, Programa de Integração Nacional. Levantamentos de recursos naturais. vol. 18 (Manaus). Radam (Projeto) DNPM, Ministério das Minas e Energia, Brasil, 626 pp, 1978.

RAI, K. S.; LORINER, N.; HLLINAN, E. The current status of genetic methods for controlling *Aedes aegypti*. In: Pal, R.; Whitten, M. J. (Eds). **The use of genetics in insect control**. Elsevier, North Holland. p. 119-132, 1974.

RAJATILEKA, S. *et al.* Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 54–57, 2008.

RATHBURN JÚNIOR, C. B. Insecticide formulations – types and uses: a review. **Journal of American Mosquito Control Association**, v. 1, n. 1, p. 80-84, 1985.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; COLON, N. Enhancement of the CDC Ovitrap with Hay Infusions for Daily Monitoring of *Aedes aegypti* Populations. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n. 1, p. 52–55, mar. 1991.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; ANDERSON, R. A.; CLARK, G. G. Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood-feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 2, p. 177–179, 1995.

RICHNER, J. M.; JAGGER, B. W.; SHAN, C.; PIERSON, T. C.; SHI, P.; DIAMOND, M. S. Vaccine mediated protection against zika virus-induced congenital disease. **Cell**, v. 170, p. 273–283, 2017.

ROWLEY, W. A.; GRAHAM, C. L. The effect of temperature and relative humidity on the flight performance of female *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 14, n. 9, p. 1251-1257, 1968.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 17–23, 2001.



ROZENDAAL, J. A. **Vector control methods for use by individuals and communities.** Geneve: World Health Organization; 1997.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K.; URDANETA-MARQUEZ, L.; RAJATILEKA S.; MOULTON, M; FLORES, A. E.; FERNANDEZ-SALAS, I.; BISSET, J.; RODRIGUEZ, M.; MACCALL, P. J.; DONNELLY, M. J.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; BLACK IV, W. C. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**. v.16, p. 785–798, 2007.

SAAVEDRA-RODRÍGUEZ, K.; GARCÍA, G. P.; SALAS, I. F.; ZAPATA, R. T.; SUAREZ, A. E. F. Mutación asociada a la resistencia a insecticidas piretroides en el mosquito transmisor de dengue (*Aedes aegypti*). **Ciencia UANL**, v. 11, n. 4, 2008.

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

SANTOS, J. M. M. dos; FRAGA, E. C.; MAIA, J. F.; TADEI, W. P. Genetic diversity in dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Amazon region: comparative analysis with isozymes and RAPD loci. **The Open Tropical Medicine Journal**, v. 4, p. 11–20, 2011.

SCARPASSA, V. M.; CARDOZA, T. B.; CARDOSO-JÚNIOR, R. P. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) from Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 895–903, 2008.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS/MS). Dengue: Situação epidemiológica/ Dados. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>> Acesso em: 23 de julho de 2017.

SEVERSON, D. W. ANTHONY, N.; ANDREEV, O.; FFRENCH-CONSTANT, R. Molecular Mapping of Insecticide Resistance Genes in the Yellow Fever Mosquito (*Aedes aegypti*). **Journal of Heredity**, v. 88, n. 6, p. 520–524, 1997.

SHOPE, R. Global climate change and infectious diseases. **Environmental health perspectives**, v. 96, p. 171, 1991.

SILVA, R. A. da; NEVES, V. L. F. de C.; MACORIS, M. de L. das G.; ALVES, M. C. G. P.; DUTRA, A. P.; MARQUES, G. R. A. M.; TAKAKU, L. **Manual de vigilância**

**entomológica de *Aedes aegypti***. São Paulo: Superintendência de Controle de Endemias, 1997.

SIMOY, M. I.; SIMOY, M. V.; CANZIANI, G. A. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. **Ecological Modelling**, v. 314, p. 100–110, 24 out. 2015.

SMITH, C.; Baldwin, A. H.; SULLIVAN, J.; LEISNHAM, P. T. Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on competition between the mosquitoes *Aedes albopictus* and *Ae. triseriatus* via changes in litter quality and production. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 521–532, 2013

SODERLUND, D.M.; KNIPPLE, D.C. The molecular biology of *Knockdown resistance* to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 33, p. 563–577, 2003.

SOUSA, G. B.; DUTARI, G. P.; GARDENAL, C. N. Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) populations in central Argentina determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction markers. **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 3, p. 400–404, 1999.

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

SUÁREZ, M. F.; NELSON, M. J. Registro de altitud del *Aedes aegypti* en Colombia. **Biomédica**, v. 1, n. 4, p. 225, 1 dez. 1981.

TABACHNICK, W. J. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistemes in a changing world. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 946–954, 2010.

TAN, J. Liu, Z. ; TSAI, T.; VALLES, S. M.; GOLDIN, A. L. ; DONG, K. Novel sodium channel gene mutations in *Blattella germanica* reduce the sensitivity of expressed channels to deltamethrin. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 4, p. 445-454, 2002.

TAYLOR, M. F. J. HECKEL, D. G.; BROWN, T. M.; KREITMAN, M. E.; BLACK, B. Linkage of pyrethroid insecticide resistance to a sodium channel locus in the tobacco budworm. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 23, n. 7, p. 763–775, 1993.

THAI, K. T.; ANDERS, K. L. The role of climate variability and change in the transmission dynamics and geographic distribution of dengue. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 236, n. 8, p. 944–954, 2011.

TSUDA, Y.; TAKAGI, M. Survival and development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae under a seasonally changing environment in Nagasaki, Japan. **Environmental Entomology**, v. 30, n. 5, p. 855-860, 2001.

VAIS, Horia *et al.* Activation of *Drosophila* sodium channels promotes modification by deltamethrin. **The Journal of general physiology**, v. 115, n. 3, p. 305-318, 2000.

VALENÇA, M. A.; MARTEIS, L. S.; STEFFLER, L. M.; SILVA, A. M.; SANTOS, R. L. C. Dynamics and Characterization of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Key Breeding Sites. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 311–316, 15 mar. 2013.

VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 240–256, 2013.

WALTON, W. E.; REISEN, W. K. Influence of climate change on mosquito development and blood-feeding patterns. In: SINGH, S. (Ed). *Viral infections and global change*. New Jersey: Wiley, p. 35–56, 2013.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. An introduction to insecticides. **The Pesticide Book**. Meister Pub. Willoughby, Ohio, 2004.

WILLIAMS, C. R. MINCHAM, G.; RITCHIE, S. A. ; VIENNET, E.; HARLEY, D. Bionomic response of *Aedes aegypti* to two future climate change scenarios in far north Queensland, Australia: implications for dengue outbreaks. **Parasites e Vectors**, v. 7, n. 1, 2014.

WILKERSON, R. C.; PARSONS, T. J.; KLEIN, T. A.; GAFFIGAN, T. V.; BERGO, E.; CONSOLIM, J. Diagnosis by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of Four Cryptic Species Related to *Anopheles (Nyssorhynchus) Albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 5, p. 697–704, 1995.

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

WILLIAMSON, M. S.; DENHOLM, I.; BELL, C. A.; DEVONSHIRE, L. A. *Knockdown resistance(Kdr)to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (Musca domestica)***Molecular and General Genetics**, n. 240, p. 17-22, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Control of Neglected Tropical Diseases: WHO Pesticide evaluation Scheme (WHOPES). **Pesticides and their applications: for the control of vectors and pests of public health importance**. 6 ed. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategy for dengue prevention and control, 2012–2020**. Geneva, Switzerland, 2012.

WRIGHT. S. Breeding structure of populations in relation to speciation. **The American Naturalist**, v. 74, n. 752, p. 232–248, 1940.

WRIGHT. S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114–138, mar. 1943.

WRIGHT. S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323–354, 1951.

YEH, F. C.; YANG, R-C; BOYLE, T. **POPGENE versão 1.3**: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. 1999.