MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DO INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

VARIAÇÃO GENÉTICA ESPACIAL E TEMPORAL DE *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM MANAUS-AM, COM O EMPREGO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

BÁRBARA ALESSANDRA ALVES MENDONÇA

Manaus, Amazonas

Agosto, 2010

BÁRBARA ALESSANDRA ALVES MENDONÇA

VARIAÇÃO GENÉTICA ESPACIAL E TEMPORAL DE *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM MANAUS-AM, COM O EMPREGO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Orientadora: Profa. Dra. VERA MARGARETE SCARPASSA

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas

Agosto, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

M539 Mendonça, Bárbara Alessandra Alves
Variabilidade genética espacial e temporal de *Aedes* (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) em Manaus-AM, com o emprego de marcadores microssatélites / Bárbara Alessandra Alves Mendonça.--- Manaus : [s.n.], 2011.
xiii, 62 f. : il. color.

Dissertação (mestrado)-- INPA, Manaus, 2011
Orientador : Vera Margarete Scarpassa
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Aedes aegypti. 2. Estrutura microgeográfica. 3. Sazonalidade. 4. 4. Genética populacional. 5. Microssatélites. I. Título. I. Título.

CDD 19. ed. 595.770415

SINOPSE

Sinopse:

Estudou-se a variabilidade genética do *Aedes aegypti*, sob enfoque espacial e temporal em quatro localidades da cidade de Manaus-AM. As populações foram amostradas em dois momentos distintos: na estação chuvosa e na estação seca, em quatro pontos de Manaus (um na Zona Norte, dois na Zona Leste e um na Zona Sul) e cada amostragem sazonal analisada separadamente. Os resultados foram comparados e os padrões de estruturação entre as estações foram descritos.

Palavras-chave: Estrutura microgeográfica, Sazonalidade, Genética de populações.

“Dedico esta conquista aos meus pais, irmãos, sobrinhos, demais familiares, amigos e aos meus anjos da guarda, por acreditarem em mim e por me darem força, quando muitas vezes, senti-me fraca e impotente diante dos obstáculos, que sempre surpreendem ao longo desta grande caminhada, chamada vida”

AGRADECIMENTOS

A Deus, essência que me deu força em muitos momentos na vida e sempre andará junto a mim, direcionando minhas atitudes, em prol do meu melhor e de todos aqueles a que ele recorre.

Aos meus pais, Luiz Alberto e Gelda, pelo incentivo, pelas palavras de carinho e apoio, em todos os momentos de minha vida, porque nós, eu e meus irmãos, "*somos o caso deles e sustentamos as suas vidas*".

Aos meus dez irmãos, Joana, Gicelda, Luiz, Denise, Adriana, Patrícia, Andréa, Wilson, João e Francisco, que juntos, formamos o famoso time de futebol de Seu Luiz e Dona Gelda. Muito obrigada, meus irmãos, pelas atitudes de carinho, palavras de perseverança e pela receptividade, quando chegava à nossa casa, para "descansar" das atividades do mestrado.

À minha querida trupe de 16 sobrinhos e aos três sobrinhos-netos, por tornarem minha vida mais alegre, divertida e descontraída.

Aos meus afilhados Letícia e Thomas, pelo presente de ser madrinha destes dois anjos, que dão um sentido especial à minha vida.

À minha orientadora, Dra. Vera Margarete Scarpassa, por ter aceitado me orientar, mesmo sabendo que eu não possuía experiência alguma em biologia molecular e por ter me mostrado que a superação é sempre possível.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pela oportunidade que me foi dada de realizar mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida.

À Coordenação de Pesquisas em Entomologia (CPEN), por disponibilizar transporte para a coleta e para resolver outras questões pertinentes ao mestrado.

Ao programa de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, ao antigo e atual Conselho, aos professores do programa e às secretarias Alessandra, Elci e Tamara, pela ajuda nas questões acadêmicas e burocráticas referentes ao mestrado.

Ao Laboratório Temático de Biologia Molecular, pelo suporte laboratorial e a Jaqueline, Kyara e Gisele pelo auxílio para o manuseio dos aparelhos lá disponibilizados e também pelos esclarecimentos prestados.

À FUNASA e às Secretarias de Saúde Estaduais do Estado do Amazonas, pelo auxílio durante as coletas realizadas nos bairros de Manaus.

À Dra. Anete Pereira e à Dra. Miriam Rafael, por terem colaborado com minha ida à Universidade de Campinas, através do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD), para concretizar uma etapa importante da metodologia do meu mestrado.

À Adna Sousa, por não só ter me ensinado a técnica de genotipagem em gel de poliacrilamida, mas, principalmente, pela solicitude, além do necessário, durante minha permanência em Campinas.

À Tatiana de Campos, pequena notável, pelas consultorias genéticas e pelos valiosos conselhos.

Aos amigos da turma de mestrado da genética de 2008 (Alexandre, Daniela, Deyla, Edvaldo, Edson, Gabriela, Graciela, Joel, Mariana, Mauro e Melina), pela amizade, paciência e palavras de estímulo.

Às turmas de mestrado de 2007, 2009, 2010 e demais alunos, por colaborarem no reconhecimento do Programa de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva como renomado, entre os programas de pós-graduação oferecidos pelo INPA.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Populações e Evolução de Vetores de Malária e Dengue, Alex, Joel, Ledayane, Tatiana e Ronildo, pela colaboração e amizade. Em especial, a Jéssica e a Simone, pela grande ajuda na parte laboratorial, que tornou possível concretizar minhas análises. Muito obrigada, minhas grandes colaboradoras!

Aos meus amigos da República dos Coiotes, Carlos Faresin, Everton, Galileu, Manoel, Marcelo, Marco Antônio, Rafael Angrizani, Rafael Trindade e Rodrigo, pela amizade firmada, que foi de grande valia para minha adaptação inicial em Manaus.

Às amigas Deyla Paula e Fabíola Rodrigues, pelo auxílio nos programas utilizados em minhas análises e pelas palavras de estímulo.

Aos amigos Edson e Mauro, pela amizade, carinho e principalmente, por ter ajudado a me tornar alguém mais autoconfiante.

Ao meu maninho Joel Cordeiro, pela amizade, companheirismo e auxílio nas questões do laboratório.

Às minhas amigas-irmãs, Leila e Mariana, pessoas especiais, que sempre estiveram junto a mim, estimulando-me e tentando me mostrar, que sou capaz de superar obstáculos, de transpor barreiras, mesmo que outros tentem me mostrar o contrário. Meninas lindas, muito obrigadas por tudo, sem vocês, não teria chegado até o final e há muito, já teria desistido.

Aos demais amigos de Manaus, os quais não foram anteriormente citados, pela amizade, carinho e troca de idéias.

Aos meus amigos de Aracaju, por não deixar a nossa amizade sucumbir à distância, em especial ao meu amigo-irmão, Jandson Marques, figura única, sempre ao meu lado nos grandes momentos de minha vida acadêmica e pela força no final do mestrado. Muito obrigada, meu grande amigo!

Enfim, a todos que torceram e acreditaram em mim, muito obrigada!

“Ensinar exige respeito à
autonomia do ser do educando.”

Paulo Freire

“Nunca pare de sonhar

Ontem um menino que brincava me falou
Hoje é a semente do amanhã
Para não ter medo que este tempo vai passar
Não se desespere, nem pare de sonhar
Nunca se entregue, nasça sempre com as manhãs
Deixe a luz do sol brilhar no céu do seu olhar
Fé na vida, fé no homem, fé no que virá
Nós podemos tudo, nós podemos mais
Vamos lá fazer o que será”

Gonzaguinha

RESUMO

O *Aedes aegypti* é o principal vetor da dengue. Arbovirose mais importante, na atualidade, por atingir populações humanas em áreas tropicais e subtropicais do globo, associada a elevadas taxas de morbi-mortalidade. Sem haver, até o momento, vacina disponível e tratamento específico aos pacientes, que contraem um dos seus sorotipos virais (DENV-1, DENV- 2, DENV-3 ou DENV-4). Desta forma, a ferramenta profilática mais eficaz para a redução dos índices de transmissão é a utilização de medidas integradas de controle do seu vetor. Assim, foi realizado um estudo genético-temporal, para melhor compreender sua dinâmica populacional, que está relacionada a fatores ambientais. Neste estudo, foram analisadas populações deste mosquito de quatro localidades de Manaus-AM (Jorge Teixeira e Coroado – Zona Leste, Cachoerinha, Centro e Praça 14 de Janeiro – Zona Sul e Cidade Nova – Zona Norte), amostradas nos períodos chuvoso e seco. No primeiro, foram obtidos 165 indivíduos e no segundo, 156 espécimes. Após o processamento dos espécimes (criação em insetário, identificação e congelamento em freezer - 80ºC), foram realizadas as extrações e as amplificações de seus DNA, utilizando-se nove locos microssatélites dinucleotídeos. Os alelos de cada loco foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6%, corado com nitrato de prata e os dados analisados em programas estatísticos específicos. Nas duas estações, a heterozigosidase esperada (H_E) média foi maior na Zona Leste e variou de 0,555 a 0,613 no Coroado (período chuvoso) e 0,530 a 0,594 no Jorge Teixeira (período seco). Os valores de F_{ST} e análise hierárquica (AMOVA) evidenciaram baixa estrutura genética entre as amostras da estação chuvosa. Contudo, houve baixa e significante estrutura entre algumas amostras da estação seca. Estes resultados foram suportados pelos menores valores do tamanho efetivo de população (*N*e) na estação seca, segundo o modelo do desequilíbrio de ligação. A análise Bayesiana do programa *Structure* indicou um grupo para as quatro localidades das duas estações (K=1). O teste de Mantel não evidenciou isolamento por distância entre as localidades em ambas as estações. A existência de maior estruturação na estação seca pode ter sido decorrente da redução dos criadouros disponíveis para as oviposições, com subsequente redução da densidade populacional do *Ae. aegypti* e, por conseguinte, do tamanho efetivo populacional, com perda de variabilidade genética e formação da estrutura genética mais evidente durante a estação seca.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the vector of dengue. Most important arbovirus in the news, reaching the human populations in tropical and subtropical areas of the globe, coupled with high rates of morbidity and mortality. To date, no vaccine is available and no effective treatment to patients who get one of their serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 or DENV-4). Thus, the most effective prophylactic tool for reducing the transmission rates is the use of integrated control of its vector. Thus, we performed a genetic study time, to better understand their population dynamics, which is related to environmental factors. Thus, populations of this mosquito were analyzed from four locations in Manaus-AM (Jorge Teixeira and Coroado - East Zone, Cachoerinha, Centro and Praça 14 de Janeiro - South and Cidade Nova - North Zone), collected during the rainy and dry seasons. At first, 165 individuals were obtained in the second, 156 individuals. After processing the specimens (establishment in insectary, identification and freezing in a freezer at -80°C), were performed extractions and amplifications of their DNA, using dinucleotide microsatellite loci. His alleles were visualized on polyacrylamide gel 6%, stained with silver nitrate and analyzed data on specific statistical programs. In both seasons, the heterozigosidase expected (H_E) average was higher in eastern zone and ranged from 0.555 to 0.613 in Coroado Crown (rainy season) and from 0.530 to 0.594 in Jorge Teixeira (dry season). The F_{ST} values and hierarchical analysis (AMOVA) showed low genetic structure among samples of the rainy season. However, there was low and significant structure among some samples of the dry season. These results were supported by low values of effective population size (*N*e) in the dry season, following the model of linkage disequilibrium. The Bayesian analysis of the program *Structure* showed the existence of a reverse split in the four locations and at both stations (K = 1). The Mantel test showed no isolation by distance between locations in both seasons. The presence of a significant structure in the dry season may have been due to the reduction of breeding sites available for oviposition, with subsequent reduction in population densities of *Ae. aegypti* and therefore the effective population size, with loss of genetic variability and genetic structure formation more evident during the dry season.

SUMÁRIO

1. Introdução 1
1.1 Considerações Iniciais sobre *Aedes aegypti* 1
1.2 Aspectos Biológicos e Ecológicos de *Aedes aegypti* 2
1.3 Dengue: Conceito, Histórico e Distribuição 4
1.4 Quadro Atual de Dengue no Brasil 6
1.5 Dengue: Considerações Epidemiológicas 7
1.6 Microssatélites 7
1.7 Estudos Genéticos 9
2. Justificativa 13
3. Hipóteses 14
4. Objetivo geral 15
4.1 Objetivos Específicos 15
5. Material e métodos 16
5.1 Local de Coleta e Preparo dos Espécimes 16
5.2 Extração do DNA 20
5.3 Semiquantificação do DNA Extraído 21
5.4 Escolha dos Locos 21
5.5 Amplificação das Amostras 23
5.6 Análises das Amostras em Gel de Poliacrilamida 6% 24
5.7 Análises Estatísticas 25
6. Resultados 27
6.1 Variabilidade Genética 27
6.2 Testes para o Desequilíbrio de Ligação 31
6.3 Estrutura Genética e Isolamento por Distância (IBD) 31
6.4 Tamanho Efetivo de População (N_e) e Análise de Gargalo Populacional 34
7. Discussão 38
7.1 Análise de Variabilidade Genética 38
7.2 Comparação da Estrutura Genética de Populações 42
8. Conclusões 47
9. Referências 48
10. Anexos 58
Figura A. Interpretação da genotipagem em gel de poliacrilamida 6% e corado com nitrato de prata de nove indivíduos da Cidade Nova, estação seca, loco *AG5* 59

Figura B. Genotipagem dos indivíduos da localidade Praça 14 de janeiro – estação chuvosa – loco *AG2* 59
Figura C. Genotipagem dos indivíduos da localidade Jorge Teixeira – estação chuvosa – loco AG7.....59
Figura D. Genotipagem dos indivíduos da localidade Coroado – estação seca – loco *AG5* 60
Figura E. Genotipagem dos indivíduos da localidade Praça 14 de Janeiro – estação seca– loco *AT1*.....60
Figura F. Genotipagem dos indivíduos da localidade Cidade Nova – estação seca– loco *AG4*.....60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Locais de coleta de *Aedes aegypti* nos quatro bairros de Manaus-AM. 16
Figura 2. Índices pluviométricos observados na cidade de Manaus durante o ano de 2009. 17
Figura 3. Temperaturas máxima, média e mínima obtidas para Manaus em fevereiro de 2009. 18
Figura 4. Temperaturas máxima, média e mínima obtidas para Manaus em outubro de 2009. 18
Figura 5. Umidade relativa do ar obtida para Manaus em fevereiro de 2009. 19
Figura 6. Umidade relativa do ar obtida para Manaus em outubro de 2009. 19
Figura 7. Produtos de PCR do loco AG7 de *Ae. aegypti* analisados em gel de agarose a 2%. 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Locais de coleta de *Aedes aegypti* em Manaus - AM 17
Tabela 2. Locos microssatélites de *Ae. aegypti* escolhidos. 22
Tabela 3. Ciclos de amplicação para os locos analisados neste estudo, de acordo com os trabalhos de (1) Slotman *et al.* (2007) e (2) Chambers *et al.* (2007).....22
Tabela 4. Estimativas da variabilidade genética das quatro amostras de *Aedes aegypti* coletadas na cidade de Manaus, durante a estação chuvosa. 29
Tabela 5. Estimativas da variabilidade genética das quatro amostras de *Aedes aegypti* coletadas na cidade de Manaus, durante a estação seca. 30
Tabela 6. Estimativas de diferenciação ($F_{ST,}$ abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm*, acima da diagonal) par-a-par entre as quatro amostras de *Aedes aegypti* coletadas em Manaus durante a estação chuvosa.....31
Tabela 7. Estimativas de diferenciação ($F_{ST,}$ abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm*, acima da diagonal) par-a-par entre as quatro amostras de *Aedes aegypti* coletadas em Manaus durante a estação seca. 32
Tabela 8. Análise da variância molecular (AMOVA), considerando os dois grupos, chuvosa e seca, de *Aedes aegypti*.....33
Tabela 9. Valores de F_{ST} obtidos entre as estações chuvosa e seca das quatro amostras de *Aedes aegypti* de Manaus. 33
Tabela 10. Tamanho efetivo de populações (*N*e) das amostras analisadas nas estações chuvosa e seca de *Aedes aegypti,* com base nos modelos de desequilíbrio de ligação (LD) e excesso de heterozigotos (HE). 35
Tabela 11. Testes de heterozigosidade analisados para os três modelos mutacionais das amostras de *Aedes aegypti* 37

1. Introdução

1.1 Considerações Iniciais sobre *Aedes aegypti*

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) é considerado um importante vetor da dengue e da febre amarela em áreas urbanizadas. Além disso, o mosquito pode transmitir outras arboviroses ao homem e a outros animais (Forattini, 2002). Recentemente, esta espécie foi descrita como vetor principal do vírus *Chikungunya*, causador da febre *Chikungunya*, em epidemias no Quênia, Ilhas Comoro e Índia, entre 2005 e 2006 (Yergolkar *et al.,* 2006; Charrel *et al.*, 2007). Entretanto, na atualidade, a dengue é a mais importante doença causada por um arbovírus que afeta os seres humanos. Suas epidemias têm causado elevada taxa de morbi-mortalidade em diferentes regiões do mundo, ocasionando considerável impacto em Saúde Pública (Figueredo *et al.*, 2004). São registrados a cada ano 100 milhões de novos casos de dengue (Huber *et al.*, 2001). Até o momento, nenhuma vacina efetiva está disponível contra esta doença e a ferramenta mais importante para a sua prevenção é o uso de medidas de controle integrado do mosquito vetor (Tauil, 2001; Donalísio e Glasser, 2002).

Aedes aegypti (*aedes*, do grego, odioso e *aegypti*, do latim, do Egito) é oriunda do Velho Mundo, provavelmente da Etiópia e foi inicialmente descrita no Egito. Esta espécie foi introduzida da África, seu provável local de origem, para o Novo Mundo do século XV ao XIX, através do intenso tráfego marítimo realizado entre estes continentes. Na Ásia, a introdução deste vetor ocorreu devido ao desenvolvimento da indústria e da navegação (MacDonald, 1956; Smith, 1956; Forattini, 2002). *Ae. aegypti* [1] está distribuída nas regiões Tropicais e Subtropicais do mundo entre os paralelos de 45º de latitude Norte e 40º de latitude Sul, sendo raramente encontrada além destes limites e, quando encontrada, não tende a formar populações estáveis. Esta distribuição, próxima ao cosmopolitismo, resulta em parte da atividade humana e da facilidade dos meios de transportes aéreo, marítimo e terrestre, que provavelmente contribuíram para a dispersão passiva deste vetor, cuja capacidade de dispersão pelo vôo geralmente não ultrapassa 800 metros (Forattini, 2002).

---

[1] Em função da vasta literatura encontrada, Reinert (1975, 1982, 1991) propôs a abreviatura dos gêneros e subgêneros dos mosquitos, duas letras para o primeiro e três para o segundo, respectivamente.

Antes mesmo que o *Ae. aegypti* apresentasse o atual padrão de dispersão, Mattingly (1957), com base em padrões de coloração do corpo do adulto, fez a descrição de duas formas presentes no Complexo *aegypti*. Uma delas seria a típica, *Ae. aegypti aegypti*, associada ao ambiente antrópico e com alta domiciliação, sendo que os adultos apresentam aspecto pálido, ou amarronzado, e não enegrecido, ou com somente escamas claras no tergito do primeiro segmento. A segunda forma seria o *Ae. aegypti formosus,* silvestre e encontrada ao Sul do Deserto do Saara, que apresenta uma forte tonalidade enegrecida do tórax e do abdome e ausência de escamas claras. Porém, vários estudos apontam a existência destas duas subespécies somente na África (Wallis e Tabachnick, 1990; Failloux *et al.*, 2002; Sylla *et al.*, 2009). Por isto, com base nos conhecimentos atuais, cita-se apenas o nome específico de *Ae. aegypti* em estudos feitos fora do continente africano, limitando-se a citar a variedade *formosus* na parte meridional do Deserto do Saara (Forattini, 2002).

1.2 Aspectos Biológicos e Ecológicos de *Ae. aegypti*

Ae. aegypti pertence à família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia*. Os adultos se alimentam de néctar de flores e sucos de frutos e as fêmeas destes mosquitos anautógenos exercem a hematofagia, por meio do repasto sangüíneo, importante para a maturação dos ovos, fazendo, em seguida, sua postura. Entretanto, as fêmeas de *Ae. aegypti* alimentam-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, aumentando a probabilidade deste vetor transmitir o vírus (Barata *et al.*, 2001; Forattini, 2002).

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* apresenta duas fases distintas: uma aquática na qual passa pelos estágios de ovo, larva e pupa e a outra terrestre, que corresponde ao estágio adulto. Após o acasalamento, as fêmeas exercem sua hematofagia, pois o sangue é indispensável para o amadurecimento dos ovos, colocando seus ovos geralmente aderidos às paredes dos recipientes, próximos ao espelho d'água e estes levam entre dois e três dias para eclodirem. Após a eclosão, surgem as larvas, as quais passam por quatro estádios, caracterizados por grande mobilidade e elevado crescimento, exigindo, para tal, um bom suprimento alimentar e temperatura média entre 24º C e 29º C. O estágio de larva pode durar de quatro a oito dias. Das larvas, surgem as pupas também bastante móveis, com atividade respiratória e tempo de desenvolvimento de aproximadamente dois dias. Após esta

fase, surge o mosquito adulto que se alimenta de carboidratos, procedentes do néctar e sucos vegetais. Na fêmea, o intervalo entre a alimentação sanguínea e a oviposição varia de dois a três dias (Consoli e Oliveira, 1994; Service, 2000; Forattini, 2002).

O ciclo de transmissão da dengue inicia-se, quando o mosquito pica um ser humano infectado com o vírus, no período de viremia. No mosquito, o vírus se multiplica no intestino e passa também para os ovários e tecido nervoso, atingindo, por último, as glândulas salivares; este período de incubação dura de oito a 11 dias. Ao picar seu hospedeiro (um homem), o mosquito transmite o vírus, que passará para a corrente circulatória e através desta, atinge o fígado, baço e tecidos linfáticos, e permanece, nestes órgãos, por cerca de sete dias, onde retorna à corrente sanguínea, caracterizando a viremia. Se uma nova fêmea fizer o repasto sanguíneo em um homem nesta fase, a mesma se tornará infectada, dando início a um novo ciclo (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Service, 2000; FIOCRUZ, 2005). O mosquito (fêmea) uma vez contraído o vírus, permanece infectado por toda a vida (Forattini, 2002).

Ae. aegypti habita o ambiente doméstico, pica durante o dia, demonstra forte preferência por sangue humano e está intimamente associado a ambientes urbanos (Scott *et al.,* 1997; Tauil, 2001). Os tipos de criadouros preferenciais para o desenvolvimento dos estágios imaturos desta espécie variam entre os países, dependendo da disponibilidade e freqüência dos mesmos, os quais estão associados a fatores ambientais e/ou sócio-culturais. No Camboja, por exemplo, caixas d'água com capacidade igual ou superior a 100 litros são os principais criadouros de larvas (Paupy *et al.*, 2005). No Brasil, o *Ae. aegypti* é considerado predominantemente antropofílico e endofílico, preferindo reservatórios artificiais tais como pneus, latas, garrafas e ferragens em oficinas para o desenvolvimento das larvas. Os adultos preferem ambientes pouco iluminados, como dormitórios e salas de estar (Mazine *et al.*, 1996; Barata *et al.*, 2001). Nas regiões Sudeste e Sul do país, as formas imaturas de *Ae. aegypti* foram encontradas em bromélias utilizadas para fins decorativos em residências (Forattini e Marques, 2000). No entanto, a densidade larval nestes reservatórios está associada aos índices pluviométricos, sendo maior durante a estação chuvosa (Nogueira *et al.*, 1999).

1.3 Dengue: Conceito, Histórico e Distribuição

A dengue é uma doença febril aguda, causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, com antigenicidade para quatro sorotipos virais: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 e transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Ae. aegypti* o principal vetor e o *Ae. albopictus* considerado um vetor secundário. As manifestações clínicas desta doença variam desde uma síndrome viral, inespecífica e benigna a um quadro grave e fatal de doença hemorrágica com choque, como pode ainda ser assintomática (Tauil, 2001; Huber *et al.*, 2002b).

Com base nestas manifestações clínicas, a dengue apresenta duas formas clínicas principais: a febre clássica do dengue (FD ou DC) e a febre hemorrágica do dengue (FHD), que representam importantes problemas de Saúde Pública em áreas Tropicais e Subtropicais, salientando-se que a segunda forma clínica, a FHD, é mais freqüente nos locais onde dois ou mais sorotipos co-circulam (Huber *et al.*, 2002b). A prevalência do dengue tem aumentado em diferentes regiões do mundo, com exceção da Europa, assim como a FHD, desde a sua primeira descrição no Sudeste Asiático, na década de 50 (Gubler, 2002). Segundo Paupy *et al.* (2005), ocorrem entre 50 e 100 milhões de casos de FD e FHD em mais de 100 países, principalmente em países da Ásia, Américas e região do Pacífico.

A FHD apresenta características epidemiológicas complexas e não muito claras, sendo provavelmente relacionadas à cepa do vírus, à densidade, ao comportamento e à competência do mosquito vetor, ao estado imunitário e genético do paciente, à concomitância com outras doenças e à infecção prévia por outro sorotipo viral da doença. A FD não possui imunidade cruzada, embora possa haver uma imunidade cruzada transitória, de curta duração (Tauil, 2001; Huber *et al.*, 2002b).

Apesar de os primeiros relatos sobre epidemias de dengue terem ocorrido na Ásia, África e América do Norte em 1779 e 1780, suspeita-se que já havia algum registro na China de uma doença compatível a esta enfermidade, chamada de “veneno da água”, visto que estava associada a insetos voadores relacionados à água. Epidemias ocorridas nas Antilhas Francesas em 1635, no Panamá em 1699 e em Jacarta (Indonésia) e Cairo (Egito) em 1789 parecem também ter sido de dengue. Desta forma, mesmo não havendo comprovação de que estas epidemias tenham sido realmente de dengue, é bastante provável que o seu surgimento tenha ocorrido no século XVIII, devido à forte evidência de que a epidemia ocorrida na

Filadélfia (E.U.A.), em 1780, era provavelmente de dengue, caracterizada clinicamente como *breakbone fever* (febre quebra-osso) (Gubler, 1998; Vasconcelos *et al.*, 1999; Schatzmayr, 2000).

Na primeira metade do século XX, países da América Central, tais como Cuba, México, Panamá e várias Ilhas Caribenhas foram provavelmente acometidos por surtos de dengue, de acordo com os sintomas apresentados pelos pacientes: febre, dores musculares e nas articulações (Vasconcelos *et al.*, 1999). Na América do Sul, vários países também teriam sido acometidos, tais como: Peru nas décadas de 50 e 80; Venezuela entre 1941 e 1946, e na década de 60, período de erradicação do *Ae. aegypti* em vários países da América Latina e na década de 70 (Pinheiro e Corber, 1997; Gubler, 1998); Colômbia, Guiana, Guiana Francesa e Suriname na década de 70; Bolívia, Equador e Paraguai na década de 80 (Pinheiro e Nelson, 1997). Nos últimos anos, epidemias de dengue continuam sendo registradas em diversos países da América do Sul, tais como: Argentina, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Uruguai e Venezuela (Pinheiro e Corber, 1997; Gubler, 1998; Vasconcelos *et al.*, 1999).

O Brasil não registrou nenhum caso de dengue na década de 50 e o seu principal vetor, o *Ae. aegypti*, foi considerado erradicado do país em 1955 (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Subsequentemente, reintroduções deste vetor ocorreram no norte do Brasil entre 1960 e 1970, provavelmente, oriundas de países vizinhos, tais como: Suriname, Guiana e Venezuela, sul dos Estados Unidos e algumas Ilhas do Caribe, que não conseguiram a sua erradicação (Nogueira *et al.*, 1999; Lourenço-de-oliveira *et al.*, 2002). Logo em seguida, houve a primeira epidemia de dengue, com base no diagnóstico clínico-laboratorial, na cidade de Boa Vista (capital de Roraima) entre 1981 e 1982 (Travassos-da-Rosa *et al.*, 1982; Vasconcelos *et al.*, 1999; Figueredo *et al.*, 2004). Em 1986, foram notificados casos nos estados do Rio de janeiro, Ceará e Alagoas (Schatzmayr *et al.*, 1986; Figueiredo *et al.,* 1990). Em 1991, ocorreram outras epidemias no Rio de Janeiro e no Tocantins (Vasconcelos *et al.*, 1993; FUNASA, 1998) e em 1994, no Ceará (Vasconcelos *et al.*, 1995). A partir de 1994, todas as regiões brasileiras estavam sendo acometidas por casos de dengue, em especial, as regiões Nordeste e Sudeste. Na atualidade, somente dois estados da Região Sul, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, não apresentam casos autóctones de dengue (Nogueira *et al.*, 2002; FUNASA, 2009).

O Amazonas foi um dos últimos estados do país a se tornar infestado pelo *Ae. aegypti*, sendo o mesmo encontrado em sua capital, Manaus, em 1996. Posteriormente, duas grandes epidemias de dengue foram registradas nesta capital em 1998 e 2001. A partir deste período, casos de dengue continuam sendo registrados todos os anos (Figueredo *et al.*, 2004), havendo o registro pela primeira vez do sorotipo 4 (DENV4) em Manaus, entre 2005 e 2007, detectado em 3 amostras sorológicas de pacientes de Manaus, a partir de testes sorológicos e moleculares, fato que deve alertar para a reintrodução de mais um sorotipo no Brasil, e mais especificamente, em Manaus (Figueredo *et al.*, 2008).

1.4 Quadro Atual de Dengue no Brasil

De acordo com os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) para as sete primeiras semanas epidemiológicas de 2010, foram notificados 155.771 casos de dengue, distribuídos da seguinte forma nas cinco regiões brasileiras: Centro-Oeste 77.805 (50%), Sudeste 38.971 (25%), Norte 29.207 (18,7%), Nordeste 6.765 casos (4,3%) e Sul 3.023 (2%). Destes, 82,3% estiveram concentrados nos estados do Acre, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Rondônia. Ao comparar estes com os dados do mesmo período em 2009, verificou-se um aumento da incidência em 11 das 27 unidades federativas brasileiras: Alagoas, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Rondônia, São Paulo e Tocantins (FUNASA, 2010).

Segundo as manifestações clínicas, foram registrados 211 casos graves de dengue, 77 de febre hemorrágica de dengue (FHD) e 134 de dengue com complicações (DCC - forma clínica que não se enquadra no tipo clássico ou no hemorrágico, segundo critérios da OMS), com 24 óbitos. Em 2009, foram notificados 1.043 casos graves de dengue e 54 óbitos no mesmo período, ou seja, houve uma redução de 85% do primeiro e 55,6% do segundo (FUNASA, 2009; 2010).

Quanto aos sorotipos circulantes no Brasil, nota-se a presença de três sorotipos virais: DENV-1, DENV-2 e DENV-3, com predomínio do sorotipo 3 entre 2002 e 2006 e do sorotipo 2 em 2007, 2008 e 2009. O sorotipo 1 prevaleceu em 2010 (FUNASA, 2010).

Na Região Norte, em 2009, houve um registro de 70.399 casos suspeitos de dengue, sendo confirmados 217 casos de FHD e 318 de DCC, destes, 12 evoluíram para óbito. No Amazonas, houve notificação de 2.680 casos e 1232 destes

ocorreram em Manaus. Em todo o estado, ocorreram 60 casos de FHD e 55 de DCC, com apenas um óbito e um provável predomínio do sorotipo 2, em virtude do baixo número de amostras positivas necessário à sua confirmação (FUNASA, 2009).

1.5 Dengue: Considerações Epidemiológicas

Os motivos para o ressurgimento do dengue são complexos e não muito claros. Provavelmente, mudanças geográficas ocorridas nos países subdesenvolvidos, a partir da década de 60, levaram a um fluxo migratório do campo para a cidade e estas não conseguiram se moldar a esta nova realidade, apresentando problemas de habitação e saneamento básico. Relacionado a estes aspectos, estaria o aumento da produção industrial moderna. Outro fator preocupante seria a facilidade de propagação do agente etiológico do dengue decorrentes dos rápidos meios de transportes, assim como o crescimento do tráfego aéreo e terrestre (Gubler, 1998).

Outro problema a ser considerado seria a deterioração da infra-estrutura no Sistema de Saúde Pública, com redução dos recursos humanos e financeiros. Além disso, as autoridades sanitárias vêm privilegiando medidas emergenciais de controle em detrimento de sua prevenção. Deve-se considerar ainda que o diagnóstico precoce dos casos de dengue tem sido negligenciado, inclusive confundido com outras doenças, por exemplo, rubéola e outras viroses, sendo comumente realizado, quando um grande número de pessoas já está infectado, atingindo uma grande área demográfica, o que dificulta o controle da epidemia (Tauil, 2001, Donalísio e Glasser, 2002).

1.6 Microssatélites

Os microssatélites foram descobertos na década de 1960, quando pesquisadores submeterem uma amostra do DNA genômico a uma centrifugação com cloreto de césio. E a partir disto, obtiveram bandas, sendo que uma delas continha genes e na outra banda superior, DNA satélite, que apresentava repetições com dois a milhares de pares de bases, localizados principalmente no centrômero (Tautz, 1989). Estas repetições foram divididas em dois grupos: os minissatélites formados por repetições constituídas por nove a 100 pares de bases e os microssatélites, por um a seis pares de bases (Weber, 1990).

Os microssatélites, *Simple Sequence Repeats* (SSR), *Sequence Tagged Microssatelites* (STMS) ou *Single Sequence Length Polymorphism* (SSLP) são sequências de DNA repetitivo com, no máximo, seis pares de bases *em tandem* (alinhadas), distribuídas no genoma de eucariotos e procariotos (Li *et al.,* 2004). Suas altas taxas mutacionais oscilam entre 10^{-3} e 10^{-6}, mas são conservativos em suas regiões flanqueadoras, possuem herança co-dominante, isto é, ambos os alelos do indivíduo heterozigoto podem ser visualizados. Apresentam alta taxa de polimorfismo, sendo os marcadores que revelam o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (Ferreira e Grattapaglia, 1998). E através do uso da reação da polimerase em cadeia (PCR), com *primers* espécie-específicos para as suas regiões flanqueadoras, podem ser detectados (Litt e Luty, 1989).

Quanto ao número de nucleotídeos, os SSR podem ser mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídicos. Já segundo a disposição dos seus motivos de repetição, são classificados em perfeitos (formados apenas pelos motivos de repetição), imperfeitos (com uma interrupção, nucleotídeo, entre os motivos de repetição), interrompidos (com uma pequena sequência entre os motivos de repetição) e compostos (formados por mais de um tipo de motivo de repetição) (Oliveira *et al.*, 2006).

Segundo Eisen (1999), dois modelos podem explicar a origem, o polimorfismo e a evolução dos microssatélites: o *"crossing-over"* desigual e o "*slippage"*. O primeiro resulta da recombinação desigual entre cromátides de cromossomos homólogos, devido ao não alinhamento em um mesmo nível destes no início daquele processo. Assim, são trocados segmentos de tamanhos diferentes entre cromátides de cromossomos homólogos (*"crossing-over"*desigual), resultando em deleções ou expansões nas sequências, onde estariam localizados os SSR (Eisen, 1999; Mello *et al.*, 2002). O segundo processo seria o deslize ou escorregão da DNA polimerase. Este ocorre durante a replicação do ácido desoxirribonucléico, quando a enzima DNA polimerase avança ou recua em uma região repetitiva, diminuindo ou aumentando o número de repetições, sendo o mecanismo mais aceito para explicar o polimorfismo em microssatélites, pois explicaria o aparecimento de variações pequenas no número de seus motivos de repetições (Schlotterer e Tautz, 1991; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Eisen, 1999).

Este caráter polimórfico torna-os úteis para diagnósticos de doenças, estudos de mapeamento genético, relações de parentesco, estrutura genética inter e

intrapopulacional, genética forense e filogeografia. Além de apropriados para avaliar o impacto do sistema reprodutivo, a estrutura social e a dispersão em populações em extinção (Ellegren, 2004; Diniz *et al.*, 2007).

Huber *et al.* (2002b) enfatizaram a importância dos microssatélites para diferenciar populações de *Ae. aegypti*. Ravel *et al.* (2002) afirmam ainda que os microssatélites podem ser adequados para identificar várias populações de *Ae. aegypti* em uma escala microgeográfica, bem como úteis para avaliar variação temporal (sazonal) dentro de populações de mosquitos.

1.7 Estudos Genéticos

Em virtude de o *Ae. aegypti* ser o principal vetor dos sorotipos virais para a dengue, estudos de diversas naturezas são feitos, baseados neste organismo. Dentre os quais, estão os estudos de genética de populações, que visam estimar a variação genética de *Ae. aegypti* em vastas regiões geográficas, ou dentro de uma região. Assim, os resultados gerados têm sido úteis para compreender como o seu padrão de migração afeta sua estrutura genética (Huber *et al.*, 2002b). Muitos destes estudos revelaram que suas populações estão geneticamente estruturadas em diferentes regiões do mundo e isto poderia ser utilizado para uma melhor compreensão de sua competência vetorial, resistência a inseticidas e adaptação ecológica (Donalísio e Glasser, 2002; Ravel *et al.*, 2002; Lima-Júnior e Scarpassa, 2009).

Desta forma, diversos estudos foram feitos, Paduan *et al.* (2006), com o emprego de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic* DNA), encontraram elevado polimorfismo e altos níveis de diferenciação genética entre populações de seis estados brasileiros e também dentro de seus municípios, sendo as populações brasileiras de *Ae. aegypti* subdividida em dois grupos principais, um compreendendo as populações do Nordeste e o outro, as populações do Norte, Centro-Oeste e Sudeste.

Com o mesmo marcador anterior, foram realizados dois outros estudos. O primeiro feito em diferentes regiões geográficas do estado de São Paulo, a fim de se verificar o padrão de infestação do *Ae. aegypti*. Assim, também foram encontrados dois grupos principais neste estado: um composto por mosquitos provenientes da região oeste da cidade de São Paulo e o outro composto por mosquitos originários de criação em laboratório e da cidade de Santos (Santos *et al.*, 2003). O segundo

foi realizado em Cáli (Colômbia), no qual foi avaliada a dinâmica populacional do *Ae. aegypti* por meio da pesquisa epidemiológica de importantes variantes biológicas, como a competência vetorial, associadas às análises de genética populacional, a fim de proporcionar um complemento ao estudo da transmissão do vírus dengue e da vigilância do seu vetor. Os resultados deste estudo mostraram uma heterogeneidade na competência vetorial e uma moderada diferenciação genética inter-populacional (Ocampo e Wesson, 2004).

Yébakima *et al.* (2004), em Martinica, realizaram estudos de genética populacional com isoenzimas associados à susceptibilidade das populações do vetor ao dengue e encontraram uma elevada diferenciação em oito locos, sendo a maior encontrada no bairro de *Le Lamentin*. Em relação aos resultados obtidos em locais da América Latina, a diferenciação foi ainda mais elevada. A susceptibilidade das populações ao vírus dengue foi muito variável e populações geneticamente homogêneas mostraram-se igualmente susceptíveis. Ainda utilizando isoenzimas, foi avaliada a estrutura genética de *Ae. aegypti*, em relação à densidade populacional humana em duas ilhas da Polinésia Francesa. Neste estudo, áreas densamente povoadas apresentaram uma elevada diferenciação, em comparação a áreas menos povoadas (Paupy *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado na Venezuela, Urdaneta-Marquez *et al.* (2008), por meio do gene *ND4* do DNA mitocondrial e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), verificaram as relações genéticas entre populações de *Ae. aegypti* de diferentes localidades e a sua competência vetorial em transmitir o sorotipo DENV-2. Foram encontrados seis diferentes haplótipos para o gene *ND4* e seu padrão de variação sugerindo isolamento por distância; já para os SNP, a variação foi menor, não havendo isolamento por distância. Houve confirmação da competência vetorial daquele mosquito para transmitir o vírus dengue. Lima-Júnior e Scarpassa (2009), também utilizando o gene *ND4*, em um estudo na Amazônia brasileira, encontraram um elevado número de haplótipos (13), altos valores médios de diversidade genética e um relativo fluxo gênico entre as dez localidades amostradas em seu estudo.

Scarpassa *et al.* (2008), usando o gene *COI* do DNAmt, analisaram a estrutura populacional e os padrões de dispersão, por meio das estimativas de fluxo gênico, em 14 amostras do principal vetor do dengue provenientes de quatro regiões brasileiras. Os autores encontraram dez haplótipos distribuídos em dois grupos, sugerindo que as populações de *Ae. aegypti* destas regiões seriam originárias do

leste e do oeste da África. Paduan e Ribolla (2008), com o emprego dos genes *COI* e *ND4*, também encontraram dois clados principais em populações de *Ae. aegypti* no Brasil.

Paupy *et al.* (2008), no norte de Camarões, utilizando microssatélites e o gene *ND4,* verificaram uma significativa diferenciação genética entre populações silvestres, enquanto as populações domésticas foram mais homogêneas, não encontrando nenhum padrão de isolamento por distância, isto foi verificado com o primeiro marcador citado. Já com o segundo, o gene *ND4*, foi observado um aumento da diversidade genética nas populações domésticas, com uma provável e recente expansão demográfica, enquanto na população silvestre, foi encontrado um único haplótipo.

Com a utilização de marcadores microssatélites, foi encontrada uma substancial diferenciação nas populações do subúrbio da cidade de *Ho Chi Minh* (Vietnã), em relação àquelas localizadas no Centro, menos diferenciadas (Huber *et al.*, 2002b). Entretanto, em outro estudo com microssatélites e isoenzimas, na capital do Rio de Janeiro, foi detectada uma considerável diferenciação genética em populações procedentes de uma pequena escala geográfica, ou seja, dentro da cidade, verificando o mesmo padrão de diferenciação tanto em populações do centro como da periferia (Costa-Ribeiro *et al.*, 2006b).

Análises com isoenzimas mostraram como determinadas condições ambientais (níveis de pluviosidade) e intervenções humanas (o uso de inseticidas e a prática de armazenar água) afetam o nível de diferenciação genética entre as populações deste vetor. Assim sendo, o acompanhamento de mudanças temporais poderá auxiliar no entendimento de como as mudanças genéticas ocorrem durante os períodos de epidemia e inter-epidêmico de transmissão do dengue (Paupy *et al.*, 2005; Costa-Ribeiro *et al.*, 2006a).

Segundo Costa-Ribeiro *et al.* (2006a), análises em diversas áreas demonstraram uma alta diferenciação genética entre as populações de *Ae. aegypti* separadas por distâncias de 3,5 a 8,5 Km, implicando numa baixa taxa de migração entre elas. Adicionalmente, neste estudo, observou-se durante a estação chuvosa uma maior estrutura genética, sugerindo uma baixa dispersão do *Ae. aegypti* nesta época do ano, período coincidente com as epidemias de dengue na cidade. Este padrão, entretanto, foi menos acentuado na estação seca, onde houve uma menor diferenciação. Resultado contrário foi observado na cidade de *Siem Reap*

(Camboja), onde a alta taxa de diferenciação genética coincidiu com a baixa precipitação, pois havendo o desaparecimento temporário dos locais de reprodução dos estágios imaturos, haveria um efeito *bottleneck* (gargalo populacional) no tamanho da população e, como consequência, uma redução na variação genética por deriva genética aleatória (Paupy *et al.*, 2005). Este mesmo padrão foi detectado na parte central da cidade *Ho Chi Minh* (Vietnã) (Huber *et al.*, 2002a).

Os estudos de genética de populações são importantes, pois auxiliam no desenvolvimento de novas estratégias de controle de vetores (Paduan *et al.*, 2006). Além de serem úteis para entender a dinâmica populacional e os fatores que podem interagir com a mesma, tais como: competência vetorial, resistência a inseticidas e adaptação ecológica (Donalísio e Glasser, 2002; Ravel *et al.*, 2002; Lima-Júnior e Scarpassa, 2009). Dessa forma, conhecer os padrões de diferenciação genética em populações de *Ae. aegypti*, entre as estações seca e chuvosa em Manaus, poderá auxiliar no entendimento da dinâmica das populações do vetor e da dinâmica de transmissão do dengue, permitindo aprimorar as estratégias de controle do vetor na região (Huber *et al.*, 2002a; Paupy *et al.*, 2005; Costa-Ribeiro *et al.*, 2006a).

2. Justificativa

A dengue é uma das mais sérias arboviroses da atualidade, visto que são registrados a cada ano 100 milhões de casos. Assim sendo, medidas devem ser tomadas a fim de se conter o surgimento e a dispersão de suas epidemias. Desta forma, estudos de estrutura genética e de fluxo gênico em populações do seu principal vetor, o *Ae. aegypti*, podem ser de grande valia para a compreensão de aspectos epidemiológicos desta doença (Huber *et al.,* 2001).

Segundo Lima-Júnior & Scarpassa (2009), sabe-se pouco sobre a dinâmica populacional do *Ae. aegypti* na Amazônia brasileira. Assim sendo, compreender os padrões de fluxo gênico e a estrutura genética nos níveis espacial e temporal das populações de *Ae. aegypti* de Manaus são de extrema relevância. Estas informações serão relevantes para subsidiar as estratégias de controle deste vetor. Para tanto, torna-se necessária uma avaliação temporal das populações nas estações, seca e chuvosa, pois é conhecido que os ovos desta espécie podem ser viáveis por até um ano, havendo apenas uma redução da densidade populacional durante o período de seca. Este período exige atenção por parte dos Órgãos de Saúde responsáveis pelo controle epidemiológico do vetor, uma vez que não se deve realizar o controle somente durante o período de chuva, o qual coincide com o surgimento das epidemias. No período de seca, o vetor está também reproduzindo, mesmo havendo um menor número de criadouros disponíveis para a oviposição e, como conseqüência, fazendo-o se dispersar e talvez provocando uma homogeneização de suas populações, o que poderia tornar seu controle mais efetivo.

3. Hipóteses

$H_{0,1}$ Variações espaciais não influenciam na estrutura genética das populações de *Ae. aegypti* na cidade de Manaus.

$H_{1,1}$ Variações espaciais influenciam na estrutura genética das populações de *Ae. aegypti* na cidade de Manaus.

$H_{0,2}$ Variações temporais não influenciam na estrutura genética das populações de *Ae. aegypti* na cidade de Manaus.

$H_{1,2}$ Variações temporais influenciam na estrutura genética das populações de *Ae. aegypti* na cidade de Manaus.

$H_{0,3}$ Forças evolutivas não exerceriam influência nas populações das localidades amostradas entre as estações.

$H_{1,3}$ Forças evolutivas exerceriam influência nas populações das localidades amostradas entre as estações.

$H_{0,4}$ Fatores sócio-culturais (uso de inseticida e prática de estocar água) não determinam padrões distintos de diferenciação genética entre as localidades.

$H_{1,4}$ Fatores sócio-culturais (uso de inseticida e prática de estocar água) determinam padrões distintos de diferenciação genética entre as localidades.

4. Objetivo geral

Estimar a variação e a estrutura genética de populações de *Ae. aegypti*, procedentes de quatro localidades da cidade de Manaus, durante as estações chuvosa e seca, com o emprego de nove locos microssatélites.

4.1 Objetivos Específicos

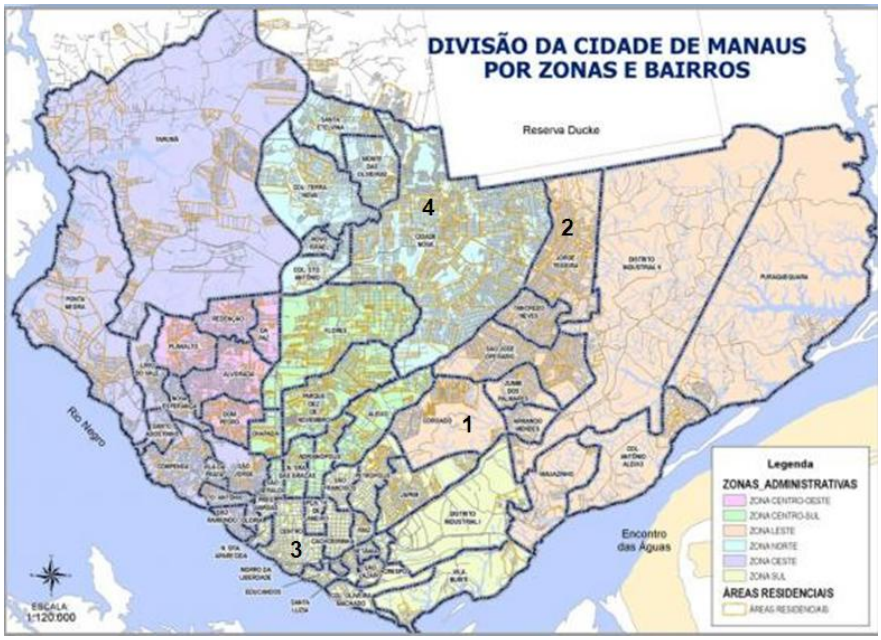
- Estimar a variabilidade genética intra e interpopulações de *Ae. aegypti* nas duas estações, com o emprego de marcadores microssatélites.
- Inferir a extensão de fluxo gênico e a divergência genética entre as populações de *Ae. aegypti* em cada estação (seca e chuvosa), como também comparar estes parâmetros entre as estações.
- Verificar a interferência de forças evolutivas, fatores ambientais e sócio-culturais sobre a estruturação das populações de *Ae.aegypti* em quatro localidades da cidade de Manaus entre as estações chuvosa e seca.

5. Material e métodos

5.1 Local de Coleta e Preparo dos Espécimes

As amostras de *Ae. aegypti* foram obtidas nos estágios imaturos (larvas de 1º, 2º, 3º e 4º estádios e pupas) em 16 pontos distintos em quatro localidades escolhidas aleatoriamente, duas procedentes das zonas[2] Leste (Coroado e Jorge Teixeira), uma da Sul (Centro, Cachoerinha e Praça 14 de Janeiro) e uma da Norte (Cidade Nova) da cidade de Manaus, Estado do Amazonas (Figura 1 e Tabela 1).

Manaus apresentou um Índice de Infestação Predial (IIP) de 1,4 para os anos de 2008 e 2009. Este índice basea-se no Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *Aedes aegypti* (LIRAa) e este valor revela uma situação de alerta para aquela capital, de acordo com os parâmetros preconizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) (FUNASA, 2009).



Fonte: http://www.arsam.am.gov.br

Figura 1 - Locais de coleta de *Ae. aegypti* nas quatro localidades de Manaus-AM. 1- Coroado, 2- Jorge Teixeira, 3- Praça 14 de Janeiro, Cachoerinha e Centro e 4- Cidade Nova.

---

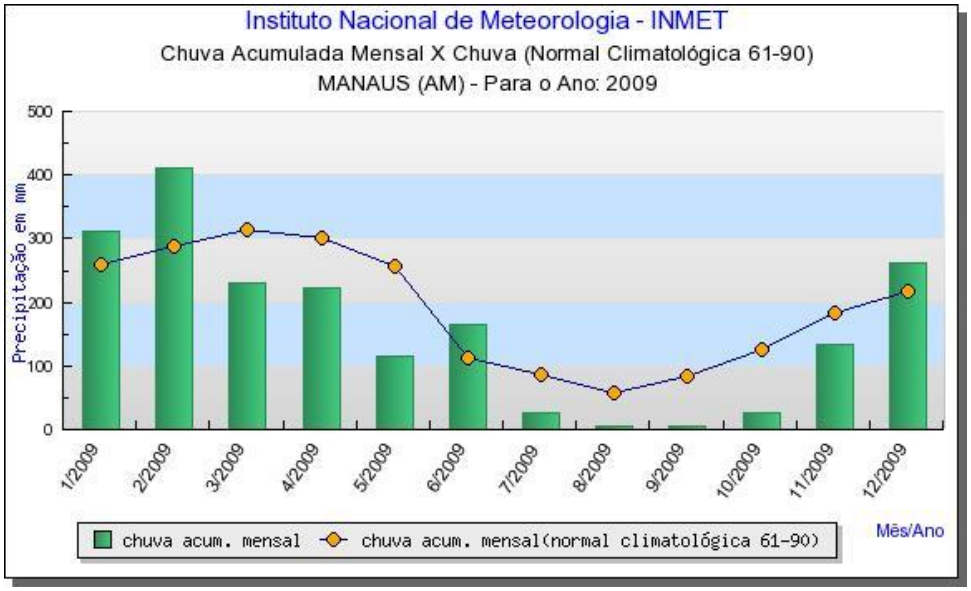
[2] A divisão geográfica do Município de Manaus em 6 zonas administrativas foi instituída no Decreto n. 2924, de 07 de agosto de 1995 e redimensionada pela Lei 283, de 12 de abril de 1995. Teve como base os estudos técnicos realizados pelo Instituto Municipal de Planejamento e Informática – IMPLAN (Fonte: http://www.arsam.am.gov.br/novo/?q=node/163).

Tabela 1 - Locais de coleta de *Ae. aegypti* em Manaus - AM

Localidades/ estação	Coordenadas	Tamanho da amostra
Estação Chuvosa		
JT	03º01’56”S e 59º55’39”W	45
COR	03º05’12”S e 59º57’44”W	43
P14	03º07’14”S e 60º00’47”W	38
CN	03º01’08”S e 59º58’06”W	39
Estação Seca		
JT	03º01’56”S e 59º55’39”W	43
COR	03º05’12”S e 59º57’44”W	32
P14	03º07’14”S e 60º00’47”W	41
CN	03º01’08”S e 59º58’06”W	40

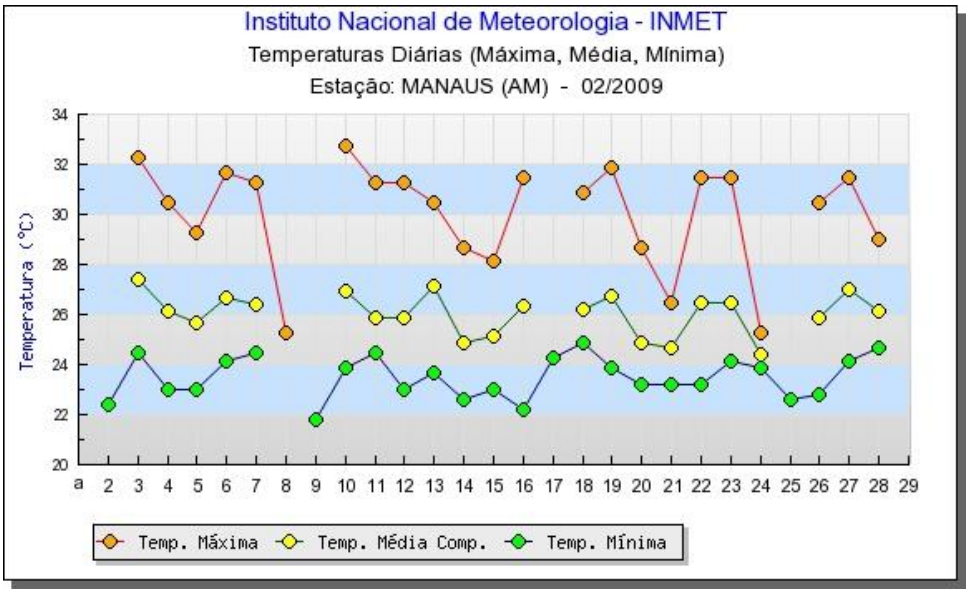
JT = Jorge Teixeira; COR = Coroado; P14 = Praça 14 de Janeiro, Cachoeirinha e Centro; CN = Cidade Nova

Em função da análise temporal, as coletas foram feitas, em sua maioria, em fevereiro de 2009 na estação chuvosa e em outubro de 2009 na estação seca. Os dados climatológicos referentes ao período de coleta foram obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6).



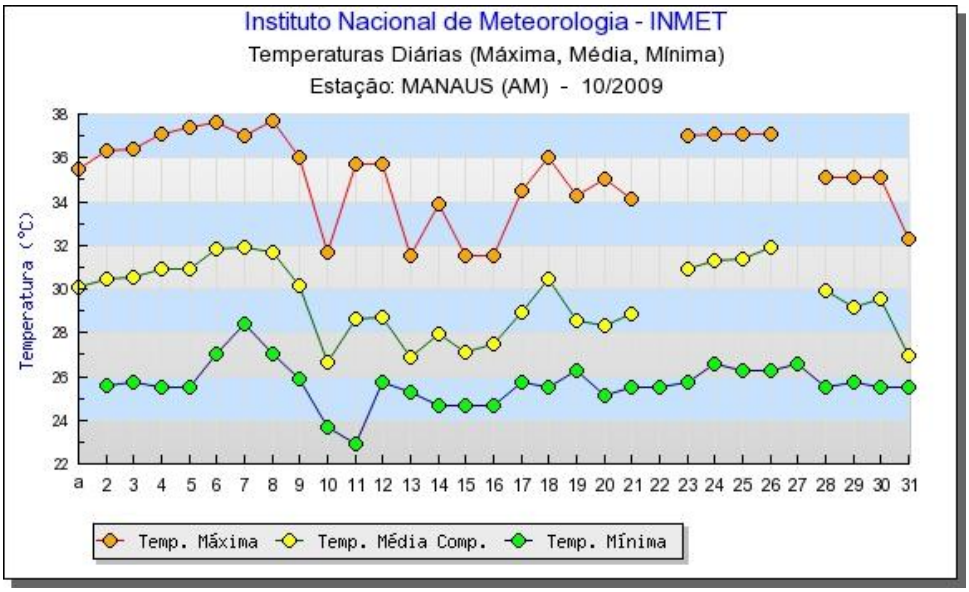
Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)

Figura 2 - Índices pluviométricos observados na cidade de Manaus durante o ano de 2009.



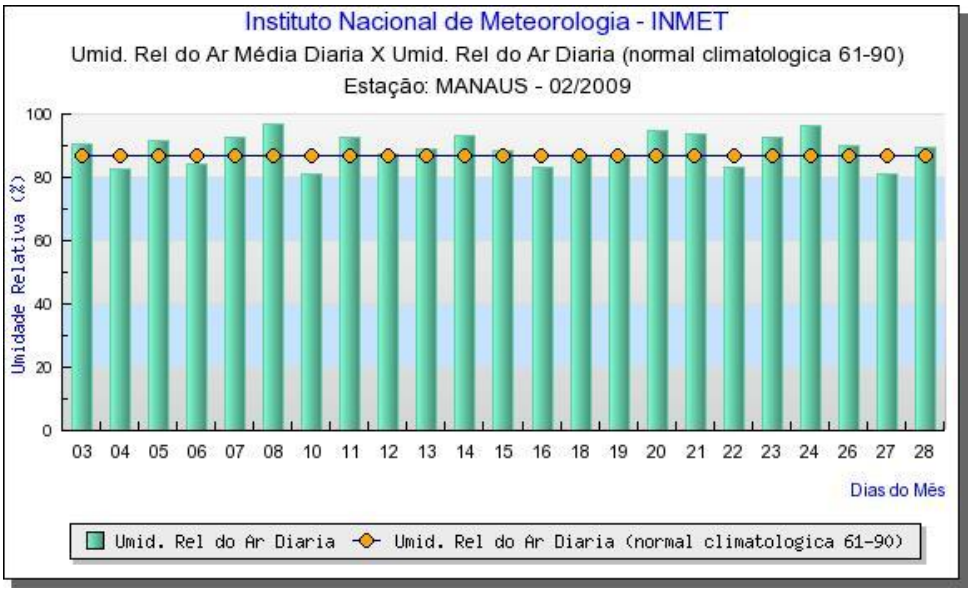
Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)

Figura 3 – Temperaturas máxima, média e mínima obtidas para Manaus em fevereiro de 2009.



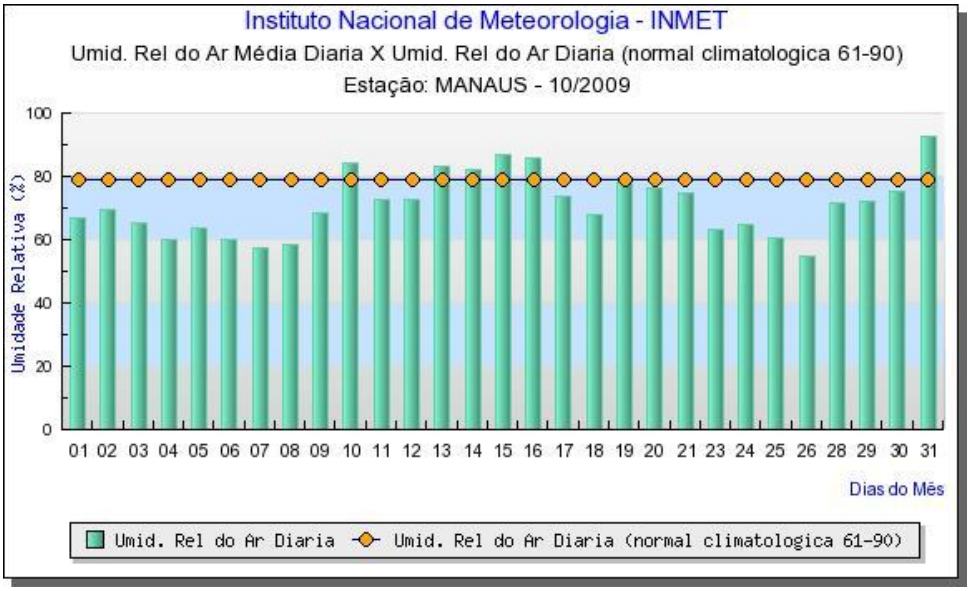
Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Figura 4 - Temperaturas máxima, média e mínima obtidas para Manaus em outubro de 2009.



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Figura 5 - Umidade relativa do ar obtida para Manaus em fevereiro de 2009.



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)

Figura 6 - Umidade relativa do ar obtida para Manaus em outubro de 2009.

Os espécimes foram coletados com auxílio de um conta-gotas em criadouros artificiais próximos às residências, oficinas e borracharias e, em seguida, transferidos para frascos com etiquetas, contendo a data, as coordenadas e o local de coleta. A seguir, o material foi transportado para o Laboratório de Genética e Evolução de Mosquitos Vetores de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e, posteriormente, transferido para cubas, sendo adicionados água e alimento (gérmen de trigo e farinha de peixe) até as larvas atingirem o quarto estágio larval. As pupas foram transferidas para copos contendo água limpa, cobertos com filó, para a emergência dos adultos (Scarpassa e Tadei, 1990). Em seguida, os espécimes foram identificados com a chave taxonômica de Forattini (2002) e transferidos para tubos *eppendorf* com etiqueta, contendo o nome da espécie, local e data de coleta, sendo estes acondicionados imediatamente a -80°C, onde se mantiveram até as extrações do DNA genômico.

De cada localidade foram analisados, em média, 40 indivíduos.

5.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi feita segundo o protocolo de Collins *et al.* (1987), com modificações, da seguinte forma: larvas de 4º estádio ou adultos foram macerados individualmente em microtubos de 1,5 mL, contendo 100 µL do tampão de lise, contendo 0,08M de NaCl, 0,16M de sacarose, 0,06M de EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético), 0,5% de SDS (dodecil sulfato de sódio - detergente iônico, que solubiliza os lipídeos e desfaz complexos macromoleculares e 0,1M de Tris-Cl. Posteriormente, os tubos contendo as amostras foram incubados em banho-maria a 65° C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado acetato de potássio (KAc) a 8M para precipitar as proteínas e as amostras novamente foram incubadas a 4° C por 30 minutos, centrifugadas e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A seguir, o DNA foi precipitado com 200 µL de etanol 95% e mantido por no mínimo duas horas no freezer a - 20°C. Posteriormente, o material foi centrifugado e o precipitado lavado com 1mL de etanol a 70%, e submetido à nova centrifugação. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi seco em estufa a 37° C, ressuspendido em 30 µL de água estéril. Após as extrações, as amostras foram tratadas com 3 µL de RNAse A 100 µg/mL e incubadas em banho-maria por 30 minutos, para retirar os resquícios de ácido ribonucléico (RNA). Após este tratamento, uma alíquota (2 µL)

de DNA foi retirada para estimar sua concentração e o restante foi mantido em freezer a -80°C, até as preparações das reações de PCR.

5.3 Semiquantificação do DNA Extraído

A alíquota de 2 µL foi utilizada para verificar a qualidade e estimar a concentração do DNA extraído. Este DNA foi analisado em gel de agarose a 1%, com tampão TBE a 0,5X (TBE–Tris base 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,5M pH 8,0) e o resultado comparado com o marcador de baixo peso molecular (100 pb). As condições de corrida foram de 70 Volts por 40 minutos. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio por 15 minutos, lavado em água e revelado em fotodocumentador, marca *Eagle eye* II. As amostras com concentrações acima de 10ng/µL foram diluídas, adicionando-se água deionizada.

5.4 Escolha dos Locos

Os nove locos escolhidos para análise deste estudo foram previamente desenvolvidos e publicados para *Ae. aegypti* por Slotman *et al.* (2007) e por Chambers *et al.* (2007) e estão ilustrados na tabela 2. Os oito primeiros foram publicados por Slotman *et al.* (2007) e o loco *B07* foi publicado por Chambers *et al.* (2007).

Os programas de amplificação utilizados no presente estudo foram publicados nos estudos citados acima e constam na tabela 3. Em seguida, os produtos amplificados foram checados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo e fotografado, a fim de se verificar a qualidade da amplificação e a intensidade das bandas.

Tabela 2 - Locos microssatélites de *Ae. aegypti* escolhidos.

Locos SSR de *Ae. aegypti*	Iniciadores 5'⟶ 3'	Número de alelos	Temperatura de Anelamento
AC5	D: TGGATTGTTCTTAACAAACACGAT R: CGATCTCACTACGGGTTTCG	6	60ºC
AG1	D: AATCCCCACACAAACACACC R: GGCCGTGGTGTTACTCTCTC	7	60ºC
AG2	D: TCCCCTTTCAAACCTAATGG R: TTTGCCCTCGTATGCTCTCT	10	52ºC
AG3	D: CGCCAAAACTGAAAACTGAA R: AAGGGCGGTGATGACTTTCT	6	60ºC
AG4	D: AAAACCTGCGCAACAATCAT R: AAGGACTCCGTATAATCGCAAC	7	60ºC
AG5	D: TGATCTTGAGAAGGCATCCA R: CGTTATCCTTTCATCACTTGTTTG	6	52ºC
AG7	D: CGTGCGAGTGAATGAGAGAC R: CATCCTCTCATCAGCTTCTAATAAA	10	52ºC
AT1	D: CGTCGACGTTATCTCCTTGTT R: GGACCGGAAAGACACAGACA	8	52ºC
**B07*(GA_{15})	D: CAAACAACGAACTGCTCACG R: TCGCAATTTCAACAGGTAGG	11	60ºC

Os oito primeiros foram publicados por Slotman *et al.,* 2007 e o último * por Chambers *et al.,* 2007.

D = iniciador direto e R= iniciador reverso para cada loco microssatélite.

Tabela 3 – Ciclos de amplicação para os locos analisados neste estudo, de acordo com os trabalhos de (1) Slotman *et al.* (2007) e (2) Chambers *et al.* (2007).

Programas do PCR	*AG2, AG5, AG7, AT1(1)*	*AC5, AG1, AG3, AG4 (1)*	*BO7 (GA15) (2)*
Desnaturação inicial	94 ºC -- 10 min	94 ºC -- 10 min	94 ºC -- 5 min
Desnaturação	94 ºC -- 30s	94 ºC -- 30s	94 ºC – 1min
Anelamento	52 ºC -- 30s *	60ºC -- 30s *	60 ºC -- 1min #
Extensão	72 ºC -- 30s	72 ºC -- 30s	72 ºC -- 2min
Extensão final	72 ºC -- 5 min	72 ºC -- 5 min	72 ºC -- 10 min
Hold	4 ºC	4 ºC	4 ºC

* Repetição por 35 ciclos e # 30 ciclos.

5.5 Amplificação das Amostras

Todas as amostras analisadas, neste estudo, foram amplificadas por meio da reação da polimerase em cadeia - PCR - (Mullis e Faloona, 1987), as quais foram preparadas da seguinte maneira: 0,4 ng/µL DNA molde; 0,25 U de *Taq*; 0,5 µmol de cada iniciador (direto e reverso); 2mM de cloreto de magnésio; 0,4 mM de dNTP; 1 X de solução tampão; 16,95µL de água deionizada, até completar o volume de 25µL. Em todas as PCR, foi incluído o controle negativo, contendo 1 µL de água estéril no lugar do DNA molde.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo e fotografado, a fim de verificar a qualidade das amplificações e proceder à diluição correta, antes de ser realizada a eletroferese em gel de poliacrilamida a 6% (Figura 4).

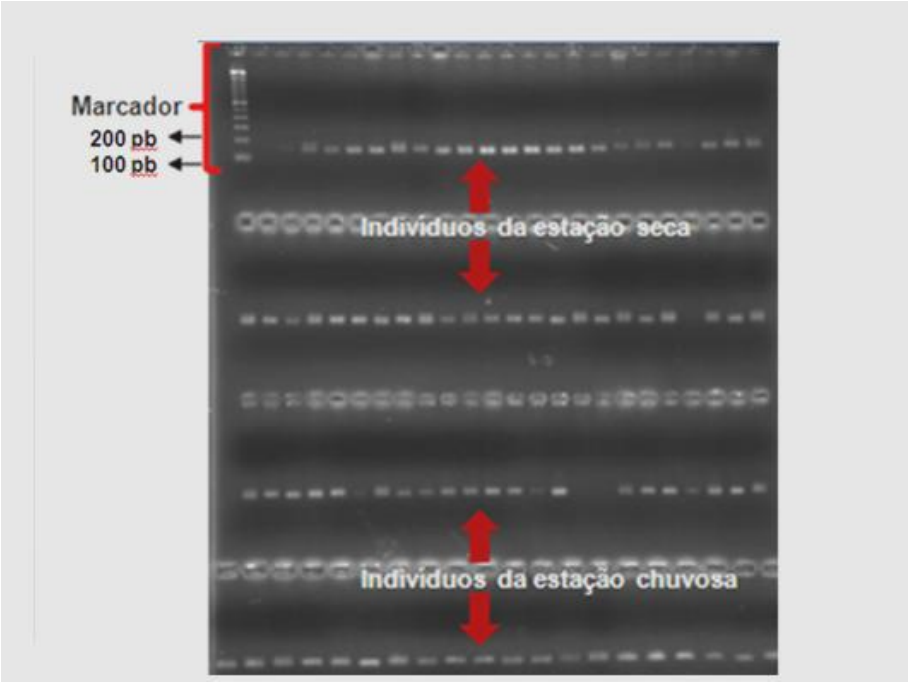


Figura 7 - Produtos de PCR do loco *AG7* de *Ae. aegypti* analisados em gel de agarose a 2% para a amostragem do bairro Jorge Teixeira, estações seca (43 indivíduos) e chuvosa (45 indivíduos). O tamanho do fragmento está entre 200 e 100 pb, baseado no marcador de 100 pb.

5.6 Análises das Amostras em Gel de Poliacrilamida 6%

Antes do carregamento das amostras no gel de poliacrilamida, aos 3µL dos produtos amplificados, foram adicionados 7 uL da formamida e tampão de carregamento. Desta mistura, 2 µL foram aplicados em cada poço do gel de poliacrilamida a 6%, previamente preparado e polimerizado. No primeiro poço, foram colocados 6µL do marcador de 10 pb pré-diluído com formamida e água deionizada. Após carregamento das amostras no gel, a eletroforese ocorreu nas seguintes condições: 1570 Volts, sob potência de 75W e com uma corrente de 70 mA, durante duas horas, condições pré-estabelecidas no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas.

Finalizada a corrida, o gel ainda sobre a placa foi submetido à coloração com nitrato de prata (Creste *et al.*, 2001) para a visualização das bandas, que passou pelas seguintes etapas:

a) o gel foi mergulhado em solução fixadora (20 mL de ácido acético glacial, 200mL de álcool etílico 96% e 1780 mL de água destilada) por 10 minutos;

b) enxaguou-se o gel em 2000 mL de água destilada por um minuto;

c) pré-tratamento (30 mL de ácido nítrico 65% e 1970 mL de água destilada) por três minutos;

d) o gel foi novamente enxaguado em 200 mL água destilada, por um minuto;

e) e mergulhado na solução contendo 4g de nitrato de prata diluídos em 2000 mL de água destilada, por impregnação, durante 20 minutos sob agitação constante;

f) novamente o gel foi lavado em 200 mL de água destilada por um minuto;

g) revelou-se o gel em solução contendo 30g de carbonato de sódio, 1000 mL de água destilada e 540 µL de formaldeído, posto somente no momento da coloração, sob agitação constante até as bandas serem visualizadas;

h) novamente, enxaguado em água destilada (2000 mL) por um minuto;

i) interrompeu-se a revelação pela adição da solução de parada, "*stop*", contendo 100 mL de ácido acético glacial e 1900 mL de água destilada, por cinco minutos;

j) por fim, o último enxágue com água destilada (2000 mL), por um minuto.

Posteriormente, o gel ficava em temperatura ambiente até secar e digitalizado. Em seguida, foram estimados os tamanhos dos alelos dos nove locos

microssatélites, a partir da migração da banda (alelo), em relação à banda do marcador de 10 pb.

5.7 Análises Estatísticas

Após serem genotipados 321 indivíduos de *Ae. aegypti* das 4 localidades amostradas, foram construídas duas matrizes, uma contendo os indivíduos da chuvosa e a outra, os da seca, a fim de se proceder às análises genéticas com o auxílio dos programas estatísticos específicos para análises genéticas.

Em princípio, utilizou-se o programa Micro-Checker (Oosterhout, *et al*., 2004) para verificar a presença de alelos nulos.

A variabilidade genética foi estimada a partir do número de alelos por loco, riqueza alélica, heterozigosidades observada e esperada. Estas estimativas foram obtidas por meio dos programas: *MStools* (Park, 2001) e FSTAT (Goudet, 2005). Este último também serviu para calcular as estimativas dos F de Wright (Wright, 1951).

O programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005) foi utilizado para verificar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, para o cálculo de F_{ST} par-a-par e do número de migrantes (*Nm*). Além de ter sido utilizado para a análise da variância molecular (AMOVA) dentro e entre as estações. Este programa também foi utilizado para testar a hipótese de isolamento por distância, por intermédio do teste de Mantel (Mantel, 1967).

O EHW também foi estimado pelos programas TFPGA (Miller, 1997) e GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995) e os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005).

Para estimar o número de grupamentos, baseado nos *pools gênicos* apresentados pelas quatro amostragens coletadas em Manaus, utilizou-se a análise Bayesiana do Programa *Structure* (Pritchard *et al.,* 2000). Os seus parâmetros para o número de grupamentos (K) variou entre 1 e 10, o número de corridas do método de Monte Carlo com cadeias de Markov (*Markov Chain Monte Carlo* - MCMC) foi de 500.000 e o número de corridas descartadas (Burnin) de 200.000. Admitiram-se o modelo de mistura (*admixture model*) e a correlação das frequências alélicas entre as populações (*correlated allele frequence between populations*).

Por meio do programa *Ne*Estimator (Peel *et al.*, 2004), calculou-se o tamanho efetivo de populações de cada localidade e nas duas estações, estimado a partir de dois modelos, os modelos de desequilíbrio de ligação e excesso de heterozigotos.

O programa *Bottleneck* (Cornuet e Luikart, 1996) testou a hipótese de redução do tamanho efetivo populacional, devido a um gargalo populacional entre as estações.

Em seguida, os resultados obtidos foram analisados para avaliar, por meio de uma comparação entre as estimativas do índice de fixação par-a-par, do número de migrantes, da AMOVA, dos valores de F_{st} obtidos das localidades entre as estações e do tamanho efetivo populacional, se houve, de fato, padrões de estruturação distintos nas populações entre as estações seca e chuvosa.

6 – Resultados

Com base nos resultados obtidos pelo Programa Micro-checker, observou-se a presença de alelos nulos em alguns locos, mas isto não ocorreu nas amostras de todas as localidades. Portanto, não houve necessidade de excluir nenhum loco analisado neste estudo.

6.1 – Variabilidade Genética

Considerando as duas estações chuvosa e seca, 321 espécimes de *Ae. aegypti* foram genotipados para os nove locos microssatélites (*AC5, AG1, AG2, AG3, AG4, AG5, AG7, AT1 e BO7*), sendo 165 indivíduos da estação chuvosa e 156 da estação seca, procedentes de quatro bairros de Manaus. Todos os locos mostraram polimorfismo nas duas estações, totalizando 41 alelos, distribuídos da seguinte forma: três alelos para o *AG1*, *AG2* e *AG3*, quatro para o loco *AC5* e *AG7*, cinco para o *AG5*, seis para o *AT1* e *B07*, sete para o *AG4*.

A tabela 4 apresenta as estimativas de variabilidade genética obtidas para as quatro amostras da estação chuvosa. A maior riqueza alélica foi observada para o loco *AG4* na amostra do bairro Coroado (6,359). A menor heterozigosidade esperada (H_E) intraloco foi obtida para o loco *AG2* na amostra do Jorge Teixeira (0,247), enquanto, a maior para o loco *AT1* na amostra do Coroado (0,824). Por outro lado, a menor H_E média foi detectada na amostra do Jorge Teixeira (0,555) e a maior na amostra do Coroado (0,613). A H_E geral (total) foi de 0,588, que corresponde à H_E média obtida na estação chuvosa. As localidades Coroado (loco *AG3*) e Jorge Teixeira (loco *AG2*) apresentaram o maior e menor valor de heterozigosidase observada (H_O), respectivamente, no período chuvoso.

Valores ligeiramente menores para estas estimativas foram detectados na estação seca (Tabela 5), onde as maiores riquezas alélicas foram constatadas para o loco *AG4* na amostra da Cidade Nova (6,005) e para o loco *AT1* nas amostras do Jorge Teixeira, Corado e Praça 14 de Janeiro (5,992; 6,000; 5,989, respectivamente). A menor H_E intraloco foi observada no loco *AG2* para a amostra da Cidade Nova (0,180), enquanto, a maior foi verificada para o loco *AT1* na amostra do Coroado (0,815). A menor H_E média foi obtida para a amostra da Cidade Nova (0,530) e a maior foi para a amostra do Jorge Teixeira (0,594). A H_E geral (total) foi de 0,564, que corresponde à H_E média para a estação seca. A Cidade Nova (loco

AT1) foi a localidade, onde H_O foi mais alta e o Jorge Teixeira (loco *AG2*), o local, no qual a mesma foi menor para o período seco.

Para verificar se as populações amostradas estão em panmixia, foi necessário realizar o teste de aderência para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Este teste tem por objetivo verificar se as freqüências observadas estão de acordo com as freqüências esperadas.

Na estação chuvosa (Tabela 4), os locos *AG1*, *AG5* e *AG7* mostraram-se em EHW para as quatro amostras analisadas. Os demais locos apresentaram desvios significativos do EHW em pelo menos uma amostra. Dos 36 testes realizados para o EWH, oito (22,22%) apresentaram desvios significativos após a correção de Bonferroni (Rice, 1989), sugerindo deficiência de heterozigotos. Corroborando estes resultados, os valores de F_{IS} (coeficiente de *inbreeding*) foram positivos em todos os casos. Na amostra da Praça 14 de Janeiro, os nove locos analisados mostraram-se em equilíbrio, enquanto nas amostras do Coroado e Cidade Nova, três dos nove locos apresentaram desvios significativos para o EHW (*AC5; AT1; B07* e *AG3; AT1; B07*, respectivamente). Nas amostras do Jorge Teixeira, dois dos nove locos analisados mostraram desvios do EHW (*AG2 e AG4*).

Nas amostras da estação seca, resultado ligeiramente diferente foi observado (Tabela 5). Os locos *AC5*, *AG4* e *AG5* apresentaram-se em EHW para as quatro amostras analisadas. Dos 36 testes, 13 (36,11%) apresentaram desvios significativos, após a correção de Bonferroni (Rice, 1989). A maioria dos desvios significativos indicou deficiência de heterozigotos, com valores positivos para o coeficiente de *inbreeding* (F_{IS}). Contudo, o desvio do EHW do loco *AG7* na amostra do Coroado sugere excesso de indivíduos heterozigotos, com valor de F_{IS} negativo. Já o loco *AT1*, um dos mais variáveis neste estudo, apresentou desvios significativos nas quatro amostras, após a correção do Bonferroni (Rice, 1989), sugerindo deficiência de heterozigotos nas três primeiras amostras e excesso de heterozigotos na amostra da Cidade Nova. Diferente do resultado encontrado na estação chuvosa, nas quatro amostras obtidas na estação seca, pelo menos três dos nove locos estavam em desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4 – Estimativas da variabilidade genética das quatro amostras de *Ae. aegypti* coletadas na cidade de Manaus, durante a estação chuvosa.

		JT	COR	P14	CN	Total
Loco	N	45	43	38	39	165
AC5	Na	3	4	4	4	4
	Rs	2,615	3,600	3,499	3,455	3,326
	H_O	0,308	0,325***	0,342	0,212	0,297
	H_E	0,303	0,562	0,317	0,332	0,380
	F_{IS}	-0,017	0,425	-0,081	0,365	0,217
AG1	Na	3	3	3	3	3
	Rs	3,000	3,000	3,000	2,999	3,000
	H_O	0,400	0,548	0,432	0,389	0,442
	H_E	0,502	0,602	0,572	0,504	0,547
	F_{IS}	0,206	0,092	0,246	0,231	0,187
AG2	Na	3	3	3	3	3
	Rs	2,980	2,995	3,000	3,000	2,989
	H_O	0,182**	0,233	0,343	0,250	0,252
	H_E	0,247	0,289	0,421	0,390	0,338
	F_{IS}	0,267	0,198	0,189	0,364	0,247
AG3	Na	3	3	3	3	3
	Rs	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
	H_O	0,477	0,778	0,526	0,314***	0,524
	H_E	0,553	0,626	0,619	0,599	0,600
	F_{IS}	0,138	-0,248	0,152	0,479	0,150
AG4	Na	6	7	6	6	7
	Rs	5,200	6,359	5,906	5,920	5,932
	H_O	0,425**	0,698	0,487	0,546	0,539
	H_E	0,672	0,653	0,541	0,604	0,618
	F_{IS}	0.370	-0.070	0.102	0.098	0,127
AG5	Na	5	4	5	5	5
	Rs	4,956	4,000	4,953	4,631	4,769
	H_O	0,711	0,667	0,763	0,632	0.693
	H_E	0,714	0,730	0,747	0,719	0,728
	F_{IS}	0,004	0.088	-0.022	0.123	0,042
AG7	Na	4	4	4	4	4
	Rs	3,981	3,999	4,000	4,000	3,993
	H_O	0,622	0,537	0,722	0,649	0,632
	H_E	0,673	0,663	0,704	0,715	0,689
	F_{IS}	0,077	0,192	-0,027	0,094	0,086
AT1	Na	6	6	6	6	6
	Rs	5,977	5,998	5,983	5,995	5,990
	H_O	0,677	0,314***	0,611	0,394***	0,499
	H_E	0,819	0,824	0,716	0,802	0,795
	F_{IS}	0,176	0,622	0,148	0,513	0,370
B07	Na	5	6	6	5	6
	Rs	4,810	5,348	5,622	4,956	5,283
	H_O	0,333	0,342***	0,500	0,314***	0,372
	H_E	0,511	0,566	0,649	0,641	0,594
	F_{IS}	0,350	0,399	0,232	0,513	0,375
Médias	H_O	0,459	0,493	0,525	0,410	0,472
	H_E	0,555	0,613	0,587	0,590	0,588
	F_{IS}	0,174	0,197	0,107	0,306	0,197

JT = Jorge Teixeira; COR = Coroado; P14 = Praça 14 de Janeiro; CN = Cidade Nova. N: número de indivíduos analisados, Na: número de alelos, Rs: riqueza alélica, H_O: heterozigosidase observada, H_E: heterozigosidase esperada, F_{IS}: coeficiente de endocruzamento. Os valores com asteriscos indicam desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, após o ajuste da correção de Bonferroni (Rice, 1989); * P < 0,05; **P<0,01; *** P<0,001.

Tabela 5 – Estimativas da variabilidade genética das quatro amostras de *Ae. aegypti* coletadas na cidade de Manaus, durante a estação seca.

		JT	COR	P14	CN	Total
Loco	N	43	32	41	40	156
AC5	Na	4	4	4	2	4
	Rs	3,855	3,720	3,651	2,000	3,423
	H_O	0,310	0,448	0,293	0,167	0,304
	H_E	0,419	0,521	0,284	0,259	0,372
	F_{IS}	0,263	0,142	-0,031	0,361	0,166
AG1	Na	3	3	3	3	3
	Rs	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
	H_O	0,524	0,594	0,400**	0,704	0,555
	H_E	0,664	0,660	0,576	0,645	0,637
	F_{IS}	0,213	0,102	0,309	-0,093	0,152
AG2	Na	3	3	3	3	3
	Rs	2,884	2,724	2,998	3,000	2,927
	H_O	0,049***	0,241	0,370	0,095	0,189
	H_E	0,223	0,220	0,375	0,180	0,250
	F_{IS}	0,783	-0,101	0,011	0,477	0,290
AG3	Na	3	3	3	3	3
	Rs	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
	H_O	0,725	0,438**	0,375**	0,425***	0,491
	H_E	0,648	0,653	0,630	0,633	0,643
	F_{IS}	-0,120	0,333	0,407	0,332	0,232
AG4	Na	6	6	6	7	7
	Rs	5,901	5,706	5,856	6,005	5,967
	H_O	0,667	0,759	0,550	0,500	0,619
	H_E	0,669	0,668	0,570	0,647	0,639
	F_{IS}	0,003	-0,139	0,035	0,229	0,041
AG5	Na	5	5	5	5	5
	Rs	4,992	4,656	4,991	4,946	4,981
	H_O	0,605	0,656	0,675	0,588	0,631
	H_E	0,715	0,692	0,761	0,703	0,719
	F_{IS}	0,156	0,052	0,114	0,165	0,125
AG7	Na	4	4	4	4	4
	Rs	4,867	3,655	3,992	3,784	4,249
	H_O	0,400***	0,906***	0,525	0,571	0,601
	H_E	0,652	0,589	0,539	0,537	0,579
	F_{IS}	0,389	-0,553	0,025	-0,065	-0,009
AT1	Na	6	6	6	6	6
	Rs	5,992	6,000	5,989	5,443	5,978
	H_O	0,500***	0,400***	0,371***	0,923***	0,549
	H_E	0,792	0,815	0,812	0,713	0,787
	F_{IS}	0,373	0,514	0,546	-0,300	0,265
B07	Na	6	5	6	5	6
	Rs	5,005	4,375	4,860	4,703	4,605
	H_O	0,447	0,300	0,308***	0,290***	0,336
	H_E	0,566	0,301	0,488	0,455	0,454
	F_{IS}	0,211	0,002	0,372	0,367	0,270
Médias	H_O	0,470	0,527	0,430	0,474	0,475
	H_E	0,594	0,569	0,559	0,530	0,564
	F_{IS}	0,212	0,075	0,234	0,108	0,162

JT = Jorge Teixeira; COR = Coroado; P14 = Praça 14 de Janeiro; CN = Cidade Nova. N: número de mosquitos analisados, Na: número de alelos, Rs: riqueza alélica, H_O: heterozigosidase observada, H_E: heterozigosidase esperada, F_{IS}: coeficiente de endocruzamento. Os valores com asteriscos indicam desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, após o ajuste da correção de Bonferroni (Rice, 1989); **P<0,01; *** P<0,001.

6.2 – Testes para o Desequilíbrio de Ligação

Neste trabalho, dos 144 testes de desequilíbrio de ligação realizados para as amostras da estação chuvosa, apenas 2 comparações mostraram desequilíbrio para o par de locos: *AG1*/*AG3* no Jorge Teixeira e na Praça 14 de Janeiro. Na estação seca, dos 144 testes, 3 revelaram desequilíbrio para o par de locos *AG1*/*AG3* no Coroado, na Praça 14 de Janeiro e na Cidade Nova. Entretanto, o desequilíbrio de ligação observado para este par de locos não foi observado em todas as amostras das duas estações simultaneamente. Portanto, é pouco provável que estes locos estejam, de fato, ligados (Tabelas 4 e 5).

6.3 – Estrutura Genética e Isolamento por Distância (IBD)

A tabela 6 apresenta os valores de F_{ST} par-a-par e *Nm*, os quais foram baixos e altos, sendo infinitos entre algumas localidades, respectivamente, sugestivo para a existência de baixa estruturação e intenso fluxo gênico entre as populações das localidades amostradas na estação chuvosa.

Na estação seca, também foi observada uma baixa diferenciação entre as amostras, porém esta foi maior em relação à chuvosa, visto que os valores de F_{ST} par-a-par foram maiores e estatisticamente significantes nas comparações envolvendo a amostra da Praça 14 de Janeiro e as demais. Esta maior estruturação foi corroborada pelas menores estimativas do número de migrantes, em relação ao período chuvoso (Tabelas 6 e 7).

Isto indica um menor fluxo gênico entre as localidades no período seco, resultando em maior estruturação no período de menor precipitação.

Tabela 6 – Estimativas de diferenciação ($F_{ST,}$ abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm*, acima da diagonal) par-a-par entre as quatro amostras de *Ae. aegypti* coletadas em Manaus durante a estação chuvosa.

	JT	COR	P14	CN
JT	-	Infinito	52,419	56,554
COR	-0,023	-	Infinito	Infinito
P14	0,0095	-0,011	-	178,753
CN	0,0088	-0,011	0,003	-

JT = Jorge Teixeira; COR = Coroado; P14 = Praça 14 de Janeiro; CN = Cidade Nova.

Número de permutações =1023.

Tabela 7 - Estimativas de diferenciação ($F_{ST,}$ abaixo da diagonal) e fluxo gênico (*Nm*, acima da diagonal) par-a-par entre as quatro amostras de *Ae. aegypti* coletadas em Manaus durante a estação seca.

	JT	COR	P14	CN
JT	-	659,153	11,095	71,000
COR	0,0008	-	7,742	Infinito
P14	0,043*	0,061*	-	14,630
CN	0,007	-0,002	0,033*	-

JT = Jorge Teixeira; COR = Coroado; P14 = Praça 14 de Janeiro; CN = Cidade Nova.

Número de permutações =1023. * P < 0,01, após a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada considerando-se as amostras da estação chuvosa, da estação seca e a comparação entre as amostras das duas estações. Entre as amostras da estação chuvosa, a estruturação foi baixa e não-significativa (F_{ST} = -0,0041; P > 0,05). No entanto, observou-se uma maior diferenciação entre as amostragens da estação seca, com o valor de F_{ST} significativo (F_{ST} = 0,025, P < 0,001). Na comparação entre as estações, todos os níveis foram significativos (P < 0,05 e P < 0,01) e a estruturação (F_{ST} = 0,023, P < 0,01) foi mais determinada pela diferenciação entre as estações (F_{CT} = 0,014; P < 0,05) do que pela estruturação entre as amostras dentro de cada estação (F_{SC} = 0,009; P < 0,01) (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise da variância molecular (AMOVA), considerando os dois grupos, chuvosa e seca, de *Ae. aegypti*.

Origem da variação	G.L.	Percentagem de variação (%)	Índice de Fixação
Amostras da estação chuvosa			
Entre as amostras	3	-0,41	F_{ST} = -0,0041 (P > 0,05)
Dentro das amostras	326	100,41	
Amostras da estação seca			
Entre as amostras	3	2,52	F_{ST} = 0,025 (P<0,001)
Dentro das amostras	308	97,48	
Comparações			
Entre as estações	1	1,39	F_{CT} = 0,014 (P < 0,05)
Entre as amostras dentro das estações	7	0,90	F_{SC} = 0,009 (P < 0,01)
Dentro das amostras	634	97,70	F_{ST} = 0,023 (P < 0,01)

Número de permutações = 1023. G.L. = graus de liberdade.

As análises de F_{ST} foram também realizadas entre as amostras das duas estações para cada localidade, com o objetivo de se verificar se há diferenças estatisticamente significantes entre as estações. Os resultados desta análise mostraram diferenciação significativa entre as amostras das duas estações para as localidades Praça 14 de Janeiro e Cidade Nova (P<0,05) (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de F_{ST} obtidos entre as estações chuvosa e seca das quatro amostras de *Aedes aegypti* de Manaus.

Amostras/estações	F_{ST}
JT chuvosa X seca	0,0193
COR chuvosa X seca	-0,0134
P14 chuvosa X seca	0,043*
CN chuvosa X seca	0,040*

JT = Jorge Teixeira; COR = Coroado; P14 = Praça 14 de Janeiro; CN = Cidade Nova. Número de permutações =1023. Nível de significância: * P < 0,01, após a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

Com o emprego da análise Bayesiana do Programa *Structure* (Pritchard *et al.,* 2000), os dados do presente estudo foram analisados, a fim de reiterar, ou não, uma suposta estruturação entre as localidades. O número mais provável de agrupamentos foi K = 1 nas duas estações. Seu mais provável valor na estação chuvosa teve probabilidade (P) igual a - 3020 e - 2810 na seca, sugestivo para a existência de uma população panmítica de *Ae. aegypti* em Manaus.

Neste estudo, testou-se também a hipótese de isolamento por distância (IBD), por meio da correlação entre distâncias genética (F_{ST}) e geográfica em quilômetros (Km). Os valores obtidos para o coeficiente de correlação (r), por meio do teste de Mantel (1000 permutações), para as amostras da estação chuvosa (r= 0,423, P= 0,166) e para as amostras da estação seca (r= 0,454, P= 0,236), mostraram que não existe correlação entre distâncias genética e geográfica nas duas estações, pois os valores de P não foram significativos nas duas situações, ou seja, não existe correlação entre distâncias genética e geográfica. Isto era previsto pelo resultado obtido na análise do Programa *Structure* (Pritchard *et al.,* 2000).

6.4 – Tamanho Efetivo de População (N_e) e Análise de Gargalo Populacional

O tamanho efetivo populacional foi estimado a partir de dois modelos, segundo os modelos de desequilíbrio de ligação e excesso de heterozigotos. De acordo com o primeiro modelo, o valor de N_e foi maior em todas as amostras coletadas durante a estação chuvosa, com intervalo de confiança de 95%. O N_e, com base no modelo de excesso de heterozigotos, foi infinito para todas as amostras coletadas nas estações chuvosa e seca (Tabela 10).

Tabela 10 - Tamanho efetivo de populações (*Ne*) das amostras analisadas nas estações chuvosa e seca de *Ae. aegypti,* com base nos modelos de desequilíbrio de ligação (LD) e excesso de heterozigotos (HE).

Amostras	LD	IC de 95%	HE	IC de 95%
Estação chuvosa				
JT	23,3	17,2-33,1	∞	N. A.
COR	31,3	21,4-51,4	∞	N. A.
P14	70,0	39,0-218,0	∞	N. A.
CN	22,3	16,2-32,9	∞	N. A.
Total	105,3	76,8-154,5	∞	N. A.
Estação seca				
JT	20,1	15,3-27,5	∞	N. A.
COR	19,0	13,9-27,6	∞	N. A.
P14	13,5	10,9-17,1	∞	N. A.
CN	8,6	7,0-10,7	∞	N. A.
Total	52,2	42,0-66,0	∞	N. A.

JT = Jorge Teixeira; COR = Coroado; P14 = Praça 14 de Janeiro; CN = Cidade Nova.

IC = Intervalo de confiança; ∞ = Infinito; N. A. = Não aplicado.

Ao se constatar uma redução do tamanho efetivo da estação chuvosa para a seca, segundo o modelo de desequilíbrio de ligacão, fez-se necessário verificar se esta diferença entre as estações resultou do efeito de um gargalo populacional (*bottleneck*), considerando os três modelos evolutivos empregados para microssatélites: modelo dos alelos infinitos, *infinitive alleles model* (IAM), modelo de mutação aos passos, s*tepwise mutation model* (SMM) e modelo de duas fases, t*wo Phase model* (TPM) [3]. Com o modelo IAM, houve um excesso de heterozigotos para a maioria dos locos, para todas as amostras de *Ae. aegypti* nas duas estações. Contudo, nenhuma amostra foi estatisticamente significante. Com o emprego dos modelos SMM e TPM, os resultados foram bastante semelhantes entre si, mas ligeiramente diferentes do primeiro modelo. Aproximadamente a metade dos locos mostrou excesso de heterozigotos e a outra metade deficiência, para a maioria das amostras, com exceção da amostra do Coroado, obtida na estação chuvosa, que apresentou uma tendência para o excesso de heterozigotos, mas nenhum teste foi

estatisticamente significante. No geral, estes resultados sugerem equilíbrio entre mutação e deriva. Contudo, no modelo IAM, houve uma tendência para o excesso de heterozigotos para todas as amostras, indicando que as populações poderiam ter sofrido um *bottleneck* recente. Mas, este resultado deve ser interpretado com cautela, pois pode ser devido ao modelo mutacional empregado e/ou ao número baixo de locos analisados neste estudo (Tabela 11).

---

[3] Existem três modelos evolutivos aplicados aos microssatélites:

1. modelo dos alelos infinitos, *infinitive alleles model* - IAM (Kimura e Crow, 1964): qualquer evento mutacional ocasiona o aparecimento de um novo alelo pela adição de um, ou mais, motivo de repetição, com tamanho independente do alelo original, uma vez que se gera um estado alélico nunca antes encontrado. A estimativa do F_{ST} basea-se neste modelo.
2. modelo de mutação aos passos, *stepwise mutation model* - SMM (Kimura e Ohta, 1978): a presença de novos alelos decorre da perda ou ganho de uma unidade de repetição e os alelos existentes variariam entre estados alélicos presentes na população. Este modelo é empregado para o cálculo do R_{ST} (Slatkin,1995).
3. modelo de duas fases, t*wo Phase model* - TPM (DiRienzo *et al*., 1994): tentativa de abordagem para a evolução dos microssatélites como um processo de maior complexidade, tornando o seu processo matemático mais complexo. Não existem estimativas de diferenciação genética baseadas neste modelo.

Tabela 11 – Testes de heterozigosidade analisados para os três modelos mutacionais das amostras de *Ae. aegypti* nas duas estações, chuvosa e seca, de Manaus, Amazonas.

			Populações							
			Estação Chuvosa				**Estação Seca**			
Testes de Heterozigosidade	**Modelos**		**JT**	**CO**	**P14**	**CN**	**JT**	**CO**	**P14**	**CN**
	IAM	He < Heq	3	2	2	2	3	2	3	2
		He > Heq	6	7	7	7	6	7	6	7
		P (He > Heq)	0,35	0,15	0,16	0,15	0,39	0,16	0,38	0,14
	SMM	He < Heq	4	4	5	4	5	5	5	5
		He > Heq	5	5	4	5	4	4	4	4
		P (He > Heq)	0,52	0,54	0,28	0,53	0,26	0,27	0,27	0,30
	TPM (90%)	He < Heq	4	3	4	4	4	4	5	4
		He > Heq	5	6	5	5	5	5	4	5
		P (He > Heq)	0,53	0,46	0,54	0,55	0,52	0,53	0,29	0,56

IAM: modelo dos alelos infinitos; SMM: modelo de mutação aos passos; TPM: modelo de duas fases.

He: heterozigosidade esperada e Heq: heterozigosidade esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva.

7. Discussão

7.1 Análise de Variabilidade Genética

Considerando-se as duas estações chuvosa e seca, os nove locos microssatélites dinucleotídeos analisados foram polimórficos nas oito amostras de *Ae. aegypti* de Manaus. No entanto, o nível de variabilidade genética encontrado foi inferior aos trabalhos de caracterização destes locos SSR (chuvosa: Ho = 0,410 a 0,525; seca: Ho = 0,430 a 0,527). Estes índices apresentaram valores menores aos encontrados nos trabalhos de caracterização dos microssatélites de *Ae. aegypti*, desenvolvidos por Chambers *et al.* (2007) e Slotman *et al.* (2007). No primeiro, onde o presente estudo escolheu um dos seus locos, o *B07,* detectaram-se 11 alelos em populações das localidades *Curepe* e *Oropouche* e a H_O igual a 0,800. No segundo, cinco a dez alelos foram observados em populações do Quênia e da Tanzânia e os maiores valores de H_O foram 0,700 (Quênia) e 0,867 (Tailândia).

Um resultado semelhante ao presente trabalho foi encontrado por Ravel *et al.* (2002), utilizando três outros marcadores microssatélites. Encontraram-se entre um e sete alelos e a H_O variou entre 0,00 e 0,674 nas quatro populações de Costa do Marfim. Uma destas populações foi amostrada em dois períodos (análise temporal), em 1998 e em 1999, o número de alelos oscilou entre dois e sete, a H_O variou entre 0,00 e 0,364 na primeira amostragem de 1998 e entre 0,028 e 0,341 na segunda amostragem de 1999.

Locos pouco polimórficos foram também observados em duas populações do México, com número de alelos variando de dois a três por loco e a H_O entre 0,125 a 0,389 (Ravel *et al.*, 2001). Mais recentemente, um número maior de locos (8) foi empregado por Paupy *et al.* (2008), que compararam populações domésticas e selvagens de *Ae. aegypti* do Norte de Camarões. A riqueza alélica (R_S) e a H_E foram de 0,029 a 0,038 e de 0,370 a 0,510, respectivamente.

Valores ligeiramente superiores aos deste estudo foram obtidos por Hlaing *et al.* (2010), no qual populações de 36 localidades de Myanmar, Camboja e Tailândia; 17 indivíduos do Sri Lanka e 46 da Nigéria foram analisados, com emprego de todos os 13 locos microssatélites caracterizados por Slotman *et al.* (2007). Neste estudo, a diversidade gênica, assim como a riqueza alélica, superaram àquelas obtidas no presente estudo.

Diferente do *Ae. aegypti*, os microssatélites têm mostrado elevados níveis de variabilidade em espécies do gênero *Anopheles*, tais como em *Anopheles darlingi* (Scarpassa e Conn, 2007; Mirabello *et al.*, 2008) e *Anopheles gambiae* (Lanzaro *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 1996), dois eficientes vetores de malária. Em populações de *An. darlingi* da Amazônia brasileira, observaram-se de cinco a 25 alelos por loco e H_E entre 0,519 e 0,949 (Scarpassa e Conn, 2007).

Apesar da diferença entre as citadas espécies, a diversidade genética de *Ae. aegypti* em Manaus pode estar relacionada ao alto índice demográfico desta cidade, à presença de portos fluviais, de um polo industrial e de um elevado fluxo de pessoas, fatores que provocariam a dispersão passiva deste vetor (Scarpassa *et al.*, 2008; Lima-Júnior & Scarpassa, 2009).

Os níveis de variabilidade genética de uma dada espécie dependem também da distribuição das suas populações, seus tamanhos, do modo e taxas de fluxo gênico, dos processos de extinção e recolonizações. Em contraposição às espécies de *Anopheles*, *Ae. aegypti*, por ser considerada uma espécie altamente antropofílica, endofílica, de hábitos de criação no ambiente doméstico (intradomicílio e/ou peridomicílio) e por ser um eficiente vetor de doenças transmitidas ao homem (Paupy *et al.* 2008), tem suas populações constantemente submetidas ao controle focal com inseticidas, como conseqüência, está sujeita à constante redução e expansão do tamanho populacional. Esforços de controle intenso contra o vetor podem levar a uma drástica redução, ou até a extinção, local das populações, resultando na perda de alelos e, consequentemente, da variabilidade genética por deriva genética aleatória. Além deste, na estação seca (verão) ocorre redução do número de criadouros artificiais para as oviposições e desenvolvimento dos estágios imaturos, acarretando a diminuição das populações de *Ae. aegypti*, com perdas de variabilidade genética por deriva genética. Além destes fatores, a taxa de migração ativa deste vetor parece ser relativamente baixa, sendo descritos na literatura, no máximo 800 metros (Forattini, 2002), o que pode restringir ainda mais o fluxo gênico com outras populações. Todos estes fatores podem explicar os menores índices de variabilidade genética encontrados para os microssatélites em *Ae. aegypti*, em relação aos anofelinos.

Contudo, os nove locos microssatélites utilizados neste estudo apresentaram níveis de variabilidade genética de quatro a cinco vezes mais elevados, em comparação às isoenzimas. Fraga *et al.* (2003) estimaram a variabilidade genética

de amostras de *Ae. aegypti* de quatro bairros de Manaus (Compensa, Coroado, Cidade Nova e Centro), com emprego de isoenzimas, sendo dois dos quatro bairros utilizados no presente estudo. Encontraram o número de alelos por loco de 1,6 a 1,7 e uma H_O média de 0,109 a 0,152.

Desvios significativos do EHW, após a correção de Bonferroni (Rice, 1989), foram observados tanto nas amostras da estação chuvosa (oito de 36 testes), quanto nas amostras da estação seca (13 de 36 testes), porém com percentual maior para esta última. Na maioria dos casos, os desvios sugeriram deficiência de genótipos heterozigotos, com valores positivos para o F_{IS}. Deficiências significativas de genótipos heterozigotos, em relação ao esperado, podem ser interpretadas como decorrentes de subdivisão de população (efeito *Wahlund*), endogamia, seleção e alelos nulos. Contudo, o efeito *Wahlund* parece ser uma explicação improvável para os resultados do presente estudo, pois afetaria todo o genoma, e dois locos (*AG7* na amostra do Coroado e *AT1* na amostra da Cidade Nova, ambos na estação seca) apresentaram desvios altamente significantes e valores de F_{IS} negativos (-0,553 e -0,300, respectivamente), indicando um expressivo excesso de heterozigotos.

Mesmo que os resultados obtidos neste estudo não comprovem a presença de alelos nulos. A hipótese de sua existência para explicar a deficiência de heterozigotos poderia ser considerada, visto que são bastante freqüentes em microssatélites e faz com que um indivíduo heterozigoto seja genotipado como homozigoto, devido a novas mutações na região de anelamento dos *primers*. Além disso, devido à presença de alelos nulos nos locos, podem ser observados indivíduos sem banda ou pico, sugerindo que este indivíduo possa ser homozigoto para um alelo nulo ou, ainda, heterozigoto para dois alelos nulos. Alternativamente, a deficiência de heterozigotos pode ser um resultado de endogamia, que favorece o aumento da frequência de indivíduos homozigotos observados, em relação aos esperados.

No caso dos excessos significativos de genótipos heterozigotos nos locos *AG7* e *AT1* nas amostras do Coroado e Cidade Nova, respectivamente, existe a hipótese de que seleção esteja atuando nestes locos, onde os genótipos heterozigotos teriam maiores *fitness* comparados com os homozigotos, durante a estação seca, o que seria uma estratégia de sobrevivência da espécie frente aos fatores ambientais adversos. Uma situação semelhante foi observada em populações de *An. darlingi* durante a estação chuvosa, onde foi constatada uma

elevada freqüência de inversões cromossômicas heterozigotas nesta estação (Tadei *et al.*, 1982). Este resultado foi interpretado como estratégia adaptativa da espécie para explorar mais nichos ecológicos, uma vez que na estação chuvosa, há um maior número de criadouros. Outros resultados semelhantes foram obtidos para *An. nuneztovari* com análises de inversões dos cromossomos politênicos (Conn *et al.*, 1993) e com marcadores isoenzimáticos (Scarpassa *et al.*, 1999).

Na amostra da Praça 14 de Janeiro obtida na estação chuvosa, os nove locos mostraram-se em EWH, enquanto a amostra da estação da seca, para esta mesma localidade, houve desvios do EWH para três (*AG3*, *AT1* e *B07*) dos nove locos. Isto nos chama atenção para o fato de que a amostragem desta localidade na estação chuvosa apresentou o valor de *Ne* elevado (70,0), enquanto na estação seca, o valor de *Ne* foi quase cinco vezes menor (13,5), segundo o modelo de desequilíbrio de ligação. Deste modo, o cruzamento entre indivíduos aparentados (*inbreeding*) seria uma das explicações prováveis para os desvios do EHW, que resultou na deficiência de heterozigotos observados nesta amostra. Estes resultados podem ser explicados como decorrentes da redução drástica da população natural de *Ae. aegypti* para esta localidade, provavelmente devido à redução do número de criadouros disponíveis na estação seca, para as fêmeas de *Ae. aegypti* realizarem suas oviposições, resultando na maior probabilidade de endocruzamentos. Corroborando ainda para esta hipótese, a amostra da Praça 14 de Janeiro da estação seca foi a que apresentou menor H_O média (H_O = 0,430). Além de haver, nesta localidade um controle expressivo com inseticida, mesmo na estação seca, pela quantidade elevada de potenciais criadouros para o mosquito (borracharias, oficinas, entre outros) e também por ter sido sua presença registrada, pela primeira vez, na cidade de Manaus em 1996, por meio da Fundação de Medicina Tropical/ Instituto de Medicina Tropical do Amazonas (FMT/IMT-AM) na Praça 14 de Janeiro.

Neste trabalho, dos 144 testes de desequilíbrio de ligação realizados para as amostras da estação chuvosa, apenas duas comparações mostraram desequilíbrio, entre os locos *AG1* e *AG3*. Na estação seca, dos 144 testes, três revelaram desequilíbrio para os mesmos pares de locos. Entretanto, estes testes obtidos não foram observados entre os citados locos nas quatro localidades e nem nas duas estações consideradas. Portanto, é pouco provável que estes locos estejam, de fato, ligados.

Segundo Weir (1996), qualquer associação entre alelos de dois locos será referida como desequilíbrio de ligação, mesmo que isto não represente, de fato, ligação entre estes locos, mesmo que as freqüências alélicas em diferentes locos possam mostrar associação entre os mesmos, até quando os locos não estão ligados (Martinez, 2008), como muito provavelmente ocorreu neste estudo.

No entanto, o desequilíbrio de ligação entre locos pode resultar também do efeito *Wahlund*, , endogamia, seleção, deriva genética e fluxo gênico.

7.2 Comparação da Estrutura Genética de Populações

As análises de estrutura genética entre as amostras da estação chuvosa, reveladas pelas análises de distância genética (F_{ST} par-a-par), AMOVA e do *Structure*, revelaram homogeneidade genética para as populações de *Ae. aegypti* nos bairros amostrados de Manaus. No entanto, as amostras obtidas na estação seca foram significativamente estruturadas entre a Praça 14 de Janeiro e as demais localidades, apesar de ter sido detectado um nível baixo de diferenciação neste período. Entre as estações, houve diferenciação significativa na Praça 14 de Janeiro e na Cidade Nova.

Padrões distintos de diferenciação entre as estações podem ocorrer em populações de *Ae. aegypti* por diversos fatores. Os climáticos, como a precipitação, são de extrema importância para o surgimento dos locais de oviposição. Visto que o aumento da precipitação favorece o aumento da densidade populacional, proporcionando maior dispersão das fêmeas, um incremento no fluxo gênico e consequentemente, uma menor diferenciação no período chuvoso. Ao contrário, no período seco, espera-se uma maior diferenciação, associada a uma menor precipitação, que reduz a oferta de criadouros, provocando um gargalo populacional e isso acarretaria uma redução da variabilidade genética (Paupy *et al.*, 2005).

Fatores humanos, como o uso de inseticidas e a prática de armazenar água também podem provocar níveis distintos de diferenciação nas populações de *Ae. aegypti* (Paupy, 2005). Segundo McCauley (1991), o controle com inseticidas provoca subdivisão entre populações de mosquito, ocasionando estruturação, como verificado em *Seam Reap*, no Camboja. Já em *Kampong Som* (Camboja), onde o uso de inseticidas é menos intenso, verificou-se menor diferenciação entre as populações de *Ae. aegypti* (Paupy, 2005).

A prática de armazenar água também pode afetar a estrutura genética em populações de mosquitos. Em *Phon Penh* (Camboja), em média, 570.000 pessoas vivem em área urbana e devido à imigração descontrolada e à urbanização sem o adequado saneamento básico, há uma deficiência no armazenamento de água, levando à prática de estocar água e, por conseguinte, existe uma manutenção dos locais para a oviposição das fêmeas de *Ae. aegypti*. Assim, nestes locais, a baixa diferenciação em populações deste mosquito pode ser atribuída à permanência de altas densidades de *Ae. aegypti* e ao intenso fluxo gênico nestas localidades, independente de fatores sazonais (Paupy, 2005). Situação semelhante pode ter ocorrido nos bairros Coroado e Jorge Teixeira, locais onde os seus moradores armazenam água para suas atividades diárias.

Um resultado diferente foi obtido por Costa-Ribeiro *et al.* (2006a). Estes autores analisaram a genética espacial e temporal de populações de *Ae. aegypti* da cidade do Rio de Janeiro e encontraram elevada diferenciação genética entre as populações deste mosquito. A justificativa destes autores foi relacionada à ampla disponibilidade de criadouros nas localidades estudadas, fazendo as fêmeas migrarem menos para realizarem suas oviposições. Entretanto, a estruturação genética foi menor no período seco, em detrimento da redução dos criadouros disponíveis à oviposição das fêmeas, que acumulam água somente nos períodos de chuva. Assim, quando estes criadouros reduzem em quantidade (no período seco), as fêmeas se dispersam mais à procura de locais para oviposição, tornando suas populações de mosquitos geneticamente mais homogêneas. Isto pode ser visto no Coroado e Jorge Teixeira, mesmo ocorrendo estocagem de água, há ainda uma redução dos criadouros pela queda dos índices pluviométricos no período seco.

Segundo Edman *et al.* (1998), em teoria, a disponibilidade dos locais de oviposição é inversamente correlacionada ao potencial de dispersão das fêmeas de *Ae. aegypti*. Portanto, no período seco, as fêmeas tendem a se dispersar, a fim de encontrar locais para realizar sua oviposição. Além disto, este comportamento de dispersão reduz a competição entre indivíduos aparentados (Taylor, 1988).

Nos subúrbios do Rio de Janeiro, há uma precariedade no saneamento básico e no abastecimento de água, os quais favorecem à proliferação do mosquito, mesmo no período de poucas chuvas. Além disso, a violência urbana dificulta a execução de medidas de controle nestes locais e, por consequência, os mosquitos

destas áreas não tratadas invadem áreas tratadas e homogeneízam geneticamente as populações na estação seca (Costa-Ribeiro *et al.*, 2006a).

Na cidade de *Ho Chi Minh* (Vietnã), a diferenciação genética foi menor na estação chuvosa e aumentou na estação seca nas populações dos bairros do Centro, semelhante ao ocorrido na Praça 14 de Janeiro e Cidade Nova. No entanto, o inverso foi observado em um bairro do subúrbio, onde a estruturação foi mais evidente na chuvosa e mais discreta na estação seca (Huber *et al.*, 2002a).

O abastecimento de água é precário nos subúrbios da cidade de *Ho Chi Minh*, havendo a necessidade de armazenamento de água no interior das residências. Esta prática favorece a manutenção dos locais de oviposição para as fêmeas do mosquito *Ae. aegypti*, durante todo o ano, onde as fêmeas não necessitam se dispersar para realizarem as suas oviposições. Estes fatores têm causado a estruturação genética nas populações deste vetor naquela cidade. No entanto, o contrário acontece nos bairros do centro, onde o abastecimento de água é regular e constante e, consequentemente, não havendo a necessidade de a população armazenar água para suas atividades diárias. Nestas localidades, as larvas de *Ae. aegypti* somente são encontradas em recipientes abandonados próximos às residências, que somente secam durante a estação seca, causando um decréscimo na densidade do *Ae. aegypti*. Esta situação provoca um gargalo populacional, acarretando a redução da variabilidade genética por deriva genética aleatória durante o período seco (Huber *et al.*, 2002a). Isto pode ser aplicado à Praça 14 de Janeiro e à Cidade Nova.

Durante a estação chuvosa, ocorre aplicação de inseticida (permetrina) nos bairros do subúrbio de *Ho Chi Minh*, este é utilizado para o controle do vetor da malária, mas também poderia ter atuação sobre as populações de *Ae. aegypti*, mesmo Huber *et al.* (2002a) *apud* Huber *et al.* (2000) encontrado alta resistência à permetrina em populações de *Ae. aegypti*. Este tipo de controle poderia ser responsável por gerar gargalos populacionais, os quais reduziriam a variabilidade genética e levaria a uma significativa diferenciação em populações do vetor do dengue durante o período chuvoso.

Entretanto, no período seco, a diferenciação genética foi menor nos bairros dos subúrbios, decorrente de migrações de mosquitos procedentes de áreas não tratadas para áreas tratadas com inseticidas, havendo uma intensa troca genética entre as populações no subúrbio de *Ho Chi Minh*. Esta situação leva à redução do

nível de diferenciação das populações de *Ae. aegypti* durante a estação seca ou a manutenção da homogeneidade genética, como visto no Coroado e Jorge Teixeira.

Em Manaus, ocorreu uma situação semelhante, pois o abastecimento de água que chegava à população é irregular em algumas localidades, assim como as condições de saneamento foram inadequadas em duas das localidades aqui amostradas: Jorge Teixeira e Coroado. Esta situação fez com que a população armazenasse água, dentro e ao redor das residências. Esta prática ampliou os sítios de reprodução para as fêmeas de *Ae. aegypti*, favorecendo altas densidades do vetor durante todo o ano. Esta prática pode explicar nossos resultados, para as amostras dos bairros Jorge Teixeira e Coroado, nos quais não foram observadas diferenças significantes entre as amostras das duas estações e houve pouca variação nos valores de *Ne.*

Nas amostras da Praça 14 de Janeiro e Cidade Nova, a diferenciação genética foi significativa entre as duas amostras das estações chuvosa e seca. Este resultado pode ser explicado pelo fato do abastecimento de água ter sido constante. Em particular, na Praça 14 de Janeiro, os criadouros para as fêmeas do *Ae. aegypti* foram basicamente recipientes descartados nas ruas, pneus em borracharias e peças em oficinas de veículos, por exemplo, que só foram preenchidos por água, durante o período de chuva. No período seco, estes criadouros desapareceram e as fêmeas ovipuseram nos escassos criadouros, que persistiram mesmo no período de menor precipitação. Esta redução nos sítios de oviposição levou à diminuição da densidade do mosquito, resultando provavelmente em um gargalo populacional, como demonstrado pelos valores de *Ne* para esta localidade, com quedas na variabilidade por deriva genética. Tal fato acarretou uma maior estruturação nesta localidade no período seco. Reforçando nossa hipótese de gargalo populacional, durante as coletas realizadas no período seco neste bairro, ocorreram grandes dificuldades para compor a amostragem, pois grande parte dos pontos visitados, entre eles, os estratégicos, foram negativos para a presença do vetor da dengue.

Dois outros estudos realizados em populações de *Ae. aegypti* de Manaus com os genes *COI* e *ND4*, ambos marcadores mitocondriais, revelaram também estrutura genética não significante (Scarpassa *et al.*, 2008; Lima-Júnior e Scarpassa, 2009). Porém, o fluxo gênico observado entre as amostras foi menor com os marcadores mitocondriais, em relação aos microssatélites.

Embora a distância genética, estimada pelo F_{ST} par-a-par e AMOVA tenha sido baixa, os testes de isolamento por distância indicaram ausência de correlação entre distâncias genética e geográfica nas duas estações, sugerindo que a diferenciação genética independe das distâncias geográficas. No caso da estação seca, este resultado deveu-se principalmente pela maior distância genética entre as amostras do Coroado e da Praça 14 de Janeiro. Ausência de isolamento por distância entre as populações de *Ae. aegypti* foi observada na maioria dos estudos (Huber *et al.*, 2002; 2008; Paupy *et al.*, 2008; Scarpassa *et al.*, 2008; Lima-Júnior e Scarpassa, 2009), decorrente provavelmente de fatores sócio-ambientais, dispersão passiva, atividades de controle do vetor, seguidos de eventos de extinção, colonização, recolonização e deriva genética (Scarpassa *et al.*, 2008).

Em resumo, nas quatro localidades de Manaus, houve uma baixa estruturação genética, exceto entre a Praça 14 e as demais localidades, muito provável pelo uso de inseticida e pela queda dos criadouros do mosquito na estação seca. Entre as estações, verificou-se estruturação nas localidades Praça 14 de Janeiro e Cidade Nova, tanto pelo controle químico, quanto pela diminuição dos sítios de oviposição no período seco.

Padrões distintos de diferenciação do *Ae. aegypti* entre as estações podem contribuir para o seu controle, visto que mesmo não havendo diferenças genéticas relevantes entre suas populações, o mosquito continua se reproduzindo no período de menores índices pluviométricos, depositando ovos, que podem ser viáveis nos criadouros por cerca de um ano, fato que exige medidas de controle constantes deste vetor, não somente quando já estão ocorrendo as epidemias de dengue no Brasil e em outras áreas endêmicas.

8. Conclusões

Utilizando-se nove locos microssatélites desenvolvidos para o *Ae. aegypti* na análise genético-temporal de quatro populações em Manaus-AM, concluíram-se que:

1- Todos os locos mostraram-se úteis para estimar a variabilidade genética de populações de *Ae. aegypti*. Os nove locos foram polimórficos nas quatro amostras das estações chuvosa e seca, com um número total de 41 alelos.

2- Os índices de variabilidade genética encontrados, neste estudo, foram inferiores aos de outros vetores importantes na Amazônia Brasileira, por ser o vetor do dengue mais vulnerável aos fatores ambientais e sócio-culturais.

3- Os níveis de diferenciação encontrados mostraram uma baixa estruturação entre as quatro localidades. Entretanto, significativa entre a Praça 14 de Janeiro e as outras localidades na estação seca e entre as estações, também houve significância na Cidade Nova entre os períodos. Isto pode exigir a implementação de medidas de controle diferenciadas nestas localidades.

4- Apesar da prevalência de homogeneidade das populações dentro e entre as estações, medidas de controle do vetor da dengue devem ser permanentes, exercidas por todo o ano. Uma vez que o mosquito se reproduz por todo o ano, com ovos viáveis por até um ano, e desta forma, estariam-se implementando medidas profiláticas, que poderiam reduzir de forma definitiva a incidência da dengue.

5- Diferenças verificadas na dinâmica populacional do *Ae. aegypti* entre as estações sugerem implementações de medidas de controle deste vetor também no período seco, período de menor incidência de dengue, mas de sobrevivência de populações cujos descendentes serão vetores desta doença no período chuvoso.

6- Estudos sazonais fornecem informações úteis para validar estudos genéticos feitos num único momento e provem explicações sobre quais fatores estariam agindo para provocar mudanças genéticas em um curto intervalo de tempo, corroborando provavelmente para um controle mais efetivo do vetor da dengue.

9. Referências

ARMAM - Agência Reguladora dos Serviços Públicos Concedidos do Estado do Amazonas. Disponível em: <http://www.arsam.am.gov.br>. Acesso em: 23 de set. de 2010.

Barata, E.A.M. de F.; Costa, A.I.P da; Chiaravalloti-Neto, F.; Glasser, C.M.; Barata, J.M.S.; Natal, D. 2001. População de *Aedes aegypti* (l.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 35 (3): 237-242.

Chambers, E. W.; Meece, J.K.; McGowan, J.A.; Lovin, D.D.; Hemme, R.R.; Chadee, D.D.; McAbee, K.; Brown, S.E.; Knudson, D.L.; Severson, D.W. 2007. *Journal of Heredity*, 98(3): 202-210

Charrel, R.N.; Lamballerie, X. de; Raoult, D. 2007. Chikungunya Outbreaks-The Globalization of vector-borne diseases. *N. England J. Med*., 356: 769-771.

Collins, F.H.; Mendez, M.A.; Rasmussen, M.O.; Mehaffey, P.C.; Besansky, N.J., Finnerty, V. 1987. A Ribossomal RNA gene probe differentiations member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37: 37-41.

Conn, J.; Puertas, Y.R.; Seawright, J.A. 1993. A new cytotype of *Anopheles nuneztovari* from Western Venezuela and Colombia. *J. Am. Control. Assoc*. 9: 294-301.

Consoli, R.A.G.B. e Oliveira, R.L.D. 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de janeiro, Brasil, 225 pp.

Cornuet, J.M. e Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for inferring recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 144: 2001-2014.

Costa-Ribeiro, M.C.V. da; Lourenço-de-Oliveira, R.; Failloux, A.-B. 2006a. Geographic and temporal genetic patterns of *Aedes aegypti* populations in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Medicine and International Health* 2 (8), 1276-1285.

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

Creste, S.; Tulmann-Neto, A.; Figueira, A. 2001. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polycrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. *Plant Molecular Biology Report*. 19: 299-306.

Detinova, T.S. 1968. Methods of determining the physiological age of female. Age grouping methods in Diptera of medical importance. *Annual Review of entomology*, 13: 427-450.

Diniz, F.M.; Iyengar, A.; Lima, P. S. da C.; Maclean, N.; Bentzen, Paul. 2007. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. *Genetics and Molecular Biology*. 30 (2): 380-384.

DiRienzo, A.; Peterson, A. C.; Garza, J. C.; Valdes, A. M.; Slatkin, M. 1994 Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceeding of the National of The National Academy of Scienses of The USA*. 91**:** 3166–3170.

Donalísio, M.R. e Glasser, C.M. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do Dengue. *Rev. Bras. Epidemiol*. 5 (3), 259-272.

Edman, J. D.; Scott, T.W.; Costero, A.; Morisson, A. C.; Harrington, L.C.; Clarck, G.G. 1998. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. *Entomological Society of America*. 35: 578-583.

Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D.B.; Schlötterer, C. (eds), *Microsatellites - evolution and applications*, 4: 34-48.

Ellegren, H. 2004. Microssatellites: simple sequence with complex evolution. *Genetics* 5: 435-445.

Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform***.** *Online*, 1: 47-50.

Failloux, A.B.; Vazeille, M.; Rodhain, F. 2002. Geographic genetic variation in population of the dengue virus Aedes aegypti. *Journal of Molecular Evolution*, 55: 653-663.

Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores em análise genética*. Brasília: Embrapa – Cenargem, 3ª ed., 220p.

Figueiredo, L.T.M.; Cavalcante, S.M.B.; Simões, M.C. 1990. Dengue serologic survey of school children in Rio de Janeiro, Brazil, 1986 and 1987. *Bulletin of Pan American Health Organization* 24: 217-225.

Figueredo, R. M. P. de; Thatcher, B.D.; Lima, M.L. de; Almeida, T.C.; Alecrim, W. D.; Guerra, M.V. de 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.

Figueiredo, R. M., Naveca, F. G., Bastos, M. D., Melo, M. D., Viana, S. D., Mourão, M. P., et al. 2008. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerging infectious diseases*, *14*(4), 667-9.

FIOCRUZ. 2005. O vírus do dengue. Especial dengue. Disponível em: <http:// www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=339&sid=12>. Acesso: 24 de out. de 2008.

Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia Médica, vol. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 860 pp.

Forattini, O.P. e Marques, G. R. A. M. 2000. Nota sobre o encontro de *Aedes aegypti* em bromélias. *Revista de Saúde Pública*, 34 (5): 543-544.

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

FUNASA. 1998. *Casos de dengue e febre amarela no Brasil. Brasília.* Ministério da Saúde.

FUNASA. 2009. *Informe Epidemiológico da Dengue, Semanas 1 a 52 de 2009*. Ministério da Saúde.

FUNASA. 2010. *Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Abril de 2010*. Ministério da Saúde.

Goldstein, D.B.; Schlötterer, C. 1999. Microsatellites: evolution and applications. *Oxford University Press*, New York.

Goudet, J. 2005. HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, *5*(1), 184–186.

Gubler, D.J. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11 (3), 480-496.

Gubler, D.J. 2002. Epidemic dengue/denguehemorrhagic fever as a public health, social, and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiology*, 10 (2): 100-103.

Hlaing, T.; Tun-Lin, W.; Somboon, P.; Socheat, D.; Setha, T.; Min, S. 2010. Spatial genetic structure of Aedes aegypti mosquitoes in mainland Southeast Asia. *Evolutionary Applications*, 3 (4): 319-339.

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

Huber, K; Loan, L. Le; Hoang, T. H.; Tien, T. K.; F.; Failloux, A.-B. 2002a. Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). *Heredity*, 89: 7-14.

Huber, K; Loan, L. Le; Hoang, T. H.; Ravel, S.; Rodhain, F.; Failloux, A.-B. 2002b. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. *Molecular ecology*, 11: 1629-1635.

Huber, K.; Ba, Y.; Dia, I; Mathiot, C.; Sall, A. A.; Diallo, M. 2008. *Aedes aegypti* in Senegal: Genetic Diversity and Genetic Structure of Domestic and Sylvatic Populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg*., 79(2), 218-229.

INMET- Instituto Nacional de Meteorologia. 2009. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br>. Acesso em: 23 de jul. de 2010.

Kimura, M.; Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Proceeding of the National of The National Academy of Scienses of The USA*. 49: 725 - 738.

Kimura, M.; Ohta, T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceeding of the National of The National Academy of Scienses of The USA*. 75: 2868 - 2872.

Lanzaro, G. C.; Zheng, L.; Toure, Y. T.; Traore, S. F.; Kafatos, F. C.; Vernick, K. D. 1995. Microsatellite DNA and isozyme variability in a West African population of Anopheles gambiae. *Insect Molecular Biology*. 4 (2): 105-112.

Lehmann, T.; Hawley, W. A.; Kamau, L.; Fontenille, D.; Simard, F.; Collins, F. H. 1996. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity*. 77: 192-208.

Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Nevo, E. 2004. Microsatellites within genes: structure, function and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6): 991-1007.

Lima-Júnior, R.S. e Scarpassa, V.M. 2009. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA *ND4* gene sequences. *Genetic and Molecular Biology*, 32 (2): 414-422.

Litt M. e Luty J.A. 1989. A hipervariable microssatelitte revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of human genetics* 44: 397-401.

Lourenço-de-Oliveira, R.; Vazeille, M.; Filippis, A.M.B. de; Failloux, A.-B. 2002. Oral Susceptibility to Yellow Fever Virus of Aedes aegypti from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(3): 437-439.

MacDonald, W.W. 1956. *Aedes aegypti* in Malaya, I. Distribution and dispersal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 50 (4): 385 – 398.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27: 209-220.

Martinez, M.L.L. 2008. Aplicação de Marcadores Microssatélites na Caracterização de Recursos Genéticos de *Tabebuia roseo-alba* conservados ex situ no Banco de Germoplasma da Floresta da USP de Ribeirão Preto. Tese (mestrado em Ciências. Área: Biologia Comparada). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP.

Mattingly, P. F. 1957. Genetical aspects of the *Ae. Aegypti* problem: Taxonomy e bionomics. Liverpool University Press. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 51 (4): 391-498.

Mazine, C. A. B.; Macoris, M. L. G.; Andrighetti, M. T. M.; Yasumaro, S.; Silva, M. E.; Nelson, M. J.; Winch, P. J. 1996. Disposable containers as larval habitats for *Aedes aegypti* in a city with regular refuse collection: a study in Marília, São Paulo State, Brazil. *Acta tropica*, 62 (1): 1-13.

McCauley, D.E. 1991. Genetics Consequence of Local Population Extinction and Recolonization. *Trends Ecol. Evol.* 6: 5-8.

Mello, M.P. de; Bachega, T.A.S.S.; Costa-Santos, M. da; Mermejo, L.M.; Castro, M. de. 2002. Bases Moleculares da Hiperplasia Adrenal Congênita. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabólica*, 46(4): 457 – 477.

Miller, M.P. 1997. *TFPGA – Tools for populations genetics analyses*. V 1.3 A Window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.

Mirabello, L.; Vinies, J.H.; Yanoviak, S.P.; Scarpassa, V.M**.;** Póvoa, M.M.; Padilha, N.; Achee, N.L.; Conn, J.E. 2008. Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *BMC Ecology*, 8 (3): 1-15.

Mullis, K.B. e Faloona, F. 1987. Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase Catalysed Chain Reaction. *Method Enzymol*. 155: 335-350.

Nogueira, R.M.R.; Miagostovich, M.P.; Schatzmayr, H.G.; Santos, F.B. dos; Araújo, E.S.M.; Filippis, A.M. de; Souza, R.V. de; Zagne, S.M.O.; Nicolai, C.; Baran, M.; Teixeira-Filho, G. 1999. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (3): 297-304.

Nogueira, R.M.R; Miagostovich, M.P.; Schatzmayr, H.G. 2002. Dengue viruses in Brazil. Dengue Bulletin 26, 77-83.

Ocampo, C. B. e Wesson, D. M. 2004. Population dynamics of Aedes aegypti from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(4): 506-513.

Oliveira, E. J.; Zucchi, M. I.; Vencovsky, R. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *DNA Repair*, *307*, 294-307.

Oosterhout, C.V.; Hutchinson, W.F.; Willis, D.P.M.; Shipley, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4:535-538.

Paduan, K. S.; Araújo-Júnior, J. A.; 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.

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

Park, S. D E. 2001. *MSTools*. Version 3. [http://acer.gen.tcd.ie/sdepark/ms-toolkit].

Paupy, C.; Vazeille-Falcoz, M.; Mousson, L.; Rodhain, F.; Failloux, A.-B. 2000. Aedes aegypti in Tahiti and Moorea (French Polinesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population density. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2), 217-224.

Paupy, C.; Chantha, N.; Reynes, J.-M.; Failloux, A.-B. 2005. Factors influencing the population structure of *Aedes aegypti* from the many cities in Cambodia. *Heredity*. 95: 144-147.

Paupy, C.; Brengues, C., Kamgang, B.; Herve, J.-P.; Fontenille, D.; Simard, F. 2008. Gene Flow Between Domestic and Sylvan Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. *Journal of Medical Entomology*. 45(3): 391-400.

Peel D., Ovenden J.R.; Peel S.L. 2004. *NEESTIMATOR*: *software for estimating effective population size, Version 1.3*. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries, St Lucia, Queensland.

Pinheiro, F.P. e Corber S.J. 1997.Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Statistics Quartely*, 50: 161-169.

Pinheiro, F.P. e Nelson, M. 1997. Re-emergence of dengue and emergence of DHF in the Americas. *Dengue Bulletin*, 21:17-24.

Pritchard J.K.; Wen W. 2000. *Documentation for STRUCTURE software: Version 2*. Available from: < http://pritch.bsd.uchicago.edu>.

Pritchard, J., Donnelly, P., Stephens, M. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945. Genetics Soc America. Retrieved from http://www.genetics.org/cgi/content/abstract/155/2/945.

Ravel, S.; Monteny, Nicole; Olmos, Dolores Velasco; Verdugo, Juan Escalante; Cuny, Gèrard. 2001. A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. *Acta Tropica*, 78: 241-250.

Ravel, S.; Hervé, J.-P..; Diarrassouba, S.; 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 mosquitos from Bouaké. *Acta Tropica*, 82: 39-49.

Raymond, M. e Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.

Reinert, J. F. 1975. Mosquito generic e subgeneric abbreviations (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 7: 105-107.

Reinert, J. F. 1982. Abbreviations for mosquito generic e 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.

Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical test. *Evolution*. 43: 223-225.

Santos, V. M. dos; Macoris, Maria de Lourdes; Andrighetti, Maria Teresa Macoris; Ávila, P.E.; Kirchgatter, K. 2003. Analyses of genetic relatedness between populations of *Ae. aegypti* from different geographic regions of São Paulo State, Brazil. 2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(2): 99-101.

Scarpassa, V.M. e Conn, J.E. 2007. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 (3): 319-327.

Scarpassa, V. M.; Cardoza, T. B.; Cardoso-Júnior, R. P. 2008. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidade) from Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 78(6): 895-903.

Scarpassa, V.M. e Tadei, W.P. 1990. Biologia de Anofelinos Amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae*). Acta Amazônica*, 20 (único): 95-118.

Scarpassa, V.M.; Tadei, W.P.; Suarez, M.F. 1999. Population structure and genetic divergence in *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) from Brazil and Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(6): 1010-1018.

Schatzmayr, H.G.; Nogueira, R.M.R.; Travassos-da-Rosa A.P.A. 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 245-246.

Schatmayr, H.G. 2000. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 179-181.

Schlotterer, C. e Tautz, D. 1991. Slippage syntheses of simple sequence DNA. *Nucleics Acids research* 20 (2): 211-215.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, 18: 233-234.

Scott, T. W., A. Naksathit, J. F. Day, P. Kittayapong, and J. D. Edman. 1997. A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females

feed only on human blood. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 57:235 - 239.

Service, M.W. 2000. Medical entomology for students. 2 ed. Cambridge, University Press, England, United Kingdom, 238pp.

Slatkin, M. 1995. A Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139: 457- 462.

Slotman, M.A.; Kelly, N.B.; Harrington, L.C.; Kitthawee, S; Jones, J.W.; Scott, T.W.; Caccone, A.; Powell, J.R. 2007. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. *Molecular Ecology Notes*, 7: 168-171.

Smith, C.E.G. 1956. The history of dengue in Tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 59: 243-251.

Sylla, M., Bosio, C., Urdaneta-Marquez, L., Ndiaye, M., Black, W. C. 2009. Gene flow, subspecies composition, and dengue virus-2 susceptibility among Aedes aegypti collections in Senegal. *PLoS neglected tropical diseases*, *3*(4): 319-339.

Tadei, W. P.; Santos, J. M. M. dos. 1982. Biologia de anofelinos amazônicos. VII. Estudo da variação de frequências das inversões cromossômicas de Anopheles darlingi Root (Diptera, Culicidae). *Acta Amazônica*. 12 (4): 759-785.

Tauil, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. 2001. *Caderno de Saúde Pública*, 17 (Suplemento): 99-102.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17(16): 6463-6471.

Taylor, P.D. 1988. An Inclusive Fitness Model for Dispersal of Offspring. *Journal of Theoretical Biology*. 130: 363-378.

Travasssos-da-Rosa, A.P.A.; Rocha, J.M.; Silva, O.V.; Lins, Z.C. 1982. Surto de dengue em Boa Vista, Território de Roraima, Brasil. *Boletim Epidemiológico* (Ministério da Saúde), 14: 93-100, 1982.

Urdaneta-Marquez, L.; Bosio, C.; Herrera, F.; Rubio-Palis, Y.; Salasek, M.; Black, W. C. 2008. Genetic Relationships among Aedes aegypti Collections in Venezuela as Determined by Mitichondrial DNA Variation and Nuclear Single

Nucleotide Polymorfisms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 78(3): 479-491.

Vasconcelos, P.F.C.; Travassos-da-Rosa, E.S.; Travassos-da-Rosa, J.F.S.; Freitas, R.B.; Dégallier, N.; Rodrigues, S.G.; Travassos-da-Rosa, A.P.A. 1993. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaina, Tocantins, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35:141-148.

Vasconcelos, P.F.C.; Menezes; D.B.; Melo, L.P.; Pessoa, E.T.F.P.; Rodrigues, S.G.; Travassos da Rosa E.S.;, Timbó, M.J.; Coelho, I.C.B.; Montenegro F.; Travassos-da- Rosa J.F.S.; Andrade, F.M.O.; Travassos-da-Rosa, A.P.A. 1995. A large epidemic of dengue fever with dengue haemorrhagic cases in Fortaleza, Ceará State, Brazil, 1994. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 37: 253-255.

Vasconcelos, P.F.C.; Travassos-da-Rosa, A.P.A; Pinheiro, F.P.; Rodrigues, S.G.; Travassos-da-Rosa, E.S.; Cruz, A.C.R.. 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*, 23.

Wallis, G.P. e Tabachinick, W.J. 1990. Genetic analyses of rock hole and domestic *Aedes aegypti* on the Caribean Island of Angilla (West Indies). *J. Amer. Mosq. Control Assoc*., 6: 625-630.

Weber, J. L. 1990. Informativeness of human (dCdA)*n.*(dG-dT)*n* polymorphisms. *Genomics*, **7**, 524-530.

Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15: 323–354.

Yébakima, A.; Charles, C.; Mousson, L.; Vazeille, M.; Yp-Tcha, M.-M.; Failloux, A.-B. 2004. Genetic heterogeneity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Martinique. *Tropical Medicine and International Health*, 9(5): 582-587.

Yergolkar, P.N.; Tandale, B.V.; Arankalle, V.A.; Sathe, P.S.; Sudeep, A.B.; Gandhe, S.S.; Gohkle, M.D.; Jacob, G.P.; Hundekar, S.L.; Mishra, A.C. 2006. Chikungunya outbreaks caused by african genotype. *Emerging Infectous Diseases*, 12(10): 1580-1583.

Anexos

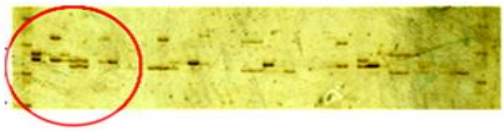


Figura 4. Imagem de genotipagem do loco *AG5* - Cidade Nova seca - feita em gel de poliacrilamida 6% e corado com nitrato de prata

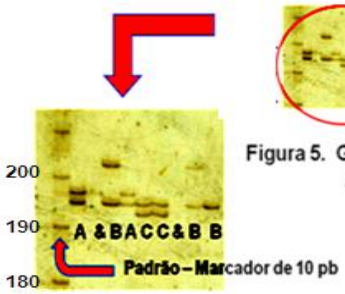


Figura 5. Genótipos de nove indivíduos para o loco *AG5* - Cidade Nova seca: A = 194/ 196; B = 194/204; C = 192/194; & = indivíduo não genotipado.

Figura A - Interpretação da genotipagem em gel de poliacrilamida 6% e corado com nitrato de prata de nove indivíduos da Cidade Nova, estação seca, loco *AG5*.

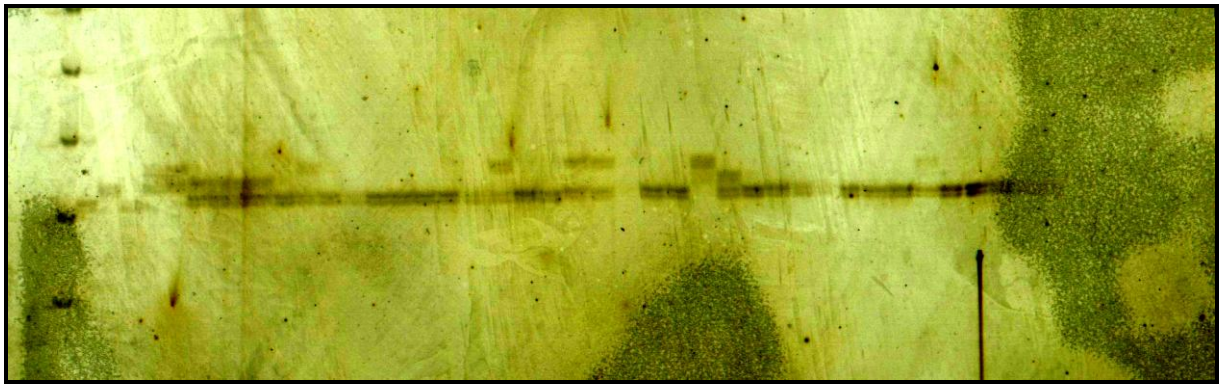


Figura B - Genotipagem dos indivíduos da localidade Praça 14 de janeiro – estação chuvosa – loco *AG2*.

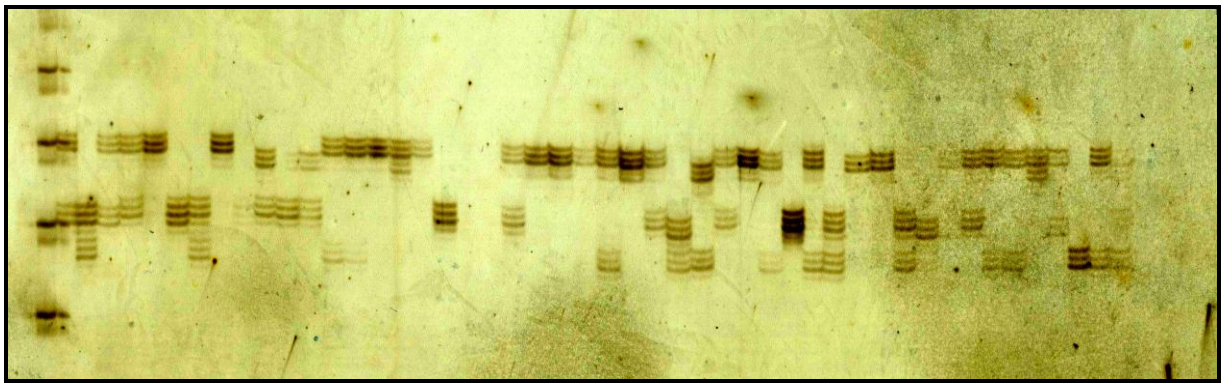


Figura C - Genotipagem dos indivíduos da localidade Jorge Teixeira – estação chuvosa – loco *AG7*

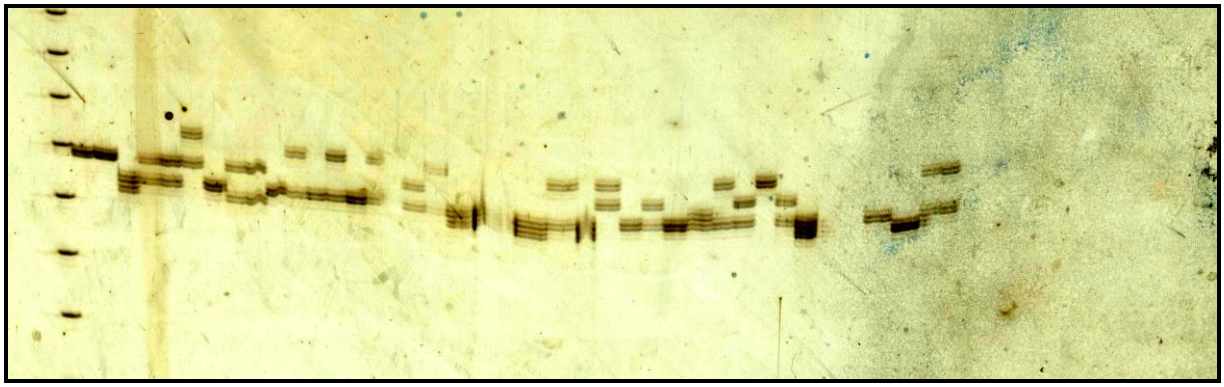


Figura D - Genotipagem dos indivíduos da localidade Coroado – estação seca – loco *AG5*.

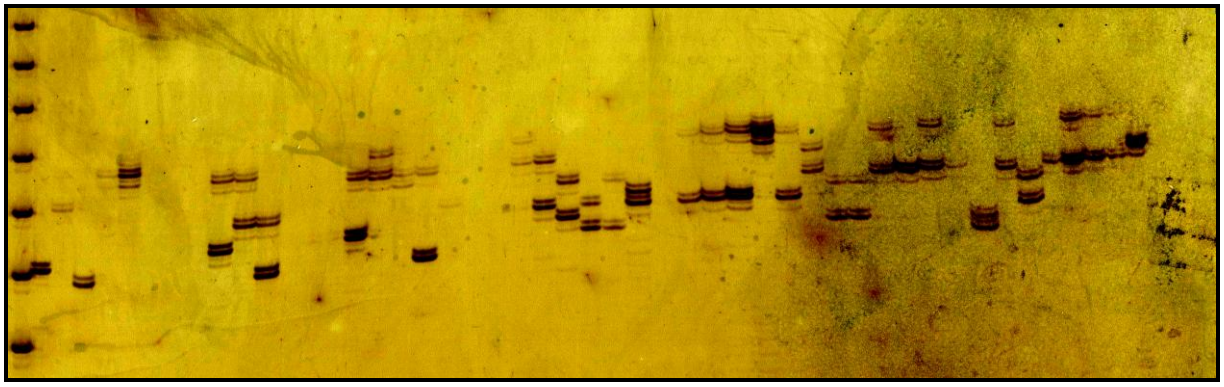


Figura E - Genotipagem dos indivíduos da localidade Praça 14 de Janeiro – estação seca– loco *AT1*.

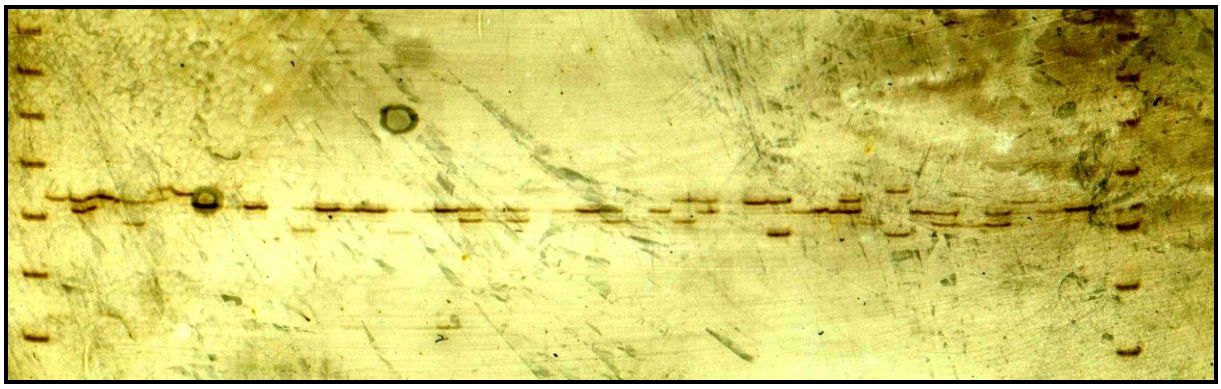


Figura F - Genotipagem dos indivíduos da localidade Cidade Nova – estação seca– loco *AG4.*