

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA – MCT
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E
RECURSOS NATURAIS

**Estimativas de Variação Genética do Gene ND4 do DNA Mitocondrial
em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da Amazônia, Brasil.**

Raimundo Sousa Lima Júnior

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus - AM
Maio de 2007

**MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA – MCT
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E
RECURSOS NATURAIS**

**Estimativas de Variação Genética do Gene ND4 do DNA Mitocondrial
em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da Amazônia, Brasil.**

Raimundo Sousa Lima Júnior

Orientadora: Profa. Dra. Vera Margarete Scarpassa

Dissertação apresentado ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus - AM
Maio de 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

L732e

Lima Júnior, Raimundo Sousa

Estimativas de Variação Genética do Gene ND4 do DNA Mitocondrial em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da Amazônia, Brasil. / Raimundo Sousa Lima Júnior. -- Manaus: UFAM/INPA, 2007.
xv + 63 f.: Ilust.

Dissertação (Mestrado) --- UFAM/INPA.

Orientadora: Dra. Vera Margarete Scarpassa

Área de Concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. Variação genética. 2. *Aedes aegypti*. 3. DNA mitocondrial.
4. Gene ND4. 5. Genética de Populações.

CDD 19^a 595.77

Sinopse:

Estudou-se a diversidade genética de dez populações naturais de *Aedes aegypti* da Amazônia brasileira. Cento e vinte três segmentos do gene ND4 do DNA mitocondrial foram seqüenciados e analisados quanto a diversidade genética, AMOVA, estrutura genética e fluxo gênico, testes de neutralidade (D de Tajima e F_s de Fu), teste de Mantel e análise dos dendrogramas de haplótipos e de populações. Os haplótipos encontrados neste estudo foram comparados com outros haplótipos do gene ND4 encontrados em populações de *Aedes aegypti* do Brasil, América do Sul e América Central.

Palavras-chave: Variação genética, *Aedes aegypti*, DNA mitocondrial, Gene ND4, Genética de Populações.

Dedico este trabalho a minha
família: meus pais Raimundo Sousa e
Deuzimar Nogueira, aos meus irmãos
Raimar e Maria pelo amor e carinho.
E ao primo biólogo Gilson Nogueira
(in memorium).

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo gostaria de agradecer ao meu grande Deus Pai Eterno por ter me concedido a oportunidade de cursar o mestrado em Genética, por ter me abençoado, dando saúde e proteção em todos os momentos;

Meus sinceros agradecimentos aos meus pais Deuzimar Nogueira e Raimundo Sousa por todo carinho e por terem sido os primeiros e mais importantes professores de minha vida. A vocês dedico todo meu amor e gratidão eterna;

Aos meus irmãos (Raimar e Maria), sobrinhos (Victor, Victória e Vinícios) e familiares por todo carinho;

Meus sinceros e especiais agradecimentos Prof^a. Dra. Vera Margarete Scarpassa por ser uma orientadora sempre presente, bem como um exemplo de profissional correto, competente e dedicado a Ciência, ao qual admiro e tento me espelhar;

Ao INPA por ser um importante instituto de desenvolvimento científico na Amazônia e por oferecer toda infra-estrutura de laboratórios para o desenvolvimento deste trabalho. A Coordenação de Pesquisas Entomológicas (CPEN) do INPA pelo apoio logístico de carro em algumas coletas realizadas;

A coordenação do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) do INPA pelo apoio nas etapas de seqüenciamento genético.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo auxílio financeiro de todas as etapas desse estudo, incluindo a concessão de passagens para eventos. Ao Governo Federal, em especial ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e a CAPES por ter concedido a bolsa de estudos;

A coordenadora do GCBEV, Dra. Miriam Rafael, pelo ótimo trabalho a frente do curso de Genética, a todos os membros do Conselho, às secretárias do curso Hercilia e Alessandra e a ex-coordenadora do GCBEV, Dra. Elina Feldberg;

Um agradecimento especial a Chefe do Controle do Dengue no Estado do Amazonas, Sra. Luzia Mustafá, por ter proporcionado com muita eficiência e profissionalismo apoio logístico para as coletas de *Aedes aegypti* na cidade de Manaus, além de intermediar os contatos com as Secretarias de Saúde do interior do Estado;

A FUNASA e as Secretarias de Saúde Estaduais dos Estados do Amazonas, Pará, Roraima e Acre pelo incondicional apoio logístico e de pessoal (agentes de Saúde e de Endemias) nas coletas realizadas;

Aos colegas do Laboratório de Genética e Evolução de Mosquitos: Tatiana Cardoza (que me ensinou as primeiras técnicas de Biologia Molecular), Vera Dantas, Louise Haddad e Rafael Trindade pela amizade e companheirismo;

Aos colegas da turma 2005 do GCBEV pela grande amizade construída ao longo do curso: Aline, Alexandre, Áureo, Carlos, Eduardo, Luciano, Fátima, Tatiana e Walfran;

Um especial agradecimento ao falecido primo e Biólogo Gilson Nogueira que morreu de forma covarde, vítima da violência inexplicável da sociedade em que vivemos. Agradeço sinceramente ao Gilson não só por ter me ajudado (de forma financeira e com moradia) nos primeiros meses do mestrado em que estive sem bolsa, mas também pela amizade e por ser hoje um exemplo de quem lutou e venceu na vida;

Aos moradores da República do Tereré: Francis, Geraldo, Luciano, Marcio e Ricardo. E a todos que não eram moradores da república, mas que passaram por lá e deixaram uma marca através da amizade e companheirismo.

Agradeço de forma especial a Fabiane Rodrigues Fonseca, pelo papel importante que tem em minha vida, por estar sempre comigo e me fazer muito feliz... Te Amo, muito obrigado.

A todos os professores da Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus de Santarém, em especial aos professores: Dr. Rommel Burbano e Dr. Luis Reginaldo que me orientaram nos primeiros passos na área de Genética;

A todos os amigos de Santarém pelo apoio e incentivo dispensados a mim. Agradeço também a amizade e incentivo dos colegas santarenos que, como eu, vieram para Manaus em busca de uma melhor qualificação profissional. A todas as amizades que conquistei em Manaus... a todos vocês que de forma direta e indireta contribuíram para que esse trabalho fosse concluído,

Meu muito obrigado.

“Fazemos Ciência com fatos, como fazemos uma casa com pedras; mas a acumulação de fatos não é Ciência, assim como um monte de pedras não é uma casa”.

(Poincaré)

RESUMO

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito de grande importância epidemiológica por ser o principal vetor da febre amarela urbana e dos quatro sorotipos do vírus dengue. Atualmente, este mosquito está presente em todos os estados brasileiros. Está comprovado que estudos genéticos em populações de *Ae. aegypti* podem subsidiar a implementação de estratégias de controle desse vetor. Na Amazônia brasileira, no entanto, pouco se conhece a respeito da variabilidade genética de populações deste mosquito. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo detectar a variação genética do gene NADH desidrogenase, subunidade 4 (ND4), do DNA mitocondrial de populações naturais de *Ae. aegypti* da Amazônia brasileira. Foram estudadas 10 populações deste vetor, sendo quatro bairros da cidade de Manaus (AM) (Coroado, Praça 14 de Janeiro, Compensa e Tancredo Neves), e as cidades de Coari (AM), Santarém (PA), Belém (PA), Boa Vista (RR), Pacaraima (RR) e Rio Branco (AC). Foram analisados 380 pares de bases de 123 indivíduos, onde foi possível encontrar 13 haplótipos, sendo que 9 desses foram considerados únicos. Os níveis de diversidade genética foram elevados para quase todas as populações, sendo que as cidades de Belém ($h = 0,782$; $\pi = 0,0170$) e os bairros do Coroado ($h = 0,737$; $\pi = 0,0136$), Praça 14 de Janeiro ($h = 0,745$; $\pi = 0,0155$), em Manaus, foram as que apresentaram os maiores valores. Os testes de neutralidade, D de Tajima e F_s de Fu, não foram significativos para todas as amostras ($P > 0,05$), indicando que o polimorfismo genético está de acordo com o modelo neutro de mutações. Os resultados da primeira AMOVA mostraram que a maioria da variação ocorreu dentro das populações (72,69 %; $F_{ST} = 0,273$; $P < 10^{-5}$). Já a segunda AMOVA, que reuniu as populações em grupos de acordo com os Estados, também mostrou que a maioria da variação ocorreu dentro das populações (70,66%; $F_{ST} = 0,293$; $P < 10^{-5}$). Os valores de F_{ST} não foram significantes para a maioria das comparações que envolveram as 10 populações de *Ae. aegypti*, indicando que existe fluxo gênico entre essas populações. Um intenso fluxo gênico foi observado entre populações distantes geograficamente, como Santarém e Boa Vista ($Nm = 35,1$) e Tancredo Neves e Belém ($Nm = 9,3$). As populações de Pacaraima e Rio Branco mostraram-se bastante estruturadas quando comparadas com as outras populações, revelando restrito fluxo gênico relacionado à presença dos haplótipos mais

comuns (H1 e H6). A correlação entre distâncias genética e geográfica foi significativa ($r = 0,5815$; $P = 0,006$) entre as dez populações. Entretanto, excluindo as populações de Rio Branco e Pacaraima, o teste de Mantel não foi significativo, indicando que a distância genética não está relacionada com a distância geográfica. Os dendrogramas de haplótipos e de populações apresentaram dois agrupamentos, indicando a presença de linhagens distintas. Esses resultados, somados com os níveis de variabilidade genética observado e a comparação com haplótipos de outros estudos, sugerem que podem ter ocorrido, pelo menos, duas introduções do *Ae. aegypti* na Amazônia: uma por Boa Vista, vindo do México e da Venezuela; e outra por Belém, vindo do restante do país ou pelo Oceano Atlântico.

ABSTRACT

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) is a mosquito of great epidemiological importance as the main vector of urban yellow fever and the four serotypes of the dengue virus. Today, this species is present in all States of Brazil. It has been established that genetics studies of *Ae. aegypti* population can contribute to the implementation of control strategies. However, in the Brazilian Amazon region little is known about the genetic variability of this mosquito. The aim of this study was to detect genetic variation in a region of the NADH dehydrogenase subunit 4 mitochondrial gene (ND4) in natural populations of *Ae. aegypti* in the Brazilian Amazon. Ten populations were studied: four from different districts of the city of Manaus, and one each from the cities of Coari (Amazonas), Santarém and Belém (Pará), Boa Vista and Pacaraima (Roraima), and Rio Branco (Acre). We analyzed 380 base pairs from 123 individuals and found 13 haplotypes, of which 9 were considered unique. The levels of genetic diversity were high in nearly all populations, with the highest values from Belém ($h = 0.782$; $\pi = 0.0170$) and the districts of Coroado ($h = 0.737$; $\pi = 0.0136$) and Praça 14 de Janeiro ($h = 0.745$; $\pi = 0.0155$) in Manaus. The tests of neutrality Tajima's D and Fu's F_s were not significant ($P > 0.05$) for all samples, indicating that the genetic polymorphism is in agreement with the neutral model of mutations. The results of the first AMOVA showed that the greater part of the variation occurred within populations (72.69 %; $F_{ST} = 0.273$; $P < 10^{-5}$). The second AMOVA, grouping populations according to State, also indicated that most variation was within the population (70.66%; $F_{ST} = 0.293$; $P < 10^{-5}$). The F_{ST} values for most of the comparisons between the 10 populations were not significant, indicating the existence of gene flow between them. Intense gene flow was observed among pairs of geographically distant populations such as Santarém and Boa Vista ($Nm = 35.1$) and Tancredo Neves (Manaus) and Belém ($Nm = 9.3$). The population of Pacaraima and Rio Branco were well structured in comparison with the other populations, indicating restricted gene flow in relation to the most common haplotypes (H1 and H6). Correlation between genetic and geographic distances among the ten populations was significant ($r = 0.5815$; $P = 0.006$). However, except for Rio Branco and Pacaraima, the Mantel test was not significant, indicating that genetic

distance was not related to geographical distance. The dendrograms of haplotypes and populations show two groupings indicating distinct lineages. These result, together with the observed levels of genetic variability and comparison with haplotypes found in other studies, suggest that *Ae. aegypti* may have been introduced into Amazonia at least twice: once into Boa Vista, originating from Mexico and Venezuela; e once to Belém from the rest of the country or across the Atlantic.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Locais de coletas com seus respectivos Estados, coordenadas geográficas e tamanho amostral.	19
Tabela 2. Distribuição haplotípica da frequência absoluta das 10 populações de <i>Aedes aegypti</i>	28
Tabela 3. Sítios variáveis observados nos 13 haplótipos do gene ND4 do DNA mitocondrial de <i>Aedes aegypti</i>	32
Tabela 4. Diversidade genética e testes de neutralidade em populações de <i>Aedes aegypti</i>	34
Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) de todas as populações não agrupadas de <i>Aedes aegypti</i>	35
Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de <i>Aedes aegypti</i>	35
Tabela 7. Valores de F_{ST} par-a-par (acima da diagonal) e número efetivo de migrantes (Nm) (abaixo da diagonal) em populações de <i>Aedes aegypti</i>	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> realizando hematofagia.	2
Figura 2. Mapa mostra a origem do <i>Aedes aegypti</i> no continente africano e sua dispersão pelo mundo.	5
Figura 3. Sorotipos circulantes do vírus dengue nos estados brasileiros, 2001-2002 e 2006.	9
Figura 4. Locais de coleta de <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 5. Mapa da cidade de Manaus destacando os bairros onde foram realizadas as coletas de <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 6. Gel de Eletroforese com 1% de agarose, corado com brometo de etídio mostrando os fragmentos do gene ND4 de 10 indivíduos de <i>Ae. aegypti</i> com tamanho próximo a 400 pares de base (pb).	21
Figura 7. Frequência relativa dos 13 haplótipos encontrados nas 10 populações de <i>Aedes aegypti</i> da Amazônia.	29
Figura 8. Frequência relativa dos haplótipos em cada população analisadas de <i>Aedes aegypti</i> analisada.....	30
Figura 9. Rede de haplótipos observada para as amostras de <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 10. Resultado da regressão de Mantel entre as populações de <i>Ae. aegypti</i> baseado nos valores par-a-par de F_{ST} . A: Gráfico de regressão com todas as 10 populações; B: Gráfico de regressão sem as populações de Pacaraima e Rio Branco.	38
Figura 11. Dendrograma observado entre os 13 haplótipos de <i>Aedes aegypti</i> . Utilizou-se o método de Neighbor-Joining, seguindo o modelo de distância genética de Tamura-Nei.	39
Figura 12. Dendrograma baseado nos valores par-a-par de F_{ST} das dez amostras de <i>Aedes aegypti</i> . Método: Neighbor-Joining.	40

SUMÁRIO

	Pág.
1. Introdução	1
1.1 O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	1
1.2 Ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i>	3
1.3 Origem do mosquito	3
1.4 O <i>Aedes aegypti</i> no Brasil	5
1.5 O dengue no Mundo e no Brasil	6
1.6 Características epidemiológicas, transmissão e sintomas do dengue	8
1.7 DNA mitocondrial como marcador molecular	9
1.8 Estudos Genéticos	10
2. Objetivos	
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. Material e Métodos	16
3.1 Local de Coleta e Preparação dos Espécimes	16
3.2 Extração do DNA	20
3.3 Amplificação do DNA	20
3.4 Purificação do Produto Amplificado	21
3.5 Reação de Seqüenciamento	22
3.6. Alinhamento das Seqüências	22
3.7 Análises Estatísticas	22
3.7.1 Análise dos haplótipos	22

3.7.2 Análise do Polimorfismo molecular	23
3.7.3 Testes de neutralidade	23
3.7.4 Análise de variância molecular (AMOVA) e estrutura genética	24
3.7.5 Isolamento por distância	24
3.7.6 Análise por meio de dendrogramas	25
4. Resultados	26
4.1 Distribuição e frequência dos haplótipos	26
4.2 Diversidade genética e testes de neutralidade	33
4.3. Análise da variância molecular (AMOVA) e estimativa de fluxo gênico	33
5. Discussão	41
5.1 Frequência e distribuição dos haplótipos	41
5.2 Variabilidade genética das populações	42
5.3 Análise da variância molecular (AMOVA) e estimativas de fluxo gênico	43
6. Conclusões	48
7. Referências bibliográficas	50
8. Anexos	59
Figura A – Rede de haplótipos do gene ND4 de <i>Aedes aegypti</i> agrupando os haplótipos encontrados no presente trabalho (amarelo), no México (verde) e no Peru (azul).	60
Figura B – Gráfico mostrando a proporção das mutações ao longo das seqüências nucleotídicas de <i>Aedes aegypti</i>	61
Figura B – Composição da frequência nucleotídica das 123 seqüências do gene ND4 de <i>Aedes aegypti</i>	62
Tabela B – Matriz de distância reta utilizada nas análises do teste de Mantel.	63

1. Introdução

1.1 O mosquito *Aedes aegypti*

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito pequeno de cor escura que apresenta escamas brancas nas pernas e tórax. É um mosquito de fácil identificação, pois possui no tórax, precisamente na região do escudo, escamas brancas dispostas em linhas laterais longitudinais, formando um desenho que lembra uma “lira” (Forattini, 2002) (Figura. 1). O macho se distingue da fêmea por apresentar as antenas mais plumosas.

O mosquito pertence à família Culicidae (lat. *cullex* = mosquito) que são dípteros nematóceros que apresentam características e sistema geral de organização próprios desses insetos (Forattini, 1996). Segundo Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), os indivíduos pertencentes ao gênero *Aedes* são caracterizados por possuírem o final do abdome freqüentemente afilado e pontudo, sendo que os últimos segmentos estão sobrepostos uns aos outros, com cerdas salientes.

Atualmente ocorrem no Brasil quatro subgêneros de *Aedes*: *Ochlerotatus*, *Stegomyia*, *Howardina* e *Protomacleaya*. Porém somente os subgêneros *Stegomyia* e *Howardina* têm maiores destaque por serem de grande importância epidemiológica. No subgênero *Stegomyia* são consideradas duas espécies: *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O *Aedes albopictus* é um mosquito que teve sua origem no sudeste da Ásia onde estes mosquitos são responsáveis pela transmissão endêmica do vírus dengue. Ele foi introduzido no continente americano nos anos 80 do século passado, sendo que em 1986 foi observado em três regiões do Brasil (Figueiredo, 2003). No Brasil, um estudo realizado por Serufo *et al.* (1993) identificou o primeiro isolado do vírus tipo 1 (DEN-1) em larvas de *Aedes albopictus* no estado de Minas Gerais. Apesar disso, este mosquito ainda não foi incriminado como vetor inter-humano em surtos de dengue no Brasil, porém não se pode descartar a possibilidade de transmissão do vírus do dengue por tais mosquitos (Degallier *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2006).



Fonte: Genilson Vieira, IOC.

Figura 1. Fêmea de *Aedes aegypti* realizando hematofagia.

O *Aedes aegypti* é um mosquito que tem sua importância epidemiológica por ser o principal vetor da febre amarela urbana e dos quatro sorotipos do vírus dengue: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. A capacidade vetora deste mosquito pode se estender também à transmissão de outros arbovírus e a helmintos filarídeos, os quais podem atingir o homem e outros animais (Forattini, 2002). Entretanto, atualmente o principal problema epidemiológico está relacionado à transmissão do dengue, com ênfase especial a forma mais severa, a febre hemorrágica do dengue (FHD).

O *Ae. aegypti*¹ é um mosquito de hábitos sinantrópicos e antropofílicos, preferindo áreas urbanizadas e possuindo capacidade adaptativa aos criadouros artificiais com água limpa (Pinheiro, 2005). É essencialmente doméstico tolerando temperaturas tropicais e precipitações pluviométricas elevadas (Donalísio & Glasser, 2002). A oviposição ocorre em recipientes artificiais e naturais, contendo água parada

¹ Em razão da abundante literatura existente, Reinert (1975, 1982, 1991) propôs a abreviatura dos nomes de gêneros e subgêneros dos mosquitos. Assim, estabelecem-se duas letras para o gênero e três para o subgênero.

protegidos do sol, como tanques, caixas d'água, cisternas, cascas de cocos, bromélias e outros. Os ovos apresentam elevada resistência, podendo permanecer viáveis por cerca de um ano.

Este mosquito apresenta uma grande capacidade de adaptação devido a conjunturas sociais e urbanas diferenciadas. Por essa razão, muitos pesquisadores têm se dedicado a estudar a ecologia desse mosquito, procurando desvendar seu comportamento e hábitos preferenciais na natureza e no espaço habitado pelo homem (Donalísio & Glasser, 2002), visto que variações ocorridas em parâmetros ecológicos podem afetar a estrutura genética de populações em nível regional deste mosquito (Bosio et al., 2005).

1.2 Ciclo biológico do *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* apresenta duas fases distintas no seu ciclo de vida: uma aquática (ovos, larva e pupa) e outra terrestre (adulto). Após o acasalamento a fêmea necessita de sangue para o desenvolvimento dos ovos, fato este que a faz realizar hematofagia.

Os ovos são, geralmente, depositados aderidos à parede dos recipientes, próximos ao espelho d'água, e demoram em média 2 a 3 dias para eclodir. Após a eclosão surgem as larvas (4 estádios), que apresentam grande mobilidade e crescimento acentuado, necessitando de boa oferta de alimento e temperatura em torno de 24° C a 29° C. Esta fase dura em torno de 4 a 8 dias. Passado o estágio de larva surgem as pupas que apenas respiram, porém apresentam grande mobilidade. Em condições favoráveis, o tempo médio de duração do estágio de pupa é de 2 dias. Em seguida, o adulto emerge e, a partir daí, passa a se alimentar de carboidratos, provenientes de néctar e sucos vegetais. Contudo, o intervalo entre a alimentação sanguínea e a ovoposição varia de 2 a 3 dias, completando assim o ciclo de vida do mosquito (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Service, 2000; Forattini, 2002).

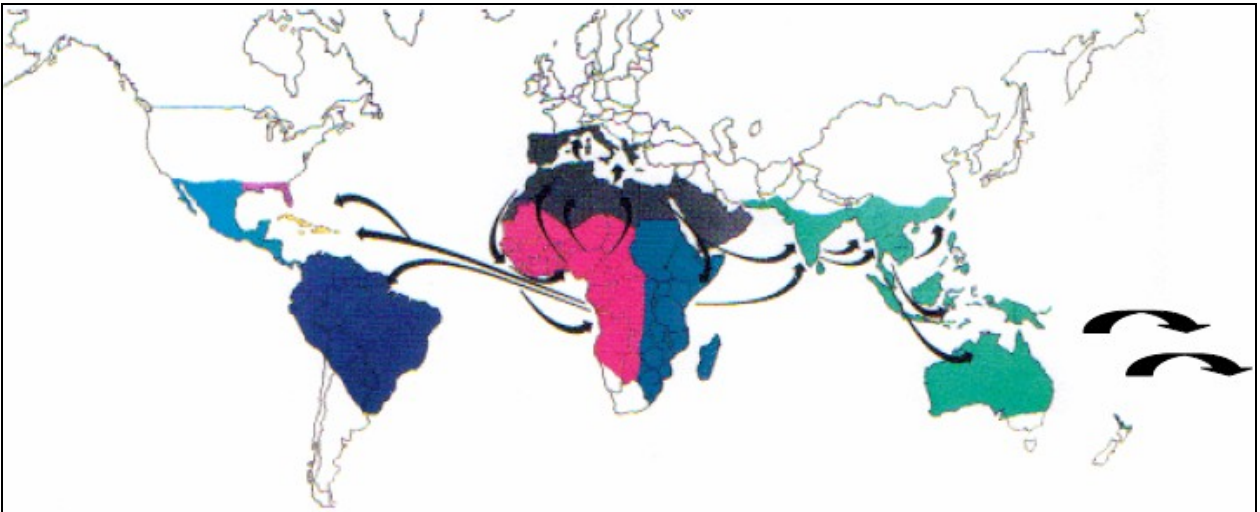
1.3 Origem do mosquito

Acredita-se que o *Ae. aegypti* seja oriundo do velho mundo, provavelmente da região da Etiópia onde se encontra a grande maioria dos representantes do grupo

(Figura. 2). As migrações humanas pelo mundo provocaram alterações na paisagem e favoreceram sua dispersão. Com isso, esta espécie tornou-se cosmopolita, distribuindo-se pelas regiões Tropicais e Subtropicais entre os paralelos de 45° de latitude norte e 40° de latitude sul (Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

Acredita-se que antes de sua larga distribuição pelo mundo, este mosquito sofreu grande diferenciação com relação aos padrões genéticos e ecológicos, a ponto de serem conhecidas atualmente duas formas. Mattingly (1957), com base nos padrões de coloração, fez referência à existência de duas subespécies de *Ae. aegypti*: uma forma mais clara encontrada na África e no Novo Mundo e a outra de tonalidade mais enegrecida encontrada no Sul do deserto do Saara, denominadas como *Ae. aegypti aegypti* e *Ae. aegypti formosus*, respectivamente. O *Ae. aegypti aegypti* possui comportamentos intimamente associados ao homem e elevada competência vetorial para o dengue (Failloux *et al.*, 2002) e da febre amarela (Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2002). Por outro lado, o *Ae. aegypti formosus* restringe-se a ambientes silvestres e rurais, apresentando baixa capacidade vetora para o vírus dengue. Vários estudos genéticos confirmaram a existência e distribuição destas duas formas (Scott & McClelland, 1975; Tabachnick & Powell, 1978; Powell & Tabachnick, 1980; Wallis *et al.*, 1983; Failloux *et al.*, 2002).

Especialmente para as Américas não existem, até o momento, estudos que comprovem a existência das duas subespécies (Forattini, 2002), isto foi confirmado em estudo genético realizado por Wallis & Tabachnick (1990) no Caribe, onde não conseguiram encontrar evidências para a existência da forma *formosus*. Portanto, com exceção dos espécimes encontrados na África, menciona-se de maneira convencional, apenas o nome específico de *Ae. aegypti*.



Fonte: Instituto Pasteur

Figura 2. Mapa mostra a origem do *Aedes aegypti* no continente africano e sua dispersão pelo mundo.

1.4 O *Aedes aegypti* no Brasil

O *Ae. aegypti* foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Figueiredo, 2003). Porém, antes da chegada do dengue, acredita-se que o vetor já existia há muitos anos no continente americano (Franco, 1976). A campanha de erradicação do *Ae. aegypti* no Brasil começou com Oswaldo Cruz em 1904 na luta contra a febre amarela (Figueiredo, 2003). Nos anos seguintes, até 1920, graças aos apoios técnico e financeiro da Fundação Rockefeller, o Brasil conseguiu manter-se livre de grandes epidemias de febre amarela por vários anos (Franco, 1976).

Entre as décadas de 1950 e 1960, por algumas vezes, o *Ae. aegypti* foi "erradicado" do Brasil e de vários países do continente americano (MS, 2004). No entanto, a erradicação não foi realizada com êxito no Suriname, Guianas, Venezuela, Ilhas do Caribe e Estados Unidos, ocasionando a reintrodução no Brasil em 1967, pelo Estado do Pará (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Em 1976 este mosquito foi encontrado na Bahia, em 1977 no Rio de Janeiro e em Roraima no início da década de 1980 (Schatzmayr, 2000). A partir daí, vários estados brasileiros foram acometidos por esse vetor.

Atualmente, segundo os dados da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) esse mosquito encontra-se presente em todos os estados brasileiros. Esses dados revelam que o *Ae. aegypti* iniciou sua dispersão nos municípios com mais de 50.000 habitantes que, em sua grande maioria, fazem parte de regiões metropolitanas ligadas a grandes centros comerciais. Nota-se também que, na maioria das vezes, esses grandes centros urbanos são os principais responsáveis pela dispersão do mosquito para municípios menores desfavorecidos de assistência a saúde e saneamento básico (MS, 2002).

Em 2002, a FUNASA elaborou o Plano Nacional de Controle do Dengue (PNCD), cuja meta era reduzir a menos de 1% a infestação predial do mosquito em todos os municípios brasileiros. No entanto, em 2005 a Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) realizou o Levantamento Rápido de Índice e de Infestação de *Ae. aegypti* (LIRAA) em 155 municípios como forma de intensificar as ações de prevenção do dengue. Os resultados deste levantamento demonstraram que 54 municípios encontravam-se com índices de infestação predial (IIP) satisfatório (<1%), 77 com IIP em situação de alerta (1 a 3,9%), 24 municípios com IIP em risco de surto do dengue (> 3,9%) (MS, 2006). Estes dados revelam que as ações de controle do *Ae. aegypti* não alcançaram suas metas pretendidas, o que reforça a possibilidade de que o vetor da dengue continua se dispersando pelo Brasil.

1.5 O dengue no Mundo e no Brasil

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), o dengue é a doença viral mais comum entre os seres humanos e que, portanto, trata-se de um dos principais problemas de saúde pública mundial (WHO, 2006).

A origem desta doença ainda é ponto de discussão entre muitos pesquisadores. A história mais convincente é de que os vírus tenham originado na Ásia, uma vez que estes vírus mantêm um ciclo bem estabelecido em primatas não humanos (Rudinick, 1978). Com a expansão colonial para a Ásia, o *Ae. aegypti* saiu da África acompanhando os seres humanos para esta região e ali estabeleceu-se um ciclo eficaz do dengue envolvendo seres humanos e o mosquito (Smith, 1956 *apud* Sardagna, 2003). Os primeiros relatos na literatura de uma doença compatível com o dengue foram registrados em 1779 em Jacarta no Cairo, sendo que, no ano seguinte, Benjamim

Rush faz a primeira descrição clínica desta enfermidade na Filadélfia, Estados Unidos (Pontes & Ruffino-Netto, 1994).

Após esse período, a II Guerra Mundial teve grande importância na dispersão do *Ae. aegypti*, pois os combatentes do sudeste da Ásia levavam consigo para o Japão e Ilhas do Pacífico os vírus dengue. Se não bastasse isto, as cidades também cresciam em ordem exponencial devido às migrações de pessoas que fugiam da Grande Guerra ou àqueles que migravam de regiões rurais para os grandes centros urbanos, contribuindo para a precariedade das condições de vida e aparecimento de várias doenças (Halstead, 1992).

Na década de 50, ocorreu o primeiro caso de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) em Manila, nas Filipinas. A partir daí, essa doença tornou-se uma das principais causas de morbi-mortalidade no sudeste da Ásia e Ilhas do Pacífico Sul (Gubler, 1998; Pontes & Ruffino-Netto, 1994). Nas décadas de 80 e 90, o dengue se dispersou pelo mundo e, atualmente, está presente em vários países tropicais.

Os primeiros relatos de surtos de dengue no Brasil iniciaram no século XIX. Mariano (1916) descreveu uma possível epidemia que ocorreu no Rio de Janeiro em 1846. Ainda naquele século existem relatos de surtos de dengue que ocorreram na região sul do país (Reis, 1896; Mariano, 1916). Entre os anos de 1922 e 1923, no Rio de Janeiro, foi registrada uma grande epidemia possibilitando estudos acurados sobre as manifestações clínicas dos casos de dengue (Pedro, 1923).

Na região Norte, os primeiros casos de dengue registrados clínica e laboratorialmente foram em Boa Vista em 1982, causados pelos sorotipos DEN-1 e DEN-4 (Osanai *et al.*, 1983). Acredita-se que os sorotipos tenham entrado em Roraima vindos da Guiana e da Venezuela, países que haviam sofrido epidemias de dengue anteriormente (Vasconcelos *et al.*, 1999). Este surto foi controlado por meio de medidas locais de eliminação do mosquito. Em seguida ocorreu uma epidemia no Rio de Janeiro em 1986 e, a partir daí, o vírus se espalhou para vários Estados (Nogueira *et al.*, 2002). Na região Nordeste, os primeiros casos foram registrados no Ceará em agosto de 1986 (Cunha *et al.*, 1998). Em 1990, uma grande epidemia de dengue ocorreu na região metropolitana do Rio de Janeiro, sendo que as dificuldades na implementação de um programa de controle do vetor resultaram numa rápida difusão do vírus e,

conseqüentemente, na ocorrência de várias epidemias em muitos outros Estados (Figueiredo, 2003; Nogueira *et al.*, 2002).

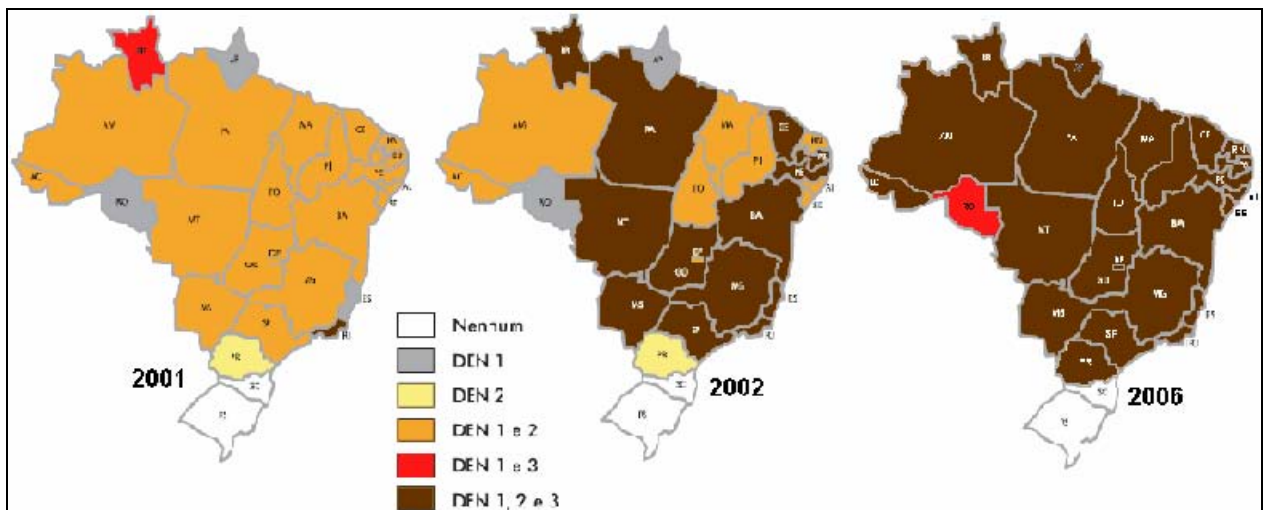
Os primeiros casos autóctones do vírus dengue na região Norte foram registrados no Pará, em 1995, nos municípios de Redenção e Rondon (Figueiredo *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2000). No Estado do Amazonas, os primeiros registros do vetor ocorreram em 1996, em Manaus, por meio da Fundação de Medicina Tropical/Instituto de Medicina Tropical do Amazonas (FMT/IMT-AM), desencadeando em 1998 e 2001 duas grandes epidemias de dengue em Manaus (Figueiredo *et al.*, 2004). Em 1998 foram isolados os sorotipos DEN-1 e DEN-2 (Figueiredo *et al.*, 2002). Em 2002, foi isolado pela primeira vez em Manaus o sorotipo DEN-3, proveniente de dois pacientes (Araújo *et al.* 2003). No ano seguinte, Pinheiro *et al.* (2005) coletaram amostras de *Ae. aegypti* em vários bairros da cidade de Manaus e detectaram uma alta taxa de infecção pelo DEN-3.

Segundo dados do Ministério da Saúde, atualmente no Brasil encontram-se circulando três sorotipos do dengue (DEN-1, DEN-2 e DEN-3), sendo que os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul são os únicos que se mantêm com registro de nenhum sorotipo circulando (MS, 2006) como mostra a figura 3. Estes dados fazem parte de dois levantamentos rápidos da situação epidemiológica do dengue, realizados entre março e outubro de 2006. Segundo esse levantamento, foram registrados, de janeiro a setembro de 2006, 530 casos de febre hemorrágica do dengue e a ocorrência de 61 óbitos.

1.6 Características epidemiológicas, transmissão e sintomas do dengue

A transmissão do dengue começa quando o mosquito *Ae. aegypti* pica uma pessoa que já esteja infectada com o vírus. No interior do inseto, o vírus irá se multiplicar no intestino e depois passará para outros órgãos, tais como ovários e tecido nervoso e, por último alcança as glândulas salivares, onde através da picada cairá na corrente sanguínea de outro indivíduo humano. O período de incubação do vírus no mosquito varia de 8 a 14 dias, e a partir daí o inseto torna-se infectado para o resto da vida (Fiocruz, 2005; Service, 2000).

Por outro lado, o ser humano que for picado pelo mosquito infectado, os vírus do dengue passam para a corrente sanguínea e começam a se multiplicar em células musculares estriadas, lisas ou em linfonodos locais (Figueiredo, 1999). Depois da multiplicação, eles se espalham por todo o organismo, podendo circular livres no plasma ou no interior de monócitos. Após o período de incubação de 4 a 7 dias, surgem os sintomas gerais do dengue caracterizados por febre e mal-estar (MS, 2005). O vírus pode circular no sangue periférico durante todo o período febril que varia de 2 a 10 dias. Durante esse período de viremia, se outro mosquito picar a pessoa doente, este se tornará infectado, iniciando assim outro ciclo (Gubler, 1998).



Fonte: SES/FUNASA e SVS, modificado

Figura 3. Sorotipos circulantes do vírus dengue nos estados brasileiros, 2001-2002 e 2006.

1.7 DNA mitocondrial como marcador molecular

O DNA mitocondrial (DNAm_t) dos animais é constituído de uma molécula circular, de fita dupla, onde são descritos 37 genes dos quais 2 codificam RNAs ribossômicos, 13 codificam polipeptídeos relacionados com a fosforilação oxidativa e 22 codificam a formação dos RNAs transportadores (Matioli, 2001). Seu tamanho é de aproximadamente 16.000 pares de bases, porém muito importante para o metabolismo celular (Lang *et al.*, 1999; Boore, 1999). Em invertebrados, o DNAm_t é muito parecido com o dos vertebrados, estando as diferenças principalmente relacionadas com o rearranjo dos genes na fita circular (Snustad & Simmons, 2001).

O DNAm_t é uma molécula haplóide que é adquirida por herança materna que não apresenta recombinação gênica. Não possui íntrons ou pseudogenes, raramente apresenta seqüências duplicadas e geralmente possui menos de 10 pares de bases separando seus genes (Attardi, 1985; Gray, 1989). Possui uma taxa de evolução dez vezes maior que o DNA nuclear (Beatty & Marquardt, 1996), fato este que pode ser explicado por uma baixa eficiência do sistema de reparo nas mitocôndrias, visto que as enzimas envolvidas neste processo são codificadas por genes nucleares e dependem de serem transportadas até as mitocôndrias (Matioli, 2001). Devido a estas características, o genoma mitocondrial tem sido extensivamente usado como marcador molecular em estudos de genética de populações, tais como fluxo gênico, tamanho efetivo da população e história evolutiva (Avice, 1994; Spanos *et al.*, 2000).

1.8 Estudos Genéticos

Nos últimos anos, um elevado número de estudos envolvendo genética de populações tem sido realizado com *Ae. aegypti*. Os primeiros estudos realizados para avaliar a variabilidade genética nestes mosquitos foram baseados em técnicas de eletroforese em gel de amido e poliacrilamida. Townson (1969) foi um dos pioneiros, pois realizou estudos isoenzimáticos em mosquitos de Liverpool. O uso de marcadores isoenzimáticos também foi importante na caracterização e diferenciação genética entre as duas subespécies: *Ae. aegypti formosus* e *Ae. aegypti aegypti*, conforme descrito acima (Powell & Tabachnick, 1980; Scott & McClelland, 1975; Tabachnick & Powell, 1978; Wallis *et al.*, 1983; Wallis & Tabachnick, 1990).

Apesar da grande quantidade de marcadores existentes atualmente, os marcadores isoenzimáticos ainda são utilizados para inferir variabilidade genética de populações de mosquitos, entre eles o *Ae. aegypti*. Paupy *et al.* (2000), encontraram cinco locos polimórficos para isoenzimas em 28 amostras de *Ae. aegypti* procedentes das Ilhas Tahiti e Moorea, na Polinésia Francesa. Esse estudo revelou que as populações das duas ilhas encontram-se estruturadas geneticamente e que tal estruturação está ligada diretamente à densidade populacional humana e às características ecológicas da espécie.

Em Manaus, Fraga *et al.* (2003) realizaram um estudo isoenzimático em populações de *Ae. aegypti* de quatro bairros da cidade. Dos 18 locos analisados, sete mostraram-se polimórficos, sendo que a análise molecular revelou maior variabilidade dentro das populações. Outro estudo isoenzimático foi realizado por Yébakima *et al.* (2004) em Martinique, no Caribe, cujo objetivo foi quantificar a variação genética entre as populações de *Ae. aegypti*, bem como estimar a taxa de infecção experimental ao vírus dengue. Os resultados revelaram que as populações desses mosquitos encontram-se bem diferenciadas geneticamente, principalmente entre os grupos geográficos, com os valores de F_{ST} variando entre 0,189 (na região Central) e 0,346 (região do Atlântico Norte). As taxas de infecção do vírus dengue variaram de 42,8% a 98,6%. Outro estudo usou isoenzimas para quantificar a variação genética de 23 populações de *Ae. aegypti* de 13 Estados brasileiros, bem como a susceptibilidade aos vírus dengue e da febre amarela (Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004). Neste estudo as populações mostraram-se bastante diferenciadas com alta susceptibilidade aos dois vírus. Outro importante estudo envolvendo técnicas isoenzimáticas, em populações naturais de *Ae. aegypti*, foi realizado por Paupy *et al.* (2005) em quatro cidades do Camboja. A análise de 47 amostras revelou um baixo valor de F_{ST} (0,024), porém com significativa diferenciação ($P < 10^{-6}$). Quando a análise considerou as cidades separadamente, observou-se importante diferenciação tanto interpopulacional quanto intrapopulacional, no entanto sem revelar associação significativa entre as distâncias geográfica e genética.

Ao contrário dos marcadores isoenzimáticos, os marcadores baseados em seqüências de DNA são largamente utilizados em estudos de genética de populações de eucariontes, pois permitem a visualização direta das variações ocorridas nas seqüências de nucleotídeos. Esta técnica foi aperfeiçoada graças ao surgimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Mullis & Faloona, 1987), que possibilitou a amplificação *in vitro* de ácidos nucléicos, resolvendo os problemas relacionados à quantidade de DNA a ser utilizada nas reações de laboratório.

Em populações de *Ae. aegypti* vários estudos foram realizados utilizando-se seqüências de DNA como forma de avaliar a variabilidade genética destes mosquitos, entre eles, destacam-se trabalhos que utilizaram o Polimorfismo de Comprimento de

Fragmentos de Restrição (RFLP) (Yan *et al.*, 1998) e Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) (Merrill *et al.*, 2005). Além disso, destacam-se também os trabalhos que utilizaram a técnica economicamente viável do Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) (Apostol *et al.*, 1996; Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000; Ocampo & Wesson, 2004; Paduan *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2001). Entre os estudos que utilizaram RAPD em populações de *Ae. aegypti*, especial destaque é dado a um extensivo estudo realizado por Ayres *et al.* (2003) que avaliou a diversidade genética de populações de *Ae. aegypti* de cinco Estados brasileiros. Os 47 locos analisados revelaram elevado polimorfismo e diferenciação genética entre as populações deste vetor no Brasil.

Outros estudos têm sido realizados com microssatélites em populações de *Ae. aegypti*. Ravel *et al.* (2002) que utilizaram três locos de microssatélites em populações deste vetor no oeste da África. Nesse estudo foram encontradas fortes evidências de diferenciação genética microgeográfica entre populações de Bouaké. Na Ásia, Huber *et al.* (2002) empregaram seis locos de microssatélites para estimar a variação genética dessa espécie na cidade de Ho Chi Minh, no Vietinã. As análises revelaram pouca diferenciação genética entre as populações da região central devido aos processos de cruzamentos aleatórios. Por outro lado, alta diferenciação ocorreu nas regiões do entorno da cidade que, segundo os autores, deve-se ao processo de deriva genética ali ocorrido. Outro estudo envolvendo microssatélites foi realizado por Costa-Ribeiro *et al.* (2006) no Rio de Janeiro, onde foi constatada alta diferenciação genética nas populações do centro e da periferia da cidade.

Análises de segmentos mitocondriais também foram utilizadas em populações de *Ae. aegypti*. A região Controle (também conhecida como região A + T ou região *D-loop*) do DNA mitocondrial (DNAMt) foi analisada em seis populações da Argentina revelando diferenciação genética, porém sem associação entre as distâncias geográfica e genética (Rondan-Dueñas *et al.*, 2002).

Na Austrália, Beebe (*et al.*, 2005) utilizaram o gene COI do DNAMt em 46 amostras de *Ae. aegypti* do norte e de algumas ilhas próximas. Foram encontrados 8 haplótipos e uma discreta variação genética entre as populações analisadas.

Dentre os genes mitocondriais utilizados em estudos de genética de populações de *Ae. aegypti*, o segmento do gene NADH desidrogenase, subunidade 4 (ND4) do DNAm tem demonstrado ser uma excelente ferramenta de diferenciação genética. Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2002) conduziram um estudo de genética de populações no México utilizando RAPD e o segmento do gene ND4 como marcadores. Foram encontrados 25 haplótipos e isolamento geográfico, quando as distâncias eram maiores que 250 Km. Na Tailândia, um estudo com dezenove populações, utilizando o mesmo marcador (ND4), foram encontrados sete haplótipos e uma diversidade genética menor do que a encontrado nas populações do México (Bosio *et al.*, 2005). Na América do Sul, Costa-da-Silva *et al.* (2005) também utilizaram o gene ND4 para estimar a variabilidade genética do *Ae. aegypti* de três cidades do Peru (Lima, Piura e Iquitos). Foram encontrados três haplótipos, sendo que a população de Piura foi a que se mostrou mais estruturada geneticamente quando comparada com Iquitos e Lima.

Recentemente, um estudo conduzido por Herrera *et al.* (2006) em populações deste mosquito na Venezuela utilizou o gene ND4 e encontrou sete haplótipos, revelando significativa diferenciação entre as populações e fortes evidências para isolamento genético por distância.

Além disso, outros trabalhos foram conduzidos utilizando o DNA mitocondrial em diferentes espécies do gênero *Aedes*. Fonseca *et al.* (2001) estudaram a estrutura genética de populações de *Aedes (Finlaya) japonicus* do Japão e Estados Unidos, usando o gene ND4 como marcador. No Japão ficou evidenciado um limitado fluxo gênico entre as populações, sendo que para os Estados Unidos houve significantes diferenças genéticas entre as amostras, sugerindo múltiplas introduções do mosquito. Birungi e Munstermann (2002) analisaram a estrutura genética de *Ae. albopictus* de amostras do Brasil e Estados Unidos, usando o segmento do gene ND5 do DNAm, e demonstraram que houve mecanismos distintos de dispersão desse mosquito entre os dois países. Recentemente, Szalanski *et al.* (2006) analisaram o gene ND5 em populações de *Ae. vexans* dos Estados Unidos e encontraram 40 haplótipos. Esse estudo também revelou elevada variabilidade e pouca estruturação genética.

Todos os estudos acima citados demonstram que a maioria das populações *Ae. aegypti* estão geneticamente estruturadas em diferentes regiões do mundo. Boa parte

desses estudos buscou avaliar a estrutura genética como uma exigência essencial à compreensão da dinâmica populacional, porém outros buscaram associar muito de seus resultados a outros fatores, tais como a competência vetorial, resistência à inseticidas e a adaptação ecológica.

Atualmente pouco se conhece a respeito da dinâmica populacional do *Ae. aegypti* na Amazônia brasileira. Por esta razão, esse trabalho pretende estudar a estrutura genética de populações naturais deste mosquito na Amazônia, objetivando obter subsídios para a implementação de novas estratégias de controle deste importante vetor de doenças.

2. Objetivos

Geral:

Analisar a variabilidade genética de dez amostras de *Ae. aegypti* da Amazônia brasileira, objetivando o conhecimento da estrutura genética de populações, da extensão do fluxo gênico e dos possíveis eventos de colonização dessa espécie na região e, desta forma, contribuir para o desenvolvimento de metodologias mais eficazes para o controle desse vetor de doenças.

Específicos:

1. Estimar e comparar o grau de variabilidade genética intra-populacional das amostras;
2. Estimar e comparar o grau de variabilidade inter-populacional, a extensão de fluxo gênico e a divergência genética entre as amostras;
3. Inferir se há isolamento entre as distâncias genética e geográfica nas populações estudadas;
4. Propor hipóteses sobre a possível origem das populações de *Ae. aegypti* na Amazônia brasileira, a partir da comparação com os haplótipos encontrados nesse estudo e outros haplótipos obtidos em populações de *Ae. aegypti* das Américas Central e do Sul.

3. Material e Métodos

3.1 Local de Coleta e Preparação dos Espécimes

Os locais de coletas do *Ae. aegypti* compreenderam as cidades de Belém (PA), Santarém (PA), Boa Vista (RR), Pacaraima (RR), Rio Branco (AC), Coari (AM) e Manaus (AM), conforme mostrado na Figura 4. Para a análise microgeográfica foram coletados indivíduos pertencentes a quatro bairros da cidade de Manaus: Coroadó, Praça 14 de Janeiro, Compensa e Tancredo Neves (Figura. 5). As informações sobre os locais de coleta e número amostral encontram-se na Tabela 1.

As amostras foram obtidas nos estágios de larvas e pupa com auxílio de um conta-gotas, em criadouros artificiais (recipientes), próximos às residências. Em seguida, o material foi transportado para o Laboratório de Genética e Evolução de Mosquitos, na Coordenação de Pesquisas em Entomologia (CPEN), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Chegando lá, as amostras foram transferidas para cubas com água e as larvas foram alimentadas com farinha de peixe e germe de trigo, para completar o desenvolvimento até o 4º estágio (Scarpassa & Tadei, 1990). As pupas foram separadas em copos plásticos, devidamente etiquetados, fechados com tela para a emergência dos adultos. Os espécimes foram identificados, utilizando-se a chave de identificação taxonômica de Forattini (2002) e, posteriormente, acondicionados em tubos *ependorfs* etiquetados e congelados em freezer -80° C.

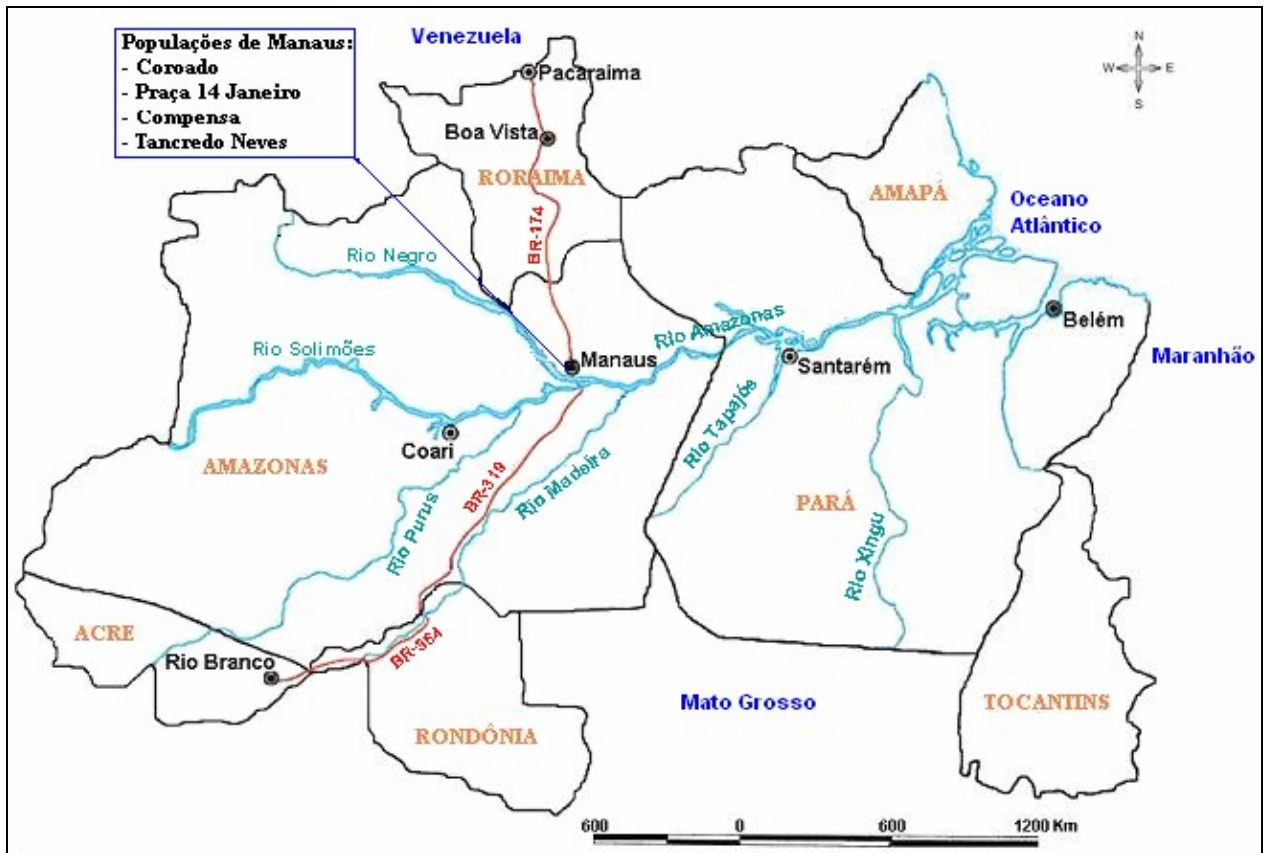


Figura 4. Locais de coleta de *Aedes aegypti*.



Figura 5. Mapa da cidade de Manaus destacando os bairros onde foram realizadas as coletas de *Aedes aegypti*. 1- Praça 14 de Janeiro, 2- Coroado, 3- Compensa e 4- Tancredo Neves.

Tabela 1. Locais de coletas com seus respectivos Estados, coordenadas geográficas e tamanho amostral.

Estados	Localidade / Bairro	Localização	Tamanho Amostral
Pará	Belém	1° 25' S e 48° 27' W	11
Pará	Santarém	2° 26' S e 54° 43' W	14
Roraima	Boa Vista	2° 48' N e 60° 42' W	12
Roraima	Pacaraima	4° 25' N e 61° 08' W	12
Acre	Rio Branco	9° 58' S e 67° 49' W	12
Amazonas	Coari	4° 05' S e 63° 08' W	12
Amazonas	Coroado*	3° 05' 25" S e 59° 58' 51" W	19
Amazonas	Praça 14 de Janeiro*	3° 07' 19" S e 60° 00' 52" W	11
Amazonas	Compensa*	3° 06' 33" S e 60° 03' 03" W	10
Amazonas	Tancredo Neves*	3° 03' 23" S e 59° 56' 45" W	10

* Bairros da cidade de Manaus, conforme mostra a Figura 5.

3.2 Extração do DNA

Na extração do DNA total foi utilizado o protocolo desenvolvido por Collins *et al.* (1987), com algumas modificações. Os mosquitos adultos, pupas e larvas de 4º estágio foram macerados individualmente em tubos *ependorfs* de 1,5 ml com tampão de lise: 0,08 M NaCl, 0,16 M de Sucrose, 0,06 M de EDTA, 0,5% SDS e 0,1 M de Tris-Cl. A solução mais importante neste tampão trata-se do detergente iônico SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) que tem por função solubilizar lipídeos e desfazer complexos macromoleculares. Em seguida, as amostras foram levadas ao banho-maria numa temperatura de 65 °C por 30 minutos. Após este período de incubação, era acrescentado Acetato de Potássio (KAc) a 8 M, para a precipitação das proteínas.

A seguir, as amostras foram incubadas a uma temperatura de 4 °C por 30 minutos, centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, o DNA foi precipitado com Etanol 95%. O DNA ficou repousando de um dia para o outro (*overnight*) no freezer a – 20 °C. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados e o precipitado foi lavado em Etanol 75%, seguido de nova centrifugação. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi posto para secar em temperatura ambiente e solubilizado em tampão 1XTE e mantidos em freezer – 80 °C.

3.3 Amplificação do DNA

A amplificação do gene ND4 foi realizada pelo método da PCR, que permitiu a obtenção de cópias exponenciais do gene ND4. As reações foram preparadas utilizando as seguintes concentrações finais das soluções: 1X da solução estoque do tampão 10X (Tris-KCl 200mM, pH 8,4), 0,4 mM de dNTP (10mM), 2,0 mM de MgCl₂ (50 mM), 0,5 uM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 1 U (*units*) de Taq *polymerase* e água estéril para completar o volume final de 25 µL de reação para cada tubo de microcentrífuga de 0,2 mL.

Os iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação do segmento do gene ND4 foram publicados por Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2000) e consistem das seguintes seqüências:

Forward: (5' – GTD YAT TTA TGA TTR CCT AA – 3')

Reverse: (5' – CTT CGD CTT CCW ADW CGT TC – 3')

O termociclador (*Eppendorf – Mastercycler 5333*) utilizado para amplificar as amostras foi programado com o seguinte perfil de amplificação: uma temperatura inicial de 95° C durante 3 minutos, 10 ciclos a 92° C durante 30 segundos, 48° C durante 1 minuto e 72° C durante 40 segundos, seguido de 40 ciclos a 92° C durante 30 segundos, 52° C durante 35 segundos e 72° C por 40 segundos e finalizando numa temperatura de extensão de 72° C durante 5 minutos (Bosio *et al.*, 2005).

Para verificar a eficiência da amplificação, os produtos de PCR foram checados em géis de agarose a 1%. Foram colocados nos géis um marcador com peso molecular conhecido, para posterior comparação e estimativa do tamanho do DNA em análise. Os géis foram corados com brometo de etídio por 20 minutos e, em seguida, lavados e visualizados por meio de um transluminador de luz UV *Eagle Eye II* para fotodocumentação e análise (Figura 6).

3.4 Purificação do Produto Amplificado

Os produtos de PCR que produziram bandas intensas e nítidas foram separados para purificação utilizando o kit GFX da GE Healthcare, conforme instruções do fabricante. A purificação foi realizada para eliminar resíduos de baixo peso molecular, tais como sais, iniciadores e dNTPs.



Figura 6. Gel de Eletroforese com 1% de agarose, corado com brometo de etídio mostrando os fragmentos do gene ND4 de 10 indivíduos de *Ae. aegypti* com tamanho próximo a 400 pares de base (pb). M = marcador *Ladder* de peso molecular conhecido da Invitrogen.

3.5 Reação de Seqüenciamento

As amostras de DNA foram seqüenciadas no Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA, utilizando-se para isto o kit de seqüenciamento *DYEnamic™ ET dye terminator kit (MegaBACE™)*. Nestas reações foram utilizados 5 µL de DNA, 1 µL de iniciadores de seqüenciamento, 2 µL de ET e 2 µL de água Milliq, perfazendo um total de 10 µL de reação. Para cada amostra foram preparadas duas reações: *Reverse* e *Forward*. Em seguida, as amostras foram agitadas e a placa contendo o DNA foi transportada para o termociclador. Após a amplificação, foi realizada a precipitação. Em seguida, a placa era submetida à eletro-injeção no seqüenciador automático *MegaBACE 1000 analysis System*, seguindo-se o protocolo padrão do fabricante.

3.6. Alinhamento das Seqüências

Uma vez obtidas as seqüências, as mesmas foram alinhadas utilizando-se os programas BioEdit, versão 7.0.5.2, (Hall, 1999) e Chromas, versão 3.0. Todos os indivíduos foram seqüenciados em ambas as direções. Após o alinhamento manual das seqüências obtidas com ambos os *primers (Forward e Reverse)*, foi realizada a justaposição (*overlap*) das seqüências de cada amostra para obtenção de uma única seqüência representativa do gene ND4, denominada de *Contig*.

3.7 Análises Estatísticas

3.7.1 Análise dos haplótipos

A genealogia entre os haplótipos foi inferida por meio da construção de uma rede de haplótipos, que foi elaborada com o auxílio do programa TCS versão 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Este programa estima a relação entre haplótipos com base no método de parcimônia, agrupando-os a partir das mutações obtidas em suas seqüências. Tal genealogia é baseada no cálculo da freqüência destes haplótipos nas populações amostradas, usando um algoritmo descrito por Templeton *et al.* (1992). Portanto, a rede de haplótipos gerada é uma reconstrução evolutiva da história genealógica da variação genética encontrada nas amostras de DNA que experimentaram pouca ou nenhuma recombinação (Templeton, 2001).

3.7.2 Análise do Polimorfismo molecular

O estudo da diversidade genética em populações naturais têm sido de grande interesse para geneticistas de populações e evolucionistas. Diversidade haplotípica (h) é a probabilidade de duas seqüências, escolhidas aleatoriamente de uma população, serem diferentes dentro da população.

O número de nucleotídeos diferentes por sítio entre seqüências escolhidas aleatoriamente define outro parâmetro de diversidade molecular, a diversidade nucleotídica (π). No presente estudo, estas duas medidas de diversidade genética foram estimadas pelo programa Arlequin, versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006) e pelo programa DnaSP, versão 4.10 (Rozas *et al.*, 2003).

3.7.3 Testes de neutralidade

Para a teoria neutra de mutações, a maioria das substituições de bases que se tornam fixadas em uma população é neutra com respeito ao sucesso reprodutivo (*fitness*) (Kimura, 1968).

Atualmente, muitos testes são utilizados em genética de populações para aferir a neutralidade seletiva em populações naturais. Porém, para o presente trabalho foram utilizados dois testes: D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997).

O teste D de Tajima utiliza a variação genética dentro das populações no nível de DNA. Esta variação é calculada a partir da relação entre o número de sítios segregantes e o número médio de diferenças nucleotídicas estimado pela comparação par-a-par. O teste F_s de Fu também utiliza polimorfismo de DNA, porém este teste leva em consideração o fator temporal das mutações que geram sítios polimórficos, classificando-as como antigas ou recentes. Este modelo é aplicável principalmente quando há excesso de mutações jovens (mutações que ocorreram recentemente, com baixa freqüência e que geram excesso de alelos raros). Por esta razão, o teste F_s de Fu julga-se ser mais promissor pela possibilidade de detectar crescimento populacional e *genetic hitchhiking* ("efeito carona"). Para calcular dos testes de neutralidade foram utilizados ferramentas disponíveis no programa DnaSP, versão 4.10 (Rozas *et al.*, 2003).

3.7.4 Análise de variância molecular (AMOVA) e estrutura genética

Para verificar a existência de população diferenciada e avaliar o grau de significância da variabilidade genética inter e intrapopulacional, foi utilizada a análise de variância molecular através do programa Arlequin, versão 3.1, (Excoffier *et al.*, 2006). Este modelo estatístico (AMOVA) baseia-se nas análises de diferentes níveis hierárquicos: primeiro é obtido com a permutação entre os grupos (F_{CT}), o segundo entre populações dentro dos grupos (F_{SC}) e o terceiro dentro das populações (F_{ST}). Assim, os indivíduos são reunidos em grupos previamente definidos com base em critérios não genéticos, como geográficos, ecológicos, ambientais, etc. No caso deste trabalho, utilizou-se distribuição geográfica para a montagem dos grupos hierárquicos.

Para verificar se as populações estudadas encontram-se diferenciadas (estruturadas) foi utilizado o índice de fixação (F_{ST}) de Wright (1921). O índice F_{ST} é freqüentemente relacionado ao número de migrantes por geração (Nm), através da fórmula $F_{ST} = 1 / 4Nm + 1$ para dados diplóides e para marcadores haplóides $F_{ST} = 1 / 2Nm + 1$. O Nm fornece informações sobre o fluxo gênico entre as populações. O índice de fixação F_{ST} e a estimativa de fluxo gênico (Nm) foram também obtidos pelo programa Arlequin, versão 3.1, por meio de 1023 permutações paramétricas dos haplótipos entre as populações.

3.7.5 Isolamento por distância

O isolamento genético por distância foi testado mediante metodologia desenvolvida por Mantel (1967), que é uma metodologia estatística geral que testa a significância da correlação entre uma matriz de distância genética e uma matriz de distância geográfica (em Km). Na matriz de distância genética foram utilizados os valores da comparação par-a-par de F_{ST} . A hipótese de isolamento por distância foi testada com auxílio do programa IBDWS, versão 3.03 (Jensen *et al.*, 2005). A distância geográfica foi estimada através de GPS e por ferramentas disponíveis no programa Google Earth, versão 4.0 (2006).

3.7.6 Análise por meio de dendrogramas

Foram construídos dois dendrogramas baseados em ferramentas disponíveis no programa Mega, versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). O primeiro foi um dendrograma de haplótipos baseado no método de Neighbor-Joining, seguindo o modelo de distância genética de Tamura-Nei, com o emprego de 1000 replicatas. Foram incluídos como grupos externos (*outgroup*) as seqüências haplotípicas do gene ND4 de *Aedes albopictus* (GenBank # EF153761) e *Anopheles marajoara* (GenBank # AY846347). O segundo dendrograma construído foi baseado nos valores par-a-par de F_{ST} das 10 amostras de *Ae. aegypti*, com o emprego do método de Neighbor-Joining. Para este segundo dendrograma foram utilizados os valores de F_{ST} calculados pelo programa Arlequin, versão 3.1.

4. Resultados

4.1 Distribuição e frequência dos haplótipos

Cento e vinte e três indivíduos (123) foram analisados, resultando em 123 seqüências do gene ND4, com 380 pares de bases (pb) cada, de dez populações de *Ae. aegypti*. O bairro do Coroadó, em Manaus, e a cidade de Santarém foram as populações com maior número de indivíduos seqüenciados, 19 e 14, respectivamente.

A composição média de nucleotídeos foi de 9,67% para Citosina; 41,74% para Timina; 27,92% para Adenina e 20,67% para Guanina. Dos 380 pb, 16 sítios foram variáveis, sendo 15 informativos para parcimônia.

A tabela 2 mostra os 13 haplótipos encontrados nas 10 populações analisadas. O haplótipo H1 foi o mais freqüente, representando 47,15% do total de haplótipos observados. O H6 foi o segundo haplótipo mais freqüente com 32,52%, sendo detectado na maioria das populações, com exceção de Boa Vista e Pacaraima. O haplótipo H11 foi observado em 12 indivíduos de três bairros de Manaus e da cidade de Boa Vista. Os demais haplótipos, com exceção do H10, foram únicos (*singletons*). A frequência relativa total dos 13 haplótipos nas 10 populações de *Ae. aegypti* e a frequência relativa dos haplótipos em cada população estão representadas graficamente nas figuras 7 e 8, respectivamente. A tabela 3 mostra as posições variáveis observadas nos 13 haplótipos identificados.

Com base no método da parcimônia, foi gerada uma rede de haplótipos, conforme mostra a Figura 9. O tamanho das elipses é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo. Os círculos menores, que ligam os haplótipos identificados, correspondem aos haplótipos não amostrados (*missing haplotypes*) e classificados como intermediários. O haplótipo H1, representado por um retângulo, é provavelmente o haplótipo ancestral entre os indivíduos estudados.

As seqüências dos 13 haplótipos do gene ND4 encontradas neste trabalho foram alinhadas com as seqüências de haplótipos depositadas no *GenBank*, provenientes de estudos feitos no México (Gorochotegui-Escalante *et al.*, 2002) e no Peru (Costa-da-

Silva *et al.*, 2005) (México: *GenBank* # AF334841-AF334865; Peru: *GenBank* # DQ177153- DQ177155). Os haplótipos 3, 5 e 6 do México foram idênticos, respectivamente, aos haplótipos H5, H3 e H11 encontrados no presente estudo. No Peru, os haplótipos 1 (da cidade de Lima) e o haplótipo 3 (da cidade de Piura) foram idênticos, respectivamente, aos haplótipos H5 e H1 encontrados na Amazônia brasileira. A Figura A dos anexos apresenta uma rede de haplótipos gerada com todos os haplótipos observados, incluindo os do presente estudo, México e Peru.

Os estudos feitos na Tailândia (Bosio *et al.* 2005) e na Venezuela (Herrera *et al.*, 2006) não tiveram suas seqüências de haplótipos depositadas no *GenBank*, portanto, não foi possível uma comparação com os haplótipos encontrados neste estudo. Por outro lado, foram encontradas no *GenBank* seqüências de haplótipos do gene ND4 provenientes de três estudos realizados em populações de *Ae. aegypti* do Brasil e da América do Sul, porém não publicados na literatura. Estas seqüências foram então alinhadas com as seqüências dos haplótipos do presente estudo, onde foi constatado que estes trabalhos apresentaram no mínimo três dos seguintes haplótipos encontrados na Amazônia brasileira: H1, H3, H5, H6, H11.

Tabela 2. Distribuição haplotípica da frequência absoluta das 10 populações de *Aedes aegypti*.

Populações de <i>Aedes aegypti</i>											
Haplótipos	Cor	Pra	Com	TaN	Coa	Stm	Blm	BoV	Pac	RBr	Total
H1	7	3	7		8	11		10	12		58
H2					1						1
H3							1				1
H4	1										1
H5			1								1
H6	7	5	2	5	3	2	4			12	40
H7						1					1
H8							1				1
H9							1				1
H10							4				4
H11	3	2		5				2			12
H12	1										1
H13		1									1
Total	19	11	10	10	12	14	11	12	12	12	123

Cor = Coroadó; Pra = Praça 14 de Janeiro; Com = Compensa; TaN = Tancredo Neves; Coa = Coari; Stm = Santarém; Blm = Belém; BoV = Boa Vista; Pac = Pacaraima; RBr = Rio Branco.

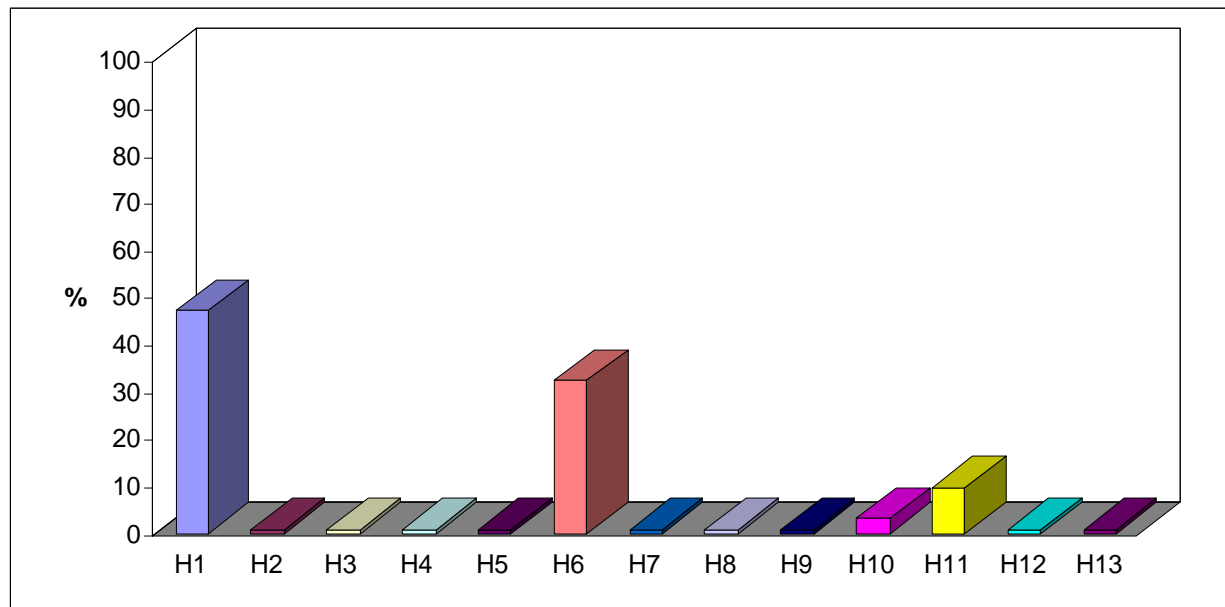


Figura 7. Frequência relativa dos 13 haplótipos encontrados nas 10 populações de *Aedes aegypti* da Amazônia.

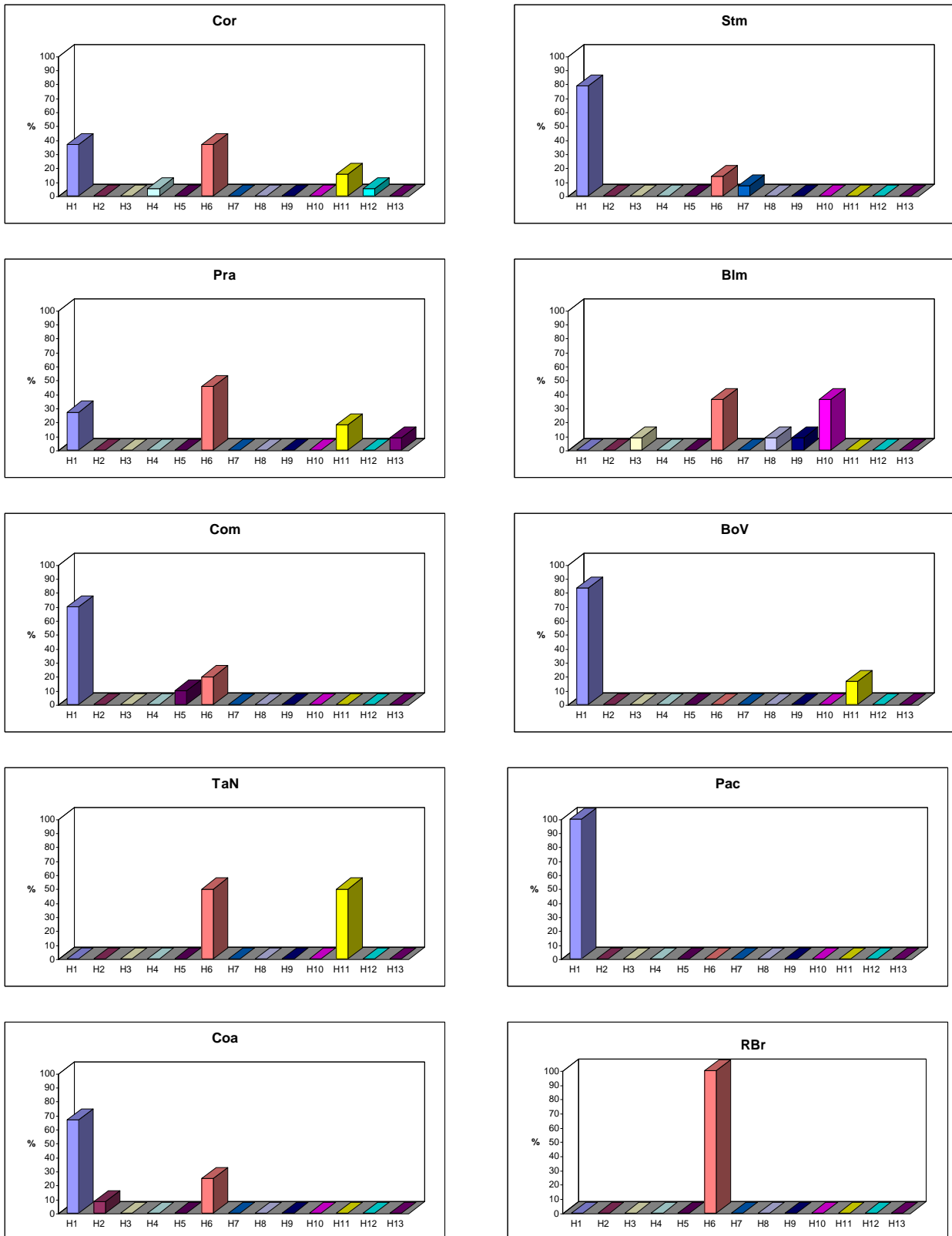


Figura 8. Frequência relativa dos haplótipos em cada população analisadas de *Aedes aegypti* analisada.

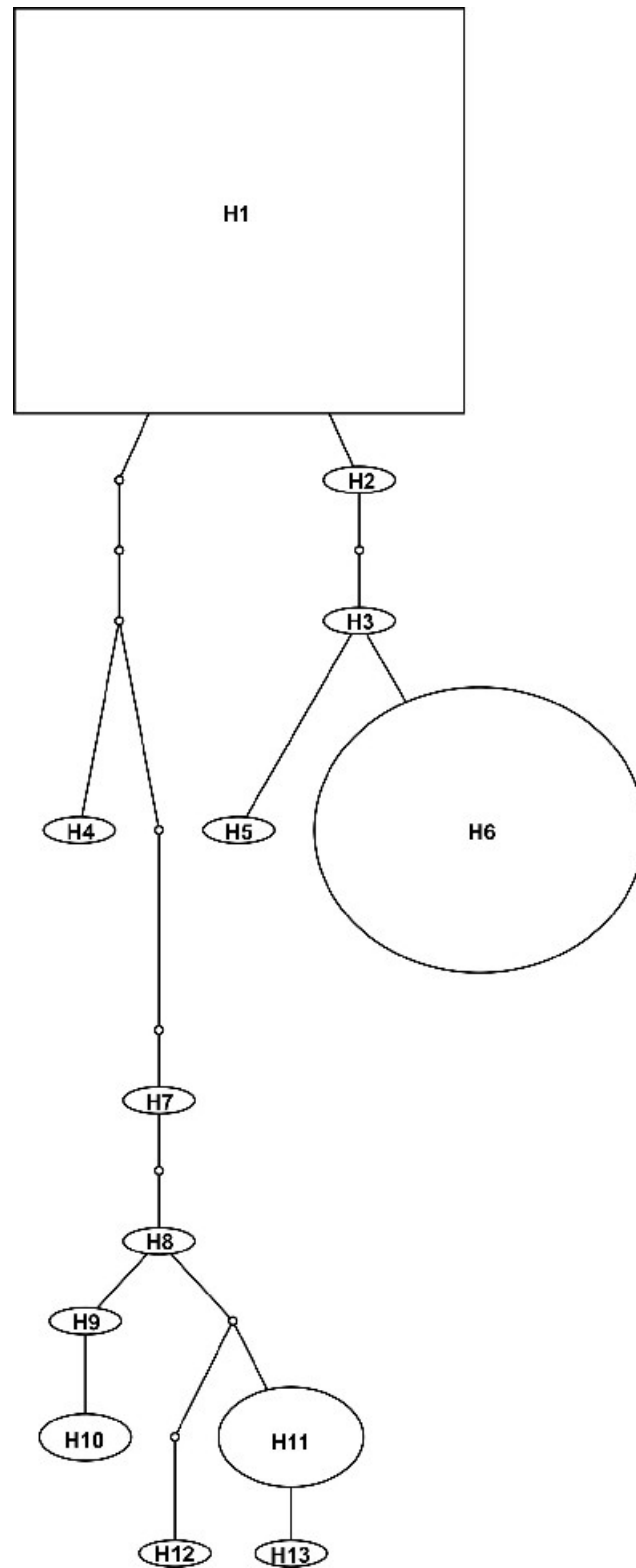


Figura 9. Rede de haplótipos observada para as amostras de *Aedes aegypti*.

Tabela 3. Sítios variáveis observados nos 13 haplótipos do gene ND4 do DNA mitocondrial de *Aedes aegypti*. **N** indica o número de indivíduos que compartilham cada haplótipo.

Haplótipos	Posições das mudanças nucleotídicas															N	
	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3		
	3	3	3	8	2	4	5	6	0	3	5	8	8	9	9	2	
	1	4	7	8	7	8	7	6	5	2	0	3	6	2	8	8	
H1	T	C	T	T	A	C	T	A	T	G	T	A	A	T	A	T	58
H2	T	.	.	.	1
H3	.	T	T	.	.	C	1
H4	C	T	C	C	1
H5	.	T	A	.	.	T	.	.	C	1
H6	.	T	.	.	G	T	.	.	C	40
H7	.	T	C	C	.	T	C	G	1
H8	.	T	C	C	.	T	C	.	C	.	C	G	1
H9	.	T	C	C	.	T	C	G	C	.	C	G	1
H10	.	T	C	C	.	T	C	G	C	.	C	G	.	.	G	.	4
H11	C	T	C	C	.	T	C	.	C	.	C	G	.	C	.	.	12
H12	.	.	C	C	.	T	C	.	C	.	C	.	.	C	.	.	1
H13	C	T	C	C	.	T	C	.	.	.	C	G	.	C	.	.	1

4.2 Diversidade genética e testes de neutralidade

Os valores de diversidade genética e os valores dos testes de neutralidade foram estimados para cada população de *Ae. aegypti* (Tabela 4). Os maiores valores de diversidades haplotípica e nucleotídica foram observados nas populações da cidade de Belém e dos bairros Coroado e Praça 14 de Janeiro, em Manaus. A população do bairro Tancredo Neves, em Manaus, apresentou o maior valor somente para a diversidade nucleotídica. As populações de Pacaraima e Rio Branco não mostraram variação nucleotídica.

Os testes de neutralidade, D de Tajima e F_s de Fu, não foram significativos para todas as amostras ($P > 0,05$), indicando que o polimorfismo genético está de acordo com o modelo neutro de mutações.

4.3. Análise da variância molecular (AMOVA) e estimativas de fluxo gênico

A análise da variância molecular (AMOVA) foi utilizada para detectar a variação genética dentro e entre as populações, sendo considerada inicialmente todas as populações não agrupadas. Os resultados revelaram que a maioria da variação genética (72,69%) ocorreu dentro das populações ($F_{ST} = 0,273$; $P < 10^{-5}$), conforme mostra a Tabela 5. Na segunda análise da AMOVA, as populações foram reunidas em grupos de acordo com os Estados: Grupo do Amazonas: Bairros de Manaus (AM) (Coroado, Praça 14 de Janeiro, Compensa e Tancredo Neves) e a cidade de Coari; Grupo do Pará: Santarém e Belém; Grupo de Roraima: Boa Vista e Pacaraima; Grupo do Acre: Rio Branco. Semelhante ao obtido na Tabela 5, os resultados mostraram que a maioria da variação ocorreu dentro das populações (70,66%; $F_{ST} = 0,293$, $P < 10^{-5}$) (Tabela. 6). Entre as populações dentro dos grupos a porcentagem de variação foi também significativa (18,87%; $F_{ST} = 0,210$, $P < 10^{-5}$).

Tabela 4. Diversidade genética e testes de neutralidade em populações de *Aedes aegypti*.

Pop.	NH	NV	K	<i>h</i>	π	Teste <i>D</i> de Tajima	Teste <i>F_s</i> de Fu
Cor	5	13	5,192	0,737 ± 0,062	0,0136 ± 0,0022	1,456	3,996
Pra	4	13	5,891	0,745 ± 0,098	0,0155 ± 0,0030	1,432	3,923
Com	3	5	1,955	0,511 ± 0,164	0,0051 ± 0,0015	0,427	1,926
TaN	2	12	6,666	0,556 ± 0,075	0,0175 ± 0,0023	2,581	9,078
Coa	3	4	1,712	0,530 ± 0,136	0,0045 ± 0,0013	1,029	1,900
Stm	3	9	1,868	0,385 ± 0,149	0,0049 ± 0,0021	-1,304	2,386
Blm	5	12	6,472	0,782 ± 0,093	0,0170 ± 0,0020	2,518	2,672
Bov	2	10	3,030	0,303 ± 0,147	0,0079 ± 0,0038	-0,349	5,937
Pac	1	0	0,000	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000	NC	NC
RBr	1	0	0,000	0,000 ± 0,000	0,0000 ± 0,0000	NC	NC
Total	13	16	4,399	0,666 ± 0,029	0,0115 ± 0,0010	1,309	1,418

NH = N^o de haplótipos para cada população; **NV** = N^o de sítios variáveis; **K** = N^o médio de diferenças nucleotídicas; ***h*** = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica. **NC** = não calculado. Nível de significância para os testes de neutralidade $P > 0,05$.

Cor = Coroadó; Pra = Praça 14 de Janeiro; Com = Compensa; TaN = Tancredo Neves; Coa = Coari; Stm = Santarém; Blm = Belém; BoV = Boa Vista; Pac = Pacaraima; RBr = Rio Branco.

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) de todas as populações não agrupadas de *Aedes aegypti*.

Tipo Variação	G L	C V	Variação (%)	Índice de Fixação	P
Entre as populações	9	0,6169	27,31	$F_{ST} = 0,273$	$< 10^{-5}$
Dentro das populações	113	1,6423	72,69		
Total	122	2,259	100		

GL = graus de liberdade; C V = componentes de variação; P = significância.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de *Aedes aegypti*.

Tipo Variação	G L	C V	Variação (%)	Índice de Fixação	P
Entre os grupos	3	0,2433	10,47	$F_{CT} = 0,104$	0,01
Entre as populações dentro dos grupos	6	0,4384	18,87	$F_{SC} = 0,210$	$< 10^{-5}$
Dentro das populações	113	1,6423	70,66	$F_{ST} = 0,293$	$< 10^{-5}$
Total	122	2,324	100		

GL = graus de liberdade; C V = componentes de variação; P = significância.

A diferenciação genética, representada pelos valores par-a-par de F_{ST} e os valores de Nm (número de migrantes por geração), referentes às 10 populações de *Ae. aegypti* são mostrados na Tabela 7. Após a correção de Bonferroni (Rice, 1989), valores significantes de F_{ST} ($P < 0,001$) foram verificados para a maioria das comparações que envolveram a cidade de Rio Branco, com valores correspondentes de Nm variando de 0,0-1,0, indicando baixo fluxo gênico. Os valores de F_{ST} também foram altos para seis comparações envolvendo a cidade Pacaraima, com valores significantes para três dessas comparações. Entre os quatro bairros da cidade de Manaus, nenhuma comparação foi significativa. Entretanto, a comparação entre os bairros Tancredo Neves e Compensa apresentou um valor elevado de F_{ST} (0,370), porém não significativa.

A hipótese de isolamento por distância foi testada e constatou-se um valor significativo para o coeficiente de correlação do teste de Mantel ($r = 0,5815$; $P = 0,006$), revelando que existe correlação entre a distância genética (F_{ST}) e distância geográfica (Km) em populações de *Ae. aegypti*. Entretanto, retirando as populações de Pacaraima e Rio Branco, o valor de correlação entre as distâncias genética e geográfica não foi significativo ($r = 0,2880$; $P = 0,097$) (Figura 10 A e B).

Foi construído um dendrograma baseado no método de agrupamento de vizinhos (Neighbor-Joining) para demonstrar a relação genética existente entre os 13 haplótipos encontrados. Para tanto, regiões homólogas do gene ND4 de *Ae. albopictus* e *An. marajoara* foram utilizadas como grupos externos (*outgroups*) (Figura 11). Este dendrograma mostrou dois agrupamentos, sendo que o grupo I incluiu seis haplótipos, entre eles, os dois mais comuns (H1 e H6) e quatro haplótipos únicos; o grupo II, reuniu sete haplótipos, entre eles, o terceiro haplótipo mais freqüente (H11), o haplótipo H10 exclusivo de Belém (4 indivíduos) e cinco haplótipos únicos.

O outro dendrograma envolveu as 10 populações de *Ae. aegypti*, sendo usados os valores de F_{ST} e o método de Neighbor-Joining (Figura 12). Este dendrograma também apresentou dois agrupamentos, sendo que o grupo I foi constituído de populações que apresentaram o haplótipo H1, e o grupo II, as populações que mostraram ausência do haplótipo H1.

Tabela 7. Valores de F_{ST} par-a-par (acima da diagonal) e número efetivo de migrantes (Nm) (abaixo da diagonal) em populações de *Aedes aegypti*.

	Cor	Pra	Com	TaN	Coa	Stm	Blm	BoV	Pac	RBr
Cor		-0,061	0,055	0,085	0,073	0,084	0,147	0,066	0,228	0,330*
Pra	inf		0,120	0,000	0,146	0,166	0,087	0,127	0,353*	0,325
Com	8,5	3,7		0,366	-0,089	-0,037	0,373	0,094	0,214	0,699*
TaN	5,4	inf	0,9		0,398	0,403	0,037	0,302	0,554*	0,476
Coa	6,4	2,9	inf	0,8		-0,009	0,405	0,111	0,210	0,706*
Stm	5,5	2,5	inf	0,7	inf		0,402*	0,014	0,051	0,732*
Blm	2,9	5,3	0,8	13,1	0,7	0,7		0,323	0,545*	0,506
BoV	7,0	3,4	4,8	1,2	4,0	35,1	1,0		0,010	0,716
Pac	1,7	0,9	1,8	0,4	1,9	9,3	0,4	5,0		1,000*
RBr	1,0	1,0	0,2	0,6	0,2	0,2	0,5	0,2	0,0	

* Indica o nível de significância $P < 0,001$, após correção de Bonferroni. Inf = infinito. Cor = Coroadó; Pra = Praça 14 de Janeiro; Com = Compensa; TaN = Tancredo Neves; Coa = Coari; Stm = Santarém; Blm = Belém; BoV = Boa Vista; Pac = Pacaraima; RBr = Rio Branco.

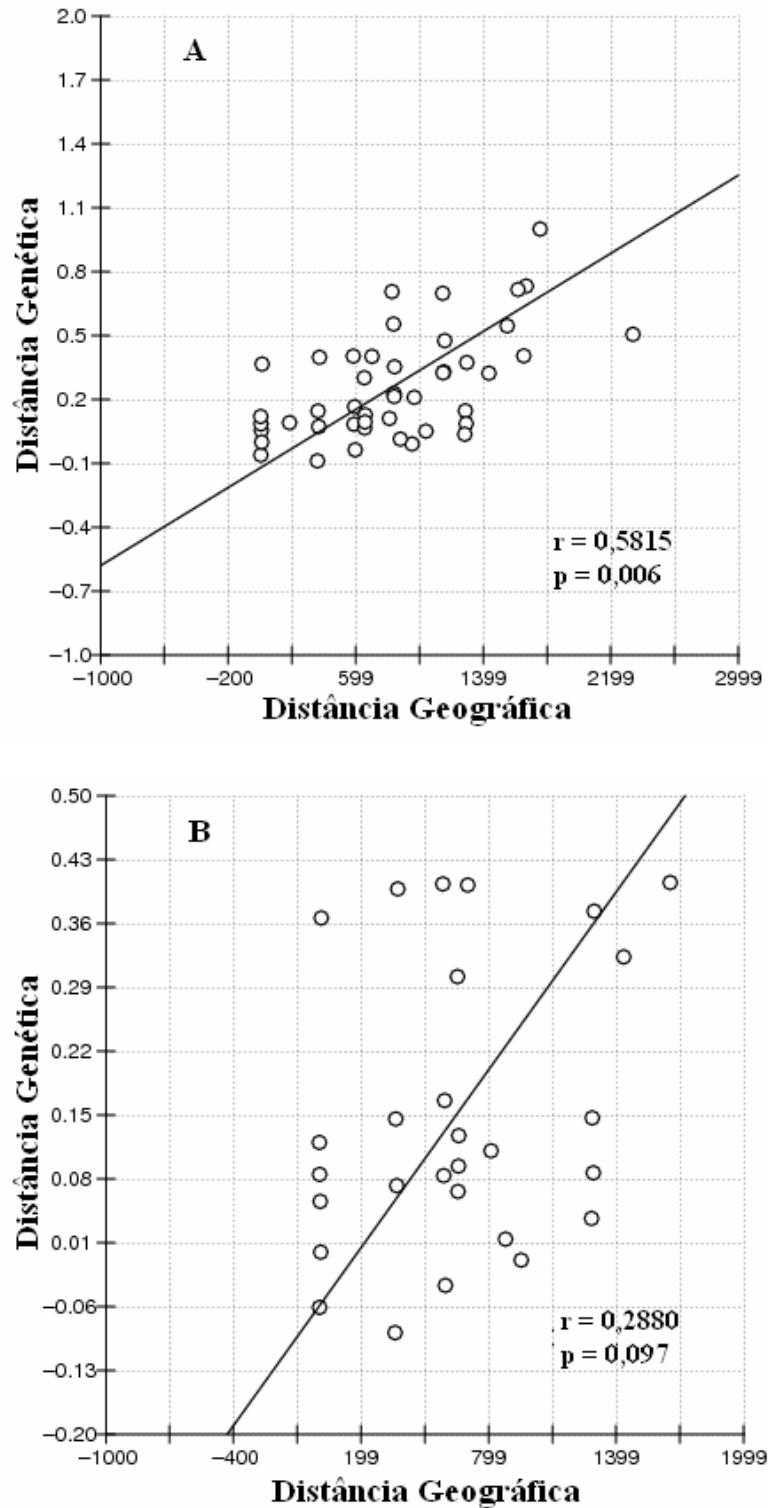


Figura 10. Resultado da regressão de Mantel entre as populações de *Ae. aegypti* baseado nos valores par-a-par de F_{ST} . **A:** Gráfico de regressão com todas as 10 populações; **B:** Gráfico de regressão sem as populações de Pacaraima e Rio Branco.

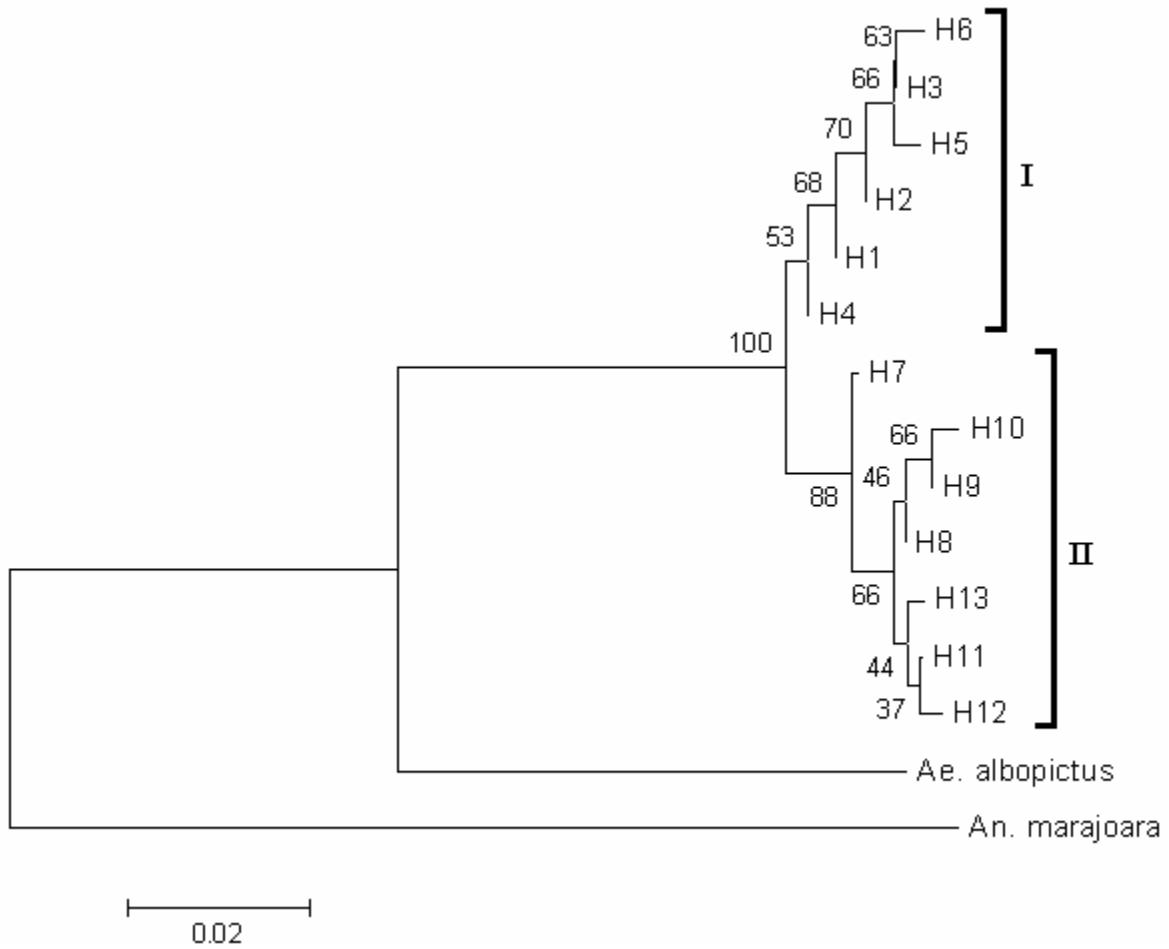


Figura 11. Dendrograma observado entre os 13 haplótipos de *Aedes aegypti*. Utilizou-se o método de Neighbor-Joining, seguindo o modelo de distância genética de Tamura-Nei. Os valores de bootstrap encontram-se nos ramos.

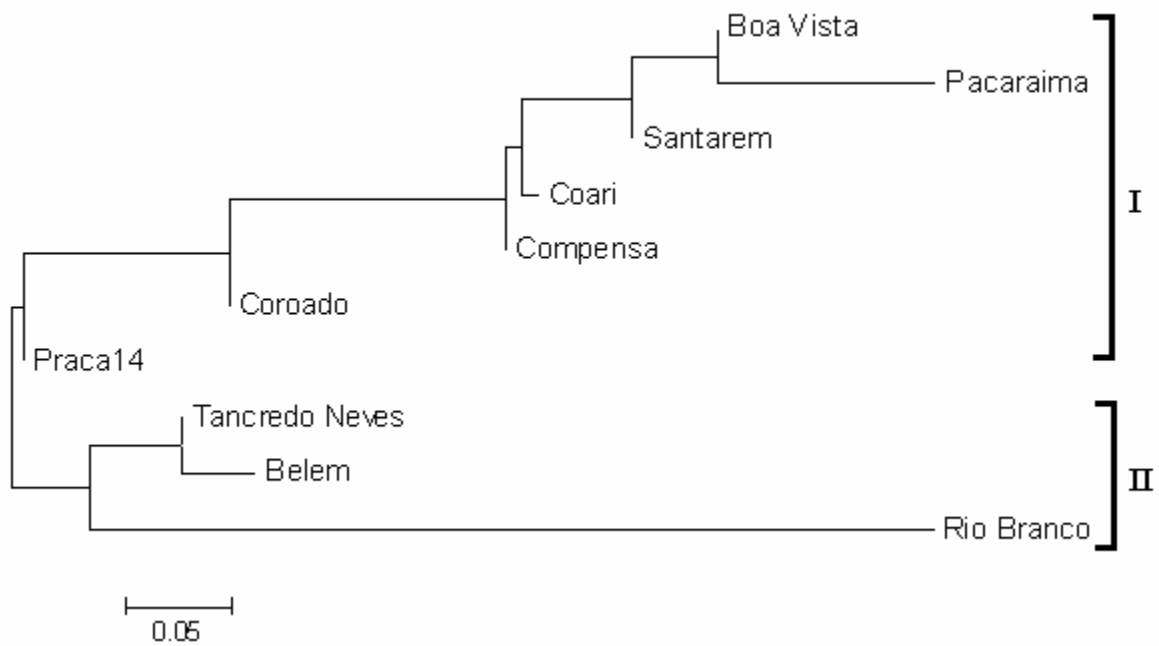


Figura 12. Dendrograma baseado nos valores par-a-par de F_{ST} das dez amostras de *Aedes aegypti*. Método: Neighbor-Joining.

5. Discussão

5.1 Frequência e distribuição dos haplótipos

Dentre os estudos publicados até o momento na América do Sul com o gene ND4 em populações de *Ae. aegypti*, o presente estudo foi o que encontrou o maior número de haplótipos (13). Desses haplótipos, 9 foram considerados únicos (*singletons*), distribuídos entre cinco das dez populações analisadas. As populações de Pacaraima e Rio Branco não revelaram polimorfismo genético, sendo monomórficas para os haplótipos H1 e H6, respectivamente.

O haplótipo H1, apesar de ser o mais freqüente (47,15%), não foi encontrado em todas as populações analisadas. Este háplotipo foi ausente nas cidades de Belém, Rio Branco e no bairro do Tancredo Neves, em Manaus. Por outro lado, as cidades com maior freqüência para o H1 foram Pacaraima (100%) e Boa Vista (83%), sugerindo que, provavelmente, este haplótipo originou ou foi introduzido no Estado de Roraima e, a partir daí, se espalhou para outras localidades da Amazônia brasileira. Esse haplótipo foi encontrado também em Piura, no Peru, por Costa-da-Silva *et al.* (2005), sendo denominado de H3 (Figura A dos anexos). Se o H1 foi introduzido na Amazônia brasileira, provavelmente esse haplótipo seja procedente da Venezuela. No entanto, os sete haplótipos encontrados por Herrera *et al.* (2006), oriundos de 24 localidades da Venezuela, ainda não foram depositados no *GenBank*, tornando difícil uma conclusão a respeito da origem do H1.

O haplótipo H6 foi o segundo mais freqüente (32,52%) entre as populações analisadas, sendo ausente apenas nas populações de Pacaraima e Boa Vista. Este haplótipo foi encontrado também em três estudos de populações de *Ae. aegypti* do Brasil e nas América do Sul, cujos dados ainda não foram publicados, mas com seqüências depositadas no *GenBank*. Após comparações, ficou constatado que o H6 do presente estudo está presente nesses três trabalhos que ainda não foram publicados na literatura. Desse modo, suspeita-se fortemente que o H6 seja amplamente disperso no Brasil, incluindo a Amazônia. No entanto, esse haplótipo não foi encontrado nas populações do México (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2002) e do

Peru (Costa-da-Silva et al. 2005), conforme mostra a Figura A dos anexos, impossibilitando propor uma hipótese sobre a sua origem.

O haplótipo H11, o terceiro mais freqüente, foi encontrado na cidade de Boa Vista e nos bairros do Coroadó, Praça 14 de Janeiro e Tancredo Neves, em Manaus. Esse haplótipo foi encontrado em populações do México, sendo denominado de H6 por Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2002), bem como também foi encontrado nos três estudos, com dados não publicados, citados acima. Desse modo, é possível que o haplótipo H11 tenha sido introduzido no Brasil vindo da América Central, sendo que sua introdução pode ter ocorrido pela Amazônia, provavelmente pelo Estado de Roraima. Entretanto, essa hipótese pode ser reforçada ampliando os estudos nos países das Américas do Sul e Central.

5.2 Variabilidade genética das populações

Os valores médios de diversidade genética encontrados no presente estudo foram relativamente altos ($h = 0,676$; $\pi = 0,0113$), quando comparado com outras espécies de mosquitos, como em *Anopheles trinkae* ($h = 0,599$; $\pi = 0,0076$) (Conn *et al.*, 1997), *Anopheles albimanus* ($\pi = 0,0045-0,0051$) (De Mérida *et al.*, 1999) e *Anopheles nuneztovari* ($h = 0,564$; $\pi = 0,0063$) (Scarpassa *et al.* 2000). Dos estudos publicados com *Ae. aegypti* que usaram o gene ND4, apenas a diversidade nucleotídica foi calculada. Costa-da-Silva *et al.* (2005) estudando três populações do Peru e Bosio *et al.* (2005), analisando 19 populações da Tailândia, estimaram um valor idêntico de π , porém inferior ao do presente estudo ($\pi = 0,0079$). Por outro lado, valores maiores de diversidade nucleotídica foram encontrados em populações do México (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000) ($\pi = 0,0143$) e em populações da Venezuela (Herrera *et al.*, 2006) ($\pi = 0,0187$).

Comparando cada população do presente estudo, a cidade de Belém foi a que apresentou a maior diversidade genética, seguida dos bairros Coroadó, Praça 14 de Janeiro e Tancredo Neves, em Manaus. Esta elevada diversidade observada em Belém pode ser explicada devido se tratar de uma cidade na Amazônia com grande densidade demográfica, possuindo um enorme fluxo de pessoas devido ao fácil acesso via fluvial, pelo Rio Amazonas e, via marítima, pelo Oceano Atlântico e com o restante do país, por

meio de rodovias. Do mesmo modo, a alta diversidade genética observada em Manaus pode ser explicada devido à grande densidade demográfica. Além de ser uma cidade turística, Manaus possui um grande porto fluvial e um dos maiores pólos industriais do país, o que fazem aumentar o fluxo de pessoas e mercadorias nesta região, facilitando, portanto, a dispersão das populações de *Ae. aegypti*. As características dessas duas cidades podem estar favorecendo o aumento do fluxo gênico entre as populações de *Ae. aegypti*, tendo implicações no aumento do tamanho efetivo de população, apesar das constantes aplicações de inseticidas utilizados no combate ao vetor. Além disso, a presença de haplótipos altamente divergentes dentro das localidades dos bairros do Coroadó, Tancredo Neves, Praça 14 de Janeiro, em Manaus, e da cidade de Belém, conforme mostram os valores de **K** da tabela 4, pode estar contribuindo para elevar o valor médio da diversidade nucleotídica.

Contrariamente, os valores baixos de diversidade genética obtidos para as populações de Santarém e Boa Vista, sugerem um declínio populacional, indicando que estas populações de *Ae. aegypti* podem ter sofrido um *bottleneck* (“efeito gargalo de garrafa”) recente.

Os resultados do teste de neutralidade, *D* de Tajima (Tajima, 1989) não foram significantes ($P > 0,05$) para todas as populações, sugerindo que o polimorfismo detectado está de acordo com o modelo neutro. O teste *F_s* de Fu (Fu, 1997), que é o mais promissor na detecção de crescimento populacional, também não revelou valores significativos, indicando que as populações de *Ae. aegypti* dessas localidades não se encontram em expansão, apesar da presença de haplótipos únicos (raros). No Peru, Costa-da-Silva *et al.* (2005) também não encontraram valores significativos para o teste *D* de Tajima.

5.3 Análise da variância molecular (AMOVA) e estimativas de fluxo gênico

Os resultados da primeira análise de variância molecular (AMOVA), em que todas as populações fizeram parte de um único grupo (Tabela 5), indicam que a maioria da variação ocorreu dentro das populações (72,69 %). Esta variação está relacionada, principalmente, ao alto número médio de diferenças nucleotídicas (**K**) encontradas nas populações de *Ae. aegypti* de Belém e dos bairros do Coroadó, da Praça 14 de Janeiro

e do Tancredo Neves, em Manaus. Por outro lado, a variação entre as populações foi de 27,31%, com valores significantes ($F_{ST} = 0,273$; $P = < 10^{-5}$). Esta significativa variação está relacionada à alta diferenciação genética encontrada nas comparações que envolveram as populações de Pacaraima e Rio Branco, pois a maioria dos valores obtidos na comparação par-a-par de F_{ST} , que envolveram estas populações, foram significantes, revelando estruturação genética.

Semelhante à primeira análise, a segunda AMOVA (Tabela 6) mostrou que a maior porcentagem da variação genética ocorreu dentro das populações (70,66%; $F_{ST} = 0,293$; $P < 10^{-5}$). Entre as populações dentro dos grupos, a variação foi de 18,87%, $F_{SC} = 0,210$; $P < 10^{-5}$ e foi decorrente, principalmente, da diferenciação genética observada entre as populações de Belém e Santarém (Grupo do Pará), que apresentaram um valor significativo na comparação par-a-par de F_{ST} .

Os resultados dessas análises sugerem que as populações de *Ae. aegypti* da Amazônia estão geneticamente mais estruturadas quando comparadas àquelas da Venezuela (11,58% de variação nas populações dentro dos grupos; $F_{SC} = 0,130$; $P < 10^{-5}$) (Herrera *et al.*, 2006), sugerindo que as populações da Amazônia brasileira apresentam um fluxo gênico mais restrito. No entanto, as três populações do Peru (Costa-da-Silva *et al.*, 2005) mostraram-se fortemente estruturadas com somente 10,07% de variação dentro das populações e 89,93% entre as populações dentro dos grupos.

A correlação entre a distância genética e distância geográfica foi significativa quando todas as populações foram incluídas. No entanto, quando foram excluídas as populações mais divergentes, Rio Branco e Pacaraima, não houve correlação significativa entre distâncias genética e geográfica, indicando que o fluxo gênico independe da distância geográfica.

As estimativas de fluxo gênico reveladas pelos valores de Nm (número de migrantes por geração) estão diretamente relacionadas à presença dos haplótipos H1 e H6, os mais freqüentes neste estudo. Um grande exemplo disso envolveu as populações de Santarém e Boa Vista que, apesar da grande distância geográfica, apresentaram um intenso fluxo gênico entre si ($Nm = 35,12$), relacionado principalmente à alta freqüência do H1 nas duas populações. Já o intenso fluxo gênico

($Nm = 13,16$) entre as populações de Belém e do bairro do Tancredo Neves, em Manaus, esteve diretamente relacionado à presença do H6.

A grande estruturação genética encontrada em Rio Branco ($Nm = 0,0-1,0$) corrobora a hipótese de isolamento geográfico em relação às demais populações analisadas devido, principalmente, às péssimas condições da rodovia BR-364, no trecho que liga o Estado do Acre ao Estado de Rondônia, e da rodovia BR-319 que liga o Estado de Rondônia com o Estado do Amazonas. Este isolamento resultou no reduzido ou ausente fluxo gênico observado entre esta cidade e as demais populações analisadas. Além disso, a ausência de variabilidade pode ter contribuído ainda mais para a diferenciação genética dessa população em relação às demais analisadas.

No entanto, a estruturação genética encontrada na população de *Ae. aegypti* de Pacaraima não está associada ao isolamento geográfico, visto que a rodovia BR-174 oferece boas condições de acesso à esta cidade. Além disso, Pacaraima situa-se exatamente na fronteira entre o Estado de Roraima e a Venezuela e apresenta um grande fluxo de pessoas. Além disso, essa cidade é parada obrigatória para turistas e outras pessoas que cruzam a fronteira e seguem para a Venezuela (vice-versa). Por esta razão, esperava-se que a população de *Ae. aegypti* de Pacaraima apresentasse um alto nível de polimorfismo genético, o que na realidade não foi observado. No entanto, tal situação só pode ser consistente com duas hipóteses: 1) a população de *Ae. aegypti* de Pacaraima poderia ter se mantido com poucos indivíduos devido a aplicação constante de inseticidas gerando repetidos eventos de *bottlenecks*; ou 2) a população de *Ae. aegypti* de Pacaraima teria sido fundada por poucos indivíduos e se mantido com um baixo tamanho efetivo de população. As duas situações resultam na redução da variabilidade genética por deriva genética (Hartl & Clark, 1997).

Os valores de fluxo gênico do presente estudo foram maiores quando comparados com outros estudos realizados em populações de *Ae. aegypti* no Brasil. Ayres *et al.* (2003), estudando populações de *Ae. aegypti* de cinco estados brasileiros, com o emprego de RAPD, encontraram altos níveis de diferenciação genética e reduzido fluxo gênico, tanto no nível macro geográfico ($Nm = 0,54$) como no nível micro geográfico ($Nm = 0,69$). Paduan *et al.* (2006) também utilizaram RAPD em populações de *Ae. aegypti* de seis estados brasileiros e encontraram altos níveis de diferenciação

genética e restrito fluxo gênico ($Nm = 0,65$), mesmo em populações procedentes do mesmo Estado. Esses resultados, somados aos do presente estudo, indicam que as populações de *Ae. aegypti* do Brasil apresentam níveis relativamente altos de variabilidade e diferenciação genética entre as populações. Essa estruturação pode estar associada à dispersão passiva, eventos de colonização e re-colonização e ao uso contínuo de inseticidas no controle do vetor *Ae. aegypti*.

A análise do dendrograma dos haplótipos encontrados na população de *Ae. aegypti* da Amazônia brasileira mostrou dois agrupamentos (Figura 11). O haplótipo H7, procedente da população de Santarém, apesar de pertencer ao grupo II, está separado do grupo I por dois passos mutacionais. Isto faz com que este haplótipo assumira uma posição intermediária entre esses dois *clusters*. Provavelmente, o grupo I seja o mais antigo por possuir os haplótipos mais frequentes (H1 e H6) e também por ter mostrado a maior consistência nos valores de *bootstrap*.

A maioria dos estudos que utilizaram o gene ND4 em populações de *Ae. aegypti* também tiveram seus dendrogramas de haplótipos dividido em dois *clusters* (Bosio *et al.*, 2005; Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000; Herrera *et al.*; 2006). Este padrão encontrado no presente estudo pode ser consistente com a presença de diferentes linhagens de *Ae. aegypti*.

O dendrograma de populações de *Ae. aegypti* também mostrou dois agrupamentos (Figura 12). Esta divisão em dois grupos está diretamente relacionada a presença dos haplótipos H1 e H6. O maior agrupamento foi formado pelo grupo I que agrupou todas as populações que apresentaram o H1. As populações de Manaus (Praça 14 de Janeiro, Coroado e Compensa), apesar de apresentar os ramos não bem definidos, foram as que mostraram menor diferenciação genética, ou seja, maior fluxo gênico entre si. Além de serem as populações que mostraram a maior frequência do H1 (Figura 7). Por outro lado, Pacaraima apresentou a maior distância genética em relação as outras localidades do grupo I, justamente por possuir a maior frequência do H1 (100%) e também por ser a população mais estruturada geneticamente. O grupo II ficou formado pelas populações que tiveram ausência do H1 e maior frequência do H6. No grupo II, Rio Branco está separado de Belém e Tancredo Neves justamente por ser a população mais estruturada e por apresentar a maior frequência do H6 (100%).

Os resultados desses dois dendrogramas, somados com a elevada diversidade genética verificada, sugerem que podem ter ocorrido pelo menos duas introduções desse mosquito na Amazônia brasileira: uma por Boa Vista, vindo do México e/ou da Venezuela; e a outra por Belém, vindo de outras regiões do país ou pelo Oceano Atlântico.

Os haplótipos únicos (*singletons*) representaram a maioria (9) entre os 13 haplótipos encontrados neste trabalho. Certamente esses haplótipos *singletons* originaram de mutações ocorridas nos haplótipos mais comuns. Essas mutações podem ter acontecido em períodos de alto crescimento populacional, após vários eventos de *bottlenecks* que ocorreram por esforços no controle do vetor (aplicação de inseticidas). Um fato interessante é que os haplótipos únicos ocorreram somente nas cidades localizadas às margens dos rios Amazonas e Negro, demonstrando que a principal rota de dispersão do mosquito *Ae. aegypti* na Amazônia é realizada por via fluvial.

Nossos dados evidenciaram que, as migrações humanas, via fluvial e terrestre, podem estar favorecendo a dispersão do vetor do dengue, *Ae. aegypti*, na Amazônia brasileira.

Os resultados apresentados neste trabalho podem ter alguma implicação no controle do dengue. Em áreas urbanas, o uso contínuo de inseticidas pode resultar em populações *bottleneck* e/ou populações fundadas com poucos indivíduos, via recolonização, os quais podem causar mudanças genéticas nas populações de *Ae. aegypti*, ocasionando diferenças na capacidade vetora. Estudos demonstram uma correlação entre estrutura genética de populações e a capacidade vetora em *Ae. aegypti* (Beerntsen, *et al.*, 2000; Faiulloux *et al.*, 2002; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004). Portanto, conhecer a estrutura genética das populações de *Ae. aegypti* em cada região da Amazônia poderá ser o primeiro passo para estudar as possíveis relações com a capacidade de transmissão do dengue por esses mosquitos, auxiliando no melhor entendimento da dinâmica de transmissão do dengue.

6. Conclusões

Com base nas análises realizadas com o gene ND4 nas 10 populações de *Ae. aegypti* da Amazônia, conclui-se que:

1. Foi encontrado um número elevado (13) de haplótipos quando comparado com outros estudos que também usaram o gene ND4 em populações de *Ae. aegypti*. Os haplótipos H1 e H6 foram os mais freqüentes e foram os que mais contribuíram para a diferenciação genética entre as populações estudadas.
2. Os valores médios de diversidade genética foram relativamente altos. Os maiores valores de diversidade genética foram observados nas populações com maior densidade demográfica: Belém e Manaus. Foi discutido que as características dessas cidades favorecem a dispersão desse mosquito, resultando em um aumento do fluxo gênico entre as populações de *Ae. aegypti*.
3. Valores baixos de diversidade genética para as populações de Santarém e Boa Vista, indicam a ocorrência de um ou mais *bottlenecks* (“efeito gargalo de garrafa”) recentes.
4. Os testes de neutralidade, D de Tajima e F_s de Fu, sugerem que as populações de *Ae. aegypti* da Amazônia brasileira não encontram-se em expansão e o polimorfismo encontrado está em equilíbrio genético, de acordo com o modelo neutro.
5. A maioria das comparações entre as 10 populações de *Ae. aegypti* mostraram valores não significantes para F_{ST} , indicando que existe um relativo fluxo gênico entre elas.

6. As populações de Pacaraima e Rio Branco foram as mais estruturadas geneticamente quando comparadas com a demais.
7. Os resultados do dendrograma de haplótipo sugerem que podem existir na Amazônia brasileira duas linhagens de haplótipos para o gene ND4.
8. Os resultados dos dois dendrogramas, somados aos valores de diversidade genética desse estudo e a comparação com outros haplótipos encontrados em estudos realizados no Brasil, América do Sul e América Central, indicam que podem ter ocorrido, pelo menos, duas introduções do *Ae. aegypti* na Amazônia brasileira: uma por Boa Vista, vindo do México e/ou da Venezuela; e a outra por Belém, vindo do restante do país ou pelo Oceano Atlântico.

5.Referências Bibliográficas

- Attardi, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *Int. Rev. Cyt.* 93: 93-145.
- Apostol, B.L.; Black IV, W.C.; Reiter, P.; Miller, B.R. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Porto Rico. *Heredity*, 76: 325-334.
- Araújo, G.C.A.; Travassos da Rosa, E.S.; Vasconcelos, H.B.; Nunes, M.R.T.; Carvalho, C.L.C.; Rodrigues, S.G.; Cruz, A.C.R.; Vasconcelos, P. 2003. Sorotipos do dengue isolados no Instituto Evandro Chagas no ano de 2002. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(supl. I): 16.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Ayres, C.F.J.; Melo-Santos, M.A.V.; Solé-Cava, A.M.; Furtado, A.F. 2003. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 40 (4) : 430-435.
- Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. 1996. *The biology of disease vectors*. University press of Colorado. Niwot, USA, 632p.
- Beebe, N.W.; Whelan, P.I.; Hurk, A.; Ritchie, S.A.; Cooper, R.D. 2005. Genetic diversity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Australia and implications for future surveillance and mainland incursion monitoring. *CDI*. 29(3): 299-303.
- Beerntsen, B.T.; James, A.; Christensen, B.M. 2000. Genetics mosquito of vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(1): 115-137.
- Birungi, J. & Munstermann, L.E. 2002. Genetics structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: Evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95(1): 125-132.
- Boore, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767-1780.
- Bosio, C.F.; Harrington, L.C.; Jones, J.W.; Sithiprasasna, R.; Norris, D.E.; Scott, T.W. 2005. Genetic Structure of *Aedes aegypti* Population in Thailand Using Mitochondrial DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72:434-442.

- Clement, M.; Posada, D. & Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9 (10): 1657-1660.
- Collins, F.H.; Mendez, M.A., Rasmussen, M.O.; Mehaffey, P.C.; Besansky, N.J.; Finnerty, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 37-41.
- Conn, J.E.; Mitchell, S.E.; Cockburn, A.F. 1997. Mitochondrial DNA variation within and between two species of neotropical anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Heredity*, 88: 98-107.
- Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Costa-da-Silva, A.L.; Capurro, M.L.; Bracco, J.E. 2005. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 100(6): 539-544.
- Costa-Ribeiro, M.C.V.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Failloux, A.B. 2006. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101(8): 917-921.
- Cunha, R.V.; Miagostovich, M.P.; Petrola, Z.; Araújo, E.S.M.; Cortez, D.; Pombo, V.; Sousa, R.V.; Nogueira, R.M.R.; Schatzmayr, H.G. 1998. Retrospective study on dengue in Fortaleza, State of Ceará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 93(2): 155-159.
- Degallier, N.; Teixeira, J.M.S.; Soares, S.S.; Pereira, R.D.; Pinto, S.C.F.; Chaib, A.J.M.; Vasconcelos, P.F.C.; Oliveira, E. 2003. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. *Revista de Saúde Pública*. Brief communications. 37(3): 386-387.
- De Merida, A.M.P.; Palmieri, M.; Yurrita, M.M.; Molina, M.; Molina E.; Black IV, W.C. 1999. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* localities. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* 61:230-239.
- Donalísio, M.R. & Glasser, C. M. 2002. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, vol.5, no.3, p.259-279.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2006. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*.
- Failloux, Ana-Bella. *Annual report of vector system for year 2002*. Disponível: <http://www.paster.fr/recherche/RAR/RAR2002/Esv-en.html>. Acesso em dez. 2005.

- Failloux, Ana-Bella; Vazeille, M.; Rodhain, F. 2002. Geographic genetic variation in population of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution*, 55: 653-663.
- Figueiredo, L.T.M. 1999. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. *Simpósio: Virologia Médica I. Medicina*, Ribeirão Preto, 32: 15-22.
- Figueiredo, R.M.P.; Bastus, M.S.; Lima, M.J.I; Almeida, T.M.C.; Alecrim, W.D. 2002. Dinâmica da sorologia e isolamento viral na epidemiologia do dengue em Manaus (1998-2001). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(supl. I): 94.
- Figueiredo, L.T.M. 2003. Dengue in Brazil: past, present and future perspective. *Dengue Bolletín*, 27: 25-33.
- Figueiredo, R.M.P.D; Thatcher, B.D; Lima, M.L.D; Almeida, T.C; Alecrim, W.D; Guerra, M.V.F. 2004. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37(6): 476-479.
- Fiocruz. 2005. *O vírus do dengue*. Especial dengue. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ccs/especiais/dengue/dengue_virus. Acesso em 2005
- Fonseca, D.M.; Campbell, S.; Crans, W.J.; Mogi, M.; Miyagi, I.; Toma, T.; Bullians, M.; Andreadis, T.G.; Berry, R.L.; Pagac, B.; Sardelis, M.R.; Wilkerson, R.C. 2001. *Aedes (Finlaya) japonicus* (Diptera: Culicidae), a newly recognized mosquito in the United States: Analyses of genetic variation in the United States and putative source populations. *J. Med. Entomol.* 38(2): 135-146.
- Forattini, O.P. 1996. *Culicidologia médica: princípios gerais, morfologia, glossário taxonômico*. Vol. 1. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 548 p.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia Médica*. Vol. 2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Fraga, E.C. Santos, J.M.M, Maia, J.F. 2003. Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Manaus – AM, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (2): 181-187.
- Franco, O. 1976. *Historia da Febre Amarela no Brasil*. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro.
- Fu, Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1447: 915-925.

- Gorrochotegui-Escalante, N.; Muñoz, M.L.; Fernandez-Salas, I.; Beaty, B.J.; Black, W.C. 2000. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 200-209.
- Gorrochotegui-Escalante, N.; Gomez-Machorro, C.; Lozano-Fuentes, S.; Fernandez-Salas, I.; Muñoz, M.L.; Farfan-Ale, J.A.; Garcia-Rejon, J.; Beaty, B.J.; Black, W.C. 2002. The breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 213-222.
- Gray, M.W. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5: 25-50.
- Gubler, D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews.* 11: 480-496.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. 1997. *Principles of population genetics.* 3 ed. Sinauer Associates. Sunderland Massachusetts 542 p.
- Halstead, S.B. 1992. XXth century dengue pandemic: Deed for surveillance and research. *World Health Statistics Quarterly.* 45: 292-298.
- Herrera, F.; Urdaneta, L.; Rivero, J.; Zoghbi, N.; Ruiz, J.; Carrasquel, G.; Martinez, J.A.; Pernaleté, M.; Villegas, P.; Montoya, A.; Rubio-Palis, Y.; Rojas, E. 2006. Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101(6): 625-633.
- Huber, K.; Loan, L.L.; Hoang, T.H.; Ravel, S.; Rodhain, F.; Failloux, A.B. 2002. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. *Molecular Ecology,* 11: 1629-1635, 2002.
- Jensen, J.L., Bohonak, A.J., and Kelley, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13.v. 3.0.3. Disponível: <http://ibdws.sdsu.edu/>. Acesso em jan. 2007.
- Kimura, M. 1968. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. *Genetical Research,* 11, 247-269.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lang, B.F.; Gray, M.W.; Burger, G. 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 33:351-97.

- Lourenço-de-Oliveira, R.; Vazeille, M.; de Filippis A.M.B.; Failloux, A.B. 2002. Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 97(3): 437-439.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Vazeille, M.; de Filippis A.M.B.; Failloux, A.B. 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98: 43-54.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27: 209-220.
- Mariano, F. 1916. A dengue: Considerações a respeito de sua incursão no Rio Grande do Sul, em 1916. *Archivos Brasileiros de Medicina*. 272-277.
- Martins, V.E.P.; Martins, M.G.; Araújo, J.M.P.; Silva, L.O.R.; Monteiro, H.A.O.; Castro, F.C.; Vasconcelos, P.F.C.; Guedes, M.I.F. 2006. Primeiro registro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Estado do Ceará, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 40(4): 737-739.
- Matioli, S. Russo. 2001. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora. 202 p.
- Mattingly, P.F. 1957. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem: Taxonomy e bionomics. Liverpool University Press. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 51(4): 391-408.
- Merrill, S.A.; Ramberg, F.B.; Hagedorn, H.H. 2005. Philogeography and population structure of *Aedes aegypti* in Arizona. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72(3): 304-310.
- MS – Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2002. *Programa Nacional de Controle do Dengue*. Brasília: Ministério da Saúde, 32 p.
- MS – Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2004. *100 anos de saúde pública: A visão da FUNASA*. Brasília: Ministério da Saúde, 232 p.
- MS – Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2005. *Dengue: Diagnóstico e manejo clínico*. Brasília. 24p.
- MS – Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2006. *Boletim da situação epidemiológica do dengue, semana epidemiológica nº 13*. Brasília. 15p.
- Mullis, K.B.; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155: 335-350.
- Nogueira, R.M.R. Miagostovich, M.P., Schatzmayr, H.G. 2002. Dengue viruses in Brazil. *Dengue Bulletin*, 26: 77-83.

- Ocampo, C.B. & Wesson, D.M. 2004. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71(4): 506-513.
- Osanai, C.H.; Rosa, A.P.A.T.; Tang, A.T.; Amaral, R.S.; Passos, A.C.; Tauil, P.L. 1983. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 25: 53-54.
- Paduan, K.S.; Araújo-Júnior, J.P.; Ribolla, P.E.M. 2006. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. *Genetics and Molecular Biology.* 29(2): 391-395.
- Paupy, C.; Vazeille-Falcoz, M.; Mousson, L.; Rodhain, F.; Failloux, Anna-Bella. 2000. *Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): Isoenzyme differentiation if the mosquito population according to human population density. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62(2): 217-224.
- Paupy, C.; Chantha, N.; Reynes, J.M.; Failloux, Anna-Bella. 2005. Factors influencing the population structure of *Aedes aegypti* from de main cities in Cambodia. *Heredity.* 95: 144-147.
- Pedro, A. 1923. O dengue em Nictheroy. *Brazil Médico*, 37: 173-177.
- Pinheiro, V.C.S. 2005. *Controle do dengue em Manaus-AM: Estudo da positividade/produtividade larvária, viabilidade de ovos e investigação por RT-PCR dos sorotipos do vírus dengue em Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).* Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 160p.
- Pinheiro, V.C.S.; Tadei, P.W.; Barros, P.M.S.S.; Vasconcelos, P.F.C.; Cruz, A.C.R. 2005. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 100(8): 833-839.
- Pontes, R.J.S.; Ruffino-Netto, A. 1994. Dengue em localidade urbano da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Rev. Saúde Pública.* 28(3): 218-227.
- Powell, J.R & Tabachnick, W.J. 1980. Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. *Science*, 208: 1385-1387.
- Ravel, S.; Herve, J.P.; Diarrassouba, S.; Kone, A.; Cuny, G. 2002. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Côte d'Ivoire: Evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouake. *Acta Trop.* 82: 39-49.
- Reinert, J.F. 1975. Mosquito generic em subgeneric abbreviations (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 7: 105-110.

- Reinert, J.F. 1982. Abbreviations for mosquito generic and subgeneric taxa established since 1975 (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 14: 124-126.
- Reinert, J.F. 1991. Additional abbreviations of mosquito subgenera: names established since 1982 (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 23: 209-210.
- Reis, T.J. 1896. A febre dengue in Curityba. *Gazeta Médica da Bahia*, 163-266.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution.* 43: 223-225.
- Rondan-Dueñas, J.; Panzetta-Dutari, G.M.; Blanco, A.; Gardenal, C.N. 2002. Restriction Fragment-Length Polymorphism of the mtDNA A + T-Rich Region as a Genetic Marker in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95 (3): 352-358.
- Rosa, A.P.A.R.R.; Vasconcelos, P.F.C.; Rosa, E.S.T.; Rodrigues, S.G.; Mondet, B.; Cruz, A.C.R.; Sousa, M.R.; Rosa, J.F.S.T. 2000. Dengue Epidemic in Belém, Pará, Brazil, 1996-97. *Emerging Infectious Diseases*, 6(3): 298-301.
- Rozas, J.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Messeguer, X.; Rozas, R. 2003. *DnaSP*, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rudnick, A. 1978. Ecology of dengue viruses. *Asia Journal of Infectious Diseases.* 2: 156-160.
- Santos, V.M.; Macoris, M.L.G.; Andrighetti, M.T.M.; Ávila, P.E.; Kirchgatter, K. 2003. Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 45(2): 99-101.
- Sardagna, A.A. 2003. *Caracterização molecular de dengue vírus sorotipo 1 autóctones ao Distrito Federal, Brasil.* Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Brasília, 107p.
- Scarpassa, V. M., and W. P. Tadei. 1990. Biologia de Anofelinos Amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Acta Amazônica.* 20: 95-117.
- Scarpassa, V.M.; Geurgas, S.; Azeredo-Espin, A.M.L.; Tadei, W.P. 2000. Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brasil and Colômbia. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1): 71-78.
- Schatzmayr, H.G. 2000. Dengue Situation in Brazil by Year 2000. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 95:179-181.

- Scott, J.A. & McClelland, G.A.H. 1975. Eletrophoretic differences between sympatric ecotypes. *Nature*, 256: 405-406.
- Serufo, J.C.; Oca, H.M.; Tavares, V.A.; Souza, A.M.; Rosa, R.V.; Jamal, M.C. 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos City, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 88(3): 503-504.
- Service, M.W. 2000. *Medical entomology for students*. 2 ed. Cambridge University Press, New York, USA, 283p.
- Snustad, D.P. & Simmons, M.J. 2001. *Fundamentos de Genética*. Guanabara Koogan, 2 ed. Rio de Janeiro.
- Sousa, G.B.; Blanco, A.; Gardenal, C.N. 2001. Genetic relationships among *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Argentina using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction markers. *J. Med. Entomol.* 38(3): 371-375.
- Spanos, L.; Koutroumbas, G.; Kotsyfakis, M.; Louis, C. 2000. The mitochondrial genome of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 9(2): 139-144.
- Szalanski, A.L.; Owens, C.B.; Lewter, J.A.; Broce, A.B. 2006. Genetic structure of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) populations from central United States based on mitochondrial ND5 sequences. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99(1): 000-000.
- Tabachnick W.J. & Powell J.R. 1978. Genetic structure of the East African domestic populations of *Aedes aegypti*. *Nature*, 272: 535-537.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Templeton, A.R.; Crandall, K.A.; Sing C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data: III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619-633.
- Templeton, A. R. 2001. Using phylogeographic analyses analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology* 10:779-791.
- Townson, H. 1969. Esterase isozymes of individual *Aedes aegypti*. *Ann. Trop. Me. Parasit.* 63(4): 413-418.
- Vasconcelos, P.F.C.; Rosa, A.P.A.T.; Pinheiro, F.P.; Rodrigues, S.G.; Rosa, E.S.T.; Cruz, A.C.R.; Rosa, J.F.S.T. 1999. *Aedes aegypti*, Dengue and Re-urbanization of Yellow Fever in Brazil and other South American Countries - Past and Present Situation and Future Perspectives. *Dengue Bulletin*, vol. 23. Disponível: <http://w3.whosea.org/EN/Section10/Section332/>. Acesso em jul. 2005.

- Wallis, G.P. & Tabachnick, W.J. 1990. Genetic analysis of rock hole and domestic *Aedes aegypti* on Caribbean island of Anguilla. *J. Am. Moq. Control Assoc.*, 6(4): 625:630.
- Wallis, G.P.; Tabachnick, W.J.; Powell, J.R. 1983. Macrogeographic genetic variation in a human commensal: *Aedes aegypti* the yellow fever mosquito. *Genetical Research*, 41: 241-258.
- WHO – World Health Organization. *Dengue/dengue haemorrhagic fever*. Disponível em: < <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/>>. Acesso em dez. 2006.
- Wright, S. 1921. Systems of mating. *Genetics* 6:111. Wright, S. 1922a. Coefficients of inbreeding and relationship. *Amer. Naturalist* 56: 330.
- Yan, G.; Chadee, D.D.; Severson, D.W. 1998. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetic Society of America*. 148: 793-800.
- Yébakima, A.; Charles, C.; Mousson, L.; Vazeille, M.; Yp-Tcha, M.M.; Failloux, A.B. 2004. Genetic heterogeneity of dengue vector *Aedes aegypti* in Martinique. *Tropical Medicine and International Health*. 9:(5) 582-587.

Anexos

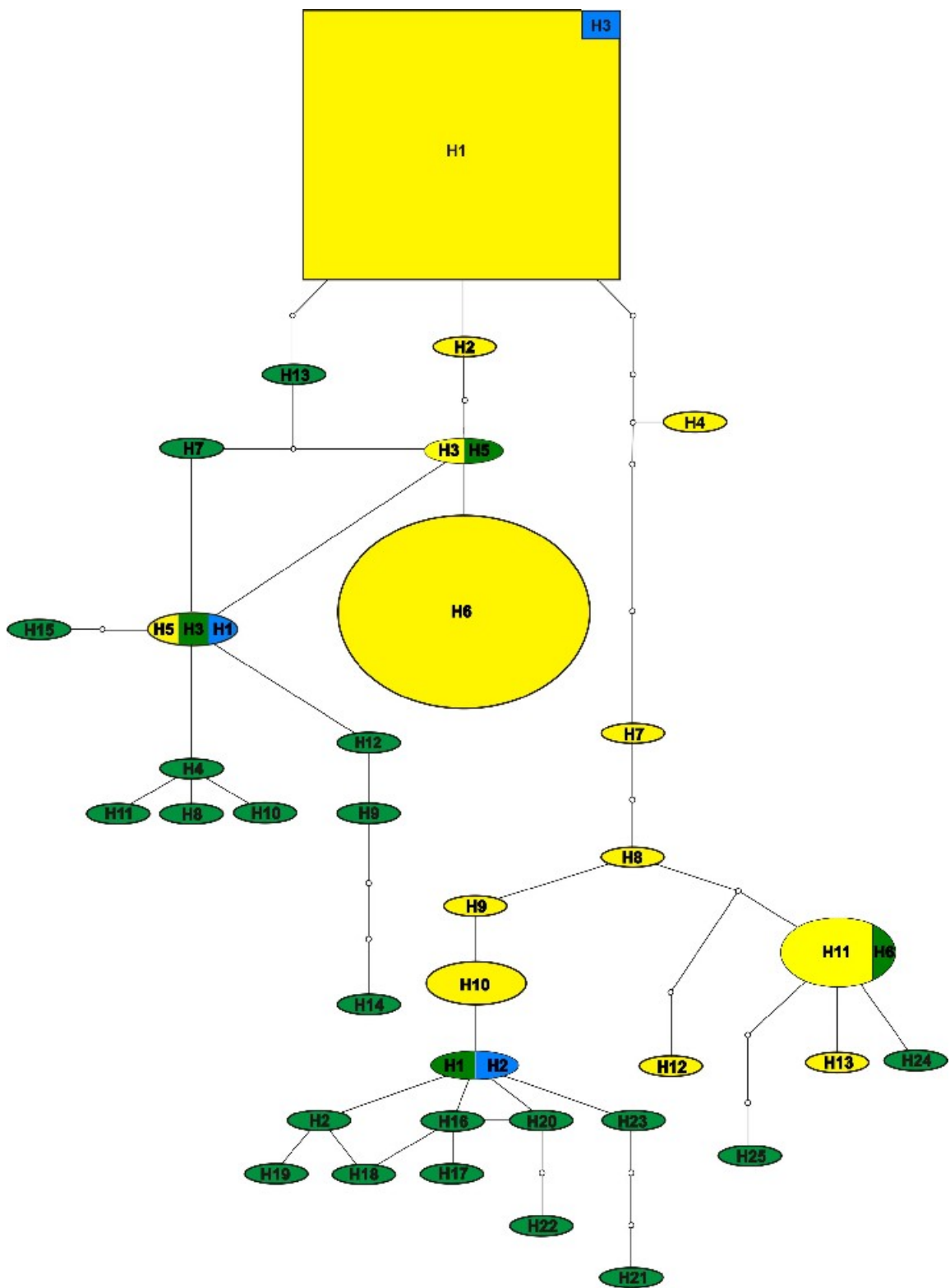


Figura A – Rede de haplótipos do gene ND4 de *Aedes aegypti* agrupando os haplótipos encontrados no presente trabalho (amarelo), no México (verde) e no Peru (azul).

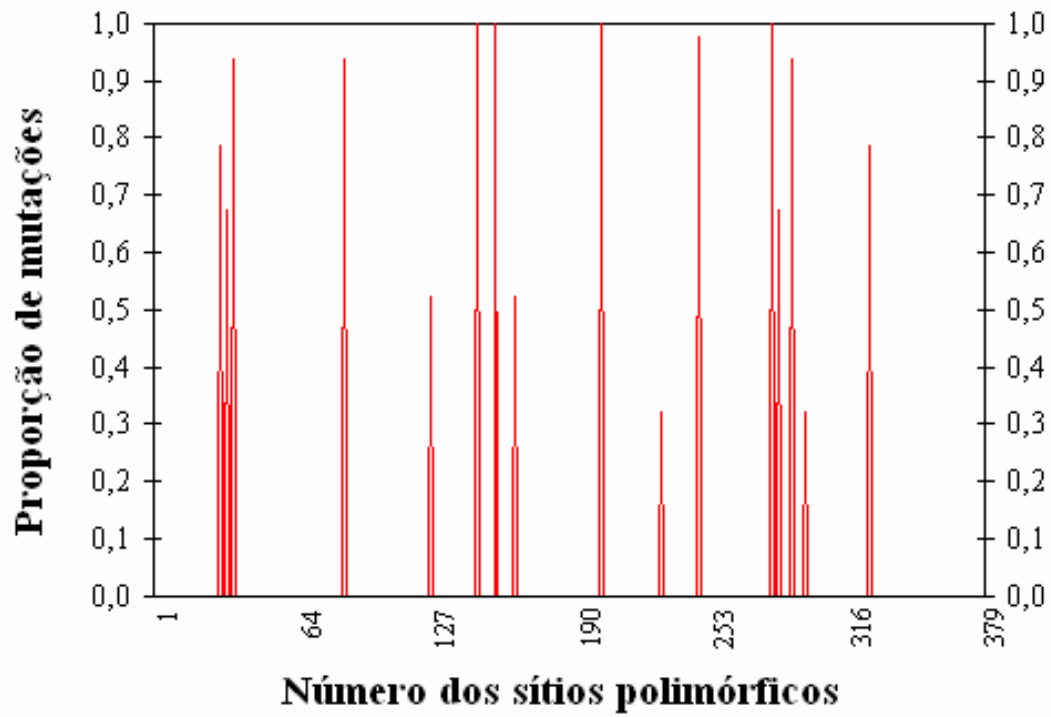


Figura B – Gráfico mostrando a proporção das mutações ao longo das seqüências nucleotídicas de *Aedes aegypti*.

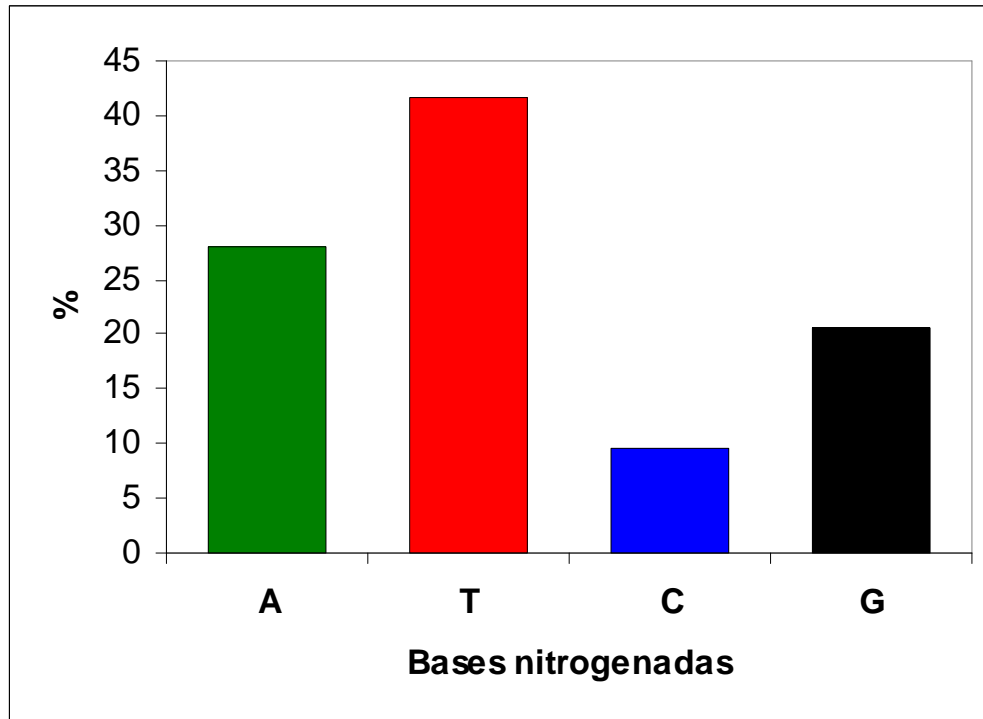


Figura B – Composição da frequência nucleotídica das 123 seqüências do gene ND4 de *Aedes aegypti*.

Tabela B – Matriz de distância reta utilizada nas análises do teste de Mantel.

Populações de <i>Aedes aegypti</i>										
	Cor	Pra	Com	TaN	Coa	Stm	Blm	BoV	Pac	RBr
Cor										
Pra	5,10									
Com	8,3	4,28								
TaN	5,4	10,5	13,01							
Coa	368,14	363,54	360,12	373,02						
Stm	589,11	593,23	597,06	584,81	953,52					
Blm	1287,77	1292,59	1296,79	1284,18	1654,15	701,97				
BoV	656,11	659,63	658,21	653,59	811,58	879,82	1435,48			
Pac	840,53	843,41	841,42	837,42	967,37	1040,45	1550,03	185,11		
RBr	1152,86	1147,76	1145,71	1158,26	827,43	1669,67	2339,01	1617,94	1756,48	

Cor = Coroado; Pra = Praça 14 de Janeiro; Com = Compensa; TaN = Tancredo Neves;
 Coa = Coari; Stm = Santarém; Blm = Belém; BoV = Boa Vista; Pac = Pacaraima; RBr = Rio Branco.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.