



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

FERNANDA FERNANDES DUARTE DE OLIVEIRA LIMA

**VARIABILIDADE DE *Aedes aegypti* EM ÁREA URBANA DE CAMPINA
GRANDE - PB**

**CAMPINA GRANDE – PB
2013**

FERNANDA FERNANDES DUARTE DE OLIVEIRA LIMA

**VARIABILIDADE DE *Aedes aegypti* EM ÁREA URBANA DE CAMPINA
GRANDE - PB**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação de Ciências Biológicas da
Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento
à exigência para obtenção do grau de Licenciado e
Bacharelado em Ciências Biológicas

Orientador: Dr. Eduardo Barbosa Beserra
Co-Orientador: Ms. Walter Fabricio Martins

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

L732v Lima, Fernanda Fernandes Duarte de Oliveira.
Variabilidade de *aedes aegypti* em área urbana de
Campina Grande - PB [manuscrito] / Fernanda Fernandes
Duarte de Oliveira Lima. – 2014.
31 f. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências
Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

“Orientação: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra,
Departamento de Ciências Biológicas.”

1. Diversidade genética. 2. Vetor da dengue. 3. Fluxo
gênico. I. Título.


CDD 21. ed. 616.928


FERNANDA FERNANDES DUARTE DE OLIVEIRA LIMA

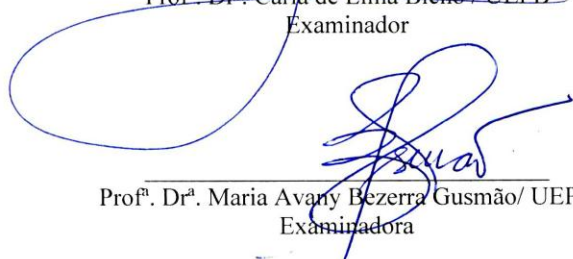
**GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* EM ÁREAS
URBANAS DE CAMPINA GRANDE.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação Ciências Biológicas
da Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento à exigência para obtenção do
grau de Licenciado e Bacharelado em
Ciências Biológicas.

Aprovada em 13 /11/2013.


Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra / UEPB
Orientador


Prof.^a Dr.^a Carla de Lima Bicho / UEPB
Examinador


Prof.^a Dr.^a Maria Avany Bezerra Gusmão/ UEPB
Examinadora

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Aedes aegypti* EM ÁREA URBANA DE CAMPINA GRANDE- PB

LIMA, Fernanda Fernandes de Oliveira

RESUMO

A caracterização de insetos possibilita a identificação de diversas especificidades através dos padrões fisiológicos, morfológicos e genéticos é possível obter uma estruturação populacional. A utilização de marcadores moleculares são ferramentas baseadas em DNA que possibilita complementar ao estudo desta caracterização. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética de populações de *Aedes aegypti* nos bairros do Catolé e José Pinheiro, Campina Grande, PB, utilizando marcadores moleculares microssatélite e determinar a estrutura genética e o nível de fluxo gênico entre as populações em escala micro geográfica através com a utilização de 3 pares de *primers*. A coleta de ovos realizada no mês de fevereiro utilizando 10 pontos em cada bairro serviu para a tabulação dos dados e a realização da PCR com três *primers* de microssatélite. No programa GenAlEx 6.5 (*Genetic Analysis in Excel*) foi gerado os resultados para o comparativo gráfico. A análise feita por estimativas F_{st} (índice de fixação gênica) entre as populações nos observar que entre os pontos J-1 e C-2 apresentam uma fixação média de 0,006 , classificado com alto valor de fluxo gênico dentro dessas populações e um baixo fluxo gênico entre C-4 e C-8 .

Palavras-chave: vetor da dengue, diversidade genética, microssatélite, fluxo gênico

VARIABILITY OF *Aedes aegypti* IN URBAN AREA FROM CAMPINA GRANDE - PB

LIMA, Fernanda Fernandes de Oliveira

ABSTRACT

The characterization of insects enables the identification of different features, such as density, size, emergence and sex ratio through knowledge of their physiological patterns, for a morphological and genetic population structure. Molecular markers are DNA-based tools, complementary to the study of this characterization. Aimed through this study was to evaluate the genetic diversity of populations of *Aedes aegypti* in two districts of Campina Grande - PB, Catolé and José Pinheiro and determine the genetic structure and levels of gene flow between populations in micro scale through geographic microsatellite amplification using primer pairs 3. The data were submitted to the GenAlEx 6.5 (Genetic Analysis in Excel) to create a comparison chart. The analysis estimates for F_{st} (index fixation of gene) among populations collected at each of 10 points, allows us to observe that between the subpopulations J-1 and C-2 show a fixation average 0.006 classified as a low level genic differentiation, in other words, there is greater gene flow within subpopulations to compare themselves with others groups for this search.

KEYWORDS: dengue vector, population genetics, microsatellite, gene flow.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Introdução | 4 |
| 2 | Objetivos | 6 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 6 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 6 |
| 3 | Referencial Teórico | 7 |
| 3.1 | SITUAÇÃO ATUAL DA DENGUE | 7 |
| 3.2 | ECOLOGIA DO <i>Aedes aegypti</i> | 9 |
| 3.3 | CONTROLE DO <i>Aedes aegypti</i> | 9 |
| 3.4 | MARCADORES MOLECULARES | 10 |
| 4. | Material e Métodos | 12 |
| 4.1 | COLETA DE <i>Aedes aegypti</i> | 12 |
| 4.2 | CRIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO <i>Aedes aegypti</i> | 12 |
| 4.3 | EXTRAÇÃO DO DNA | 13 |
| 4.4 | AMPLIFICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES | 13 |
| 4.5 | ELETROFORESE | 14 |
| | 4.5.1 PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA | |
| | 4.5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS ELETROFORESE | |

4.5.4 REVELAÇÃO DO GEL

| | |
|---|-----------|
| 5. Resultado e Discussão | 15 |
| 5.1 ANÁLISES DE DADOS | 15 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA | 15 |
| 6. Conclusão | 25 |
| Referências | 26 |

1 INTRODUÇÃO

Aedes aegypti é um inseto de origem africana e devido ao seu comportamento antropofílico teve uma rápida dispersão principalmente em meios urbanos, o que pode explicar o crescente número de casos de dengue juntamente com o desenvolvimento industrial (SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE, 2010). Esse mosquito provavelmente foi introduzido no Brasil ainda no período colonial através dos navios europeus, quando surtos de febre amarela assolavam o período (BISSET, 2002).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, OMS (2012), a dengue tem sido relatada no mundo desde o século XVII. Porém no século XVIII as epidemias se tornaram mais intensas e o *A. aegypti* foi descoberto como vetor da doença.

A palavra dengue tem origem espanhola e quer dizer “melindre”, “manha”. O nome faz referência ao estado de prostração que o indivíduo contaminado pelo arbovírus adquire (PORTAL DA SAÚDE, 2012). O agente etiológico da dengue é um arbovírus da família Flaviviridae existente em quatro sorotipos possíveis - DENV-1; DENV-2; DENV-3 e DENV-4 (GUEDES, 2012).

A ausência de uma vacina ou medicamento eficaz para o tratamento da dengue torna a utilização de inseticidas químicos a principal medida de controle contra o inseto para evitar o alastramento das epidemias. As campanhas de conscientização são estratégias adicionais para o combate do inseto visto que os principais criadouros são produzidos, sobretudo por seres humanos.

Mesmo com os métodos de controle disponíveis, nenhum método é livre de riscos ou continuam eficientes em longo prazo que possam evitar surtos de dengue, tornando necessário o conhecimento aprofundado sobre a estruturação genética e dinâmica populacional, uma vez que populações geneticamente diferentes podem apresentar diferenças quanto a sua capacidade e competência vetorial para o vírus da dengue. Na tentativa de se manter estratégias efetivas de controle, o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem o entendimento das relações entre o vetor e homem é imprescindível (SPENASSATTO, 2011).

Os marcadores moleculares tornaram-se o mais comum parâmetro para medir as diferenças genéticas entre indivíduos ou dentro e entre espécies relacionadas às populações (BEHURA, 2006). Atualmente, existe uma série destes, sendo utilizados para diversos fins, como filogenia, ecologia e dinâmica populacional (SABATINI, 2003).

Os marcadores moleculares baseados na amplificação de microssatélites, também

denominados de repetições de sequências simples (*simple sequence repeats*; SSRs), compreendem uma classe de DNA repetitivo composto de pequenas sequências de 1 a 4 nucleotídeos repetidos adjacentes que se encontram dispersos no genoma.

Em genomas de eucariotos, essas pequenas sequências repetitivas de DNA são mais frequentes, mais bem distribuídas e formam loci genéticos muito polimórficos que podem ser amplificados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir de um par de *primers* específicos (de vinte a trinta bases) que flanqueiam os microssatélites (MÜLLER, 2010).

Desta forma, objetivou-se avaliar a diversidade genética das populações de *A. aegypti* em área urbana, caracterizando a estrutura genética e nível de fluxo gênico entre populações em escala micro geográficas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a estrutura genética das populações de *Aedes aegypti* em área urbana

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a variabilidade genética espacial da espécie *Aedes aegypti*;
- Avaliar o nível de fluxo gênico entre populações em escala micro geográficas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

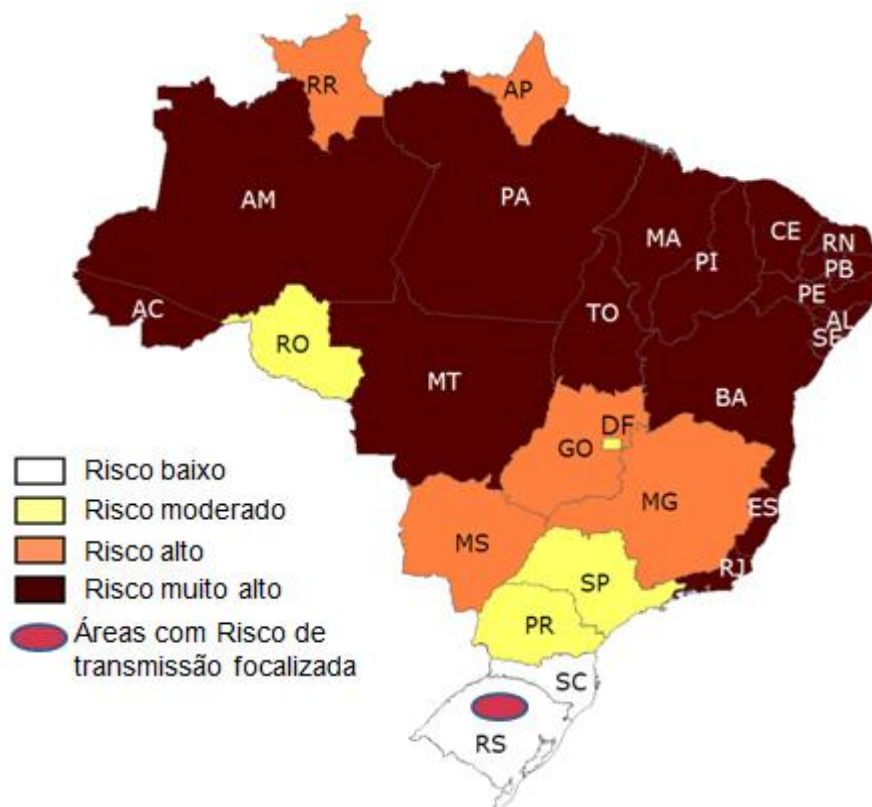
3.1. Situação atual da dengue

A dengue é uma enfermidade de ocorrência mundial, sendo atualmente encontrada em grande escala no continente americano, numa faixa que se estende do Uruguai até o Sul dos Estados Unidos (VARÓN, 2010). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), são relatados mais de 100 milhões de casos por ano.

O número de países com ocorrência da febre amarela e da dengue hemorrágica vem crescendo durante os anos. Em 1992 foram relatados casos da doença em 20 países, em 2001 esse número sobe para 38 países, entre os anos 2001 e 2004 tiveram relatos de 69 países infectados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Nas Américas o número de casos e de países com registros de infectados também é crescente, entre 1968 e 1980, foram registradas a infecção em cinco países com 60 casos. Por outro lado entre 1981 até 2005 os casos ultrapassam 139 mil em 29 países (COELHO, 2008). Registros mais atuais obtidos através do Programa Regional da Dengue da OPAS/OMS (2013) mostram que houve 279.540 casos da doença, 1.752 casos graves e 84 óbitos na Região das Américas. Dentre as áreas com transmissão ativa destacam-se o Cone Sul com 242.639 casos (Brasil 204.650 casos e Paraguai 37.642), seguida da sub-região América Central e México com 16.907 casos, e Andina com 14.983 casos.

No Brasil, a primeira epidemia relatada com diagnóstico clínico ocorreu em Boa Vista/ Roraima em 1982. Nesse mesmo século, ocorreram epidemias no Rio de Janeiro e em algumas capitais do Nordeste. 70% da população brasileira residem na região Sudeste e Nordeste, onde os casos de dengue são mais frequentes (figura 1) (A Dengue vem ocorrendo desde então de forma continuada, intercalando com ocorrências epidêmicas e isoladas. A cada ano, são registrados entre 50 milhões e 80 milhões de casos de dengue em todo mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).



OBS 1: O mapa não considera a dispersão do DEN-4 para outros estados
OBS 2: SC nunca teve transmissão autóctone de dengue

Figura 1: Mapa do território brasileiro com a intensidade de epidemias para a dengue.

Fonte: Ministério da Saúde, 2010

Na Paraíba, os dados do Levantamento do Índice Rápido de Infestação por *A. aegypti* (LIRAA), realizado em novembro de 2010, indicam que João Pessoa está em situação satisfatória, que é definida quando a presença de larvas do mosquito, ocorre em menos de 1% das residências. No entanto, os municípios de Campina Grande e Santa Rita estão em situação de alerta, com índices de infestação de 1,9% (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011).

Os dados tiveram mudanças, no último boletim da Secretaria de Estado da Saúde, publicado no dia 15 de dezembro de 2012, os dados do LIRAA mostra que o município de Campina Grande está em situação satisfatória com índices de infestação de 0,8%. Contudo, alguns municípios estão em situação de alerta, como no município de Emas que possui o índice de infestação de 14%, mostrando que apesar dos programas do governo revelar resultados, a região do sertão continua sendo a mais acometida e contribui com 55,27% do total de casos do estado da Paraíba (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012)

De acordo com dados do Boletim Epidemiológico nº 9, foi registrado um aumento de 9% no número de notificações de casos de dengue na Paraíba de 1º de janeiro a junho do ano de 2013, se comparado com o mesmo período do ano anterior. Até agora, foram notificados

7.471, dos quais 2.570 já confirmados para dengue clássica, 62 casos graves da doença e 781 descartados. No mesmo período de 2012, foram registradas 6.850 notificações. O maior número de casos notificados ocorreu nos municípios de João Pessoa, Campina Grande, São João do Cariri e Santana de Mangueira (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2013).

3.2. Distribuição e ecologia do *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* encontra-se hoje distribuído mundialmente entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul, que correspondem à isoterma de inverno de 10°C. A distribuição desse mosquito também é restrita à altitude. Embora a espécie não seja normalmente encontrada em zonas acima de 1.000 metros de altitude, sua presença já foi detectada a alturas de mais de 2.000 metros, na Índia e na Colômbia (BRAGA, 2008).

Com relação ao ciclo de vida, na natureza os culicídeos nutrem-se de néctar de flores e suco de frutos que são essenciais para a sobrevivência de muitas espécies. Contudo, o repasto sanguíneo feito pelas fêmeas é imprescindível para a maturação dos ovos. Em geral, a fêmea de culicídeos faz uma postura após cada repasto sanguíneo (BARATA, 2001). O ápice desta atividade dá-se no período crepuscular matutino, à tarde e a meia noite (BRAGA, 2007).

O *Aedes aegypti*, mais do que qualquer outra espécie, alimenta-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, especialmente quando a fêmea é perturbada antes de estar totalmente ingurgitada. Essa característica aumenta a possibilidade do mosquito ser transmissor do vírus.

Segundo Braga (2007), o ciclo gonotrófico se completa nos culicídeos, em dois ou três dias quando as condições ambientais são favoráveis. A época da reprodução se estende ao longo do ano, tendo um declínio na estação de seca e um período de pico na temporada chuvosa, coincidindo em um período de alta incidência (HUBER, 2002).

A temperatura influencia na transmissão do dengue interferindo de forma direta e indireta no repasto sanguíneo das fêmeas, em seu desenvolvimento e no período de incubação extrínseco do vírus (DONALISIO & GLASSER, 2002).

3.3. Controle do *Aedes aegypti*

Uma primeira campanha pública contra a dengue e febre amarela urbana, iniciada por Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (1902-1907), instituíram brigadas sanitárias, cuja função era detectar casos de febre amarela e eliminar os focos de *A. aegypti* (BRAGA E VALLE, 2007).

As campanhas de conscientização são importantes para o combate do inseto visto que os principais criadouros são produzidos principalmente pelos seres humanos. Existem estratégias utilizadas pelas campanhas para o controle de vetores, como por exemplo, o manejo ambiental, que lança mão da retirada do vetor ou do foco do ambiente com a eliminação dos criadouros, drenagem e instalação de portas e janelas (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995).

O controle biológico é outra estratégia que se utiliza de predadores larvais, como invertebrados aquáticos (copépodos e Toxorhynchites) ou peixes. Entre as medidas de controle biológico ainda é possível citar o uso de patógenos como o fungo *Lagenedium giganteum*, e de parasitas como os nemátodeos (ROSE, 2001). Vários agentes de controle biológico apresentaram um bom potencial para suprimir populações de mosquitos.

Com a ausência de um medicamento eficaz no tratamento da dengue, o Ministério da Saúde brasileiro vem, oficialmente, adotando programas verticais de controle da Dengue e em 2002 foi instituído o Programa Nacional de Controle de Dengue (PNCD), que tem por base a de eliminar o mosquito através de inseticidas/ larvicidas.

A utilização de inseticidas químicos é a medida atual de maior eficiência tomada contra larvas e mosquitos adultos para evitar o alastramento das epidemias. Contrapartida o uso de produtos químicos como os organofosforados e piretróides expõem os seres humanos a sua ação tóxica, com repercussões de longo prazo para a saúde, com difícil e custosa investigação epidemiológica (hipersensibilizantes, imunotóxicos, neurotóxicos, carcinogênicos e disruptores endócrinos)(FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAUDE, 2002).

3.4. Marcadores Moleculares

Com o aprimoramento da biotecnologia estudos começam a introduzir a utilização de caracteres moleculares para caracterização de uma espécie, ou de suas populações, e com isso, encontrar uma forma mais efetiva de controle da dengue (CALADO, 2005).

Os Marcadores Moleculares tornaram-se um parâmetro comum para medir as diferenças genéticas entre indivíduos ou dentro e entre espécies relacionadas às populações (BEHURA, 2006). Atualmente, existe uma série destes, sendo utilizados para diversos fins, como filogenia, ecologia e dinâmica populacional (SABATINI, 2003).

Os Marcadores moleculares são segmentos de DNA que estão ligados a locus que determinam características de interesse (ALZATE-MARIN et. al, 2005). Estes são entidades

herdáveis que seguem os padrões de herança mendeliana e são importantes ferramentas no estudo sobre a variação genética (SCHULMAN et al., 2004).

Segundo Brown et. al, 1996 o uso de marcadores moleculares foi largamente aceito como ferramenta para o melhoramento, estudos evolutivos e conservação. Botstein et. al (1980) relata que RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foram os primeiros marcadores desenvolvidos e utilizados na avaliação da variação genética entre organismos.

Behura et. al (2006) menciona que os Marcadores com mtDNA, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) tem sido utilizados em estudo de população de insetos. Os SSRs (*Simple Sequence Repeats*) são trechos de DNA contendo repetições em *tandem*, unidades distribuídas por todo genoma, estes se tornaram marcadores padrões para a análise do genoma tanto de plantas como dos animais (CONNELL et. al, 1998).

PCR (*Polymerase Chain Reactions*) permite realizar estudos moleculares envolvendo grande número de indivíduos em qualquer fase do seu desenvolvimento, desde que haja quantidade suficiente de DNA para análise. Esta técnica permite a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um fragmento sintético de DNA de tamanho definido a partir do DNA de amostras biológicas, também chamadas DNA molde (BORÉM & SANTOS, 2004).

Microssatélites são regiões do genoma dos organismos eucariontes constituídas de 2 a 5 nucleotídeos em cadeia, e estão distribuídos aleatoriamente no genoma, em uma densidade aproximada de 1 a cada 10 a 15kb, dependendo da espécie. Estas regiões são caracterizadas por um alto grau polimórfico (taxa de mutação estimada em 10^{-2} a 10^{-3} por locus por gameta por geração) no que diz respeito ao número destas repetições. Este polimorfismo tem consequências importantes, como a geração de alelos polimórficos que podem ser utilizados em estudos genéticos populacionais, em sistemática e no mapeamento genômico. (SABATINI, 2003)

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de *Aedes aegypti*

A coleta foi realizada no mês de fevereiro nos bairros do Catolé e José Pinheiro, em Campina Grande, PB. Em cada bairro foram delimitados cinco pontos de coleta, onde foram instaladas 90 armadilhas para coleta de ovos (ovitrap), sendo nove armadilhas por ponto distribuídas no intra e Peri domicílio. As armadilhas foram recolhidas após três dias da instalação, e o material coletado, acondicionado em caixas térmicas de isopor e trazido para o laboratório para a quantificação do número de ovos e identificação da espécie (Figura 2).

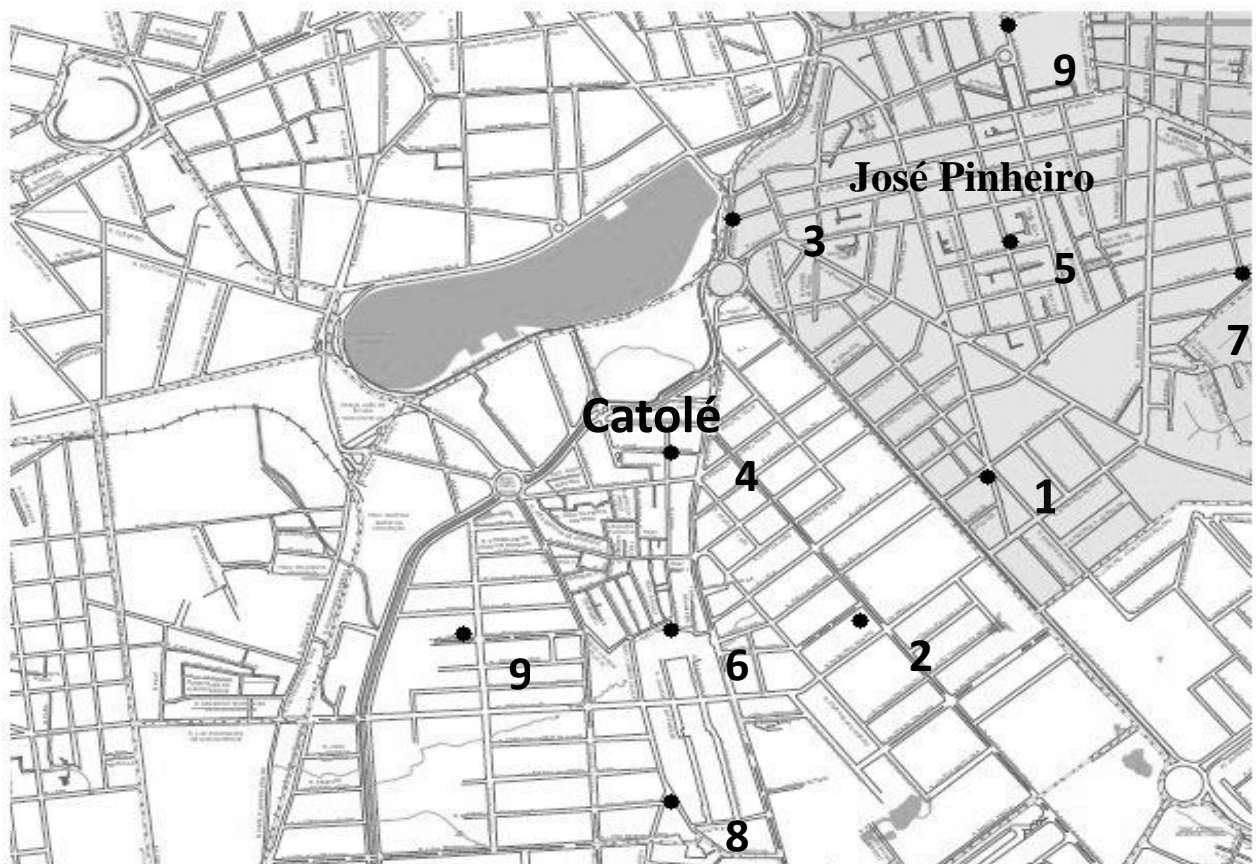


Figura 2: Mapa ilustrativo da distribuição dos pontos de coleta nos bairros do Catolé e José Pinheiro. Os pontos negros correspondem às áreas de coleta.

4.2. Criação e identificação de *A. aegypti* em laboratório

No laboratório de Entomologia do Núcleo de Bioecologia e Sistemática de Insetos da Universidade Estadual da Paraíba as palhetas contendo os ovos foram colocadas para secar por um período de 48 horas, sendo em seguida, acondicionados em bandejas plásticas de cor

branca medindo 40 x 40 x 7,5 cm com um terço de sua capacidade preenchida com água destilada. Após a eclosão das larvas foi ofertada ração para peixe ornamental (*Alcon/goldfish* crescimento) na proporção de 100 mg/bandeja.

Após a mudança de estágio, as pupas foram sexadas e transferidas para copos descartáveis de 250 ml e colocados em gaiolas até atingirem a fase adulta. Para a identificação do mosquito utilizou-se a chave dicotômica contida em Forattini (2002) e Rueda (2004).

4.3. Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada no laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário Alcides Carneiro utilizando o *Kit Promega, Wizard Genomic DNA Purification* seguindo as recomendações do fabricante. .

Inicialmente, cada inseto foi macerado individualmente em 200 µl de tampão (solução de quebra nucléica) em seguida homogeneizado por 10 segundos. Posteriormente foi adicionado em cada amostra 6µl de proteinase k 20mg/ml e homogeneizado por inversão por 2 minutos, seguido de incubação por 1 hora a 55 °C.

Para a lise e precipitação de proteínas foi adicionado 1µl de *RNase Solution* e incubada por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 66 µl de *Protein precipitation solution*, homogenizado e colocado no gelo por 5 minutos. Após centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 300µl de isopropanol em temperatura ambiente e homogeneizado por inversão antes de centrifugar a 13.000 rpm por 20 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi homogenizado em 300 µl de etanol 70% a 4 °C, e novamente centrifugado por 20 minutos a 13.000 rpm.

O etanol foi removido completamente antes da re-hidratação do DNA em 30 µl de *DNA Rehydration Solution* a 4°C *overnight*, e posteriormente armazenado à -20 °C.

4.4 Amplificações de microssatélites

Para a amplificação das 100 amostras, foram utilizados 3 *primers*, AC-1, T-9 e AC-2, e otimizado para as condições de amplificação e eletroforese utilizadas no laboratório de Entomologia da UEPB.

As reações para amplificação de microssatélites foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 1µL de DNA genômico, 15.45µL de água miliQ, 2.5 µL de tampão *buffer*10x (10 mM Tris HCl, pH 8,3, 50 mM KCl), 1.25 µL de MgCl₂, 1 µL de cada *primer*,

2.5µL de dNTP e 0.3 µL de *Taq* DNA polimerase.

Para amplificação, as reações foram submetidas as seguintes condições: desnaturação à 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos compostos por uma desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento à 36°C por 1 minuto e uma extensão de 72°C por 2 minutos, seguida de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.5. Eletroforese

4.5.1. Preparação do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida 6% foi preparado utilizando-se 15 mL de solução acrilamida-bisacrilamida (40%), contendo uréia (7M), foi adicionado 300µL de persulfato de amônia (10 %) e 30µL de TEMED (N,N,N',N' – Tetrametileno diamino). Após o preparo a solução foi homogeneizada e distribuída entre as placas de vidro de forma sucessiva e rápida, evitando assim, a formação de bolhas de ar. Em seguida, foi inserido um pente para formação dos poços, sendo aguardando 40 minutos até a polimerização do gel.

4.5.2. Preparo das amostrase Eletroforese

Antes da separação eletroforética, 4µL de cada PCR, foram homogenizados com 6µL de tampão de carregamento (formamida 95%, azul de bromofenol 0,05% e EDTA 0,5 M), seguidos por 5 minutos de desnaturação a 95 °C conservado em gelo até a aplicação no gel de poliacrilamida. Após a polimerização, o pente foi removido e o gel inserido em uma cuba de eletroforese vertical contendo TBE 1x. Antes da aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma pré-corrída de aproximadamente 50 minutos a uma potência de 20W. Em seguida, 9µL de cada amostra foi aplicada nos poços. Foi utilizado um marcador molecular (*ladder*) de 100 pb. Sendo utilizado como padrão para caracterizar o tamanho dos fragmentos amplificados. A corrida eletroforética foi realizada em temperatura de 2°C por duas horas a uma potência de 20 W e 300 U, para a separação dos fragmentos.

4.5.4 Revelação do gel

A visualização dos fragmentos após eletroforese seguiu o método de coloração com

nitrate de prata (CRESTE et al, 2001). Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma bandeja e submerso em solução de fixação contendo álcool etanol 10% e ácido acético 1% (fixação), mantido sob lenta agitação por 10 minutos. Logo Após, o gel foi transferido para outra bandeja com solução de 25 g de nitrato de prata em 250 ml de água miliQ para a coloração dos fragmentos por 10 min sob agitação. A revelação foi realizada em solução de 150 mL de Hidróxido de Sódio e 150µL de formaldeído em 250 mL de água destilada miliQ, mantido sob lenta agitação até que as bandas pudessem ser visualizadas. Para a captura das imagens, foi utilizada máquina fotográfica. A conservação do gel foi feita com a solução de fixação e reservadas em depósitos de vidro dentro do refrigerador por uma semana.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises de dados

O perfil eletroforético de cada amostra foi analisado considerando como referencia a migração do marcador de peso molecular.

Através da visualização dos géis, os dados foram inseridos no Microsoft Excel, atribuindo-se o símbolo 1 para o alelo mais denso, 2 para o alelo intermediário e 3 para o alelo que mais havia corrido em cada locus dos pares de *primers* estudados (Figura 3). Os dados foram submetidos ao programa GenAlEx 6.5 (*Genetic Analysis in Excel*) para criar o comparativo gráfico.

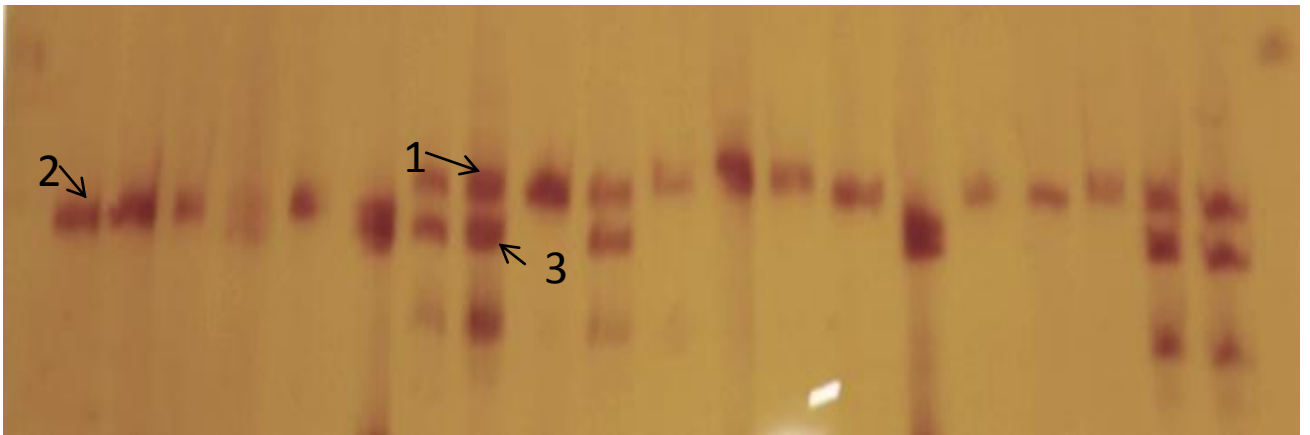


Figura 3: Gel de poliacrilamida 6% após a corrida eletroforética e revelação; amostras da população C2 com a utilização do *primer* AC-2.

5.2. Caracterização da variabilidade Genética

O estudo da variação genética em populações naturais de uma espécie envolve duas questões básicas: quantificar a variabilidade dentro das populações e caracterizar a estrutura genética entre as populações (CONTE, 2004).

Cada marcador microssatélite utilizado amplifica um locus gênico. O *primer* A-1 amplifica o locus1, o AC-2 amplifica o locus 2 e o CT-2 amplifica o locus 3.

Ao analisar a variação alélica em nível de porcentagem das populações em questão José Pinheiro (subpopulações J-1, J-3, J-5, J-7, J-9) e Catolé (subpopulações C-2, C-4, C-6, C-8, C-9), em todos os 3 loci considera-se que há maior polimorfismo no alelo1 por apresentar maior valor de frequência e menor no alelo 3 por possuírem valores mais baixos e parecer ausente no locus 3 (Figura 4).

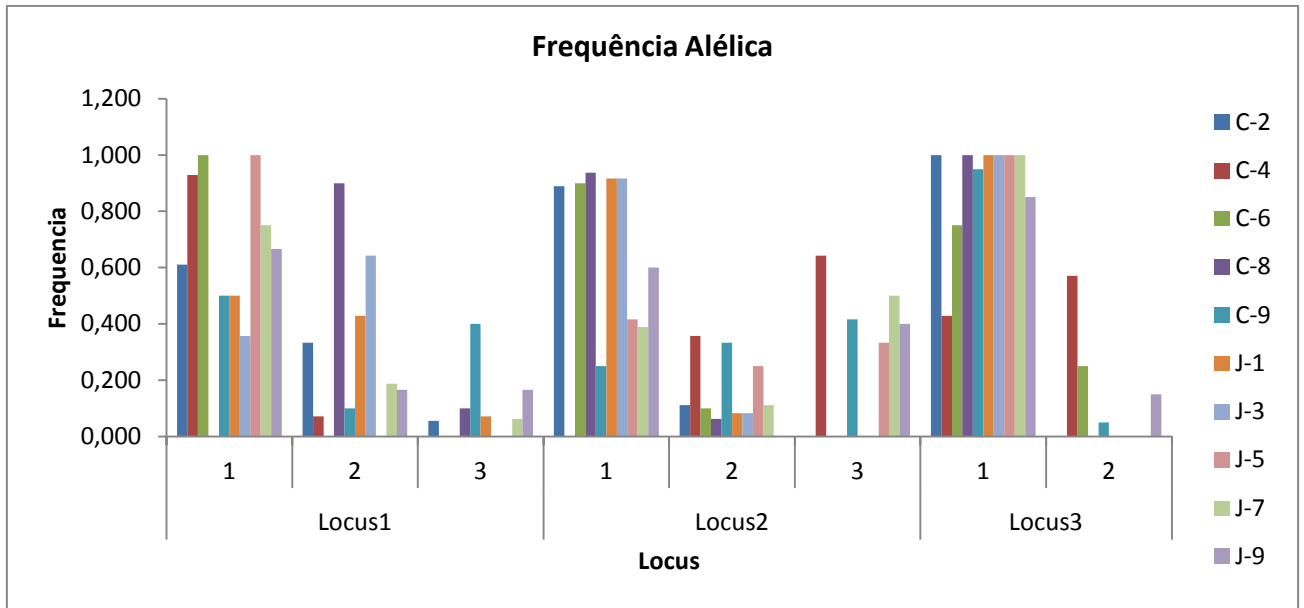


Figura 4: Frequência alélica dos pontos C-2, C-4, C-6, C-8, C-9, J-1, J-3, J-5, J-7, J-9 representado por cores nos três loci presentes.

No locus 1(L1) (Figura 5) a população do Catolé apresentou 61% de frequência do alelo 1, 28% do alelo 2 e 11% do alelo 3. Valores aproximados da população do José Pinheiro, com valores de frequência igual a 65% do alelo 1, 29 do alelo 2 e 6% do alelo 3.

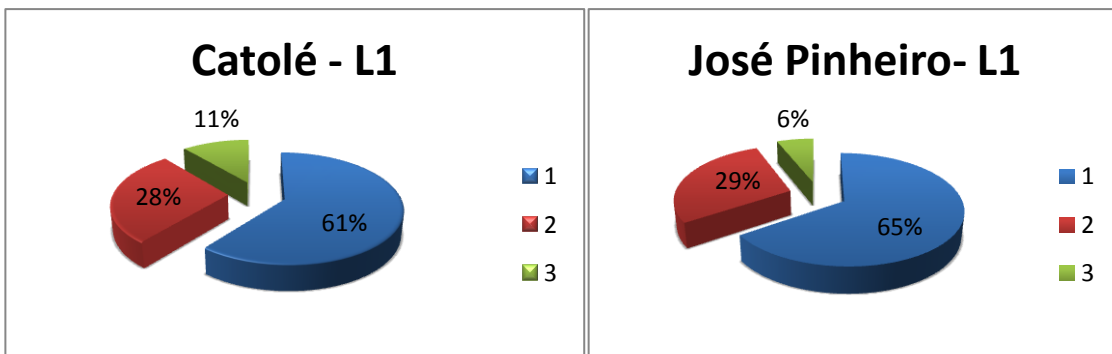


Figura 5: Frequência alélica do locus 1 (L1) representada em porcentagem dos bairros Catolé e José Pinheiro.

No locus2 (L2) ao comparar os valores em relação ao locus 1, pode ser observado um aumento percentual da frequência do alelo 3. No catolé com 10% acréscimos somando 21% do alelo 3, e no José Pinheiro com o valor de 25% para o mesmo alelo (Figura 6). O padrão obtido para as duas populações são semelhantes quanto as frequências para o locus 2.

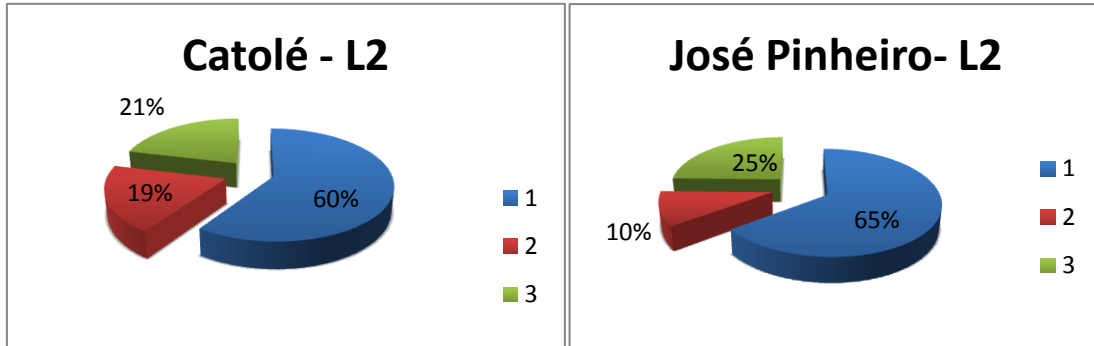


Figura 6: Frequência alélica do locus 2 (L2) representada em porcentagem dos bairros Catolé e José Pinheiro

Ao observar a Figura 7, nota-se que a frequência alélica do locus 3 (L3) é pouco variante, sendo predominante o alelo 1, no Catolé com 83% e no José Pinheiro com 97%, o terceiro alelo não aparece na estatística em ambas populações. O valor elevado da frequência de apenas um alelo (alelo 1) nos apresenta homozigotos em maior proporção que nos demais locos. O padrão das duas populações mostrou-se novamente bem semelhantes.

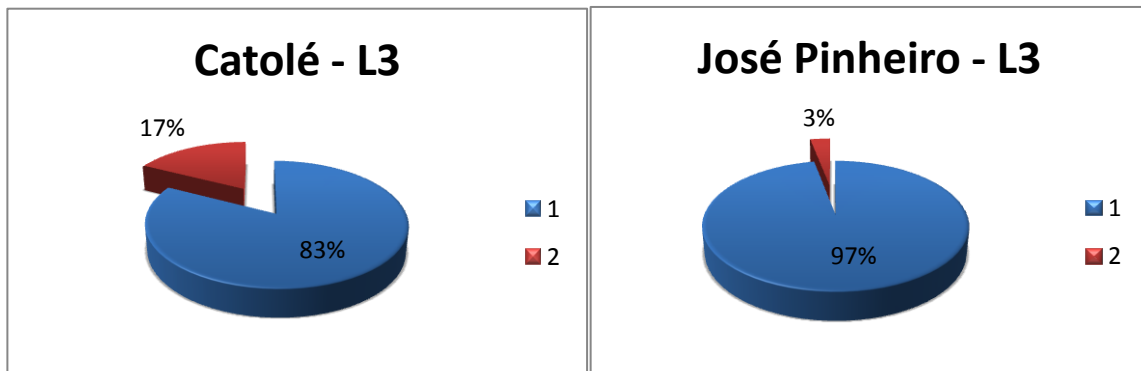


Figura 7: Frequência alélica do locus 3 (L3) representada em porcentagem nos bairros Catolé e José Pinheiro.

É possível aferir a partir dos dados dispostos em análise, que o tamanho das populações é pequeno, porém o comparativo entre a heterozigose média observada (H_o) revela um aumento em relação a heterozigose média esperada (H_e), com exceção das populações J-3 e J-9.

A população C-9 apresentou maior heterozigosidade média, de valor igual a 0,578. A heterozigose observada (H_o) na população C-8 teve menor valor em relação as outras populações, 0,186, apesar de obter um aumento em relação ao valor esperado da heterozigose, H_e 0,108 (Tabela 1). Segundo Moreira (2007), quando o tamanho da população (N_e) é pequeno, mesmo em cruzamentos totalmente ao acaso, uma diminuição de heterozigosos pode ocorrer.

O índice de fixação (F) proposto por Whight (1965) é considerado como o coeficiente de endogamia. O seu valor é estimado a partir da razão entre a heterozigose observada e esperada.

$$F = 1 - (H_o/H_e)$$

As maiorias das populações apresentaram baixo índice de fixação, o menor índice refere-se a população C-4 com valor -0,461, a população C-2 apresentou fixação muito alta, valor igual a 0,675 e em segundo lugar a população J-9 com índice de 0,108. Oliveira, et al. (2006) diz que esse índice de fixação elevado na população pode ser proveniente à ocorrência da deriva genética por efeito de gargalo, devido à redução aleatória no tamanho da população ou estar associado ao aumento intenso do parentesco na mesma.

Outra causa pode ser considerada, o efeito de fundação ocorrido na ocasião de povoamento da área. A fundação da população a partir de poucos indivíduos provoca aumento no índice de fixação, por consequência da endogamia.

Tabela 1: Valores médios dos 3locus de cada população. N= Número amostral da população; Na = número de alelos; Ne= número de alelos efetivos;I= indicador; Ho= Heterozigosidade observada; He= Heterozigosidade esperada; UHe = Heterozigosidade esperada imparcial; F= Índice de fixação

| População | N | Na | Ne | I | Ho | He | UHe | F |
|------------------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|------------|----------|
| C-2 | 9,333 | 2,000 | 1,432 | 0,392 | 0,111 | 0,237 | 0,251 | 0,675 |
| C-4 | 7,000 | 2,000 | 1,654 | 0,531 | 0,571 | 0,361 | 0,388 | -0,461 |
| C-6 | 5,667 | 1,667 | 1,273 | 0,296 | 0,233 | 0,185 | 0,203 | -0,222 |
| C-8 | 7,667 | 1,667 | 1,117 | 0,186 | 0,108 | 0,099 | 0,108 | -0,089 |
| C-9 | 7,000 | 2,667 | 2,122 | 0,740 | 0,578 | 0,443 | 0,486 | -0,236 |
| J-1 | 7,333 | 2,000 | 1,486 | 0,395 | 0,294 | 0,238 | 0,257 | -0,182 |
| J-3 | 7,667 | 1,667 | 1,343 | 0,313 | 0,198 | 0,204 | 0,220 | -0,012 |
| J-5 | 6,000 | 1,667 | 1,627 | 0,359 | 0,222 | 0,218 | 0,237 | -0,021 |
| J-7 | 9,000 | 2,333 | 1,693 | 0,554 | 0,375 | 0,328 | 0,349 | -0,009 |
| J-9 | 7,000 | 2,333 | 1,755 | 0,654 | 0,344 | 0,412 | 0,449 | 0,108 |

Os valores da frequência alélica e do número de heterozigotos da tabela 1 servem de subsídio para a construção da matrix de fixação ou divergência genética entre as populações através da fórmula:

$$F_{st} = (Ht - He) / Ht$$

Os níveis de diferenciação genética das populações (F_{st}) consiste na média dos pares aleatórios de cromossomos na população em estudo, considerados essas de subpopulações. Os dados de frequência das subpopulações foram calculados aos pares e variam de 0 a 1 (Tabela 2). Quando o valor de F_{st} é igual a um, a população está estruturada e provavelmente não ocorre fluxo gênico, podendo ser considerada uma população isolada. Quando é aproximado à zero, as populações têm frequência alélica idêntica.

As estatísticas F foram adaptadas por Nei (1977) para locus multialélicos através do conceito de heterosigosidade observada e esperada tornando exclusivos os desvios existentes aos efeitos da deriva genética e do sistema de reprodução (CONTE, 2004).

Os geneticistas populacionais têm utilizado a técnica com a medida do grau de estrutura de uma população para casos mais específicos. Populações estruturadas geralmente mostram equilíbrio dinâmico entre fatores que favorecem a diferenciação (mutação, deriva e seleção natural direcional ou disruptiva, diferente em cada área) e fatores homogeneizadores (migração e seleção natural balanceada ou diferencial, uniforme em cada área) (SOLÉ-CAVA 2001).

Tabela 2: Matriz da média dos valores do índice de fixação (F_{st}) descrito por Wright (1951). Em negrito os valores de maior e menor frequência alélica.

| Matriz de valores F_{st} da população | | | | | | | | | |
|---|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| C-2 | C-4 | C-6 | C-8 | C-9 | J-1 | J-3 | J-5 | J-7 | J-9 |
| 0,000 | | | | | | | | | C-2 |
| 0,336 | 0,000 | | | | | | | | C-4 |
| 0,116 | 0,215 | 0,000 | | | | | | | C-6 |
| 0,171 | 0,553 | 0,327 | 0,000 | | | | | | C-8 |
| 0,125 | 0,187 | 0,208 | 0,245 | 0,000 | | | | | C-9 |
| 0,006 | 0,369 | 0,142 | 0,122 | 0,136 | 0,000 | | | | J-1 |
| 0,040 | 0,425 | 0,206 | 0,070 | 0,170 | 0,017 | 0,000 | | | J-3 |
| 0,189 | 0,183 | 0,162 | 0,524 | 0,102 | 0,238 | 0,334 | 0,000 | | J-5 |
| 0,132 | 0,181 | 0,169 | 0,382 | 0,047 | 0,161 | 0,220 | 0,066 | 0,000 | J-7 |
| 0,087 | 0,165 | 0,108 | 0,230 | 0,053 | 0,101 | 0,137 | 0,089 | 0,041 | 0,000 J-9 |

O dendograma é uma representação gráfica em forma de árvore (*Tree Clustering*) que expressa a estrutura dos agrupamentos. O método de agrupamento do dendograma é aglomerativo hierárquico (VALE, 2005) (Figura 8).

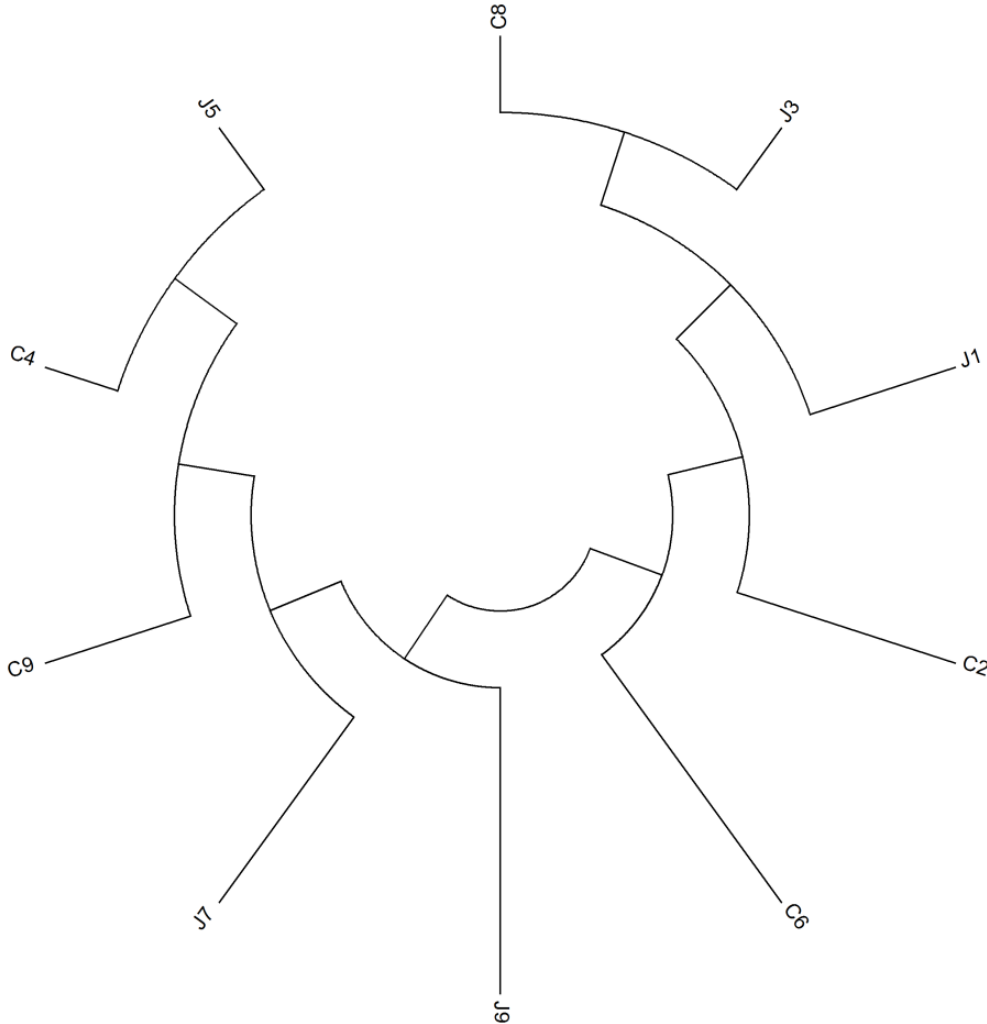


Figura 8: Dendrograma circular de agrupamento das subpopulações do *Aedes aegyptinus* bairros do Catolé e José Pinheiro utilizando do índice de fixação alélica F_{st}

Observa-se na tabela 2, que por apresentar menores valores de distanciamento, as subpopulações C-2 e J-1 apresentam-se como agrupamentos de maior similaridade (Figura 8) com o índice de fixação de 0,006. Segundo McManus et.al. (2011), F_{st} com valores entre 0-0,05 são indicativos de pouca diferenciação genética tendo assim uma frequência alélica considerada idêntica entre elas.

Logo em seguida, a maior proximidade de J1 ocorre com a população J-3 possuindo F_{st} igual a 0.017, é observado dendograma a similaridade entre as duas populações.

Há um fluxo gênico entre as populações e dentro das mesmas, a que apresentou maior fluxo são as populações J-1 e C-2, uma hipótese é que o alto fluxo gênico de algumas subpopulações tenha ocorrido por endogamia e proximidade geográfica. Uma vantagem para a aplicação de um método efetivo na elaboração de um controle para o vetor.

Em contrapartida obteve-se entre algumas subpopulações, um índice de fixação maior, se destacando C4 e C8 como valor igual a 0,553. Valores do F_{st} acima de 0,25 são considerados níveis altos de diferenciação.

Oliveira, et al (2006), observou através do estudo genético com *Caesalpiniae chinata* (Lam), maior fixação de F_{st} 0,212, tal índice revelam que as populações podem estar isoladas. Já a diversidade observada das populações considerada alta ($F_{st} = 0,788$) mostram que a diversidade mantida entre populações ocorre em função de processos evolutivos recentes (LEE et al., 2002)

McManus et. al. (2011) afirma que segundo Wright (1940), rápidos ciclos de extinção e colonização afetam a estrutura genética de populações, onde frequentes eventos de fundação (*founder events*) podem ser responsáveis pelo aumento do valor de F_{st} . A competição intra-específica faculta ser um fator responsável para o fluxo gênico menor, a fim de regular a população mais propícia às características locais.

6. CONCLUSÃO

Com o estudo realizado, foi possível inferir uma real existência de fluxo gênico entre as populações amostrais. Efeitos gargalo são supostos ao observar valores altos da F_{st} , o que nos leva a confirmar que a ação humana é responsável por uma seleção de características resistentes do Culicidae *Aedes aegypti*.

As técnicas de Eletroforese utilizadas são ferramentas importantes para o estudo de acontecimentos microevolutivos ou em regiões pouco distantes, essa técnica nos oferece resultados da variabilidade genética que somadas ao estudo da adaptação e comportamento de sobrevivência dos indivíduos possibilita adquirir resultados mais precisos para o controle efetivo do vetor em questão.

REFERÊNCIAS

- BARATA, E. A. M. F., COSTA, A. I. P., et al. **Aedes aegypti (L.) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil**. Rev Saúde Publica São Paulo- 2001; 35:237-242
- BESERRA, E.B. et al. **Resistência de *Aedes aegypti*(L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado Temefós na Paraíba** . Neotropical Entomology; v. 36, n. 2. 2007. p303-307
- BISSET J.A. **Uso correcto de insecticidas: control de La resistencia**. Revista Cubana de Medicina Tropical 2002;54(3):202-219.
- BRAGA, I. A., VALLE, D.. ***Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência**. Epidemiologia serv. Saúde. Brasília, DF. 2007.
- COELHO, G. E. **Dengue: Situação atual e desafios**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2008; Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal>>Acessado 10 de abril de 2011.
- CONTE, R. **Estrutura Genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. Submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites**.tese (doutorado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- Piracicaba, 2004.
- CUNHA, S. P. et al. **Presence of *Aedes aegypti* in Bromeliaceae and plant breeding places in Brazil**. Rev. de Saúde Pública. São Paulo: 2002.
- DONALÍSIO, M. R; GLASSER, C.M. **Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue**. Revista Brasileira de Epidemiologia. São Paulo, v. 5 n.3. Dec. 2002.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. **Informe epidemiológico do SUS**. ISSN 0104-1673 Volume 8 - Nº 4 Out/Dez 2002.
- GUEDES, D. R. D. **Análise da competência vetorial para o vírus dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco**, Tese (doutorado em saúde pública)- Recife: s. n., 2012. 101 p.
- HAWKES, N. J.; HEMINGWAY, J. **Analysis of the promoters for the α -esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinque fuscatus***. Acta, v. 1574, p. 51-62, 2002.
- HEMINGWAY, J. **The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of Insecticide resistance**. *InsectBiochem. Mol. Biol.*, v. 30, p. 1009-1015, 2000
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. 1ªed. São Paulo, Atheneu, 2001. 435pp.

HUBER, K. et. al. **Short report: microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 61(6), pp. 1001–1003, 1999.

MCMANUS, C., PAIVA, S. et. al. **Estatísticas para descrever Genética de Populações.** INC, Serie técnica: Genética. Brasília- DF, p.50, Jan. 2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação da Dengue no Brasil – 2007.** Disponível em:<<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue1203.pdf>> acessada 20 de fevereiro de 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **O agente comunitário de saúde no controle da dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde.** – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

MOREIRA, A. A. ; MOREIRA, H.L.M.; HILSDORF, A.W.S. **Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.42, n.4, p.521-526, Abr. 2007

MÜLLER, G. A., MARCONDES, C. B., SILVA, M. A. N.. **Aplicação de marcadores microssatélites para o estudo de Culicidae (Diptera): revisão com especial referência a *Haemagogus*.** Bol Mal Salud Amb v.50 n.2 Maracay dez. 2010

NELSON, MJ. ***Aedes aegypti*: biologia y ecologia.** Washington, DC, Organización Panamericana de La Salud; 1986.

OLIVEIRA, A. M. de, SILVA, E. F., MOLICA, S. G. **Diversidade e estrutura genética em populações de *Caesalpinia chinata* (Lam.) na Estação Ecológica do Tapacurá, PE.** Ver. Scientia Forestais.n. 70, p. 77-83, abril 2006

ORGANIZACIÓN Panamericana de La Salud. **Dengue y dengue hemorrágico em las Américas: guías para suprevención y control.** Washington, DC: OPS; 1995.

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.** Fundação Oswaldo Cruz/ Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, PE, 2006.

RETNAKARAN, A.; KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology,** Insect Growth Regulator.v.12, Pergamon Press, p. 529-601, 1985.

RODRIGUES, M. M. et al. **Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba.** Revista Cubana de Medicina Tropical51:83-88, 1999.

ROSE R.I. **Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management.** Emerging Infectious Diseases 2001;7(1):17-23.

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

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Informe Epidemiológico da Dengue
Análise de situação e tendências - 2011.**

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Epidemiológico da
Dengue Análise de situação e tendências - 2013.**

VALE, M. N. **Agrupamentos de dados : avaliação de métodos e desenvolvimento de
aplicativo para análise de grupos** – Rio de Janeiro : PUC, Departamento de Engenharia
Elétrica, 2005.

VIEGAS Jr. C. **Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle
químico de insetos.** Araraquara – SP Quim. Nova, Vol. 26, No. 3, 390-400, 2003