

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Variabilidade genética de populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) do estado e município do Rio de Janeiro através de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs).

Curitiba, Março de 2013

RODRIGO FAITTA CHITOLINA

Variabilidade genética de populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) do estado e município do Rio de Janeiro através de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs).

Monografia apresentada ao Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dra. Magda Clara Vieira da Costa-Ribeiro
Co-orientadora: Dra. Karina dos Santos Paduan

Curitiba, Março de 2013.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas alegrias conquistas e bons momentos que experimentei ao longo da minha vida, mas também pelos momentos de dificuldade que tanto me ajudaram a crescer.

Aos meus pais, Adair André Chitolina e Vera Inês Faitta, que estiveram sempre presentes e me apoiando nos mais diferentes aspectos da minha vida, e que mesmo após estes 6 anos em que não nos vemos diariamente, o amor e o carinho estão sempre representados nos mais singelos atos. Amo vocês!

Aos meus irmãos Henrique e Arthur, que mesmo com brigas e discussões fraternais são parte importantíssima da minha vida. E a todas as outras pessoas da minha família que de uma maneira ou outra me ajudam e me apoiam.

Ao Seu Ernesto, Dona Lourdes, Soraya, Milene, Hary, Bubi, Cátia, Ernesto e Marina, que me acolheram e me proporcionaram uma segunda família ao longo desses 6 anos. E especialmente ao Gilson Hartmann que esteve ao meu lado durante todo o período de graduação, aturando e entendendo meus momentos de nervosismo, a ausência devido aos estudos, as noites mal dormidas, os trabalhos e mais trabalhos que consumiam os finais de semana. Muito obrigado por todo o apoio incondicional, a paciência e o carinho que sempre teve comigo.

Um agradecimento mais do que especial para a Ana Caroline Dalla Bona e Carla Fernanda Piccoli, minhas duas inspirações de vida, e que foram as responsáveis por me ensinar tudo o que eu aprendi até hoje nesse maravilhoso mundo da Entomologia. Muito obrigado pelos ensinamentos, momentos de discussão, descontração e alegria. Obrigado por estarem sempre ao meu lado e aturando meus momentos bons e ruins, e pelas inúmeras conversas até hoje, mesmo que sejam conversas vindas de terras lusitanas. E por elas estendo meu agradecimento ao Cezar Capriglioni Carvalho, o Papis, ao meu afilhado científico Augusto, e ao “cunhado” português Vitor Canosa. Obrigado por estarem sempre comigo.

Aos demais amigos de vida acadêmica, científica e pessoal: Vinícius Sobrinho Richardi, Débora Rebechi, Maiara Vicentini, Oscar Alexander Aguirre Obando, Sullamy Gomes Aciole. Obrigado por tornarem meus dias de laboratório tão divertidos.

A todos meus amigos de faculdade que me acompanharam ao longo destes cinco anos de curso: Izabela Paulini de Jesus, Bruna Soley, Fernanda Gatto, Douglas Adamoski, Vanessa Zulki, Talita Gomig, Leandro Serino, Vanessa Chicora, Andressa Chequin, Marina Cotta, Talita Bessani, Vinícius S Chagas, Mariana Santos, Aline Leck, Marcelli Krul Vieira, Bruno Accioly, Gonzalo Olivares Flores, Francieli Gonçalves Azeredo, Camila Matos, Mariana Busato, Najara Nogari e, um agradecimento muito mais do que especial para a Isabela Tiemy Pereira que esteve ao meu lado desde o início da caminhada, e que permanecerá junto nos próximos dois anos de Mestrado. Amo muito vocês!

Aos amigos distantes fisicamente, mas sempre perto de coração: José Barriquel Neto, Silvia Fachin, Fernando Chillemi, José Henrique Pretto, Mayara Anselmi, Natália Bonan, Simone Zuchelli, Luiza Peres, Camila Weingartner, Camila Cristina Rex e meu trio insubstituível, que completa a minha família por escolha, Leonardo Annoni, Germano Bortolotto e Suelin Pesente Galon. Obrigado por fazerem os poucos momentos que passamos juntos valerem por todo o tempo em que ficamos afastados.

Vale ainda um muito obrigado aos amigos recentes e tão importantes que me ajudaram a superar as reviravoltas da vida: Kiko Christiano, Rodrigo Vieira Chaves, Bruno Fulan e muitíssimo especialmente ao Syllas Moreira da Fonseca Neto que graças aos momentos de companheirismo, conselhos e diversões tornou possível estas últimas conquistas. Obrigado a todos por tudo, amo vocês.

A todos os membros do Laboratório de Parasitologia Molecular pela recepção calorosa como novo membro da equipe.

E por fim gostaria de agradecer a Liana Alves de Oliveira, não só por ter aceitado o convite para participar da banca, mas também pelos auxílios e momentos de discussão. A professora Dr^a Débora do Rocio Klisiowicz pela

participação na banca mas também por ter me aceitado de braços abertos dentro do departamento e aberto as portas para o meu futuro.

Por último, mas não menos importante e sim com especial zelo e carinho, a professora Dr^a Magda Clara Vieira da Costa-Ribeiro. MUITÍSSIMO obrigado por entender a situação que estava passando e me aceitar como orientado, mas também por ter me dado um novo ânimo e entusiasmo para a pesquisa e por finalmente me proporcionar um verdadeiro momento Orientador-Orientado. Muito obrigado por tudo professora!

“E de repente a vida te vira do avesso, e você descobre que o avesso, é o seu lado certo.”

Caio Fernando Abre

RESUMO

A dengue, principal doença viral de transmissão vetorial, é atualmente a que causa maiores impactos em termos de morbimortalidade. No Brasil, o estado Rio de Janeiro é uma importante área endêmica, tendo sido porta de entrada para três dos quatro sorotipos virais e do vetor, *Aedes aegypti*. O controle dessa endemia apresenta inúmeros problemas, dentre os quais destacam a falta de vacina e ineficácia no combate ao vetor. Dessa forma o controle vetorial, a vigilância entomológica, o conhecimento da estrutura genética, assim como os mecanismos que influenciam na dinâmica populacional são as principais formas de combate a dengue. O presente estudo teve como objetivo caracterizar a estrutura populacional de *Ae. aegypti* provenientes do estado e do município do Rio de Janeiro através da análise do polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNPs). Os exemplares foram coletados nos meses de março e dezembro de 2003 em cinco municípios do Estado do Rio de Janeiro: Barra Mansa (B), Duque de Caxias (D2), Nova Iguaçu (N), Paraíba do Sul (PA) e Três Rios (T) e nove bairros do município do Rio de Janeiro: Cocotá (C), Freguesia (F), Jardim América (JA), Pilares (P), Penha (PE) Rocha Miranda (R), Taquara (TA), Barra da Tijuca (BA) e Tijuca (TI). Para as análises da estrutura populacional foram utilizados nove SNPs e analisados os valores de F_{st} , AMOVA, frequências alélicas, análise Bayesiana, através dos softwares Arlequin v. 3, GENEPOP (Versão 4.2) e Structure v. 2.3.1. Maior percentual de variação foi encontrada dentro das populações, principalmente na coleta proveniente do mês de dezembro do estado do Rio de Janeiro. A diferenciação genética espacial e temporal foi altamente significativa em todas as amostras e coletas realizadas nos diferentes períodos ($P < 0,05$), evidenciando baixo fluxo gênico entre as populações de *Ae. aegypti*. Contudo, comparativamente, menor fluxo gênico foi observado no mês de dezembro. Pela análise Bayesiana evidenciou-se uma baixa variabilidade genética das populações avaliadas.

Palavras-chave: Genética de populações, SNPs, *Aedes aegypti*, Rio de Janeiro.

ABSTRACT

Dengue, the main vector-borne viral disease, is currently causing the greatest impact in terms of morbidity and mortality. In Brazil, the Rio de Janeiro state is an important endemic area, being the gateway to three of the four viral serotypes and for the vector, *Aedes aegypti*. The control of this endemic disease presents several problems, mainly because there is no effective vaccine against the disease and also due to the problems in vector control. Thus the vector control, entomological surveillance, knowledge of the genetic structure, as well as the mechanisms that influence population dynamics are the main ways to combat dengue. Using Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) markers, we investigated the genetic structure of the mosquito vector *Ae. aegypti* sampled at state and the municipality of Rio de Janeiro. Specimens were collected in March and December 2003 in five counties of the State of Rio de Janeiro: Barra Mansa (B), Duque de Caxias (D2), Nova Iguaçu (N), Paraíba do Sul (PA) and Três Rios (T) and nine districts of the municipality of Rio de Janeiro: Cocotá (C), Freguesia (F), Jardim América (JA), Pilares (P), Penha (PE) Rocha Miranda (R), Taquara (TA), Barra da Tijuca (BA) and Tijuca (TI). For the analyzes of population structure nine SNPs were used and analyzed F_{st} values, AMOVA, allelic frequencies, Bayesian analysis using software Arlequin v. 3, GENEPOP (Version 4.2) and Structure v.. 2.3.1. Highest percentage of variation was found within populations, mainly in collecting from the month of December the state of Rio de Janeiro. The spatial and temporal genetic differentiation was highly significant in all samples and samples collected in different periods ($P < 0.05$), indicating low gene flow among populations of *Aedes aegypti*. However, comparatively lower gene flow was observed in the month of December. By the Bayesian analysis a low genetic variability of populations was showed.

Keywords: Population genetics, SNPs, *Aedes aegypti*, Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Justificativa	21
3	Objetivos	22
3.1	Objetivo Geral	22
3.2	Objetivos Específicos	22
4	Material e Métodos	23
4.1	Coleta de material	23
4.2	Extração de DNA	26
4.3	Caracterização da estrutura genética populacional	26
5	Resultados	29
5.1	Análise de variância molecular	29
5.2	Equilíbrio de Hardy-Weinberg e frequências alélicas	32
5.3	Diferenciações genética geográfica e temporal	46
5.4	Determinação do valor de k	48
5.5	Estruturação populacional	50
6	Discussão	59
7	Conclusão	63
8	Referências Bibliográficas	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Média anual de número de casos de DF/DHF e média anual do número de países reportando casos de dengue. (Fonte: WHO, 2012).	16
Figura 02: Casos notificados por semana epidemiológica no município do Rio de Janeiro em 2012 (Fonte SINAN – S/SUBPAV/SVS/CAS – SMSDC/RJ).	17
Figura 03: Países/áreas com risco de transmissão de dengue (Fonte: WHO 2012)	18
Figura 04: (•) Pontos de coleta de <i>Aedes aegypti</i> , no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Abreviações dos municípios disponíveis na tabela 01.	23
Figura 05: (•) Pontos de coleta de <i>Aedes aegypti</i> , município do Rio de Janeiro, Brasil. Abreviações dos distritos disponíveis na tabela 01. (Fonte: Adaptado de Costa-Ribeiro <i>et al.</i> 2006a).	24
Figura 06: Marcadores (SNPs) utilizados no processo de caracterização populacional segundo Paduan & Ribolla (2009) (Fonte: Spenassatto, 2011).	28
Figura 07: Valores de K calculados a partir do método de Evanno pelo software Structure Harvester.	49
Figura 08. Resultado da análise Bayesiana do município do Rio de Janeiro da coleta de março (considerando frequências alélicas correlacionadas)	52
Figura 09. Resultado da análise Bayesiana do estado do Rio de Janeiro sem o município do Rio de Janeiro da coleta de março (considerando frequências alélicas correlacionadas)	52
Figura 10. Resultado da análise Bayesiana do estado do Rio de Janeiro sem o município do Rio de Janeiro da coleta de março (considerando frequências alélicas correlacionadas).	53
Figura 11. Resultado da análise Bayesiana do estado e município do Rio de Janeiro, coleta de março (considerando frequências alélicas correlacionadas).	53

Figura 12. Resultado da análise Bayesiana do município do Rio de Janeiro, coleta de dezembro (considerando frequências alélicas correlacionadas)	54
Figura 13. Resultado da análise Bayesiana do estado do Rio de Janeiro, coleta de dezembro (considerando frequências alélicas correlacionadas)	54
Figura 14. Resultado da análise Bayesiana do estado e município do Rio de Janeiro, coleta de dezembro (considerando frequências alélicas correlacionadas).	54
Figura 15: Gráfico de agrupamento das populações do município do Rio de Janeiro, coleta de março, em função das composições genéticas.	55
Figura 16: Gráfico de agrupamento das populações (k=2) do estado do Rio de Janeiro, coleta de março, em função das composições genéticas.	55
Figura 17. Gráfico de agrupamento das populações (k=9) do estado do Rio de Janeiro, coleta de março, em função das composições genéticas	56
Figura 18. Gráfico de agrupamento das populações estado e município do Rio de Janeiro, coleta de março, em função das composições genéticas	56
Figura 19. Gráfico de agrupamento das populações do município do Rio de Janeiro, coleta de dezembro, em função das composições genéticas	57
Figura 20. Gráfico de agrupamento das populações estado do Rio de Janeiro, coleta de dezembro, em função das composições genéticas.	57
Figura 21. Gráfico de agrupamento das populações estado e município do Rio de Janeiro, coleta de dezembro, em função das composições genéticas	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Local de coleta de <i>Aedes aegypti</i> e densidade humana dos locais amostrados.	25
Tabela 02: Locais de coleta no município do Rio de Janeiro agrupados de acordo com a localização geográfica.	25
Tabela 03: Análise de variância molecular de SNPs nas populações de <i>Aedes aegypti</i> amostradas nos meses de março e dezembro de 2003, município* do Rio de Janeiro, Brasil.	30
Tabela 04: Análise de variância molecular de SNPs nas populações de <i>Aedes aegypti</i> amostradas nos meses de março e dezembro de 2003, estado * do Rio de Janeiro, Brasil.	31
Tabela 05: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove <i>loci</i> polimórficos em populações de <i>Aedes aegypti</i> , março de 2003, município do Rio de Janeiro, Brasil.	34
Tabela 06: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove <i>loci</i> polimórficos nas populações de <i>Aedes aegypti</i> , dezembro de 2003, município do Rio de Janeiro, Brasil.	36
Tabela 07: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove <i>loci</i> polimórficos nas populações de <i>Aedes aegypti</i> , março de 2003, estado do Rio de Janeiro, Brasil.	38
Tabela 08: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove <i>loci</i> polimórficos nas populações de <i>Aedes aegypti</i> , dezembro de 2003, estado do Rio de Janeiro, Brasil.	40

Tabela 09: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em onze <i>loci</i> polimórficos nas populações de <i>Aedes aegypti</i> , março de 2003, estado e município do Rio de Janeiro, Brasil.	41
Tabela 10: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove <i>loci</i> polimórficos nas populações de <i>Aedes aegypti</i> , dezembro de 2003, estado e município do Rio de Janeiro, Brasil.	44
Tabela 11: Diferenciação genética de populações de <i>Aedes aegypti</i> , março e dezembro de 2003, estado e município do Rio de Janeiro, Brasil.	47
Tabela 12: Valores de K e Delta K determinados para cada população conforme o software Structure Harvester, segundo o método de Evanno.	50

1. INTRODUÇÃO

Entre as doenças virais de transmissão vetorial, a dengue é a que causa maior impacto na população em termos de morbimortalidade (Gubler, 2002; Taail, 2002). Nos últimos 50 anos a incidência de dengue aumentou em 30 vezes (Fig 01). Estimativas indicam que 2,5 bilhões de pessoas (dois terços da população mundial) encontram-se em áreas endêmicas e com risco para contrair a infecção, sendo que mais de 50 milhões são acometidas pela doença anualmente, com 500 mil casos de febre hemorrágica da dengue (FHD) e 22 mil mortes, principalmente entre crianças (WHO, 2012; Wilder-Smith & Schwartz, 2005).

O principal vetor desta arbovirose é o mosquito de hábito urbano *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Braga & Valle, 2007) e seu agente etiológico é um retrovírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* (Carroll *et al.*, 2007). Este agente etiológico tem alta variabilidade genética apresentando quatro sorotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), sendo que cada sorotipo retrata vários genótipos diferentes (Pontes & Ruffino-Netto, 1994).

Ao longo da sua trajetória evolutiva o *Ae. aegypti* desenvolveu hábitos extremamente sinantrópicos e antropofílicos, sendo encontrado principalmente colonizando depósitos permanentes de água e pequenas coleções temporárias (Braga & Valle, 2007, Natal, 2002). Ainda, a espécie apresenta seu ciclo de vida associado aos regimes pluviais, de tal forma que a incidência de casos de dengue está relacionada a fatores ambientais (aumento de temperatura, pluviosidade, umidade) que favorecem a disseminação do vetor devido ao aumento de criadouros para a espécie (Ribeiro *et al.*, 2006).

A seleção de locais para oviposição pelas fêmeas de *Ae. aegypti*, é um fator chave para a sobrevivência de seus imaturos (Bentley & Day. 1989). A escolha desse local e subsequente oviposição é influenciada por fatores visuais, táteis e olfativos, sendo esse último considerado de importância primária (Benzon & Apperson. 1988; Bentley & Day. 1989; Logan & Birkett. 2007). Costa-Ribeiro (2006) coloca que há dois aspectos do comportamento de

oviposição de *Ae. aegypti* de interesse particular para entendimento de sua estratégia de colonização e perpetuação nas áreas invadidas.

O primeiro refere-se ao fato de os ovos serem depositados acima da linha da água nos criadouros temporários, e dessa forma acabam sendo transportados passivamente junto as migrações humanas (Takahashi *et al.*, 2005 *apud* Costa-Ribeiro, 2006), além disso acrescenta-se o comportamento de oviposição aos saltos da espécie, comportamento esse que tem particular interesse para a compreensão da estruturação genética de populações desse vetor. Em situações de baixa disponibilidade de criadouros, seja devido a baixa pluviosidade, medidas eficientes de controle, a fêmea grávida necessita dispersar mais para ovipositar resultando em maior dispersão de sua prole no espaço e, conseqüentemente, aumento de fluxo gênico e menor diferenciação genética entre as populações (Costa-Ribeiro, 2006)

O segundo aspecto refere-se à resistência à dessecação dos ovos (Natal, 2002) sendo que em condições laboratoriais, os ovos de *Ae. aegypti* podem resistir pelo período de até um ano, sem contato com a água, eclodindo em poucos minutos após serem submersos na água (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

No Brasil existem relatos de dengue desde o século XIX, em 1916 em São Paulo e 1923 em Niterói/RJ, sendo que a primeira epidemia ocorreu entre 1981-1982 em Roraima pelos sorotipos 1 e 2 (Cartilha Dengue, 2011). Após quatro anos, deflagrou-se uma epidemia no Rio de Janeiro e em algumas capitais do Nordeste e, nos últimos 20 anos quatro outras grandes epidemias (1986, 2002, 2008 e 2010) causadas pelas mudanças de sorotipo viral predominante. Em 2010 foi registrada a reentrada do sorotipo 4 (DENV-4) no Brasil, após 28 anos de sua circulação no país (Nogueira & Eppinghaus, 2011).

O município do Rio de Janeiro é considerado uma importante porta de entrada para os sorotipos do vírus dengue e do próprio vetor (Nogueira *et al.* 2002; Lourenço de Oliveira *et al.* 2004). Além disso, é um dos locais mais densamente populosos do país, abrigando 5% da população brasileira, um dos mais importantes pontos turísticos e econômicos e está ligado a outras regiões brasileiras por várias rodovias e pelo mar (Costa-Ribeiro *et al.* 2006a, 2007).

Todas as epidemias de dengue causadas pelos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 se espalharam a partir da grande região metropolitana do Rio de Janeiro para o restante do país (Lourenço de Oliveira *et al.* 2004). Ainda, em 2011 o sorotipo 4 (DENV-4) foi detectado no Rio de Janeiro, oito meses após sua entrada em Roraima (Nogueira & Eppinghaus, 2011). Até o mês de Junho de 2012 (22ª semana epidemiológica) foram registrados no município do Rio de Janeiro 89.406 casos (Fig. 02) sendo que o sorotipo 4 foi responsável por 88% dos casos observados (Boletim Dengue, 2012).

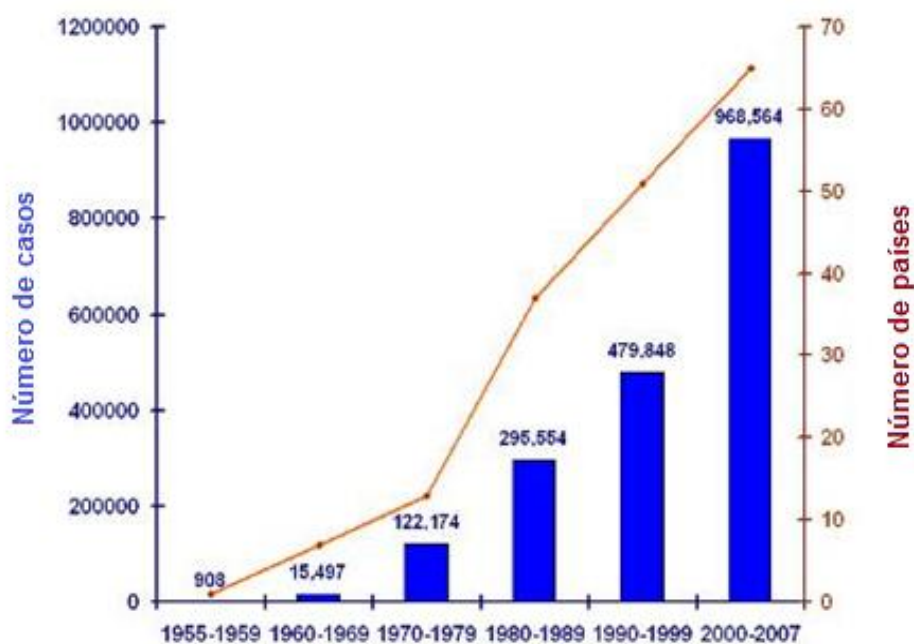


Figura 01: Média anual de número de casos de Febre do Dengue(DF)/Febre Hemorrágica do Dengue (DHF) e média anual do número de países reportando casos de dengue. (Fonte: WHO, 2012).

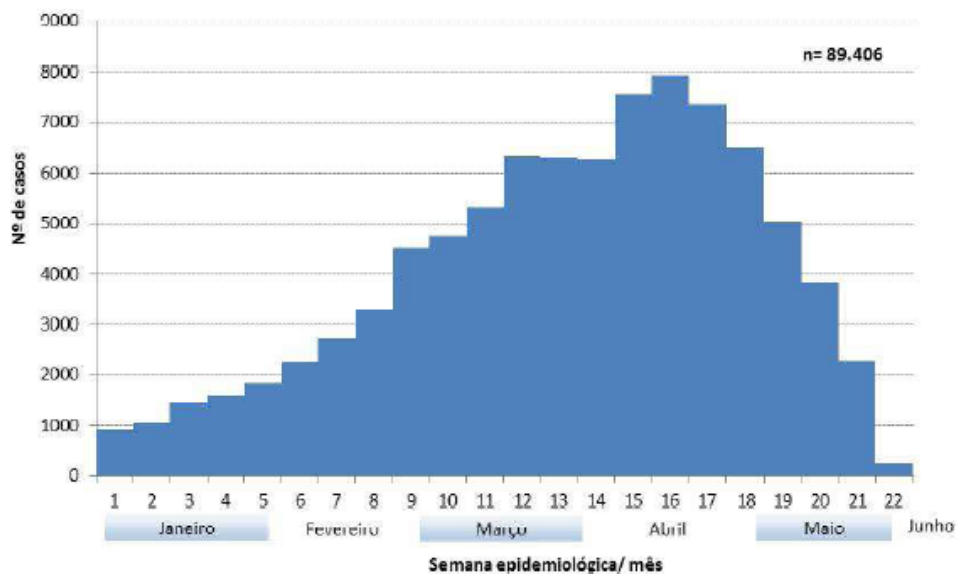


Figura 02: Casos notificados por semana epidemiológica no município do Rio de Janeiro em 2012 (Fonte SINAN – S/SUBPAV/SVS/CAS – SMSDC/RJ).

Quando comparado os dados referentes aos casos de dengue no Brasil como um todo, é possível evidenciar uma alta prevalência de notificações em determinadas regiões do país, especialmente no município do Rio de Janeiro.

No século XXI, o Brasil se tornou o país com a maior taxa de casos de dengue, ocupando o primeiro lugar no ranking internacional de doenças, com mais de três milhões de registro entre 2000 e 2005 (Teixeira *et al.*, 2009). Nos anos de 2001 e 2002, o aumento de casos na região sudeste foi observado principalmente no estado do Rio de Janeiro (aproximadamente 145 mil casos reportados até a 13ª semana epidemiológica), sendo que este número corresponde a 45,8% do registrado em todo o país, sendo que a região metropolitana, onde se localiza o município do Rio de Janeiro, foi responsável por 60% dos casos registrados no estado (PAHO, 2002)

Ainda, de 1990 a junho de 2008 foram incluídos no Sistema de Vigilância Epidemiológica 8.885 casos de FHD e, em 2008, dados preliminares revelaram que mais de 700 mil casos e mais de 45 mil hospitalizações por dengue foram registrados no Ministério da Saúde (Barreto & Teixeira, 2008). Na epidemia ocorrida no verão de 2008 na cidade do Rio de Janeiro, verificou-se um aumento da taxa de indivíduos menores de 15 anos acometidos tanto pela febre do dengue quanto pela febre hemorrágica do dengue. Apenas nos primeiros quatro meses de 2008 na cidade do Rio de Janeiro foram notificados

mais de 155 mil casos de dengue, 9 mil hospitalizações, mais de mil casos de dengue hemorrágica e 110 mortes, com mais da metade sendo crianças (Teixeira *et al.*, 2009).

Originário da África, o *Ae. aegypti* apresenta-se distribuído mundialmente (Fig. 03) sendo que sua distribuição ocorreu de forma passiva, principalmente através de atividades humanas (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). No Brasil o vetor foi erradicado na década de 50, sofrendo sucessivas reinfestações nos anos seguintes que foram controladas, mas em 1976 ocorreu uma nova reintrodução e não havendo êxito no seu controle, o vetor se espalhou para todo o território brasileiro (Tauil, 2002).



Figura 03: Países/áreas em verde com risco de transmissão de dengue (Fonte: WHO 2012)

Por não existir vacina contra a doença, o controle vetorial, a vigilância entomológica (Jirakanjanakit *et al.*, 2007a; IRAC-BR, 2010), o conhecimento da estrutura genética, e os mecanismos que influenciam na dinâmica populacional (Hiragi, *et al.* 2009), são ferramentas para estabelecer estratégias de combate a dengue. Pelo fato das populações de *Ae. aegypti* terem sofrido eventos de migração intercontinentais por diferentes rotas, dispersões passivas nos níveis regional e continental, além de repetidas pressões de seleção causadas pelo

uso de inseticidas, é de se esperar que efeitos fundadores e pressões de seleção tenham causado variações genéticas e/ou morfológicas nas diferentes populações (Henry *et al.*, 2009; Jirakanjanakit *et al.*, 2007a).

Para o estudo da dinâmica e estrutura populacional dessa espécie são utilizadas ferramentas como a morfometria geométrica que se baseia em variações morfológicas e permite a diferenciação populacional devido a fatores genéticos e/ou ambientais (Jirakanjanakit & Dujardin, 2005; Dujardin, 2008) e marcadores moleculares que permitem avaliar o polimorfismo de DNA entre os indivíduos.

Dentre os marcadores moleculares, é possível destacar as técnicas de isoenzimas (Costa-Ribeiro *et al.*, 2006b; Costa-Ribeiro *et al.* 2007), RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (Julio *et al.*, 2009), microssatélites (Paupy *et al.*, 2010; Costa-Ribeiro *et al.* 2006a Huber *et al.*, 2001), DNA mitocondrial (Twerdochlib *et al.*, 2012; Paduan & Ribolla, 2008) e SNPs (Polimorfismo de nucleotídeo único) (Hemme *et al.*, 2010; Paduan & Ribolla, 2009).

As isoenzimas têm sido utilizadas para detecção de polimorfismos enzimáticos as quais comparam populações ou espécies (Costa-Ribeiro, 2006). A técnica de RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso) baseia-se na utilização de iniciadores arbitrários que se ligam aleatoriamente ao DNA. Assim avaliam o polimorfismo entre as populações de determinado organismo (Williams *et al.* 1990 *apud* Loxdale & Lushai, 1998).

Os microssatélites caracterizam-se por serem repetições de sequências simples ao longo do genoma, de diferentes tamanhos em um determinado *locus* codominantes. O DNA mitocondrial tem sido muito utilizado pelo fato de seus genes apresentarem taxa de evolução rápida, sendo útil para estudos de variação intraespecífica e relação filogenética (Martins & Domingues, 2011 *apud* Bona, 2012), mas apresentam como desvantagem a presença de pseudogenes (Hlaing *et al.*, 2009).

Por outro lado, os SNPs são caracterizados por uma variação de um único nucleotídeo na sequência de DNA de um indivíduo, são extremamente abundantes e representam a maior fonte de variabilidade genética entre organismos individuais, e quando comparados aos microssatélites são mais

fáceis de serem detectados (Taillon-Miller *et al.*, 1998 *apud* Spenassatto, 2011; Brookes, 1999 *apud* Spenassatto, 2011).

Para *Ae. aegypti*, mais especificamente, estudos prévios com cepas de laboratório demonstraram que há aproximadamente 12 SNPs/kb (Morlais & Severson, 2003) ao passo que em populações de campo provenientes da Venezuela obteve-se de 30 a 124 SNPs/kb (Urdaneta-Marques *et al.* 2009). Para as populações brasileiras Paduan & Ribolla (2009) caracterizaram oito SNPs em populações de *Ae. aegypti* provenientes de 16 cidades brasileiras, tendo sido sequenciado sete genes. Estes genes revelaram a existência de 53 SNPs individuais, representando um SNP para cada 52 pares de bases. Dos 53 SNPs oito foram altamente polimórficos.

Os SNPs são considerados extremamente úteis como marcadores genéticos (Morlais & Severson, 2003) o que nos motivou a realizar uma análise da estrutura populacional de *Ae. aegypti* provenientes do estado e do município do Rio de Janeiro, importante área endêmica da dengue.

2. JUSTIFICATIVA

O conhecimento da estrutura genética de populações de *Ae. aegypti* é de grande interesse para a compreensão da epidemiologia do dengue, já que determinados genes estão associados à resistência aos inseticidas (Yan *et al.*, 1988; Lima-Catelani *et al.*, 2004; Sousa-Polezzi *et al.*, 2005), à susceptibilidade e à competência vetorial aos diferentes sorotipos e genótipos desse vírus (Failloux *et al.*, 1999; Bosio *et al.*, 2000; Black IV *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 2002).

Marcadores mais polimórficos, como os SNPS, são recomendados em estudos populacionais de menores escalas geográficas, permitindo avaliar mais detalhadamente, por exemplo, as populações das áreas urbanas e suburbanas do município do Rio de Janeiro.

No Brasil, vários fatores têm contribuído para o aumento do número de casos de dengue, dentre os quais podemos destacar: ampla dispersão de *Ae. aegypti* no território brasileiro, a intensificação do crescimento urbano desordenado, medidas ineficientes de controle, elevado fluxo migratório humano (migração, imigração e emigração) e, a co-circulação de quatro sorotipos do vírus dengue. Nesse contexto, o fluxo gênico de *Ae. aegypti* reveste-se de interesse particular dentro desse relevante problema de saúde pública, visto que, sua dispersão (passiva e/ou ativa), pode estar envolvida com a disseminação do vírus, de mosquitos competentes vetorialmente e resistentes ao controle.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a estrutura populacional de *Ae. aegypti* provenientes do Estado e do município do Rio de Janeiro através da análise do polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs).

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a estrutura genética inter e intra-populacional de *Ae. aegypti* provenientes do estado do Rio de Janeiro: municípios de Barra Mansa, Duque de Caxias, Nova Iguaçu, Paraíba do Sul e Três Rios;
- Analisar a estrutura genética inter e intra-populacional de *Ae. aegypti* provenientes dos bairros da cidade do Rio de Janeiro: Cocotá, Freguesia, Jardim América, Pilares, Penha, Rocha Miranda, Taquara, Barra da Tijuca e Tijuca, município do Rio de Janeiro;
- Estimar o fluxo gênico das populações de *Ae. aegypti* provenientes do estado e do município do Rio de Janeiro;
- Estimar o fluxo gênico temporal das populações de *Ae. aegypti* provenientes dos municípios do estado do Rio de Janeiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de material

As coletas de espécimes de *Ae. aegypti* foram realizadas com auxílio de ovitrampas em cinco municípios do estado do Rio de Janeiro: Barra Mansa (B), Duque de Caxias (D2), Nova Iguaçu (N), Paraíba do Sul (PA) e Três Rios (T) (Figura 04; Tabela 01). No município do Rio de Janeiro foram amostrados sete bairros: Cocotá (C), Freguesia (F), Jardim América (JA), Pilares (P), Rocha Miranda (R), Taquara (TA) e Tijuca (TI) (Figura 05; Tabela 02).

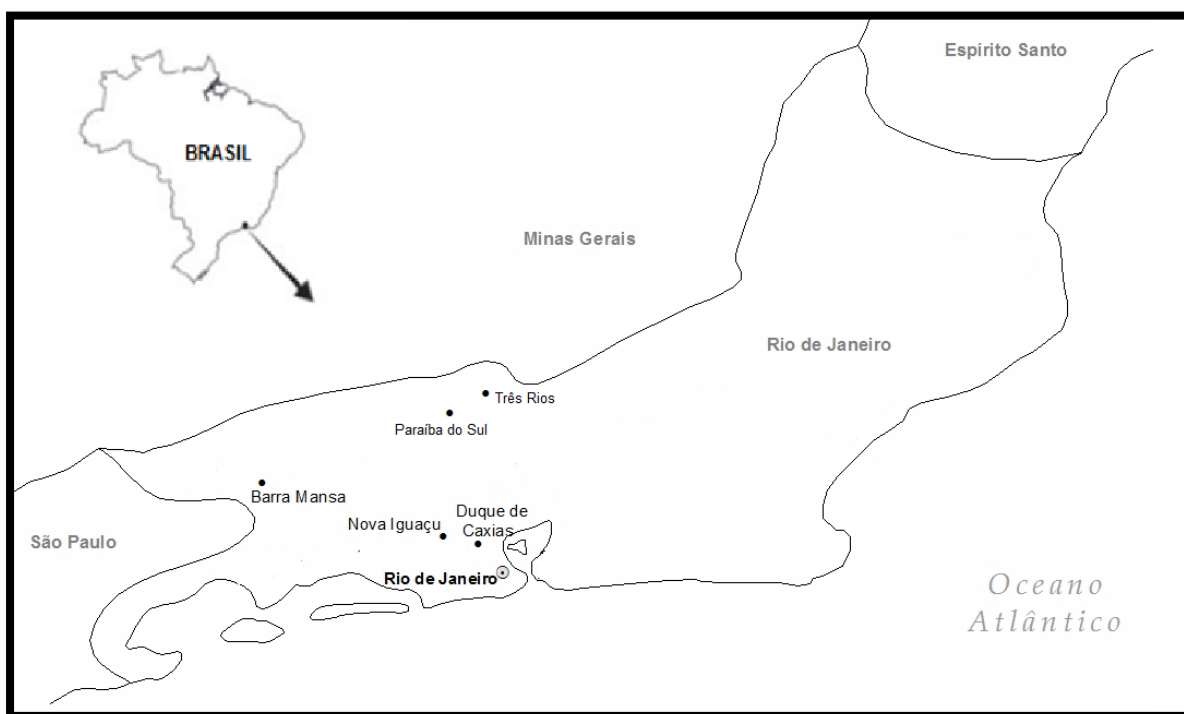


Figura 04: (•) Pontos de coleta de *Aedes aegypti*, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Abreviações dos municípios disponíveis na tabela 01.

O período amostral compreendeu os meses de março e dezembro de 2003, tendo sido amostradas 12 localidades (março) e 10 localidades (dezembro) (Tabela 01). Todo o processo de criação e separação dos espécimes foi realizado por Costa-Ribeiro (2006).

Para as análises dos dados provenientes das coletas do município do Rio de Janeiro, os bairros foram divididos de acordo com a localização geográfica detalhada na tabela 02.

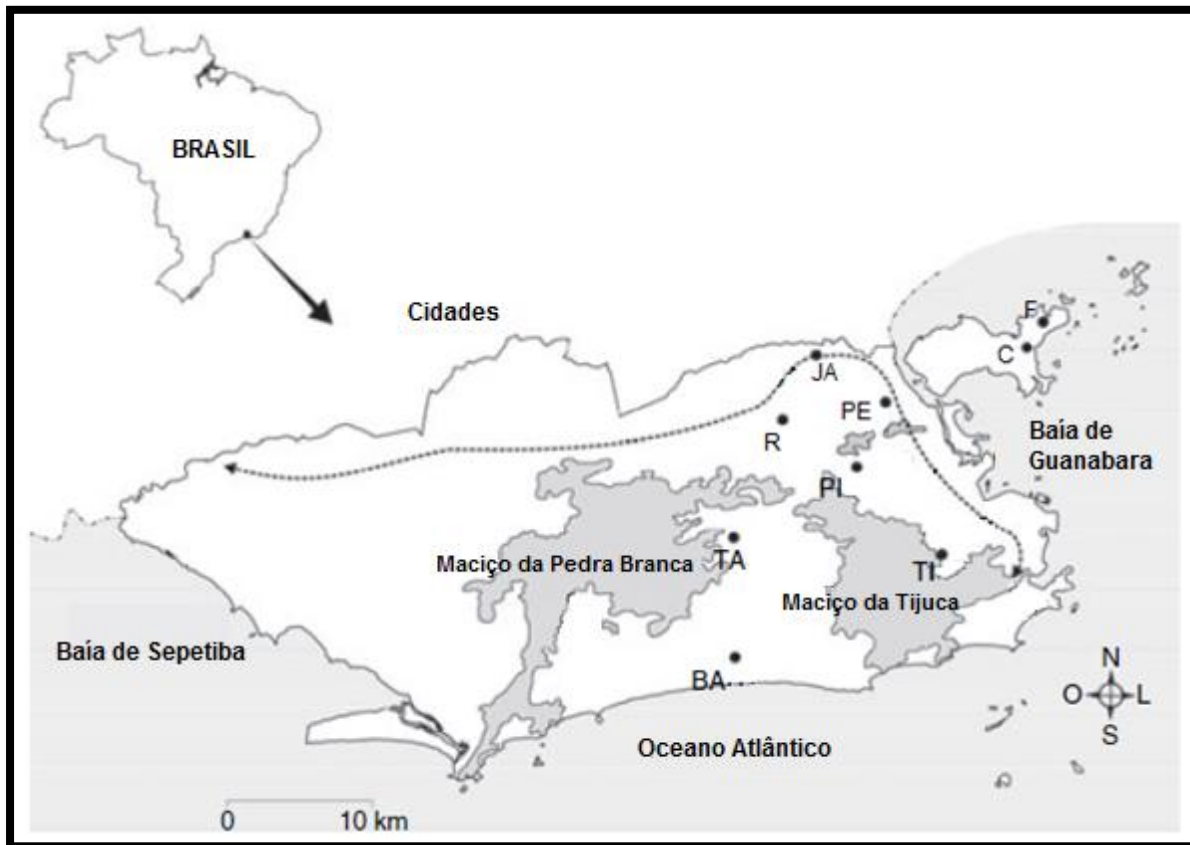


Figura 05: (•) Pontos de coleta de *Aedes aegypti*, município do Rio de Janeiro, Brasil. Abreviações dos distritos disponíveis na tabela 01. (Fonte: Adaptado de Costa-Ribeiro *et al.* 2006a).

Tabela 01: Local de coleta de *Ae. aegypti* e densidade humana dos locais amostrados.

Código	Designação estado do Rio de Janeiro (municípios)	Coleta	Densidade Humana/Km ²
B	Barra Mansa	março e dezembro	311,9
D2	Duque de Caxias-Parque Duque	Março	1669,1
DC	Duque de Caxias-25 de Agosto	Março	1669,1
N	Nova Iguaçu	março e dezembro	1757,2
PA	Paraíba do Sul	Março	64,4
T	Três Rios	março e dezembro	221,8
município do Rio de Janeiro (bairros)			
BA	Barra da Tijuca	Dezembro	1726,46
C	Cocotá	março e dezembro	10786,43
F	Freguesia	Dezembro	4723
JÁ	Jardim América	Dezembro	12870,08
PE	Penha	Março	12394,47
PI	Pilares	março e dezembro	15364,17
R	Rocha Miranda	março e dezembro	14082,83
TA	Taquara	março e dezembro	6442,13
TI	Tijuca	Março	17431,88

Tabela 02: Locais de coleta no município do Rio de Janeiro agrupados de acordo com a localização geográfica.

Bairro	Sigla	Bairro	Sigla
Norte		Ilha	
Jardim América	JA	Cocotá	C
Penha	PE	Freguesia	F
Pilares	PI		
Rocha Miranda	R		
Leste		Oeste	
Tijuca	TI	Taquara	TA
		Barra da Tijuca	BA

4.2 Extração de DNA e PCR em Tempo Real (qPCR)

O DNA genômico foi extraído de mosquitos inteiros, triturados com auxílio de um pistilo utilizando-se a resina Chelex100® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories). Depois de homogeneizados com pistilo cada mosquito foi submetido ao vortex por 15 segundos, posteriormente centrifugado a 13.000 rpm por 20 segundos e colocados por 30 minutos em banho seco a 80°C. Em seguida, o sedimento foi submetido ao vortex por 15 segundos e centrifugado a 13.000 rpm por 20 segundos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. A concentração do DNA foi estimada pelo espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000). Após quantificação uma parte de cada amostra foi diluída a 25 ng/μL e acondicionadas em placas de 96 poços. O DNA de cada mosquito, extraído individualmente, foi submetido à amplificação pela PCR em tempo real através da plataforma StepOnePlus™ v. 2.1 (Applied Biosystems) utilizando-se placas ópticas de 96 poços e sistema TaqMan® para a discriminação alélica. O processo de extração foi realizado por Costa Ribeiro (2006).

4.3 Caracterização da estrutura genética populacional

Para a caracterização populacional foram utilizados nove marcadores SNPs de acordo com Paduan & Ribolla (2009) (Figura 06).

As análises da estrutura populacional foram realizadas através da análise de variância molecular (AMOVA) com auxílio do *software* Arlequin v. 3.1. Este método estatístico se baseia na geração de estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos, ou seja, avalia a diversidade genética distribuída dentro das populações e entre as populações, além de valores de estatística F (F_{is} e F_{st}), que indicam o grau de subdivisão geográfica.

- F_{is} - deficiência ou excesso de heterozigotos causados pela ausência de panmixia no interior das subpopulações;
- F_{st} - deficiência de heterozigotos causada pela deriva genética, consequência da subdivisão da população ou efeito Wahlund, podendo ser interpretado da seguinte maneira:

- entre 0 e 0,05 = pouca diferenciação;
- entre 0,05 e 0,15 = diferenciação moderada;
- entre 0,15 e 0,25 = diferenciação alta;
- valores acima de 0,25 = diferenciação muito alta.

A comparação das proporções de Hardy–Weinberg e as frequências alélicas foram calculadas através do software online GENEPOP (Versão 4.2) desenvolvido por Raymond & Rousset (Rousset, 2008)

O *software* Structure v. 2.3.1 foi utilizado na análise de estruturação de populações com base em dados de genotipagem multilocus. A utilização deste teste possibilita a construção de clusters genéticos e estima a fração do genótipo de cada indivíduo que pertence a cada cluster na ausência de qualquer informação prévia sobre a estrutura da população (Spennassatto, 2011). Para determinação do valor de K utilizou-se o *software* online Structure Harvester (Versão 0.6.93) baseado no método de Evanno (Earl, D.A. & VonHoldt, B. M., 2012).

Gene	Oligonucleotideo F (5' - 3')	Oligonucleotideo R (5' - 3')	Sonda VIC™ (5' - 3')	Sonda FAM™ (5' - 3')
AeIMUC1	AAGCCAGCGTTTGTGATTGG	GGCACAGAACTTCCACCACTA	CATCCGGCCA G CTC	CATCCGGCCA A CTC
apollp-II	CCGGTGCCTCCGTTGAA	TTTGGGTACAGATACCTCCTTGT	TTTGGCCAATCT A TACAAG	TTTGGCCAATCT T TACAAG
Ef2	TGTGCGTACAGACCGAAACC	ACAGCACCGGCTTGATACG	TTCCGG A ATGGCCT	TCCGG T ATGGCCT
Na/K	GCTACCGGAGTCGCCAAAA	GGGCAGAGGGAAGAAATGATAGTTT	CCCTCCAAC A TTAACA	CCCTCCAAC T TTAACA
PGK	TGATCATTGGAGGTGGAATGGC	GTCGAACAATGATCCTCCAATTTCC	AATACCTTAAGGA A CGTAAAT	CCTTAAGGA T CGTAAAT
Chym	CGAACAGCGTGGTTTGTT	GGCAATGTCATCGGGACTGA	CGGAATTCATC A TCCAC	CGGAATTCATC T TCCAC
CYP9J2	GGTGTGGCTGGAAGTGAAG	GCCAGTAGATAAACCATTCCATCA	CTAGACCGAA A AGCTTA	CTAGACCGAA T AGCTTA
TSF	GGAAGTTACGCAGAGTTTGATCTTG	GCCAGTACAAGGACGTGATC	AACGGACC A TGGCGCT	CGGACC T TGGCGCT
FerH	CCGTCGACAAGCACTTCAAG	AGGAGGATTTCTTCACCGATGTG	ACCGACTTAC A TAGTTC	ACCGACTTAC T TAGTTC

Figura 06: Marcadores (SNPs) utilizados no processo de caracterização populacional segundo Paduan & Ribolla (2009) (Fonte: Spenassatto, 2011).

5. RESULTADOS

5.1 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

A AMOVA realizada nas populações de *Ae. aegypti* provenientes do município do Rio de Janeiro retratou maior percentual de variação dentro das populações (F_{st}), perfazendo valores superiores a 93%. Comparativamente, dezembro apresentou menor valor de $F_{st}=0,0541$ ($P<0,01$) em relação a março $F_{st}=0,0660$ ($P<0,01$) (Tabela 03)

Para as análises entre os grupos (F_{ct}) os valores não foram significativos ($P>0,05$) para ambas as coletas, assim como na análise entre as populações dentro dos grupos (F_{sc}) para a coleta de março (Tabela 03).

Pela análise de variação molecular das populações amostradas no Estado com o município do Rio de Janeiro, verifica-se que em ambas as coletas (março e dezembro) a porcentagem de variação é maior dentro das populações analisadas, respectivamente, 92,85% e 87,79%. Além disso, os valores de F_{st} são baixos, indicando diferenciação moderada para março ($F_{st} = 0,07155$) e para dezembro ($F_{st}= 0,12208$). Para as análises entre os grupos, em ambas as coletas os valores foram não significativos ($P>0,05$) (Tabela 04).

Não foi possível analisar as populações do estado do Rio de Janeiro sem o município do Rio de Janeiro, visto que para as análises de AMOVA se fazem necessários agrupamentos com mais de uma população nos grupos, e para o estado do Rio de Janeiro cada grupo contava com apenas uma população (Barra Mansa, Nova Iguaçu e Três Rios).

Tabela 03: Análise de variância molecular de SNPs nas populações de *Aedes aegypti* amostradas nos meses de março e dezembro de 2003, município* do Rio de Janeiro, Brasil.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Varição (%)	Índice de Fixação	P
Março					
Entre os Grupos ^a	15,417	0,11830	6,71555	Fct:0,06716	>0,05
Entre as populações dentro dos grupos ^b	3,132	-0,00204	-0,11559	Fsc:-0,00124	>0,05
Dentro das populações ^c	216,348	1,64525	93,40004	Fst:0,06600	<0,01
Dezembro					
Entre os Grupos ^a	7,357	-0,01894	-0,99074	Fct:-0,00991	>0,05
Entre as populações dentro dos grupos ^b	18,712	0,12216	6,39176	Fsc:0,06329	<0,01
Dentro das populações ^c	283,077	1,80804	94,59897	Fst: 0,05401	<0,01

*Populações agrupadas conforme regiões Norte, Sul, Leste e Oeste, de acordo com a tabela 02.

^a : Regiões geográficas do município do Rio de Janeiro

^b: bairros do município do Rio de Janeiro de cada região geográfica

^c: cada indivíduo da amostra total

F_{CT} : Correlação entre as populações dos grupos em relação a amostra total.

F_{SC} : Correlação entre as populações dentro dos grupos em relação às regiões

F_{ST} : Correlação entre os indivíduos das populações em relação a toda a amostra.

Tabela 04: Análise de variância molecular de SNPs nas populações de *Aedes aegypti* amostradas nos meses de março e dezembro de 2003, estado * do Rio de Janeiro, Brasil.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Varição (%)	Índice de Fixação	P
Março					
Entre os Grupos ^a	25,870	0,02512	1,63	F _{ct} : 0,01633	>0,05
Entre as populações dentro dos grupos ^b	17,042	0,08493	5,52	F _{sc} : 0,05613	<0,01
Dentro das populações ^c	388,458	1,42816	92,85	F _{st} : 0,07155	<0,01
Dezembro					
Entre os Grupos ^a	24,889	0,12027	6,62	F _{ct} : 0,06623	>0,05
Entre as populações dentro dos grupos ^b	23,995	0,10143	5,59	F _{sc} : 0,05981	<0,01
Dentro das populações ^c	357,116	1,59427	87,79	F _{st} : 0,12208	<0,01

*Considerando o estado com o município do Rio de Janeiro.

^a : municípios do estado do Rio de Janeiro

^b: municípios do estado do Rio de Janeiro e bairros da cidade do Rio de Janeiro

^c: cada indivíduo da amostra total

F_{CT}: Correlação entre as populações dos grupos em relação a amostra total.

F_{SC}: Correlação entre as populações dentro dos grupos em relação às regiões

F_{ST}: Correlação entre os indivíduos das populações em relação a toda a amostra.

5.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg e frequências alélicas

Em amostras de *Ae. aegypti* coletados em março no município do Rio de Janeiro foram observados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg associados ao déficit de heterozigotos: Pilares (EF2; $F_{is}=0,6901$); Cocotá (EF2; $F_{is}= 0,6901$); Rocha Miranda (MUC; $F_{is}= 0,6508$) e (FERR; $F_{is} = 0,0312$) ($P<0,05$) (Tabela 05).

Já na coleta de dezembro, desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg associados a déficit de heterozigotos no *locus* NAK foram observados em três bairros: Rocha Miranda ($F_{is}= 1$); Taquara ($F_{is}= 0,7619$) e Barra da Tijuca ($F_{is}=0,7619$). O excesso de heterozigotos foi atribuído ao *locus* TSF em Pilares ($F_{is}= -1$) e Freguesia ($F_{is}= - 0,8333$) (Tabela 06).

Para as coletas realizadas no estado do Rio de Janeiro, sem considerar o município do Rio de Janeiro nas análises (Tabelas 07 e 08) obteve-se déficit de heterozigotos ($P<0,05$) na coleta de março para o *locus* NAK (N; $F_{is}= 1$) em Paraíba do Sul (Tabela 03) e na coleta de dezembro no *locus* PGK (B; $F_{is}= 0,6508$) em Barra Mansa e em Três Rios no *locus* APOL (T; $F_{is}= 0,766$) . Ainda na coleta de dezembro o *locus* TSF apresentou um excesso de heterozigotos em Nova Iguaçu ($F_{is}= -1$; $p<0,05$) (Tabela 08).

Quando se realizou a análise incluindo-se o município do Rio de Janeiro na análise do estado do Rio de Janeiro (Estado do Rio de Janeiro com o município do Rio de Janeiro) (Tabelas 09 e 10) obtiveram-se os mesmos desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, nos mesmos *loci* e populações daqueles obtidos quando o município do Rio de Janeiro foi analisado isoladamente ou quando foi considerado somente o estado do Rio de Janeiro.

Após a realização da correção de Bonferroni verificaram-se desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o mês de dezembro nas coletas conduzidas no município do Rio de Janeiro. O desvio associado ao déficit de heterozigotos foi observado na população de Rocha Miranda no *locus* NAK ($F_{is}=1,000$, $P=0,0022$) e o excesso de heterozigotos, nas populações de Pilares (PI) para o *locus* TSF ($F_{is}= -1,00$, $P< 0,0018$) (Tabela 06).

Nas análises realizadas somente no estado do Rio de Janeiro, foi encontrado déficit de heterozigotos no *locus* PGK na população de Barra Mansa (B) ($Fis= 0,6508$, $P < 0,0432$) e na população de Nova Iguaçu (N), um excesso de heterozigotos no *locus* TSF ($Fis= -1,00$, $p < 0,0111$) (Tabela 08).

Tabela 05: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove *loci* polimórficos em populações de *Aedes aegypti*, março de 2003, município do Rio de Janeiro, Brasil.

Amostra	EF2					MUC					NAK				
Março	1	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	1	4	F_{IS}	P	N
PE	0.333	0.667	0.2903	0.5152	24	0.667	0.333	0.2903	0.5208	24	0.917	0.083	-0.0476	1	24
PI	0.5	0.5	0.6901	0.028*	24	0.75	0.25	-0.2941	0.5291	24	1	0		-	24
R	0.458	0.542	-0.1324	1	24	0.667	0.333	0.6508	0.0425*	24	0.722	0.278	0.2258	1	18
TA	0.364	0.636	-0.5385	0.188	22	0.708	0.292	0.0351	1	24	0.864	0.136	0.6429	0.1405	22
TI	0.05	0.95	-0.0000	-	20	0.8	0.2	0.4194	0.3073	20	0.688	0.312	0.7407	0.0777	16
C	0.5	0.5	0.6901	0.0256*	24	0.792	0.208	0.2826	0.4069	24	0.917	0.083	-0.0476	1	24

Amostra	PGK						APOL						FERR					
Março	1	2	3	F_{IS}	P	N	1	2	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	
PE	0.875	0.125	0	0.6452	0.1299	24	0.542	0	0.458	0.2029	0.5956	24	0.25	0.75	0.1538	1	24	
PI	0.917	0.083	0	-0.0476	1	24	0.5	0	0.5	0.0435	1	24	0.125	0.875	0.6452	0.1312	24	
R	0.917	0.083	0	-0.0476	1	24	0.542	0	0.458	0.2029	0.5939	24	0.208	0.792	0.7660	0.0312*	24	
TA	0.818	0.182	0	0.4286	0.2759	22	0.318	0	0.682	-0.4286	0.4814	22	0.167	0.833	-0.1579	1	24	
TI	0.7	0.3	0	0.1000	1	20	0.3	0	0.7	0.1000	1	20	0.2	0.8	0.4194	0.3055	20	
C	0.875	0	0.125	-0.1000	1	24	0.458	0.542	0	0.2029	0.5925	24	0.227	0.773	-0.2500	1	22	

* $P < 0.05$. 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Amostra	P450					TSF					CHYM					Todos Loci	
	Março	1	3	F _{IS}	P	N	2	3	F _{IS}	P	N	1	3	F _{IS}	P	N	F _{IS}
PE	0.5	0.5	-0.6071	0.0903	24	0	1	-	-	24	0.542	0.458	-0.1324	1	24	0.0717	0.7047
PI	0.542	0.458	0.2029	0.5932	24	0.042	0.958	0	-	24	0.417	0.583	0.0149	1	24	0.1821	0.4854
R	0.591	0.409	0.1071	1	22	0.273	0.727	-0.3333	0.5066	22	0.333	0.667	0.2903	0.5207	24	0.2041	0.5260
TA	0.458	0.542	0.5286	0.1038	24	0.091	0.909	-0.0526	1	22	0.625	0.375	0.1538	1	24	0.0563	0.6039
TI	0.9	0.1	-0.0588	1	20	0.05	0.95	-0.0000	-	20	0.5	0.5	0.2500	0.5640	20	0.2723	0.6870
C	0.5	0.5	0.3714	0.2803	24	0.167	0.833	0.4359	0.2565	24	0.5	0.5	-0.6418	0.0808	24	0.1335	0.3071

* P <0,05. 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Tabela 06: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove *loci* polimórficos nas populações de *Aedes aegypti*, dezembro de 2003, município do Rio de Janeiro, Brasil.

Amostra	EF2					MUC					NAK				
Dezembro	1	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	1	4	F_{IS}	P	N
PI	0.208	0.792	0.2826	0.4066	24	0.292	0.708	-0.3750	0.4866	24	0.833	0.167	-0.1429	1	18
R	0.417	0.583	-0.3333	0.5494	24	0.545	0.455	-0.0526	1	22	0.727	0.273	1,000	0.0022*	22
TA	0.292	0.708	0.4310	0.1976	24	0.583	0.417	0.3529	0.2907	24	0.773	0.227	0.7619	0.0384	22
C	0.333	0.667	0.2903	0.5188	24	0.375	0.625	0.1538	1	24	0.85	0.15	-0.125	1	20
F	0.208	0.792	0.2826	0.4046	24	0.208	0.792	-0.2222	1	24	0.583	0.417	-0.3333	0.5484	24
JÁ	0.227	0.773	-0.25	1	22	0.4	0.6	-0.2	1	20	0.955	0.045	0	-	22
BA	0.292	0.708	-0.375	0.4867	24	0.417	0.583	0.3529	0.292	24	0.773	0.227	0.7619	0.0364	22

Amostra	PGK						APOL						FERR					
Dezembro	1	2	3	F_{IS}	P	N	1	2	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	
PI	0.833	0.167	0	-0.1579	1	24	0.5	0	0.5	-0.6418	0.0796	24	0.208	0.792	-0.2222	1	24	
R	0.875	0	0.125	-0.1000	1	24	0.667	0.333	0	-0.0820	1	24	0.125	0.875	-0.1000	1	24	
TA	0.917	0	0.083	-0.0476	1	24	0.458	0.542	-0.0149	-0.1324	1	24	0.125	0.875	-0.1	1	24	
C	0.917	0.083	0	-0.0476	1	24	0.417	0	0.583	0.0149	1	24	0.167	0.833	0.4359	0.2537	24	
F	0.875	0.125	0	0.6452	0.1338	24	0.417	0	0.583	0.0149	1	24	0.25	0.75	0.1538	1	24	
JÁ	0.818	0.182	0	-0.1765	1	22	0.636	0	0.364	-0.1321	1	22	0.05	0.95	0	-	20	
BA	0.833	0.167	0	0.4359	0.2542	24	0.458	0	0.542	0.2029	0.5958	24	0.167	0.833	-0.1579	1	24	

* P valor $<0,05$; Negrito= P significativo após correção de Bonferroni. 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Amostra	P450					TSF					CHYM					Todos loci	
Dezembro	1	3	F _{IS}	P	N	2	3	F _{IS}	P	N	1	3	F _{IS}	P	N	F _{IS}	P
PI	0.542	0.458	-0.1324	1	24	0.5	0.5	-1	0.0018*	24	0.5	0.5	-0.6418	0.0782	24	-0.3925	0.0989
R	0.542	0.458	-0.1324	1	24	0.125	0.875	-0.1000	1	24	0.292	0.708	0.4310	0.1974	24	0.0643	0.5445
TA	0.375	0.625	0.1538	1	24	0.042	0.958	0	-	24	0.417	0.583	0.3529	0.2906	24	0.2417	0.5462
C	0.375	0.625	0.5	0.2092	24	0.625	0.375	-0.5714	0.0938	24	0.458	0.542	-0.4776	0.2400	24	0.0132	0.6775
F	0.5	0.5	-0.2941	0.5620	24	0.542	0.458	-0.8333	0.0148*	24	0.167	0.833	0.4359	0.2549	24	-0.1000	0.3705
JÁ	0.5	0.5	-0.1489	1	20	0.5	0.5	-0.6071	0.0915	22	0.364	0.636	-0.1321	1	22	-0.2283	0.9886
BA	0.542	0.458	-0.1324	1	24	0.583	0.417	-0.3333	0.547	24	0.417	0.583	0.0149	1	24	0.0642	0.6268

* P <0,05; Negrito: P valor significativo após correção de Bonferroni. 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Tabela 07: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove loci polimórficos nas populações de *Aedes aegypti*, março de 2003, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Amostra	EF2					MUC					NAK				
Março	1	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	1	4	F_{IS}	P	N
B	0.35	0.65	-0.5	0.2178	20	0.95	0.05	0	-	20	0.818	0.182	-0.1765	1	22
D2	0.208	0.792	-0.2222	1	24	0.792	0.208	-0.2222	1	24	0.833	0.167	-0.1579	1	24
DC	0.273	0.727	0.1304	1	22	0.708	0.292	-0.375	0.4872	24	1	0	-	-	22
N	0.375	0.625	0.1538	1	24	0.792	0.208	0.2826	0.4051	24	0.917	0.083	1	0.0447*	24
PA	0.5	0.5	0.3714	0.2803	24	0.792	0.208	0.2826	0.4029	24	0.833	0.167	0.4359	0.2545	24
T	0.25	0.75	0.1538	1	24	0.364	0.636	0.2593	0.5366	22	0.917	0.083	-0.0476	1	24

Amostra	PGK						APOL						FERR					
Março	1	2	3	F_{IS}	P	N	1	2	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	
B	0.636	0	0.364	-0.1321	1	22	0.417	0.583	0	0.0149	1	24	0.045	0.955	0	-	22	
D2	0.875	0	0.125	-0.1	1	24	0.417	0.583	0	0.3529	0.2885	24	0.083	0.917	-0.0476	1	24	
DC	0.792	0	0.208	-0.2222	1	24	0.458	0.542	0	-0.1324	1	24	0.167	0.833	-0.1579	1	24	
N	0.917	0	0.083	-0.0476	1	24	0.542	0.458	0	0.2029	0.5929	24	0.042	0.958	0	-	24	
PA	0.917	0	0.083	-0.0476	1	24	0.542	0.458	0	0.2029	0.5941	24	0	1	-	-	24	
T	0.958	0.042	0	0	-	24	0.5	0	0.5	-0.2941	0.5620	24	0.208	0.792	0.2826	0.4051	24	

* $P < 0.05$. 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Amostra	P450					TSF					CHYM					Todos loci	
	1	3	F _{IS}	P	N	2	3	F _{IS}	P	N	1	3	F _{IS}	P	N	F _{IS}	P
Março																	
B	0.682	0.318	-0.4286	0.4815	22	0.182	0.818	-0.1765	1	22	0.636	0.364	0.2593	0.5402	22	-0.1377	0.9726
D2	0.708	0.292	0.431	0.1932	24	0.05	0.95	0		20	0.5	0.5	0.3714	0.2822	24	0.1166	0.9393
DC	0.667	0.333	0.2903	0.5193	24	0.083	0.917	-0.0476	1	24	0.667	0.333	-0.082	1	24	-0.0682	1
N	0.625	0.375	0.5	0.2040	24	0.125	0.875	-0.1	1	24	0.542	0.458	0.5286	0.1038	24	0.3125	0.4000
PA	0.636	0.364	0.2593	0.5364	22	0	1	-	-	22	0.375	0.625	0.1538	1	24	0.2555	0.8055
T	0.542	0.458	0.5286	0.1005	24	0.167	0.833	0.4359	0.2547	24	0.458	0.542	0.2029	0.5937	24	0.1915	0.7033

* $P < 0,05$. 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Tabela 08: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove *loci* polimórficos nas populações de *Aedes aegypti*, dezembro de 2003, estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Amostra	EF2					MUC					NAK				
Dezembro	1	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	1	4	F_{IS}	P	N
B	0.5	0.5	0.3714	0.2767	24	0.583	0.417	-0.6923	0.0638	24	0.5	0.5	-0.6071	0.0928	22
N	0.4	0.6	-0.6364	0.1717	20	0.15	0.85	-0.125	1	20	1	0	-	-	18
T	0.667	0.333	-0.082	1	24	0.667	0.333	0.2903	0.5208	24	0.818	0.182	0.4286	0.2779	22

Amostra	PGK					APOL					FERR					
Dezembro	1	2	F_{IS}	P	N	1	2	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N
B	0.667	0.333	0.6508	0.0432*	24	0.75	0	0.25	-0.2941	0.532	24	0.208	0.792	-0.2222	1	24
N	0.85	0.15	-0.125	1	20	0.65	0	0.35	0.3864	0.4807	20	0.05	0.95	0	-	20
T	1	0	-	-	24	0.208	0.792	0	0.766	0.0312*	24	0.333	0.667	-0.082	1	24

Amostra	P450					TSF					CHYM					Todos Loci	
Dezembro	1	3	F_{IS}	P	N	2	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	F_{IS}	P
B	0.625	0.375	-0.5714	0.0915	24	0.278	0.722	-0.3333	1	18	0.5	0.5	-0.6418	0.0782	24	-0.2527	0.0351
N	0.722	0.278	0.75	0.0593	18	0.5	0.5	-1	0.0111*	18	0.2	0.8	-0.2	1	20	-0.1451	0.1420
T	0.5	0.5	-0.2941	0.5634	24	0.125	0.875	0.6452	0.1314	24	0.667	0.333	0.2903	0.5207	24	0.1823	0.3658

* $P < 0,05$; Negrito: P valor significativo após correção de Bonferroni; 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Tabela 09: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove *loci* polimórficos nas populações de *Aedes aegypti*, março de 2003, estado e município do Rio de Janeiro, Brasil.

Amostra	EF2					MUC					NAK				
	1	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	1	4	F_{IS}	P	N
Março															
B	0.35	0.65	-0.5	0.2178	20	0.95	0.05	0	-	20	0.818	0.182	-0.1765	1	22
D2	0.208	0.792	-0.2222	1	24	0.792	0.208	-0.2222	1	24	0.833	0.167	-0.1579	1	24
DC	0.273	0.727	0.1304	1	22	0.708	0.292	-0.375	0.4872	24	1	0	-	-	22
N	0.375	0.625	0.1538	1	24	0.792	0.208	0.2826	0.4051	24	0.917	0.083	1	0.0447*	24
PA	0.5	0.5	0.3714	0.2803	24	0.792	0.208	0.2826	0.4029	24	0.833	0.167	0.4359	0.2545	24
T	0.25	0.75	0.1538	1	24	0.364	0.636	0.2593	0.5366	22	0.917	0.083	-0.0476	1	24
PE	0.333	0.667	0.2903	0.5177	24	0.667	0.333	0.2003	0.5155	24	0.917	0.083	-0.0476	1	24
PI	0.5	0.5	0.6901	0.0251*	24	0.75	0.25	-0.2941	0.531	24	1	0	-	-	24
R	0.458	0.542	-0.1324	1	24	0.667	0.333	0.6508	0.0436*	24	0.722	0.278	0.2258	1	18
TA	0.364	0.636	-0.5385	0.1916	22	0.708	0.292	0.0351	1	24	0.864	0.136	0.6429	0.1459	22
TI	0.05	0.95	0	-	20	0.8	0.2	0.4194	0.3083	20	0.688	0.312	0.7407	0.0753	16
C	0.5	0.5	0.6901	0.0263*	24	0.792	0.208	0.2826	0.4025	24	0.917	0.083	-0.0476	1	24

* $P < 0,05$; 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Amostra	PGK						APOL						FERR					
Março	1	2	3	F _{IS}	P	N	1	2	3	F _{IS}	P	N	1	3	F _{IS}	P	N	
B	0.636	0	0.364	-0.1321	1	22	0.417	0.583	0	0.0149	1	24	0.045	0.955	0	-	22	
D2	0.875	0	0.125	-0.1	1	24	0.417	0.583	0	0.3529	0.2885	24	0.083	0.917	-0.0476	1	24	
DC	0.792	0	0.208	-0.2222	1	24	0.458	0.542	0	-0.1324	1	24	0.167	0.833	-0.1579	1	24	
N	0.917	0	0.083	-0.0476	1	24	0.542	0.458	0	0.2029	0.5929	24	0.042	0.958	0	-	24	
PA	0.917	0	0.083	-0.0476	1	24	0.542	0.458	0	0.2029	0.5941	24	0	1	-	-	24	
T	0.958	0.042	0	0	-	24	0.5	0	0.5	-0.2941	0.562	24	0.208	0.792	0.2826	0.4051	24	
PE	0.875	0.125	0	0.6452	0.1302	24	0.542	0	0.458	0.2029	0.5923	24	0.25	0.75	0.1538	1	24	
PI	0.917	0.083	0	-0.0476	1	24	0.5	0	0.5	0.0435	1	24	0.125	0.875	0.6452	0.1348	24	
R	0.917	0.083	0	-0.0476	1	24	0.542	0	0.458	0.2029	0.5929	24	0.208	0.792	0.766	0.0314*	24	
TA	0.818	0.182	0	0.4286	0.2795	22	0.318	0	0.682	-0.4286	0.4838	22	0.167	0.833	-0.1579	1	24	
TI	0.7	0.3	0	0.1	1	20	0.3	0	0.7	0.1	1	20	0.2	0.8	0.4194	0.3074	20	
C	0.875	0	0.125	-0.1	1	24	0.458	0.542	0	0.2029	0.5923	24	0.277	0.773	-0.25	1	22	

* P <0,05; 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Amostra	P450					TSF					CHYM					Todos loci	
Março	1	3	F _{IS}	P	N	2	3	F _{IS}	P	N	1	3	F _{IS}	P	N	F _{IS}	P
B	0.682	0.318	-0.4286	0.4815	22	0.182	0.818	-0.1765	1	22	0.636	0.364	0.2593	0.5402	22	-0.1377	0.9726
D2	0.708	0.292	0.431	0.1932	24	0.05	0.95	0	-	20	0.5	0.5	0.3714	0.2822	24	0.1166	0.9393
DC	0.667	0.333	0.2903	0.5193	24	0.083	0.917	-0.0476	1	24	0.667	0.333	-0.082	1	24	-0.0682	1
N	0.625	0.375	0.5	0.204	24	0.125	0.875	-0.1	1	24	0.542	0.458	0.5286	0.1038	24	0.3125	0.4000
PA	0.636	0.364	0.2593	0.5364	22	0	1	-	-	22	0.375	0.625	0.1538	1	24	0.2555	0.8055
T	0.542	0.458	0.5286	0.1005	24	0.167	0.833	0.4359	0.2547	24	0.458	0.542	0.2029	0.5937	24	0.1915	0.7033
PE	0.5	0.5	-0.6071	0.0905	22	0	1	-	-	24	0.542	0.458	-0.1324	1	24	0.0717	0.7038
PI	0.542	0.458	0.2029	0.5933	24	0.042	0.958	0	-	24	0.417	0.583	0.0149	1	24	0.1821	0.4734
R	0.591	0.409	0.1071	1	22	0.273	0.727	-0.3333	0.5074	22	0.333	0.667	0.2903	0.519	24	0.2041	0.5300
TA	0.458	0.592	0.5286	0.1027	24	0.091	0.909	-0.0526	1	22	0.625	0.375	0.1538	1	24	0.0563	0.6130
TI	0.9	0.1	-0.0588	1	20	0.05	0.95	0	-	20	0.5	0.5	0.25	0.564	20	0.2723	0.6837
C	0.5	0.5	0.3714	0.2837	24	0.167	0.833	0.4359	0.2555	24	0.5	0.5	-0.6418	0.0778	24	0.1335	0.3052

* P <0,05; 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

Tabela 10: Valores de F_{IS} e desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg observados em nove *loci* polimórficos nas populações de *Aedes aegypti*, dezembro de 2003, estado e município do Rio de Janeiro, Brasil.

Amostra	EF2					MUC					NAK				
	1	3	F_{IS}	P	N	1	3	F_{IS}	P	N	1	4	F_{IS}	P	N
Dezembro															
B	0.5	0.5	0.3714	0.2767	24	0.583	0.417	-0.6923	0.0638	24	0.5	0.5	-0.6071	0.0928	22
N	0.4	0.6	-0.6364	0.1717	20	0.15	0.85	-0.125	1	20	1	0	-	-	18
T	0.667	0.333	-0.082	1	24	0.667	0.333	0.2903	0.5208	24	0.818	0.182	0.4286	0.2779	22
PI	0.208	0.792	0.2826	0.4051	24	0.292	0.708	-0.375	0.4863	24	0.833	0.167	-0.1429	1	18
R	0.417	0.583	-0.3333	0.5452	24	0.545	0.455	-0.0526	1	22	0.727	0.273	1	0.0024*	22
TA	0.292	0.708	0.431	0.1973	24	0.583	0.417	0.3529	0.2827	24	0.773	0.227	0.7619	0.0396*	22
C	0.333	0.667	0.2903	0.5186	24	0.375	0.625	0.1538	1	24	0.85	0.15	-0.125	1	20
BA	0.292	0.708	-0.375	0.4907	24	0.417	0.583	0.3529	0.2888	24	0.773	0.227	0.7619	0.036*	22
F	0.208	0.792	0.2826	0.4051	24	0.208	0.792	-0.2222	1	24	0.583	0.417	-0.3333	0.5497	24
JÁ	0.227	0.773	-0.25	1	22	0.4	0.6	-0.2	1	20	0.955	0.045	0	-	22

* $P < 0,05$; 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs

Amostra	PGK						APOL						FERR					
Dezembro	1	2	3	F _{IS}	P	N	1	2	3	F _{IS}	P	N	1	3	F _{IS}	P	N	
B	0.667	0.333	0	0.6508	0.0432*	24	0.75	0	0.25	-0.2941	0.532	24	0.208	0.792	-0.2222	1	24	
N	0.85	0.15	0	-0.125	1	20	0.65	0	0.35	0.3864	0.4807	20	0.05	0.95	0	-	20	
T	1	0	0	-	-	24	0.208	0.792	0	0.766	0.0312*	24	0.333	0.667	-0.082	1	24	
PI	0.833	0.167	0	-0.1579	1	24	0.5	0	0.5	0.6418	0.0732	24	0.208	0.792	-0.2222	1	24	
R	0.875	0	0.125	-0.1	1	24	0.667	0.333	0	-0.082	1	24	0.125	0.875	-0.1	1	24	
TA	0.917	0	0.083	-0.0476	1	24	0.458	0.542	0	-0.1324	1	24	0.125	0.875	-0.1	1	24	
C	0.917	0.083	0	-0.0476	1	24	0.417	0	0.583	0.0149	1	24	0.167	0.833	0.4359	0.255	24	
BA	0.833	0.167	0	0.4359	0.2541	24	0.458	0	0.542	0.2029	0.5963	24	0.167	0.833	-0.1579	1	24	
F	0.875	0.125	0	0.6452	0.1329	24	0.417	0	0.583	0.0149	1	24	0.25	0.75	0.1538	1	24	
JÁ	0.818	0.182	0	-0.1765	1	22	0.636	0	0.364	-0.1321	1	22	0.05	0.95	0	-	20	

Amostra	P450					TSF					CHYM					Todos Loci	
Dezembro	1	3	F _{IS}	P	N	2	3	F _{IS}	P	N	1	3	F _{IS}	P	N	F _{IS}	P
B	0.625	0.375	-0.5714	0.0915	24	0.278	0.722	-0.3333	1	18	0.5	0.5	-0.6418	0.0782	24	-0.2527	0.0351
N	0.722	0.278	0.75	0.0593	18	0.5	0.5	-1	0.0111*	18	0.2	0.8	-0.2	1	20	-0.1451	0.1420
T	0.5	0.5	-0.2941	0.5634	24	0.125	0.875	0.6452	0.1314	24	0.667	0.333	0.2903	0.5207	24	0.1823	0.3658
PI	0.542	0.458	-0.1324	1	24	0.5	0.5	-1	0.0021	24	0.5	0.5	-0.6418	0.0769	24	-0.3925	0.1007
R	0.542	0.458	-0.1324	1	24	0.125	0.875	-0.1	1	24	0.292	0.708	0.431	0.1969	24	0.0643	0.5569
TA	0.375	0.625	0.1538	1	24	0.042	0.958	0	-	24	0.417	0.583	0.3529	0.2894	24	0.2417	0.5459
C	0.375	0.625	0.5	0.2057	24	0.625	0.375	-0.5714	0.0903	24	0.458	0.542	-0.4776	0.2382	24	0.0132	0.6696
BA	0.542	0.458	-0.1324	1	24	0.583	0.417	-0.3333	0.5468	24	0.417	0.583	0.0149	1	24	0.0642	0.6249
F	0.5	0.5	-0.2941	0.5624	24	0.542	0.458	-0.8333	0.0141*	24	0.167	0.833	0.4359	0.2552	24	-0.1000	0.3648
JÁ	0.5	0.5	-0.1489	1	20	0.5	0.5	-0.6071	0.0904	22	0.364	0.636	-0.1321	1	22	-0.2283	0.9883

* $P < 0,05$; 1, 2 e 3 representam os alelos dos respectivos SNPs.

5.3 Diferenciação genética espacial e temporal

Em ambas as coletas as populações exibiram diferenciação significativa ($P < 0,05$), sendo o maior valor de F_{ST} encontrado na coleta de dezembro no estado do Rio de Janeiro ($F_{ST} = 0,1878$, $P < 0,005$), indicativo de alta diferenciação. A coleta de março apresentou os menores valores de F_{ST} (Tabela 11).

Dentre os loci avaliados, o PGK e o APOL foram os que demonstraram fixação alélica, e conseqüentemente redução na heterozigosidade, em todos os períodos e coletas realizadas, com destaque para os valores de F_{ST} do *locus* APOL, onde todos são indicativos de uma diferenciação moderada a muito alta. O *locus* P450 apresentou fixação em apenas uma coleta do município do Rio de Janeiro no mês de março (Tabela 11).

Tabela 11: Diferenciação genética de populações de *Aedes aegypti*, março e dezembro de 2003, estado e município do Rio de Janeiro, Brasil.

Coletas	Ns	Nt	F_{ST}									
			EF2	MUC	NAK	PGK	APOL	FERR	P450	TSF	CHYM	Todos
Março												
Município RJ	6	70	0.0617*	-0.0376	0.0543*	0.0228*	0.1705*	-0.0438	0.0496*	0.0656*	-0.0003	0.0455**
Estado RJ	6	72	0.0070	0.1421*	-0.0024	0.0792*	0.1213*	0.0347	-0.0424	0.0056	-0.0051	0.0428**
Estado RJ e município do RJ	12	142	0.0310*	0.0438*	0.0204*	0.0710*	0.2244*	0.0056	0.0049	0.0287*	-0.0049	0.0617**
Dezembro												
Município RJ	7	84	-0.0160	0.0297	0.0202	-0.0022*	0.1807*	-0.0145	-0.019	0.2059*	0.0147	0.0585**
Estado RJ	3	34	0.0302	0.2368*	0.2808*	0.1506*	0.4349*	0.0784	0.0100	0.1415*	0.1700*	0.1878**
Estado RJ e município do RJ	10	118	0.0532*	0.0796*	0.0791*	0.0352*	0.2431*	0.0100	-0.0012	0.1888*	0.0549*	0.0945**

F_{ST} : índice de fixação que mede a redução da heterozigidade de uma população devido a uma deriva genética aleatória; Ns: número de amostras; Nt: número de indivíduos analisados; * $P < 0,05$, ** P altamente significativo.

5.4 Determinação do Valor de K

Para determinar o valor de K, utilizado nas análises de estruturação populacional com base em dados de genotipagem multilocus, construção de clusters genéticos e estimar a fração do genótipo de cada indivíduo realizou-se a análise segundo o método de Evanno, obtendo-se o valor de $K=2$ como sendo o mais apropriado para as análises (Figura 07). Exceto pela coleta de março para o estado do Rio de Janeiro, cujo melhor valor de K é 9 (Figura 07 C). Os valores de K foram determinados a partir do maior valor de delta K, conforme o método de Evanno (Tabela 12).

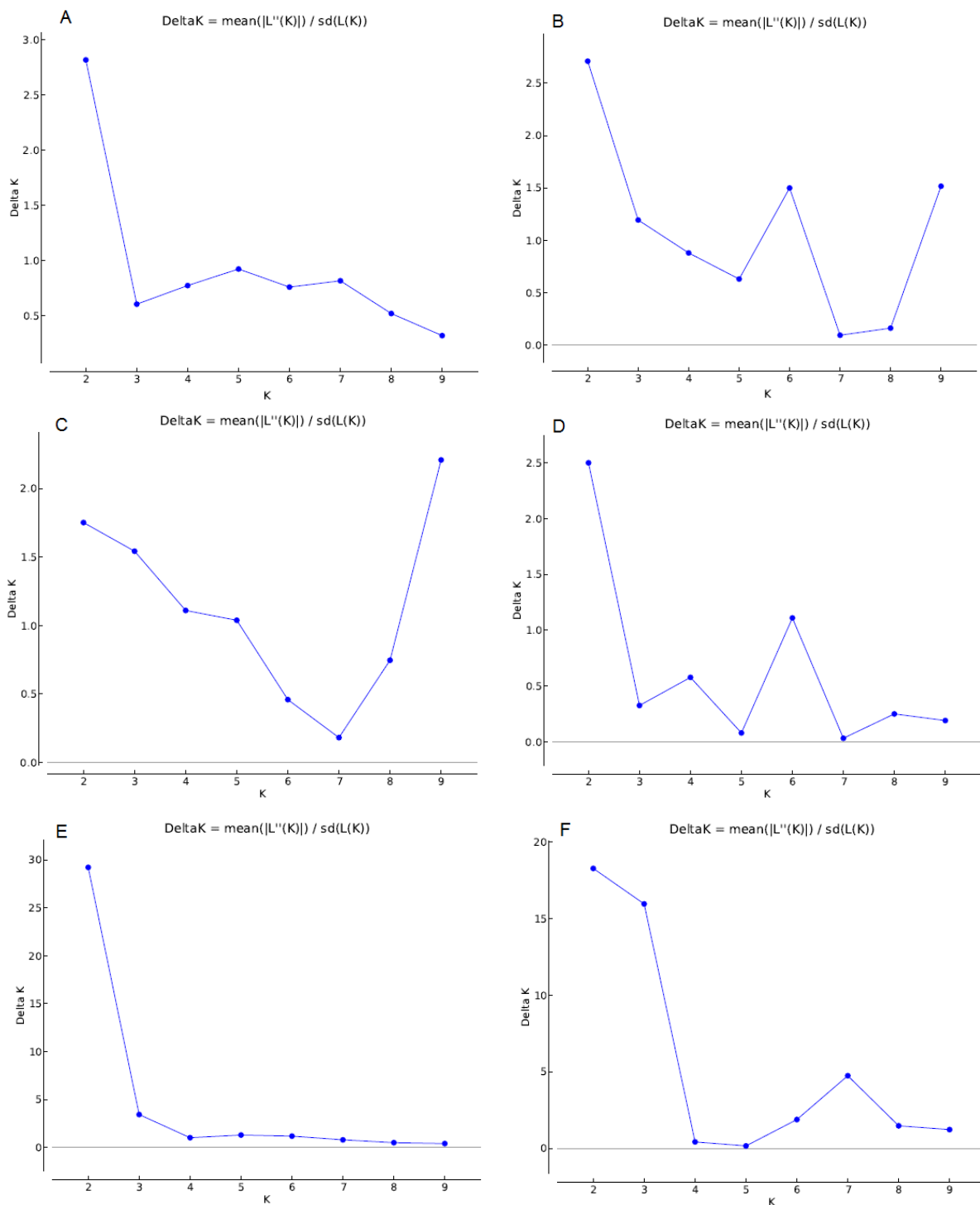


Figura 07: Valores de K calculados a partir do método de Evanno pelo software Structure Harvester. (A: município RJ, coleta de março; B: município RJ, coleta de dezembro; C: estado do RJ, coleta de março; D: estado do RJ, coleta de dezembro; E: estado e município do RJ, coleta de março; F: estado e município do RJ, coleta de dezembro)

Tabela 12: Valores de K e Delta K determinados para cada população conforme o software Structure Harvester, segundo o método de Evanno.

	Valor de K	Delta K
Março		
Município do Rio de Janeiro	2	2,815
Estado do Rio de Janeiro sem o Município do Rio de Janeiro	9	2,209
Estado do Rio de Janeiro com o Município do Rio de Janeiro	2	3,426
Dezembro		
Município do Rio de Janeiro	2	2,708
Estado do Rio de Janeiro sem o Município do Rio de Janeiro	2	2,499
Estado do Rio de Janeiro com o Município do Rio de Janeiro	2	18,263

5.5 Estruturação populacional

O *software* Structure 2.3.1 foi usado para identificar as prováveis composições genéticas das populações de *Ae. aegypti* de acordo com as localidades amostradas. A análise Bayesiana foi realizada para avaliar níveis de relação entre populações e a ocorrência de fluxo gênico entre elas, além de fornecer informação sobre a heterogeneidade das populações através dos gráficos dos clusters formados em função da composição genética.

Para as coletas realizadas no mês de março verificou-se que a composição genética para as populações do município do Rio de Janeiro não apresentou clara predominância de clusters, exceto pelo bairro de Cocota (Figura 08) onde o cluster verde parece ser mais representativo. Já para o estado do Rio de Janeiro não houve predominância de nenhum dos 9 clusters definidos conforme a análise prévia do método de Evanno (Figura 09). Ainda em relação a estas populações o segundo maior valor de Delta K foi referente ao K=2 ($\Delta K = 1,752$), indicando apenas duas composições genéticas. E para

esta situação assim como para nove composições genéticas não há predomínio de nenhum dos clusters genéticos (Figura 10).

Já quando se analisa o estado e o município do Rio de Janeiro, verifica-se uma modificação da tendência das populações dos estados (B, D2, DC, N, PA e T). Para estas populações que antes não apresentavam predomínio de cluster genético, se observa o predomínio da composição genética representada pela cor vermelha, exceto para a população de Três Rios (T), onde o cluster predominante é o verde (Figura 11). Ainda, para o município do Rio de Janeiro que não apresentava predominância de cluster agora tem o cluster verde como sendo predominante e, o bairro de Cocotá, que na análise do município do Rio de Janeiro apresentava uma leve predominância do cluster verde (Figura 08) agora tem predominância do cluster vermelho, aproximando-se mais das populações das demais localidades do estado do Rio de Janeiro (Figura 11).

Para as coletas realizadas no mês de dezembro no município do Rio de Janeiro há um predomínio do cluster vermelho exceto nos bairros de Rocha Miranda (R) e Taquara (TA) (Figura 12). Na análise do estado do Rio de Janeiro há predomínio quase que total do cluster vermelho nas populações de Barra Mansa (B) e de Nova Iguaçu (N), ao passo que em Três Rios o cluster verde é predominante (Figura 13). Para a análise incluindo o município do Rio de Janeiro no estado do Rio de Janeiro, constata-se a mesma inversão observada na coleta de março. Populações onde predominava o cluster verde passa a ter predominância do cluster vermelho e vice-versa, onde predominava o cluster vermelho, passou a predominar o cluster verde (Figura 14).

Partindo das aparentes variações evidenciadas com base nas composições genéticas de cada indivíduo em relação aos clusters, procedeu-se a observação da heterogeneidade populacional através dos clusters formados em função da composição genética indicando haver uma tendência de agrupamento entre as populações.

Todas as análises das coletas tanto de março quanto de dezembro apresentam uma distribuição agrupada indicando uma menor heterogeneidade populacional (Figuras 15 – 21). Uma exceção ocorre na coleta de dezembro, analisada no estado do Rio de Janeiro, onde verifica-se uma separação bem evidente da população de Três Rios (T) em relação as populações de Barra

Mansa (B) e Nova Iguaçu (N), separação essa que evidencia-se também na composição dos clusters (Figura 13).



Figura 08. Resultado da análise Bayesiana do município do Rio de Janeiro da coleta de março (considerando frequências alélicas correlacionadas). Cada um dos indivíduos incluídos na análise e representado por uma linha vertical, dividida em duas cores. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas, e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*.

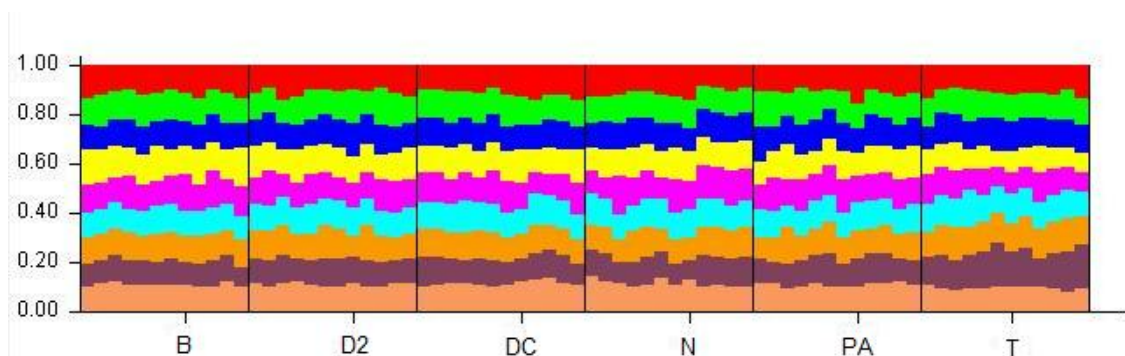


Figura 09. Resultado da análise Bayesiana do estado do Rio de Janeiro sem o município do Rio de Janeiro da coleta de março (considerando frequências alélicas correlacionadas). Cada um dos indivíduos incluídos na análise e representado por uma linha vertical, dividida em até cores. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas, e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*.

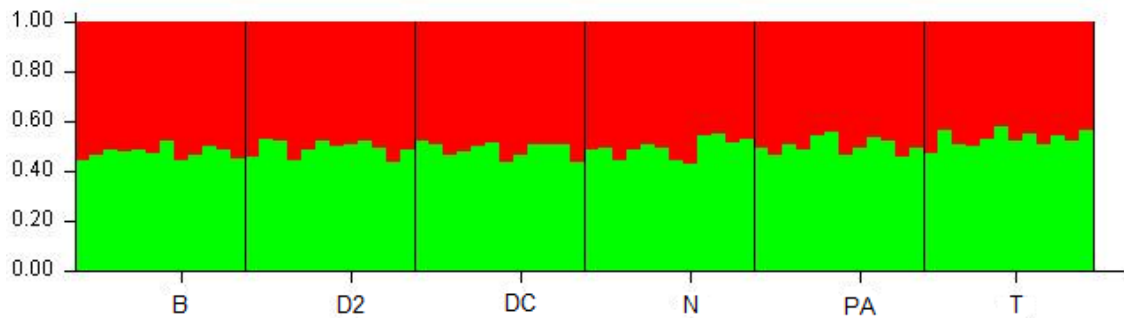


Figura 10. Resultado da análise Bayesiana do estado do Rio de Janeiro sem o município do Rio de Janeiro da coleta de março (considerando frequências alélicas correlacionadas). Cada um dos indivíduos incluídos na análise e representado por uma linha vertical, dividida em duas cores. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas, e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*.

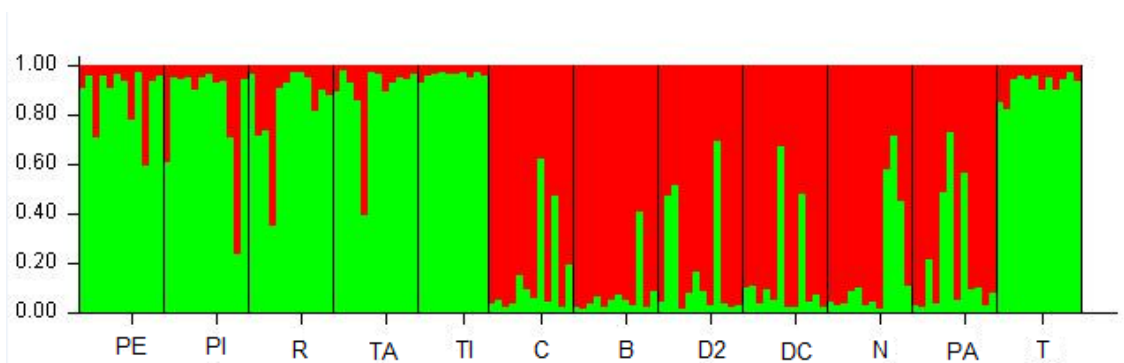


Figura 11. Resultado da análise Bayesiana do estado e município do Rio de Janeiro, coleta de março (considerando frequências alélicas correlacionadas). Cada um dos indivíduos incluídos na análise e representado por uma linha vertical, dividida em duas cores. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas, e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*.

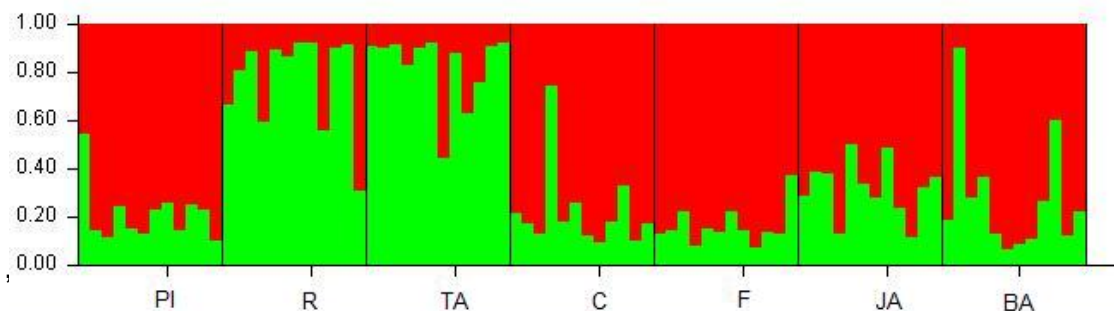


Figura 12. Resultado da análise Bayesiana do município do Rio de Janeiro, coleta de dezembro (considerando frequências alélicas correlacionadas). Cada um dos indivíduos incluídos na análise e representado por uma linha vertical, dividida em duas cores. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas, e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*.

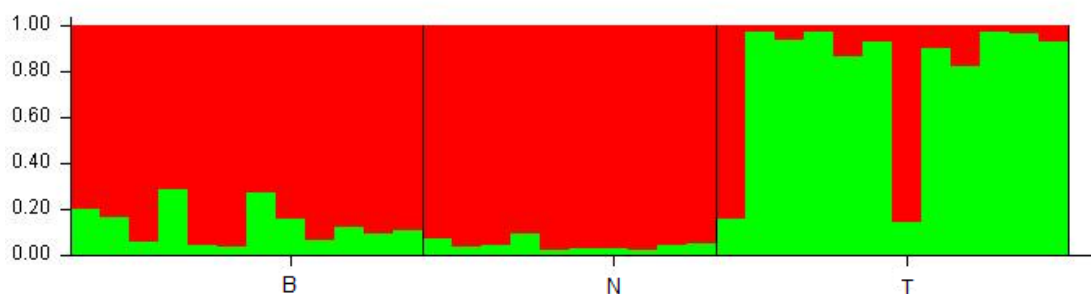


Figura 13. Resultado da análise Bayesiana do estado do Rio de Janeiro, coleta de dezembro (considerando frequências alélicas correlacionadas). Cada um dos indivíduos incluídos na análise e representado por uma linha vertical, dividida em duas cores. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas, e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*.



Figura 14. Resultado da análise Bayesiana do estado e município do Rio de Janeiro, coleta de dezembro (considerando frequências alélicas correlacionadas). Cada um dos indivíduos incluídos na análise e representado por uma linha vertical, dividida em duas cores. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas, e representam a probabilidade do indivíduo pertencer a um dos *clusters*.

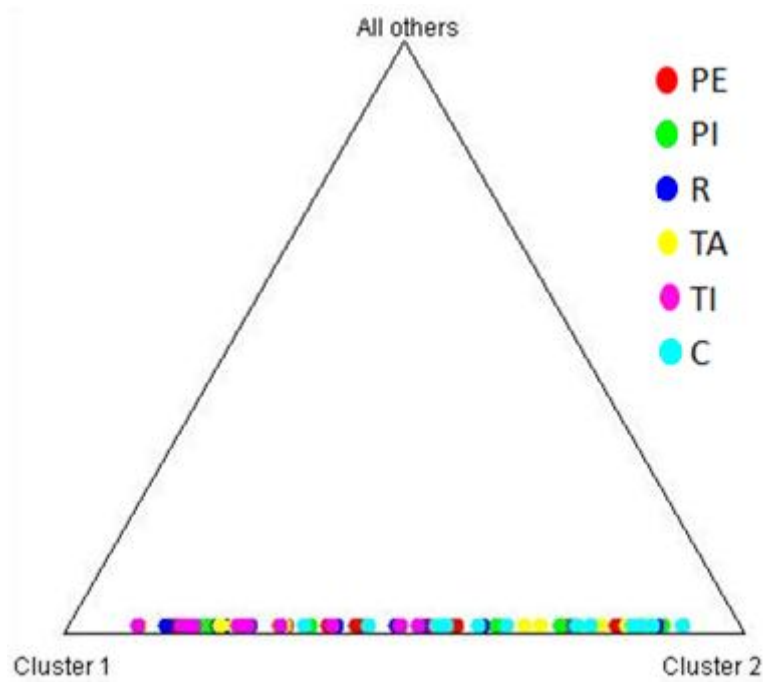


Figura 15: Gráfico de agrupamento das populações do município do Rio de Janeiro, coleta de março, em função das composições genéticas. (Cada indivíduo é representado por um ponto colorido conforme a legenda de cores da imagem).

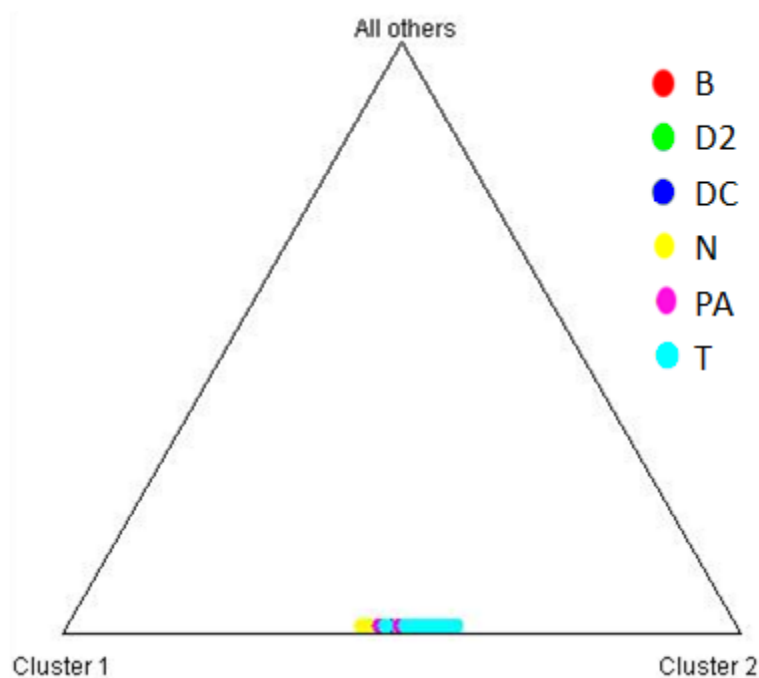


Figura 16: Gráfico de agrupamento das populações ($k=2$) do Estado do Rio de Janeiro, coleta de março, em função das composições genéticas. (Cada indivíduo é representado por um ponto colorido conforme a legenda de cores da imagem).

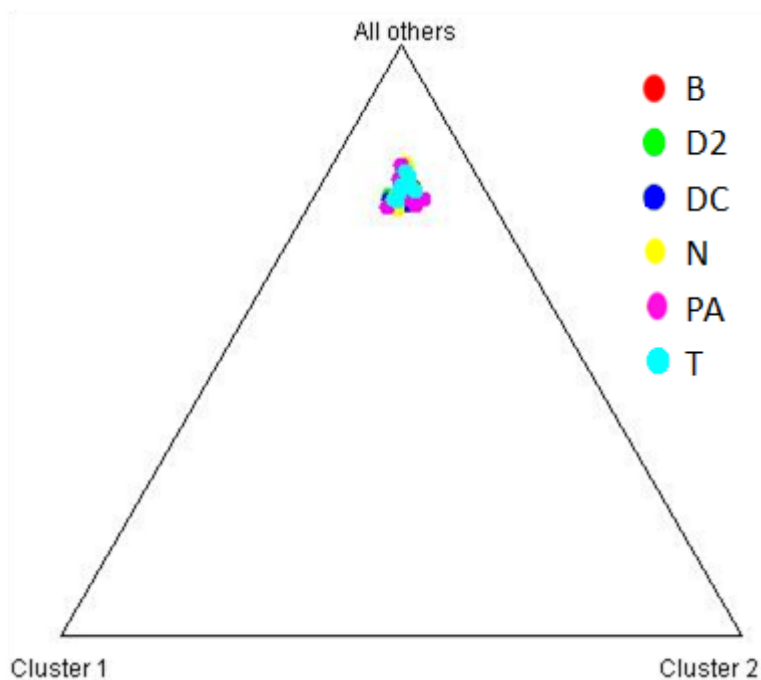


Figura 17. Gráfico de agrupamento das populações ($k=9$) do estado do Rio de Janeiro, coleta de março, em função das composições genéticas. (Cada indivíduo é representado por um ponto colorido conforme a legenda de cores da imagem).

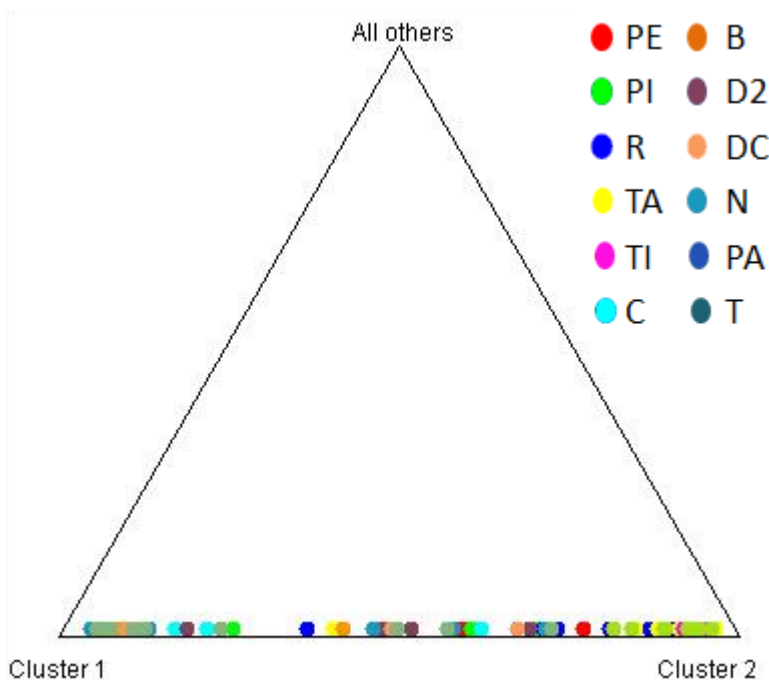


Figura 18. Gráfico de agrupamento das populações estado e município do Rio de Janeiro, coleta de março, em função das composições genéticas. (Cada indivíduo é representado por um ponto colorido conforme a legenda de cores da imagem).

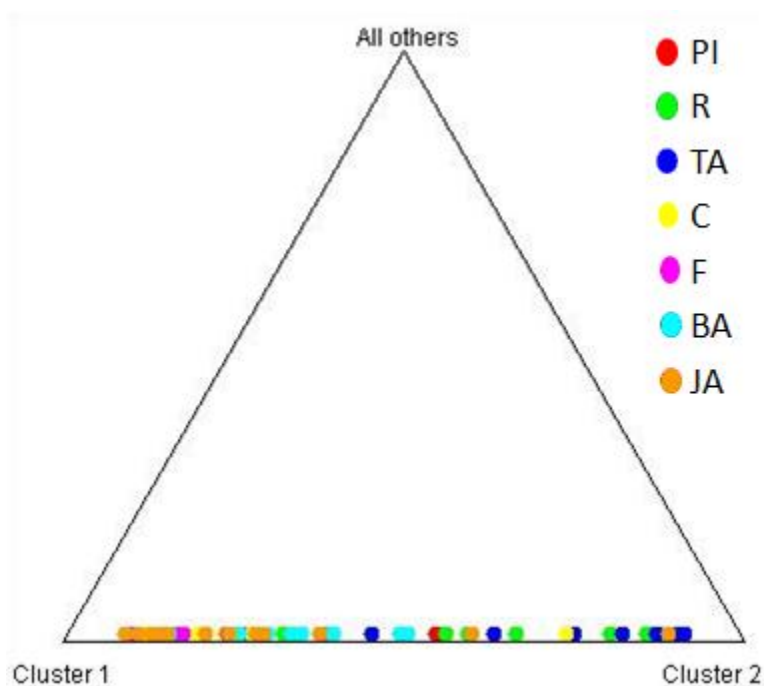


Figura 19. Gráfico de agrupamento das populações do município do Rio de Janeiro, coleta de dezembro, em função das composições genéticas. (Cada indivíduo é representado por um ponto colorido conforme a legenda de cores da imagem).

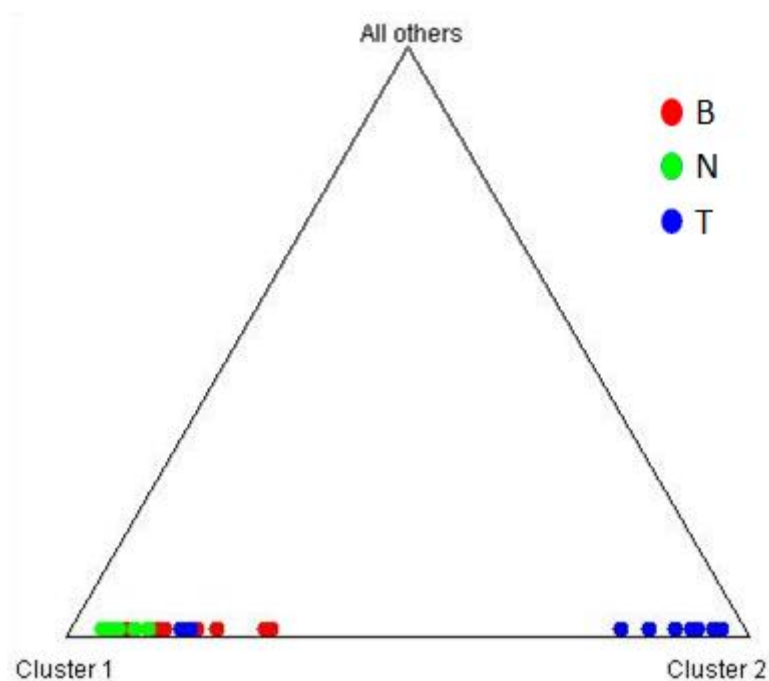


Figura 20. Gráfico de agrupamento das populações estado do Rio de Janeiro, coleta de dezembro, em função das composições genéticas. (Cada indivíduo é representado por um ponto colorido conforme a legenda de cores da imagem).

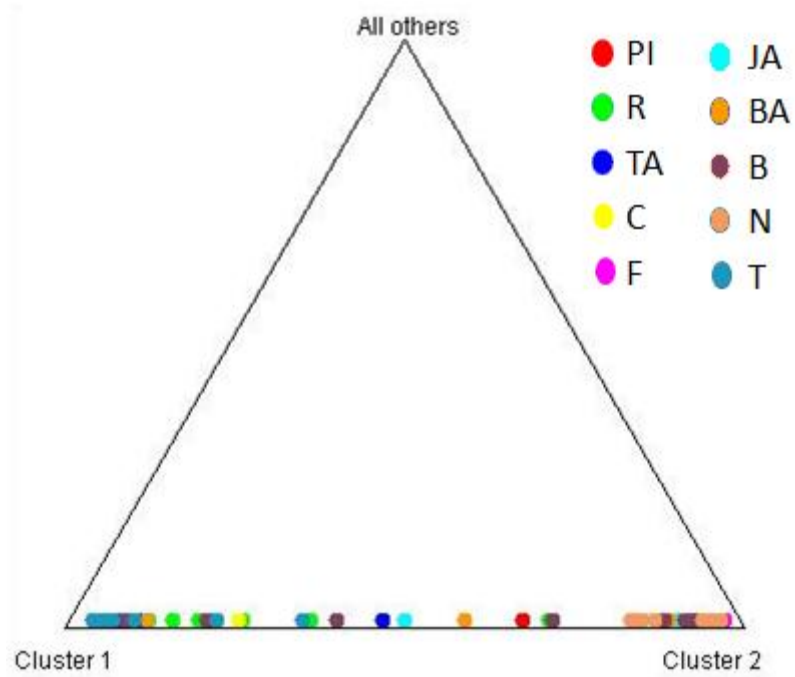


Figura 21. Gráfico de agrupamento das populações estado e município do Rio de Janeiro, coleta de dezembro, em função das composições genéticas. (Cada indivíduo é representado por um ponto colorido conforme a legenda de cores da imagem).

6. DISCUSSÃO

A análise de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em populações de *Ae. aegypti* demonstrou, pela análise de variância molecular (AMOVA), que as maiores porcentagens de variação ocorrem dentro das populações analisadas. Apesar dos baixos valores de F_{st} , os mesmos foram significativos, indicando que nessas populações ocorre reduzido fluxo gênico, o que aumenta conseqüentemente as variações entre as populações. Similarmente Spensatto (2011) através da análise de 8 SNPs encontrou a maior diversidade genética (95,63%) dentro da população e uma diversidade de 3,24% entre as populações do estudo.

Outros trabalhos relatam baixos valores de variabilidade genética entre as populações (Urdaneta-Marquez *et al.* 2008, Paduan 2008) corroborando os resultados observados no presente estudo.

Além dos SNPs, outros marcadores moleculares foram avaliados para *Ae. aegypti* a fim de verificar a variabilidade e diversidade genética. Fraga e colaboradores (2003) utilizando isoenzimas encontraram valores semelhantes de variação ao deste trabalho, tendo 95,12% da variação ocorrendo dentro das populações.

Estudos realizados por Costa-Ribeiro (2006) para o gene ND4, demonstrou porcentagem de variação mais elevada dentro das populações (46,66% para março e 32,48% para dezembro). Entretanto, esta porcentagem de variação foi inferior a encontrada nesse estudo, quando se utilizou SNPs como marcadores moleculares.

Três de 396 amostras (0.76%) foram significativas para o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni, todas no mês de dezembro. Uma amostra esta associada a um déficit de heterozigotos e duas ao excesso de heterozigotos, contudo nenhuma amostra de toda a população foi significativa para um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Costa-Ribeiro *et al.* (2006a), utilizando isoenzimas observaram 17 amostras relacionadas a um déficit de heterosigozidade e 8 ao excesso. E no ano seguinte encontraram 16 casos de déficit de heterosigozidade e excesso de heterosigozidade em três amostras (Costa-Ribeiro *et al.* 2007). Trabalhando com microssatélites, nas populações do Rio de Janeiro evidenciaram-se 6

amostras com déficit de heterosigozidade, mas considerando todos os *loci* para cada população, todas foram significativas para um déficit de heterosigozidade (Costa-Ribeiro *et al.* 2006b).

No presente trabalho o número dos desvios associados a um F_{IS} foram menores. A explicação para estes desvios seriam a de ocorrência do efeito Wahlund, onde há a existência de agrupamentos populacionais com diferentes frequências alélicas em uma mesma população (Costa-Ribeiro *et al.* 2007).

A diferenciação genética avaliada pelo F_{ST} foi altamente significativa em todas as amostras e coletas realizadas nos diferentes períodos, evidenciando um baixo nível de migração entre as populações de *Ae. aegypti*, tanto do estado do Rio de Janeiro como um todo, quanto das populações restritas apenas a capital do estado. O mesmo padrão foi encontrado em estudos realizados na mesma localidade e período por Costa-Ribeiro e colaboradores (2006a, 2006b e 2007) usando isoenzimas e microssatélites como marcadores moleculares.

Segundo estes pesquisadores, isto pode ser devido à alta disponibilidade de criadouros para as formas juvenis visto das falhas existentes nos programas de controles. Com isto, ocorre uma baixa dispersão das fêmeas que acabam por ovipositar e realizar repasto sanguíneo em áreas próximas, circunscrita, acarretando baixo fluxo gênico diferenciação genética entre as populações.

Hemme *et al.* (2010) sugerem que os valores de F_{ST} são relativamente menores quando se comparam localidades, análise espacial, do que quando se comparam amostras coletadas em períodos diferentes, análise temporal. De fato, ao compararmos os valores de F_{ST} nas duas coletas, maior diferenciação foi observada nas populações de dezembro. Exceto pelas coletas conduzidas no município do Rio de Janeiro, em março os valores de F_{ST} , foram similares nas populações provenientes do estado do Rio de Janeiro e das populações do estado com o município do Rio de Janeiro.

Oportuno ressaltar, é que a análise do estado do Rio de Janeiro sem o município do Rio de Janeiro no mês de dezembro contava apenas com três populações, fato este que pode ter contribuído para o aumento do valor de F_{ST} .

Pela análise Bayesiana evidenciou-se além de uma baixa composição genética em cada população, baixa heterogeneidade, independente do período

de coleta e localidade. Spenassatto (2011) trabalhando com populações paulistas verificou a existência de apenas três clusters genéticos nas populações, contudo a população de São Sebastião apresentou-se mais dispersa, sendo um indicativo de uma maior heterogeneidade. Paupy e colaboradores (2010) trabalhando com variabilidade genética em *Ae. aegypti* no Senegal por meio de microssatélites, encontrou que o número de clusters genéticos é maior durante a estação das chuvas do que durante a estação seca. Já para a realidade das populações brasileiras do estado do Rio de Janeiro, isto não foi evidenciado visto que tanto no período das chuvas (março) quanto no período das secas (dezembro) o número de clusters genéticos permaneceu o mesmo.

O *Ae. aegypti* apresenta seu ciclo de vida extremamente ligado aos regimes pluviais, visto que uma maior precipitação leva a uma maior disponibilidade de criadouros, o que pode contribuir para a pouca dispersão das fêmeas, resultado assim, em um baixo fluxo gênico. Já no período de seca o número e a disponibilidade de criadouros diminui requerendo que as fêmeas aptas a ovipositar, desloquem-se mais, contribuindo para um maior fluxo gênico. Na presente pesquisa não foi evidenciada diferença entre período de chuva e período de seca. Fato similar foi observado na Ásia por Huber *et al.* (comunicação pessoal) onde os criadouros não variavam em função do regime de chuvas porque os reservatórios permanentes ou semi-permanentes com os vasos de água dentro das casas eram mantidos independentes de fatores ambientais, o que influenciava diretamente na estrutura populacional de *Ae. aegypti* daquela região. Esses dados demonstram o quanto fatores sócio-ambientais e culturais são importantes para a manutenção de *Ae. aegypti* e quão é importante estudos que analisem esses fatores caso a caso. Áreas onde os criadouros mais produtivos e permanentes são abundantes e bem distribuídos no espaço, o aumento da oferta de pequenos depósitos durante as chuvas deve influenciar secundariamente a dispersão visando à desova.

A estrutura genética é o resultado dos eventos de migração, dos processos de seleção, de mutação e da deriva genética. A variabilidade genética e o baixo fluxo gênico entre populações refletem a descontinuidade encontrada no ambiente natural das populações. Para os artrópodes, esta descontinuidade é na maioria das vezes, espacial e temporal. O fluxo gênico

apoiado sobre a capacidade de dispersão do vetor (distância e direção) é um importante elemento a ser considerado na adoção de medidas de controle. A estimativa de fluxo gênico a partir da análise de genes neutros oferece informações que refletem a dinâmica das populações, evidenciando os problemas ligados às variações da capacidade vetorial, de resistência aos inseticidas e ainda da potencialidade da utilização de mosquitos transgênicos no controle do vetor (Failloux *et al.* 1999).

7. CONCLUSÕES

- Pela análise de variância molecular foi observado maior percentual de variação dentro das populações de *Ae. aegypti*, no estado e no município do Rio de Janeiro, e em ambas as coletas realizadas;
- A diferenciação genética espacial e temporal avaliada pelo F_{ST} , foi altamente significativa em todas as amostras e coletas realizadas, evidenciando baixo fluxo gênico, tanto no estado do Rio de Janeiro quanto nas populações de *Ae. aegypti* do município;
- Pela análise Bayesiana evidenciou-se baixa variabilidade genética das populações avaliadas, independente do período de coleta e localidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barreto, M. L. & Teixeira, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados 22 (64)**: 53 – 72, 2008.

Benson, G. L. & Apperson, C. S. Re-examination of Chemically Mediated Oviposition Behavior in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol. 25 (3)**: 158-164, 1988.

Bentley, M. D. & Day, J. F. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. **Annual Review Entomology 34**: 401–421, 1989.

Black IV, W.C., Bennett, K., Gorrochotegui-Escalante, N., Barrillas-Mury, C.V., Fernández-Salas, I., Muñoz, M.L., Farfán-Alé, J.A., Olson, K.E. & Beaty, B.J. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research 33**: 379-388, 2002.

Boletim Dengue 04/06/2012. Disponível em: http://www.fiocruz.br/rededenque/media/Boletim_Dengue_040612.pdf.

Acessado em 12/10/2012.

Bona, A. C. D. **Aplicação de ferramentas moleculares e genéticas para monitoramento do vetor e do vírus dengue**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 155p., 2012.

Bosio, C.F., Fulton, R.E., Salasek, M.L., Beaty, B.J. & Black, W.C. IV. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics 156**: 687-698, 2000.

Braga, I. A., Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços da Saúde 16 (4)**: 279-293, 2007.

Carroll, D., Toovey, S., Gompel, A. V. Dengue fever and pregnancy – A review and comment. **Travel Medicine and Infectious Disease, 5**: 183-188, 2007.

Cartilha dengue 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html. Acesso em [11/10/2012](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html). Acessado em: 12/10/2012.

Consoli, R. A.; Lourenço-de-Oliveira, R.. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 225 p., 1994.

Costa- Ribeiro, M. C. V. **Variabilidade genética de *Aedes (Stegomyia) aegypti* no Brasil**. Tese de doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 136p., 2006.

Costa-Ribeiro, M. C. V., Lourenço-de-Oliveira, R. & Failloux, AB. Geographic and temporal genetic patterns of *Aedes aegypti* populations in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, **11 (8)**: 1276–1285, 2006a.

Costa-Ribeiro, M. C. V., Lourenço-de-Oliveira, R. & Failloux, AB. Low Gene Flow of *Aedes aegypti* between Dengue-Endemic and Dengue-Free Areas in Southeastern and Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **77 (2)**: 303–309, 2007.

Costa-Ribeiro, M.C.V., Lourenço –de- Oliveira, R., Failloux, A. B. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101 (8)**: 917-921, 2006b.

Dujardin, J-P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution** **8**: 875–890, 2008.

Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, **4 (2)**: 359-361, 2012.

Failloux A-B, Vazeille-Falcoz, M., Mousson, L. & Rodhain, F. Contrôle génétique de la compétence vectorielle des moustiques du genre *Aedes*. **Bulletin de la Société de pathologie exotique** **92 (4)**: 266-273, 1999.

Fraga, E. C., Santos, J. M. M. & Maia, J. F. Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Manaus-AM, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, **26 (2)**: 181-187, 2003.

Gubler, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology** **10**: 100-103, 2002.

Hemme, R. R.; Thomas, C. L.; Chadee, D. D. & Severson, D. W. Influence of urban landscapes on population dynamics in a short - distance migrant mosquito: Evidence for the dengue vector *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases** **4**: 634-643, 2010.

Henry A, Thongsripong P, Fonseca-Gonzalez I, Jaramillo-Ocampo N. & Dujardin J-P. Wing shape of dengue vectors from around the world. **Infect Genetic & Evolution** **10 (2)**: 207-214, 2009.

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** **38**: 542-547, 2009.

Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, D., Seta, T., Min Sein C., Seng, M. & Catherine, W. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. **BMC Genetics**, **10**: 1-12, 2009.

Huber, K., Mousson, L., Rodhain, F. & Failloux, A-B. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. **Molecular Ecology Notes** **1**: 219 -222, 2001.

IRAC-BR.Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas. 2010. Disponível em <<http://www.irac-br.org.br/curso01.htm>>. Acessado em 13 de Julho de 2012.

Jirakanjanakit, N. & Dujardin, J-P. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** **36 (4)**: 1–4, 2005.

Jirakanjanakit, N., Leemingsawat, S. & Dujardin, J-P. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. **Infection Genetics and Evolution** **8**: 414–421, 2007a.

Julio, N. B.; Chiappero, M. B.; Rossi, H. J.; Duenas, J. C. R. & Gardenal, C. N. Genetic structure of *Aedes aegypti* in the city of Córdoba (Argentina), a recently reinfested área. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **104**: 626-631, 2009.

Lima-Catelani, A.R.A., Ceron, C.R. & Bicudo, H.E.M.C. Variation of genetic expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Biochemical Genetics** **42 (3/4)**: 69-83, 2004.

Logan, J. G. & Birkett, M. A. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. **Pest Management Science** **63**: 647-657, 2007.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB. . *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** **98**:43-54, 2004.

Loxdale, H.D. & Lushai, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**, **88 (6)**: 577-600, 1998.

Morlais, I. & Severson, D.W. Intraspecific DNA variation in nuclear genes of the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, **12**: 631-639, 2003.

Natal, D. Bioecologia do Aedes. **Biológico** **64 (2)**:205-207, 2002.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil. **Dengue Bull** **26**:77-83, 2002.

Nogueira, R. M. R. & Eppinghaus, A. L. F. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106 (3)**: 255-256, 2011.

Olson, K. E., Adelman, Z.N., Travanty, E.A., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B.J. & Blair, C.D. Developing arbovirus resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **32**: 1333-1343, 2002.

Paduan, K.S. & Ribolla, P.E.M. Mitochondrial DNA Polymorphism and Heteroplasmy in Populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **Journal of Medical Entomology** **45(1)**:59-67, 2008.

Paduan, K.S. **Desenvolvimento de marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) para estudos populacionais do mosquito *Aedes aegypti***

no Brasil. Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu-SP, 2008.

Paduan, K.S. & Ribolla, P.E.M. Characterisation of 8 single nucleotide polymorphism markers in *Aedes aegypti*. **Molecular Ecology Notes**, **9 (1)**: 114–116, 2009.

PAHO. Dengue in Brazil: Current Situation and Prevention and Control Activities. **Epidemiological Bulletin**, **23 (1)**, 2002. Disponível em: http://www.paho.org/english/sha/be_v23n1-denguebrazil.htm. Acessado em: 24/10/2012.

Paupy, C., Brengues, C., Ndiathc, O., Totyb, C., Hervéb, J. P. & Simard, F. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. **Infection, Genetics and Evolution** **10**: 473-480, 2010.

Pontes, R. J. S.; Ruffino-Netto, A. Dengue em localidade urbana da região Sudeste do Brasil: Aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, **28**: 218-227, 1994.

Ribeiro, A. F., Marques, G. R. A. M., Voltolini, J. C., Condino, M. L. F. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de Saúde Pública** **40 (4)**: 671-676, 2006.

Rousset, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources** **8 (1)**: 103–106, 2008.

Sousa-Polezzi, R.C. & Bicudo, H.E.M.C. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) detected by changes in the esterase patterns. **Genética** **125**: 43-53, 2005.

Spenassatto, C. **Desenvolvimento de metodologia high-throughput para estudo populacional do mosquito *Aedes aegypti* e comparação de dados de genes nucleares com dados de genes mitocondriais.** Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2011.

Tauil P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** **18**: 867-871, 2002.

Teixeira, M. G., Costa, M. C. N., Barreto, F. & Barreto, M. L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, **25 (1)**: S7-S18, 2009.

Twierdochlib, A., Bona, A. C. D., Leite, S. C., Chitolina, R. F., Westphal, B. & Navarro-Silva, M. A. Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. **Revista Brasileira de Entomologia** **56(2)**: 249-256, 2012.

Urdaneta-Marquez, L., Bosio, C., Herrera, F., Rubio-Palis, Y., Salasek, M. & Black IV, W. C. Genetic Relationships among *Aedes aegypti* Collections in Venezuela as Determined by Mitochondrial DNA Variation and Nuclear Single Nucleotide Polymorphisms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **78 (3)**: 479-491, 2008.

WHO – World Health Organization. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>. Acessado em: 22/10/2012.

Wilder-Smith, A., Schwartz, E. Dengue in travelers. **New England Journal of Medicine**, **353 (9)**: 924-932, 2005.

Yan G., Chadee D. D. & Severson D.W. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. **Genetics** **148**: 793-800, 1988.