

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Evolução de mutações no gene do canal de sódio
associadas à resistência tipo *Kdr* em populações
de *Aedes (Stegomyia) aegypti* do Estado de São Paulo.

Eliane Batista

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

São Paulo
2012

Evolução de mutações no gene do canal de sódio
associadas à resistência tipo *Kdr* em populações
de *Aedes (Stegomyia) aegypti* do Estado de São Paulo.

Eliane Batista

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

São Paulo
2012

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa ou eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Mauro Toledo Marrelli, por todo o respaldo que uma pesquisa necessita.

Ao Dr. José Eduardo Bracco, pela orientação, pelas conversas e discussões que contribuíram para minha formação científica.

À CAPES pela bolsa de estudos e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Douglas Mascara, por me iniciar no mundo científico e por me fazer enxergar a ciência por um novo prisma.

À Dr^a Roseli Tuan, chefe do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, por abrir as portas do laboratório e permitir que os experimentos deste estudo fossem lá realizados. Agradeço ainda por todas as sugestões e críticas como membro da banca examinadora desta pesquisa.

À Dr^a Maria Anice Mureb Sallum pelas indagações, sugestões e críticas dispensadas a essa pesquisa e por compor a banca examinadora de defesa.

Às regionais de Santos, Campinas, Presidente Prudente e de Marília e Bauru, por ampliarem em uma semana as coletas dentro do programa de monitoramento de resistência do *Aedes aegypti* e por ceder esse material para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Instituto Butantã por ceder bactérias *E. coli* DH5 α para o processo de clonagem.

Aos colegas de laboratório Raquel Gardini Sanches Palasio, Diego Mendes Pereira, e em especial Marta Ribeiro da Silva, por toda a contribuição direta e

indireta nesse estudo, por toda a ajuda nos experimentos e discussões sobre técnicas, potenciais erros e soluções de problemas. Foram de especial valor.

A todos os aprimorandos da Sucen, os velhos e novos, por tornarem o horário do almoço mais divertido e por atenuarem os momentos de ansiedade e preocupações gerados pela pós-graduação.

À minha família, em especial minha mãe, pelo apoio necessário e por segurar a corda enquanto eu descia por ela. Ao meu irmão Dr. Eliezer Batista por todo o incentivo em prosseguir nos estudos e por servir de exemplo de perseverança e empenho na conquista de seus objetivos.

Ao meu noivo Ms. Rodrigo Fernando de Souza, pela disposição em discutir metodologias, conceitos biológicos e repartir todo conhecimento adquirido dentro de um laboratório de biologia molecular. Minha sincera gratidão pela paciência e compreensão e principalmente pela parceria na vida.

Finalmente, à Deus por tornar a vida, em todas as suas formas, tão interessante e prazerosa de se estudar e além disso por me permitir fazê-lo.

RESUMO

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 é o principal vetor do vírus do dengue sorotipo 1-4 (DEN 1-4) e da febre amarela.

Por não haver vacina disponível, a redução da transmissão da dengue só pode ser alcançada mediante o controle do vetor. Entre as medidas de controle, os órgãos responsáveis utilizam-se de compostos químicos, principalmente organofosforados. Além disso, devido ao grande incômodo causado pelo *Aedes*, a população faz uso de inseticidas domésticos, a base de piretróides, na tentativa de eliminar e ou repelir o mosquito.

As repetidas aplicações destes inseticidas e seu uso contínuo possibilitam o desenvolvimento de resistência em populações de mosquitos, processo resultante do efeito seletivo de exposição a dosagens que matam os indivíduos suscetíveis, sobrevivendo os resistentes, que transferem essa capacidade a seus descendentes.

Dentre os mecanismos de resistência, a redução da sensibilidade do sítio alvo é dada por mutações pontuais no sítio de ação dos inseticidas. Tais mutações podem levar a uma substituição de aminoácidos na molécula alvo e a uma diminuição da afinidade do inseticida com essa molécula.

No caso dos piretróides a mudança estrutural na molécula formadora do canal de sódio (Na_v), sítio alvo deste inseticida, é a causa da resistência tipo *knockdown resistance (kdr)*, um mecanismo de resistência bastante conhecido.

Em *Aedes aegypti*, a associação entre a presença da mutação V1016I e o fenótipo de resistência a piretróide já foi verificada em algumas regiões Brasileiras, utilizando primers alelo-específicos. A mutação I1011M também está associada à resistência a piretróides e já foi descrita no Brasil.

O objetivo deste estudo foi determinar a frequência destas mutações que levam às substituições V1016I e I1011M no $AaNa_v$ de populações de *Aedes aegypti* no estado de São Paulo e avaliar a evolução desta frequência no período de dez anos.

Para isso, indivíduos coletados em 2001 e 2011 tiveram o DNA extraído e primers alelo específicos foram utilizados para a realização de PCR a fim de verificar a presença da mutação.

Houve um aumento significativo do alelo 1016 Ile nas populações estudadas, comparando-se os anos 2001 e 2011. Entretanto para o alelo 1011 Met, somente a população de Santos apresentou essa diferença significativa.

Este aumento na frequência destas mutações pode ter sido ocasionado pela utilização de inseticidas domésticos à base de piretróides, uma vez que os órgãos de controle interromperam a utilização desses compostos.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, dengue, resistência, piretróides, canal de sódio.

ABSTRACT

The mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 is the main vector of the virus dengue serotypes 1-4 (DEN 1-4) and the yellow fever virus.

As there is not vaccine available, the reduction of the transmission of dengue can only be achieved by controlling the vector. Among the control measures, the responsible agencies use chemical compounds, organophosphate mainly. Furthermore, due to the big nuisance caused by *Aedes*, the population makes use of domestic insecticide, pyrethroids based, trying to eliminate or repel the mosquito.

The repeated applications of these insecticides and the continuous use of them enable the resistance development in the mosquitoes population. This process is the result of selective effect of exposure to dosages that can kill the susceptible individuals, and then the surviving individuals transfer these characteristics to their descendents.

Among the mechanism of resistance, the reduction of sensibility of the target site is given by punctual mutation (SNIP) in the action site of the insecticides. This mutation can lead to a substitution of amino acids in the target molecule and a reduction of affinity of the insecticide with this molecule.

In the case of pyrethroids, the structural change in the forming molecule of the sodium channel (Nav), target site of this insecticide, is the cause of knockdown resistance (kdr) type.

In *Aedes aegypti*, the association between the presence of the mutation V1016I and the pyrethroid resistance phenotype has been previously verified in many Brazilian regions, using Allele Specific primers. The mutation I1011M is also associated with the pyrethroids resistance and it has been described in Brazil.

The objective of the this study was to determine the frequency of the mutations that leads to the substitutions V1016I e I1011M in AaNav of the *Aedes aegypti* population in the state of Sao Paulo and to evaluate the evolution of this frequency in the period of ten years.

Therefore, collected individuals in 2001 and 2011 had their DNA extracted and specific primers were used for PCR, in order to verify the presence of the mutation.

There was a significant raise of allele 1016 Ile in the studied population, comparing the years 2001 and 2011. Nevertheless for allele 1011 Met, only the population of Santos showed this significant difference.

This raise in the frequency of these mutations may have been caused by the utilization of domestic insecticides pyrethroid based, whereas the control agencies interrupted the utilization of this compost.

Key words: *Aedes aegypti*, dengue, resistance, pyrethroid, sodium channel.

ÍNDICE

1. LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	9
2. LISTA DE FIGURAS.....	10
3. LISTA DE TABELAS.....	11
4. INTRODUÇÃO.....	12
4.1. DENGUE – SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA.....	12
4.1.1. No mundo.....	12
4.1.2. No Brasil.....	13
4.1.3. No Estado de São Paulo.....	15
4.2. VETOR E CONTROLE.....	16
4.3. INSETICIDAS.....	18
4.4. RESISTÊNCIA.....	21
4.4.1. Mecanismos.....	21
4.5. EVOLUÇÃO - VARIAÇÃO GENÉTICA DAS FREQUÊNCIAS.....	27
4.6. HIPÓTESE DE TRABALHO.....	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1. OBJETIVO GERAL.....	30
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
6. MATERIAIS E MÉTODOS	31
6.1. SELEÇÃO DE ESPÉCIMES PARA ANÁLISE.....	31
6.2. EXTRAÇÃO DO DNA	33
6.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	34
6.4. GENOTIPAGEM E FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO.....	36
6.5. CLONAGEM.....	36

6.6. SEQUENCIAMENTO.....	39
6.7. AMPLIFICAÇÃO ND4.....	40
6.8. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	40
6.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
6.9.1. Frequência genotípica.....	41
6.9.2. Frequência alélica.....	41
6.9.3. Cálculo das frequências genotípicas esperadas.....	42
6.9.4. Cálculo do número esperado.....	42
6.9.5. Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	42
6.9.6. Cálculo de significância das diferenças de frequência.....	43
6.9.7. Coeficiente de endocruzamento de Wright.....	44
6.9.8. Análise do mtDNA.....	45
7. RESULTADOS.....	46
7.1. EXTRAÇÃO DO DNA.....	46
7.2. AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E GENOTIPAGEM.....	47
7.3. CLONAGEM.....	50
7.4. SEQUENCIAMENTOS E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	52
7.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
7.5.1 Mutações V 1016 I.....	55
7.5.1.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg locus 1016.....	58
7.5.2 Mutações I 1011 M.....	59
7.5.2.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg – locus 1011.....	61
7.5.3. Análise do mtDNA (ND4).....	63

8. DISCUSSÃO.....	67
9. CONCLUSÕES.....	76
10. REFERÊNCIAS.....	77
11. ANEXOS.....	86

1. LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL	Microlitros
A→G	Substituição Adenina por Guanina
<i>AaNa_v</i>	Canal de sódio dependente de voltagem em <i>Aedes aegypti</i>
BA	Bahia
Bti	<i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i>
C	Aminoácido Cisteína
COEs	Carboxylesterases
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DEN 1-4	Vírus do dengue – sorotipos 1 – 4
E	Aminoácido Ácido Glutâmico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESTs	Esterases
F	Aminoácido Fenilalanina
G	Aminoácido Glicina
GST	Glutathione-S-Transferase
H	Aminoácido Histidina
HCl	Ácido clorídrico
I / Ile	Aminoácido Isoleucina
K	Aminoácido Lisina
<i>Kdr</i>	<i>knockdown resistance</i>
L	Aminoácido Leucina
M / Met	Aminoácido Metionina
MFOs	Oxidases de função mista
mL	Mililitros
Na ⁺	Íon sódio
Na _v	Canal de sódio dependente de voltagem
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
R	Aminoácido Arginina
RJ	Rio de Janeiro
rpm	rotações por minuto
S	Aminoácido Serina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SES-SP	Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde
T	Aminoácido Treonina
V / Val	Aminoácido Valina
W	Triptofano

2. LISTA DE FIGURAS

Nº Figura	Descrição	Pág
Figura 1	Países/Áreas com risco de transmissão de dengue no ano de 2010.	13
Figura 2	Classificação de áreas de vulnerabilidade para ocorrência de Dengue por Unidades Federadas, Brasil, 2011.	14
Figura 3	Número de casos confirmados de dengue no Estado de São Paulo, entre os anos 2001 e 2011.	15
Figura 4	Estrutura química dos piretróides.	20
Figura 5	Topologia transmembranosa do canal de sódio.	23
Figura 6	Modelo de ilha	29
Figura 7	Municípios utilizados na comparação entre as frequências dos anos 2001 e 2011.	31
Figura 8	Mapa do vetor de clonagem pGEM®-T Easy.	38
Figura 9	Eletroforese em gel de agarose 1%, DNA extraído pelo método fenol e clorofórmio.	46
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose 1%, DNA extraído pelo kit DNeasy® Blood & Tissue da empresa Qiagen.	47
Figura 11	Eletroforese em gel de agarose 4%. Padronização mutação V1016I	48
Figura 12	Eletroforese em gel de agarose 4%. Mutação V1016I	49
Figura 13	Eletroforese em gel de agarose 4%. Mutação I1011M	50
Figura 14	Alinhamento realizado através do programa Multialign versão 5.4.1.	51
Figura 15	Sequências consenso utilizando primers externos à mutação para confirmação da genotipagem.	53
Figura 16	Cromatograma da amostra de Santos (2.9) - mutação V1016I.	54
Figura 17	Cromatograma da amostra de Santos (2.6) - mutação V1016I	54
Figura 18	Cromatograma da amostra de Bauru (1.33) - mutação I1011M	54
Figura 19	Cromatograma da amostra de Bauru (1.11) - mutação I1011M	55
Figura 20	Cromatograma da amostra de Bauru (1.32) - mutação I1011M	55
Figura 21	Mapa do estado de São Paulo. Os gráficos mostram a frequência alélica da mutação V1016I no anos 2001 e 2011	57
Figura 22	Mapa do estado de São Paulo. Os gráficos mostram a frequência alélica da mutação I1011IM no anos 2001 e 2011.	61
Figura 23	Rede de Haplótipos encontrados em <i>Ae. aegypti</i> do Estado de São Paulo.	65

3. LISTA DE TABELAS

Nº	Descrição	Pág
Tabela 1	Mutações encontradas em algumas espécies de insetos associadas à redução da sensibilidade à piretróides.	24
Tabela 2	Mutações descritas em <i>Aedes aegypti</i> associadas à redução da sensibilidade a piretróides	25
Tabela 3	Mutações nos códons 1011 e 1016 no <i>AaNav</i> , encontrados no Brasil.	26
Tabela 4	Número de indivíduos de <i>Aedes aegypti</i> utilizadas nas genotipagens das mutações I1011M e V1016I.	33
Tabela 5	Sequência dos primers utilizados na amplificação do alelo Ile1016 e do alelo Met 1011.	35
Tabela 6	Tamanho dos amplicons gerados para cada alelo, utilizando primers alelo-específicos	36
Tabela 7	Primers utilizados para a amplificação e sequenciamento direto do PCR	39
Tabela 8	Frequência genotípica do códon 1016 do <i>AaNav</i> , em alguns municípios do estado de São Paulo.	56
Tabela 9	Frequência alélica do códon 1016 do <i>AaNav</i> , em alguns municípios do estado de São Paulo.	57
Tabela 10	Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o locus 1016 do <i>AaNav</i> em alguns municípios de São Paulo nos anos 2001 e 2011	58
Tabela 11	Estimativa de F_{IS} de Wright para o locus 1016	59
Tabela 12	Frequência genotípica do códon 1011 do <i>AaNav</i> , em alguns municípios do estado de São Paulo.	60
Tabela 13	Frequência alélica do códon 1011 do <i>AaNav</i> , em alguns municípios do estado de São Paulo.	60
Tabela 14	Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o locus 1011 do <i>AaNav</i> em alguns municípios de São Paulo nos anos 2001 e 2011.	62
Tabela 15	Estimativa de F_{IS} de Wright para o locus 1011	62
Tabela 16	Número de sequências de ND4 analisadas em cada localidade nos anos 2001 e 2011.	63
Tabela 17	Análise do polimorfismo observado entre as sequências de ND4 analisadas.	63
Tabela 18	Haplótipos encontrados nos municípios e o número de indivíduos que compartilham cada haplotipo em cada localidade no ano de 2001.	64
Tabela 19	F_{ST} pareado e N_m estimados entre populações de <i>Ae. aegypti</i> do estado de São Paulo coletadas em 2001.	66
Tabela 20	F_{ST} pareado e N_m estimados entre populações de <i>Ae. aegypti</i> do estado de São Paulo coletadas em 2011.	66

4. INTRODUÇÃO

4.1. DENGUE – SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

4.1.1 No mundo

A dengue é a arbovirose com maior incidência no mundo (CLARO *et al.*, 2004). Cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas sob o risco de contrair a infecção (figura 1), principalmente, em países com clima tropical e subtropical (WHO, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Nas Américas, no período que compreende 2001-2007, mais de 30 países notificaram 4.332.731 casos de dengue (OPS, 2009). Em 2010, o número de casos foi 1.663.276 e até o mês de agosto de 2011 dados preliminares registram 901.552 casos notificados. O espectro clínico da dengue inclui infecção assintomática, dengue clássico (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SCD) que é frequentemente fatal (SAN MARTÍN, 2010).

Apesar da existência de ciclos de transmissão silvestre entre macacos e mosquitos na África e na Ásia (DEGALLIER, *et al.*, 2001), nas Américas ela apresenta apenas o ciclo epidemiológico urbano. Os elementos desse ciclo são: o homem (hospedeiro), o *Aedes aegypti* (vetor) e o vírus (agente etiológico). Classificado como arbovírus da família Flaviviridae, o vírus dengue possui 4 sorotipos (DEN 1-4) (REBELO *et.al.*, 1999). Além de ser vetor dos quatro sorotipos do vírus da dengue, o mosquito *Ae. aegypti* também é vetor do vírus da febre amarela em seu ciclo urbano. Estas enfermidades estão disseminadas em áreas urbanas acompanhando a distribuição geográfica do vetor (BISSET *et al.*, 2003).

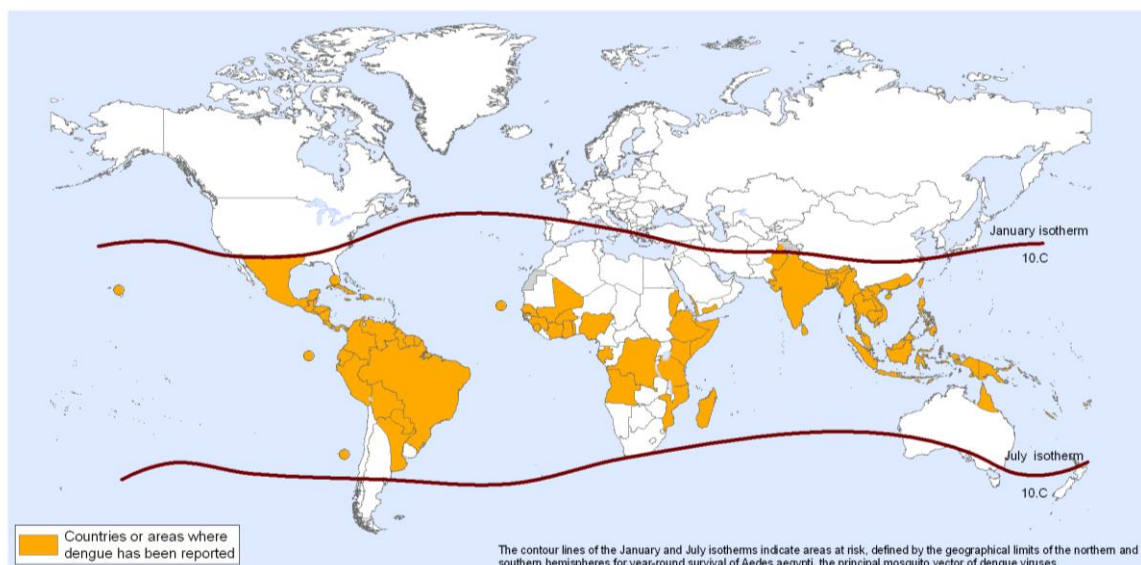


Figura 1: Países/Áreas com risco de transmissão do vírus dengue no ano de 2010, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (Fonte: WHO 2010).

4.1.2. No Brasil

Atualmente a dengue representa uma das principais endemias brasileiras (TAUIL, 2002). Existem relatos de casos de dengue no Brasil desde 1846, mas as primeiras citações na literatura científica são de 1916 (em São Paulo) e 1923 (em Niterói) descritos por Meira (1916) e Pedro (1923) *apud* BARRETO & TEIXEIRA (2008). Entretanto, a primeira evidência comprovada da ocorrência de uma epidemia de dengue no Brasil data de 1982, quando foram isolados os sorotipos DEN-1 e DEN-4, em Boa Vista (RR). Após esse primeiro surto, o sorotipo DEN-1 foi reintroduzido no Brasil em 1986, tendo sido isolado no Estado do Rio de Janeiro. A partir daí, a dengue passou a se disseminar para as cidades vizinhas (BARRETO & TEIXEIRA, 2008). Na década de 1990 e início de 2000, o Brasil apresentou picos epidêmicos com incidências de 71 (1991), 356 (1998) e 398 (2002) por 100 mil habitantes (BVS – RIPSA, 2007)

Na epidemia de 1991, que teve início na Região Sudeste, houve a introdução do sorotipo DEN-2. O sorotipo DEN-3 foi introduzido na mesma região em 2002, o que causou uma epidemia neste período (BVS – RIPSA, 2007).

Após a epidemia de 2002 houve queda na incidência de notificações. Entretanto, a partir de 2005, a tendência de crescimento retornou. Em 2008 foram

806.036 casos de dengue registrados em todo Brasil (425,1 por 100 mil habitantes) e em 2009 ocorreram 529.237 casos (276,4 por 100 mil habitantes). Já no ano de 2010, dados até o mês de julho registraram 788.809 (412,0 por 100 mil habitantes), o que representa aumento de 158,7% em relação a 2009 no mesmo período. No ano de 2010 houve circulação simultânea dos sorotipos DEN-1, com maior prevalência, DEN-2 e no final do período, a introdução do DEN-4 (SVS/MS, 2010).

No ano de 2011 foram notificados 764.032 casos de dengue (SVS/MS, 2012). Analisando as características epidemiológicas observadas em 2011, observamos o segundo ano de recirculação do sorotipo DEN-1 como tendência principal no país, porém com uma circulação importante de outros sorotipos, como o DEN-2 e DEN-4 (SVS/MS, 2011)

A figura 2 mostra as áreas de vulnerabilidade para ocorrência de dengue nos estados brasileiros nos ano de 2011.

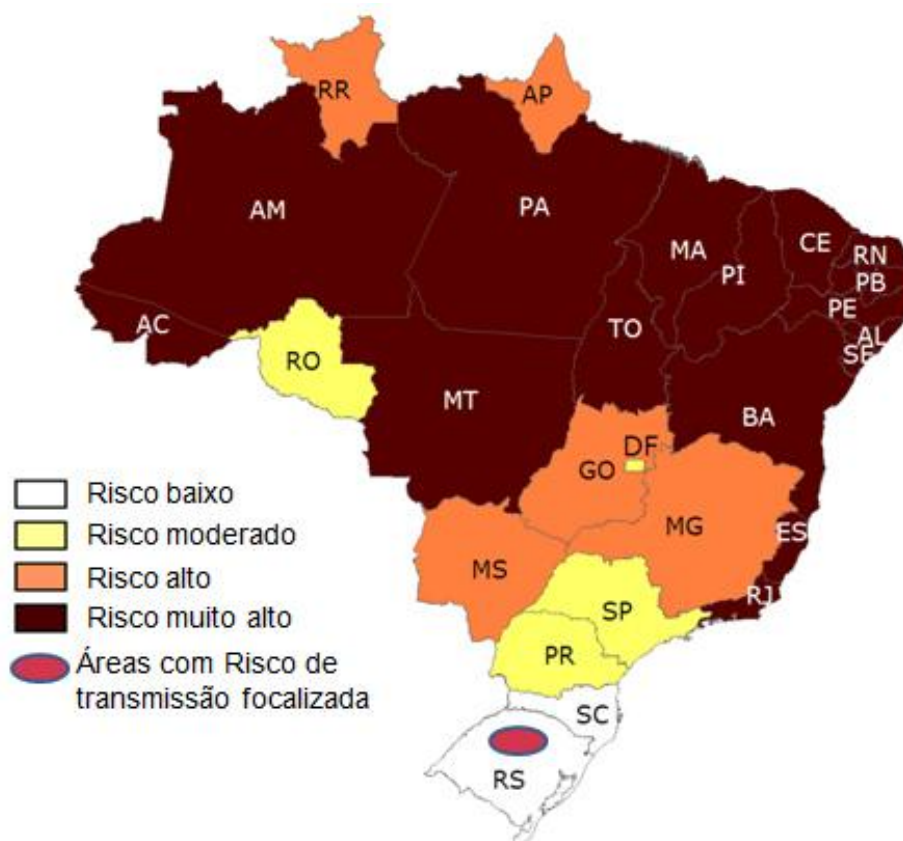


Figura 2: Classificação de áreas de vulnerabilidade para ocorrência de Dengue por Unidades Federadas, Brasil, 2011. Obs1: O mapa não considera a dispersão do DEN-4 para outros estados. Obs2: SC nunca teve transmissão autóctone de dengue (Fonte: SVS/MS 2011)

4.1.3. No Estado de São Paulo

Epidemias de dengue são observadas no Estado de São Paulo, desde o início da década de 90 do século passado (SUCEN, 2009).

Até o ano de 1998, a transmissão de dengue estava restrita ao interior do estado e às regiões Norte e Centro-Oeste. Desde então, epidemias de dengue começaram ocorrer também na Baixada Santista, Litoral Norte e na região Leste. Em 2002, 70% dos casos ocorreram nos municípios da Baixada Santista. Em 2001 teve início a transmissão de dengue nas cidades da Grande São Paulo. Diante desse quadro houve aumento da incidência de dengue no Estado em 2001 e 2002, com 51.472 e 42.368 casos confirmados respectivamente, juntamente com a entrada em circulação dos sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 no estado (SPINOLA, 2004)

No ano de 2009, foram registrados 7.960 casos autóctones de dengue no Estado de São, com incidência de 19,2 casos por 100.000 habitantes. Foram isolados no Estado os sorotipos DEN-1 (predominante), DEN-2 e DEN-3. (SVS/MS, 2010).

Uma comparação realizada entre os anos de 2010 e 2011 até outubro indica que no Estado de São Paulo foram registrados 205.520 casos em 2010 contra 113.204 casos em 2011, apresentando uma redução de 45% (SVS/MS, 2011). A figura 3 mostra o número de casos confirmados de dengue no Estado de São Paulo entre os anos 2001 e 2011.

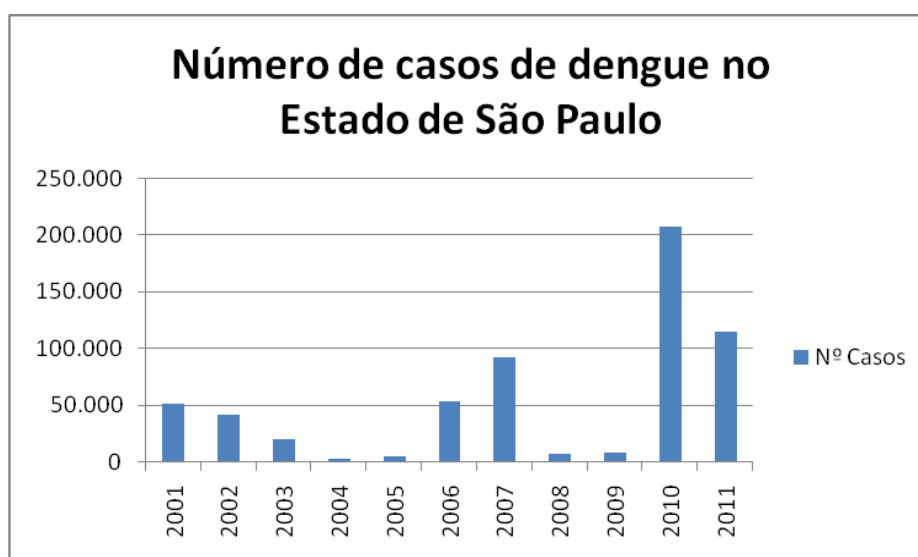


Figura 3: Número de casos confirmados de dengue no Estado de São Paulo, entre os anos 2001 e 2011. Fonte: SVS/MS, 2012.

4.2.VETOR E CONTROLE

Aedes (Stegomyia) aegypti tem origem no continente africano (CHRISTOPHERS, 1960). O mosquito está associado a áreas com grande concentração humana e hoje é encontrado nas regiões tropical e subtropical, entre os paralelos 45° de latitude Norte e 40° de latitude Sul (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Projeções de elevação de 2°C da temperatura para o final do século XXI poderão aumentar a extensão da latitude e altitude da distribuição da espécie no planeta, agravando a vulnerabilidade mundial em relação à dengue e à febre amarela (DONALIZIO & GLASSER, 2002).

No início do Século XX foi institucionalizado, no Brasil, o combate ao *Aedes aegypti*. Isso ocorreu devido às diversas epidemias de febre amarela urbana que ocorriam no país, desde o século XVII, levando à morte milhares de pessoas. Após campanha de erradicação levada a cabo em todo continente americano, o *Ae. aegypti* foi considerado erradicado do Brasil em 1958 (BRAGA & VALLE, 2007a). Porém, nove anos mais tarde (1967) foi detectado foco do vetor em Belém do Pará. Em 1976, esse vetor foi encontrado na cidade de Salvador (BA) e no ano seguinte, no Rio de Janeiro (RJ), instalando-se definitivamente no território brasileiro. Atualmente o *Ae. aegypti* está distribuído em todas as regiões do país (SUCEN, 2010).

O *Ae. aegypti* se reproduz dentro ou nas proximidades de habitações humanas, com suas formas imaturas desenvolvendo-se em recipientes com acúmulo de água. Nestes sítios de oviposição, ocorrem as cinco fases imaturas (quatro estágios larvais e um pupal) do inseto. Na fase adulta machos e fêmeas alimentam-se de néctar de plantas; entretanto as fêmeas necessitam de repasto sanguíneo para o desenvolvimento dos ovários. Sendo assim, sobretudo após a fecundação, apresentam hábito hematofágico, com acentuada antropofilia (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI 2002).

Por não haver vacina disponível, a única forma de controle da dengue é a diminuição da população vetora a níveis baixos o suficiente para que uma epidemia não possa ocorrer. Para tanto, os órgãos de controle se utilizam de estratégias

baseadas na utilização de produtos químicos e biológicos, integrados a programas de manejo ambiental e controle mecânico. (LUNA *et al.*, 2004).

As atividades preconizadas pelo Ministério da Saúde no controle do vetor da dengue são baseadas em visitas residenciais bimestrais para a eliminação de criadouros artificiais e tratamento com larvicidas daqueles irremovíveis; pesquisa larvária nos pontos estratégicos; atividades de educação e comunicação com vistas à prevenção e controle da dengue pela população; articulação com órgãos municipais de limpeza urbana e outros órgãos governamentais e não-governamentais. As ações de rotina se baseiam no controle mecânico, biológico, legal (que visa responsabilizar o proprietário pela manutenção e limpeza de terrenos baldios) e químico (SVS/MS, 2009).

O controle mecânico consiste na adoção de práticas capazes de impedir a procriação do *Aedes*, tendo como principais atividades a proteção, a destruição ou a destinação adequada de potenciais criadouros (SVS/MS, 2009). Como exemplo, podemos citar a coleta de resíduos sólidos, coleta seletiva de materiais recicláveis, cobertura de áreas de depósitos de materiais que acumulam água, sistema de drenagem, reaproveitamento de materiais como pneus, garrafas *pets*, latas de cerveja, etc (SUCEN, 2009).

Na busca de novas alternativas de controle, utilizam-se agentes biológicos no controle das formas imaturas de *Ae. aegypti*. A partir de 1998 foi introduzida a utilização do *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti) pelo Ministério da Saúde. A decisão para utilização desse larvicida biológico foi baseada na existência de estudos, ensaios de laboratório e aplicação no campo, que revelou sua eficácia no controle do *Aedes aegypti* (SVS/MS, 2009). Esse bioinseticida tem sido utilizado no Brasil em substituição ao organofosforado temephos em regiões onde foi detectada resistência do *Ae. aegypti* a esse composto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Mais recentemente, os reguladores de crescimento de inseto (IGR - Insect Growth Regulators) foram incorporados ao controle. Atualmente o Diflubenzuron é o regulador de crescimento em uso no Brasil pelo Programa de Controle da Dengue (SVS/MS, 2010).

Uma abordagem relativamente nova no combate a doenças transmitidas por artrópodes é a manipulação genética do vetor, comprometendo sua capacidade de ser

infectado pelo agente etiológico. (SPERANÇA & CAPURRO, 2007). O bloqueio da replicação viral no mosquito através do RNA de interferência (RNAi) é um dos mecanismos usuais na tentativa de interromper a transmissão da dengue (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A alta capacidade reprodutiva dos mosquitos também é um dos principais fatores que dificultam seu controle populacional. O lançamento no campo de machos estéreis foi a primeira iniciativa utilizando mosquitos manipulados no controle da população de insetos (Knippling 1959 e 1962 apud SPERANÇA & CAPURRO, 2007). Na técnica do inseto estéril (SIT - Sterile Insect Technique), utiliza-se radiação para esterilizar machos que serão soltos no campo para competir com os selvagens. As fêmeas que acasalarem com machos estéreis não produzirão descendentes.

Uma evolução da SIT é a utilização de gene letal nos mosquitos, o RIDL (Release of Insect carrying Dominant Lethal gene). Trata-se de um sistema transgênico espécie-específico que induz a letalidade nos organismos portadores do transgene. Machos RIDL homozigotos são soltos em campo e ao procriarem com fêmeas selvagens gerarão descendentes com esse transgene letal que não chegarão à fase adulta, na qual ocorre a transmissão do patógeno. Com a redução da população adulta de *Aedes aegypti*, reduz-se os casos da doença. Esta técnica está em fase de teste no nordeste do Brasil e a primeira liberação de machos transgênicos na América do Sul foi realizada em fevereiro de 2011 (OLIVEIRA *et al.* 2011).

4.3. INSETICIDAS

Desde o surgimento do DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), em finais da década de 1940, o uso de inseticidas químicos tem se mostrado indispensável nas operações de controle. Os principais compostos orgânicos utilizados como inseticidas pertencem a 4 grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides.

Os organoclorados são inseticidas que contêm carbono, hidrogênio e cloro. São classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos; hexaclorociclohexanos;

ciclodienos; e policloroterpenos. No grupo do hexaclorociclohexano está o BHC e no grupo difenil-alifáticos se inclui o DDT (WARE & WHITACRE, 2004).

A eficácia do DDT contra as formas adultas dos mosquitos e seu prolongado efeito residual e seu baixo custo fizeram com que no período de 1946-1970 todos os programas de controle se apoiassem quase totalmente em seu emprego (D'AMATO, 2002).

Entretanto, em virtude de seu efeito acumulativo no organismo e no ambiente, o uso do DDT foi proibido por volta dos anos 70 do século passado nos Estados Unidos (D'AMATO, 2002). No Brasil, a comercialização, distribuição e uso desses produtos em atividades agrícolas foram proibidos em 3 de setembro de 1985 (BRASIL, 1985). Entretanto, seu uso foi permitido em campanhas de saúde pública até 1994 no controle de insetos vetores de agentes etiológicos, sob responsabilidade da Fundação Nacional de Saúde (D'AMATO, 2002).

Comparado com outros inseticidas, o DDT tem uma ação lenta. Ele age principalmente sobre o sistema nervoso periférico causando impulsos nervosos espontâneos que geram contração dos músculos seguidos de tremores no corpo e nos apêndices. A exposição ao DDT causa a paralisia levando à morte do inseto (DAVIES *et al.*, 2007). O modo de ação bem como o sítio de ligação do DDT é semelhante ao dos piretróides e será discutido mais adiante.

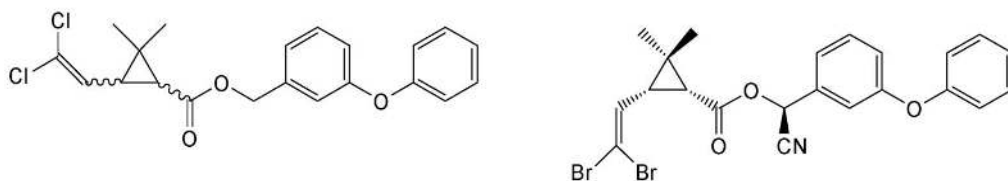
Os organofosforados incluem todos os inseticidas que contêm fósforo em sua molécula: malathion, vapon, vidrin, etil e metil paration, fenitrothion, clorpirifos, clorpirifos-metil, etc. Atualmente, dentro desse grupo, utilizam-se malathion e fenitrothion como adulticidas e o temephos como larvicida no controle *Ae. aegypti*.

Já os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico; entre os quais está o propoxur, bastante utilizado na década de 60 (WARE & WHITACRE, 2004).

Os organofosforados e carbamatos exercem suas ações biológicas por inibição da enzima acetilcolinesterase, que age na degradação do neurotransmissor acetilcolina. No caso dos carbamatos essa inibição é reversível; já na ação dos organofosforados a acetilcolinesterase é inibida irreversivelmente. Com a inibição desta enzima, há o acúmulo de acetilcolina no espaço sináptico, o que leva a interrupção da transmissão dos impulsos nervosos levando à morte do inseto.

Os piretróides são os derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas (SANTOS, 2007). Dentre os piretróides mais utilizados estão: bifentrina, lambda-cialotrina, cipermetrina, ciflutrina, deltametrina, esfenvalerato, fenpropatrina, flucitrinato, fluvalinato, praletrina, taufluvalinato, teflutrina, tralometrina e zeta-cipermetrina (BRAGA & VALLE, 2007b).

Os piretróides são classificados em Tipo I ou Tipo II de acordo com sua estrutura química. Piretróides tipo I, como a permetrina não apresentam o grupo ciano (CN) na porção fenoxibenzil, já o tipo II como a deltametrina apresenta este grupo na mesma porção (figura 4) (SANTOS, 2007).



I **Figura 4:** Estrutura química dos piretróides I) permetrina e II) deltametrina

II

A preferência pelo uso dos piretróides como aduictidas se dá por sua alta capacidade letal, maior estabilidade à luz e calor, menor volatilidade, baixa toxicidade aos mamíferos, além de suas propriedades repelentes (DIABATE, *et al.*, 2002; HEMINGWAY *et al.*, 2004).

Os piretróides, numa ação semelhante ao DDT, agem sobre o sistema nervoso central e periférico do inseto. Tem como sítio alvo o canal de sódio dependente de voltagem (Na_v), localizado na membrana dos neurônios. Este canal está envolvido na transmissão do impulso nervoso, tendo papel importante no processo de polarização da membrana do axônio. Após a ligação com o inseticida, os canais de sódio se modificam e se mantêm abertos, fixando-se nesta configuração, ou seja, na condução do íon Na^+ , o que leva a uma incapacidade de repolarização da membrana (DAVIES, *et al.*, 2007). Mosquitos submetidos à piretróides apresentam um quadro de hiperexcitabilidade, descordenação e paralisia. Particularmente os insetos alados são rapidamente nocauteados (HEMINGWAY *et al.*, 2004). Esse fenômeno é conhecido

como efeito *knockdown* definido como movimentos rápidos e involuntários, seguido por paralisia e morte (BUSVINE, 1951).

Piretróides do tipo I, como a permetrina, são bons agentes de *knockdown* devido à habilidade de induzir repetidas descargas elétricas causando a paralisia do inseto. Por outro lado piretróides tipo II, como por exemplo, a deltametrina, causam pronunciada fase de convulsão que resulta em morte do inseto devido à despolarização irreversível do axônio. A diferença fisiológica da ação dos piretróides tipo I e tipo II é o tempo em que eles mantêm o canal de sódio modificado conduzindo íon Na^+ . Esse efeito causado por piretróides tipo I dura somente dezenas a centenas de milésimos de segundos, enquanto o tipo II vários segundos ou mais (DAVIES, *et al.*, 2007).

4.4. RESISTÊNCIA

As repetidas aplicações de inseticidas possibilitam a seleção de populações de mosquitos resistentes a esses compostos. Esse processo resulta do efeito seletivo de exposição a dosagens que matam os indivíduos suscetíveis, mas não os resistentes, que transmitem essa capacidade a seus descendentes (DONALIZIO & GLASSER, 2002).

4.4.1. Mecanismos

Existem dois principais mecanismos de resistência aos inseticidas químicos desenvolvidos pelos insetos: a resistência metabólica e redução da sensibilidade do sítio alvo (BRENGUES *et al.*, 2003; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2009a).

Resistência metabólica é devida ao aumento na atividade, ou ainda na super produção, de enzimas detoxificantes do organismo. Essas enzimas desintoxicam o inseto pela metabolização da molécula inseticida em produtos menos tóxicos ou

ligando-se à molécula inseticida rapidamente e liberando-a de forma lenta, numa cinética bioquímica característica (MARCOMBE *et al.*, 2009).

Os sistemas enzimáticos mais comuns envolvidos na resistência metabólica são Esterases (ESTs), Glutathione-S-Transferase (GST), Oxidases de Função Mista (MFOs) e Carboxylesterases (COEs) (HEMINGWAY, 2000; MONTELLA *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2009a). Cada uma destas famílias de enzimas apresenta um número variado de genes com várias funções no metabolismo do inseto, mas acredita-se que somente um pequeno número esteja envolvido diretamente na detoxificação de inseticida (AWOLOLA, *et al.*, 2009).

Outro mecanismo de resistência é o da redução da sensibilidade do sítio alvo do inseticida. Essa redução é causada por mutações pontuais não sinônimas no gene codificante da molécula alvo que eventualmente levam a uma diminuição de sua afinidade com o inseticida (HEMINGWAY *et al.*, 2004). No caso da resistência a piretróides e ao DDT esta mudança estrutural determina um tipo de resistência conhecido como *knockdown resistance (kdr)*, uma resistência ao efeito *knockdown* descrito anteriormente (DABIRÉ *et al.*, 2009).

Em finais da década de 1980, o entendimento desse tipo de resistência teve grande avanço com a descrição do gene “*para*” do canal de sódio dependente de voltagem (Na_v) de *Drosophila melanogaster* (LOUGHNEY *et al.*, 1989). Esse gene codifica as 4 subunidades que formam o canal de sódio. O termo “*para*” refere-se à sua localização, dentro do locus *paralysis*, no cromossomo X. O gene “*para*” de *Drosophila* é estrutural e funcionalmente homólogo à subunidade α do Na_v de mamíferos (DAVIES *et al.*, 2007). Mutações nos domínios homólogos do gene do canal de sódio foram encontradas no gene “*para*” de *Drosophila* associadas à resistência a piretróide (PITTENDRIGH *et al.*, 1997).

Em um estudo para a detecção de loci controladores de características quantitativas (QTL), SAAVEDRA-RODRIGUEZ, *et al.* (2008) demonstraram que o gene do canal de sódio em *Ae. aegypti* está localizado no cromossomo III.

Como já mencionado, o canal de sódio compreende quatro domínios (I-IV), cada um composto por seis hélices (subunidades) transmembranosas nomeadas S1 a S6 (Figura 5) (SODERLUND, 2008).

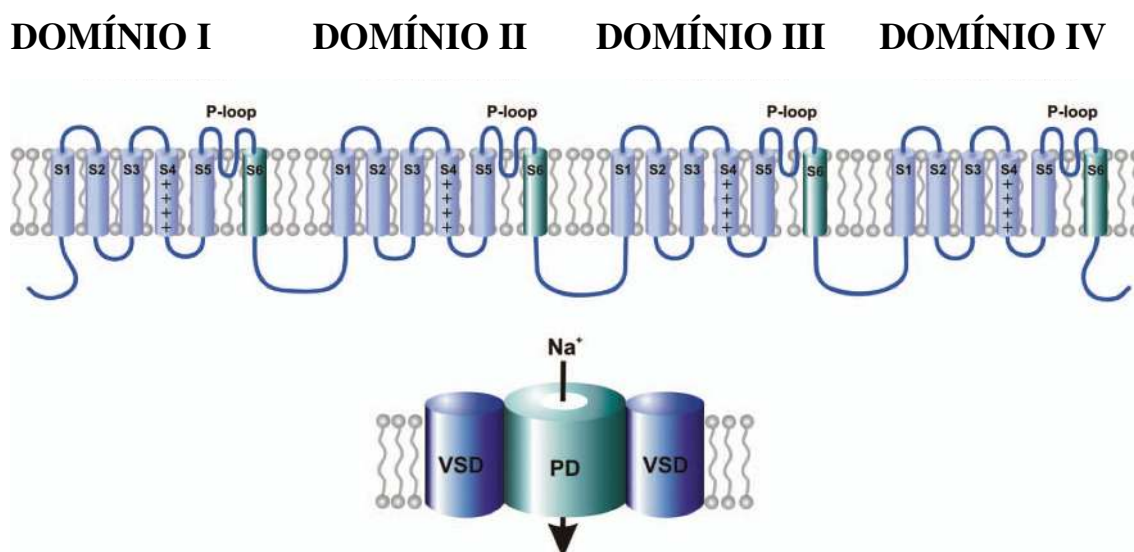


Figura 5: Topologia transmembranosa do canal de sódio. A subunidade α formadora do poro consiste numa cadeia polipeptídica simples formada por 4 domínios internos homólogos (I-IV), cada um possuindo 6 hélices transmembranosas (S1-S6). Os domínios se arranjam para formar um poro central, aquoso, revestido pelas hélices S5 e S6 e seus “linkers” (P-loops). As hélices S1-S4 são responsáveis pela parte sensível à voltagem do canal e se arranjam de modo a formar 4 domínios independentes (VSD). (Apenas dois mostrados na figura) (DAVIES *et.al.*, 2007).

BUSVINE (1951) descreveu a resistência *Kdr* em mosca *Musca domestica* L., mostrando que a resistência era causada por um fator recessivo localizado no cromossomo 3. O gene nesse inseto foi designado *Vssc1* ou *Msc*. Para este inseto foram encontradas duas mutações pontuais na molécula do canal de sódio associadas à resistência que levam as substituições: Leucina→Fenilalanina na posição 1014 (L1014F) e Metionina→Treonina na posição 918 (M918T). A mutação M918T está localizada entre as hélices transmembranosas S5 e S6 (SODERLUND, 2008). A combinação entre as duas mutações esta associada à resistência super-kdr, uma resistência a altos níveis de piretróides como cismetrina e cypermetrina (SODERLUND & KNIPPLE, 2003).

Já a substituição L1014F está localizada na região do S6 do domínio II e foi empregada como diagnóstica para resistência a piretróides em diversas espécies de insetos como *Anopheles gambiae* (MARTINEZ-TORRES *et. al.*, 1998), *Culex pipiens* (MARTINEZ-TORRES *et al.*, 1999) e *Culex quinquefasciatus* (Xu *et al.*, 2006). Em *Anopheles gambiae* estudos estimando a frequência da mutação L1014F

realizados em populações africanas correlacionaram essa substituição à resistência a permetrina (PINTO *et al.*, 2007; DABIRÉ *et al.*, 2009).

Entretanto uma segunda mutação (Leucina→Serina) foi encontrada neste mesmo sitio (L1014S) em *Culex pipiens* e *Anopheles gambiae* (MARTINEZ-TORRES *et al.*, 1999; RANSON *et al.*, 2000). Além disso, outra substituição Leucina→Histidina (L1014H) também foi descrita para outras populações de insetos, mostrando a importância desse sítio na afinidade do inseticida com seu alvo (SODERLUND, 2008).

Em outras classes de insetos também foram encontradas mutações associadas à redução da sensibilidade a piretróides, como a mostra a tabela 1.

Tabela 1: Mutações encontradas em algumas espécies de insetos associadas à redução da sensibilidade à piretróides.

Nome popular	Inseto	Mutação/Posição	Referência
Lagarta - da – maçã	<i>Heliothis virescens</i>	Valina→Metionina (V410M)	ZHAO <i>et al.</i> , 2000
Traça das crucíferas	<i>Plutella xylostella</i>	Treonina→Isoleucina (T929I)	VAIS <i>et al.</i> , 2001
Carrapato de boi	<i>Boophilus microplus</i>	Fenilalanina→Isoleucina (F1538I)	WANG <i>et al.</i> , 2001
Barata comum	<i>Blattella germanica</i>	Ácido Glutâmico→Lisina (E435K)	TAN <i>et al.</i> , 2002
Barata comum	<i>Blattella germanica</i>	Cisteína→Arginina (C785R)	TAN <i>et al.</i> , 2002

Em *Ae. aegypti* Na_v ($AaNa_v$), foram descritas mutações nos exons 19, 20 e 21, no segmento S6 do domínio II. As mutações em *Ae. aegypti* estão listadas na tabela 2 (BRENGUES *et al.*, 2003; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; RAJATILEKA *et al.*, 2008).

Tabela 2: Mutações descritas em *Aedes aegypti* associadas à redução da sensibilidade a piretróides. Baseado em BRENGUES *et al.*, 2003; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; RAJATILEKA *et al.*, 2008.

Posições na cadeia polipeptídica	Substituições	Referência
923	Glicina→Valina (G923V)	BRENGUES <i>et al.</i> , 2003
952	Valina→Isoleucina (V952I)	BRENGUES <i>et al.</i> , 2003
961	Histidina→Lisina (H961K)	BRENGUES <i>et al.</i> , 2003
982	Leucina→Triptofano (L982W)	BRENGUES <i>et al.</i> , 2003
1011	Isoleucina→Metionina (I1011M)	BRENGUES <i>et al.</i> , 2003 / LIMA <i>et al.</i> , 2011
1011	Isoleucina→Valina (I1011V)	BRENGUES <i>et al.</i> , 2003
1011	Valina→Metionina (V1011M)	Saavedra-Rodriguez <i>et al.</i> 2007
1016	Valina→Glicina (V1016G)	BRENGUES <i>et al.</i> , 2003
1016	Valina→Isoleucina (V1016I)	Saavedra-Rodriguez <i>et al.</i> 2007
1534	Fenilalanina→Cisteina (F1534C)	YANOLA <i>et al.</i> , 2010, 2011 / HARRIS <i>et al.</i> , 2010
1794	Ac. aspártico→Tirosina (D1794Y)	CHANG <i>et al.</i> , 2009

SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.* (2007) sequenciaram os exons 20 e 21 de populações de *Ae. aegypti* presentes na América Latina e encontraram mutações distintas daquelas encontradas por Brengues *et al.* (2003) nas posições 1011 (exon 20) e 1016 (exon 21) de *AaNa_v*. Eles identificaram uma substituição de A/G na primeira posição do codon 1011 levando à substituição de Valina por Metionina. De igual modo na posição 1016 foi verificada transição G/A que leva a Isoleucina no lugar de Glicina. Os autores afirmaram que o Ile1016 atua como um alelo recessivo para conferir resistência kdr.

No Brasil, o surgimento do fenótipo de resistência a piretróides (cipermetrina) já foi relatada (da CUNHA *et al.*, 2005). Estudos recentes mostraram a presença de várias mutações no gene *AaNa_v*. Assim, BRENGUES *et al.* (2003) descreveram as mutações G923V e I1011M em populações de Belém enquanto MARTINS *et al.* (2009b) reportam a mutação V1016I em várias populações das

regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Neste último trabalho os autores sugerem que o alelo Ile 1016 está se espalhando pelo Brasil, originalmente vindo de municípios localizados na região centro-oeste do país.

Recentemente, a substituição V1016I foi descrita no nordeste do Brasil, embora não tenha sido encontrada associação entre a mutação e o fenótipo de resistência no local. Entretanto uma associação significativa foi detectada entre a presença da substituição I1011M e a resistência a piretróide (LIMA *et al.*, 2011). Indivíduos apresentando estas mutações demonstram uma insensibilidade aos inseticidas piretróides. Entretanto os autores não excluem a presença de importantes mutações em outras regiões do gene. Os genótipos encontrados no Brasil para essas duas posições estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3: Mutações nos códons 1011 e 1016 no *AaNa_v* encontrados no Brasil.

Genótipo	Códons	
	1011	1016
Selvagem	Ile – ATA	Val – GTA
Mutado	Met – ATG	Ile – ATA

Devido à detecção de resistência aos piretróides, a Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo (SES-SP) tem recomendado que se evite o uso deste tipo de inseticida no controle do vetor, preconizando o uso do organofosforado Fenitrothion como aduicida até que sejam definidas as estratégias para a utilização de Cipermetrina (piretróide) (SUCEN, 2010).

Apesar dessas recomendações da SES-SP, o surgimento de resistência aos piretróides já se dá amplamente (MACORIS *et al.*, 2007; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2009, HARRIS *et al.*, 2010, LIMA *et al.*, 2011).

Com o objetivo de avaliar a dinâmica evolutiva dos alelos Ile 1016 e Met 1011, o presente projeto propõe determinar suas frequências em populações silvestres capturadas com intervalo de uma década. Para isso será avaliada a presença da mutação em populações coletadas em 2001 (BRACCO *et al.*, 2007) e em 2011.

4.5. EVOLUÇÃO - VARIAÇÃO GENÉTICA DAS FREQUÊNCIAS

O teorema de HARDY-WEINBERG (EHW), que representa o fundamento de toda a teoria genética da evolução, diz que sob condições que são implicitamente assumidas, uma única geração de cruzamento ao acaso estabelece frequências genotípicas e alélicas (p e q) que não serão alteradas em gerações subsequentes. Sendo assim, as frequências genotípicas encontradas tanto em populações naturais como de laboratório, devem ser muito próximas das expectativas teóricas (FUTUYMA, 2002).

Este teorema é baseado em certas premissas, que se violadas, causam alterações nas frequências dos alelos, dos genótipos ou de ambos. Essa diferença entre uma população ideal em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e uma população real é fruto da evolução. Tais premissas são:

- O tamanho da população é infinito;
- O cruzamento entre os indivíduos é aleatório;
- Não existe seleção. Todos os alelos são igualmente competentes na síntese de cópias de si mesmo, as quais se incorporam ao conjunto gênico nos gametas.
- Não ocorre a introdução de novas cópias de qualquer alelo (FUTUYMA, 2002; HARTL, 2008).

Geralmente, populações naturais normalmente não estão em EHW, pois:

- Populações naturais não têm tamanho infinito e a frequência de um alelo pode flutuar de geração a geração devido a eventos aleatórios (deriva genética);
- Muitas espécies apresentam a chamada seleção sexual, onde caracteres sexuais como tamanho, força e cor, influenciam a escolha de um parceiro sexual;
- Existem duas fontes possíveis de novas variantes: migração de alelos a partir de outra população (fluxo gênico) e a transformação de um alelo em outro (mutação).

O desvio do EHW é caracterizado por variações nas frequências alélicas de uma geração à seguinte. No caso dos alelos de resistência, a eventual alteração da

frequência, associado à insensibilidade a piretróides, pode ocorrer devido às pressões seletivas positivas ou negativas. A seleção positiva ocorre com a utilização de inseticidas piretróides, na qual os alelos que codificam formas insensíveis da molécula alvo, o canal de sódio, e conseqüentemente populações resistentes são selecionadas. No caso da pressão negativa, esta seria promovida pela interrupção no uso de inseticidas piretróides pelos órgãos de controle no Estado de São Paulo (SUCEN) a partir de 2003, o que faria com que os alelos resistentes não apresentassem mais uma vantagem adaptativa sendo gradualmente eliminados da população. A ocorrência de endocruzamento nestas populações pode gerar aumento no número de indivíduos homozigotos para esse alelo.

Caracterizada por alterações aleatórias na frequência alélica da população, a deriva tem maior peso quando ocorre em populações pequenas, o que pode ser observado em populações de *Ae. aegypti* em períodos de inverno ou devido à diminuição da densidade do vetor, ocasionado por uma série de medidas de controle.

A taxa de migração é uma medida de fluxo gênico e pode ser estimada relacionando-a com F_{ST} de Wright. As estatísticas F de Wright são uma série de medidas hierarquizadas que correlacionam frequências alélicas caracterizando a variabilidade em três níveis: individual, subpopulacional (grupos) e população total. Em estudos de fluxo gênico a estatística F mais utilizada é o F_{ST} . Dentre as interpretações de F_{ST} , a mais relevante é a variância na frequência alélica entre as populações σ_p^2 , padronizada pela média da frequência alélica (p) para o locus: $F_{ST} = \sigma_p^2/[p(1-p)]$ (WHITLOCK & MCCAULEY, 1999).

Um modelo de estrutura de população proposto por Wright (1931), chamado modelo de ilha (figura 6), correlaciona o número de migrantes que a população recebe por geração com o F_{ST} : $F_{ST} \sim 1/(4Nm + 1)$, para marcador nuclear e $F_{ST} \sim 1/(2Nm + 1)$ para marcador mitocondrial, onde N é o tamanho da população e m é a taxa de migração entre populações.(WHITLOCK & MCCAULEY, 1999; URDANETA-MARQUEZ et al., 2008).

Para realizar as estimativas de F_{ST} e Nm, o fragmento do gene mitocondrial (mtDNA) da Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase (*ND4*) apresenta-se como um bom marcador neutro. A variação em padrões de frequência de

haplótipos do mtDNA pode ser utilizada para estimar as taxas de fluxo gênico (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, et al., 2000).

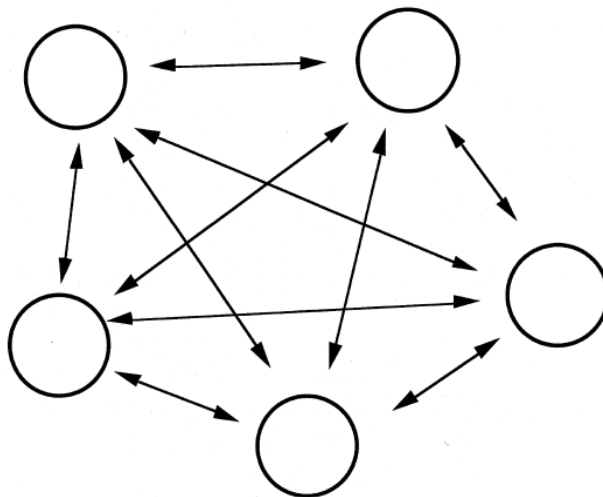


Figura 6: Modelo de ilha. Cada população recebe e envia migrantes para outra população na mesma taxa m . Cada população também é composta pelo mesmo número de indivíduos, N . Extraído de WHITLOCK *et al.* (1999).

4.6. HIPÓTESE DE TRABALHO

A variação na frequência dos alelos Met 1011 e Ile 1016, que conferem resistência, em intervalo de dez anos, pode ter sido promovida pela seleção de indivíduos resistentes através da utilização de inseticidas a base de piretróides.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a distribuição dos alelos Ile 1016 e Met 1011 do gene *AaNa_v* em populações de *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo nos anos 2001 e 2011.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a presença das mutações V1016I e I1011M em populações naturais coletadas em 2001 no Estado de São Paulo.
2. Avaliar a presença das mutações V1016I e I1011M nas populações naturais coletadas em 2011 no Estado de São Paulo.
3. Verificar se existe diferença significativa entre as frequências destas mutações nas populações de 2001 e 2011.
4. Caracterizar fatores que possam estar associados às diferenças das frequências.
5. Estimar o grau de migração entre as populações através do marcador *ND4*.
6. Discutir separadamente sobre esse fator de evolução.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. SELEÇÃO DE ESPÉCIMES PARA ANÁLISE

Os exemplares usados neste estudo foram coletados dentro das atividades do programa de monitoramento da suscetibilidade do *Ae. aegypti*, que no Estado de São Paulo está a cargo da Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN (SUCEN, 2002).

Na escolha das cidades para a amostragem buscou-se realizar um transecto no sentido oeste-leste no estado, de modo que as cidades escolhidas refletissem a história de infestação desse mosquito no estado (GLASSER & GOMES, 2000) (Figura 7).

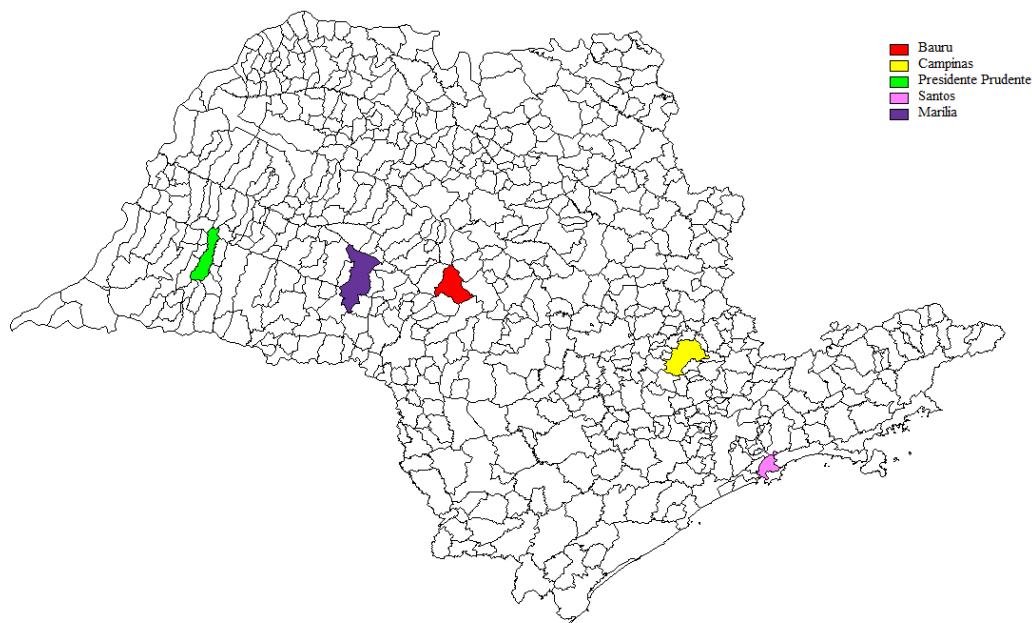


Figura 7: Municípios utilizados na comparação entre as frequências dos anos 2001 e 2011.

Resumidamente, nos municípios selecionados, as armadilhas de oviposição (ovitrampas) foram distribuídas geograficamente seguindo padrão de “malha”. O número de quadrantes corresponde ao número de armadilhas previsto por município.

Para estimar o tamanho da amostra, considerou-se o número de edificações dos municípios, seguindo critério definido pelo programa. As armadilhas são colocadas no mês de novembro, antes que se inicie o programa anual de controle de *Aedes aegypti* com a aplicação de inseticidas.

As armadilhas de oviposição consistem de frasco de 500 mL com água de torneira, nos quais são mergulhadas palhetas de madeira. Estas servem de substrato para que as fêmeas selvagens depositem ovos. Depois de instaladas, as armadilhas ficaram no ambiente no período de 1 semana, após o que as palhetas foram recolhidas.

As palhetas foram, então, encaminhadas aos laboratórios regionais da SUCEN/SP para verificar a presença de ovos. As palhetas positivas foram separadas e encaminhadas ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da SUCEN/SP e colocadas em água para a eclosão dos ovos.

As larvas resultantes foram criadas em recipientes medindo, aproximadamente, 20x40x10 cm contendo 800 mL de água filtrada mantida a temperatura de 25° C aproximadamente. A alimentação das larvas foi feita por meio de ração comercial para camundongos, na proporção de 0,5g de ração dissolvida no total de água (800 mL).

Os adultos emergidos e identificados como *Aedes aegypti*, de acordo com a chave de identificação proposta por FORATTINI (2002), foram estocados em etanol absoluto a -20° C.

O número de indivíduos de cada município utilizado nos dois anos de coleta está descrito na tabela 4.

Tabela 4: Número de indivíduos de *Aedes aegypti* utilizados na genotipagem das mutações I1011M e V1016I nos anos de 2001 e 2011.

Município	Coordenadas	Anos de coleta	Número de indivíduos utilizados por ano de coleta 2001/2011
Santos	23°57'S46°29'O	2001/2011	52/50
Campinas	22°54'S47°05'O	2001/2011	50/50
Bauru	22°19'S49°04'O	2001/2011	50/50
Marília	21°56'S49°53'O	2001/2011	50/50
Presidente Prudente	22°07'S51°22'O	2001/2011	50/36
TOTAL			252/236

6.2. EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA total dos indivíduos coletados em 2001 foi extraído seguindo-se o protocolo utilizando fenol e clorofórmio proposto por Sambrook *et al.* (1989). Após a extração, o DNA total foi ressuspendido em 100 µL de água MilliQ.

A extração do DNA dos indivíduos coletados em 2011 foi realizada utilizando-se o kit de extração DNeasy Blood & Tissue Kit Qiagen®, seguindo orientações do fabricante.

Para estimar a qualidade e concentração do DNA extraído, uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão Tris-Borato-EDTA (0,81M Tris; 0,2M de ácido bórico; 15mM EDTA ph 8,9), corada com GelRed™ (Uniscience) e comparada com padrão de massa. Após a corrida, as alíquotas foram armazenadas a -20°C até sua utilização.

6.3. AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Neste estudo utilizamos a estratégia de genotipagem descrita por MARTINEZ-TORREZ *et al.* (1998) para anofelinos e aplicada a *Aedes aegypti* por outros autores (SAAVEDRA-RODRIGUES *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2009b; HARRIS *et al.*, 2010). Essa estratégia consiste na amplificação dos diferentes alelos utilizando *primers* alelo-específicos e será descrita resumidamente a seguir.

Para a mutação V1016I foram desenhados dois *primers* no sentido sense (*primers* alelo-específicos) e um *primer* no sentido anti-sense. Os *primers* sense, diferem na sua extremidade 3': um deles contem o nucleotídeo que confere o genótipo selvagem (G – *primer* Val1016F) e o outro, o mutado (A – *primer* Ile1016F). Uma cauda de nucleotídeos CG foi adicionada à extremidade 5' de cada um desses *primers*. No *primer* selvagem essa cauda tem 26 nucleotídeos (cauda longa) enquanto que na do *primer* mutado, apenas 6 (cauda curta). O *primer* no sentido inverso (Ile1061R) não contém cauda CG (Tabela 5).

Para a mutação I1011M foram desenhados dois *primers* anti-sense (alelo-específicos) e um *primer* sense. Nos dois *primers* anti-sense foi utilizada a mesma estratégia descrita acima: na extremidade 3' de um deles o nucleotídeo presente era o que confere o genótipo selvagem e o outro, o mutado. A cauda longa também foi adicionada à extremidade 5' do *primer* selvagem e a cauda curta ao *primer* mutado.

Além disso, na primeira posição da última trinca, na extremidade 3' de cada *primer* alelo-específico, foi substituído um nucleotídeo por um “mismatch”. Isso para dificultar o anelamento inespecífico entre *primers* de um alelo na seqüência do outro. Se no sítio ocorria uma purina, a mesma era substituída por uma pirimidina e vice-versa. Além disso, foram utilizadas diferentes purinas ou pirimidinas nos dois *primers* alelo-específico. Para o *primer* Val 1016F, o A foi substituído por um C e no *primer* Ile 1016F o mesmo A foi substituído por um T. Já no *primer* Ile 1011R, o C foi substituído por um G e no *primer* Met 1011R o C foi substituído por um A (tabela 5).

Os *primers* foram utilizados em sistema triplex em um único tubo e visualizados em gel de agarose 4% corado com GelRed™ (Uniscience). Nessa concentração foi possível visualizar uma diferença de migração dos fragmentos cujo tamanho diferiu em apenas 20 pb.

Tabela 5. Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do alelo Ile1016 e do alelo Met 1011. Em vermelho, os nucleotídeos selvagens (G ou C) e mutados (A ou T); em azul, os nucleotídeos não pareados (mismatch); em [itálico] as caudas CG (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
Val 1016F	<i>[GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCC]ACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG</i>
Ile 1016F	<i>[GCGGGC]ACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA</i>
Ile 1016R	GGATGAACCGAAATTGGACAAAAGC
Met 1011F	GTCCTGTATTCCGTTCTTTTT
Ile 1011R	<i>[GCGGGC]TACTTACTACTAGATTTACT</i>
Met 1011R	<i>[GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCC]TACTTACTACTAGATTTGCC</i>

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizamos o Kit de amplificação GoTaq® Green Máster Mix 1X (Promega) num volume final de 25 µL, contendo 0,5 µL de DNA molde (50 ng), e 0,05 µM de cada um dos *primers*.

Para a mutação V1016I, as condições de temperatura do termociclador foram: denaturação inicial por 12 minutos a 95° C, seguidos de 40 ciclos de 95° C por 20 segundos, 65° C por 1 minuto e 72° C por 30 segundos. Ao final dos ciclos uma extensão de 72° C por 10 minutos. Já para a mutação I1011M, a temperatura de anelamento foi de 52°C. O termociclador utilizado foi o modelo TC 512 da Techne™.

6.4. GENOTIPAGEM E FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO

Através da diferença de tamanho dos segmentos amplificados, os indivíduos foram classificados em homozigoto para mutação (Met/Met para 1011 e Ile/Ile para

1016), homozigoto selvagem (Ile/Ile para 1011 e Val/Val para 1016) ou heterozigoto (Ile/Met para 1011 e Val/Ile para 1016).

O tamanho dos amplicons gerados para definir cada alelo está descrito na tabela 6.

Tabela 6: Tamanho dos amplicons gerados para cada alelo, utilizando *primers* alelo-específicos

Alelo	Amplicons gerados para cada alelo	
	1011	1016
Val (Selvagem)	-	102pb
Ile (Mutado)	-	82pb
Ile (Selvagem)	83pb	-
Met (Mutado)	103pb	-

6.5. CLONAGEM

Com o intuito de certificar que os *primers* utilizados na genotipagem realmente anelavam no local esperado e que os resultados obtidos não eram simplesmente artefatos da técnica, fragmentos amplificados foram clonados e sequenciados. Foram selecionados 3 indivíduos de cada genótipo (homozigoto para mutação, homozigoto selvagem e heterozigoto) para as mutações I1011M e V1016I.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit QIAquick® PCR purification Kit da empresa Qiagen®.

O PCR purificado foi ligado ao vetor pGEM®-T Easy da empresa Promega, utilizando 1µL de enzima T4 DNA ligase, de acordo com as orientações do fabricante, e deixado 1h em temperatura ambiente e em seguida durante 12 horas a 4°C.

Para o processo de transformação das bactérias, este produto da ligação foi adicionado a 50µl de *E. coli* DH5α competentes por MgCl₂ que permaneceram em gelo por 30 minutos, em seguida 30 segundos a 42°C e 2 minutos novamente no gelo.

Foram adicionados 940 μ l de LB Broth (Invitrogen) e deixado a 37°C por uma hora para crescimento.

As bactérias transformadas foram então plaqueadas em meio LB agar (Invitrogen™) com antibiótico ampicilina para que as bactérias que não contivessem o vetor não sobrevivessem, uma vez que o vetor confere resistência à bactéria que o possui. Mais um fator seletivo foi adicionado ao meio para a identificação das bactérias que contivessem o vetor-inserto, o substrato análogo à lactose Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo). Como mostra a figura 8 o plasmídeo utilizado apresenta o sítio múltiplo de clonagem incorporado ao gene *lacZ'*, que codifica para um segmento de β -galactosidase. Dessa forma, quando o gene está íntegro, isto é, não houve a incorporação de nenhum fragmento (inserto) de DNA em um dos sítios de clonagem, o gene *lacZ'* é transcrito e traduzido, seu produto combina com outra proteína codificada pelo DNA cromossômico, formando um híbrido ativo de β -galactosidase. Se o substrato X-Gal está presente no meio, ele é hidrolisado por esta enzima em um composto de cor azul. Sob estas condições, colônias que incorporaram o vetor sem inserto apresentam cor azul. Em contraste, células que carregam um vetor com um inserto clonado formam colônias brancas. Isto ocorre porque o fragmento de DNA inserido em um dos sítios de clonagem interrompe a seqüência correta de códons do gene de *lacZ'* e inibe a produção de proteína LacZ' funcional, e portanto a produção do híbrido de β -galactosidase ativo (GLICK & PASTERNAK,1998).

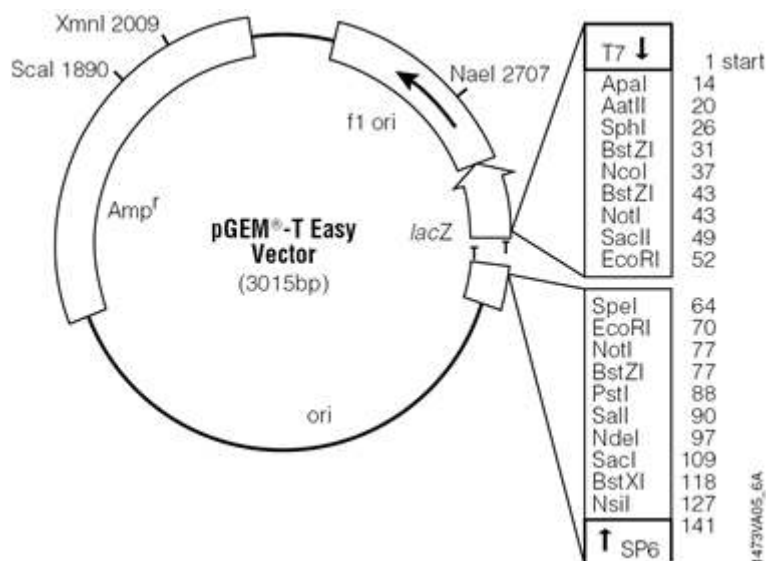


Figura 8: Mapa do vetor de clonagem pGEM®-T Easy, utilizado no processo de transformação bacteriana. Fonte: Promega (2012).

Juntamente com o X-Gal, foi adicionado à placa o IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), que é um indutor da transcrição genética que aumenta a quantidade da enzima T7 RNA polimerase, a qual se liga ao promotor T7, iniciando a transcrição do cDNA de interesse.

O crescimento das bactérias ocorreu em 18h em estufa bacteriológica a 37°C. Após esse período 4 (quatro) colônias brancas de cada placa foram repicadas individualmente com ponteiras plásticas estéreis e gentilmente misturada com água mili-Q. Essa água contendo bactérias com inserção de vetor foi utilizada para a realização de uma amplificação com *primers* que amplificam uma porção do vetor, flanqueando o segmento nele inserido (T7 – 5' AATACGACTCACTATAG 3' e New SP6 – 5' TATTTAGGTGACACTATAG 3').

Para indivíduos heterozigotos foram selecionadas 8 (oito) colônias de cada placa, para aumentar a possibilidade de se encontrar sequências selvagens e mutadas. Entretanto só foram encontradas sequências selvagens. Para solucionar esse problema, foram realizadas novas reações de PCR, utilizando-se iniciadores separados para sequência selvagem e mutada e não em sistema triplex, como descrito anteriormente. As reações foram então clonadas e sequenciadas separadamente.

As condições de amplificação foram 5 minutos a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 45°C e 30s a 72°C, em seguida uma extensão final por 10 minutos a 72°C. Em seguida a temperatura foi mantida a 4°C para a conservação das amostras até o momento da estocagem.

Uma eletroforese em gel de agarose foi realizada para verificar a amplificação. Uma nova purificação utilizando QIAquick® PCR purification Kit da empresa Qiagen® foi realizada no produto deste PCR, para ser utilizado na reação de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit da empresa Applied Biosystems®, seguindo as instruções do fabricante. O programa do termociclador para sequenciamento foi 96°C por 1 minuto seguido de 30 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50° por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. No final a temperatura foi mantida a 4°C para conservar as amostras até o momento da estocagem.

Após a precipitação utilizando isopropanol 75%, a reação foi sequenciada no ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer (Applied Biosystem™).

6.6. SEQUENCIAMENTO

Como procedimento alternativo à clonagem, para confirmação dos dados, foi realizado um sequenciamento direto do produto do PCR em algumas amostras. Os *primers* utilizados para o sequenciamento não foram os mesmos da genotipagem, mas outros que amplificam uma porção maior do genoma, amplificando parte dos exons 20 e 21 além do intron existente entre eles (tabela 7).

Tabela 7: *Primers* utilizados para a amplificação e sequenciamento direto do PCR (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

<i>Primer</i>	Mutação verificada	Sequência	Fragmento amplificado
KDR 20F	V1016I	ATGTGGGATTGTATGCTTG	361pb
KDR 21R		GATGAACCGAAATTGGAC	
KDR F	I1011M	ACAATGTGGATCGCTTCCC	457pb
KDR R		CTTAGCCTTGCTTTTGTCC	

O produto destas amplificações foram purificadas utilizando QIAquick® PCR purification Kit da empresa Qiagen® e em seguida, a reação de sequenciamento foi feita como descrito anteriormente e sequenciada no ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer (Applied Biosystem™).

6.7. AMPLIFICAÇÃO ND4

Para a amplificação do gene mitocondrial ND4 foram utilizados os seguintes *primers*: sense (5'ATTGCCTAAGGCTCATGTAG3') e anti-sense (5'TCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT3').

O programa do termociclador foi: denaturação inicial por 2 minutos a 94° C, seguidos de 40 ciclos de 94° C por 1 minuto, 56° C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto. Ao final dos ciclos uma extensão de 72° C por 10 minutos

O produto do PCR foi purificado utilizando QIAquick® PCR purification Kit da empresa Qiagen®. Em seguida a reação de sequenciamento foi feita como descrito anteriormente, utilizando-se os mesmos *primers* usados na reação de PCR, e então, sequenciadas.

6.8. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas pelo software Bioedit 2.0 (HALL, 1999) para a verificação da qualidade do sequenciamento através dos picos do cromatograma. Neste mesmo programa as sequências sense foram alinhadas com as anti sense, e foram geradas as sequências consenso utilizadas nas análises. O programa Multialign versão 5.4.1 também foi utilizado para os alinhamentos (CORPET, 1988).

As sequências alinhadas foram comparadas com sequências do gene *AaNa_v* ou do mtDNA de *Aedes aegypti* depositadas no banco de dados NCBI através da ferramenta de bioinformática BLAST, presente no próprio banco de dados (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

6.9.1. Frequência genotípica

Para contabilizar e comparar os genótipos encontrados nos dois anos de coleta para as duas mutações estudadas a frequência genotípica foi estimada. A estimativa foi realizada pela divisão do número de indivíduos apresentando cada um dos genótipos (homozigoto para mutação, homozigoto selvagem e heterozigoto) dividido pelo número total de indivíduos amostrados, para cada população (N).

Sendo assim, o cálculo foi:

$$F_x = \frac{\text{número de indivíduos com o genótipo } x}{\text{número total de indivíduos (N)}}$$

6.9.2. Frequência alélica

A frequência alélica representa a proporção de ocorrência de determinado alelo (1011 – Ile ou Met; 1016 – Val ou Ile) em relação ao número total de alelos observados dentro da população.

A frequência alélica foi estimada como segue:

$$F_{\text{Val}} = \frac{2 \times \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com o genótipo Val/Val} + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo Val/Ile}}{2 \times \text{número total de indivíduos}}$$

$$F_{\text{Ile}} = \frac{2 \times \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com o genótipo Ile/Ile} + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo Val/Ile}}{2 \times \text{número total de indivíduos}}$$

Sendo que $F_{Val} + F_{Ile} = 1$

6.9.3. Cálculo das frequências genóticas esperadas

A partir do cálculo da frequência alélica observada, a frequência genotípica esperada foi estimada partindo-se da premissa de equilíbrio:

$$p^2 = F_{Val}^2$$

$$2pq = 2 \times F_{Val} \times F_{Ile}$$

$$q^2 = F_{Ile}^2$$

Sendo que $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

6.9.4. Cálculo do número esperado

A partir da frequência genotípica esperada pode-se calcular o número de indivíduos esperados para cada genótipo, multiplicando-se o valor encontrado pelo número total de indivíduos analisados.

6.9.5. Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

O teste de Qui-quadrado (X^2) foi realizado para testar a hipótese de EHW em cada população. Resumidamente, a soma dos quadrados das diferenças entre o número de genótipos esperados e observados, dividido pelo número esperado:

$$X^2 = \sum \frac{(\text{número observado} - \text{número esperado})^2}{\text{Número esperado}}$$

Através de uma tabela de X^2 ou alternativamente através da fórmula: $=\text{DIST.QUI}(X^2;\text{Graus Liberdade})$, foi encontrada a probabilidade associada ao Qui-quadrado obtido, com 1 grau de liberdade e um intervalo de confiança de 95%.

- Se $p < 0,05$ = resultado estatisticamente significativo (diferenças encontradas entre o esperado e observado não é obra do acaso) – rejeita-se hipótese de equilíbrio
- Se $p > 0,05$ = modelo de equilíbrio não é rejeitado – a diferença encontrada é obra do acaso.

6.9.6. Cálculo de significância das diferenças de frequência.

O cálculo das frequências alélicas de cada mutação foi efetuado como descrito anteriormente para cada município em cada ano de coleta. Para verificar se a diferença entre as frequências nos anos observados para cada cidade é significativa foi aplicado o teste de Qui-quadrado (X^2):

$$X^2 = \frac{\sum (\text{frequência alélica esperada} - \text{frequência alélica observada})^2}{\text{frequência alélica esperada}}$$

A tabela de contingência foi construída para cada município como no exemplo:

	2001	2011	TOTAL
F _{Val} observada	A	B	C
F _{Ile} observada	D	E	F
TOTAL	G	H	I

Para se estimar a frequência esperada resumidamente fez-se a razão entre o produto cruzado das frequências marginais e o total geral:

	2001	2011	TOTAL
F_{Val} esperada	$G \cdot C / I$	$H \cdot C / I$	
F_{He} esperada	$G \cdot F / I$	$H \cdot F / I$	
TOTAL			

Após encontrar o valor de X^2 , uma tabela padrão de X^2 foi consultada para se encontrar o valor de p com 1 grau de (probabilidade da diferença ser ao acaso).

Se p não foi significativa rejeitou-se a hipótese de igualdade e admitiu-se que a diferença encontrada não é devida ao acaso.

Este teste foi aplicado somente porque suas premissas foram encontradas (PEREIRA, 2010):

- O valor esperado não foi menor que 1.
- Até 20% das células tiveram valor esperado menor que 5.

Caso isso não tivesse ocorrido seria aplicado o teste exato de Fisher, caso especial do teste Qui-quadrado, que resulta numa probabilidade p exata e não estimada.

O teste exato de Fischer permite obter possíveis frequências genotípicas para um determinado lote de frequências alélicas, rejeitando-se a hipótese de EHW cujas frequências sejam incomuns. O teste exato de Fisher trata do cálculo não enviesado da probabilidade de EHW, usando-se o método de máxima verossimilhança, com 1.000 interações (GUO & THOMPSON, 1992).

6.9.7. Coeficiente de endocruzamento de Wright

Com o objetivo de testar se o desvio de EHW é resultado de estruturação populacional (endogamia), o coeficiente de endocruzamento F_{IS} de Wright (1969 & 1978) foi estimado para as populações nos dois anos de coleta.

$$F_{IS} = 1 - \frac{(\text{heterozigotos observados})}{(\text{heterozigotos esperados})}$$

Observação: heterozigotos esperados supondo que a população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

$F_{IS} < 0$ significa que um excesso de heterozigotos foi observado. Por outro lado se $F_{IS} > 0$, indica um excesso de homozigotos ocasionado por endocruzamento dentro da população.

Uma prova de qui-quadrado foi realizada para provar a hipótese nula de que $F_{IS} = 0$.

6.9.8. Análise do mtDNA

O Programa DnaSP (ROZAS *et al.*, 2003) foi utilizado para determinação do número de haplótipos e número de sítios polimórficos, bem como para estimar a diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (Hd).

A rede de haplótipos baseada no polimorfismo do mtDNA (ND4) foi projetada utilizando o programa TCS 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000) com 95% de chance de estimar a verdadeira relação entre os haplótipos. O programa reúne todas as sequências idênticas como um haplótipo e, então, calcula a frequência dos haplótipos na amostra.

O programa Arlequin 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) foi utilizado para determinar a diferenciação genética por meio da estimativa de F_{ST} pareado e a significância desse teste foi verificada pelo método de permutações aleatórias com 10.000 permutações. Além disso, esse programa também foi utilizado para determinar o número de migrantes por geração (Nm).

A magnitude de diferenciação genética entre os grupos foi determinada, segundo a definição de Wright (1978) para caracterizar como baixa ($F_{ST} = 0$ a 0,05), moderada ($F_{ST} = 0,05$ a 0,15), alta ($F_{ST} = 0,15$ a 0,25) e muito alta ($F_{ST} > 0,25$) a diferenciação genética entre os grupos.

7. RESULTADOS

7.1. EXTRAÇÃO DO DNA

Um total de 252 indivíduos, coletados em 2001, tiveram seu DNA extraído pelo método de fenol e clorofórmio (adaptado de Sambrook *et al.* 1989). A figura 9 mostra uma eletroforese em gel de agarose 1% do DNA extraído de 7 indivíduos armazenados em etanol absoluto a -20°C desde 2001. Mesmo armazenado há 10 anos, o DNA não foi degradado, como observado no gel, o que possibilitou seu uso.

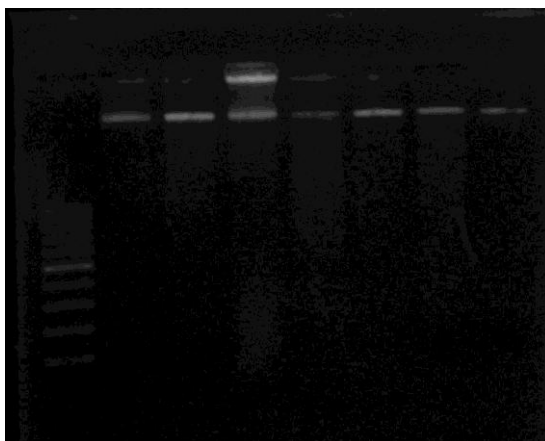


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1%, DNA extraído pelo método fenol e clorofórmio adaptado de Sambrook *et al.*, (1989).

Os indivíduos coletados em 2011 tiveram seu DNA extraído utilizando-se o kit DNeasy® Blood & Tissue da empresa Qiagen. Duzentos e trinta e seis indivíduos foram processados utilizando esse kit. A figura 10 mostra uma eletroforese em gel de agarose 1% com a extração de DNA de alguns indivíduos. Após a verificação da qualidade dos DNAs a serem analisados, passou-se à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR).

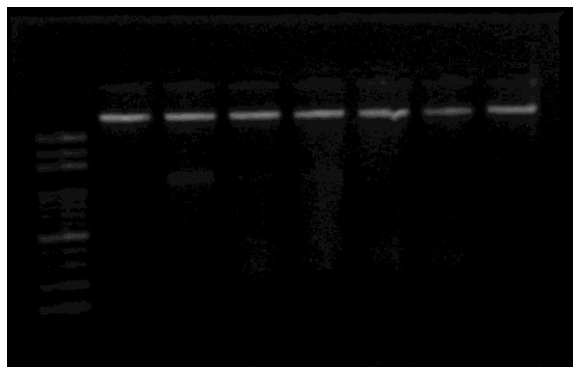


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1%, DNA extraído pelo kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen™).

7.2. AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E GENOTIPAGEM

Os indivíduos de todas as cidades amostradas foram genotipados para as duas mutações analisadas: V1016I e I1011M nos dois anos de coleta, 2001 e 2011 (tabelas de I a IV – anexos).

Com o intuito de padronizar a PCR alelo-específico em sistema triplex, realizou-se um experimento para a mutação V1016I em que os *primers* foram testados separadamente (um sense e um anti-sense) e em triplex (dois *primers* sense alelo-específicos e um anti-sense) para um mesmo indivíduo (figura 11). Assim, indivíduo proveniente da cidade de Bauru (Bauru1) teve seu DNA amplificado utilizando-se as três combinações de *primers* sense (poços B, C e D) assim como outro indivíduo da população de Santos (Santos4, poços E, F e G).

O indivíduo Bauru1 teve o fragmento amplificado quando havia o *primer* Val1016F na reação (poços B e D), mas não houve amplificação quando havia apenas o *primer* Ile1016F (poço C) sendo, portanto, genotipado como homozigoto selvagem

(Val/Val). Já o indivíduo Santos4 teve o produto amplificado em qualquer situação sendo, portanto, genotipado como heterozigoto Val/Ile (Figura 11).

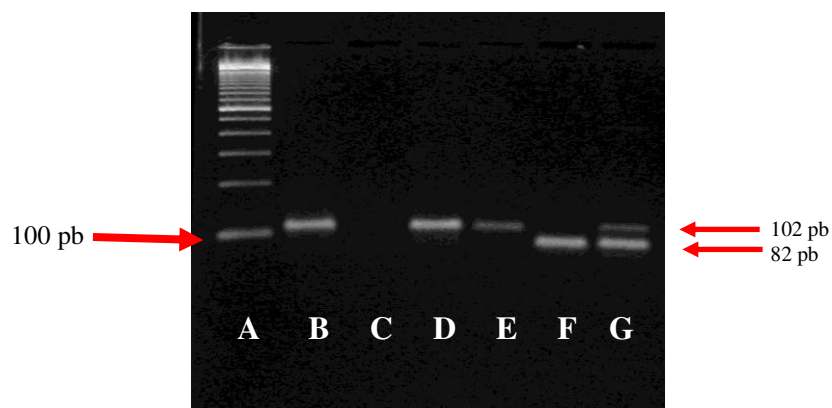


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 4%. A: Marcador de peso molecular 100 pb. B: indivíduo Bauru1/ *primer* Val1016F; C: indivíduo Bauru1/ *primer* Ile1016F e D: indivíduo Bauru1/ *primer* Val1016F e Ile1016F;. E: indivíduo Santos4/ *primer* Val1016F; F: indivíduo Santos4/ *primer* Ile1016F e G: indivíduo Santos4/ *primers* Val1016F e Ile1016F. Todas as reações mostradas utilizaram o *primers* anti-sense Val1016R.

Após a padronização da PCR, o DNA de cada indivíduo foi amplificado utilizando-se o sistema triplex. A figura 12 mostra gel de agarose com a amplificação de amostras do município de Campinas utilizando os *primers* alelo-específicos para a mutação V1016I. Para cada reação um controle negativo (sem DNA) foi adicionado para verificar a possibilidade de contaminação dos reagentes ou materiais utilizados.

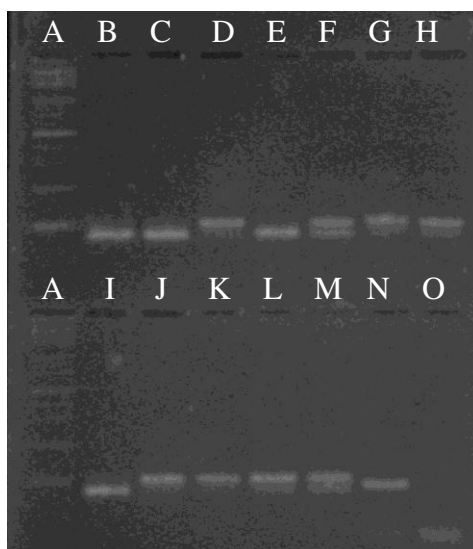


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 4%. A: Marcador de peso molecular 100pb; F e M: Amostras genotipadas como heterozigotas (Val/Ile); D, G, H, J, K e L: Amostras homozigotas selvagem (Val/Val); B, C, E, I e N: Amostras homozigotas para mutação (Ile/Ile); O: controle negativo.

A figura 13 mostra gel de agarose 4% com amostras amplificadas utilizando-se *primers* alelo-específicos para a mutação I1011M. Como pode ser visto, foi possível diferenciá-las em gel de agarose a 4%.

A contagem de todos os genótipos para as duas mutações será descrita mais adiante nas tabelas 8 e 12.

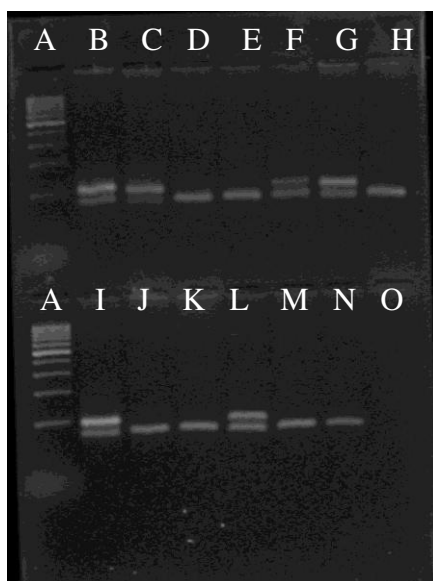


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 4%. A) Marcador Molecular 100pb; B, C, F, G, I e L: Amostras genotipadas como heterozigotas (Ile/Met); C, E H, J, K, M e N: Amostras genotipadas como homozigoto selvagem (Ile/Ile); O: Controle Negativo.

7.3. CLONAGEM

Como mencionado, a clonagem do fragmento utilizado para a genotipagem foi uma estratégia para a confirmação do anelamento correto dos *primers*. Todos os fragmentos clonados e sequenciados tanto homozigotos como heterozigotos corroboraram a genotipagem realizada através da visualização do gel de agarose. A figura 14 mostra duas seqüências obtidas a partir da clonagem de indivíduos genotipados como heterozigoto, em cada uma das mutações, utilizando essa estratégia.

Val 1016 Ile		1	50
ValTG CGGG..CACA AATTGTTTCC CACCCGCACC		
Ile	TGCGGGCAGG GCGGCGGGG CGGGGCCACA AATTGTTTCC CACCCGCACT		
ConsensusgG CGGG..CACA AATTGTTTCC CACCCGCACC		
		51	99
Val	GCTACTTAAC CTTTTCTTAG CCTTGCTTTT GTCCAATTC GGTTCATCC		
Ile	GACTACTTAAC CTTTTCTTAG CCTTGCTTTT GTCCAATTC GGTTCATCC		
Consensus	GaTACTTAAC CTTTTCTTAG CCTTGCTTTT GTCCAATTC GGTTCATCC		
Ile 1011 Met		1	50
Ile	GTCCTGTATT CCGTTCTTTT TGGCCACCGT AGTGATAGTA AATCTAGTAG		
Met	GTCCTGTATT CCGTTCTTTT TGGCCACCGT AGTGATGCA AATCTAGTAG		
Consensus	GTCCTGTATT CCGTTCTTTT TGGCCACCGT AGTGATaGcA AATCTAGTAG		
		51	82
Ile	TAAGTAG..C CCGC.....		
Met	TAAGTAGGCC CCGCCCCCGC CGCCCTGCCC GC		
Consensus	TAAGTAG..C CCGC.....		

Figura 14: Alinhamento realizado através do programa Multialign versão 5.4.1. As sequências foram obtidas a partir da clonagem do segmento amplificado pelos *primers* alelo-específicos. Em azul *primers* comuns às sequências mutadas e selvagens; em verde *Primer* Val 1016F; em amarelo *primer* Ile 1016F; em cinza *primer* Ile 1011R; em rosa *primer* Met 1011R; em vermelho as caudas. Letras em **vermelho negrito** correspondem aos códons mutado e selvagem.

7.4. SEQUENCIAMENTOS E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Em outra estratégia para a confirmação da genotipagem, algumas amostras tiveram um fragmento maior amplificado, utilizando-se *primers* externos kdr 20F e kdr 21R ou kdr F e R, para confirmar a genotipagem da mutação V1016 I e I1011 M respectivamente. Estes fragmentos puderam, então, ser sequenciados diretamente.

A figura 15 mostra duas sequências consenso obtidas a partir desses sequenciamentos. A primeira, na qual foi utilizado o par de *primers* kdr 20F e kdr 21R, observa-se o códon ATA (Isoleucina) nas posições 1011 (exon 20) e 1016 (exon 21). Já a segunda foi obtida a partir dos *primers* kdr F e kdr R e apresenta o códon ATA (Isoleucina) na posição 1011 e GTA (Valina) na posição 1016. Ainda que o objetivo de se utilizar *primers* diferentes fosse contemplar cada uma uma mutação, observamos que em ambas sequências as duas mutações foram atingidas, pois estão separadas por 246 ou 262pb.

Entre essas mutações existe uma região de íntron na sequência. Em amostras em que a mutação V1016I está presente, como observado na primeira sequência, o tamanho do íntron foi de 250pb, e em amostras em que esta mutação não esteve presente, o íntron foi de 234pb. As sequências alinhadas dos íntrons de algumas amostras de 2001 e 2011 são mostradas na figura I dos anexos. O mesmo padrão de íntron foi observado nos dois anos e a variação de frequência e tamanho só ocorreu entre indivíduos com e sem a mutação.

<p>Amostra de Santos (<i>primers kdr 20F e kdr 21R</i>) -</p> <p>ATGTGGGATTGTATGCTTGTGGGTGACGTGTCCTGTATTCCGTTCTTTTTG GCCACCGTAGTGATA GGAAATCTAGTA gtaagtattccgttgggagttcttataaggctgact gaaagtaaattggagcgcacaacaagacctgttatgctgtaagtccagcactaaattctcaggtgaattgcagtagtca atcgaaatctcgaacttctatttgataacagcaataactagacgcgcatagaacatacaaatatcatatagtcagccttcatg cattctatcgtgctaaccgacaaattgttccaccgccacagATACTTAACCTTTTCTTAGCCTTGC TTTTGTCCAATTTCGGTTCATC</p>
<p>Amostra de Bauru (<i>primers kdr F e R</i>)</p> <p>CTTCCC GGACAAAGACCTGCCACGGTGGAACTTCACCGACTTCATGCACT CATTGATGATCNGTGTTCGGGTATTATGCGGCGAGTGGATCGAATCCAT GTGGGATTGTATGCTTGTGGGTGACGTGTCCTGTATTCCGTTCTTTTTGGC CACCGTAGTGATA GGAAATCTAGTA gtaagtattccgttggaagttcatctgaaggctgactgaa agtaaattggagcgcacaacagacctattatgctgtaattcgtgattcaactgttataaaaagaccggtgatcttgatagcatc aatattagaggcgtgctagcagcagcagggggcgtaccaatttacttttagtcagttcttctgcattcttcgtgctaaccg acaaattgttccactcgcacagGTACTTAACCTTTCTTAGCC</p>

Figura 15: Sequências consenso utilizando *primers* externos à mutação para confirmação da genotipagem. Em amarelo, parte dos *primer*; em verde lócus 1011; em vermelho lócus 1016. Em letras minúsculas: região do íntron.

Os cromatogramas representando alguns indivíduos genotipados estão nas figuras 16 a 20. As figuras 16 e 17 mostram cromatogramas de genótipos homocigoto selvagem (Val/Val) e homocigoto para a mutação (Ile/Ile) na posição 1016, respectivamente.

As figuras 18, 19 e 20 mostram cromatogramas da posição 1011. Na figura 18 e 19 são cromatogramas de indivíduos genotipados como homocigoto selvagem (Ile/Ile) e homocigoto para a mutação (Met/Met), respectivamente. A figura 20 mostra um cromatograma de uma amostra genotipada como heterocigoto para esse

locus. Observamos dois picos na posição indicada, um preto (G) e um verde (A) identificando os dois alelos presentes (Ile/Met).

Os códons que codificam esses aminoácidos estão indicados em vermelho.

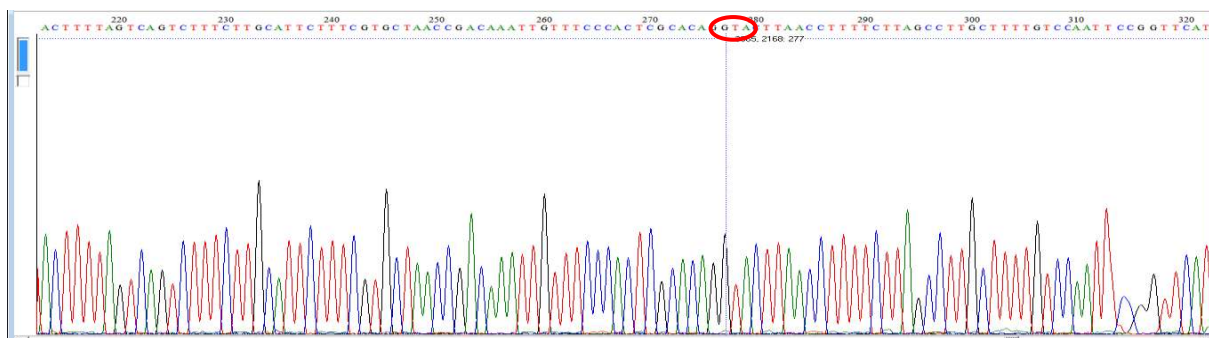


Figura 16: Cromatograma da amostra de Santos (2.9) - mutação 1016 - GTA (Val/Val) – utilizando *primers* externos.

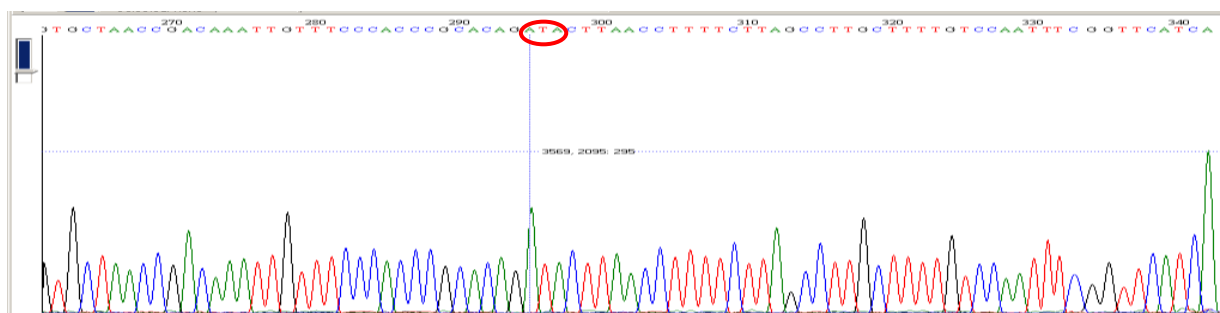


Figura 17: Cromatograma da amostra de Santos (2.6) - mutação 1016 - ATA (Ile/Ile) utilizando *primers* externos.

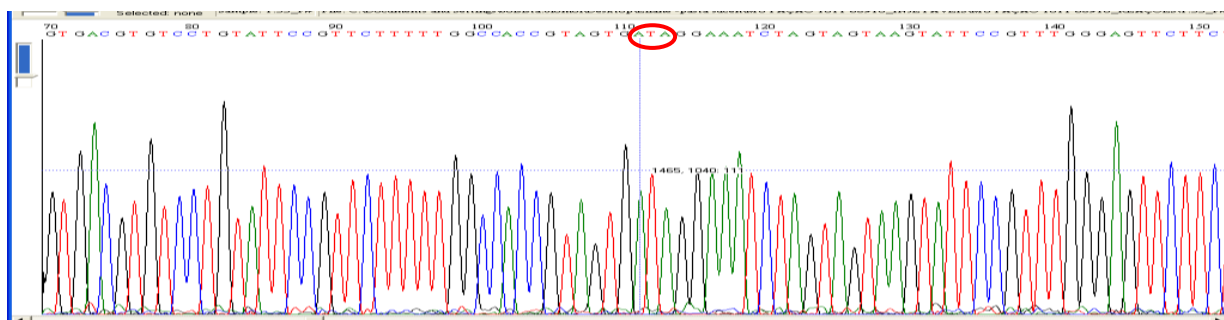


Figura 18: Cromatograma da amostra de Bauru (1.33) - mutação 1011- ATA (Ile/Ile) – utilizando *primers* externos.

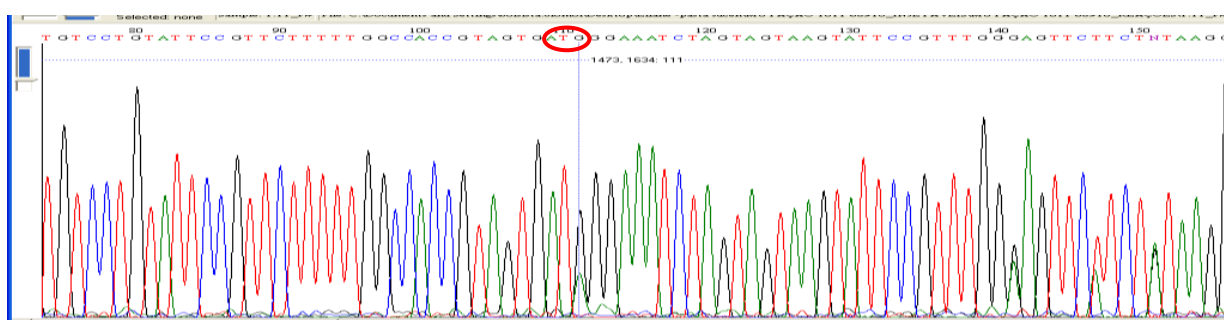


Figura 19: Cromatograma da amostra de Bauru (1.11) - mutação 1011- ATG (Met/Met)- utilizando *primers* externos.

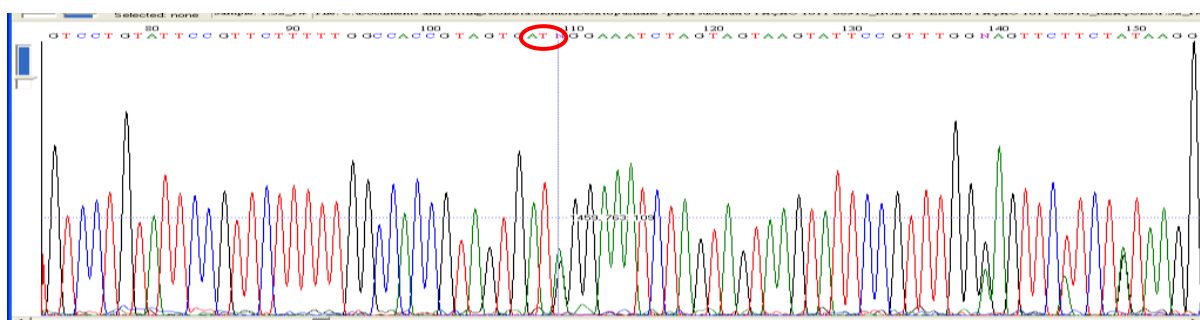


Figura 20: Cromatograma da amostra de Bauru (1.32) - mutação 1011 - ATN (Ile/Met), utilizando *primers* externos.

A partir dos sequenciamentos e clonagens efetuadas pudemos confirmar a genotipagem de alguns indivíduos feita através da técnica de PCR com *primers* alelo-específicos. Não houve divergência entre os sequenciamentos e as genotipagens realizadas através da técnica.

7.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

7.5.1 Mutação V 1016 I

As frequências genótípicas e alélicas para o locus 1016 foram calculadas para cada município nos dois anos de coleta. Os resultados estão sumarizados nas tabelas 8 e 9.

Em 2001, o alelo que confere resistência Ile1016 estava presente apenas nas cidades de Santos e Presidente Prudente, com frequências de 0,76 e 0,03, respectivamente. Nesse ano, o município de Santos já apresentava 70% dos indivíduos homocigotos para essa mutação.

Passados dez anos, em 2011, todas as cidades amostradas apresentaram o alelo resistente. Na amostra de Santos a frequência do genótipo homocigoto mutado continuou elevada (0,78), não se alterando significativamente ($p = 0,21$). Nas demais populações as frequências dos genótipos heterocigoto e homocigoto resistente, bem como a frequência do alelo resistente Ile1016 aumentaram significativamente (tabelas 8 e 9).

A figura 21 apresenta o mapa do Estado de São Paulo, mostrando a variação de frequência alélica em cada município estudado.

Tabela 8: Frequência genotípica do códon 1016 do *AaNa_v*, em alguns municípios do Estado de São Paulo.

Município	Ano	N	Frequência Genotípica			χ^2 (GL)	p ($\alpha = 0,05$)
			Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile		
Santos	2001	52	0,17	0,13	0,70	3,15 (2)	0,21
	2011	50	0,06	0,16	0,78		
Campinas	2001	50	1,00	0,00	0,00	66,67 (2)	*
	2011	50	0,20	0,26	0,54		
Bauru	2001	50	1,00	0,00	0,00	42,86 (2)	*
	2011	50	0,40	0,26	0,34		
Marília	2001	50	1,00	0,00	0,00	72,41 (2)	*
	2011	50	0,16	0,62	0,22		
Presidente Prudente	2001	50	0,94	0,06	0,00	60,38 (2)	*
	2011	36	0,11	0,47	0,42		

Dados mostrados: (N) número de indivíduos analisados; (χ^2) Valor de Qui-Quadrado; (GL) Graus de Liberdade; (*) valor de $p < 0,001$.

Tabela 9: Frequência alélica do códon 1016 do *AaN_v*, em alguns municípios do Estado de São Paulo.

Município	Ano	N	Frequência Alélica		χ^2 (GL)	p ($\alpha = 0,05$)
			Val	Ile		
Santos	2001	52	0,24	0,76	3,32 (1)	0,07
	2011	50	0,14	0,86		
Campinas	2001	50	1,00	0,00	110,75 (1)	*
	2011	50	0,33	0,77		
Bauru	2001	50	1,00	0,00	61,44 (1)	*
	2011	50	0,53	0,47		
Marília	2001	50	1,00	0,00	72,11 (1)	*
	2011	50	0,47	0,53		
P. Prudente	2001	50	0,97	0,03	78,74 (1)	*
	2011	36	0,35	0,65		

Dados mostrados: (N) número de indivíduos analisados; (χ^2) Valor de Qui-Quadrado; (GL) Graus de Liberdade; (*) valor de $p < 0,001$.

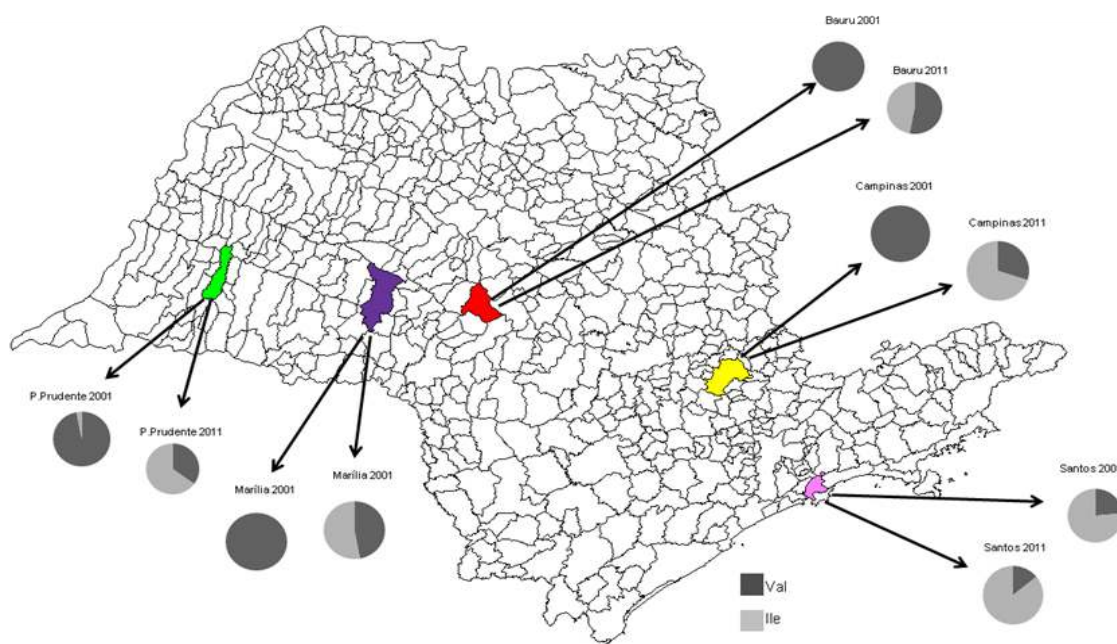


Figura 21: Mapa do estado de São Paulo. Os municípios analisados estão destacados em cores. Os gráficos mostram a frequência alélica da mutação V1016I nos anos 2001 e 2011. Em preto: frequência do alelo Val 1016 (selvagem); em cinza: frequência do alelo Ile 1016 (mutado).

7.5.1.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg locus 1016

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizado para estimar o valor de “ p ”. A análise das amostras de 2001 mostra que as populações de Bauru, Campinas, Presidente Prudente, Marília estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 10). A hipótese de equilíbrio foi aceita, pois o valor estimado de p foi maior que 0,05.

Já para a população de Santos a hipótese de equilíbrio foi rejeitada (valor estimado de p menor que 0,05). Os valores encontrados e esperados utilizados nesse cálculo estão mostrados em anexo

Em 2011 o cenário foi diferente. Somente Presidente Prudente e Marília continuam em equilíbrio e as populações de Bauru, Santos e Campinas não estiveram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, mostrando que algum processo evolutivo atuava nestas três populações.

Tabela 10: Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o locus 1016 do *AaN_{av}* em alguns municípios de São Paulo nos anos 2001 e 2011.

Municípios	Ano	χ^2	GL	Valor de p
Santos	2001	20,82	1	*
	2011	5,63	1	*
Campinas	2001	0	1	1
	2011	10,10	1	*
Bauru	2001	0	1	1
	2011	11,42	1	*
Marília	2001	0	1	1
	2011	2,99	1	0,084
Presidente	2001	0,048	1	0,83
Prudente	2011	0,06	1	0,8

Dados mostrados: (χ^2) Valor de Qui-Quadrado; (GL) Graus de Liberdade; (*) valor de $p < 0,05$.

Com o intuito de testar a hipótese do desvio de EHW ocorrer em consequência de endogamia, o que refletiria algum grau de isolamento genético das populações, estimou-se o valor de F_{IS} . Os valores estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Estimativa de F_{IS} de Wright para o locus 1016

Município	Ano	Heterozigotos		F_{IS}
		Observados	Esperados	
Santos	2001	7	18,97	0,63
	2011	8	12,04	0,34
Campinas	2001	0	-	-
	2011	13	25,41	0,49
Bauru	2001	0	-	-
	2011	13	24,91	0,48
Marília	2001	0	-	-
	2011	31	24,91	-0,24
P. Prudente	2001	3	2,91	-0,03
	2011	17	16,38	-0,04

7.5.2 Mutação I 1011 M

Em 2001, foi observado polimorfismo nesse locus em todas as populações estudadas. Entretanto o genótipo homozigoto para a mutação foi encontrado em apenas um indivíduo do município de Bauru (tabela 12).

Em 2011 não observamos variação significativa nas frequências genotípicas e alélicas em quase todas as populações estudadas. A exceção foi a população de Santos, onde observou-se aumento significativo na frequência do alelo resistente Met 1011 de 0,06 para 0,45 (tabelas 12 e 13).

Tabela 12: Frequência genotípica do códon 1011 do *AaNav*, em cinco municípios do Estado de São Paulo.

Município	Ano	N	Frequência Genotípica			χ^2 (GL)	p ($\alpha = 0,05$)
			Ile/Ile	Ile/Met	Met/Met		
Santos	2001	52	0,88	0,12	0,00	62,77 (2)	*
	2011	50	0,1	0,9	0		
Campinas	2001	50	0,36	0,64	0,00	2,23 (2)	0,33
	2011	50	0,46	0,52	0,02		
Bauru	2001	50	0,56	0,42	0,02	1,83 (2)	0,4
	2011	50	0,66	0,34	0		
Marília	2001	50	0,32	0,68	0,00	0,18 (2)	0,91
	2011	50	0,36	0,64	0		
P. Prudente	2001	50	0,44	0,56	0,00	0,54 (2)	0,76
	2011	36	0,26	0,46	0		

Dados mostrados: GL=Graus de Liberdade; * P<0,001

Tabela 13: Frequência alélica do códon 1011 do *AaNav*, em alguns municípios do estado de São Paulo.

Município	Ano	N	Frequência Alélica		χ^2 (GL)	p ($\alpha = 0,05$)
			Ile	Met		
Santos	2001	52	0,94	0,06	41,85 (1)	*
	2011	50	0,55	0,45		
Campinas	2001	50	0,68	0,32	0,38 (1)	0,54
	2011	50	0,72	0,28		
Bauru	2001	50	0,77	0,23	1,13 (1)	0,29
	2011	50	0,83	0,17		
Marília	2001	50	0,66	0,34	0,09 (1)	0,76
	2011	50	0,68	0,32		
P. Prudente	2001	50	0,72	0,28	0,31 (1)	0,58
	2011	36	0,68	0,32		

Na figura 22 podemos ver um mapa do Estado de São Paulo com os municípios analisados em destaque. A frequência alélica da mutação I1011M está demonstrada em gráficos.

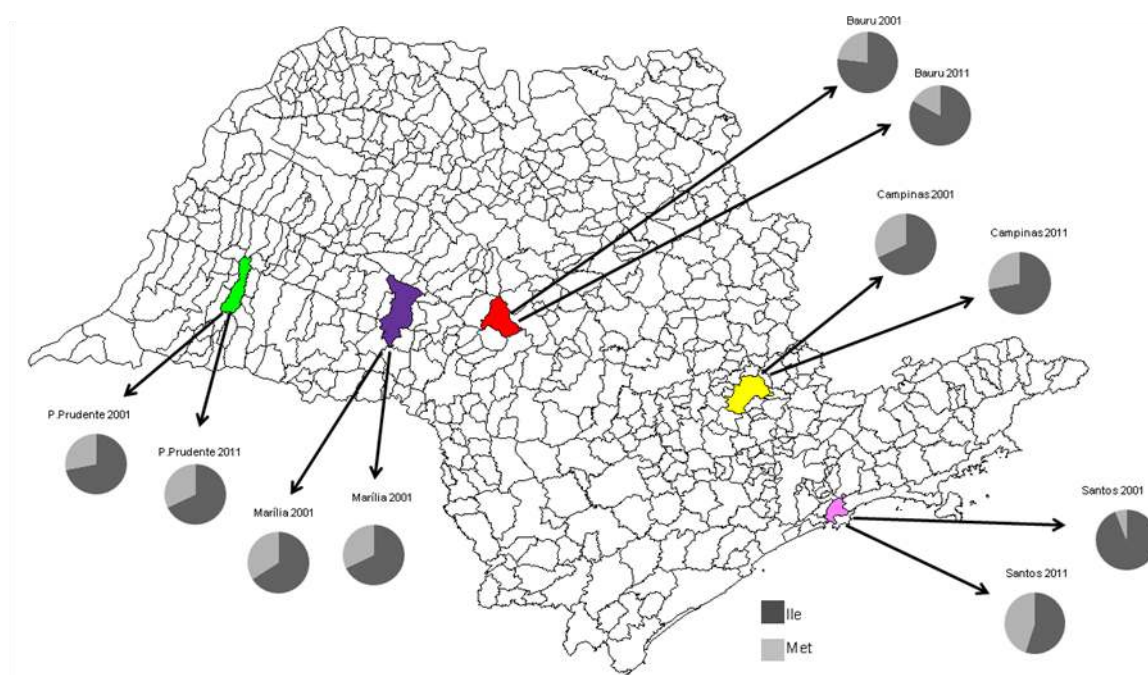


Figura 22: Mapa do Estado de São Paulo. Os municípios analisados estão destacados em cores. Os gráficos mostram a frequência alélica da mutação I1011IM nos anos 2001 e 2011. Em preto: alelo Ile 1011 (Selvagem); em cinza: alelo Met 1011 (Mutado).

7.5.2.1. Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg – locus 1011

A tabela 14 mostra o resultado dos testes de EHW nas amostras. No ano de 2001, as populações em EHW eram: Bauru e Santos. Já no ano de 2011 somente a população de Bauru estava em EHW.

Tabela 14: Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para o locus 1011 do *AaNav* em cinco municípios do Estado de São Paulo nos anos 2001 e 2011.

Municípios	Ano	χ^2	GL	Valor de <i>p</i>
Santos	2001	0,19	1	0,66
	2011	33,48	1	*
Campinas	2001	11,07	1	*
	2011	5,94	1	*
Bauru	2001	1,72	1	0,19
	2011	2,10	1	0,147
Marília	2001	13,26	1	*
	2011	11,07	1	*
Presidente Prudente	2001	7,56	1	*
	2011	7,92	1	*

Dados mostrados: (χ^2) Valor de Qui-Quadrado; (GL) Graus de Liberdade; (*) valor de *p* < 0,05.

O valor de F_{IS} de *Wright* também foi estimado para este locus. Observamos um valor de $F_{IS} < 0$ para todos os municípios analisados nos dois anos de coleta (Tabela 15). Podemos observar excesso de heterozigotos neste locus nas cidades analisadas.

Tabela 15: Estimativa de F_{IS} de *Wright* para o locus 1011

Município	Ano	Heterozigotos		F_{IS}
		Obs.	Esp.	
Santos	2001	6	5,87	-0,02
	2011	45	24,75	-0,82
Campinas	2001	32	21,76	-0,47
	2011	26	20,16	-0,29
Bauru	2001	21	17,71	-0,19
	2011	17	14,11	-0,20
Marília	2001	34	22,44	-0,52
	2011	32	21,76	-0,47
P. Prudente	2001	28	20,16	-0,39
	2011	23	15,67	-0,47

7.5.3. Análise do mtDNA (ND4)

O número de sequências de ND4 analisadas em cada ano para cada localidade está descrito na tabela 16. O tamanho dos fragmentos analisados foi de 325 pb.

Tabela16: Número de sequências de ND4 analisadas em cada localidade nos anos 2001 e 2011.

Municípios	2001	2011
Santos	16	9
Campinas	12	8
Bauru	12	10
Marília	10	7
Presidente Prudente	08	8
Total	58	42

Os haplótipos encontrados nessas localidades apresentaram 15 sítios polimórficos em 2001 e 12 em 2011. Das 14 substituições observadas em 2001, foram 14 sinônimas e somente 1 não sinônima, por outro lado todas as substituições encontradas em 2011 foram sinônimas (tabela 17).

Tabela 17: Análise do polimorfismo observado entre as sequências de ND4 analisadas

	2001	2011
Nº de sequências	58	42
Nº de haplótipos	7	6
Nº de sítios polimórficos	15	12
Nº de substituições sinônimas	14	12
Nº de substituições não-sinônimas	1	0
Diversidade nucleotídica (π)	0.01474	0.01731
Erro Padrão de π	0.00997	0.00858
Diversidade haplotípica (Hd)	0.719	0.657
Erro Padrão de Hd	0.050	0.046

Para as 58 amostras de *Ae. aegypti* de 2001 foram encontrados 7 haplótipos diferentes (A-G). Já para as 42 amostras analisadas em 2011 foram encontrados 6 haplótipos, sendo que os haplótipos A, C e F se repetem neste ano (tabela 18).

Em 2001 o haplótipo F foi o mais frequente e encontrado em todas as populações exceto em Santos, seguido do haplótipo A, compartilhado por Santos, Campinas e Bauru. Os haplótipos B, C e E foram exclusivos da população de Santos. O haplótipo G foi encontrado somente em Bauru e o D foi encontrado em igual frequência (0,5) em Santos e Marília.

No ano de 2011, os haplótipos A e F foram encontrados em todas as localidades. Os haplótipos H e I foram encontrados somente em Campinas e os haplótipos J e C foram exclusivos de Santos.

Tabela 18: Haplótipos encontrados nos municípios e o número de indivíduos que compartilham cada haplótipo em cada localidade no ano de 2001.

Ano	HAPLÓTIPOS	Indivíduos por Haplótipo					TOTAL
		Santos Fr (n)	Campinas Fr (n)	Bauru Fr (n)	Marília Fr (n)	P. Prudente Fr (n)	
2001	A	0,2(2)	0,6(6)	0,2(2)	0	0	10
	B	1/(4)	0	0	0	0	4
	C	1/(2)	0	0	0	0	2
	D	0,5/(4)	0	0	0,5(4)	0	8
	E	1(4)	0	0	0	0	4
	F	0	0,21(6)	0,29(8)	0,21(6)	0,29(8)	28
	G	0	0	1(2)	0	0	2
2011	A	0,11(2)	0,21(4)	0,37(7)	0,26(5)	0,05 (1)	19
	H	1(2)	0	0	0	0	2
	I	0	1(1)	0	0	0	1
	C	1(3)	0	0	0	0	3
	J	0	1(1)	0	0	0	1
	F	0,125(2)	0,125(2)	0,19(3)	0,125(2)	0,44(7)	16

O diagrama de haplótipos foi construído a partir do software TCS v1.21, o qual estima a relação entre os haplótipos (figura 23). O tamanho dos quadrados é proporcional ao número de indivíduos que compartilham determinado haplótipo. O diagrama sugere que o haplótipo F e o haplótipo A são ancestrais entre os indivíduos estudados nos anos 2001 e 2011, respectivamente.

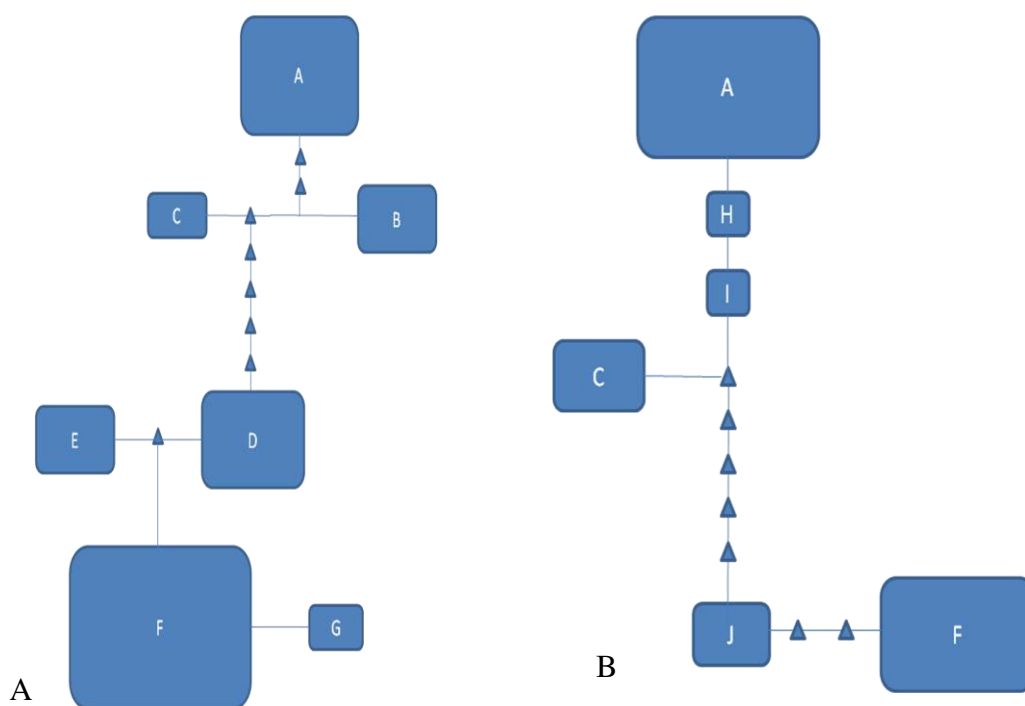


Figura 23: Rede de haplótipos encontrados em *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo, obtida a partir do programa TCS. A rede A representa os haplótipos encontrados em 2001 e a rede B em 2011. O tamanho dos quadrados representa a frequência de cada haplótipo. Os triângulos representam os passos mutacionais.

A análise de F_{ST} pareado nas amostras de 2001 mostra que existe uma baixa diferenciação genética entre os município de Santos e Campinas, Bauru e Presidente Prudente, e Marília e Bauru. As demais localidades apresentam uma alta diferenciação genética entre si (tabela 19). O maior número de migrantes foi encontrado entre Bauru e Presidente Prudente, seguido de Santos e Campinas.

Tabela 19: Em azul: F_{ST} pareado estimado entre populações de *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo coletadas em 2001. Em vermelho: Índice de migração (Nm) por geração estimada entre populações de *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo em 2001.

	Santos	Campinas	Bauru	Marília	P. Prudente
Santos	-	8.75912	1.51992	0.98578	0.63277
Campinas	0.05708	-	2.83929	0.98258	0.77419
Bauru	0.32897	0.17610	-	1.78243	10.90909
Marilia	0.50721	0.50886	0.06425	-	1.18812
P.Prudente	0.79018	0.64583	0.04583	0.42083	-

Já em 2011, o município de Presidente Prudente tem uma diferenciação genética com os outros municípios caracterizada como muito alta, pois o F_{ST} encontrado foi $> 0,25$ em todos os pares (tabela 20). Todos os demais municípios apresentaram uma diferenciação genética baixa entre si. Em consequência disso, o número de migrantes entre Presidente Prudente e os demais municípios é baixo em comparação com os outros entre si. Para Bauru e Campinas, Marília e Campinas, e Marília e Bauru foram observados infinitos migrantes.

Tabela 20: Em azul: F_{ST} pareado estimado entre populações de *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo em 2011. Em vermelho: Índice de migração (Nm) por geração estimado entre populações de *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo em 2011.

	Santos	Campinas	Bauru	Marília	P. Prudente
Santos	-	13.71041	7.59355	9.61966	1.16199
Campinas	0.03647	-	Inf	Inf	0.56323
Bauru	0.06585	0.00000	-	Inf	0.64385
Marilia	0.05198	0.00000	0.00000	-	0.59107
P.Prudente	0.43030	0.88773	0.77658	0.84593	-

*Inf = infinitos

8. DISCUSSÃO

No controle do vetor da dengue, *Aedes aegypti*, ainda se faz uso de inseticidas químicos. Essa utilização pode levar ao surgimento de linhagens resistentes aos inseticidas ocasionando falhas no controle. Como já descrito pela literatura científica, há forte correlação entre mutações no gene codificante do canal de sódio e resistência a inseticidas piretróides e DDT (BRENGUES *et al.*, 2003; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2009). Por isso, monitorar a evolução dessas mutações ao longo do tempo é fundamental para que essa ferramenta de controle seja eficiente.

Como esse monitoramento deve ser efetuado de forma contínua, a utilização de protocolos de baixo custo, que proporcionem a obtenção rápida de resultados precisos torna-se bastante apropriada. Nesse sentido, o presente estudo, utilizou o método de genotipagem por PCR alelo-específico para a avaliação da frequência de duas mutações no gene codificador do canal de sódio (Na_v).

Este método mostrou-se relativamente barato, pois utiliza equipamentos comumente encontrados em laboratórios de biologia molecular como termociclador e cuba de eletroforese e ainda reagentes de baixo custo. SAAVEDRA-RODRIGUES *et al.* (2008) estimaram que se gasta cerca de 0,35 dólares (EUA) para a determinação de um genótipo por esse método. Em contrapartida a análise pela curva de desnaturalização em máquina de tempo real, por exemplo, custa 0,73 dólares (EUA).

Com base nos resultados aqui obtidos consideramos que o método foi eficiente na identificação dos genótipos nos locos 1011 e 1016. De acordo com MARTINS & VALLE (2011) muitas metodologias com base nesta estratégia tem sido bem sucedida e tem possibilitado fazer diagnóstico individual de mutações kdr.

Alguns indivíduos tiveram seu DNA sequenciado para a confirmação da genotipagem realizada visualmente. Os sequenciamentos de parte dos exons 20 e 21 permitiram essa confirmação corroborando a eficácia do método.

De fato, em um estudo comparando os métodos utilizados na detecção de mutações kdr em *Anopheles gambiae*, como PCR-alelo específico, Taq-Man, HRM, HOLA, SSOP-ELISA e PCR dot-blot, BASS *et al.* (2007) mostraram que o método

de PCR-alelo específico é razoavelmente sensível, mas com algumas falhas, pois em algumas reações o genótipo não pode ser determinado. Eles afirmaram que essa dificuldade pode ter ocorrido devido à avaliação visual afetada pela variação na qualidade do gel de agarose. Outra dificuldade apontada pelos autores refere-se à toxicidade apresentada pelo Brometo de Etídeo, corante de ácidos nucleicos amplamente utilizado na visualização de fragmentos de DNA em géis de agarose. Para contornar esse inconveniente o Brometo de Etídeo foi substituído por GelRed™, uma alternativa sensível e mais segura.

Em Presidente Prudente o alelo Ile 1016 foi encontrado em baixa frequência e em heterozigose no ano de 2001, o que pode indicar a recente entrada do alelo na região na época. Por outro lado, a população de Santos já apresentava, naquele ano, uma alta frequência do genótipo homozigoto para a mutação no locus 1016. Esse dado indica a presença expressiva de indivíduos resistentes a piretróides no local desde 2001, o que pode ter sido provocado por mecanismos envolvidos no processo de seleção.

O controle de vetores anteriormente a essa época (até 1984) era realizado pela SUCAM (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública) do Ministério da Saúde, com a utilização de DDT e depois pela SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) utilizando piretróides. Provavelmente a pressão seletiva foi decorrente da utilização destes inseticidas, pois tanto o DDT como os piretróides possuem o mesmo sítio de ação, o canal de sódio.

De acordo com SAAVEDRA RODRIGUES *et al.* (2007 e 2008), RAJATILEKA *et al.* (2008), GARCIA *et al.*, (2009) e MARTINS *et al.* (2009), a mutação V 1016 I confere resistência aos inseticidas piretróides e ao DDT em populações de *Ae. aegypti* no Brasil e em outros países da América Latina. Isso pode ser percebido nestes estudos a partir da associação significativa entre o fenótipo de resistência observado em bioensaios e altas frequências de indivíduos homozigotos para essa mutação dentre os sobreviventes. Esses autores comprovaram o caráter recessivo da mutação, pois somente indivíduos homozigotos mostraram-se 100% resistentes aos piretróides.

Devido a essa característica genética da mutação (fenótipo recessivo), MARTINS & VALLE (2009) afirmaram que a mutação só aumenta de frequência se a pressão de seleção for constante.

Em 2011, o alelo Ile 1016 manteve-se em alta frequência na população de Santos, mas um aumento significativo desse alelo foi observado em todas as demais populações estudadas (tabelas 8 e 9). Esse aumento de frequência poderia ser explicado, em primeira hipótese, pela seleção de indivíduos resistentes com a utilização de inseticidas piretróides nos municípios.

Comparando a frequência da mutação V1016I em populações de *Ae. aegypti* de Nova Iguaçu (RJ) em 2003 e 2008, MARTINS *et al.* (2009b) verificaram aumento significativo (62%) das frequências. Esses autores sugeriram que o aumento do alelo mutado com o passar do tempo é devido à pressão seletiva causada pela utilização de inseticidas piretróides no controle de insetos do local.

No Estado de São Paulo, no ano de 2001 e até o início de 2002, os órgãos de controle utilizavam cipermetrina no controle de indivíduos adultos de *Ae. aegypti* em todas as localidades aqui estudadas. A partir de 2003 a utilização de cipermetrina (PY) foi totalmente substituída por Fenitrothion (adultos) e Malathion (OP) (larvas) (Antonio Henrique Alves Gomes – DCV/SUCEN – comunicação pessoal).

A pressão seletiva de inseticidas piretróides sobre os indivíduos do Estado de São Paulo se deu até 2002. De acordo com GARCIA *et al.* (2009), enquanto a frequência de Ile/Ile e Val/Ile é baixa, a maioria dos indivíduos de uma população suscetível pode ser eliminada pelo uso do inseticida. Assim a frequência do alelo Ile 1016 na próxima geração torna-se elevada, pois apenas os mosquitos homocigotos, e eventualmente, alguns heterocigotos sobrevivem.

Entretanto, com a substituição dos piretróides pelos órgãos de controle do *Ae. aegypti*, essa pressão não poderia explicar o aumento significativo do alelo Ile 1016 no ano 2011. A aparente contradição entre a não utilização de piretróides no controle de *Ae. aegypti* e o surgimento de resistência a esses compostos pode ser explicada pelo uso doméstico de inseticidas. De fato, os principais inseticidas de uso doméstico têm como princípio ativo piretróides. Uma característica importante, o uso de água como solvente faz com que esses inseticidas comerciais apresentem grande vantagem mercadológica, devido à ausência de odor forte. Particularmente, o uso de inseticidas

do tipo “pastilha”, empregado em difusores elétricos se mostra bastante disseminado, o que os torna potenciais causadores de pressão seletiva.

O vetor da dengue, *Ae. aegypti* é um inseto domiciliado e vive ao redor e no interior das habitações em busca de repasto sanguíneo, causando incômodo para as pessoas (FORATTINI, 2002). Com o intuito de matar ou afastar esses insetos, a população faz uso desses inseticidas. Embora não seja possível mensurar a quantidade de piretróide utilizados em todos os inseticidas de uso doméstico, não se pode descartar essa possibilidade de seleção.

Em estudo realizado em populações de *Ae. aegypti* em alguns estados do México, GARCIA *et al.* (2009) observaram um aumento na frequência da mutação V1016I que chegou a 60% entre os anos 1996 e 2008. Os autores declaram que existe a possibilidade de materiais tratados com piretróides e utilizados pela população, como cortinas, tapeçaria de paredes e telas poderem promover essa evolução de kdr em *Ae. aegypti*.

É necessário que uma maior fiscalização na comercialização desses compostos seja efetuada para que essa ferramenta de controle possa voltar a ser eficiente no futuro. MARTINS & VALLE (2011) recomendaram, em nota técnica, que essa fiscalização seja efetuada nos serviços privados de aplicação de inseticidas em condomínios, clubes e empresas, pois a pressão de seleção pode estar ocorrendo mesmo que os órgãos de controle não utilizem esses compostos. Além disso, é necessário que estratégias educativas sejam desenvolvidas a fim de que a população seja informada sobre a resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas piretróides e assim diminuir o uso indiscriminado desses compostos.

Neste estudo percebe-se que existia uma alta frequência da mutação em Santos antes que ela fosse encontrada nas demais localidades aqui estudadas. Também pode-se observar que dez anos depois ela foi encontrada em todas as localidades. Baseado-se nesses dados pode-se propor, como segunda hipótese, que a mutação foi introduzida nessa região sendo disseminada no sentido litoral-interior do estado. Os resultados das análises das sequências do mtDNA, discutidos mais adiante podem corroborar essa hipótese.

Além disso, Santos tem o porto como sua principal atividade econômica. A intensa movimentação de cargas, o terminal de cruzeiros e outras atividades

portuárias favorecem a introdução de insetos como o *Ae. aegypti* no local. Essa migração poderia ter introduzido o alelo resistente em populações nativas e posteriormente ter disseminado para localidades do interior do Estado.

No município de Campinas, por exemplo, que em 2001 não apresentava alelo de resistência passou a uma frequência de 0,77 (tabela 9). A partir dos dados do mtDNA em 2001 observa-se que entre Campinas e Santos existe uma comunicação genética (tabela 19), ou seja, existe uma migração entre os indivíduos de *Aedes aegypti* desses locais. Sendo assim, indivíduos de Santos poderiam ter migrado para Campinas e propagado o alelo ocasionando o aumento de frequência observado dez anos mais tarde.

Ao se estimar a diferenciação genética para 2011 observa-se que ocorre fluxo gênico entre as populações de *Aedes aegypti* presentes em 4 dos 5 municípios. Os valores de F_{ST} estimados foram baixos e o índice de migração mostrou-se elevado, exceto para Presidente Prudente.

Em algumas populações como Santos (2001 e 2011), Campinas, Bauru, e Marília (2011) foi observado um desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg para o locus 1016. Mostrando que provavelmente um ou mais processos evolutivos estejam atuando nessas populações.

Em 2001, por exemplo, somente Santos não estava em EHW, refletindo um excesso de homozigotos nessa população ($F_{IS} > 0$). Apesar desse aumento de homozigose poder ser relacionado com endogamia, nota-se que ele se deu nos homozigotos que apresentam a mutação associada à resistência. Isso nos leva a crer que o mecanismo evolutivo envolvido nesse processo seja a seleção positiva do alelo de resistência e a pressão seletiva exercida pelos inseticidas PY usados ou pela população ou por empresas de controle particular. O mesmo ocorreu em 2011 nas populações de Bauru, Santos e Campinas que apresentaram excesso de homozigotos resistentes ($F_{IS} > 0$).

O município de Marília apresentou resultado significativo para $F_{IS} < 0$. Neste caso observou-se um excesso de heterozigotos explicando o desequilíbrio. Não se pode descartar a hipótese de que o genótipo heterozigoto esteja sendo selecionado pelo emprego de PY em baixa concentração pela população. Um estudo com bioensaios feito por SAAVEDRA-RODRIGUES (2007) mostra que em

concentrações de permetrina (PY) que matam 100% de indivíduos homozigotos selvagens e em que 100% dos homozigotos mutados sobrevivem, cerca de 10% dos heterozigotos também sobrevivem (SAAVEDRA-RODRIGUES, 2007).

O EHW para o locus 1016 encontrado nas populações de Bauru, Campinas e Marília em 2001 e ainda Presidente Prudente em 2011 (tabela 10) podem sugerir que fatores evolutivos como seleção e migração não estejam ocorrendo. De fato o município de Presidente Prudente em 2011 tem uma diferenciação genética com as outras localidades muito alta e um ínfimo índice de migração (tabela 20). Além disso, em 2001 não havia polimorfismo para esse locus nessas localidades então a variação alélica e genotípica não poderia ocorrer tampouco a seleção do alelo de resistência. Outra premissa provavelmente mantida foi o cruzamento aleatório entre os indivíduos.

Para a mutação I1011M, os dados na literatura não são homogêneos. Essa mutação foi correlacionada com resistência a piretróides em populações de *Ae. aegypti* na região Norte (BRENGUES *et al.*, 2003) e Nordeste do Brasil (LIMA *et al.*, 2011). Em estudos eletrofisiológicos, BRENGUES *et al.* (2003) associaram esta mutação com diferentes níveis de sensibilidade do nervo para Permetrina e Lambda-Cialotrina (PY).

Entretanto essa correlação não foi encontrada em populações de Cuba e México (SAAVEDRA-RODRIGUES *et al.*, 2007) e ainda não foram confirmadas nas populações brasileiras de Natal e Nova Iguaçu (MARTINS *et al.*, 2009a e b). Em Natal a frequência do alelo Met 1011 foi maior em indivíduos resistentes do que suscetíveis, mas essa diferença não foi significativa (MARTINS *et al.*, 2009a)

No presente estudo, ocorreu um aumento da frequência do alelo Met 1011 na população de Santos, comparando os anos de 2001 e 2011 (tabela 13). A pressão seletiva com a utilização de piretróides pode explicar esse aumento, se de fato, essa mutação estiver associada à resistência a esses compostos. Entretanto essa frequência não se alterou significativamente em nenhuma das outras localidades estudadas, onde também ocorre a utilização de piretróides domésticos, como discutido anteriormente. Tendo isso em vista, supõe-se que essa variação esteja relacionada com a entrada frequente de insetos que apresentam a mutação pelo porto de Santos.

Maiores estudos devem ser realizados para comprovar a associação da mutação I1011M com a resistência a piretróides. Entretanto, o fato desta mutação ter sido apontada por ter um efeito no nervo do inseto em resposta ao inseticida (GARCIA *et al.*, 2001) e ainda ter sido significativamente associada à resistência em populações de *Ae. aegypti* no Ceará (LIMA *et al.*, 2011) a coloca como uma potencial causadora do fenótipo de resistência, merecendo atenção no que se refere a sua evolução em populações brasileiras.

Os dados do fragmento do mtDNA, ND4 são ainda preliminares. O número de indivíduos analisados por ano é pequeno e não possibilita uma análise completamente confiável. A amostragem precisa ser ampliada para que o fluxo gênico seja melhor estimado. Além disso, de acordo com WHITLOCK & MCCAULEY (1999) a estimativa de Nm a partir do F_{ST} é realmente imprecisa, pois se trabalha com um pequeno número de loci de um número limitado de indivíduos de poucas populações.

Entretanto, a variação em padrões de frequências haplotípicas de mtDNA podem ser utilizadas para estimar as taxas de fluxo de genes entre as populações (GORROCHOTEGUI-ESCARLANTE, 2000). Neste estudo, três haplótipos se repetem nos dois anos de coleta (A, C e F). Os haplótipos A e F são os mais frequentes nas populações. Em 2001 o haplótipo A estava presente em Santos, Campinas e Bauru, já em 2011 se espalhou por todas as populações. O mesmo ocorreu com o haplótipo F que em 2001 só não estava presente em Santos e em 2011 aparece distribuído em todas as localidades (tabela 18). Esses dados corroboram a hipótese de fluxo gênico entre essas populações e sugere que essas linhagens mitocondriais foram sendo introduzidas nas outras localidades com o passar dos anos.

A baixa diversidade genética encontrada entre os municípios de Santos e Campinas no ano de 2001 (tabela 19) indica alto fluxo gênico entre essas localidades. Esse fluxo parece aumentar com o passar dos anos, pois em 2011 temos um maior número na taxa de migração entre esses municípios. Dentre os municípios analisados Campinas é o mais próximo geograficamente de Santos, e a baixa diversidade observada entre esses municípios indicam que a hipótese de que a mutação *kdr* teria sido disseminada do litoral para o interior parece ser verdadeira.

Presidente Prudente é o único município que se caracterizou como geneticamente isolado em 2011, não havendo relação com os outros municípios estudados. Este município foi também o único além de Santos em que o alelo de resistência foi encontrado em 2001. Neste caso, o aumento da frequência no local seria explicado somente pela seleção do alelo pela utilização de inseticidas.

Outro resultado interessante refere-se a uma possível correlação entre a mutação *Kdr* e o tamanho do íntron existente entre os exons 20 e 21 desse gene. Para os sequenciamentos realizados neste estudo observamos que em amostras em que a mutação V1016I foi encontrada, o íntron era de 250pb. Isso ocorreu tanto em amostras heterozigotas como em homozigotas para a mutação. Já para amostras homozigotas selvagem, ou seja, em que a mutação não foi verificada, o tamanho do íntron foi 234pb (Figura I-Anexos).

Comparando-se as sequências dos íntrons de amostras de 2001 e 2011, observamos que esse padrão se repete. O íntron de indivíduos com a mutação V1016I é idêntico no tamanho e na sequência nos dois anos, bem como o íntron de indivíduos sem a mutação também não difere, formando dois grupos.

MARTINS *et al.*, (2009a) em estudo sobre a mutação I1011M e comparando sequências presentes em duas populações de *Ae. aegypti* do Brasil, uma no sudeste (Nova Iguaçu) e outra no nordeste (Natal) com cepas suscetíveis Rockefeller, encontraram os mesmos dois tipos de íntrons com diferenças no tamanho (250 pb e 234pb), além de polimorfismos tipo SNP. Com base no tamanho, as sequências foram classificadas em haplótipo A (250pb) e haplótipo B (234pb). Das sequências de mosquitos resistentes 72,7% era parte do grupo A e a mutação I1011M foi encontrada somente nesse grupo. A cepa de laboratório Rockefeller, utilizada comumente como controle suscetível foi agrupada somente no haplótipo B, no qual nenhuma mutação *kdr* foi detectada.

Embora no presente estudo nenhuma relação tenha sido apontada entre o polimorfismo intrônico e a mutação 1011, observamos que a mutação 1016 ocorre predominantemente em indivíduos que apresentam o haplótipo A de MARTINS *et al.*, (2009a). Esses dados podem estar relacionados com a posição destas mutações no gene que estão presentes no final do exon 20 (mutação 1011) e início do exon 21

(mutação 1016). No caso da mutação 1016 a primeira base após a região de íntron é exatamente onde a mutação ocorre (*intron*GTA – *intron*ATA).

Pela proximidade dos dois marcadores – íntron e mutação (tanto 1011 quanto 1016) pode-se inferir que esses marcadores, sendo um selecionado e outro neutro, estão segregando juntos, talvez pela pressão seletiva nas mutações. Entretanto, nossos resultados são baseados em apenas 13 sequências e, portanto novos estudos devem ser realizados para confirmar essa correlação.

9. CONCLUSÕES

1. O método do PCR alelo-específico utilizado neste estudo foi eficiente para a genotipagem e identificação das mutações *kdr*.
2. Ocorreu um aumento na frequência do alelo Ile 1016 em todas as populações estudadas, comparando-se os anos 2001 e 2011.
3. Esta diferença pode ter sido ocasionada pela utilização de inseticidas domésticos à base de piretróides, uma vez que os órgãos de controle interromperam a utilização desses compostos.
4. O alelo Met 1011 só teve sua frequência aumentada na população de Santos.
5. Embora a associação entre o alelo Met 1011 e o fenótipo de resistência necessite de comprovação, avaliar a evolução desta mutação em populações de *Ae. aegypti* pode ser importante para contribuir com as estratégias de controle.
6. Os dados do mtDNA sugerem que ocorra fluxo gênico entre as populações estudadas.
7. A partir deste estudo podemos observar que a resistência tipo *kdr* está presente em todas as populações de *Ae. aegypti* estudadas.
8. O objetivo dos órgãos de controle na interrupção da utilização de piretróides era diminuir a pressão seletiva para a resistência e assim poder retornar a aplicação dos piretróides. Essa estratégia faria com que a frequência da mutação diminuísse nas populações naturais, devido ao alto custo evolutivo que ela causa para o vetor. Entretanto pudemos observar que isso não ocorreu e que o retorno desta ferramenta de controle ainda está comprometido.

10. REFERÊNCIAS

- AWOLOLA T.S., ODUOLA O.A., STRODE C., KOEKEMOER L.L., BROOKE B., RANSON H. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; 103(11):1139-45, 2009.
- BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, 22 (64), 2008.
- BASS, C.; NIKOU, D.; DONNELLY, M.J.; WILLIAMSON, M.S.; RANSON, H.; BALL, A.; VONTAS, J.; FIELD, L.M. Detection of knockdown resistance (*kdr*) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. **Malaria Journal**, 6:111, 2007.
- BELKIN, J.N.; HEINEMANN, S.J.; PAGE, W.A. Mosquitoes studies (Diptera, Culicidae) XXI. The culicidae of Jamaica. **Contrib. Amer. Ent. Inst.**, 4(1), 458 pp., 1970.
- BISSET, J.A., RODRÍGUEZ, M.M., CÁCERES, L. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. **Rev Cubana Med Trop**, 55(3):191-5, 2003.
- BRACCO, J. E., CAPURRO, M. L., LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R., SALLUM, M. A. M. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102: 573-580, 2007
- BRAGA, I.A, VALLE, D. *Aedes aegypti*: Histórico do controle no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**; 16(2) : 113 – 118, 2007a.
- BRAGA, I.A., VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 16(4):279-293, 2007b.
- BRASIL, Supremo Tribunal Federal. **Portaria n.329 de 2 de setembro de 1985**. Ementa da portaria do Diário Oficial [da República Federativa de Brasil], Brasília, v.123, n.168, p.12941, 3 Set. (Seção 1), 1985.
- BRENGUES, C. *et al.* Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Med. Vet. Entom**; 17: 87-94, 2003.

- BUSVINE JR, Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. **Nature**, 168: 193-195, 1951.
- BVS-RIPSA - Comentários sobre os Indicadores de Morbidade e Fatores de Risco até 2006. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/livroidb/Com2007/Com_D0203.pdf. Acesso em 10/02/2012.
- CHRISTOPHERS, S.R. ***Aedes aegypti: the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure.*** Cambridge University Press, 1960.
- CLARO, L.B.L., TOMASSINI, H. C. B., ROSA, M. L. G. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. **Cad. Saúde Pública**, 20(6):1447-1457, 2004.
- CLEMENT, M., POSADA, D., CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Mol. Ecol.** 9: 1657-1660, 2000.
- CONSOLI, R. A. G. B; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" **Nucl. Acids Res.**, 16 (22): 10881-10890, 1988.
- SPINOLA, R. **Boletim Epidemiológico Paulista. Ano 1, Número 4. CVE/SP, 2004.** Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa4_deng.htm. Acesso em 20/04/2011.
- DABIRÉ, K.R., DIABATÉ, A., NAMOUNTOUGOU, M., TOÉ, K.H., OUARI, A., KENGNE, P., BASS, C., BALDET, T. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; 103 (11): 1113-1120, 2009.
- da-CUNHA, M.P., LIMA, J.B.P., BROGDON, W.G., MOYA, G.E., VALLE, D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 100(4): 441-444, July 2005.
- D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – Uma revisão. **Quim. Nova**, 25(6): 995-1002, 2002.
- DAVIES, T.G.E., FIELD, L.M., USHERWOOD, P.N.R., WILLIAMSON, M.S. DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. **Life**, 59(3): 151-162, 2007.

- DEGALLIER N.; TEIXEIRA, J.M.S.; CHAIB, A.J.M.; BARBOSA H.F.; CARVALHO, M.S.L.; OLIVEIRA, C.; KNOX, M.B. Avaliação do risco de transmissão silvestre da dengue no Brasil. **Inf. Epidemiol. Sus** 10(1) Brasília, 2001.
- DIABATE, A., BALDET, T., CHANDER, F., AKOGBETO, M., GUIGUEMDE, T.R., DARRIET, F., BRENGUES, C., GUILLER, P., HEMINGWAY, J., SMALL, G.J., HOUGARD, J.M. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* S.L. in Burkina Faso. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** ; 67(6): 617-622, 2002.
- DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. **Rev. Bras. Epidemiol.**, 5(3): 259-279, 2002.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinf.** Online, v.1: 47-50, 2005.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: EDUSP, 2002, 864p.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Dengue – Instruções para pessoal de combate ao vetor: Manual de normas técnicas. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2001.
- GLASSER, C.M. & GOMES, A.C. Infestação do Estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Rev. Saúde Pública**, 34 (6): 570-77, 2000.
- GLICK, B. R. & PASTERNAK, J. J. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**, 2ª ed. Estados Unidos: ASM PRESS., 1998.
- GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.
- HARTL, D.L. **Princípios de genética de população**, 3ª Ed. Ribeirão Preto/SP: FUNPEC, 2008.
- HEMINGWAY, Janet. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**; 30 1009–1015, 2000.
- HEMINGWAY, J., HAWKES, N.J., MCCARROLL, L., RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**; 34: 653–665, 2004.

- LACEY A L, UNDEEN A H. Microbial control of black flies and mosquitoes. **Ann Rev Entomol**, 31: 265-96, 1986.
- LIMA, E.P.; PAIVA, M.H.S.; ARAÚJO, A.P.; SILVA, E.V.G.; SILVA, U.M.; OLIVEIRA, L.N.; SANTANA, A.E.G.; BARBOSA, C.N.; NETO, C.C.P.; GOULART, M.O.F.; WILDING, C.S.; AYRES, C.F.J.; SANTOS, M.A.V.M. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & Vectors** 4(5), 2011.
- LOUGHNEY, K., KREBER, R., GANETZKY, B. Molecular analysis of the para locus, a sodium-channel gene in *Drosophila*. **Cell** 58: 1143 – 1154, 1989.
- LUNA, J.E.D., MARTINS, M.F., ANJOS, A.F., KUWABARA, E.F., NAVARRO-SILVA, M.A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Rev. Saúde Pública**; 38(6): 842-3, 2004.
- MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; GARBELOTO, V. C.; CARVALHO LR ; CALDAS JR, A. L. ; BROGDON WG . Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. **Mem Inst Oswaldo Cruz**,; 102: 895-900, 2007.
- MARCOMBE, S., POUPARDIN, R., DARRIET, F., REYNAUD, S., BONNET, J., STRODE, C., BRENGUES, C., YÉBAKIMA, A., RANSON, H., CORBEL, V., DAVID, J.P. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French WestIndies) **BMC Genomics**; 10:494, 2009.
- MARTINEZ-TORRES, D., CHANDRE, F., WILLIAMSON, M.S., DARRIET, F., BERGE, J.B., DEVONSHIRE, A.L., *et al.*, Molecular characterization of pyrethroid knock-down resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. **Insect Mol. Biol.**; 7: 179–184, 1998.
- MARTINEZ-TORRES, D., CHEVILLON, C., BRUN-BARALE, A., BERGE, J.B., PASTEUR, N., PAURON, D. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. **Pestic. Sci.**; 55: 1012–1020, 1999.
- MARTINS, A.J., ANDRADE LINS, R.M.M. LINSS, J.G.B , PEIXOTO, A.A., VALLE, D. Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**; 81(1): 108–115, 2009a.
- MARTINS, A.J., LIMA, J.B.P., PEIXOTO, A.A., VALLE, D. Frequency of Val 1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti*

Brazilian populations. **Tropical Medicine and International Health**, v.14: 1351-1355, November, 2009b.

MARTINS, A.J.; VALLE, D. **The pyrethroid knockdown resistance**. In: Larramendy M, Soloneski S, editors. *Insecticides / Book 2*. La Plata: Faculty of Natural Sciences and Museum, National University of La Plata, 2011.

MARTINS, A.J.; VALLE, D. Nota Técnica N.º 2/2011/IOC-FIOCRUZ/DIRETORIA. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/NotaTecnica%202%20IOC%20v1%20dengue%206%20set%202011.pdf>. Acesso em 25/05/2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal do Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23614. Acesso em 20/02/2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal do Ministério da Saúde. **Casos de Dengue: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2011**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue_classica_90_11_10_02_12.pdf. Acesso em 07 de março de 2012.

MONTELLA, I.R., MARTINS, A.J., VIANA-MEDEIROS, P.F., LIMA, J.B.P., BRAGA, I.A., VALLE, D. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**; 77(3): 467–477, 2007.

OLIVEIRA, S.L.; CARVALHO, D.O.; CAPURRO, M.L. Mosquito transgênico: do *paper* para a realidade. **Revista da Biologia** 6b: 38-43, 2011.

OPS - Organización Panamericana de la Salud. **Actualización: Situación del dengue em las Américas**, 2009. Disponível em: <http://www.ops.org.bo/et/dengue/documentos/bolSitDenAmer20090300.pdf>. Acesso em 26/02/2010.

PEREIRA J.C.R. Bioestatística em outras palavras. São Paulo: EDUSP 2010, 424p.

PINTO, P., LYND, A., VICENTE, J.L., SANTOLAMAZZA, F., RANDLE, N.P., GENTILE, G., MORENO, M., SIMARD, F., CHARLWOOD, J.D., ROSARIO, V.E., CACCONE, A., DELLA TORRE, A., DONNELLY, M.J. Multiple Origins of Knockdown Resistance Mutations in the Afrotropical Mosquito Vector *Anopheles gambiae*. **PLoS ONE**; 11, 1243, 2007.

PITTENDRIGH, B., REENAN, R., FFRENCH-CONSTANT, R.H., GANETZKY, B. Point mutations in the *Drosophila* sodium channel gene *para* associated

- with resistance to DDT and pyrethroid insecticides. **Mol.Gen. Genet.**; 256, 602–610, 1997.
- RAJATILEKA, S., BLACK, W.C., SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K., TRONGTOKIT, Y., APIWATHNASORN, C., , McCALL, P.J., RANSON, H. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. **Acta Tropica** 108: 54–57, 2008.
- RANSON, H., JENSEN, B., VULULE, J.M., WANG, X., HEMINGWAY, J., COLLINS, F.H.,. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. **Insect Mol.Biol.**; 9, 491–497, 2000.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): a population genetic software for exact tests and ecumeinism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.
- REBÊLO, J. M. M., COSTA, J.M.L., SILVA, F.S., PEREIRA, Y. N. O., SILVA, J. M. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 15(3): 477-486, 1999.
- SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K., URDANETA-MARQUEZ, L., RAJATILEKA, S., MOULTON, M., FLORES, A.E., FERNANDEZ-SALAS, I., BISSET, J., RODRIGUEZ, M., MCCALL, P.J., Donnelly, M.J., Ranson, H., Hemingway, J., Black, W.C. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, 16(6): 785–798, 2007.
- SAAVEDRA-RODRIGUEZ, S., GARCIA, G.P.; SALAS, I.F.; ZAPATA, R.T.; SUÁREZ, A.E.F. Mutación asociada a La resistência a insecticidas piretróides em El mosquito transmisor de dengue (*Aedes aegypti*). **Ciencia UANL**, 11(4): 393-402, 2008.
- SAN MARTIN, J.L.; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; SOLÓRZANO, J.O.; BOUCKENOOGHE, A.; DAYAN G.H.; GUZMÁN, M.G. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 82(1): 128–135, 2010.
- SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Piretróides – Uma Visão Geral **Alim. Nutr.**, 18(3): 339-349, 2007.
- SODERLUND, D.M. Review Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels **Pest Manag Sci**; 64:610–616, 2008.

- SODERLUND, D.M., KNIPPLE, D.C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**; 33:563-577, 2003.
- SPERANÇA, M.A.; CAPURRO, M.L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 102(4): 425-433, 2007.
- SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias – Secretaria do estado da Saúde. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/dengue.html>. Acesso em 29/09/2009.
- SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias – Secretaria de estado da saúde. **Manual de Vigilância Entomológica de *Aedes aegypti***. São Paulo, 1997. 38 p.
- SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias - Secretaria de estado da saúde. **Normas e Recomendações Técnicas para Vigilância e Controle de *Aedes aegypti* no Estado de São Paulo**. São Paulo. 2002.
- SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias – Secretaria do Estado da Saúde. **Controle Integrado dos Vetores de Dengue**. São Paulo, 2009. 9p.
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue: Série A. Normas e Manuais Técnicos**. Ministério da Saúde. Brasília/DF, 160p., 2009.
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. **Informe Epidemiológico da Dengue - Semanas de 1 a 52 de 2009**. Ministério da Saúde. Brasília/DF, 28p., 2010.
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. **Informe Epidemiológico da Dengue - Análise de situação e tendências - 2010**. Ministério da Saúde. Brasília/DF, 42p., 2010.
- SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. NOTA TÉCNICA N.º 109/ 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_inseticida_na_dengue_9_9_10.pdf. Acesso em 03 de março de 2012.
- TAN, J., LIU, Z., TSAI, T.-D., VALLES, S.M., GOLDIN, A.L., DONG, K. Novel sodium channel gene mutations in *Blattella germanica* reduce the sensitivity of expressed channels to deltamethrin. **Insect Biochem. Mol. Biol.**; 32, 445–454, 2002.
- TAUIL, P. L.. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**; 18(3): 867-871, 2002.

- URDANETA-MARQUEZ, L., BOSIO, C., HERRERA, F., RUBIO-PALIS, Y., SALASEK, M., BLACK, W.C. Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as Determined by Mitochondrial DNA variation and Nuclear Single Nucleotide Polymorphisms. **Am J. Trop. Med. Hyg.** 78(3): 479-491, 2008.
- VAIS, H., WILLIAMSON, M.S., DEVONSHIRE, A.L., USHERWOOD, P.N.R. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. **Pest. Manag. Sci.**; 57, 877–888, 2001.
- WANG, S.-Y., BARILE, M., WANG, G.K. A phenylalanine residue at segment D3-S6 in Nav1.4 voltage-gated Na⁺ channels is critical for pyrethroid action. **Mol. Pharmacol.**; 60, 620–628, 2001.
- WARE, G.W., WHITACRE, D.M. **An Introduction to Insecticides 4^a Ed. University of Minnesota**, 2004. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>. Acesso em: 01/10/2009.
- WILLIAMSON, M.S., MARTINEZ-TORRES, D., HICK, C.A., DEVONSHIRE, A.L., Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knock-down resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Mol. Gen. Genet.** 252, 51–60, 1996.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian population. **Genetics**, 16: 97-159, 1931.
- WRIGHT, S., **Evolution and the Genetics of Populations**, Vol. II. The Theory of Gene Frequencies. University of Chicago Press, Chicago, 1969
- WRIGHT, S., **Evolution and the Genetics of Populations**, Vol. IV. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, 1978.
- WHITLOCK, M.C., MCCAULEY, D.E. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{st} \sim 1/(4Nm+1)$. **Heredity** 82: 117-125, 1999.
- WHO – World Health Organization. **Dengue and Severe dengue. Fact sheet N°117 January 2012.** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em 07 de março de 2012.
- XU, Q., WANG, H., ZHANG, L., LIU, N. Kdr allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.). **Biophysical Research Communications** 345: 774–780, 2006.
- ZHAO, Y., PARK, Y., ADAMS, M.E. Functional and evolutionary consequences of pyrethroid resistance mutations in S6 transmembrane segments of a voltage-

gated sodium channel. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**; 278: 516–521, 2000.

11.ANEXOS

Tabela I: Genotipagem da mutação Val1016Ile em indivíduos coletados em 2001.

Número identificador do <i>Ae</i> <i>aegypti</i>	Bauru	Santos	Campinas	P.Prudente	Marília
1	Val/Val	-	Val/Val	Val/Val	Val/Val
2	Val/Val	-	Val/Val	Val/Val	Val/Val
3	Val/Val	-	Val/Val	Val/Val	Val/Val
4	Val/Val	Val/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
5	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
6	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
7	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
8	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
9	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val
10	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
11	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
12	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
13	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
14	Val/Val	Val/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
15	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val
16	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Ile	Val/Val
17	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
18	Val/Val	Val/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
19	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
20	Val/Val	Val/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
21	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
22	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
23	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
24	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
25	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val
26	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
27	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
28	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
29	Val/Val	Val/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
30	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
31	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
32	Val/Val	Val/Ile	Val/Val	Val/Ile	Val/Val
33	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Ile	Val/Val
34	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val
35	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val
36	Val/Val	Val/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val

Número identificador do <i>Ae</i> <i>aegypti</i>	Bauru	Santos	Campinas	P.Prudente	Marília
37	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val
38	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
39	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val
40	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
41	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Val
42	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
43	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
44	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
45	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
46	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
47	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
48	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
49	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
50	Val/Val	Ile/Ile	Val/Val	Val/Val	Val/Val
51	-	Val/Val	-	-	-
52	-	Ile/Ile	-	-	-
53	-	Ile/Ile	-	-	-
54	-	Ile/Ile	-	-	-
55	-	Ile/Ile	-	-	-

Tabela II: Genotipagem da mutação Ile1011Met em indivíduos coletados em 2001.

Número identificador do <i>Ae</i> <i>aegypti</i>	Bauru	Santos	Campinas	P.Prudente	Marília
1	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met
2	Ile/Ile	-	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile
3	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met
4	Ile/Ile	-	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
5	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
6	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met
7	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met
8	Ile/Met	-	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
9	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met
10	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile
11	Met/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
12	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile
13	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met

Número identificador do Ae <i>aegypti</i>	Bauru	Santos	Campinas	P.Prudente	Marília
14	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
15	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met
16	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile
17	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
18	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met
19	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile
20	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile
21	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
22	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met
23	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met
24	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
25	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
26	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met
27	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile
28	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met
29	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile
30	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile
31	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met
32	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
33	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
34	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met
35	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
36	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met
37	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met
38	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met
39	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met
40	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile
41	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile
42	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile
43	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met
44	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile
45	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile
46	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met
47	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Met
48	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Ile
49	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met
50	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Met	Ile/Ile
51	-	Ile/Ile	-	-	-
52	-	Ile/Ile	-	-	-
53	-	Ile/Ile	-	-	-
54	-	Ile/Ile	-	-	-
55	-	Ile/Ile	-	-	-

Tabela III: Genotipagem da mutação Val1016Ile em indivíduos coletados em 2011.

Número identificador do <i>Ae</i> <i>aegypti</i>	Bauru	Santos	Campinas	P.Prudente	Marília
1	Iso/Iso	Val/Val	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso
2	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso	Iso/Iso
3	Val/Val	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Val	Val/Iso
4	Iso/Iso	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Val	Val/Iso
5	Val/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Iso/Iso
6	Val/Val	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso	Val/Iso
7	Val/Val	Iso/Iso	Val/Val	Iso/Iso	Val/Iso
8	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
9	Val/Val	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso
10	Val/Val	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
11	Val/Val	Iso/Iso	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso
12	Val/Iso	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Val	Val/Iso
13	Val/Val	Iso/Iso	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso
14	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Val	Iso/Iso	Val/Iso
15	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
16	Val/Val	Iso/Iso	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso
17	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso
18	Val/Val	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
19	Val/Iso	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
20	Val/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
21	Val/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
22	Val/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
23	Val/Val	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
24	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Val	Val/Iso	Val/Iso
25	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Val	Val/Val	Val/Iso
26	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso
27	Iso/Iso	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Iso
28	Val/Val	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso
29	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Val	Iso/Iso	Val/Iso
30	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Iso/Iso
31	Val/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Val
32	Val/Val	Val/Val	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso
33	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Val
34	Val/Val	Iso/Iso	Val/Val	Iso/Iso	Val/Iso
35	Val/Val	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso
36	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	Val/Val
37	Val/Iso	Iso/Iso	Val/Iso	-	Iso/Iso

Continua

Continuação

Número identificador do <i>Ae aegypti</i>	Bauru	Santos	Campinas	P.Prudente	Marília
38	Iso/Iso	Iso/Isso	Iso/Iso	-	Iso/Iso
39	Iso/Iso	Iso/Isso	Iso/Iso	-	Iso/Iso
40	Iso/Iso	Iso/Isso	Val/Iso	-	Val/Val
41	Val/Val	Iso/Isso	Iso/Iso	-	Val/Iso
42	Val/Val	Val/Val	Val/Val	-	Val/Val
43	Val/Val	Iso/Isso	Iso/Iso	-	Val/Val
44	Iso/Iso	Iso/Isso	Val/Val	-	Iso/Iso
45	Iso/Iso	Iso/Isso	Val/Val	-	Val/Iso
46	Val/Val	Iso/Isso	Val/Iso	-	Val/Val
47	Val/Val	Iso/Isso	Val/Val	-	Val/Val
48	Val/Val	Iso/Isso	Val/Iso	-	Iso/Iso
49	Val/Iso	Iso/Isso	Iso/Iso	-	Val/Iso
50	Val/Iso	Val/Isso	Iso/Iso	-	Iso/Iso

Tabela IV: Genotipagem da mutação Ile1016Met em indivíduos coletados em 2011.

Número identificador do <i>Ae aegypti</i>	Bauru	Santos	Campinas	P.Prudente	Marília
1	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met
2	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso
3	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met
4	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Met
5	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso
6	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met
7	Iso/Iso	Iso/Met	Met/Met	Iso/Iso	Iso/Met
8	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso
9	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso
10	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met
11	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met
12	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met
13	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Iso
14	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met
15	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met
16	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met
17	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Met

Continua

Continuação

Número identificador do Ae <i>aegypti</i>	Bauru	Santos	Campinas	P.Prudente	Marília
18	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met
19	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met
20	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met
21	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met
22	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso
23	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met
24	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met
25	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met
26	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso
27	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso
28	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso
29	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso
30	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso
31	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso
32	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso
33	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso
34	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met
35	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Met
36	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met
37	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	-	Iso/Iso
38	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Iso	-	Iso/Iso
39	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	-	Iso/Iso
40	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	-	Iso/Met
41	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	-	Iso/Met
42	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	-	Iso/Met
43	Iso/Iso	Iso/Iso	Iso/Iso	-	Iso/Met
44	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	-	Iso/Iso
45	Iso/Iso	Iso/Met	Iso/Met	-	Iso/Met
46	Iso/Met	Iso/Iso	Iso/Met	-	Iso/Met
47	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	-	Iso/Met
48	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Met	-	Iso/Met
49	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	-	Iso/Met
50	Iso/Met	Iso/Met	Iso/Iso	-	Iso/Met

Tabela V: Frequências genótípicas observadas e esperadas das populações de *Aedes aegypti* coletadas em 2001- mutação Val1016Ile

	Genótipo	Fenótipo	N	Frequência (N/Total)	Frequência esperada	Número esperado
Bauru	Val/Val	Suscetível	50	1	1	50
	Val/Ile	Suscetível	0	0	0	0
	Ile/Ile	Resistente	0	0	0	0
Santos	Val/Val	Suscetível	9	0,17	0,0576	3
	Val/Ile	Suscetível	7	0,13	0,3648	18,97
	Ile/Ile	Resistente	36	0,70	0,5776	30,03
Campinas	Val/Val	Suscetível	50	1	1	50
	Val/Ile	Suscetível	0	0	0	0
	Ile/Ile	Resistente	0	0	0	0
P.Prudente	Val/Val	Suscetível	47	0,94	0,9409	47,045
	Val/Ile	Suscetível	3	0,06	0,0582	2,91
	Ile/Ile	Resistente	0	0	0,0009	0,045
Marília	Val/Val	Suscetível	50	1	1	50
	Val/Ile	Suscetível	0	0	0	0
	Ile/Ile	Resistente	0	0	0	0

Tabela VI: Frequências genótípicas observadas e esperadas das populações de *Aedes aegypti* coletadas em 2011- mutação Val1016Ile

	Genótipo	Fenótipo	N	Frequência (N/Total)	Frequência esperada	Número esperado
Bauru	Val/Val	Suscetível	20	0,40	0,2809	14,05
	Val/Ile	Suscetível	13	0,26	0,4982	24,91
	Ile/Ile	Resistente	17	0,34	0,2209	11,05
Santos	Val/Val	Suscetível	3	0,06	0,0196	0,98
	Val/Ile	Suscetível	8	0,16	0,2408	12,04
	Ile/Ile	Resistente	39	0,78	0,7396	36,98
Campinas	Val/Val	Suscetível	10	0,20	0,1089	5,45
	Val/Ile	Suscetível	13	0,26	0,5082	25,41
	Ile/Ile	Resistente	27	0,54	0,5929	29,65
P.Prudente	Val/Val	Suscetível	4	0,11	0,1225	4,41
	Val/Ile	Suscetível	17	0,47	0,4550	16,38
	Ile/Ile	Resistente	15	0,42	0,4225	15,21
Marília	Val/Val	Suscetível	8	0,16	0,2209	11,05
	Val/Ile	Suscetível	31	0,62	0,4982	24,91
	Ile/Ile	Resistente	11	0,22	0,2809	14,05

Tabela VII: Frequências genotípicas observadas e esperadas das populações de *Aedes aegypti* coletadas em 2001- mutação Ile1011Met.

	Genótipo	Fenótipo	N	Frequência (N/Total)	Frequência esperada	Número esperado
Bauru	Ile/Ile	Suscetível	28	0,56	0,5929	29,645
	Ile/Met	Suscetível	21	0,42	0,3542	17,71
	Met/Met	Resistente	1	0,02	0,0529	2,645
Santos	Ile/Ile	Suscetível	46	0,88	0,8836	45,9472
	Ile/Met	Suscetível	6	0,12	0,1128	5,8656
	Met/Met	Resistente	0	0	0,0036	0,1872
Campinas	Ile/Ile	Suscetível	18	0,36	0,4624	23,12
	Ile/Met	Suscetível	32	0,64	0,4352	21,76
	Met/Met	Resistente	0	0	0,1024	5,12
P.Prudente	Ile/Ile	Suscetível	22	0,44	0,5184	25,92
	Ile/Met	Suscetível	28	0,56	0,4032	20,16
	Met/Met	Resistente	0	0	0,0784	3,92
Marília	Ile/Ile	Suscetível	16	0,32	0,4356	21,78
	Ile/Met	Suscetível	34	0,68	0,4488	22,44
	Met/Met	Resistente	0	0	0,1156	5,78
Potim	Ile/Ile	Suscetível	17	0,34	0,4489	22,445
	Ile/Met	Suscetível	33	0,66	0,4422	22,1
	Met/Met	Resistente	0	0	0,1089	5,445

Tabela VIII: Frequências genotípicas observadas e esperadas das populações de *Aedes aegypti* coletadas em 2011- mutação Ile1011Met.

	Genótipo	Fenótipo	N	Frequência (N/Total)	Frequência esperada	Número esperado
Bauru	Ile/Ile	Suscetível	33	0,66	0,6889	34,45
	Ile/Met	Suscetível	17	0,34	0,2822	14,11
	Met/Met	Resistente	0	0	0,0289	1,45
Santos	Ile/Ile	Suscetível	5	0,1	0,3025	15,13
	Ile/Met	Suscetível	45	0,9	0,4950	24,75
	Met/Met	Resistente	0	0	0,2025	10,13
Campinas	Ile/Ile	Suscetível	23	0,46	0,5184	25,92
	Ile/Met	Suscetível	26	0,52	0,4032	20,16
	Met/Met	Resistente	0	0,02	0,0784	3,92
P.Prudente	Ile/Ile	Suscetível	13	0,26	0,4624	16,65
	Ile/Met	Suscetível	23	0,46	0,4352	15,67
	Met/Met	Resistente	0	0	0,1024	3,69
Marília	Ile/Ile	Suscetível	18	0,36	0,4624	23,12
	Ile/Met	Suscetível	32	0,64	0,4352	21,76
	Met/Met	Resistente	0	0	0,1024	5,12

