

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

SUZANE ALVES DOS SANTOS

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE MOSQUITOS DAS ESPÉCIES  
*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* NO MUNICÍPIO DE SÃO LOURENÇO DA MATA:  
UMA ÁREA COMPOSTA POR DIFERENTES ESTRATOS AMBIENTAIS E  
VARIAÇÕES NOS FATORES ECOLÓGICOS

RECIFE

2017

Suzane Alves dos Santos

Análise da variabilidade genética de mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de São Lourenço da Mata: uma área composta por diferentes estratos ambientais e variações nos fatores ecológicos

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Orientadora: Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa

Coorientador: Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva

RECIFE

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- S237a Santos, Suzane Alves dos.  
Análise da variabilidade genética de mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de São Lourenço da Mata: uma área composta por diferentes estratos ambientais e variações nos fatores ecológicos / Suzane Alves dos Santos. - Recife: [s.n.], 2017.  
65 p.: ilus., tab., graf.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017  
Orientadora: Rosângela Maria Rodrigues Barbosa  
Coorientador: Marcelo Henrique Santos Paiva.
1. *Aedes*. 2. Estrutura genética. 3. Urbanização. I. Barbosa, Rosângela Maria Rodrigues. II. Paiva, Marcelo Henrique Santos. III. Título.

---

CDU 616.92

Suzane Alves dos Santos

Análise da variabilidade genética de mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de São Lourenço da Mata: uma área composta por diferentes estratos ambientais e variações nos fatores ecológicos

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Aprovado em: 22 / 02 / 2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Rosângela Maria Rodrigues Barbosa  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

---

Dr. Antônio Mauro Rezende  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

---

Dra. Cleide Ribeiro de Albuquerque  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me permitiu todos os dias, durante esses dois anos, ter condições de desenvolver este trabalho da melhor forma que poderia ter sido.

À minha família amada, painho, mainha e Gabi, por todo apoio, compreensão e afago que me deram em todos os momentos de vitória e dificuldades nessa caminhada. Vocês são e sempre serão minha base e a minha força.

Ao Paulo pela compreensão, carinho, força, “puxões de orelha”, por ter dividido mesmo comigo todo esse mestrado. A pessoa que estava do meu lado em todos os momentos, até nas madrugadas inteiras de análises de resultados, que foi quase um orientador fora do Aggeu, muito obrigada amor.

À Dra. Rosângela Barbosa, minha orientadora, por acreditar em meu trabalho, pela paciência, pelo apoio, pela calma para resolver as broncas que surgiam, por estar sempre disposta a me ajudar em tudo que fosse preciso para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada, sua orientação e sua presença em minha caminhada profissional foram essenciais.

Ao Dr. Marcelo Paiva, meu coorientador, por ser parceiro e estar sempre presente em todos os momentos de desenvolvimento deste trabalho, em campo, insetário, na bancada no laboratório, no ensino das ferramentas de bioinformática, nas análises de resultados. Obrigada por todo o apoio, dedicação, paciência, por acreditar em mim e no meu trabalho. Obrigada por todo o conhecimento que me transmitiu, aprendi demais com você e sou admiradora de seu trabalho. Sua orientação e sua presença em minha caminhada profissional foram extremamente importantes. Obrigada!!

À Dra. Duschinka Guedes pela força nos momentos de dúvida, pelo conhecimento transmitido, pela paciência, valeu Duka!

Ao pessoal do Insetário, em especial Morgana, Carlos, Ana, Elisângela, Eliane, que ajudaram na concretização deste trabalho e a descontrair um pouco na rotina.

A equipe de Campo, Ribeiro, Iron e Rodrigo, sem os quais não haveria material para trabalhar e, portanto, foram essenciais para que eu chegasse até aqui, obrigada meninos!

As minhas queridas Pupas, com as quais compartilhei as alegrias e tristezas dos experimentos no laboratório, congressos, as aflições com os prazos nossos de cada dia, sem as quais não seria possível suportar a rotina intensa de trabalho. Nossos momentos de descontração foram sempre os melhores. Obrigada pela parceria pupinhas!

Agradeço em especial a uma pupa, Emanuel Holanda, com quem compartilhei a experiência de ser mestrando. Compartilhamos as vitórias, estresses, deadlines, viagens para fazer cursos, congressos, palestras que ministramos, compartilhamos aprendizado, nos ajudamos a fazer nossos experimentos, compartilhamos as análises de resultados noite adentro no laboratório. Compartilhamos também a vida, obrigada meu amigo por tudo!

Ao departamento de Entomologia e a todas as pessoas que o compõe que direta ou indiretamente ajudaram na concretização desse trabalho.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz por toda a infraestrutura, que possibilitou o desenvolvimento do meu trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro, que foi de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho.

E por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e fizeram parte direta ou indiretamente da concretização desse objetivo de vida, me tornar mestre.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ”*

**(Arthur Schopenhauer)**

SANTOS, S. A. **Análise da variabilidade genética de mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de São Lourenço da Mata:** uma área composta por diferentes estratos ambientais e variações nos fatores ecológicos. 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

## RESUMO

Mosquitos do gênero *Aedes* são implicados na transmissão de várias doenças infecciosas. Aspectos como dinâmica populacional, estrutura e diversidade genética de populações de mosquitos são importantes para auxiliar no desenvolvimento de ferramentas mais eficientes de monitoramento e controle vetorial. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a estrutura genética das espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* em São Lourenço da Mata (SLM). As coletas de ovos foram realizadas em três áreas: Arena Pernambuco (AP); Obra de Maria (OM) e Parque Capibaribe (PC), e ocorreram em dois períodos distintos, separados por um ano. As larvas foram mantidas no insetário até a emergência dos insetos adultos e estes foram identificados por taxonomia clássica. Em seguida foram submetidos individualmente à extração de DNA, PCR para amplificar fragmentos dos genes mitocondriais COI e ND5 e sequenciamento. As coletas revelaram maior abundância da espécie *A. albopictus* nas áreas de AP e OM, e prevalência de *A. aegypti* em PC. A análise do número de haplótipos e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de COI para *A. albopictus* revelou uma diminuição desses índices ao longo dos dois anos do estudo. Por outro lado, o número de haplótipos e  $\pi$  de ND5 em SLM não sofreram variação entre os dois anos. Resultados similares foram observados para COI em *A. aegypti*, com exceção do número de haplótipos e  $\pi$  de ND5 que aumentaram em um ano. Os testes de neutralidade demonstram que, em geral, há uma expansão populacional do gênero *Aedes* em SLM, cujos marcadores não estão sob efeito de seleção. Os dados de índice de fixação ( $F_{ST}$ ) para *A. albopictus* indicaram diminuição significativa da diferenciação genética na comparação entre os dois anos. Enquanto que os dados de  $F_{ST}$  para *A. aegypti* demonstraram moderada divergência. Os resultados obtidos sugerem que as populações de *A. albopictus* e *A. aegypti* de SLM apresentam atualmente baixa diferenciação genética, quando comparadas ao período de coleta anterior.

**Palavras chave:** *Aedes*. Estrutura genética. Urbanização.



SANTOS, S. A. **Genetic variability analysis of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes in the São Lourenço da Mata city:** an area composed of different environmental strata and variables of ecological factors. 2017. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2017.

### ABSTRACT

Mosquitoes of the *Aedes* genus are implicated in the transmission of various infectious diseases. Aspects such as population dynamics, structure and genetic diversity of mosquito populations are important to assist the development of more efficient monitoring and vector control tools. This study had as the main goal to evaluate the genetic structure of *A. aegypti* and *A. albopictus* species in S. Lourenço da Mata (SLM). The egg collections were done in three areas: Pernambuco Arena (PA); Obra de Maria (OM) and Capibaribe Park (CP), and occurred in two distinct periods, separated by a year. The larvae were kept in the cage until surfaced the adult insects and these were identified by classical taxonomy. Then they were individually subjected to DNA extraction, PCR to amplify fragments of the mitochondrial genes COI and ND5 and sequencing. The collections showed greater abundance of the *A. albopictus* species in the PA and OM areas, and supremacy of *A. aegypti* in CP. The analysis of the number of haplotypes and nucleotide diversity ( $\pi$ ) of COI for *A. albopictus* revealed a decrease in these indexes all over the two years of this review. On the other hand, the number of haplotypes and  $\pi$  of ND5 in SLM did not change in two years. Similar results were observed for COI in *A. aegypti*, except for the number of haplotypes and  $\pi$  of ND5 that increased in one year. The neutrality tests show that, in general, there is a population expansion of the *Aedes* genus in SLM, whose markers are not under selection effect. Fixed index ( $F_{ST}$ ) data for *A. albopictus* indicated a significant decrease in genetic differentiation in the two years proportion. While the  $F_{ST}$  data for *A. aegypti* showed moderate divergence. The results obtained suggest that the *A. albopictus* and *A. aegypti* populations of SLM introduce low genetic differentiation when compared to the previous collection period.

**Keywords:** *Aedes*. Genetic structure. Urbanization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mosquitos do gênero <i>Aedes</i> .	16
<b>Figura 2</b>	Ciclo biológico das espécies do gênero <i>Aedes</i> .	17
<b>Figura 3</b>	Fêmea da espécie <i>A. aegypti</i> .	18
<b>Figura 4</b>	Fêmea da espécie <i>A. albopictus</i> .	19
<b>Figura 5</b>	Organização do DNA mitocondrial com genes codificantes e região controle.	23
<b>Figura 6</b>	Mapa ilustrativo do município de São Lourenço da Mata e regiões circunvizinhas.	31
<b>Figura 7</b>	Imagem de ovitrampa utilizada na coleta de ovos do gênero <i>Aedes</i> .	32
<b>Figura 8</b>	Perfil de bandas da reação de PCR utilizando <i>primers</i> do gene COI.	38
<b>Figura 9</b>	Perfil de bandas da reação de PCR utilizando <i>primers</i> do gene ND5.	38
<b>Figura 10</b>	Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI (2014-2015) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de <i>A. albopictus</i> .	41
<b>Figura 11</b>	Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI (2015-2016) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de <i>A. albopictus</i> .	42
<b>Figura 12</b>	Rede de haplótipos do gene mitocondrial ND5 (2014-2015) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de <i>A. albopictus</i> .	44
<b>Figura 13</b>	Rede de haplótipos do gene mitocondrial ND5 (2015-2016) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de <i>A. albopictus</i> .	45
<b>Figura 14</b>	Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI (2014-2015) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de <i>A. aegypti</i> .	49
<b>Figura 15</b>	Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI (2015-2016) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de <i>A. aegypti</i> .	50

**Figura 16** Rede de haplótipos do gene mitocondrial ND5 (2015-2016) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de *A. aegypti*.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Espécies do gênero <i>Aedes</i> identificadas taxonomicamente nas áreas de estudo no município de São Lourenço da Mata.	37
<b>Tabela 2</b>	Dados das análises dos genes COI e ND5 em <i>A. albopictus</i> provenientes de São Lourenço da Mata.	39
<b>Tabela 3</b>	Haplótipos do gene mitocondrial COI em <i>A. albopictus</i> , mostrando sítios variáveis quando comparados ao haplótipo mais comum (H1), suas localidades e posições na sequência do gene.	40
<b>Tabela 4</b>	Haplótipos do gene mitocondrial ND5 em <i>A. albopictus</i> , mostrando sítios variáveis quando comparados ao haplótipo mais comum (H1), suas localidades e posições na sequência do gene.	43
<b>Tabela 5</b>	Dados da análise combinada dos genes COI e ND5 para os testes de neutralidade na espécie <i>A. albopictus</i> .	46
<b>Tabela 6</b>	Índice de Fixação ( $F_{ST}$ ) baseado em análise combinada dos genes COI e ND5 em amostras de <i>A. albopictus</i> .	46
<b>Tabela 7</b>	Análise da variância molecular (AMOVA) baseada em análise combinada dos genes COI e ND5 em amostras de <i>A. albopictus</i> .	47
<b>Tabela 8</b>	Dados das análises dos genes COI e ND5 em <i>A. aegypti</i> provenientes de São Lourenço da Mata.	47
<b>Tabela 9</b>	Haplótipos do gene mitocondrial COI em <i>A. aegypti</i> , mostrando sítios variáveis quando comparados ao haplótipo mais comum (H1), suas localidades e posições na sequência do gene.	48
<b>Tabela 10</b>	Haplótipos do gene mitocondrial ND5 em <i>A. aegypti</i> , mostrando sítios variáveis quando comparados ao haplótipo mais comum (H1), suas localidades e posições na sequência do gene.	51
<b>Tabela 11</b>	Dados da análise combinada dos genes COI e ND5 para os testes de neutralidade na espécie <i>A. aegypti</i> .	53
<b>Tabela 12</b>	Índice de Fixação ( $F_{ST}$ ) baseado em análise combinada dos genes COI e ND5 em amostras de <i>A. aegypti</i> .	53
<b>Tabela 13</b>	Análise da variância molecular (AMOVA) baseada em análise combinada dos genes COI e ND5 em amostras de <i>A. aegypti</i> .	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFLP** – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos Amplificados
- AP** – Arena Pernambuco
- CHIKV**– Vírus Chikungunya
- COI** – Citocromo Oxidase subunidade I
- CPqAM**– Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
- DENV** – Vírus Dengue
- dNTP** – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- ECSA** – Leste-Centro-Sul Africana
- IOL** – Asiático e Oceano Índico
- MA** – Estado do Maranhão
- mtDNA** – DNA mitocondrial
- ND5** – NADH desidrogenase subunidade 5
- NPT** – Núcleo de Plataformas Tecnológicas
- OM** – Obra de Maria
- PA** – Estado do Pará
- pb** – Pares de bases
- PC** – Parque Capibaribe
- PCR** – Reação em Cadeia de Polimerase
- RAPD** – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
- RNA<sup>t</sup>** – RNA transportador
- RFLP** – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
- TBE** – Tris Borato EDTA
- VFA** – Vírus da Febre Amarela
- ZIKV** – Vírus Zika

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	16
<b>2.1 Mosquitos do gênero <i>Aedes</i></b>	16
<b>2.2 Epidemiologia e importância médica de mosquitos do gênero <i>Aedes</i></b>	20
<b>2.3 Estudo da diversidade em mosquitos de importância médica</b>	21
<b>2.4 DNA mitocondrial em estudos genéticos</b>	23
<b>2.5 Estudos de diversidade genética em mosquitos do gênero <i>Aedes</i></b>	25
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b>	28
<b>5 HIPÓTESE</b>	29
<b>6 OBJETIVOS</b>	30
<b>6.1 Objetivo geral</b>	30
<b>6.2 Objetivos específicos</b>	30
<b>7 MATERIAL E MÉTODOS</b>	31
<b>7.1 Áreas de Estudo</b>	31
<b>7.2 Coleta de mosquitos</b>	32
<b>7.3 Identificação taxonômica das espécies do gênero <i>Aedes</i></b>	33
<b>7.4 Amplificação e sequenciamento com marcadores mitocondriais (mtDNA)</b>	33
<b>7.5 Análise de dados</b>	35
<b>8 RESULTADOS</b>	37
<b>8.1 Identificação taxonômica das espécies do gênero <i>Aedes</i></b>	37
<b>8.2 Amplificação por marcadores mitocondriais (mtDNA)</b>	37
<b>8.3 Análise de dados</b>	39
<b>8.3.1 Análise de dados <i>Aedes albopictus</i></b>	39
<b>8.3.2 Análise de dados <i>Aedes aegypti</i></b>	47
<b>9 DISCUSSÃO</b>	55
<b>10 CONCLUSÕES</b>	59
<b>REFERÊNCIAS</b>	60

## 1 INTRODUÇÃO

A família Culicidae é composta por diversas espécies dotadas da capacidade de transmitir patógenos a diferentes tipos de hospedeiros através do seu hábito de alimentação hematofágico (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Dentre as principais espécies de importância médica e epidemiológica estão *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, considerados os vetores mais importantes de arboviroses em todo o mundo e implicados na transmissão e disseminação de doenças infecciosas, como febre amarela, dengue, chikungunya e zika (GUBLER, 2011; SANTOS; BARBOSA, 2014; VASCONCELOS, 2015; VEGA-RÚA et al., 2014).

O mosquito *A. aegypti* possui competência vetorial para diferentes vírus e é classificado como principal vetor do vírus dengue e da febre amarela urbana nas Américas (NEVES et al., 2000). Este mosquito é apontado como responsável por epidemias de dengue registradas em diversos estados brasileiros, implicado também como responsável pelas epidemias de zika e chikungunya que ocorreram entre 2015 e 2016 (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO, 2016).

O mosquito *A. albopictus* é capaz de transmitir cerca de 26 arbovírus diferentes. Nos últimos anos, a competência vetorial desta espécie tem sido demonstrada em condições de laboratório, como por exemplo ao vírus Chikungunya e aos diferentes sorotipos de vírus Dengue (VEGA-RÚA et al., 2013). *A. albopictus* é considerado o vetor natural do vírus dengue em áreas urbanas, sub-urbanas e rurais da Ásia, é também o transmissor da Encefalite Japonesa neste continente.

No Brasil esta espécie ainda não foi associada a transmissão da dengue, apesar de ser potencial vetor. No entanto, estudos demonstraram a presença do vírus Dengue em um *pool* de larvas do mosquito naturalmente infectadas com o vírus Dengue tipo 1 (DENV1), na região de Montes Altos-MG (SERUFO et al., 1993). Estudos conduzidos em laboratório demonstraram que populações brasileiras de *A. albopictus* são capazes de transmitir horizontalmente os quatro sorotipos do dengue, e de transferir verticalmente dois sorotipos do vírus, 1 e 4. É importante ressaltar que *A. albopictus* pode ser um elemento de elo entre os ciclos silvestre e urbano da febre amarela, e de outros arbovírus no Brasil, levando em consideração a facilidade com que frequente, de forma igualitária, os ambientes silvestres, rurais, suburbanos e urbanos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Alguns dos principais fatores que mantêm a alta densidade populacional desses vetores e as consequentes transmissões dessas doenças são o elevado crescimento desordenado das

populações humanas e a conseqüente urbanização não planejada; popularização do transporte aéreo, que facilita o processo de dispersão destes vetores; número de criadouros existentes nos meios urbanos; alterações no seu habitat natural, como o desmatamento de grandes áreas; e carência de estrutura sanitária adequada. Estes fatores agregados podem acarretar a migração de populações de vetores de seu habitat natural para áreas urbanas, culminando em seu estabelecimento naquele ambiente (GUBLER, 2012).

O município de São Lourenço da Mata no estado de Pernambuco possui como característica fitogeográfica principal a presença de grandes áreas de Mata Atlântica entremeadas por áreas antropizadas. O processo de urbanização de um ambiente que possui características nativas silvestres, como as alterações urbanísticas realizadas no Município de São Lourenço da Mata, podem ocasionar, dentre outros danos à natureza, alterações na estrutura e diversidade genética de populações de mosquitos endêmicas daquela região, gerando impacto no comportamento dos indivíduos, e possíveis mudanças de resposta às ações de controle vetorial. De acordo com Ribeiro et al. (2012), a degradação ambiental promove a proliferação de espécies de mosquito com plasticidade adaptativa, que podem se desenvolver em áreas suburbanas, mostrando uma tendência a domiciliação e capacidade para transportar e transmitir agentes patogênicos para os seres humanos e os animais.

O estudo de variabilidade e estrutura genética de populações de mosquitos vetores é de grande importância, pois permite o conhecimento de características intrínsecas dos indivíduos que possam influenciar na resposta destes às ações de controle vetorial. Além disso, permite o conhecimento da relação filogenética entre populações de regiões diferentes, informação de grande importância para o entendimento sobre o fluxo gênico e a influência do ambiente no perfil genético das populações, o conhecimento da origem dessas populações, dados que podem facilitar o melhor desenvolvimento de estratégias de controle direcionadas ao perfil genético de cada população (CALVEZ et al., 2016).

Dessa forma, é de fundamental importância a realização de estudos sobre os culicídeos do gênero *Aedes* presentes no município de São Lourenço da Mata, visto que tais informações subsidiarão gestores do município para a qualificação das metodologias de controle vetorial empregadas na área.



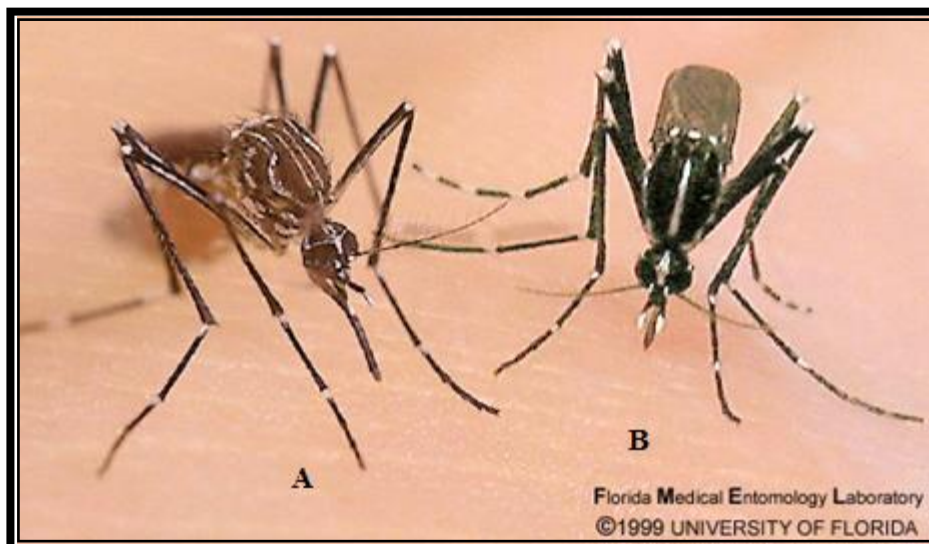
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Mosquitos do gênero *Aedes*

O gênero *Aedes* é composto por diversas espécies que possuem importância epidemiológica e que estão enquadradas em dois subgêneros: *Stegomyia* e *Ochlerotatus* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

No subgênero *Stegomyia*, originário da Etiópia, existem duas espécies de grande importância epidemiológica no Brasil, as quais são investigadas no presente estudo, *A. aegypti* e *A. albopictus* (Figura 1).

**Figura 1** – Mosquitos do gênero *Aedes*.



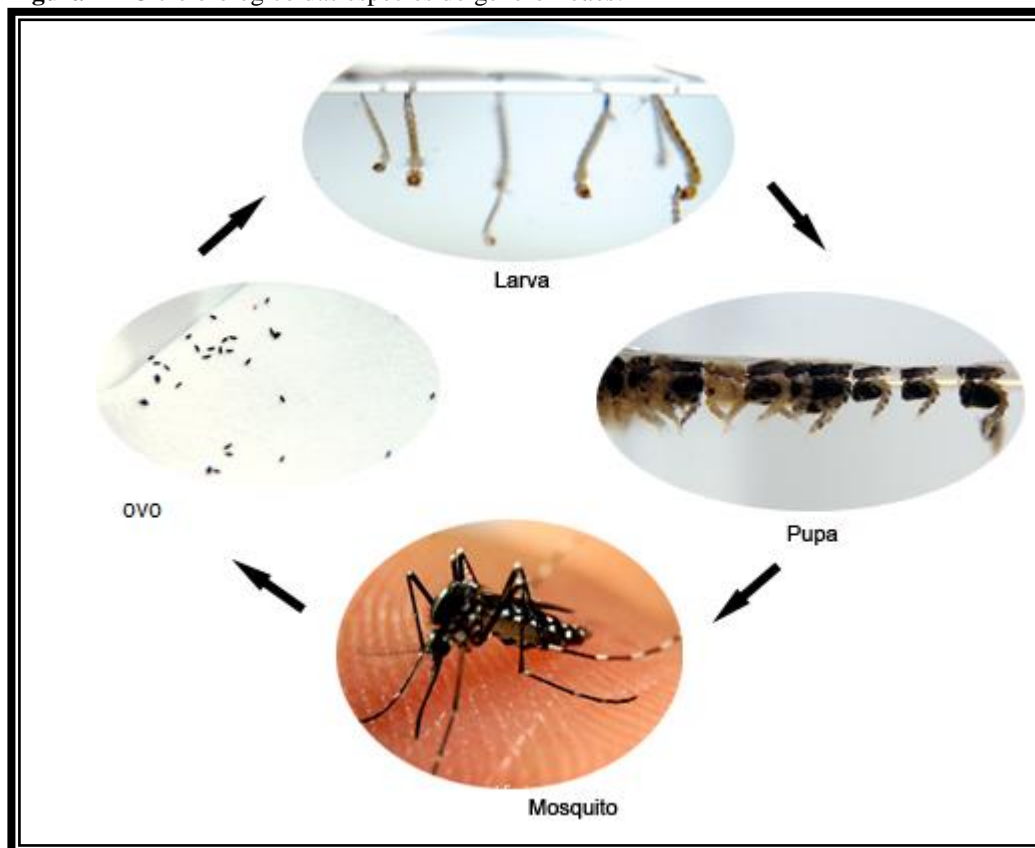
Fonte: Lounibos e O'Meara (1999)

Legenda: **A** - *A. aegypti*; **B** - *A. albopictus*.

Os indivíduos destas espécies apresentam desenvolvimento em criadouros naturais, tais como ocos de árvores e plantas da família das bromeliáceas, como também em criadouros artificiais geralmente produzidos pela atividade humana, tais como reservatórios de água para consumo e descartes em geral que possam acumular água suficiente para a eclosão e desenvolvimento das larvas (FORATTINI, 2002). Em estudo recente foi observada a colonização de criadouros com alta carga de matéria orgânica por indivíduos do gênero *Aedes*, como canaletas, caixas de inspeção e esgoto, prova da alta capacidade de adaptação do gênero as modificações ambientais proporcionadas pelo homem (SANTOS; BARBOSA, 2014). Os ovos são depositados pelas fêmeas de maneira que sejam dispersados pelo maior número de

criadouros possível, em superfícies próximas a lâmina d'água ou em ambientes inundáveis. Os ovos continuam viáveis por longos períodos de seca após rápido processo de desenvolvimento embrionário. Estas espécies fazem parte da família Culicidae, e como em outros culicídeos, a fase larval é composta por 3 mudas, sendo o estágio L4 o último estágio larval, culminando com a pupa, último estágio aquático das espécies em questão, de onde emerge o inseto adulto (Figura 2). As fêmeas de *A. aegypti* e *A. albopictus* possuem hábito alimentar hematofágico e são bastante vorazes, picando o hospedeiro durante o período diurno, porém são oportunistas, podendo se alimentar no período noturno caso um hospedeiro se aproxime de seu local de repouso (DAY, 2016; FORATTINI, 2002; SANTOS; BARBOSA, 2014; SILVA et al., 2012).

**Figura 2** – Ciclo biológico das espécies do gênero *Aedes*.



Fonte: Superintendência de Controle de Endemias (2007)

A espécie *A. aegypti* é considerada a melhor adaptada ao ambiente urbano, classificada como antropofílica e sinantrópica por estar adaptada a viver no ambiente humano. Existe um consenso de que a partir de populações silvestres foi selecionada uma variedade genética deste mosquito capaz de se adaptar a áreas alteradas e se desenvolver em aglomerados humanos (NATAL, 2002). Os indivíduos desta espécie apresentam em sua fase adulta características morfológicas tais como aspecto rajado, corpo de cor enegrecida com manchas branco-

prateadas. São facilmente identificados pela presença de um desenho em forma de lira presente em seu mesonoto (Figura 3) (NATAL, 2002; NEVES et al., 2000; REY et al., 2010).

**Figura 3** – Fêmea da espécie *A. aegypti*.



Fonte: The Disease Daily (2012)

Os indivíduos da espécie *A. aegypti* apresentam atividade diurna, realizam cópula, hematofagia e oviposição durante o dia. Quanto a alimentação, os machos da espécie em questão se alimentam de substâncias açucaradas, como frutose e glicose por exemplo, enquanto as fêmeas, além de se alimentarem de substâncias açucaradas, realizam também a hematofagia, essencial a maturação dos ovos, além de ser importante para sua nutrição fazendo com que tenham sobrevivência maior do que aquelas espécies que não possuem ingestão sanguínea (NEVES et al., 2000).

A alimentação sanguínea da espécie é realizada geralmente no intradomicílio, em ambientes escuros, em voos próximos ao solo. As investidas das fêmeas são raramente notadas pelo hospedeiro, que só se dá conta que foi picado quando a fêmea já está se deslocando ingurgitada, deixando para trás, no local da picada, proteínas presentes em sua saliva que causam prurido e irritação. Caso a fêmea não complete seu repasto sanguíneo em um único hospedeiro por ter sido afastada quando percebida, por exemplo, ela pode interromper o processo de alimentação e ser atraída por este mesmo hospedeiro ou por um outro rapidamente, e novamente se ingurgitar de sangue até que esteja satisfeita, quando busca por abrigo para a digestão do material ingurgitado (HONÓRIO et al., 2015; NATAL, 2002; NEVES et al., 2000).

A espécie *A. albopictus* foi detectada no Brasil pela primeira vez em 1986 no estado do Rio de Janeiro, pelo pesquisador da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Oswaldo Paulo Forattini. No estado de Pernambuco, mais especificamente na Região Metropolitana do Recife (RMR), o primeiro relato da presença da espécie ocorreu em região de

Mata Atlântica no ano de 1999 (ANASTÁCIO, 2002). No ano de 2002 foi detectada a presença da espécie *A. albopictus* em nove bairros da Região Metropolitana do Recife: Cordeiro, Dois Irmãos, Dois Unidos, Afogados, Várzea, Ilha do Leite, Imbiribeira, Torre e Ibura, sendo relatado que em Dois Irmãos e Dois Unidos houve prevalência de indivíduos da espécie *A. albopictus* sobre *A. Aegypti* (ANASTÁCIO, 2002). A espécie supracitada é também conhecida como “tigre asiático”, e apresenta como características morfológicas em sua fase adulta o tórax enegrecido, presença de linha vertical de tonalidade clara formada por escamas branco-prateadas, faixas e manchas ao longo do corpo também de tonalidade clara (Figura 4) (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1986).

**Figura 4** – Fêmea da espécie *A. albopictus*.



Fonte: Caratinga (2014)

*A. albopictus* apresenta distribuição geográfica em países de localização tropical e temperada do globo, sendo amplamente encontrado no Brasil, em 24 dos 27 estados (PANCETTI et al., 2015). Mesmo com ampla distribuição no país, a espécie ainda não foi relatada como vetora do vírus dengue, embora tenha se mostrado sob condições artificiais que populações brasileiras da espécie são capazes de serem infectadas com o vírus dengue e transmitir tal vírus com sucesso (PANCETTI et al., 2015; VEGA-RÚA et al., 2014).

Os indivíduos da espécie *A. albopictus* são classificados como exofilicos, por preferirem se abrigar fora do ambiente domiciliar, e exofágicos, por preferirem se alimentar também no peridomicílio e demais áreas livres fora de uma casa. Eles são encontrados mais comumente em áreas rurais, silvestres e semi-silvestres, porém atualmente vêm sendo encontrados também em áreas mais urbanizadas, dividindo espaço com *A. aegypti* (HONÓRIO et al., 2015).

*Aedes albopictus* é uma espécie também de hábitos diurnos, assim como *A. aegypti*, realizando cópula, hematofagia e oviposição durante o dia. Quanto ao hábito alimentar da

espécie, as fêmeas podem buscar sua alimentação sanguínea em diferentes tipos de animais, por serem mais comuns em ambientes rurais, podem se alimentar em hospedeiros silvestres, e por serem oportunistas podem se alimentar também em hospedeiros domésticos, como cachorros, gatos, e seres humanos, sendo este aspecto de grande importância no estudo da espécie pois devido a facilidade com que frequenta tanto ambientes rurais quanto urbanizados pode se tornar um elo entre os ciclos silvestres e urbanos de arboviroses, como por exemplo o ciclo da febre amarela (PANCETTI et al., 2015). Por todos os aspectos descritos, o conhecimento da epidemiologia e de características que conferem importância médica às espécies do gênero *Aedes* se mostra importante.

## **2.2 Epidemiologia e importância médica de mosquitos do gênero *Aedes***

Mosquitos do gênero *Aedes* são responsáveis por epidemias e surtos, como a epidemia do vírus Zika (ZIKV) disseminada pelo *A. aegypti* em Pernambuco registrada no ano de 2015 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016).

Os indivíduos destas espécies possuem algumas características intrínsecas que os tornam vetores competentes, tais como infecção pelo vírus em células epiteliais do intestino, replicação e posterior distribuição do vírus para hemocele e por fim infecção das glândulas salivares do artrópode, de onde este patógeno se encaminhará para o corpo do hospedeiro vertebrado através da hematofagia (BEERNTSEN et al., 2000; INFORME EPIDEMIOLÓGICO DO SUS, 2001; SALAZAR et al., 2007).

Durante a hematofagia, uma fêmea pode picar mais de um hospedeiro vertebrado. Esta multiplicidade de hospedeiros aumenta a possibilidade de transmissão pelas espécies *A. Aegypti* e *A. albopictus* de diferentes patógenos causadores de doenças, como os vírus da dengue, chikungunya e zika (NATAL, 2002; WILSON; SCHLAGENHAUF, 2016).

A espécie *A. albopictus* no Brasil ainda não foi descrita como transmissora do vírus Dengue, mas em outros países do mundo a espécie já se caracteriza como transmissora desta e de outras arboviroses, como febre amarela, chikungunya e também tipos de encefalites. Estudo conduzido em laboratório mostrou que *A. albopictus* é capaz de transmitir, experimentalmente diferentes tipos de arbovírus, evidenciando sua importância epidemiológica (PANCETTI et al., 2015; VEGA-RUA et al., 2013).

Estudos recentes revelaram uma grande competência vetorial de populações brasileiras de *A. albopictus* para transmissão do vírus Chikungunya, sob condições de laboratório, o que

torna o estudo sobre a biologia deste vetor de grande importância, sendo a vigilância epidemiológica e entomológica para esta espécie extremamente necessária no Brasil (PANCETTI et al., 2015; VEGA-RÚA et al., 2014).

A espécie *A. aegypti* é considerada responsável atualmente no Brasil pela disseminação de mais dois vírus: Zika e Chikungunya. O vírus Zika pertence à família *Flaviviridae*, foi isolado originalmente de uma fêmea em estado febril da espécie de macaco *Rhesus* na floresta de Zika em Uganda - África em 1947, daí o nome dado ao vírus. Este vírus está relacionado a dois outros vírus transmitidos pelo *A. aegypti*, o vírus da Febre Amarela (VFA) e o vírus da Dengue, ambos com ocorrência de febre hemorrágica. Mesmo apresentando-se na maioria dos casos como uma virose branda, de expressão benigna, recentemente na Polinésia Francesa e no Brasil foram registrados casos mais graves de associação do vírus zika com comprometimento do sistema nervoso central - síndrome de Guillain-Barré, meningite, mielite transversa (VASCONCELOS, 2015).

O vírus Chikungunya é parte da família *Togaviridae* e possui quatro linhagens geneticamente distintas: Oeste Africano, Leste-Centro-Sul Africano (ECSA), Asiático e Oceano Índico (IOL). O primeiro isolamento do vírus ocorreu de soro humano durante um surto da doença febril na Tanzânia em 1953 (AZEVEDO et al., 2015).

Diferentes fatores contribuem atualmente para o aparecimento e disseminação de arboviroses em novas áreas antes não atingidas por estas doenças, como zika e chikungunya por exemplo, sendo o principal fator a presença em todo o globo dos vetores *A. aegypti* e *A. albopictus*. Tudo isso mostra mais uma vez a importância do controle vetorial e vigilância entomológica, afim de impedir o contínuo avanço de tais arboviroses tão danosas para a população mundial. A utilização de ferramentas genéticas no estudo de tais vetores se mostra bastante importante para que seja possível obter de forma mais aprofundada a melhor estratégia de controle vetorial.

### **2.3 Estudo da diversidade em mosquitos de importância médica**

Diversidade genética se caracteriza por variações biológicas hereditárias acumuladas durante a evolução, gerada basicamente por mutações na sequência nucleotídica no momento da replicação do DNA. Quando essa variação ocorre entre indivíduos de uma mesma espécie é denominada como polimorfismo ou diversidade intraespecífica, já quando a variação ocorre entre espécies diferentes, estando fixada dentro de cada táxon, diz-se que há uma substituição

de caráter, podendo ser nucleotídica, em caso de DNA, ou aminoacídica, em caso de proteína. Podem ser realizados dois tipos de investigação da diversidade genética e suas variações biológicas, é possível investigar variações genéticas intraespecíficas, quando se deseja compreender as relações entre indivíduos e populações de cada espécie, buscando entender qual a relação de parentesco, se existe ou não fluxo gênico entre populações de uma mesma espécie, qual o estado de conservação de uma determinada espécie. É possível também investigar a diversidade genética entre espécies, quando o objetivo é conhecer as relações filogenéticas nos diferentes níveis taxonômicos (famílias, gêneros, espécies) ou realizar a caracterização de espécies, através da identificação de marcadores conservados que permitam a diferenciação (SANTOS et al., 2009).

Uma gama de técnicas moleculares está disponível para o estudo da diversidade genética em diferentes organismos. A primeira técnica molecular desenvolvida e utilizada na identificação de modificações genéticas entre organismos foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Outros tipos são: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). A técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é bem utilizada em estudos moleculares, incluindo estudos com mosquitos, permitindo a realização de técnicas como as supracitadas. A PCR permite realizar o estudo molecular desde um único indivíduo até um grande número deles, em qualquer fase de seu desenvolvimento, através da amplificação *in vitro* de milhares de cópias de um fragmento sintético de DNA de tamanho definido, baseado em um DNA molde de interesse (AMORIM, 2013; HIRAGI et al., 2009; LIMA, 2013).

Diferentes marcadores moleculares podem ser utilizados nos estudos de diversidade genética, uma vez que contribuem com informações sobre diferentes regiões do genoma (PANDEY et al., 2006). Dentre os diferentes tipos de marcadores, o DNA mitocondrial (mtDNA) é amplamente utilizado em estudos de genética de população para determinação do grau de relação entre indivíduos da mesma espécie (*DNA barcoding*), avaliação de níveis de endogamia, se há fluxo gênico entre as populações, ocorrência de gargalos populacionais, além de estudos filogenéticos e filogeográficos (LIMA, 2013).

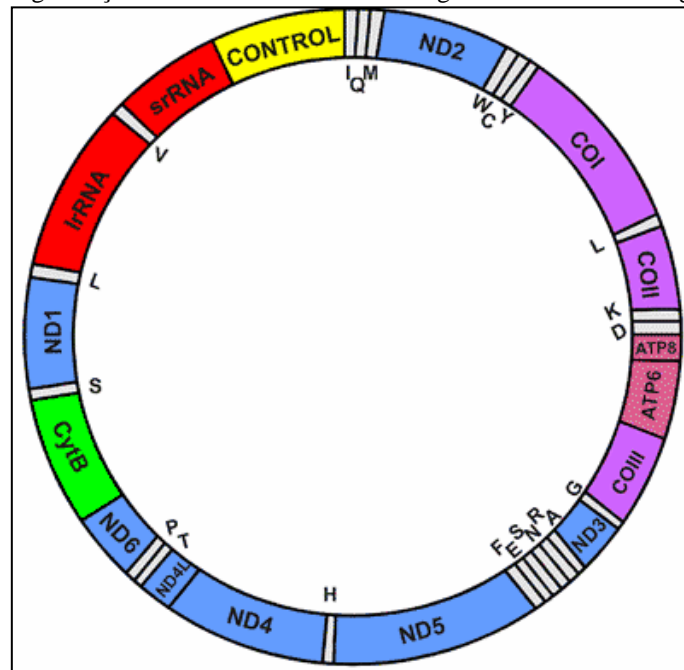
O tipo de ferramenta molecular a ser utilizada em um estudo é, geralmente, selecionado de acordo com o objetivo do trabalho.

## 2.4 DNA mitocondrial em estudos genéticos

O DNA mitocondrial (mtDNA) foi descoberto em 1966 por Van Bruggen, Sinclair e Stevens e Nass, sendo completamente sequenciado em 1981 por Anderson et al. Começou a ser usado por volta das décadas de 70-80, passando a fazer parte da maioria dos estudos populacionais (ARIAS et al., 2003; REIS et al., 2013; SOUZA, 2005).

O mtDNA possui características únicas que o fazem ser bem utilizado em estudos genéticos e populacionais, tais como: ser formado por um pequeno genoma circular, com cerca de 16 kb; apresentar herança materna e ausência de recombinação; número reduzido de genes, 37 ao todo; possuir região não codificadora chamada de região rica em A+T em invertebrados, região possivelmente responsável por controlar a replicação e a transcrição do mtDNA, composta por aproximadamente 1200 nucleotídeos; apresentar alterações no tamanho da molécula devido a deleções e inserções, principalmente na região rica em A+T; e possuir, em comparação ao genoma nuclear, taxa evolutiva (substituição de base) bastante alta (Figura 5) (ARIAS et al., 2003; AVISE, 2004; MARRELLI, 2011; SOUZA, 2005).

**Figura 5** – Organização do DNA mitocondrial com genes codificantes e região controle.



Fonte: Guedes (2006)

Além das características supracitadas o mtDNA funciona como um marcador microevolutivo a nível intraespecífico e pode ser empregado como um guia informativo das relações filogenéticas entre diferentes grupos de animais (ARIAS et al., 2003; AVISE, 2004).



O genoma mitocondrial tem origem materna, sendo por este motivo um bom informativo sobre grau de parentesco, pode ser usado para investigar a história evolutiva de determinada espécie e estudar a filogenia entre populações existentes, independentemente se estas sofreram efeitos seletivos ou adaptativos, e nunca, ou muito raramente, sofre recombinação gênica. O mtDNA possui como característica marcante também o fato de evoluir rapidamente, 10 vezes mais rápido que o DNA nuclear, pois há nesta molécula um acúmulo de mutações por não haver mecanismos reparadores na mesma, e desta forma alterações intraespecíficas são facilmente constatadas, pode ser utilizado também para inferir sobre estrutura populacional e história populacional recente (AVISE, 2004; GUEDES, 2006; HARTL; CLARK, 2010; MAIA et al., 2009; PADUAN, 2008).

Mesmo com alta taxa de evolução, indivíduos apresentam geralmente o mesmo tipo de molécula de DNA mitocondrial em todas as células de todos os tecidos do organismo. Ainda que exista equivalência qualitativa de moléculas do mtDNA em um mesmo indivíduo, há uma diferença entre a taxa de mutação entre os diferentes genes da molécula em questão. Os genes que acumulam de forma mais rápida as mutações, como substituições de bases, são os genes que codificam as seguintes subunidades: NADH desidrogenase, citocromo c oxidase e RNAt. Já os genes que estão entre os mais conservados do material genético mitocondrial são os que codificam as unidades ribossômicas e o citocromo b. A região A+T, também chamada de região D-loop, é considerada a mais variável, podendo sofrer substituição de bases, inserções ou deleções, sendo estas últimas responsáveis por possíveis alterações no tamanho da molécula de mtDNA (AVISE, 2004; GUEDES, 2006).

Uma das regiões do genoma mitocondrial mais utilizadas nos estudos evolutivos e populacionais é uma região do gene COI, subunidade I da citocromo oxidase, pois esta é caracterizada como um código de barras universal para diferentes espécies. Essa região é conhecida como *barcoding*, sendo utilizada em estudos de taxonomia, filogenia, filogeografia, genética de populações na família Culicidae (MARRELLI, 2011). Este gene mitocondrial é classificado como o maior entre as três subunidades de citocromo oxidase codificadas pelo mtDNA e também a subunidade mais conservada.

O complexo NADH desidrogenase, ou complexo respiratório mitocondrial I, é composto por grande número de subunidades onde muitos são codificados pelo mtDNA. O gene mitocondrial ND5 em específico foi demonstrado como sendo altamente polimórfico, e é bastante utilizado em estudos populacionais e de diversidade genética (PADUAN, 2008). O gene ND5, NADH desidrogenase subunidade 5, é considerado uma ferramenta poderosa para

elucidar questões sobre nível de divergência filogenética entre espécies intimamente relacionadas, como espécies que pertencem ao mesmo complexo por exemplo. Este gene é caracterizado como um dos genes mais variáveis do mtDNA e é bastante utilizado no estudo de muitas espécies dos gêneros *Aedes* e *Anopheles* (MAIA et al., 2009; MAKHAWI et al., 2013).

## **2.5 Estudos de diversidade genética em mosquitos do gênero *Aedes***

O estudo da diversidade genética contribui para o conhecimento das variações intra e interespecíficas nas diferentes populações de mosquito. Intraespecificamente, as variações genéticas podem fornecer informações sobre presença ou ausência de fluxo gênico, nível de conservação da espécie, por exemplo. Interespecificamente, auxilia na identificação de espécies crípticas com a utilização de marcadores conservados, obtenção de informações sobre relações filogenéticas entre espécies, entre outras possibilidades (SANTOS et al., 2009).

A diversidade genética pode também atuar como um importante indicador sobre a capacidade de uma espécie ou uma população de indivíduos se adaptar ao meio ambiente, quanto maior a diversidade genética de uma população melhor a resposta desta às alterações das condições ambientais, significando que esta população estará mais propensa a expandir seus limites geográficos de habitat. A redução da diversidade genética em uma população, por outro lado, reduz o potencial adaptativo desta mesma ao ambiente, estando relacionado a isso um aumento da homozigose. Para que os indivíduos de uma população persistam em determinado ambiente devem possuir fontes alélicas suficientes para se reajustar aos novos fatores de seleção (KONONOV et al., 2016; MARKERT et al., 2010).

As mudanças geradas pelo homem no ambiente tendem a fragmentar os habitats e consequentemente as populações de organismos, reduzindo o tamanho destas e gerando um aumento nos índices de endogamia dentro das subpopulações. A endogamia gera um aumento da homozigose entre os indivíduos daquela população consequentemente desencadeia a diminuição da variabilidade genética e uma menor adaptabilidade ao ambiente. Populações endogâmicas apresentam em geral maior diferença genética entre populações, pois dentro das populações está ocorrendo à queda deste índice (AGNARSSON et al., 2013). O processo de distanciamento genético entre subpopulações de determinada espécie em um ambiente geograficamente fragmentado não ocorre necessariamente de forma abrupta, pois a imposição de barreiras ao fluxo gênico pode ser um processo gradual e ao qual os organismos respondem de acordo com sua ecologia (CARNAVAL, 2002). Dessa forma, é possível dizer que

populações distantes fisicamente não necessariamente serão distantes geneticamente, porém a divergência poderá surgir através de processos de deriva genética, equilibrados pelo fluxo gênico (WRIGHT, 1943).

O fluxo gênico se caracteriza por trocas de material genético entre indivíduos de populações, e características como distribuição geográfica, antropofilia, capacidade de dispersão, número efetivo populacional, dentre outras, podem influenciar direta ou indiretamente o fluxo gênico, resultando em efeitos sobre variabilidade e diferenciação genética. A ocorrência de fluxo gênico é considerada relevante para a aproximação genética entre populações, e mesmo que ocorra de forma eventual pode dificultar a visualização de estruturação genética histórica quebrada em evento recente (SOUSA, 2013). O fluxo gênico é importante para a estruturação populacional, uma vez que altos níveis de fluxo gênico entre populações indicam que as populações podem evoluir em conjunto, em contrapartida baixos níveis deste parâmetro demonstram uma tendência de que cada população seja capaz de evoluir de forma independente (SLATKIN, 1994).

Além da análise do fluxo gênico, a diversidade genética é considerada como outro parâmetro populacional crucial a estudos sobre conservação de organismos. Esta diversidade compreende inúmeros fatores, tal como a riqueza alélica, a qual permite identificar os níveis de heterozigosidade dentro e entre populações (MELO, 2012). Estudos de diversidade genética permitem a obtenção de dados sobre indivíduos de uma população, tais como mosquitos, demonstrando respostas a níveis de adaptação a modificações ambientais, por exemplo (HIRAGI et al., 2009).

Sendo assim, a avaliação da diversidade genética e suas variações biológicas em mosquitos, especificamente os pertencentes ao gênero *Aedes* por estarem envolvidos na transmissão de diversos arbovírus de impacto na saúde da população mundial, é de grande importância, pois pode auxiliar no planejamento e desenvolvimento de medidas de controle equivalentes as condições da região de interesse, como o município de São Lourenço da Mata, área de estudo do presente trabalho.

### 3 JUSTIFICATIVA

Um dos fatores essenciais ao sucesso de um programa de controle é o conhecimento aprofundado sobre a biologia do vetor. É sabido que o entendimento de diferentes aspectos, tais como estruturação genética e dinâmica populacional, são fundamentais no estabelecimento de estratégias de controle mais eficientes. Desta maneira, a identificação de padrões de estruturação genética e fluxo gênico, dentro das populações de mosquitos, são de crucial importância para monitorar e até mesmo impedir a circulação de determinados traços genéticos. Levando-se em consideração que mudanças ambientais decorrentes do processo de urbanização favorecem o aumento da densidade de algumas espécies de culicídeos vetores, com riscos potenciais de transmissão de patógenos para humanos, o presente estudo visa identificar o modo de dispersão e colonização das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, além de investigar a diversidade genética de tais espécies no município de São Lourenço da Mata (SLM). O município de SLM, região formada por áreas urbanizadas e de Mata Atlântica, passou por grandes alterações em sua paisagem, construções como a Arena Pernambuco e novos empreendimentos têm trazido para área mudanças estruturais principalmente com relação à redução de áreas de Mata Atlântica, ocasionando danos à fauna e flora da região. Alterações no habitat natural de seres vivos, entre eles os culicídeos, acarretam diversas alterações em seu comportamento e estruturação gênica, causando desequilíbrio e disseminação de arboviroses. Portanto, o estudo detalhado das características destes vetores é de grande importância para o desenvolvimento de melhores ações de controle no município.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

A modificação ambiental e urbanização das áreas de Oبرا de Maria, Parque Capibaribe e Arena PE, no município de São Lourenço da Mata - Pernambuco, interferem na variabilidade genética de populações de *Aedes* sp. da região?

## **5 HIPÓTESE**

Alterações no habitat natural dos culicídeos, ocasionada pelo processo de urbanização observado em São Lourenço da Mata, podem acarretar em diminuição da variabilidade genética de mosquitos do gênero *Aedes*.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo geral

Analisar a variabilidade genética de mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* provenientes das áreas de Obra de Maria, Arena Pernambuco e Parque Capibaribe no município de São Lourenço da Mata.

### 6.2 Objetivos específicos

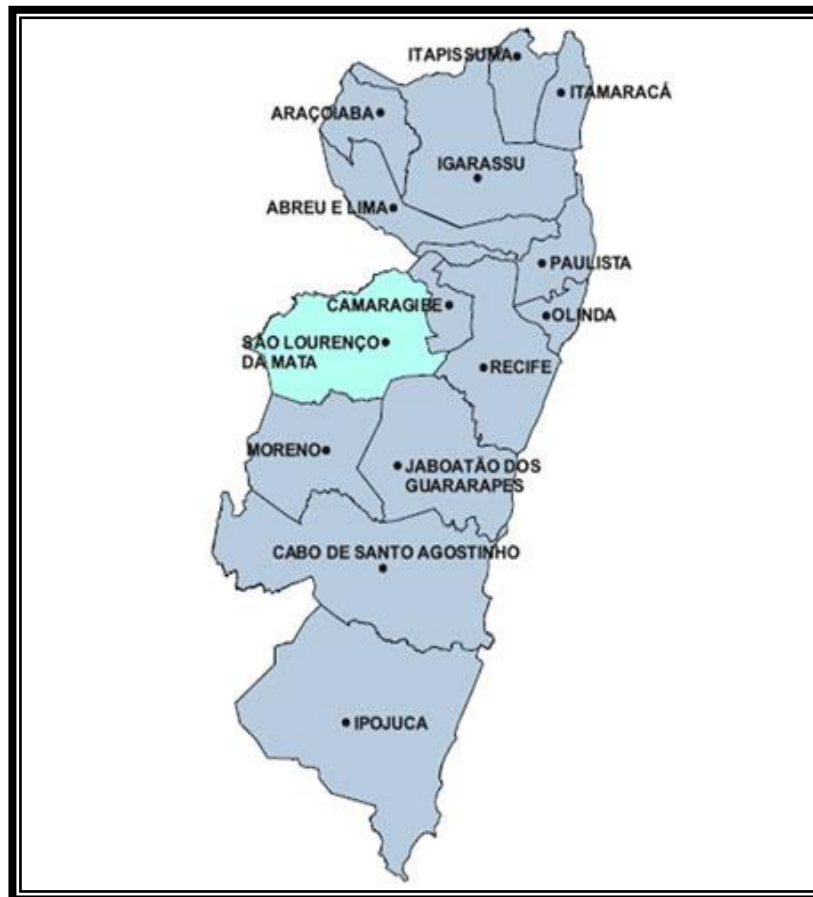
- a) Caracterizar a estrutura genética das populações de culicídeos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* coletadas na cidade de São Lourenço da Mata;
- b) Estimar o fluxo gênico e distância genética em mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e associar estes parâmetros com o processo de urbanização;
- c) Avaliar as relações filogenéticas existentes nos mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e avaliar a possível existência de linhagens evolutivas dentro das subpopulações estudadas.

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 Áreas de Estudo

O município de São Lourenço da Mata (SLM) está localizado na Região Metropolitana do Recife (RMR), limitando-se com cidades como Jaboatão dos Guararapes, Moreno, Recife, Camaragibe (Figura 6).

**Figura 6** – Mapa ilustrativo do município de São Lourenço da Mata e regiões circunvizinhas.



Fonte: São Lourenço da Mata (2014)

Localizada a 18 km do Recife, a extensão territorial da cidade compreende uma área de 264 km<sup>2</sup> e abriga quase 98.402 habitantes, de acordo com dados apresentados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Dentro do município foram selecionadas três regiões com características ambientais distintas: 1) a Arena Pernambuco (AP), construída para sediar eventos esportivos no estado, o estádio tem perfil multiuso sendo adaptável para jogos de futebol, outras partidas esportivas, grandes espetáculos, feiras e convenções; 2) a



Congregação Católica de Obra de Maria (OM), local que apresenta muitas construções em meio a área de Mata Atlântica nativa e que possui grande circulação de pessoas devido a eventos católicos. Entre a Arena Pernambuco e a Obra de Maria existe a BR-408, que separa as duas áreas por largas vias; e 3) o bairro de Parque Capibaribe (PC), região bastante urbanizada com muitas casas e grande movimentação de pessoas. A região onde está localizada a AP fica a 5 km de distância do bairro de PC e a 1,5 km de OM, enquanto que esta última localidade está a 4,5 km de distância de PC.

## 7.2 Coleta de mosquitos

As coletas dos mosquitos foram realizadas nas três regiões supracitadas do município de SLM em dois momentos diferentes: inicial (correspondente ao período de coletas entre os anos de 2014 e 2015) e final (correspondente ao período de coletas entre os anos de 2015 e 2016). Esta coletas foram realizadas no perímetro urbano da cidade no bairro de Parque Capibaribe (PC), na região de vegetação entre a cidade e a Arena-PE representada pela Obra de Maria (OM), e na área da Arena Pernambuco (AP), através de metodologia específica para a coleta de ovos de mosquitos do gênero *Aedes* baseada no uso de armadilhas de oviposição (ovitrapas), que consistem em um vaso plástico de cor preta, com capacidade para 2,5 litros de água, contendo 2 palhetas de eucatex (5 cm x 15 cm), que são estruturas recortadas de chapas de fibra de madeira e que servem para a deposição de ovos pelas fêmeas das espécies do gênero *Aedes*, presas a borda do vaso com clips (Figura 7).

**Figura 7**– Imagem de ovitrapa utilizada na coleta de ovos do gênero *Aedes*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As armadilhas foram instaladas em áreas peri-domiciliares de imóveis previamente selecionados, à um metro do chão. Nas áreas de vegetação e na própria Arena foi realizado inicialmente um levantamento de toda a extensão da área, para delimitar as estações de coleta. As armadilhas foram instaladas em campo por período máximo de 15 dias com manutenção destas a cada 7 dias. O material de ovos obtido em campo foi levado ao insetário do departamento de Entomologia (CPqAM).

### **7.3 Identificação taxonômica das espécies do gênero *Aedes***

Os ovos coletados nas áreas de estudo foram submetidos a uma solução de água e infusão de gramíneas, preparada por técnicos do insetário do CPqAM, para eclosão das larvas separadamente por área e também por ovitrampa, assim, foi possível avaliar o quantitativo de espécimes de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* por ponto de coleta na região.

Todo o material de formas imaturas, composto por larvas e pupas, das populações coletadas foi mantido em condições adequadas de temperatura ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade ( $70\% \pm 20\%$ ) no insetário do departamento de entomologia do CPqAM até a emergência do inseto adulto, que ocorre com cerca de 8 dias após a eclosão das larvas. Os indivíduos adultos obtidos a partir dos ovos provenientes das ovitrapas instaladas no município estudado foram então separados por espécie baseado em características morfológicas externas presentes em cada espécie, utilizando chaves dicotômicas para identificação de Forattini (1965, 2002) e Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994).

Após o processo de identificação taxonômica, os indivíduos foram acondicionados em microtubos de 1,5 ml, devidamente etiquetados com informações sobre a área onde foram coletados, o período da coleta dos ovos, a data de eclosão deste material no insetário, número da ovitrampa de onde foram retirados, e a espécie a qual pertencem. Após estarem devidamente acondicionados e etiquetados foram guardados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , onde ficaram congelados até serem utilizados para os estudos moleculares.

### **7.4 Amplificação e sequenciamento com marcadores mitocondriais (mtDNA)**

O DNA total das amostras foi extraído individualmente de espécimes de *A. aegypti* e *A. albopictus*, de acordo com o protocolo de precipitação por álcool de Ayres et al. (2003) que consistiu dos seguintes passos: Os mosquitos foram macerados individualmente com pistilos

plásticos de ponta cônica em microtubo de 1,5 ml, em uma solução contendo 400 µl de tampão de lise (NaCl 5M, Tris-HCl 1 M e EDTA 0,5 M pH 8.0), 7 µl de proteinase K (SIGMA) (10 mg/ml) e 72 µl de SDS 10%. O material foi incubado a 65° C por no mínimo 8 horas. A cada tubo foram acrescentados 420 µl de NaCl 5M, os mesmos foram homogeneizados e centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 2,0 ml, adicionado 800 µl de isopropanol e incubado a -20° C por 1 hora. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados por 14.000 rpm por 20 minutos. O sedimento foi lavado com 500 µl de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento seco e ressuspenso em 100 µl de T.E. (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) estéril.

Regiões dos genes mitocondriais citocromo C oxidase subunidade I (COI): Forward-5'GGAGGRTTTGGAAAYTGAYTAGTYCC3' e Reverse-5'GCWGAWGTAARTAAAGCTCGWGTATC3' (PAIVA et al., dados não publicados), que amplificam produtos de 698pb, e NADH desidrogenase subunidade 5 (ND5): Forward-5'TCCTTAGAATAAAATCCCGC3' e Reverse-5'GTTTCTGCTTTAGTTCATTCTTC3'(BIRUNGI; MUNSTERMANN, 2002), que amplificam produtos de 450pb, foram amplificadas por PCR convencional em volume final de 25 µl, usando a seguinte mistura: 200 µM de cada dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados – adenina, citosina, guanina e timina), 1.5 µM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de cada primer, 1U de Taq Polimerase (Invitrogen) e 20 ng do DNA molde. As reações foram amplificadas em termociclador programado da seguinte forma para o gene COI: 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 58°C por 50 s, 72°C por 1 min; e um ciclo final de 72°C por 8 min. Para o gene ND5 as condições foram: 95°C por 5 min; 10 ciclos a 95°C por 1 min, 45°C por 1 min; 72°C por 1 min e 30 s; 30 ciclos a 95°C por 1 min, 46°C por 1 min, 72°C por 1 min e 30s; seguido de um ciclo a 72°C por 3min. Para cada mix de PCR foi acrescentada uma amostra utilizada como controle negativo das reações, contendo todos os reagentes das demais amostras menos o DNA, para que fosse possível avaliar possíveis contaminações que pudessem interferir no resultado das ampliações. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em TBE 0,5X (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M e EDTA 0,002 M, pH 8,3), corado com brometo de etídeo (10mg/ml) e fotografados em transiluminador de ultravioleta, para certificação da amplificação ideal dos fragmentos dos genes alvo do estudo. Os produtos de PCR foram então enviados ao sequenciamento. As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas no NPT I do CPqAM/Fiocruz, baseado nas recomendações do

fabricante (Applied Biosystems), com o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®) e submetidas ao equipamento ABI 3500xL Genetic Analyser (Applied Biosystems). Para a reação de sequenciamento, foram utilizados: 1 µL de cada *primer*, os mesmos utilizados para as reações de PCR (3,2 pmol/µL); 0,5 µL de Bigdye® Terminator v3.1; 1 µL de Tampão de sequenciamento 5x (Tris-HCl, pH 9.0 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM); 1 µL do produto de PCR purificado (5 a 20 ng/µL) e água MilliQ 10 µL q.s.p. As condições de temperatura foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 seg, 50 °C por 10 seg e 60 °C por 4 min. Posteriormente os produtos de PCR foram então submetidos à reação de sequenciamento capilar nos dois sentidos da fita (forward e reverse) para os genes estudados. Após a amplificação, foi realizada a purificação e precipitação do DNA utilizando 1 µL de EDTA (125 mM, pH 8,0) e 25 µL de etanol 100% que foram homegeinizado e centrifugado a 3700 rpm por 45 minutos. Após a centrifugação, o precipitado foi lavado com 25 µl de etanol 70% e centrifugado. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspendido em 10 µL de Formamida Hi-Di e aplicado no sequenciador.

## 7.5 Análise de dados

As sequências geradas a partir da reação de sequenciamento foram avaliadas quanto a sua qualidade no programa CodonCode Aligner versão 3.7.1. Este programa utiliza o parâmetro Phred para estimar a qualidade de cada sequência, que considera como aceitável a probabilidade de encontrar uma base nucleotídica errada a cada 100 analisadas (phred=20). Neste mesmo programa foi realizada a montagem das sequências (*contigs*) de ambos os genes COI e ND5 para cada indivíduo analisado. Através do algoritmo Clustal W foi gerado o alinhamento dos contigs, para cada gene mitocondrial estudado. Com o programa MEGA versão 7.0 foram calculadas as matrizes de distância entre os diferentes haplótipos, utilizando o modelo par-a-par (*pairwise distance*), dos genes COI e ND5 para ambas as espécies. Este mesmo programa foi utilizado para a compilação dos dendrogramas através do Método de Associação Média (UPGMA), que agrupa os indivíduos através das similaridades entre suas sequências de DNA. A estimativa da diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), o número de haplótipos ( $K$ ) e o número de sítios segregantes ( $S$ ) foram analisadas de acordo com Nei e Tajima (NEI, 1987) utilizando o programa DnaSP 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A partir das frequências dos haplótipos em cada população estudada, através de análise combinada dos genes COI e ND5, foi calculado

o  $F_{ST}$  com o software Arlequin versão 3.1, importante para compreender o nível de estruturação genética e a ocorrência de fluxo gênico entre as populações estudadas (EXCOFFIER et al., 2005), com este mesmo programa foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) a qual determina se a variação ocorrida entre as populações estudadas pode ser explicada por variações ocorridas dentro das populações, entre populações diferentes dentro de um mesmo grupo ou entre os grupos. As estimativas de neutralidade seletiva dos genes foram realizadas através dos testes D de Tajima (1989) e  $F_s$  de Fu (1997) no programa Arlequin, ambos os testes levam em consideração o polimorfismo nas sequências de DNA, porém o  $F_s$  (Fu) leva em consideração o tempo entre as mutações, classificando-as como antigas ou recentes, sendo por este motivo mais confiável para inferir sobre o crescimento populacional (HARTL, 2010), e por fim, as redes de haplótipos foram construídas com o software TCS versão 1.21 (CLEMENT et al., 2000) com o intuito de visualizar as relações entre os diferentes haplótipos encontrados nas populações estudadas.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Identificação taxonômica das espécies do gênero *Aedes*

Nas coletas do período inicial (2014-2015) foram obtidos no total 4.095 indivíduos da espécie *A. aegypti* e 543 da espécie *A. albopictus*. No período final (2015-2016) foram obtidos no total 2.440 indivíduos da espécie *A. aegypti* e 1.199 da espécie *A. albopictus* (Tabela 1).

**Tabela 1** – Espécies do gênero *Aedes* identificadas taxonomicamente nas áreas de estudo no município de São Lourenço da Mata.

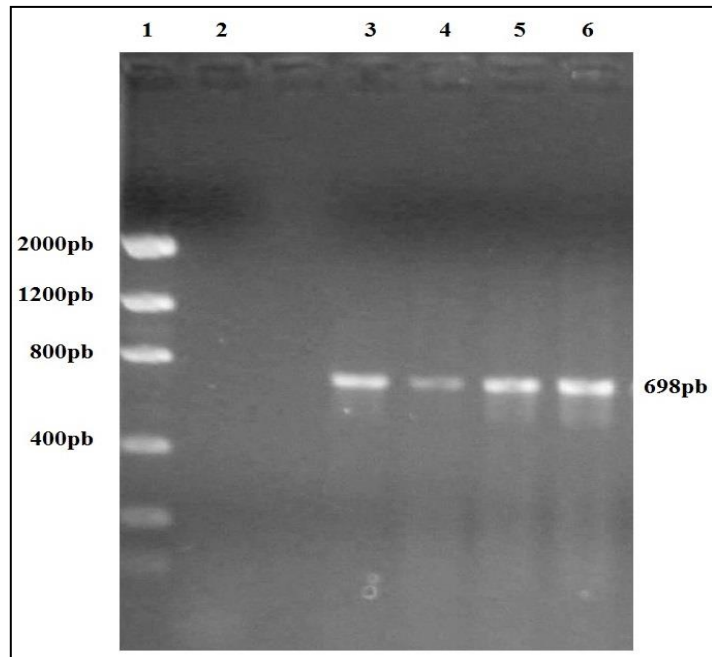
Áreas de estudo	Coletas período inicial (2014-2015)		Coletas período final (2015-2016)	
	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aedes albopictus</i>
<b>AP</b>	01	55	07	100
<b>OM</b>	44	55	180	612
<b>PC</b>	4.050	433	2.253	487

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AP:Arena Pernambuco; OM:Obra de Maria; PC: Parque Capibaribe

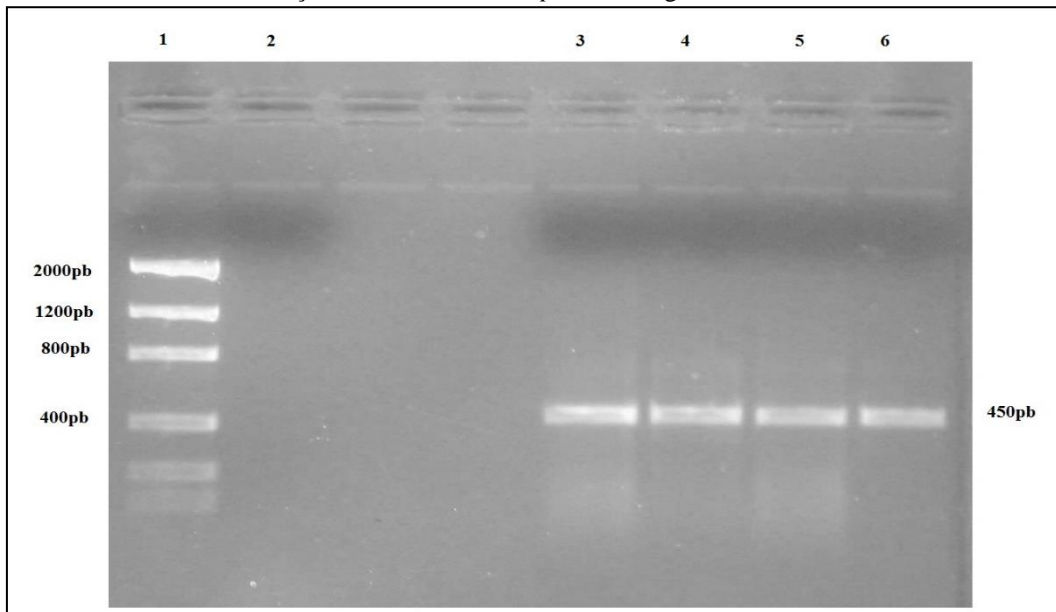
### 8.2 Amplificação por marcadores mitocondriais (mtDNA)

Após a amplificação das amostras, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,0% e fotografados, para avaliação da amplificação ideal dos fragmentos dos genes. Os amplicons de todas as amostras processadas apresentaram o tamanho esperado de 698pb para COI (Figura 8) e 450pb para ND5 (Figura 9).

**Figura 8** – Perfil de bandas da reação de PCR utilizando *primers* do gene COI.

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Marcador de pares de bases Low DNA Mass Ladder (1), Controle negativo (2), padrão do gene COI (amostras 3, 4, 5 e 6).

**Figura 9** – Perfil de bandas da reação de PCR utilizando *primers* do gene ND5.

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Marcador de pares de bases Low DNA Mass Ladder (1), Controle negativo (2), padrão do gene ND5 (amostras 3, 4, 5 e 6).

### 8.3 Análise de dados

#### 8.3.1 Análise de dados *Aedes albopictus*

A partir da investigação de *A. albopictus* no período inicial, das áreas de AP, OM, PC em avaliação conjunta, foram obtidos da análise com o gene COI 09 haplótipos e uma diversidade nucleotídica de 0,00121. Referente ao mesmo período, indivíduos de *A. albopictus* foram analisados utilizando o gene ND5 e foram observados 7 haplótipos e diversidade nucleotídica de 0,00074. Através da avaliação do período final de indivíduos de *A. albopictus* das áreas de estudo, em análise conjunta, com o gene COI, foram observados 02 haplótipos e diversidade nucleotídica de 0,00005. Análise do mesmo período utilizando o gene ND5 permitiu a obtenção de 03 haplótipos e uma diversidade nucleotídica de 0,00011 (Tabela 2).

**Tabela 2** – Dados das análises dos genes COI e ND5 em *A. albopictus* provenientes de São Lourenço da Mata.

Gene	Localidades	N		S		K		$\pi$	
		2014 2015	2015 2016	2014 2015	2015 2016	2014 2015	2015 2016	2014 2015	2015 2016
COI	AP								
	OM	104	69	10	01	09	02	0,00121	0,00005
	PC								
ND5	AP								
	OM	89	129	06	02	07	03	0,00074	0,00011
	PC								

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AP: Arena Pernambuco; OM: Obra de Maria; PC: Parque Capibaribe N: tamanho amostral; S: número de sítios segregantes; K: número de haplótipos;  $\pi$ : diversidade nucleotídica;

Quanto a distribuição dos haplótipos de *A. albopictus* coletados em São Lourenço da Mata para o gene COI, o haplótipo 1 (H1) foi encontrado de forma mais abundante tanto na análise de COI 2014-2015 (N=64 - 61,53%), estando presente em PC e AP, quanto na análise de COI 2015-2016 (N=68 - 98,55%), estando presente nas três populações AP, OM, PC. O haplótipo 2 (H2), foi observado como segundo mais comum na análise de COI 2014-2015 (N=32 - 30,76%) e presente exclusivamente em OM, já na análise de COI 2015-2016 o H2 foi observado somente em 01 indivíduo e encontrado também exclusivamente em OM. Os haplótipos entre H3-H9 foram encontrados somente na análise COI 2014-2015, o H3 foi encontrado exclusivamente na AP, os haplótipos H4, H5, H6 e H7 foram encontrados exclusivamente em OM, e os H8 e H9 foram encontrados somente em PC. As populações estudadas na análise de COI 2014-2015 foram consideradas polimórficas, ou seja, foi



encontrado mais de um haplótipo em cada uma delas. A população de PC apresentou os haplótipos H1, H8 e H9, em AP foram encontrados os haplótipos H1 e H3. E por fim em OM foi encontrado o maior número de haplótipos, 5 dos 9 haplótipos identificados na análise inicial do gene COI em *A. albopictus*. Na análise 2015-2016 de COI foram encontradas duas populações monomórficas, ou seja, que apresentaram apenas um haplótipo, AP apresentou o H1 e PC também apresentou apenas o H1. A população de OM se apresentou polimórfica, sendo encontrados para esta os haplótipos H1 e H2, sendo o H2 exclusivo de OM (Tabela 3).

**Tabela 3** – Haplótipos do gene mitocondrial COI em *A. albopictus*, mostrando sítios variáveis quando comparados ao haplótipo mais comum (H1), suas localidades e posições na sequência do gene.

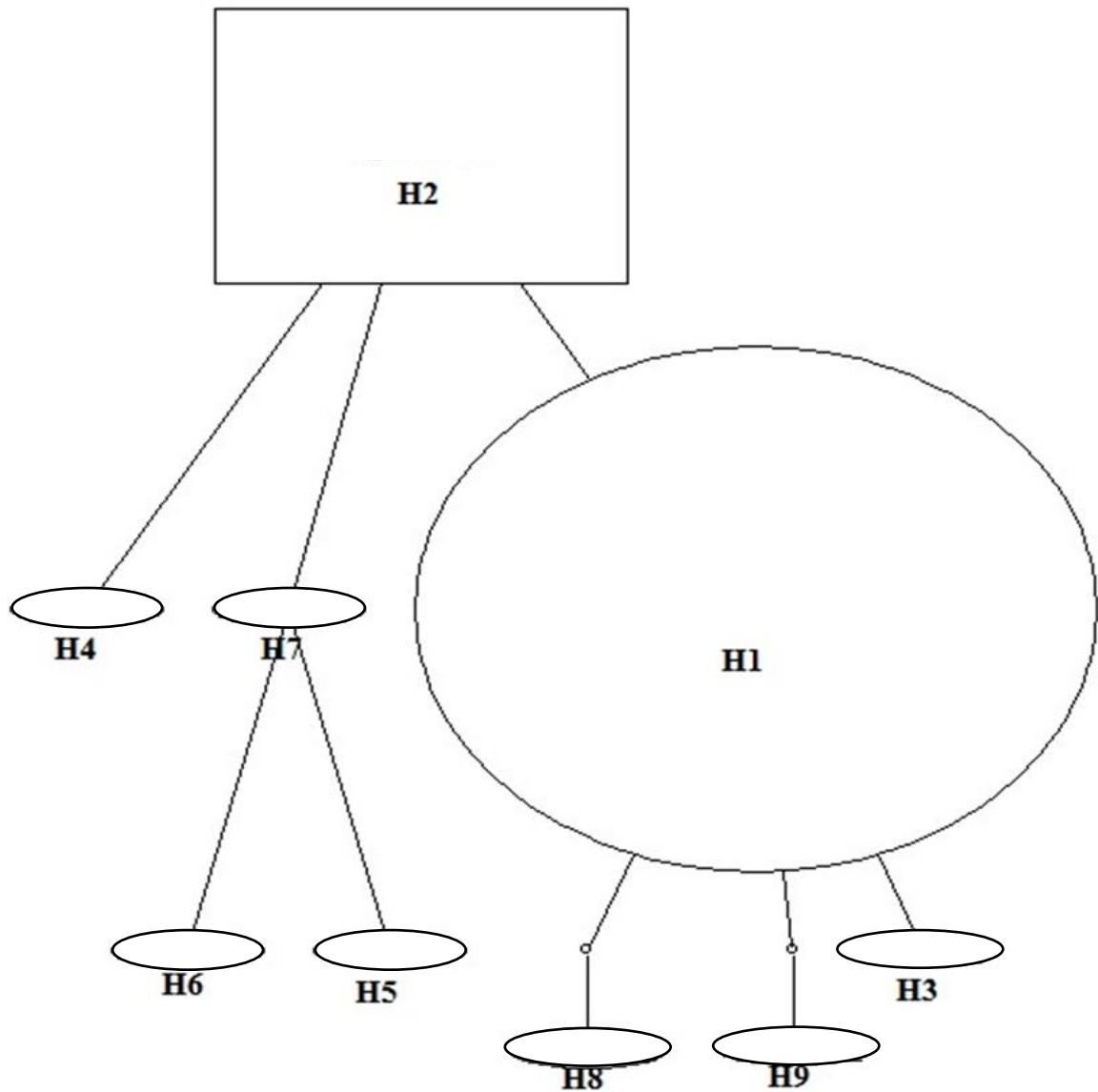
Gene	Localidades	K	N	Posição na sequência do gene COI									
				2014 2015	2014 2015	2014-2015							
				22	61	124	196	218	238	239	469	510	575
COI	PC, AP	H1	64	A	A	T	C	A	T	A	G	A	C
	OM	H2	32	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	AP	H3	01	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.
	OM	H4	01	G	.	.	.	.	A	.	.	A	.
	OM	H5	01	.	.	.	.	C	T	T	.	.	.
	OM	H6	01	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.
	OM	H7	01	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.
	PC	H8	02	A	.	C	.	.	.	A	A	.	.
	PC	H9	01	.	T	T	.	.	.	.	G	.	A
					Posição na sequência do gene COI								
				2015 2016	2015 2016	2015-2016							
				245									
COI	AP, OM, PC	H1	68	G									
	OM	H2	01	T									

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AP: Arena Pernambuco; OM: Obra de Maria; PC: Parque Capibaribe; K: número de haplótipos; N: número de indivíduos encontrados em cada haplótipo;

Com o objetivo de mostrar a relação entre os diferentes haplótipos do gene COI encontrados nas populações de *A. albopictus* no município de São Lourenço da Mata, foram geradas redes de haplótipos através do software TCS. A primeira rede demonstra as relações entre os haplótipos da análise 2014-2015 (Figura 10) e a segunda rede apresenta as relações entre os haplótipos encontrados na análise 2015-2016 (Figura 11). A forma quadrada corresponde ao haplótipo mais antigo e que deu origem aos demais haplótipos, que são representados pelas formas ovais. O tamanho das formas é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo, corresponde a frequência do haplótipo.

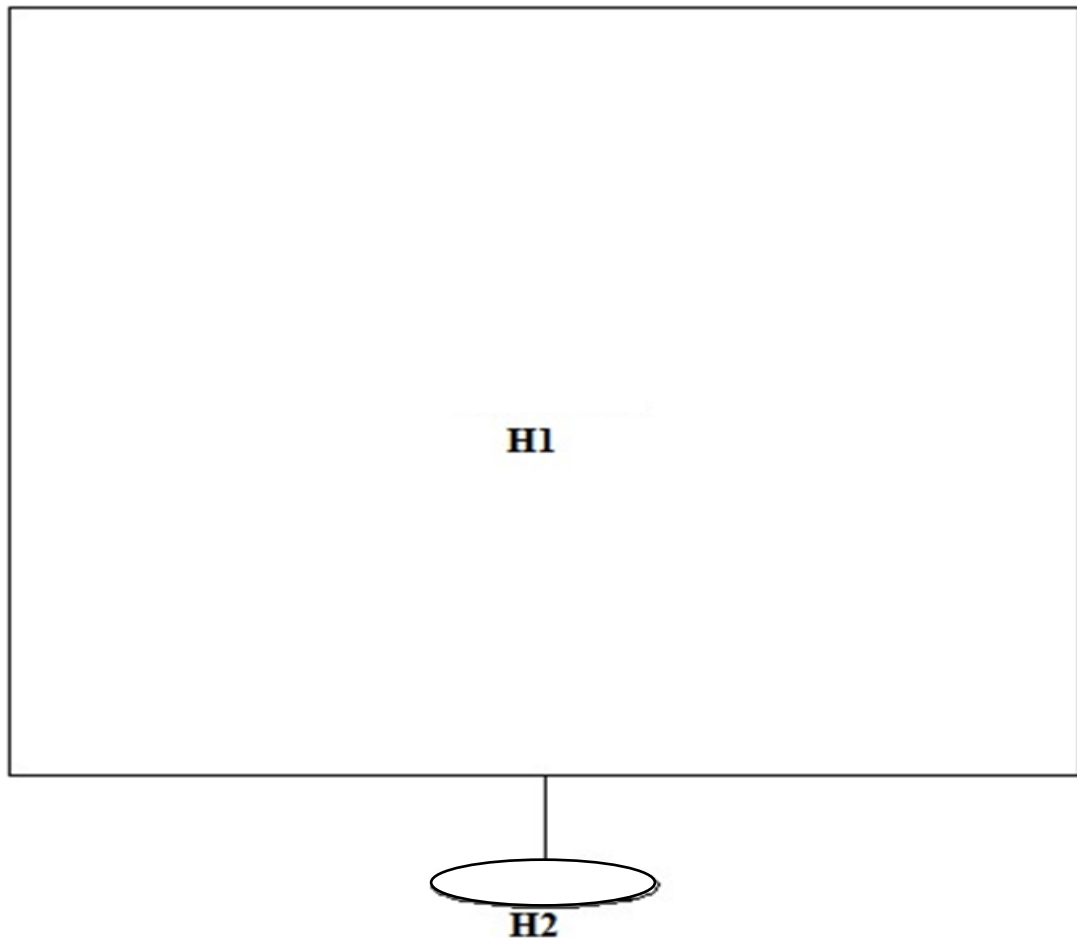
**Figura 10** - Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI (2014-2015) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de *A. albopictus*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Em negrito estão identificados os haplótipos encontrados no município de São Lourenço da Mata. H1 - haplótipo 1; H2 - haplótipo 2; H3 - haplótipo 3; H4 - haplótipo 4; H5 - haplótipo 5; H6 - haplótipo 6; H7 - haplótipo 7; H8 - haplótipo 8; H9 - haplótipo 9. Forma quadrada representa o haplótipo mais antigo e que deu origem aos demais haplótipos, representados por formas ovais.

**Figura 11** - Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI (2015-2016) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de *A. albopictus*.



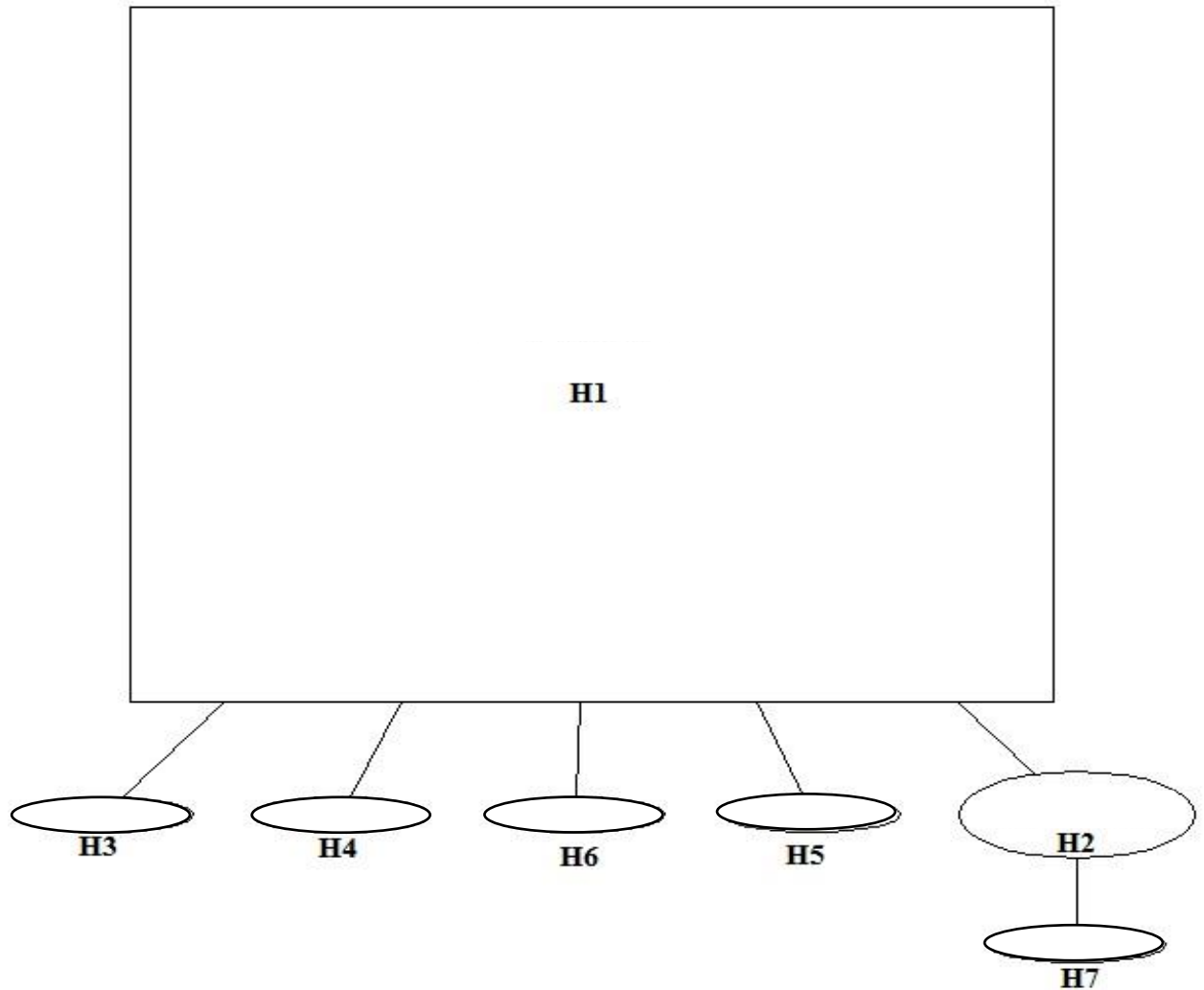
Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Em negrito estão identificados os haplótipos encontrados no município de São Lourenço da Mata. H1- haplótipo 1; H2 – haplótipo 2. Forma quadrada representa o haplótipo mais antigo e que deu origem ao outro haplótipo, representado por forma oval.

Em análise da distribuição dos haplótipos entre as populações de *A. albopictus* em São Lourenço da Mata para o gene ND5 foram observados sete haplótipos na análise inicial (2014-2015), onde o haplótipo 1 (H1) foi o mais abundante (N= 77 – 86,51%) e encontrado em todas as três populações OM, AP e PC. Na análise final deste mesmo gene (2015-2016) foram encontrados três haplótipos, sendo o H1 o mais abundante também (N= 126 – 97,67%) e encontrado também nas três populações estudadas. O haplótipo 2 (H2) foi observado como o segundo mais comum, encontrado em sete indivíduos exclusivamente em PC para análise 2014-2015, e observado em dois indivíduos exclusivamente em OM para análise 2015-2016. O haplótipo 3 (H3) foi encontrado em ambas as análises apenas para um indivíduo, na análise inicial do gene ND5 foi encontrado exclusivamente em AP e na análise final foi observado



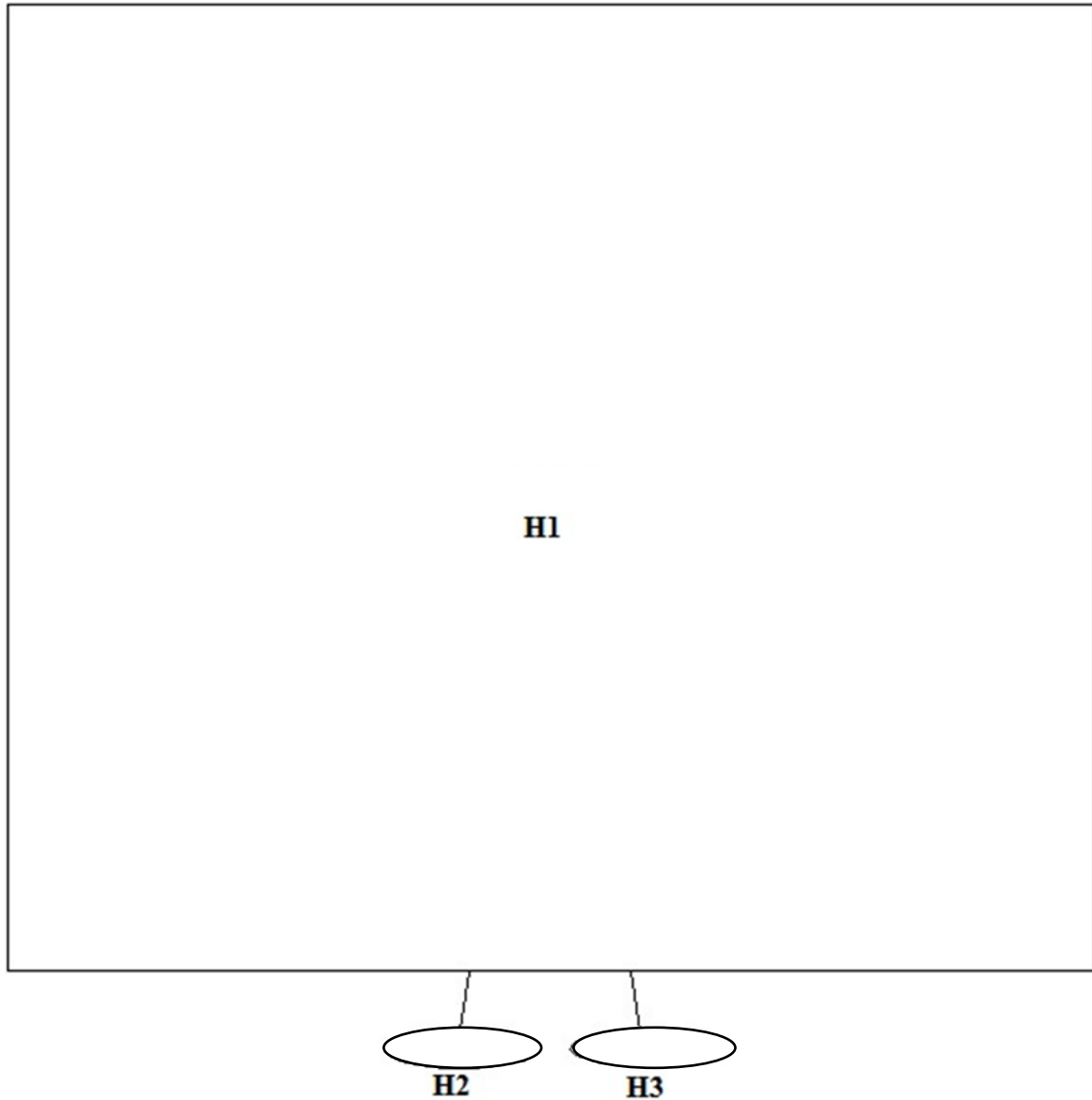
**Figura 12** - Rede de haplótipos do gene mitocondrial ND5 (2014-2015) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de *A. albopictus*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Em negrito estão identificados os haplótipos encontrados no município de São Lourenço da Mata. H1 - haplótipo 1; H2 - haplótipo 2; H3 - haplótipo 3; H4 - haplótipo 4; H5 - haplótipo 5; H6 - haplótipo 6; H7 - haplótipo 7. Forma quadrada representa o haplótipo mais antigo e que deu origem aos demais haplótipos, representados por formas ovais.

**Figura 13** - Rede de haplótipos do gene mitocondrial ND5 (2015-2016) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de *A. albopictus*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Em negrito estão identificados os haplótipos encontrados no município de São Lourenço da Mata. H1- haplótipo 1; H2 – haplótipo 2; H3 – haplótipo 3. Forma quadrada representa o haplótipo mais antigo e que deu origem aos demais haplótipos, representados por formas ovais.

A partir de análise combinada dos genes COI e ND5 para espécie *A. albopictus* das três áreas de estudo no período inicial foram obtidos os valores do teste D de Tajima para Arena Pernambuco: -1.732; para Obra de Maria: -1.776; e para Parque Capibaribe: -1.311 e os valores do teste  $F_s$  de Fu, para Arena Pernambuco: -3.020; Obra de Maria: -4.570; e Parque Capibaribe: -2.268. Em relação ao período final foi possível obter os valores do teste D de Tajima para Arena Pernambuco: 0.000; para Obra de Maria: -1.670; e para Parque Capibaribe: 0.000 e os

valores do teste FS de Fu, para Arena Pernambuco: 0.000; para Obra de Maria: -2.288; e para Parque Capibaribe: 0.000 (Tabela 5).

**Tabela 5** – Dados da análise combinada dos genes COI e ND5 para os testes de neutralidade na espécie *A. albopictus*.

Período	Genes	Localidades	Tajima's D	Fu's Fs
<b>Inicial</b> (2014-2015)	<b>COI</b> <b>ND5</b>	<b>AP</b>	-1.732*	-3.020**
		<b>OM</b>	-1.776*	-4.570**
		<b>PC</b>	-1.311	-2.268*
<b>Final</b> (2015-2016)	<b>COI</b> <b>ND5</b>	<b>AP</b>	0.000	0.000
		<b>OM</b>	-1.670*	-2.288**
		<b>PC</b>	0.000	0.000

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AP:Arena Pernambuco; OM:Obra de Maria; PC: Parque Capibaribe. \* p<0.05; \*\* p<0.01;

O valor obtido de  $F_{ST}$  entre as populações da espécie *A. albopictus* relativo ao período inicial foi  $F_{st} = 0.607$ . Em relação a análise do período final o valor foi  $F_{st} = 0.044$  (Tabela 6).

**Tabela 6** – Índice de Fixação ( $F_{ST}$ ) baseado em análise combinada dos genes COI e ND5 em amostras de *A. albopictus*.

Período	Genes	Índice de Fixação
<b>Inicial</b> (2014-2015)	<b>COI-ND5</b>	$F_{st} = 0.607$
<b>Final</b> (2015-2016)	<b>COI-ND5</b>	$F_{st} = 0.044$

Fonte: elaborado pelo autor.

A análise da variância molecular para o período inicial foi: entre as populações 60.71% de variação e dentro das populações 39.29% de variação. Para o período final foi: entre as populações 4.48 % de variação e dentro das populações 95.52 % de variação (Tabela 7).

**Tabela 7** - Análise da variância molecular (AMOVA) baseada em análise combinada dos genes COI e ND5 em amostras de *A. albopictus*.

Período	Genes	AMOVA	
		Fonte de variação	% de variação
Inicial (2014-2015)	COI-ND5	Entre populações	60.71
		Dentro das populações	39.29
Final (2015-2016)	COI-ND5	Entre populações	4.48
		Dentro das populações	95.52

Fonte: elaborado pelo autor.

### 8.3.2 Análise de dados *Aedes aegypti*

Devido ao reduzido número de indivíduos da espécie *A. aegypti* na amostragem coletada, as análises referentes ao gene COI, no período inicial, foram realizadas apenas para a área de PC, onde foram observados 8 haplótipos e diversidade nucleotídica de 0,00326. No mesmo período e para a mesma área, indivíduos de *A. aegypti* processados utilizando fragmento do gene ND5 foi identificado 1 haplótipo e diversidade nucleotídica de 0,00000. No período final, indivíduos de *A. aegypti* foram analisados com o gene COI das áreas AP, OM, PC em avaliação conjunta, foram observados 3 haplótipos e diversidade nucleotídica de 0,00121. Nas análise referente ao mesmo período utilizando fragmento do gene ND5 das três áreas de estudo, foi possível identificar a presença de 7 haplótipos e diversidade nucleotídica de 0,00091 (Tabela 8).

**Tabela 8** – Dados das análises dos genes COI e ND5 em *A. aegypti* provenientes de São Lourenço da Mata.

Gene	Localidades	N		S		K		$\pi$	
		2014 2015	2015 2016	2014 2015	2015 2016	2014 2015	2015 2016	2014 2015	2015 2016
COI	AP								
	OM	100	154	10	13	08	03	0,00326	0,00121
	PC	*PC							
ND5	AP								
	OM	101	150	00	11	01	07	0,00000	0,00091
	PC	*PC							

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AP: Arena Pernambuco; OM: Obra de Maria; PC: Parque Capibaribe N: tamanho amostral; K: número de haplótipos;  $\pi$ : diversidade nucleotídica; \*PC: apenas Parque Capibaribe.



Em análise da distribuição haplotípica das populações de *A. aegypti* em São Lourenço da Mata para o gene COI, foram encontrados 8 haplótipos no período 2014-2015, sendo o haplótipo 1 (H1) o mais abundante (N= 68 – 68%) e encontrado em PC. No período 2015-2016 foram encontrados 3 haplótipos, com o H1 sendo o mais abundante também (N= 144 – 93,5%) e encontrado em PC e AP. O haplótipo 8 (H8) foi o segundo mais frequente na análise inicial, encontrado em 20 indivíduos de PC. Na análise final o H2 foi o segundo mais frequente, encontrado em seis indivíduos de PC. O H3 apareceu em ambas as análises para o gene COI em *A. aegypti*, estando presente em três indivíduos na análise 2014-2015 em PC, e em quatro indivíduos na análise 2015-2016 também em PC. Os haplótipos H4-H8 apareceram apenas na análise inicial, H4 foi encontrado em dois indivíduos, H5, H6 e H7 foram encontrados em indivíduos únicos cada e H8 foi observado em 20 indivíduos, todos estes presentes apenas em PC. Na análise no momento inicial a população de PC foi considerada polimórfica, haplótipos H1-H8 todos encontrados nesta população. No momento final de avaliação a população de AP foi classificada como monomórfica (H1), e a população de PC foi classificada como polimórfica (H1, H2 e H3), haplótipos 2 e 3 exclusivos de PC (Tabela 9).

**Tabela 9** – Haplótipos do gene mitocondrial COI em *A. aegypti*, mostrando sítios variáveis quando comparados ao haplótipo mais comum (H1), suas localidades e posições na sequência do gene.

Gene	Localidades	K	N		Posição na sequência do gene COI									
			2014 2015	2014 2015	11	13	64	94	167	235	451	532	542	581
COI	PC	H1	68		T	C	T	G	G	G	C	A	T	G
		H2	04		.	.	.	.	A	.	.	.	.	.
		H3	03		.	.	.	.	G	A	.	.	.	.
		H4	02		.	.	.	A	.	G	.	.	.	.
		H5	01		.	G	.	G	.	.	.	.	.	.
		H6	01		G	G	C	.	.	.	A	.	A	T
		H7	01		G	G	C	.	.	.	A	C	A	T
		H8	20		G	G	C	.	.	.	C	A	A	T
COI	PC, AP PC PC													

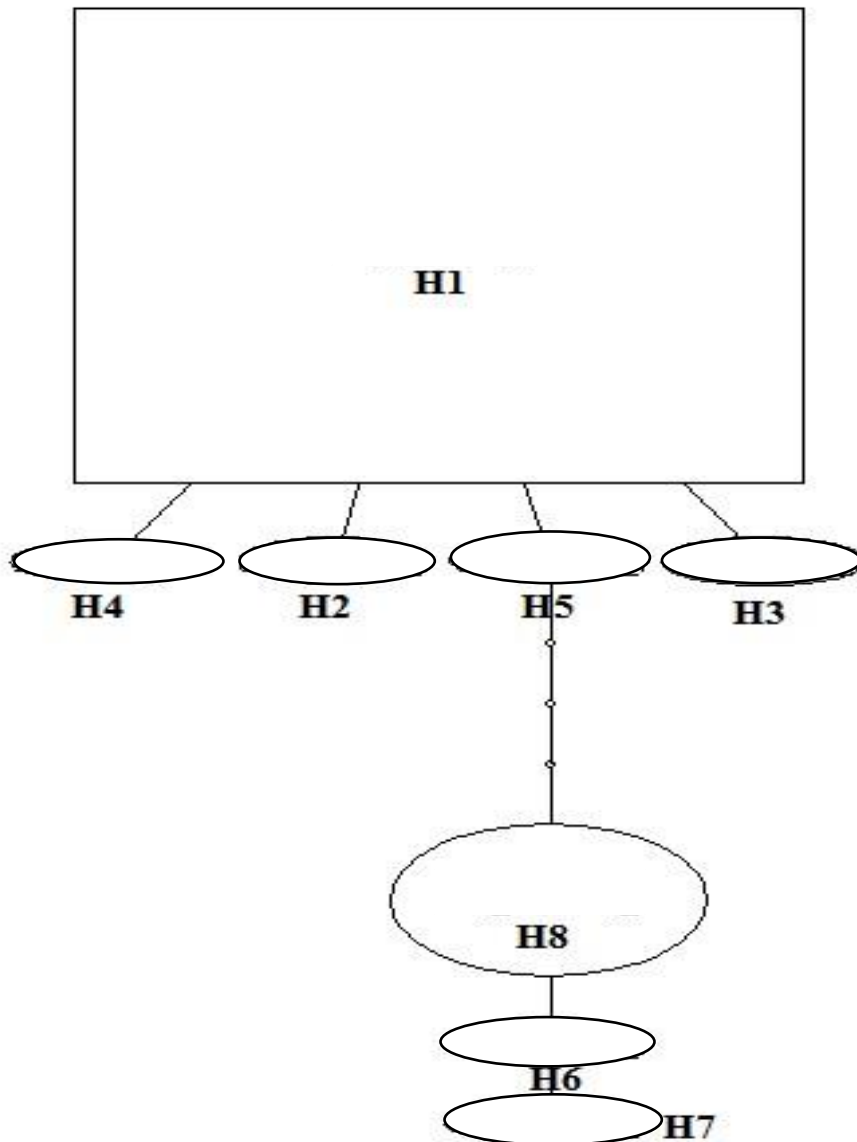
Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AP: Arena Pernambuco; PC: Parque Capibaribe; K: número de haplótipos; N: número de indivíduos encontrados em cada haplótipo;

Para mostrar a relação entre os diferentes haplótipos do gene COI encontrados nas populações de *A. aegypti* no município de São Lourenço da Mata, foram geradas redes de haplótipos através do software TCS, a primeira rede demonstra as relações entre os haplótipos da análise 2014-2015 (Figura 14) e a segunda rede apresenta as relações entre os haplótipos

encontrados na análise 2015-2016 (Figura 15). A forma quadrada corresponde ao haplótipo mais antigo e que deu origem aos demais haplótipos, que são representados pelas formas ovais. O tamanho das formas é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo, corresponde a frequência do haplótipo.

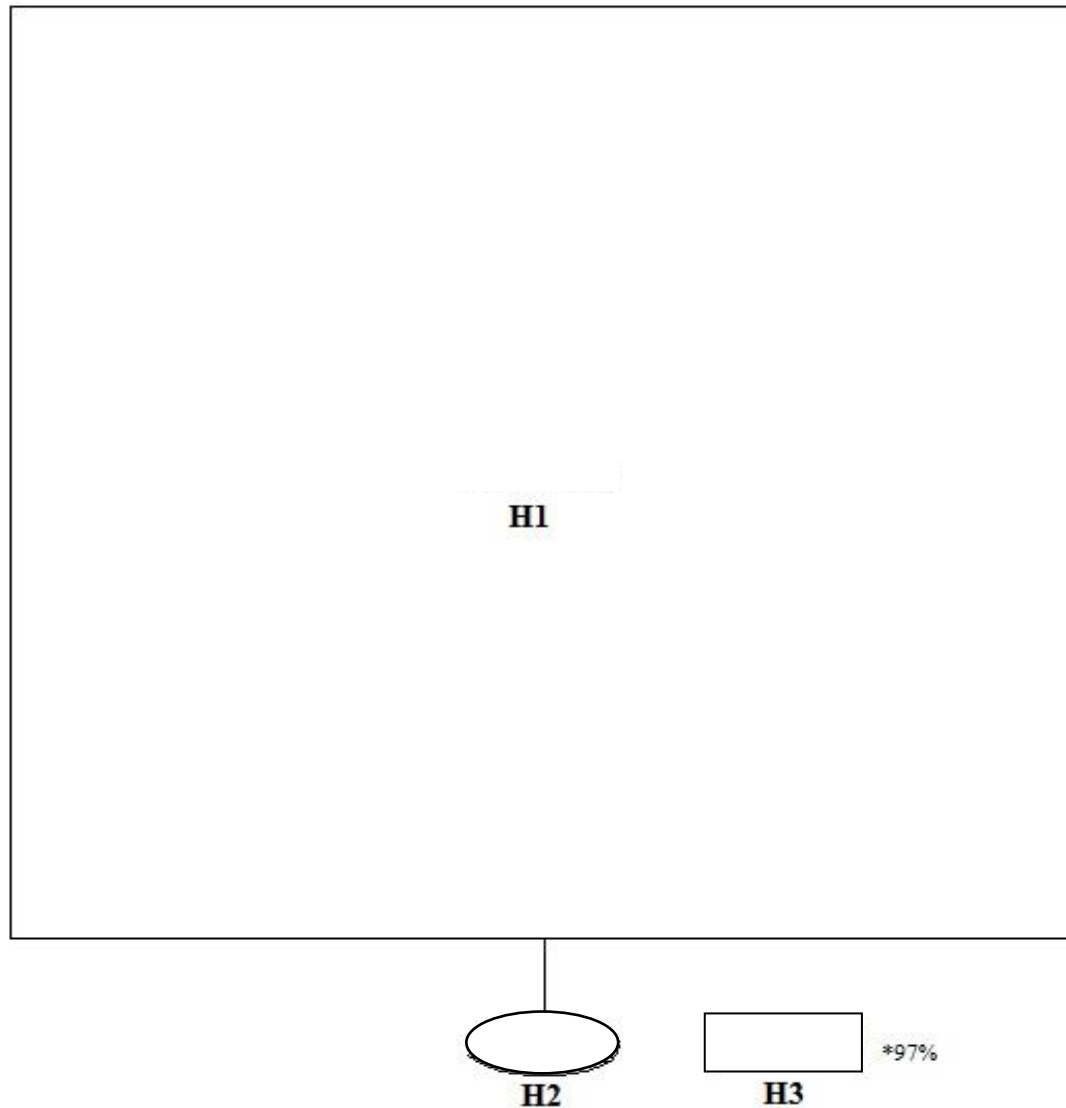
**Figura 14** - Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI (2014-2015) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de *A. aegypti*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Em negrito estão identificados os haplótipos encontrados no município de São Lourenço da Mata. H1 - haplótipo 1; H2 - haplótipo 2; H3 - haplótipo 3; H4 - haplótipo 4; H5 - haplótipo 5; H6 - haplótipo 6; H7 - haplótipo 7; H8 - haplótipo 8. Forma quadrada representa o haplótipo mais antigo e que deu origem aos demais haplótipos, representados por formas ovais.

**Figura 15** - Rede de haplótipos do gene mitocondrial COI (2015-2016) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de *A. aegypti*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Em negrito estão identificados os haplótipos encontrados no município de São Lourenço da Mata. H1- haplótipo 1; H2 – haplótipo 2; H3 – haplótipo 3 (O H3 está distante dos H1 e H2 com 97% de certeza pelo bootstrap no método Neighbor-Joining no software MEGA 7.0). Forma quadrada representa o haplótipo mais antigo e que deu origem aos demais haplótipos, representados por formas ovais.

Em observação da distribuição dos haplótipos em São Lourenço da Mata para a espécie *A. aegypti* com o gene ND5, na análise inicial (2014-2015) foi encontrado apenas o haplótipo 1 (H1) em 101 indivíduos de PC. Na análise 2015-2016 foram encontrados sete haplótipos, sendo o H1 o mais abundante (N= 141 – 94%) e encontrado em OM, AP e PC. Os haplótipos entre H2-H7 foram encontrados somente na análise final do gene ND5 para *A. aegypti*. O H2, H5 e H7 foram os que se apresentaram mais abundantes após o H1, com dois indivíduos cada e encontrados em PC exclusivamente. Os haplótipos H3, H4 e H6 foram encontrados em

indivíduos únicos cada e observados exclusivamente em PC. No momento de avaliação inicial a população de PC foi considerada monomórfica, sendo encontrado apenas um haplótipo nesta (H1). No momento de observação final foram encontradas duas populações monomórficas, OM (H1) e AP (H1), e uma população polimórfica, PC, que apresentou os sete haplótipos encontrados para este momento de avaliação, sendo os haplótipos H2-H7 exclusivos de PC (Tabela 10).

**Tabela 10** – Haplótipos do gene mitocondrial ND5 em *A. aegypti*, mostrando sítios variáveis quando comparados ao haplótipo mais comum (H1), suas localidades e posições na sequência do gene.

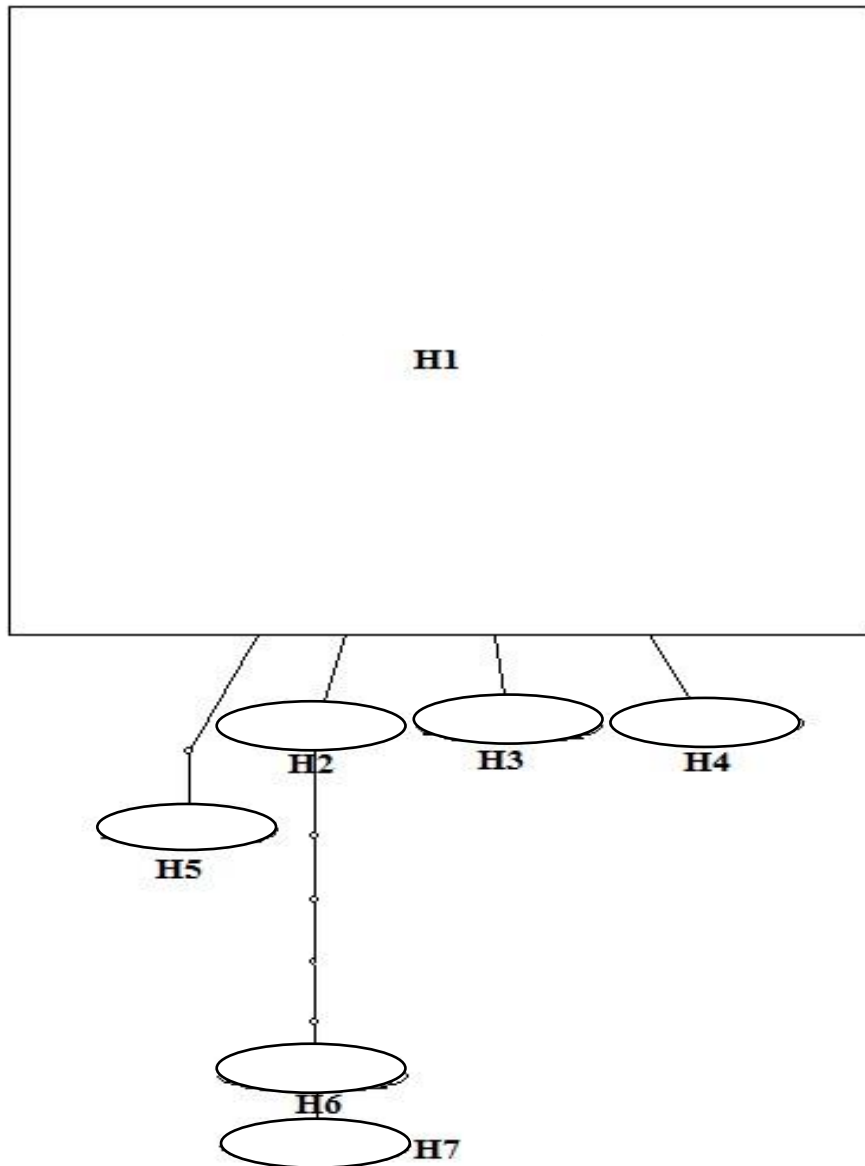
Gene	Localidades	K	N	Posição na sequência do gene ND5												
				2014-2015												
ND5	PC	H1	101	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	
				00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	
Gene	Localidades	K	N	Posição na sequência do gene ND5												
				2015-2016												
ND5	OM, AP, PC	H1	141	10	13	14	15	22	79	127	306	307	313	370		
				T	T	C	C	A	C	T	T	T	T	T		
				H2	02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
				H3	01	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.
				H4	01	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.
				H5	02	.	.	.	C	.	.	.	A	A	.	.
				H6	01	C	.	.	.	G	T	C	T	T	C	C
				H7	02	C	C	.	.	G	T	C	T	T	C	C

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AP: Arena Pernambuco; PC: Parque Capibaribe; OM: Obra de Maria; K: número de haplótipos; N: número de indivíduos encontrados em cada haplótipo;

A relação entre os diferentes haplótipos do gene ND5 encontrados nas populações de *A. aegypti* em São Lourenço da Mata foi evidenciada por redes de haplótipos desenvolvidas no software TCS, a análise 2014-2015 não produziu rede haplotípica, havia apenas um haplótipo (H1) neste momento de avaliação. A análise 2015-2016 produziu rede que apresenta as relações entre os haplótipos encontrados neste momento de análise (Figura 16). A forma quadrada corresponde ao haplótipo mais antigo e que deu origem aos demais haplótipos, que são representados pelas formas ovais. O tamanho das formas é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo, corresponde a frequência do haplótipo.

**Figura 16** - Rede de haplótipos do gene mitocondrial ND5 (2015-2016) a partir da análise dos haplótipos identificados em amostras de *A. aegypti*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: Em negrito estão identificados os haplótipos encontrados no município de São Lourenço da Mata. H1 - haplótipo 1; H2 - haplótipo 2; H3 - haplótipo 3; H4 - haplótipo 4; H5 - haplótipo 5; H6 - haplótipo 6; H7 - haplótipo 7. Forma quadrada representa o haplótipo mais antigo e que deu origem aos demais haplótipos, representados por formas ovais.

A partir da análise da área de Parque Capibaribe em avaliação combinada dos genes COI e ND5 para o período inicial de *A. aegypti* foi possível obter o valor do teste D de Tajima: -1.555; e o valor do teste FS de Fu: -2.071. Em relação ao período final, na avaliação conjunta das áreas de Parque Capibaribe e Arena PE e análise combinada de COI e ND5 para a espécie *A. aegypti* foram encontrados os valores do teste D de Tajima para Arena Pernambuco: 0.000;

e para Parque Capibaribe: -2.049 e os valores do teste  $F_S$  de  $F_u$ , para Arena: 0.000 e para Parque Capibaribe: -1.855. (Tabela 11).

**Tabela 11** – Dados da análise combinada dos genes COI e ND5 para os testes de neutralidade na espécie *A. aegypti*.

Período	Genes	Localidades	Tajima's D	Fu's Fs
<b>Inicial</b> <b>(2014-2015)</b>	<b>COI</b> <b>ND5</b>	<b>PC</b>	-1.555*	-2.071
<b>Final</b> <b>(2015-2016)</b>	<b>COI</b> <b>ND5</b>	<b>AP</b> <b>PC</b>	0.000 -2.049**	0.000 -1.855

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: AP:Arena Pernambuco; OM:Obra de Maria; PC: Parque Capibaribe. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ;

Devido a utilização de apenas uma área para as análises do  $F_{ST}$  para a espécie *A. aegypti* no período inicial não houveram dados representativos. O valor obtido de  $F_{ST}$  entre as populações de *A. aegypti* na análise relativa ao período final foi  $F_{ST} = 0.097$  (Tabela 12).

**Tabela 12** – Índice de Fixação ( $F_{ST}$ ) baseado em análise combinada dos genes COI e ND5 em amostras de *A. aegypti*.

Período	Genes	Índice de Fixação
<b>Inicial</b> <b>(2014-2015)</b>	<b>COI-ND5</b>	ND
<b>Final</b> <b>(2015-2016)</b>	<b>COI-ND5</b>	$F_{ST} = 0.097$

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: ND – Não Determinado.

A análise da variância molecular para a espécie *A. aegypti* no período inicial não apresentou dados representativos, pois havia apenas uma área para performar a análise. O resultado do teste AMOVA do período final para *A. aegypti* entre as populações foi 9.74 % de variação e dentro das populações foi 90.26 % de variação (Tabela 13).

**Tabela 13** - Análise da variância molecular (AMOVA) baseada em análise combinada dos genes COI e ND5 em amostras de *A. aegypti*.

Período	Genes	AMOVA	
		Fonte de variação	% de variação
<b>Inicial</b> (2014-2015)	<b>COI-ND5</b>	Entre populações	ND
		Dentro das populações	ND
<b>Final</b> (2015-2016)	<b>COI-ND5</b>	Entre populações	9.74
		Dentro das populações	90.26

Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: ND – Não Determinado.

## 9 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido de forma a responder aos objetivos propostos, e através de tais objetivos foi possível observar o perfil de dispersão das espécies *Aedes aegypti* e *A. albopictus* no município de São Lourenço da Mata, cidade da Região Metropolitana de Recife, relacionado ao processo de urbanização. Foi possível inferir sobre a estruturação genética, estimar o fluxo gênico e a distância genética das populações destas espécies nas áreas estudadas, através de índices como o  $F_{ST}$ , além de ser possível avaliar as relações filogenéticas existentes nos mosquitos das espécies estudadas.

Em relação a análise da dispersão de mosquitos das espécies *A. albopictus* e *A. aegypti* em três áreas de SLM, foi possível observar a prevalência de indivíduos da espécie *A. albopictus* nas áreas de AP e OM. Estas áreas apresentam essencialmente Mata Atlântica e estão se tornando cada dia mais urbanizadas, dado que corrobora com Pessoa et al. (2013) que afirmam que a espécie *A. albopictus* é encontrada originalmente habitando áreas suburbanas e rurais, com facilidade em se adaptar ao ambiente peri-doméstico, como o encontrado nas duas áreas supracitadas no município de SLM. Entre os dois momentos de coleta é possível observar um aumento no número de mosquitos de ambas espécies do período inicial para o final, representando um aumento da infestação das espécies do gênero *Aedes* no município, que pode estar ligado a inúmeros fatores, dentre eles o processo de urbanização crescente na área. Na área de PC, região bastante urbanizada e com grande circulação de pessoas, foi observada a prevalência da espécie *A. aegypti*, achado concordante com Calvez et al. (2016), que afirmam em seu estudo que a espécie *A. aegypti* é considerada doméstica e está fortemente associada ao homem e suas atividades, como a urbanização, e com Zahouli et al (2016) que observaram em seu estudo sobre ecologia e composição das espécies do gênero *Aedes* em Costa do Marfim a presença exclusiva da espécie *A. aegypti* em áreas urbanas.

Nas análises de dados da espécie *A. albopictus* foi possível observar um processo de expansão populacional pós-período de baixo tamanho efetivo devido a provável evento de gargalo de garrafa, que reduziu o número efetivo das populações. Esse fato pode estar associado as modificações ambientais intensas pelas quais o município passou. Os valores decrescentes de diversidade genética encontrados para os dois genes entre os momentos inicial e final de observação, COI:  $\pi = 0,00121 - 0,00005$ ; ND5:  $\pi = 0,00074 - 0,00011$ , e número também decrescente de haplótipos encontrados, COI:  $K = 09 - 02$ ; ND5:  $K = 07 - 03$ , dão suporte a essa sugestão.



Os resultados dos testes de neutralidade para essa espécie confirmam o processo de crescimento populacional, através de valores negativos e significantes dos testes D de Tajima e  $F_S$  de Fu. Estes dados são concordantes com Maia et al. (2009) que em seu estudo encontraram baixos valores de diversidade genética e valores não significativos para os testes de neutralidade utilizando o gene mitocondrial ND5, devido a uma introdução recente da população de *A. albopictus* que estudou na região de Manaus. Os dados do presente estudo são concordantes também com o encontrado por Paupy et al. (2008) que em seu estudo sobre fluxo gênico entre populações de *Aedes aegypti* no Norte de Camarões encontraram valores negativos e significantes para o teste de neutralidade D de Tajima, refletindo expansão das populações observadas e/ou seleção purificadora.

Os valores de zero encontrados nas áreas de AP e PC nos testes de neutralidade no momento de avaliação final não foram significantes, demonstrando que estas populações também estão em processo de crescimento. Paupy et al. (2012) também observaram valor negativo no teste D de Tajima realizado para suas populações de estudo ( $D = -2.47$ ,  $p < 0.01$ ) sugerindo um excesso de alelos raros que poderiam refletir instabilidade demográfica (expansão populacional) e/ou seleção purificadora, semelhante ao observado para as populações estudadas em SLM.

Os resultados obtidos do índice de fixação ( $F_{ST}$ ) confirmaram o processo de crescimento observado nas populações de *A. albopictus*, havendo entre os momentos de avaliação inicial e final um aumento na troca de material genético evidenciado por baixos valores de  $F_{ST}$  (0,607 – 0,044), caracterizando elevado fluxo gênico. Os resultados do AMOVA mostraram redução na variação entre populações (60,71% – 4,48%), e aumento da variação dentro das populações (39,29% - 95,52%), ficando claro que as trocas de informação genética e crescimento populacional continuam entre as populações estudadas para *A. albopictus*. Em estudo desenvolvido por Almeida et al. (2005) foi observada baixa diferenciação genética associada ao elevado fluxo gênico entre as populações avaliadas, algumas distantes até 740 km, assim como no presente estudo, onde observamos mesmo com distância geográfica uma elevada troca gênica entre as populações de SLM.

Analisando os dados de *A. aegypti* é possível visualizar um processo de expansão das populações dessa espécie no município, mostrado pelos valores decrescentes de diversidade nucleotídica encontrados para COI:  $\pi = 0,00326 - 0,00121$  e ND5:  $\pi = 0,00000 - 0,00091$ . É possível notar um leve aumento da diversidade nucleotídica para o gene ND5 que está ligado ao aumento de indivíduos na análise final que conferiram maior número de sítios segregantes,

variação do número de haplótipos e consequente aumento de diversidade nucleotídica, do momento de avaliação inicial para o final.

Os resultados dos testes de neutralidade mostraram através de valores negativos e significantes que a população de *A. aegypti* das áreas de estudo permaneceram em processo de expansão. Os dados de  $F_{ST}$  (0,097) e AMOVA entre populações (9.74%) e dentro das populações (90.26%) confirmaram essa hipótese, através dos valores encontrados que demonstram alta taxa de fluxo gênico entre as populações e altos níveis de heterozigosidade dentro das populações, proporcionado pelo alto fluxo gênico. Dados similares foram encontrados por Calvez et al. (2016) em estudo sobre diversidade genética e filogenia do *Aedes aegypti* no Pacífico, onde observaram baixa estruturação genética com valores de  $F_{ST}$  entre 0.05 e 0.24, devido ao grande fluxo gênico entre as áreas estudadas.

Em contrapartida estes dados discordam de Failloux et al. (1995) em estudo sobre diferenciação genética de *Aedes aegypti* na Polinésia Francesa. Um baixo índice de fluxo gênico entre as populações estudadas em diferentes ilhas foi encontrado, demonstrando que populações de mosquito que estão de alguma forma isoladas geograficamente possuem menor troca de material genético, chegando ao ponto de não compartilharem mais informação genética com o passar do tempo. Paupy et al. (2012) observaram em seu estudo sobre estrutura genética e filogeografia de *A. aegypti* alta diferenciação genética, com alto valor de  $F_{ST}$  para 63 das 91 amostras das populações avaliadas, sugerindo que as populações desta espécie na Bolívia possuem grande estruturação genética, achado que difere do presente estudo.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram um crescimento populacional, após período de baixo tamanho efetivo, ocasionado por provável gargalo de garrafa relacionado as alterações no habitat dessas populações de mosquito. Os valores obtidos de  $F_{ST}$  também demonstraram que havia um fluxo gênico significativo entre as populações estudadas entre as três áreas de estudo no município, evidenciando o processo de expansão das populações das espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* na localidade.

A presença da BR-408 dividindo o triângulo das áreas de estudo em dois de um lado a AP e PC e de outro a OM ainda não representa uma barreira ao fluxo gênico das espécies alvo do estudo. De acordo com Carnaval (2002) o estabelecimento de barreiras ao fluxo gênico não ocorre necessariamente de forma rápida, pode consistir de um processo gradual ao qual as espécies respondem de acordo com sua ecologia. Com um tempo maior, ao longo dos anos, as populações de vetores das espécies estudadas do município de São Lourenço da Mata poderão apresentar perfis de diversidade genética distintos dos encontrados neste estudo.

Estes resultados mostram a importância de observar todos os aspectos de uma população de vetores, desde sua ecologia e biologia até suas características mais intrínsecas, para que se possa ter uma metodologia de vigilância e controle completa. Este foi um estudo pioneiro no município, pois traz a possibilidade do conhecimento sobre a diversidade e estrutura genética destas espécies na área, conhecimento que somado ao acompanhamento feito pela prefeitura dos índices de infestação de indivíduos das duas espécies estudadas e do número de casos de dengue, Zika e Chikungunya poderão auxiliar no surgimento de novas perspectivas para o controle destes vetores.

## 10 CONCLUSÕES

- a) As populações de *Aedes albopictus* e *A. aegypti* de São Lourenço da Mata (SLM) apresentaram diferenças nos índices de variabilidade genética dos genes mitocondriais COI e ND5, nos dois momentos analisados;
- b) Tanto para o gene COI, quanto para ND5, foi observado uma considerável diminuição do número de haplótipos e conseqüentemente da diversidade nucleotídica destes genes em ambas as espécies;
- c) O índice que estima a distância genética ( $F_{ST}$ ) entre as populações indicou uma redução de alta para moderada divergência genética entre as populações de *A. albopictus*, o que sugere uma maior taxa de fluxo gênico após um ano de estudo. Com relação a *A. aegypti*, a análise do último período de coleta revelou resultados similares de  $F_{ST}$ ;
- d) As populações de *A. albopictus* analisadas apresentaram uma notável diminuição da diversidade genética entre os dois momentos do estudo. A análise de apenas um momento de coleta de *A. aegypti* resultou em índices de diversidade genética similares a *A. albopictus*;
- e) Foi observado, dentro do período de um ano, uma mudança no padrão de dispersão de indivíduos da espécie *A. aegypti* no município de SLM, refletindo o resultado do processo de urbanização e conseqüente modificação ambiental encontrado na área;
- f) Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a utilização de ferramentas moleculares é bastante útil para caracterização genética das populações de vetores, complementando os dados eco biológicos e fornecendo condições de desenvolvimento de metodologias de vigilância e controle vetorial mais eficazes.

**REFERÊNCIAS**

- AGNARSSON, I.; AVILÉS, L.; MADDISON, W. P. Loss of genetic variability in social spiders: genetic and phylogenetic consequences of population subdivision and inbreeding. *Journal of evolutionary biology*, Basel, v. 26, n. 1, p. 27–37, 2013.
- ALMEIDA, F. C. et al. Population structure and genetic variability of mainland and insular populations of the Neotropical water rat *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae). *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 28, n. 4, p. 693-699, 2005.
- AMORIM, L. B. *Populações de Culex quinquefasciatus Say, 1983 (Diptera: Culicidae) do Estado de Pernambuco: diversidade genética e perfil de susceptibilidade ao organofosforado temephos*. 2013. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- ANASTÁCIO, D. B. *Estudo da distribuição especial da resistência ao inseticida químico Temephos em populações de Aedes aegypti no município de Recife-PE*. 2002. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade Frassinetti do Recife, Recife, 2002.
- ARIAS, M. C.; FRANCISCO, F. O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, G. A. R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. (Ed.) *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. Editora UNESC, Criciúma, p. 305-309, 2003.
- AVISE, J. C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Georgia: University of Georgia, 2004.
- AYRES, C. F. et al. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.
- AZEVEDO, R. S. S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Risco do chikungunya para o Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 49, n. 58: doi.org/10.1590/S0034-8910.2015049006219, 2016.
- BEHBAHANI, A. et al. Population differentiation and Wolbachia phylogeny in mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford, v. 19, n. 1, p. 66-71, 2005.
- BEERNTSEN, B. T. et al. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and molecular biology reviews*, Washington, v. 64, n. 1, p. 115-137, 2000.
- BIRUNGI, J.; MUNSTERMANN, L. E. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and the United States. *Annals of the Entomological Society of America*, College Park, v. 95, n. 1, p. 125–132. 2002

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, v.47 n. 6, 2016.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, v.47 n. 8, 2016.

CALVEZ, E. et al. Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 10, n. 1: e0004374. doi:10.1371/journal.pntd.0004374, 2016.

CARATINGA. Prefeitura Municipal. *Fumacê não é a forma ideal de combate aos pernilongos*. Disponível em: <[http://www.caratinga.mg.gov.br/Materia\\_especifica/17571/Fumace-nao-e-a-forma-ideal-de-combate-aos-pernilongos](http://www.caratinga.mg.gov.br/Materia_especifica/17571/Fumace-nao-e-a-forma-ideal-de-combate-aos-pernilongos)> Acesso em: 8 mar 2016.

CARNAVAL, A. C. O. Q. Phylogeography of four frog species in forest fragments of northeastern Brazil – A preliminary study. *Integrative and Comparative Biology*, Oxford, v. 42 n. 5, p. 913-921, 2002.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, 2000.

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

DAY, J. F. Mosquito Oviposition Behavior and Vector Control. *Insects*, Basel, v. 7, n. 4: doi:10.3390/insects7040065, 2016.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, Auckland, v. 1, p. 47-50, 2005.

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

FAILLOUX, A. B.; DARIUS, H.; PASTEUR, N. Genetic differentiation of *Aedes aegypti*, the vector of dengue virus in French Polynesia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, Fresno CA, v.11, n. 4, p.457-62, 1995.

FORATTINI, O. P. *Entomologia médica*. São Paulo: Ed. USP, Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1965.

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 20, n. 3, p.244-245, 1986.

FORATTINI, O. P. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia*. São Paulo: Ed. USP, 2002.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, Austin, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical Medicine and Health*, Nagasaki, v. 39, suppl. 4, p. 3-11, 2011.

GUBLER, D. J. The economic burden of dengue. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 86, n. 5, p. 743-744, 2012.

GUEDES, D. R. D. *Epidemiologia Molecular do Aedes albopictus (Diptera: Culicidae)*. 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. *Princípios de Genética de Populações*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HIRAGI, C. et al. Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 38, n. 4, p. 542-547, 2009.

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 31, n.5, p.906-908, 2015.

INFORME EPIDEMIOLÓGICO DO SUS - Estudos Experimentais sobre Competência Vetorial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para os Vírus da Dengue e Febre Amarela. Brasília, 2001.

KONONOV, A. et al. Genetic diversity among eight *Dendrolimus* species in Eurasia (Lepidoptera: Lasiocampidae) inferred from mitochondrial COI and COII, and nuclear ITS2 markers. *BMC Genetics*, London, v. 17, suppl. 3, p.157, 2016.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*, London, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

LAURITO, M. et al. COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 108, suppl. 1, p. 110-122, 2013.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LIMA, F. F. D. de O. *Variabilidade de Aedes aegypti em área urbana de Campina Grande-PB*. 2013. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

LOUNIBOS, L. P.; O'MEARA, G. *Invasion Biology of Aedes albopictus*. Disponível em: <<http://fmel.ifas.ufl.edu/research/exotic.shtml>> Acesso em: 8 mar 2016.

MAIA, R. T. et al. Reduced levels of genetic variation in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazonas State, Brazil, based on analysis of the mitochondrial DNA ND5 gene. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v.8, n.3, p. 998-1007, 2009.

- MAKHAWI, A. M. et al. Genetic variations of ND5 gene of mtDNA in populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) malaria vector in China. *Parasites & Vectors*, London, v. 6 n. 290: doi:10.1186/1756-3305-6-290, 2013.
- MARKERT, J. A. et al. Population genetic diversity and fitness in multiple environments. *BMC Evolutionary Biology*, London, v.10, n. 205: doi: 10.1186/1471-2148-10-205, 2010.
- MARRELLI, M. T. *Marcadores Moleculares e Controle Genético de Mosquitos Vetores*. 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- MELO, A. T. O. *Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica*. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico*, São Paulo, v.64, n.2, p.205-207, 2002.
- NEI, M. *DNA polymorphism within and between populations*. New York: Columbia University Press, 1987.
- NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- PADUAN, K. S. *Desenvolvimento de marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) para estudos populacionais do mosquito *Aedes aegypti* no Brasil*. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, São Paulo, 2008.
- PANCETTI, F. G. M. et al. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 48, n. 1, p.87-89, 2015.
- PANDEY, A. K. et al. Genetic diversity studies of kherigarh cattle based on microsatellite markers. *Journal of genetics*, London, v. 85, n.2, p. 117-122, 2006.
- PAUPY, C. et al. Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, Honolulu, v. 45, n. 3, p. 391-400, 2008.
- PAUPY, C. et al. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*, Amsterdam, v. 12, n. 6, p. 1260–1269, 2012.
- PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde. *Óbitos por dengue cai 273% em PE - 2012*. Disponível em: < [www.portal.saude.pe.gov.br/noticias/pe-apresenta-reducao-de-273-nos-obitos-por-dengue-2/](http://www.portal.saude.pe.gov.br/noticias/pe-apresenta-reducao-de-273-nos-obitos-por-dengue-2/) > Acesso em: 29 set. 2013
- PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde. *Estado antecipa Plano de Combate à Dengue 2014*. Disponível em: < [www.portal.saude.pe.gov.br/noticias/estado-antecipa-plano-de-combate-dengue-2014/](http://www.portal.saude.pe.gov.br/noticias/estado-antecipa-plano-de-combate-dengue-2014/) > Acesso em: 18 set. 2014
- PESSOA, M. V. E. et al. *Aedes albopictus* no Brasil: aspectos ecológicos e riscos de transmissão da dengue. *Entomotropica*, Maracay, v. 28, n. 2, p. 75-86, 2013.



REIS, L. M.; SILVA, R. E.; RODRIGUES, F.W. Influência do DNA mitocondrial no glaucoma primário de ângulo aberto sob a visão da cienciometria. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, Rio de Janeiro, v. 72, n. 5, p. 301-306, 2013.

REY, L. *Bases da parasitologia médica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2010.

RIBEIRO, A. F. et al. Mosquitoes in degraded and preserved areas of the Atlantic Forest and potential for vector-borne disease risk in the municipality of São Paulo, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, Santa Ana, v. 37, n. 2, p.316-324, 2012.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, London, v. 7, n. 9: doi:10.1186/1471-2180-7-9, 2007.

SANTOS, F.R. et al. *Diversidade Genética*. Biota Minas - Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

SANTOS, S. A.; BARBOSA, R. M. R. Immature *Aedes* mosquitoes colonize *Culex quinquefasciatus* breeding sites in neighborhoods in the municipality of Olinda, State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v.47, n.6, p. 775-777, 2014.

SÃO LOURENÇO DA MATA. *São Lourenço da Mata*. Disponível em: <<http://slm.pe.gov.br/a-prefeitura/sao-lourenco-da-mata/>> Acesso em: 8 mar 2016.

SERUFO, J.C. et al. Isolation of dengue vírus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos City, State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 88, n. 3, p.503-504, 1993.

SILVA, M. G. N. M.; RODRIGUES, M. A. B.; ARAUJO, R. E. Sistema de aquisição e processamento de imagens de ovitrampas para o combate à dengue. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 364-374, 2012.

SLATKIN, M. Gene flow and population structure. In: REAL, L. A. (Ed.). *Ecological Genetics*. Princeton: Princeton University Press, p. 3-17, 1994.

SOUSA, L. C. C. *Variabilidade genética, estrutura populacional e identidade molecular dos marsupiais *Didelphis albiventris* e *Marmosops incanus* no Brasil*. 2013. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2013.

SOUZA, C. F. M. *Um estudo clínico, bioquímico histoquímico e genético-molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial*. 2005. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SP). *Banco de imagens Programa de Controle do *Aedes aegypti* do estado de São Paulo*. Disponível em: <[www.escoladafamilia.fde.sp.gov.br/Dengue/Banco%20de%20imagens.ppt](http://www.escoladafamilia.fde.sp.gov.br/Dengue/Banco%20de%20imagens.ppt)> Acesso em: 8 mar 2016.

- WESSON, D. M.; PORTER, C. H.; COLLINS, F. H. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Molecular and Phylogenetic Evolution*, San Diego, v. 1, n. 4, p. 253-269, 1992.
- WEIR, B. S.; HILL, W. G. Estimating F-statistics. *Annual Review of Genetic*, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 721-750, 2002.
- WILSON, M. E.; SCHLAGENHAUF, P. *Aedes* and the triple threat of DENV, CHIKV, ZIKV e Arboviral risks and prevention at the 2016 Rio Olympic Games. *Travel Medicine and Infectious Disease*, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2016.
- WRIGHT, S. Isolation by Distance. *Genetics*, Austin, v.28, n. 2, p. 114-138, 1943.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, Austin, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.
- TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 25, suppl 1, p.S7-S18, 2009.
- THE DISEASE DAILY - *Brazil Rolls Out GM Mosquito Farms*. Disponível em: <<http://www.healthmap.org/site/diseasedaily/article/brazil-rolls-out-gm-mosquito-farms-71812>> Acesso em: 15 mar 2017.
- VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, Ananindeua, v.6, n.2, p.9-10, 2015.
- VEGA-RUA, A. et al. High Efficiency of Temperate *Aedes albopictus* to Transmit Chikungunya and Dengue Viruses in the Southeast of France. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 8, n. 3: e59716. doi:10.1371/journal.pone.0059716, 2013.
- VEGA-RÚA, A. et al. High vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor of the spread of Chikungunya Virus. *Journal of Virology*, Washington, v. 88, n. 11, p.6294-6306, 2014.
- ZAHOULI, J. B. Z. et al. Oviposition ecology and species composition of *Aedes* spp. and *Aedes aegypti* dynamics in variously urbanized settings in arbovirus foci in southeastern Côte d'Ivoire. *Parasites and Vectors*, London, v. 9, n. 523: doi: 10.1186/s13071-016-1778-9, 2016.