

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E  
RECURSOS NATURAIS  
GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

**Genética de Populações de *Aedes albopictus* (Skuse 1894)  
(Diptera: Culicidae) da Cidade de Manaus, AM, Brasil, Com o  
Emprego do Gene *ND5* do DNA Mitocondrial.**

**RAFAEL TRINDADE MAIA**

Manaus - AM  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RAFAEL TRINDADE MAIA**

**Genética de Populações de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894)  
(Diptera: Culicidae) da Cidade de Manaus, AM, Brasil Com o  
Emprego do Gene *ND5* do DNA Mitocondrial.**

**Orientadora: Dra. Vera Margarete Scarpassa**

**Co-orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei**

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

Manaus – AM  
2008

M217

Maia, Rafael Trindade

Genética de populações de *Aedes albopictus* (Diptera: culicidae) (Skuse, 1894) da cidade de Manaus, AM, Brasil com o emprego do gene *ND5* do DNA mitocondrial / Rafael Trindade Maia .---  
Manaus: [s.n.], 2008.  
xviii, 51 f. : il.

Dissertação (mestrado) --- INPA/UFAM, Manaus, 2008

Orientador: Vera Margarete Scarpassa

Co-Orientador: Wanderli Pedro Tadei

Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. *Aedes albopictus* – Genética de populações – Amazônia. 2. *Aedes albopictus* – Diversidade genética – Amazônia. 3. Fluxo gênico. I. Título.

CDD 19. ed. 595.770415

**Sinopse:**

Estudou-se a diversidade genética de populações de *Aedes albopictus* na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. Foram inferidos dados como fluxo gênico, diversidade haplotípica e nucleotídica e valores de  $F_{ST}$ . Sessenta e oito indivíduos foram seqüenciados e analisados, revelando uma baixa variabilidade genética. Os haplótipos encontrados foram comparados com haplótipos encontrados em localidades de outros estudos.

**Palavras-chave:** variabilidade genética, fluxo gênico, estrutura genética.

*Aos meus pais, Frederico e Agnes; e ao meu irmão, Paulo Ricardo*

**Dedico.**

## **Agradecimentos**

Ao Criador, por tudo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela oportunidade de ingressar no programa de mestrado e pelo apoio estrutural fornecido.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEV) do INPA, por fornecer condições para a realização da dissertação e um curso de alta qualidade, pela ajuda na compra de reagentes e pelo apoio financeiro para participação de congresso.

Ao CNPq e CAPES, pela concessão de bolsas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo apoio financeiro em relação às despesas do projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), que através do edital PAPE proporcionou a oportunidade de apresentar os resultados desse estudo em Congresso.

A Dra. Vera Margarete Scarpassa, minha orientadora, por toda ajuda, paciência e perseverança durante todo o trabalho até aqui realizado. Um exemplo de ética, competência e dedicação profissional, além de administrar com maestria as qualidades e os defeitos de seus orientados.

Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei, meu co-orientador, pelo apoio nas coletas e na obtenção das amostras.

Aos meus pais, Frederico Celso Lyra Maia e Agnes Alves Trindade Maia, por todo incentivo e ajuda aos estudos que só os verdadeiros pais podem oferecer.

Ao meu irmão Paulo Ricardo Trindade Maia, pela amizade fraterna e por estar sempre ao meu lado.

A Valeria Rosa Santos (Ela!!!), pelo amor, carinho, companheirismo e cumplicidade que torna a minha vida sublime e repleta de paixão.

A Nádya Lyra Maia Uellendahl (*In memorian*) e família, por todo carinho e amor dispensados.

À minha co-orientada Louise Haddad Maciel, pela amizade e imensa cooperação: provavelmente nada tivesse sido viável sem sua ajuda!

Aos colegas de Laboratório Tatiana Bacry e Raimundo Júnior, pelo apoio e pela agradável convivência nesses dois anos.

Aos colegas do GCBEV, em especial aos que entraram comigo no ano de 2006.

Agradecimento em especial aos integrantes da “República dos Coiotes”: Rafael Angrizani, Rodrigo Amaral, Marco Antônio, Gabriela Muller (ex-integrante), Everton Almeida e Carlos Faresin (integrante reserva), por todos os momentos (tanto os bons como os difíceis) que passamos juntos. Realmente valeu a pena ter conhecido vocês.

Às “Solteironas do Coroadó”, por toda amizade e por terem me recebido tão bem em Manaus.

Ao “primo” e conterrâneo Rodrigo, pela inestimável ajuda prestada desde que pousei em Manaus.

À amiga Taciana, um verdadeiro anjo que apareceu para me acolher.

Ao amigo e “guerreiro valente” Giuliano, a primeira pessoa a me receber no INPA e se dispor a me ajudar.

Aos eternos orientadores Leucio Câmara Alves e Gilcia Aparecida Carvalho, por tudo e mais um pouco.

Aos Colegas da República “Igarapé Palace” Guto, Everton, Fábio, Rapha Zed e Oliver, pela amizade e agradável convivência.

Aos colegas do LTBM, em especial à Gisele, Luci, Fabiola e Kyara, pelo apoio nas etapas de seqüenciamento.

Às Secretárias do GCBEV Hercília e Alessandra, pela dedicação, simpatia e ajuda nos vários processos burocráticos ao longo do mestrado.

Aos colegas da Casa 15 e da Malária e Dengue, pela colaboração e simpatia.

À Dra. Claudia Rios da FIOCRUZ, pela ajuda inicial no projeto.

Aos motoristas Henrique e Pedrão, pela disposição e agradável companhia durante as coletas.

À todos os professores com quem estudei e aprendi ao longo desse curso. Minha sincera gratidão e admiração, pois o conhecimento é sempre a melhor dádiva que se pode oferecer à alguém.

Aos colegas do curso de Entomologia, o “curso-irmão” da Genética, por todos os bons momentos compartilhados.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram nesse período de mestrado, e aos que estiveram presentes, mesmo que em pensamento apenas.

*“Mais amor à verdade do que simples apego às suas próprias convicções”.*

Lema do cientista – Anônimo.

## Resumo

O *Aedes albopictus*, conhecido como “tigre asiático”, é uma das espécies da família Culicidae que representa preocupação na saúde pública. No Brasil, a presença deste mosquito foi registrada pela primeira vez em 1986 no Estado do Rio de Janeiro, sendo atualmente encontrado em pelo menos 19 Estados do território nacional, ocorrendo predominantemente nas periferias urbanas e localidades semi-rurais. Em condições experimentais, o *Ae. albopictus* é capaz de transmitir 22 arboviroses, entre elas, o dengue e a febre amarela. No Brasil, estudos de genética de populações com *Ae. albopictus* foram realizados nos Estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Maranhão, Espírito Santo, Santa Catarina, Bahia, Paraná, e Pernambuco. Nas demais localidades ainda existem uma grande necessidade de se elucidar a estrutura genética das populações deste mosquito. Diante disso, torna-se importante o conhecimento da diversidade dentro e entre as populações para que se possa compreender a biologia e melhor planejar o controle do transmissor de acordo com cada localidade. Neste trabalho foram estudadas a variabilidade e estrutura genética de populações de *Ae. albopictus*, baseando-se no polimorfismo do gene *ND5* do DNA mitocondrial. Foram estudadas populações provenientes de cinco bairros de Manaus (AM): Coroadó, Cidade de Deus, Cidade Nova, Compensa e Mauazinho. Dos 68 indivíduos seqüenciados, observou-se 2 haplótipos. Os valores de diversidade genética foram baixos para todas as populações. No entanto, a população de Mauazinho foi a que apresentou os maiores índices ( $h = 0,385 \pm 0,0201$ ;  $\pi = 0,00089 \pm 0,00031$ ). O teste de neutralidade,  $D$  de Tajima, não foi significativo para nenhuma das amostras, indicando que o polimorfismo genético está de acordo com o modelo neutro de mutações. O teste de neutralidade  $F_s$  de Fu, também não foi significativo, sugerindo que as populações não se encontram em expansão. A AMOVA revelou que a maior parte da variação ocorreu dentro das populações (99,08%). De forma semelhante aos resultados da AMOVA, os valores de  $F_{ST}$  foram baixos para todas as comparações, com exceção da comparação entre as populações da

Compensa e Mauzinho, sugerindo pouca estrutura genética para *Ae. albopictus* da cidade de Manaus. O teste de Mantel indicou correlação entre distâncias genética e geográfica ( $r = 0,598$ ;  $P = 0,039$ ). A análise do dendrograma indicou dois grupos de populações, associados à presença e ausência do haplótipo 2: I) Cidade de Deus, Cidade Nova e Compensa possuíam um ou nenhum indivíduo portando o haplótipo 2 e II) Coroado e Mauzinho possuíam dois ou mais indivíduos com o haplótipo 2. Esses resultados, unidos ao fato dos dois haplótipos encontrados serem compartilhados com populações de outras regiões distintas, sugerem a ocorrência de ao menos duas introduções de *Ae. albopictus* em Manaus: uma provavelmente oriunda da costa Sul e Sudeste do Brasil, e a outra do litoral da Flórida, nos Estados Unidos.

## Abstract

*Aedes albopictus*, known as "Asian tiger", is one of the mosquito species that represents a fundamental role in public health. In Brazil the presence of the *Ae. albopictus* was first recorded in 1986, on the Rio de Janeiro State. Actually, this specie has been found in 19 states, most predominantly in urban neighborhoods and semi-rural locations. In experimental conditions the *Ae. albopictus* has competence for the transmission of 22 arboviruses, including dengue and yellow fever. In Brazil, genetic studies of populations with *Ae. albopictus* was realized in the states of Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Maranhão, Espírito Santo, Santa Catarina, Bahia, Paraná, and Pernambuco. However, in the Amazonas State, nothing is known about the genetic population structure of this vector. In this context, it is important to elucidate the diversity within and among populations for understand the biology and develop better control strategies of the vector according to each locality. The objective of this study was to estimate the variability and genetic structure of populations of *Ae. albopictus*, based on the polymorphism of the gene *ND5* of mitochondrial DNA. We studied five populations, from five districts of Manaus (AM): Coroado, Cidade de Deus, Cidade Nova, Compensa and Mauzinho. We analyzed 68 sequences of 430 base pairs, and were found 2 haplotypes. The values of genetic diversity were low for all populations, and the Mauzinho population showed highest rates ( $h = 0.385 \pm 0.0201$ ;  $\pi = 0.00089 \pm 0.00031$ ). The tests of neutrality, Tajima's *D* and Fu's *F* were not significant for all samples, indicating that the genetic polymorphism is consistent with the model of neutral mutations, and the populations are not in expansion. The AMOVA revealed that most of the variation occurs within populations (99.08%). The correlation between genetic distance and geographical distance was positive and significant ( $r = 0.598$ ,  $P = 0.039$ ). The population's dendrogram showed two groups. These results, and the evidence of the two haplotypes shared with populations from others regions, indicate the occurrence of at least two distinct introductions of *Ae.*

*albopictus* in Manaus: one by populations from the Brazil's south and southeastern coast, and another from the Florida's coast, United States.

## SUMÁRIO

1.Introdução.....	01
1.1 O <i>Aedes albopictus</i> .....	01
1.2 Implicações epidemiológicas.....	03
1.3 Genética de populações de <i>Aedes albopictus</i> .....	05
1.4 Uso de DNAm <sub>t</sub> como marcador molecular.....	07
2.Objetivo(s).....	10
2.1 Objetivos Gerais.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3.Material e Métodos.....	11
3.1 Coleta dos Mosquitos.....	11
3.2 Extração de DNA.....	17
3.3 Amplificação do DNA.....	17
3.4 Eletroforese.....	18
3.5 Purificação do Produto Amplificado.....	19
3.6 Reação de Seqüenciamento.....	19
3.7 Alinhamento das Seqüências.....	19
3.8 Análise estatística dos dados.....	19
3.8.1 Estimativa da Variabilidade Genética.....	19
3.8.2 Testes de Neutralidade.....	20
3.8.3 Rede de haplótipos.....	21
3.8.4 Dendrogramas.....	21
4. Resultados.....	22
4.1 Distribuição e freqüência de haplótipos.....	22
4.2 Diversidade Genética e testes de neutralidade.....	27
4.3. Análise de variância molecular (AMOVA), e inferência de fluxo gênico.....	28

5. Discussão.....	31
5.1 Frequência e distribuição dos haplótipos.....	31
5.2 Variabilidade genética.....	33
5.3 Análise de variância molecular (AMOVA) e fluxo gênico.....	35
5.4 Dendrograma de populações e de haplótipos.....	36
6. CONCLUSÕES.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Localização dos pontos de coleta de <i>Ae. albopictus</i> .....	13
<b>Tabela 2.</b> Número de indivíduos observados para cada haplótipo nas amostras de <i>Aedes albopictus</i> dos cinco bairros de Manaus.....	23
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos haplótipos encontrados para o gene <i>ND5</i> deste estudo e de outras localidades já estudadas de <i>Aedes albopictus</i> .....	26
<b>Tabela 4.</b> Diversidade genética e testes de neutralidade calculados nas cinco populações de <i>Aedes albopictus</i> da cidade de Manaus.....	27
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de <i>Aedes albopictus</i> .....	28
<b>Tabela 6.</b> Distância genética ( $F_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $Nm$ ), acima e abaixo da diagonal, respectivamente, entre amostras de <i>Aedes albopictus</i> da cidade de Manaus.....	29

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Fêmea de <i>Ae. albopictus</i> .....	01
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do ciclo biológico de <i>Aedes albopictus</i> .....	02
<b>Figura 3.</b> Esquema simplificado do DNA mitocondrial.....	08
<b>Figura 4.</b> Localização dos bairros estudados da cidade de Manaus (destacados em vermelho).....	12
<b>Figura 5.</b> Coleta das formas imaturas de <i>Aedes albopictus</i> .....	14
<b>Figura 6.</b> Identificação dos mosquitos adultos.....	14
<b>Figura 7.</b> Fotografia de um dos pontos de coleta no bairro do Mauazinho, em Manaus.....	15
<b>Figura 8.</b> Fotografia de um dos pontos de coleta no bairro da Compensa, em Manaus.....	15
<b>Figura 9.</b> Fotografia de um dos pontos de coleta localizado na Rua Uirapuru, no bairro Cidade de Deus, em Manaus.....	16
<b>Figura 10.</b> Fotografia apresentando as características de um dos pontos de coleta localizado na Rua Cauamari, no bairro Cidade Nova, em Manaus.....	16
<b>Figura 11.</b> Extração de DNA.....	17

<b>Figura 12.</b> Produto de PCR amplificado para o gene <i>ND5</i> das amostras de <i>Ae. albopictus</i> do bairro da Cidade de Deus, em Manaus. Eletroforese em gel de agarose a 1%.....	18
<b>Figura 13.</b> Composição média de nucleotídeos.....	22
<b>Figura 14.</b> Freqüência relativa geral dos dois haplótipos de <i>Aedes albopictus</i> .....	23
<b>Figura 15.</b> Freqüências relativas dos haplótipos em cada amostra de <i>Aedes albopictus</i> .....	24
<b>Figura 16.</b> Rede de haplótipos do gene <i>ND5</i> de <i>Aedes albopictus</i> .....	25
<b>Figura 17.</b> Dendrograma de distância genética das cinco populações de <i>Aedes albopictus</i> de Manaus (AM), com o emprego do método Neighbour-Joining.....	30

## Introdução

### 1.1 O *Aedes albopictus*

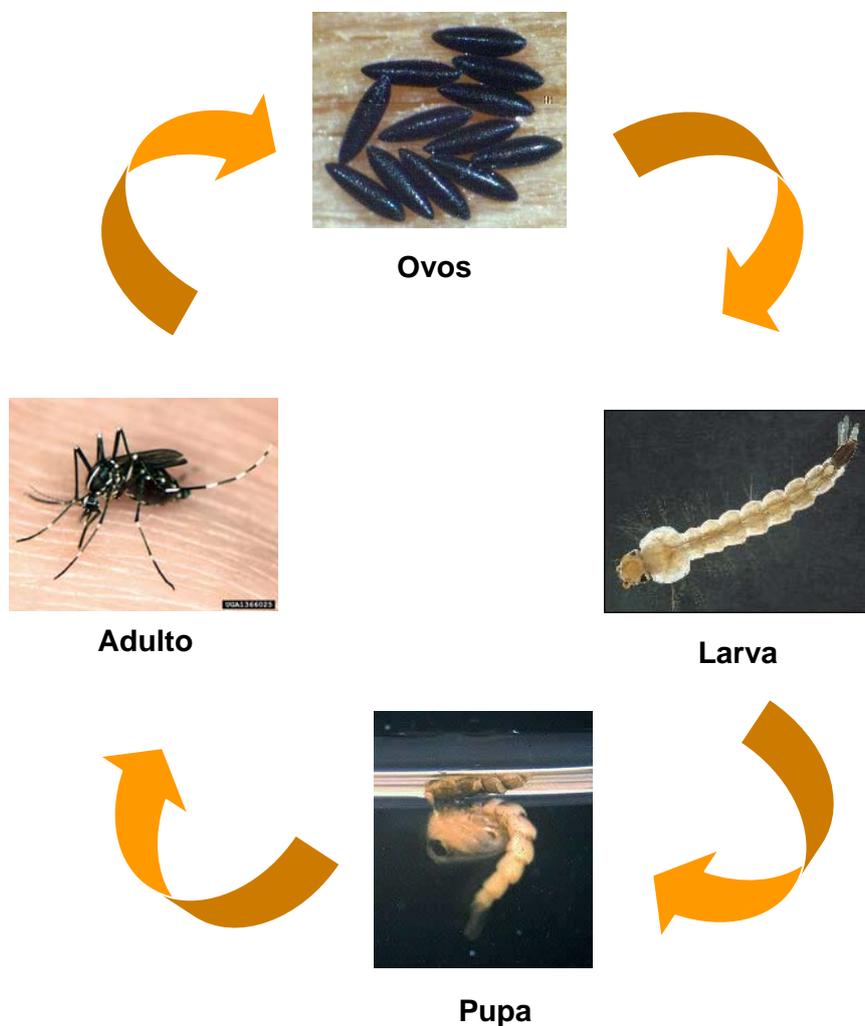
A família Culicidae apresenta várias espécies de interesse médico. Durante o hematofagismo, que geralmente ocorre no horário noturno, estes mosquitos freqüentemente perturbam o repouso do hospedeiro, podendo inclusive transmitir diversas enfermidades tais como viroses, protozooses e helmintoses (Neves, 1976).

Dentro desta família já foram descritas mais de 3500 espécies de mosquitos (Beaty e Marquardt, 1996), que se encontram agrupadas em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae (Knight e Stone, 1977). Esta última compreende vários gêneros de importância epidemiológica, dentre eles o gênero *Aedes*, que engloba centenas de espécies, as quais apresentam distribuição mundial. Dentro dos aedíneos, uma das espécies mais importantes do ponto de vista epidemiológico é o *Aedes albopictus* (Figura 1). Como todo culicídeo, seu ciclo de vida é constituído por quatro estágios: ovo, larva (com quatro estádios larvais), pupa e adulto, podendo variar de 10 a 15 dias (Figura 2).



**Figura 1.** Fêmea de *Aedes albopictus* ([www.invasive.org](http://www.invasive.org)).

Esta espécie no estágio adulto caracteriza-se por ter o corpo de coloração negra com tarjas claras, diferenciando-se do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) principalmente por apresentar um desenho de escamas branco-prateadas, formando uma linha reta e longitudinal ao longo do escudo (Figura 1), enquanto este último apresenta na mesma estrutura uma marcação de escamas claras em formato de uma lira (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). O *Ae. albopictus* apresenta hábito crepuscular, diurno, e eclético quanto ao repasto sanguíneo, tendo o homem e as aves como seus principais hospedeiros (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994) e sendo uma espécie comum em ambientes periurbanos e semi-rurais.



**Figura 2.** Representação esquemática do ciclo biológico de *Aedes albopictus*.

As larvas têm como habitat pequenas coleções de água parada, com pouca matéria orgânica em decomposição, localizadas em criadouros sombreados, em recipientes artificiais como pneus ou habitats naturais como ocos de árvores, tocos de bambu e tanques de bromélias (Forattini, 2002; Gomes e Marques, 1988; Foster, 1989; Gomes *et al.*, 1992; O'Meara *et al.*, 1995; Natal *et al.*, 1997).

*Aedes albopictus* é uma espécie de origem asiática, concentrada no Sudeste do continente até os limites com a Cordilheira do Himalaia (Forattini, 2002). Esse mosquito foi introduzido no Brasil na década de 80, provavelmente através do transporte passivo de ovos por meio do comércio mundial de pneus oriundo de populações do Japão, de acordo com as análises da genética populacional (Kambhampati *et al.*, 1991).

Segundo a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e a Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SUSAM), no Estado do Amazonas, o primeiro registro de *Ae. albopictus* ocorreu em junho de 1996, no município de Tabatinga, onde foi temporariamente eliminada, sendo porém novamente encontrada em 1997, tanto no município de Tabatinga quanto em Letícia, também no Estado do Amazonas (Velez *et al.*, 1998). Em 2002 foi encontrada pela primeira vez em área urbana do município de Manaus (Fé *et al.*, 2003; Santos, 2003). Estudos posteriores realizados neste município registraram 42 pontos de ocorrência de *Ae. albopictus*, com uma extensa distribuição na periferia e maior densidade da espécie na interface mata/perímetro urbano e periurbano. Neste trabalho, o *Ae. albopictus* foi registrado em 12 das 21 áreas de mata analisadas e em 30 pontos de área urbana visitadas por Agentes de Endemias (FAD) (Sá, 2004). Já em localidades mais urbanizadas, como os bairros de Flores, Chapada, Coroado e Tancredo Neves, em Manaus, este culicídeo ocorreu com menor frequência, sendo o *Ae. aegypti* a espécie predominante (Rios-Velásquez *et al.*, 2007).

## 1.2 Implicações epidemiológicas

No continente asiático, *Ae. albopictus* representa um grande transtorno à saúde da população, pois é considerada o vetor principal do dengue em epidemias ocorridas no Japão, Indonésia, Seychelles, Tailândia, Malásia (Hawley, 1988) e posteriormente também no Havaí (Effler *et al.*, 2005).

Em território nacional, o *Ae. albopictus* pode vir a ser um sério problema à saúde pública do país devido ao importante papel que desempenha na transmissão de arboviroses, apresentando freqüentemente uma alta susceptibilidade a certos vírus, inclusive em alguns casos superior à do *Ae. aegypti* (Mitchell, 1995). Além de apresentar uma elevada antropofilia, foi demonstrado que essa espécie apresenta a capacidade de transmissão vertical para os sorotipos 2 e 3 do vírus dengue (Ibanez-Bernal *et al.*, 1997). Tem sido também incriminada como vetor de febre amarela no continente americano (Rai, 1991). De acordo com Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994), o *Ae. albopictus* poderia introduzir o vírus da febre amarela em meios urbanos devido ao fato desta espécie ser capaz de colonizar diferentes tipos de ambientes. Apesar de ainda não ser possível incriminar o *Ae. albopictus* como vetor do dengue nas populações humanas das Américas, a transmissão deste vírus pelo *Ae. albopictus* já foi observada em laboratório (Rosen *et al.*, 1983; Mitchell e Miller, 1990) e no Brasil apresentou uma taxa de 22% de infecção de Dengue sorotipo 2 em exposição experimental (Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2003). Também foi isolado vírus do dengue sorotipo 1 em larvas de *Ae. albopictus* na cidade de Campos Altos, no Estado de Minas Gerais (Serufo *et al.*, 1993).

Na América do Norte, o *Ae. albopictus* foi encontrado naturalmente infectado pelos vírus Potosi e da encefalite eqüina tipo leste (EEE) (Mitchell *et al.*, 1990; 1992). É também responsável pela transmissão dos vírus Ross River e Chikungunya (Gubler *et al.*, 2001). No Estado da Pensilvânia, nos Estados Unidos, foi isolado o vírus do Nilo Ocidental de espécimes coletados em campo (Holick *et al.*, 2002).

O *Ae. albopictus* possui capacidade vetorial para o *Plasmodium gallinaceum* e *P. lophurae*, agentes etiológicos que causam a malária aviária,

fazendo com que este mosquito seja um modelo indicado para estudos de malária experimental (Forattini, 2002).

Em relação às helmintoses, o *Ae. albopictus* é apontado como vetor eficiente da *Dirofilaria immitis*, nematódeo causador da dirofilariose canina (Forattini, 2002). No entanto, estudos realizados nos Estados Unidos demonstram que a susceptibilidade e refratariedade à *D. immitis* variam de acordo com as diferentes localidades onde se encontra o mosquito (Apperson *et al.*, 1989; Estrada-Franco e Craig, 1995).

### **1.3 Genética de populações de *Aedes albopictus***

A variabilidade genética em mosquitos tem sido bastante estudada, apresentando diferenças nas populações de uma espécie de acordo com a região onde é encontrada. Tal variabilidade pode ser atribuída à adaptabilidade a fatores climáticos tais como: temperatura, umidade relativa do ar, índice pluviométrico, àqueles referentes ao relevo, vegetação, ou mesmo por ações antrópicas como urbanização, poluição ambiental, desmatamento e o uso de produtos químicos. As condições ambientais, incluindo importantes variáveis climáticas desempenham um importante papel nas populações de diversos organismos (Whittaker, 1975). Os insetos, em particular os terrestres, são severamente afetados pelas mudanças de gradientes devido à dependência de importantes variáveis, como taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento (Hodkinson, 2005). Estudos têm demonstrado o papel destas variáveis na estrutura genética dos insetos (Levitan, 1978; Etges, 1984; Burla *et al.*, 1986; Liebherr, 1986; Peterson, 1995).

Estudos izoenzimáticos realizados em 18 populações de *Ae. albopictus* da Itália, quatro populações dos Estados Unidos, quatro populações da Indonésia e quatro populações do Japão mostraram que dos 18 *loci* estudados, 15 apresentavam polimorfismo e sugeriram a existência de deriva genética, além de apontar alta similaridade genética entre as populações da Itália e dos Estados Unidos, reforçando a hipótese de que a introdução desta espécie nestes países

ocorreram de modo semelhante (Urbanelli et al., 2000). Em 22 *loci* isoenzimáticos de seis populações da Tailândia, Chareonviriyapha et al. (2004) observaram um fluxo gênico limitado, sugerindo uma dispersão geográfica lenta.

Também por análise de isoenzimas, Lourenço-de-Oliveira et al. (2003) estudaram populações de *Ae. albopictus* originárias do Brasil, dos Estados Unidos e das Ilhas Caiman, onde observaram fluxo gênico restrito e alta diversidade genética entre as populações brasileiras e norte-americanas. Populações de *Ae. albopictus* provenientes de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Pernambuco foram analisadas por Ayres et al. (2002) através da técnica de RAPD, onde as populações dos Estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro apresentavam maior similaridade genética, além de constatarem um fluxo gênico restrito entre todas as populações. Nestes mesmos Estados, Guedes (2006) utilizou como marcadores os genes mitocondriais *Citocromo oxidase II (COII)* e *Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4 (ND4)* e constatou que as populações de *Ae. albopictus* nessas localidades encontram-se sob forte influência de deriva genética, e que as populações de Minas Gerais e Rio de Janeiro são idênticas, pois apresentam os mesmos haplótipos para o *ND4*.

Ainda com DNA mitocondrial, Birungi e Mustermann (2002) estudaram populações dos estados Unidos, do Brasil, de Madagascar, da Malásia, da Indonésia e do Japão utilizando o gene *ND5* e verificaram uma baixa variação genética nas populações e uma alta similaridade entre as populações do Brasil e dos Estados Unidos, porém com evidências de possibilidade de diferentes introduções. Em populações norte-americanas de *Ae. vexans*, estudadas com o emprego do gene *ND5*, foram encontrados 40 haplótipos (Szalanski et al., 2006). Fonseca et al. (2001) analisaram populações de *Ae. japonicus* proveniente dos Estados Unidos e do Japão utilizando o gene *ND4* e encontraram 15 haplótipos.

As diferenças genéticas entre as populações de *Ae. albopictus* podem implicar desde populações com maior susceptibilidade e competência vetorial para agentes patogênicos até populações refratárias, como sugere o estudo

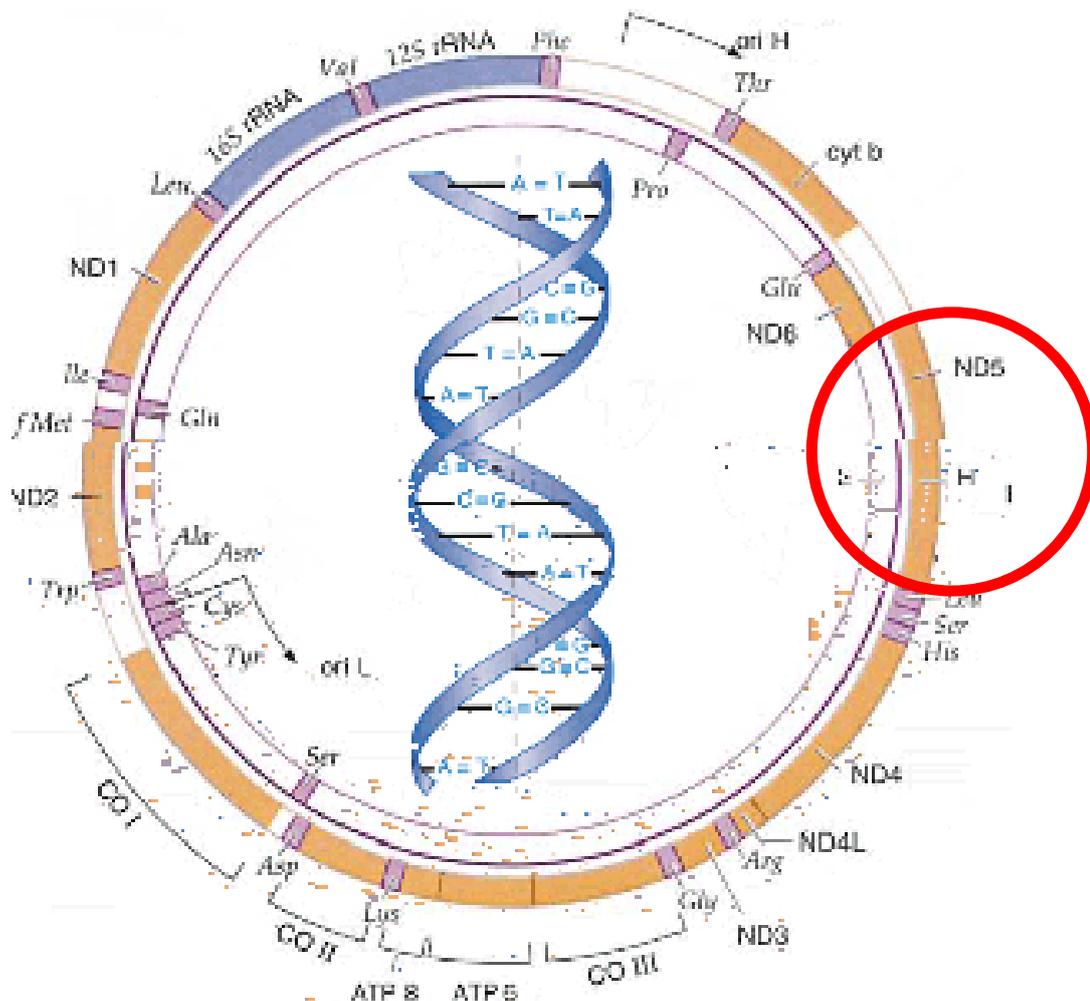
realizado por Lourenço-de-Oliveira *et al.* (2003). Pode representar também uma maior capacidade de dispersão e reprodução, resultando em populações mais adaptadas que outras, além das interações entre vetor, hospedeiro e parasita (Reisen *et al.*, 1997; LaPoint *et al.*, 2005). A diversidade genética de uma espécie poderá facilitar o surgimento de populações resistentes a inseticidas e a entomopatógenos utilizados no controle populacional de mosquitos (Coleman *et al.*, 2002).

#### **1.4 Uso de DNAm<sub>t</sub> como marcador molecular**

O DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) vem sendo largamente utilizado para inferir a variabilidade genética, fluxo gênico e história evolutiva em diversos grupos de organismos (Avice, 1994, Spanos *et al.*, 2000). Em mamíferos, esse marcador também tem sido utilizado para estudos de sistemática molecular (Adoutte, 1999) assim como têm sido empregado com sucesso em insetos (Xiang e Kocher, 1991; Kambhupati, 1995; Tang *et al.*, 1996; Tang e Unnasch, 1997). É uma molécula circular fechada presente nas mitocôndrias, com tamanho estimado de ~ 16.569 pb e 37 genes (Lang *et al.*, 1999; Boore, 1999) que codificam 22 RNAs, 2 RNAs, e 13 proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa (Wallace, 1986) (Figura 3). Há uma região controle (*D-loop*), de tamanho aproximado de 1 Kb responsável pela iniciação da replicação e transcrição. O arranjo gênico no DNAm<sub>t</sub> geralmente aparenta-se estável, embora diferenças na ordem dos genes servem para distinguir alguns taxa em animais superiores (Desjardins Morais, 1990; Okimoto *et al.*, 1992; Pääbo *et al.*, 1991).

O DNAm<sub>t</sub> possui características próprias, tais como semi-autonomia, possui sistema independente de replicação, transcrição e tradução de seu genoma e herança predominantemente materna (Wallace, 1992), além de uma taxa de evolução maior que a do DNA nuclear (Beatty e Marquardt, 1996), sendo portanto utilizado como ferramenta de alta resolução para estudos evolutivos (Brown *et al.*, 1979). Tem sido usado também em estudos filogenéticos de

insetos (Misof *et al.*, 2000), anfíbios (Morita 1999) e peixes (Richards e Moore, 1996). Dos genes que constituem o DNAm, o *ND5* (codificante da subunidade 5 da proteína NADH desidrogenase) é um dos mais variáveis e tem sido utilizado para estudos evolutivos intra específicos de anofelinos (Besansky *et al.*, 1997; Molina-Cruz *et al.*, 2004).



**Fig 3.** Esquema simplificado do DNA mitocondrial.

([dob.cicese.mx/.../investigacion.html](http://dob.cicese.mx/.../investigacion.html))

O DNAm dos invertebrados possui características semelhantes ao dos vertebrados, sendo as principais diferenças observadas no rearranjo dos genes

na fita circular (Snutad e Simmons, 2001). É uma molécula haplóide e de herança materna e em sua constituição não há íntrons, nem pseudogenes e as seqüências duplicadas em geral são raras e de tamanho pequeno e geralmente há menos de 10 pares de bases separando seus genes (Attardi, 1985; Gray, 1989). Representa apenas um quarto do tamanho efetivo da população quando comparado ao DNA nuclear, sendo, portanto bem mais sensível aos efeitos da deriva genética (Avice, 1994). Devido a essas características, o DNA mitocondrial apresenta-se como um marcador molecular extremamente útil para estudos de genética populacional.

## **2. Objetivo(s)**

### **2.1 Objetivo Geral:**

-Estimar a variabilidade e estrutura genética de populações de *Ae. albopictus* provenientes de cinco bairros da cidade de Manaus: Coroado, Cidade Nova, Cidade de Deus, Compensa e Mauzinho.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

-Estimar a variabilidade genética dentro e entre as populações de *Ae. albopictus* e verificar se essas populações encontram-se em expansão.

-Inferir a extensão do fluxo gênico entre as populações analisadas.

-Estimar o grau de distância genética entre as populações analisadas.

-Propor hipótese sobre os possíveis eventos de colonização dessa espécie em Manaus.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Coleta dos espécimes

As coletas foram realizadas em cinco bairros da cidade de Manaus: Coroado (Zona Centro-Sul/ Leste), Cidade de Deus (Zona Norte), Cidade Nova (Zona Norte) Compensa (Zona Oeste) e Mauazinho (Zona Leste), conforme apresentados na figura 4. A tabela 1 apresenta as coordenadas geográficas e os tamanhos das amostras estudadas de cada bairro. Os bairros da Compensa e Mauazinho estão localizados na margem do Rio Negro. Os bairros do Coroado e da Cidade Nova estão localizados em áreas urbanas, enquanto os bairros da Cidade de Deus, Compensa e Mauazinho localizam-se em áreas urbanas e periurbanas. Essas localidades foram escolhidas pelo fato de estudos anteriores apontarem a ocorrência de *Ae. albopictus* nesses locais (Sá, 2004).

As coletas foram realizadas em criadouros considerados propícios para a proliferação do *Ae. albopictus*, tais como: pneus, recipientes plásticos, ocos de árvores, internódios de bambu, tanques de bromélias, além de terem sido utilizadas armadilhas do tipo larvitrapa. As armadilhas consistiam de vasinhos plásticos (de plantas) de cor preta, que foram distribuídas em diferentes pontos ao longo das ruas e/ou avenidas, preferencialmente em locais sombreados, protegidos da chuva e contendo água limpa. A distância mínima entre as armadilhas foi de aproximadamente 20 metros. As armadilhas eram verificadas semanalmente. Foram coletadas amostras de 21 pontos no bairro da Compensa, 16 pontos no Coroado, 13 pontos na Cidade de Deus, 12 Cidade Nova e 13 pontos em Mauazinho.

As formas imaturas (larvas e pupas) de cada ponto (armadilha) foram coletadas com o auxílio de redes, peneiras ou conta-gotas e transferidas separadamente para frascos de vidro e etiquetados (Figura 6). Em seguida, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Genética e Evolução de Mosquitos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para completar o desenvolvimento e posteriormente identificadas por meio de chave dicotômica (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002) (Figura 7).

Após a identificação, os espécimes foram acondicionados em microtubos, etiquetados e congelados em freezer -80 °C. De cada ponto foram selecionados de um a dois indivíduos para as análises do presente estudo.



**Figura 4.** Localização dos bairros estudados da cidade de Manaus (destacados em vermelho).

Nas figuras 8, 9, 10 e 11 estão representados as características dos locais, onde foram dispostas as armadilhas e obtidos espécimes de *Ae. albopictus*.

**Tabela 1.** Localização dos pontos de coleta de *Ae. albopictus*.

<b>Localidade</b>	<b>Abreviação</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Nº de indivíduos</b>
Coroado (Zona Leste/ Centro- sul)	CO	3° 05' S, 59° 59' O	13
Cidade de Deus (Zona Norte)	CD	3° 00' S, 59° 56' O	16
Cidade Nova (Zona Norte)	CN	3° 02' S, 09° 04' O	13
*Mauazinho (Zona Leste)	MA	3° 07' S, 59° 55' O	13
*Compensa (Zona Oeste)	CP	3° 06' S, 60° 03' O	13

\*Bairros situados às margens do Rio Negro.



**Figura 5.** Coleta das formas imaturas de *Aedes albopictus*.



**Figura 6.** Identificação dos mosquitos adultos.



**Figura 7.** Fotografia de um dos pontos de coleta no bairro do Mauzinho, em Manaus.



**Figura 8.** Fotografia de um dos pontos de coleta no bairro da Compensa, em Manaus.



**Figura 9.** Fotografia de um dos pontos de coleta localizado na Rua Uirapuru, no bairro Cidade de Deus, em Manaus.



**Figura 10.** Fotografia apresentando as características de um dos pontos de coleta localizado na Rua Cauamari, no bairro Cidade Nova, em Manaus.

### 3.2 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo de Collins *et al.* (1987) no qual os indivíduos (adultos ou larvas de quarto estágio) foram macerados individualmente em microtubos (1,5 ml) contendo 100 µL de solução tampão composta por: 0,08 M NaCl; 0,16 M de sucrose; 0,06 M de EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético); 0,5% SDS e 0,1M de Tris-Cl (Figura 12). Após a maceração, o material foi incubado a 65° C, posteriormente, adicionados acetato de potássio (KAc) e, em seguida, centrifugados. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado em etanol a 95% e, em seguida, armazenado em -20° C, por no mínimo 30 minutos. Posteriormente, o material era centrifugado e o etanol descartado, seguindo-se de adição de etanol a 70% e centrifugado novamente e descartado. O pellet de DNA foi seco em estufa a 37° C. A ressuspensão do DNA foi feita em tampão 1XTE ou água *Milliq* e, em seguida, armazenado em freezer -80 °C.



**Figura 11.** Extração de DNA.

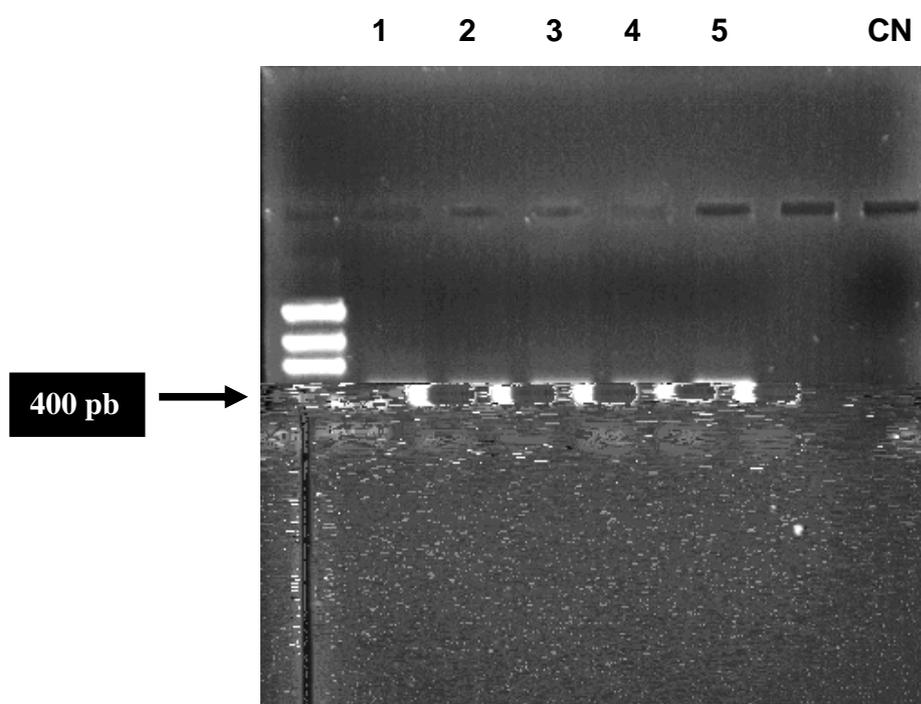
### 3.3 Amplificação do gene *ND5*.

Para a realização da PCR (reação em cadeia da polimerase) foi preparada uma reação para cada amostra com volume total de 25µL, contendo 1 *bead* da GE Healthcare (PureTaq™, Ready-To-Go™ PCR), 1,25 µL de cada primer (*Forward* (6500): 5'-TCCTTAGAATAAAATCCC-3' e *Reverse* (7398): 5'-GTTTCTGCTTTAGTTCATTCTTC-3'), e 1 µL de DNA da amostra e água *Milliq*

autoclavada para completar o volume final de 25L. A amplificação foi realizada seguindo-se o programa de amplificação descrito por Birungi e Munstermann (2002), previamente empregados no estudo do gene *ND5* em *Ae. albopictus*. Todas as amostras foram amplificadas em um termociclador, da marca *Eppendorf*.

### 3.4 Eletroforese

Após a amplificação das amostras, os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1%, com um marcador de peso molecular conhecido (*Low Mass DNA*). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio por 20 minutos, lavado em H<sub>2</sub>O *Milliq* para retirar o excesso de corante e, em seguida, visualizado e fotodocumentado (figura 12) em um transluminador de luz ultravioleta, *Eagle Eye II*.



**Figura 12.** Produto de PCR amplificado para o gene *ND5* das amostras de *Ae. albopictus* do bairro da Cidade de Deus, em Manaus. Eletroforese em gel de agarose a 1%.

### 3.5 Purificação do Produto Amplificado

As amostras que amplificaram satisfatoriamente foram purificadas utilizando o kit GFX da GE Healthcare, seguindo-se as instruções do fabricante.

### 3.6 Reação de Seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) com o uso do kit de seqüenciamento DYEnamic™ ET dye terminator kit (GE Healthcare). Para cada amostra foram preparadas duas reações (primer *Forward* e *Reverse*), onde cada uma consistiu de 5 µL de DNA, 1 µL de primer, 2 µL de ET e 2 µL de água *Milliq*, totalizando um volume total de 10 µL de reação. *Forward*. Em seguida, a placa contendo as amostras foi transportada para o termociclador e, em seguida, foi realizada a precipitação. Após a precipitação, a placa foi submetida a uma eletro-injeção no seqüenciador automático *MegaBACE 1000 analysis System*, de acordo com o protocolo padrão indicado pelo fabricante.

### 3.7 Alinhamento das Seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas com o auxílio dos Softwares BioEdit, versão 7.0.5.2, (Hall, 1999) e Chromas, versão 1.42 (Griffith University, Queensland, Australia). Após o alinhamento das seqüências *Forward* e *Reverse*, realizou-se um *overlap* com a finalidade de se obter uma seqüência consenso de cada indivíduo. Todos os indivíduos foram seqüenciados em ambas as direções.

### 3.8 Análise estatística dos dados

#### 3.8.1 Estimativas da Variabilidade Genética

A estimativa da frequência dos haplótipos, valores de diversidade haplotípica ( $h$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) de cada população, número de sítios variáveis ( $S$ ) e número médio de diferenças nucleotídicas ( $K$ ) foram calculados com o auxílio do programa DnaSP, versão 4.0 (Rozas *et al.*, 2003). Os valores par-a-par de  $F_{ST}$  e de  $Nm$  (estimativa de fluxo gênico), análise hierárquica (AMOVA) e a correlação entre distâncias genética e geográfica, pelo teste de Mantel, foram calculados no programa Arlequin, versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006). O valor total de  $Nm$  foi estimado pelo programa DnaSP, versão 4.10 (Rozas *et al.*, 2003).

Para verificar se a distância genética ( $F_{ST}$ ) está correlacionada com a distância geográfica foi utilizado o teste de correlação de Mantel (1967), onde foi testada a significância da correlação entre uma matriz de valores  $F_{ST}$  e uma matriz de distância geográfica entre as localidades, obtida por meio do programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006). Essa análise foi realizada com 1000 permutações. As distâncias geográficas foram obtidas por meio do programa *Google Earth*.

### 3.8.2 Testes de Neutralidade

Para estimar a neutralidade seletiva das populações aqui estudadas foram realizados os testes  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1997). O primeiro teste analisa a variação genética dentro das populações no nível de DNA. O cálculo desta variação é obtido a partir da relação entre o número de sítios segregantes e o número médio de diferenças nucleotídicas estimado pela comparação par-a-par. O teste  $F_s$  de Fu também se baseia no polimorfismo do DNA, porém leva em consideração o fator do tempo nas mutações que geram sítios variáveis, classificando essas mutações como antigas ou recentes. Devido a essas características, o teste  $F_s$  de Fu é também considerado o mais promissor para verificar a existência de crescimento populacional. Os testes de neutralidade foram calculados no programa DnaSP, versão 4.10 (Rozas *et al.*, 2003).

### 3.8.3 Rede de haplótipos

A rede de haplótipos foi gerada através do programa TCS, versão 1.21 (Clement *et al.*, 2000), o qual elimina as seqüências redundantes e constrói o cladograma conectando os clados separados por uma única diferença. Quando os haplótipos diferem em mais de uma mutação o programa gera haplótipos intermediários, representando o haplótipo hipotético, ou seja, inexistente ou não amostrado. Para inferir as relações entre os haplótipos obtidos no presente estudo com haplótipos procedentes de outras localidades, as seqüências aqui encontradas foram comparadas com as seqüências disponíveis no *GenBank* (números de acesso AJ971016-AJ971028; Birungi e Munstermann (2002); AY049968-AY049975, Mousson *et al.* (2005); EU118294-EU118297).

### 3.8.4 Dendrograma

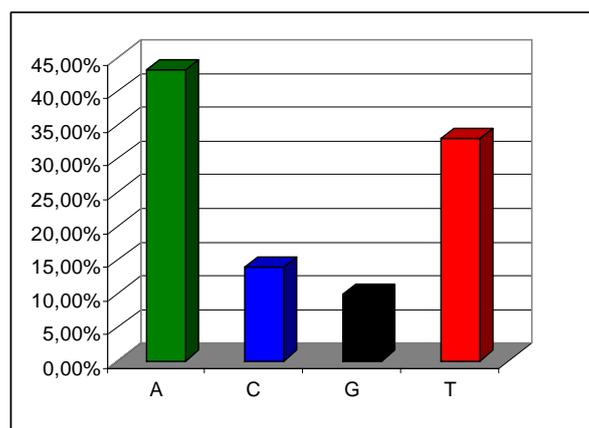
O dendrograma de populações foi gerado no programa Mega, versão 3.1, seguindo-se o método de Neighbor-Joining (Kumar *et al.*, 2004). Na construção desse dendrograma utilizaram-se os valores de  $F_{ST}$  par-a-par entre as amostras, obtidos do Arlequin.

## 4. Resultados

### 4.1 Distribuição e frequência dos haplótipos

Um total de 68 indivíduos foi analisado, que resultaram em 68 seqüências de tamanho de 430 pares de bases (pb). A amostra com maior número de indivíduos analisados foi a do bairro Cidade de Deus, com 16, e os demais bairros tiveram 13 indivíduos analisados cada. A composição média de nucleotídeos foi de 23,72 % para C + G e de 76,28% para A + T. A composição média de cada nucleotídeo está apresentada no gráfico da figura 13, havendo maior frequência dos nucleotídeos A e T.

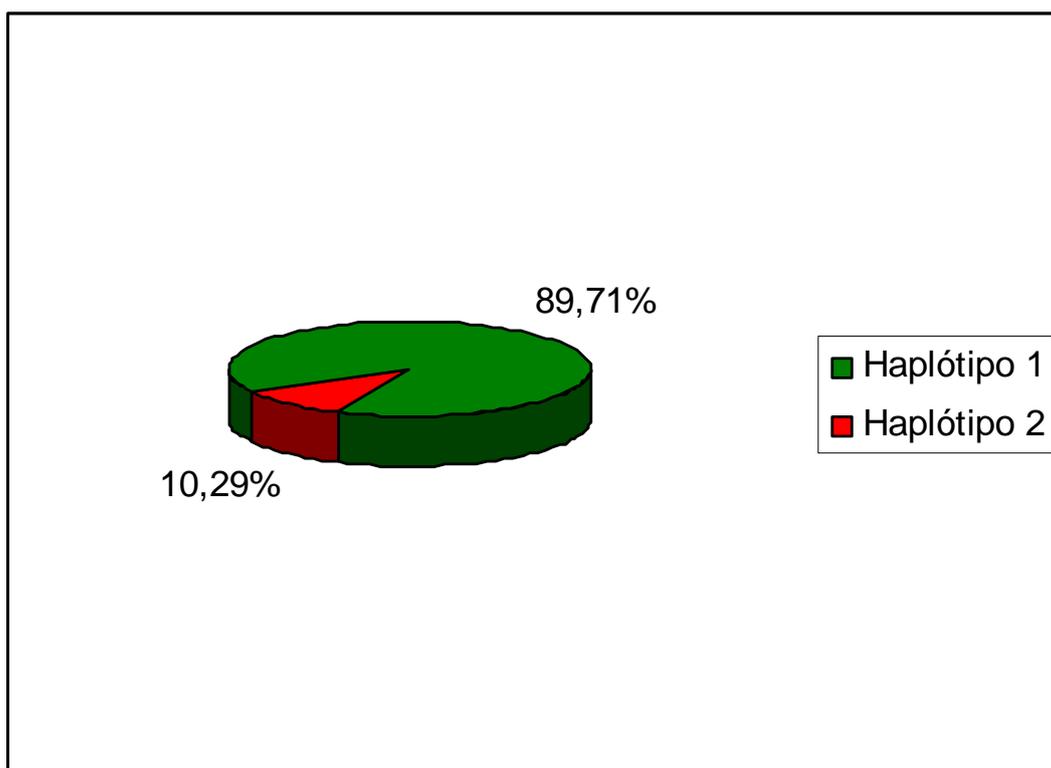
No total, foram encontrados dois haplótipos, separados por apenas uma mutação (C ↔ T), na posição 209 do nosso banco de dados. O haplótipo 1 (H1) foi o mais freqüente e foi encontrado em todas as localidades estudadas, totalizando 61 indivíduos (89,71%). O haplótipo 2 (H2), que foi encontrado em quatro das cinco populações e esteve presente em 7 indivíduos (10,29%) apenas. As freqüências absolutas dos haplótipos nas cinco amostras encontram-se na tabela 2. A freqüência relativa total dos haplótipos e as freqüências relativas dos haplótipos em cada bairro estão representadas nos gráficos das figuras 14 e 15, respectivamente.



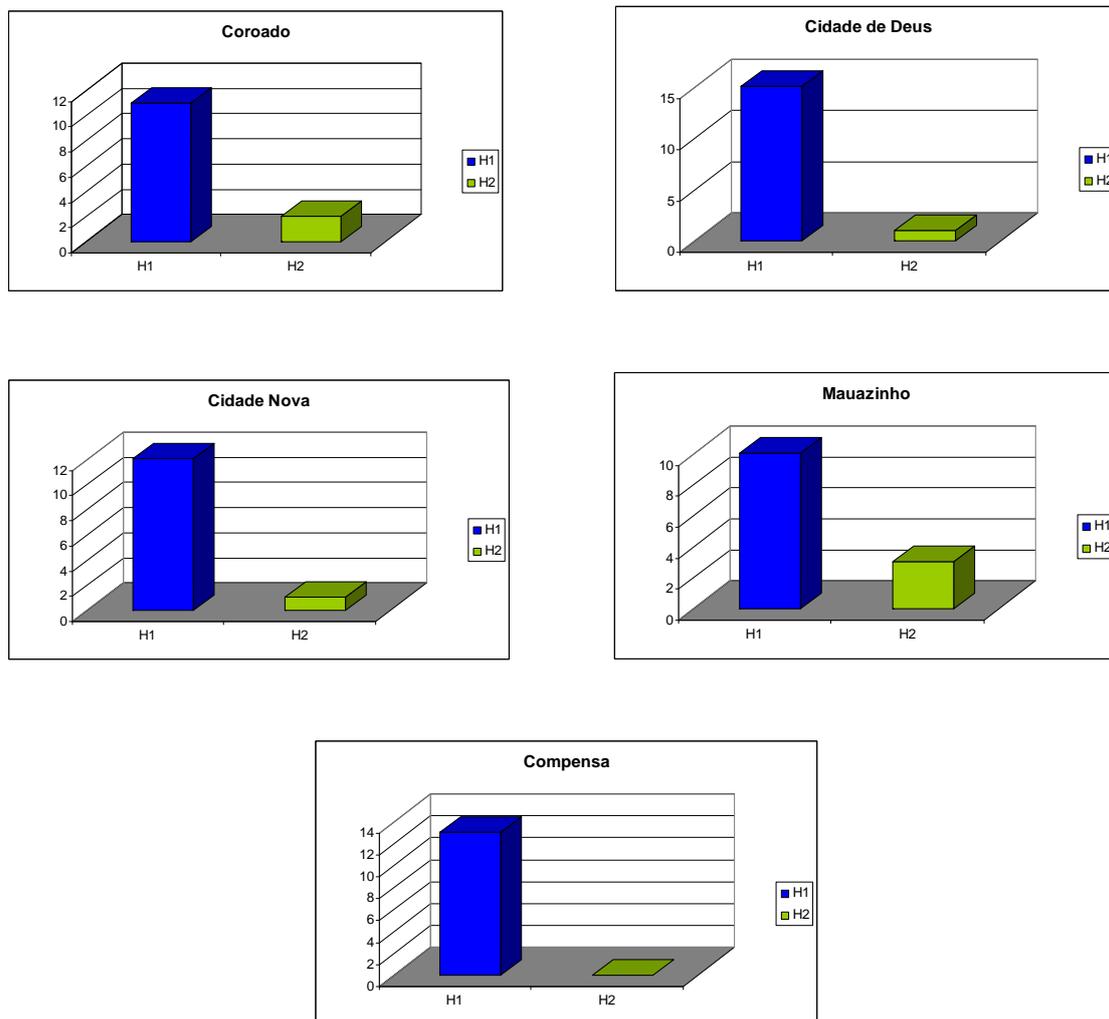
**Figura 13.** Composição média de nucleotídeos.

**Tabela 2.** Número de indivíduos observados para cada haplótipo nas amostras de *Aedes albopictus* dos cinco bairros de Manaus.

População	H1	H2
CO	11	02
CD	15	01
CN	12	01
MA	10	03
CP	13	00
<b>Total</b>	<b>61</b>	<b>07</b>



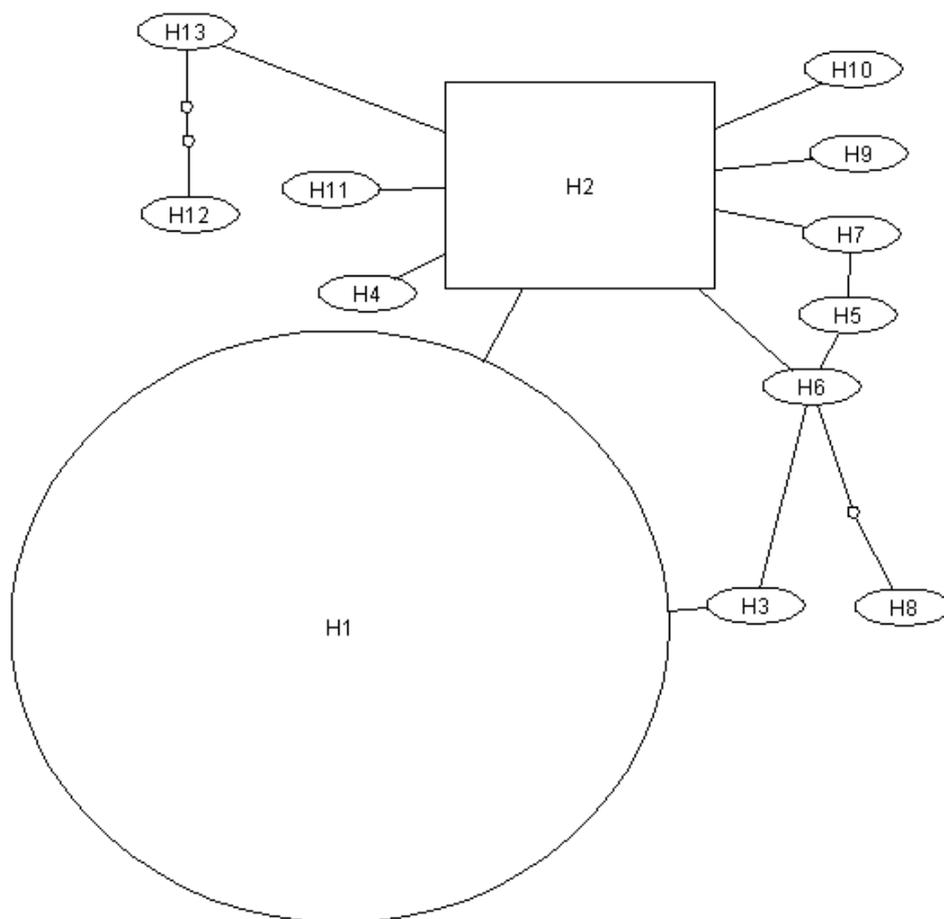
**Figura 14.** Frequência relativa geral dos dois haplótipos de *Aedes albopictus*.



**Figura 15.** Frequências relativas dos haplótipos em cada amostra de *Aedes albopictus*.

Uma rede de haplótipos foi gerada com base no método de parcimônia (Figura 16). O tamanho das elipses é proporcional ao número de indivíduos encontrados. Para a construção desta rede, além dos haplótipos obtidos nesse estudo, foram também incluídas seqüências de haplótipos depositadas no *GenBank*, cujos estudos foram realizados no Brasil, Estados Unidos, Madagascar, Malásia, Indonésia e Japão (Birungi e Munstermann, 2002) e estudos conduzidos em populações do Brasil, Vietnam, Estados Unidos,

Camboja, Madagascar, França, Havaí, Réunion e Tailândia (Mousson et al., 2005) e de seqüências de haplótipos provenientes dos Estados Unidos, cujos dados ainda não estão publicados (Usmani-Brown e Munstermann, dados não-publicados) A tabela 3 apresenta as localidades onde os haplótipos foram encontrados, com as suas respectivas referências bibliográficas.



**Figura 16.** Rede de haplótipos do gene *ND5* de *Aedes albopictus*.

**Tabela 3.** Distribuição dos haplótipos encontrados para o gene *ND5* deste estudo e de outras localidades já estudadas de *Aedes albopictus*.

Haplótipo	Ocorrência	Referência bibliográfica
<b>H1</b>	CO, CN, CD, MA, CP.  Anita Garibaldi (Brasil), Praia de Fora (Brasil), Jacarepaguá (Brasil),  Represa do Cigano (Brasil), São Luís (Brasil).	Presente estudo  H1 de Birungi e Munstermann, (2002)  Mousson <i>et al.</i> (2005)
<b>H2</b>	CO, CN, CD, MA,  Jacksonville (EUA), 3D Salvage (EUA),  Hanói (Vietnam), Chiang Mai (Tailândia), Seam Reap (Camboja), Diego Suarez (Madagascar), Montsecret (França), Naintré (França), Nha Trang (Vietnam), Oahu (Haváí), La Possession (Réunion), La Providence (Réunion).	Presente estudo  H4 de Birungi e Munstermann, (2002)  Mousson <i>et al.</i> (2005)
H3	3D Salvage (EUA), Jacksonville (EUA), AAA Salvage (EUA), Oslo Mall (EUA), Atlanta (EUA), Madagascar, Malásia.	Birungi e Munstermann, (2002)
H4	Anita Garibaldi (Brasil), Praia de Fora (Brasil)	H2 de Birungi e Munstermann, (2002)
H5	3D Salvage (EUA)	Birungi e Munstermann, (2002)
H6	Oslo Mall (EUA)	Birungi e Munstermann, (2002)
H7	3D Salvage, Jacksonville	Birungi e Munstermann, (2002)
H8	Madagascar	Birungi e Munstermann, (2002)
H9	Madagascar	Birungi e Munsterman, (2002)
H10	Dados não publicados	Usmani-Brown e Munstermann
H11	Dados não publicados	Usmani-Brown e Munstermann
H12	Dados não publicados	Usmani-Brown e Munstermann
H13	Dados não publicados	Usmani-Brown e Munstermann

O Haplótipo H1, que foi o mais freqüente nesse estudo, também foi observado em populações de *Ae. albopictus* da costa Sul e Sudeste do Brasil (Birungi e Mustermann, 2002) em São Luís (Estado do Maranhão) e Represa do Cigano (Estado do Rio de Janeiro) (Mousson *et al.*, 2005). O haplótipo H2, que provavelmente é o haplótipo mais antigo e está representado por um retângulo, foi encontrados em populações da Flórida (Birungi e Munstermann, 2002), Seam Reap (Camboja), Diego Suarez (Madagascar), Montsecret e Naintré (França), Hanoi e Nha Trang (Vietnam), Chiang Mai (Tailândia), Oahu (Havaí), La Possession e La Providence (Réunion) (Mousson *et al.*, 2005).

#### 4.2 Diversidade Genética e testes de neutralidade

A diversidade haplotípica ( $h$ ) média foi de  $0,187 \pm 0,059$  enquanto a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) média foi  $0,00044 \pm 0,00014$ . Os maiores valores de diversidades haplotípica e nucleotídica foram encontrados na amostra do bairro Mauzinho, enquanto a amostra do bairro Compensa não apresentou variação. Os valores baixos são decorrentes da presença de dois haplótipos, separados por apenas um (1) sítio polimórfico. Conseqüentemente, os valores de  $S$  e  $K$  foram também baixos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Diversidade genética e testes de neutralidade calculados nas cinco populações de *Aedes albopictus* da cidade de Manaus.

Populações	NH	S	K	H	$\pi$	Teste D de Tajima	Teste Fs de Fu
CO	2	1	0,154	$0,282 \pm 0,0201$	$0,00066 \pm 0,00033$	-0,27429	0,24
CD	2	1	0,125	$0,125 \pm 0,106$	$0,0001 \pm 0,00025$	-0,491	0,035
CN	2	1	0,154	$0,154 \pm 0,126$	$0,00036 \pm 0,00029$	-1,150	-0,537
MA	2	1	0,385	$0,385 \pm 0,132$	$0,00089 \pm 0,00031$	0,426	0,689
CP	1	1	0,000	$0,000 \pm 0,000$	$0,00000 \pm 0,00000$	NC	NC
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,187</b>	<b><math>0,187 \pm 0,059</math></b>	<b><math>0,00044 \pm 0,00014</math></b>	<b>0,518</b>	<b>0,315</b>

**NH** = Número de haplótipos por população; **S** = número de sítios de variação; **K** = número médio de diferenças nucleotídicas; **h** = diversidade haplotípica;  $\pi$  =

diversidade nucleotídica; NC = Não calculado. Nível de significância para testes de neutralidade  $P > 0.05$ .

No teste de neutralidade  $D$  de Tajima, embora houve valores negativos para as amostras de CO, CD e CN, nenhum foi significativo ( $P > 0,05$ ), indicando que polimorfismo genético está de acordo com o modelo neutro de mutações para o gene *ND5*. De forma semelhante, o teste de neutralidade  $F_s$  de Fu, mostrou valor negativo somente para a amostra de CN, entretanto, esse valor não foi significativo. O resultado deste teste sugere que as populações de *Ae. albopictus* destes bairros não encontram-se em expansão.

#### 4.3. Análise de variância molecular (AMOVA), e inferência de fluxo gênico.

Para verificar a origem da variabilidade genética foi utilizada a análise de variância molecular (AMOVA). Nessa análise, as cinco amostras foram consideradas como um único grupo (não agrupadas). Os resultados mostraram que quase toda a variação (99,08%) encontrada ocorreu dentro das populações, enquanto menos de 1% da variação ocorreu entre as populações, com um valor de  $F_{ST}$  extremamente baixo e não significativo ( $P > 0,05$ ), com 1054 permutações.

**Tabela 5.** Análise da variância molecular (AMOVA) considerando os grupos de populações de *Aedes albopictus*.

Tipo de Variação	GL	Variação (%)	Índice de fixação
Entre Populações	4	0,92	$F_{ST} = 0,009$
Dentro de populações	63	99,08	
Total	67	100,00	

GL = graus de liberdade; \*  $P > 0,05$ .

As estimativas de diferenciação genética e de fluxo gênico representadas pelos valores de  $F_{ST}$  e  $Nm$ , respectivamente, mostraram valores de  $F_{ST}$  baixos e

extensivo fluxo gênico entre as populações (Tabela 6). Nas comparações par-a-par entre as populações, todos os valores de  $F_{ST}$  não foram significantes, portanto, foi desnecessário aplicar a correção seqüencial de Bonferroni (Rice, 1989). Contudo, o maior valor de  $F_{ST}$  foi observado entre as amostras dos bairros Mauzinho e Compensa ( $F_{ST} = 0,167$ ;  $Nm = 2,5$ ), atribuído a presença e ausência do H2 em Mauzinho e Compensa, respectivamente.

**Tabela 6.** Distância genética ( $F_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $Nm$ ), acima e abaixo da diagonal, respectivamente, entre amostras de *Aedes albopictus* da cidade de Manaus.

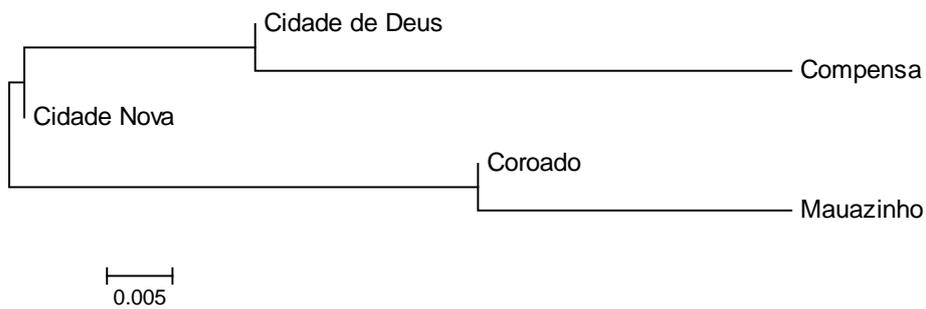
População	CO	CD	CN	MA	CP
CO	-	-0,028	-0,052	-0,063	0,083
CD	Inf. (10,87)	-	-0,073	0,046	-0,014
CN	Inf. (7,69)	Inf. (4,06)	-	0,011	0,000
MA	Inf. (5,73)	10,4 (14,73)	45.5 (10,09)	-	0,167
CP	5.5 (8,34)	Inf. (14,03)	Inf. (10,9)	2.5 (13,49)	-

Inf.: Infinito; Distancias geográfica (km) estão apresentadas dentro dos parênteses. Número de permutações = 1054.

Para verificar se há correlação entre as distancias genética e geográfica foi realizado o teste de Mantel. O valor obtido foi positivo e significativo ( $r^2 = 0,598$ ;  $P = 0,039$ ), com 1054 permutações, indicando que há aparente correlação entre as distâncias genética e geográfica.

As relt fic. ra

do grupo I apresentaram com nenhum ou apenas um indivíduo com o H2 e, as duas amostras do grupo II apresentaram dois e três indivíduos com o H2 do total analisado.



**Figura 17.** Dendrograma de distância genética das cinco populações de *Aedes albopictus* de Manaus (AM), com o emprego do método Neighbour-Joining.

## 5. Discussão

### 5.1 Frequência e distribuição dos haplótipos.

O presente trabalho é o primeiro estudo de genética de populações de *Ae. albopictus* realizado na cidade de Manaus, com o emprego do gene *ND5* do genoma mitocondrial. Dos 68 indivíduos analisados, apenas dois haplótipos foram encontrados. O H1 foi o mais freqüente nas cinco populações analisadas, enquanto o H2 foi detectado em baixa freqüência em quatro das cinco amostras. Resultados semelhantes foram obtidos em quatro amostras de *Ae. albopictus* das regiões Sul e Sudeste do Brasil, utilizando também o gene *ND5* (Birungi e Munstermann, 2002). Estes autores encontraram dois haplótipos denominados H1 e H2 nessas regiões, sendo o H1, o mais freqüente, que foi observado em duas localidades do Estado de Santa Catarina, uma do Estado do Rio de Janeiro e uma de Vitória (Estado de Espírito Santo). O H1 observado por estes autores foi compartilhado com o H1 do presente estudo. Além dessas localidades, esse haplótipo (H1 do presente estudo), também foi registrado por Mousson et al. (2005) nas localidades da Represa do Cigano (Estado Rio Janeiro) e São Luís (Estado do Maranhão). Portanto, esse haplótipo parece estar amplamente distribuído no Brasil. No estudo de Birungi e Munstermann (2002) um segundo haplótipo, denominado de H2, foi detectado nas duas localidades do Estado de Santa Catarina, porém em baixa freqüência. Este haplótipo não foi observado no presente estudo e em nenhuma outra localidade, até o momento, estudada (Birungi e Munstermann, 2002; Mousson et al. 2005).

O H2, encontrado no presente estudo, ocorre em baixa freqüência (10,29%) em Manaus. Esse haplótipo foi encontrado em duas localidades do litoral da Flórida (EUA), denominado de H4, por Birungi e Munstermann (2002), mas não foi verificado em populações brasileiras por Mousson *et al.* (2005). Embora esse haplótipo tenha sido encontrado em baixa freqüência em Manaus (presente estudo) e na Flórida (Birungi e Munstermann, 2002), o mesmo parece estar amplamente distribuído pelo mundo, em especial nos países da Ásia e

França (Mousson *et al.*, 2005). Com base nestes resultados, Mousson *et al.* (2005) em um estudo biogeográfico sugeriram que as populações brasileiras podem ser constituídas de linhagens distintas daquelas encontradas na Ásia e podem ser consideradas parafiléticas. No entanto, nosso estudo demonstrou que o H2 do presente estudo é compartilhado com o haplótipo encontrado nas localidades da Ásia [Hanói (Vietnam), Chiang Mai (Tailândia), Seam Reap (Camboja), Diego Suarez (Madagascar), Nha Trang (Vietnam), Oahu (Haváí), La Possession (Réunion), La Providence (Réunion)] e da França (Montsecret e Naintré), sugerindo que populações do Brasil e Ásia compartilham haplótipos, não sendo, portanto, linhagens distintas e como conseqüência não formam populações parafiléticas.

Desse modo, os resultados do presente estudo somados aos estudos de Birungi e Munstermann (2002) e de Mousson *et al.* (2005) proporcionam evidências de que podem ter ocorrido duas introduções no Brasil e, não uma única, como foi discutida por Mousson *et al.* (2005). Devido ao fato das populações de *Ae. albopictus* do município de Manaus compartilharem o H1 com as populações da costa Sul e Sudeste do Brasil (H1), assim como compartilham o H2 com as populações do litoral da Florida (Estados Unidos) e dos países da Ásia, há fortes evidências de terem ocorrido mais de uma introdução na cidade de Manaus.

O fato de o H1 estar também presente em populações de São Luis (Estado do Maranhão) e Represa do Cigano (Estado do Rio de Janeiro) permite sugerir a hipótese de que este haplótipo (H1) poderia ter sido introduzido em Manaus, via São Luis.

Em relação às populações do continente asiático, o haplótipo H2 (presente estudo) foi também observado nas populações da Tailândia e de outros países asiáticos como Vietnam, Camboja, Indonésia e Malásia, o que reforça a hipótese de que H1 e H2 tiveram introduções independentes nas Américas. Corroborando essa hipótese, estudos anteriores mostraram que o H1 permite separar as populações do Brasil das populações da Ásia, (Birungi e Mustermann, 2002; Mousson *et al.*, 2005). No entanto, em Manaus, é mais provável que tenha

havido introduções por populações americanas de *Ae. albopictus*, afinal a cidade de Manaus está geograficamente mais próxima dos Estados Unidos do que das localidades asiáticas. Reforçando ainda esta hipótese, *Ae. albopictus* foi registrado no Brasil após seu registro na América do Norte (Forattini, 1986). Acredita-se que a introdução deste mosquito nas Américas tenha ocorrido mediante dispersão passiva através do comércio de pneus do norte da Ásia (Hawley *et al.*, 1987).

Portanto, nossos resultados somados aos dados disponíveis na literatura (Birungi e Munstermann, 2002; Mousson *et al.*, 2005) sugerem a ocorrência de pelo menos duas introduções de *Ae. albopictus* no município de Manaus: uma provavelmente oriunda de populações das regiões Sul e Sudeste do Brasil; e outra vinda do Brasil; eonea/TT4 d7(t)-5.2F(a/TT4órJ/TT4ia/TT4da,)-5smo Ba/TT4 1 Tf6.-.000

(1991) em 17 populações de *Ae. albopictus* da Ásia, com o emprego de marcadores *RFLP* (DNA mitocondrial). Esses autores interpretaram os dados obtidos como resultante da recente expansão dessa espécie naquele continente.

Por outro lado, estudos recentes mostraram níveis maiores de variabilidade genética para as populações de *Ae. albopictus* provenientes da Região Metropolitana do Recife (PE), Minas Gerais e Rio de Janeiro. Os valores de diversidade nucleotídica foram superiores em todas as populações analisadas, tanto para o gene *COII* ( $\pi = 0,04679$ ) quanto para o *ND4* ( $\pi = 0,10831$ ) (Guedes, 2006). Estes resultados podem indicar que em *Ae. albopictus*, esses genes são menos conservados do que o gene *ND5*, ou que as populações analisadas por Guedes (2006) foram introduzidas há mais anos e tiveram tempo suficiente para o acúmulo de mutações ou, ainda, quando da colonização essas populações foram fundadas por muitos indivíduos.

Ainda, neste estudo os valores médios de diversidade genética ( $h = 0,187$ ;  $\pi = 0,00044$ ) foram extremamente baixos quando comparados com outras espécies de mosquitos, analisadas para o gene *ND5*, como por exemplo, em *Anopheles albimanus* da América do Sul e Caribe ( $h = 0,450$ ;  $\pi = 0,0047 - 0,0051$ ) (De Mérida *et al.*, 1999; Molina-Cruz *et al.*, 2004), em *Anopheles arabiensis* do Quênia ( $h = 0,841$ ;  $\pi = 0,51$ ) (Temu e Yan, 2005) e em *Aedes vexans* dos Estados Unidos ( $h = 0,953$ ;  $\pi = 0,008$ ) (Szalanski *et al.*, 2006).

Além disso, estudos realizados em outras espécies do gênero *Aedes* mostraram níveis mais elevados de variação genética. Os valores de diversidade genética do presente estudo também foram inferiores aos valores encontrados por Fonseca *et al.* (2001) para o TT4 1 Tf.6067 0 TD-l3s[p(étic Tf-33.1568 -1.7275 TD-.0003 To

encontrado corresponde ao modelo neutro de mutações. Os testes  $D$  de Tajima realizados por Birungi e Mustermann (2002) também não se mostraram significativos. O teste  $F_s$  de Fu (Fu, 1997), indicado para detectar o crescimento populacional, também não apresentou valores significativos, não havendo, portanto, evidência de que as populações das localidades estudadas estejam se expandindo, apesar da introdução ser relativamente recente.

### 5.3 Análise de variância molecular (AMOVA) e fluxo gênico.

Na análise de variância molecular (AMOVA), onde todas as cinco populações foram consideradas um grupo único (Tabela 4), indicou que quase a totalidade da variação encontrada ocorreu dentro das populações (99,08%), enquanto a variação entre as populações foi extremamente baixa (0,92%). Esse resultado sugere que as populações de *Ae. albopictus* da cidade de Manaus não encontram-se geneticamente estruturadas. O resultado desta análise (AMOVA) é corroborado pelos valores baixos de distância genética ( $F_{ST}$ ) e elevados valores de  $Nm$  entre as amostras, com exceção da comparação entre Compensa e Mauzinho ( $F_{ST} = 0,167$ ;  $Nm = 2,5$ ), sugerindo pouca estrutura genética apesar das evidências de duas introduções e dos níveis extremamente baixos de variação genética.

Diferente de nossos resultados, estudos prévios indicaram diferenças genéticas entre as populações (Ayres et al. 2002; Vazeille et al., 2001; Chareonviriyaphap et al., 2004). No entanto, as amostras analisadas nesses estudos foram geograficamente distantes. Ayres et al. (2002), com o uso de marcadores *RAPD*, constataram índices menores de  $Nm$  para populações de *Ae. albopictus* em Pernambuco, Rio de Janeiro e Minas Gerais, onde foi observado um fluxo gênico médio de  $Nm = 2,86$ . Já populações provenientes de Madagascar, analisadas pelo polimorfismo de isoenzimas, revelaram um baixo fluxo gênico, com  $Nm$  médio de 0,9 (Vazeille et al., 2001). Populações de seis localidades da Tailândia, estudadas por marcadores isoenzimáticos, também

revelaram um baixo número de migrantes entre as amostras, com  $Nm$  médio de 0,97 por geração (Chareonviriyaphap *et al.*, 2004).

Nesse estudo, a pouca estrutura genética observada (AMOVA e valores de  $F_{ST}$  e  $Nm$ ) pode ser consequência da recente introdução dessa espécie em Manaus, via efeito do fundador, seguida de recente expansão através dos bairros da cidade. Portanto, a semelhança genética (pouca estrutura) pode ser devida ao tempo insuficiente para ter acumulado diferenças genéticas (mutações) entre as populações de *Ae. albopictus* dessas localidades e não ao extenso fluxo gênico atual entre elas, refletindo homogeneidade genética.

O teste de Mantel indicou uma correlação positiva e significativa entre distâncias geográfica e genética, sugerindo que o fluxo gênico depende da distância geográfica. O resultado deste teste pode ser interpretado pela semelhança genética e a proximidade geográfica entre as comparações Coroado e Mauzinho e entre Cidade Nova e Cidade de Deus. Por outro lado, este resultado pode ser decorrente de uma expansão recente de *Ae. albopictus* em Manaus, reforçando o que foi proposto acima.

#### 5. 4 Dendrograma de populações

No dendrograma de populações (Figura 17) de *Ae. albopictus* de Manaus foi observado dois agrupamentos. O grupo I está representado pelos bairros Cidade de Deus, Compensa e Cidade Nova. O grupo II é formado pelos bairros Coroado e Mauzinho. Essa separação está relacionada à frequência do haplótipo H2. O maior agrupamento foi o grupo I que apresentou as populações com um ou nenhum indivíduo portando o haplótipo H2. A população(s) 1(re 4éanto,réantoc

Oliveira *et al.* (2003), que analisaram através de isoenzimas 20 localidades do Brasil, Estados Unidos e Ilhas Caiman. Nesse estudo, foi constatado elevado nível de diferenciação genética ( $F_{ST} = 0,249$ ).

A partir desse estudo foi possível observar a ocorrência de mais um haplótipo (H2), o qual não tinha sido previamente detectado no Brasil, sendo considerado até então restrito às populações da Ásia e do litoral da Flórida, nos Estados Unidos (Birungi e Munstermann, 2002; Mousson *et al.*, 2005).

Os dados gerados neste estudo fornecem informações adicionais e relevantes ao conhecimento dos eventos de colonização desta espécie no Brasil, assim como os primeiros resultados sobre os eventos de colonização na Amazônia. Esse conhecimento, embora preliminar, pode fornecer informações relevantes aos órgãos de controle de vetores, principalmente os de controle de dengue e febre amarela, atentando ao fato de haverem mais de uma possibilidade de introdução do vetor *Ae. albopictus* na cidade de Manaus. Vários estudos evidenciaram uma correlação entre a competência vetorial dos mosquitos e a estrutura genética de populações (Beertsen *et al.*, 2000; Faiulloux *et al.*, 2002; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004). Sendo Manaus uma cidade endêmica em dengue e situada em área de risco de febre amarela, o conhecimento acerca da genética populacional do *Ae. albopictus*, bem como de outros vetores, torna-se uma ferramenta extremamente útil para o entendimento da dinâmica de transmissão, sendo um passo essencial para aprimorar nos programas de controle de doenças na região.

## 6. Conclusões

Os resultados obtidos nas análises realizadas com o gene *ND5* nas cinco populações de *Ae. albopictus* de Manaus permite as seguintes conclusões:

1. O número de haplótipos encontrado para o gene *ND5* no município de Manaus foi baixo (2) e estão separados por apenas um evento mutacional (C ↔ T).
2. Os valores médios de diversidade genética foram baixos, assim como os valores obtidos de cada população estudada.
3. Os testes de neutralidade, *D* de Tajima e *F<sub>s</sub>* de Fu, indicaram que as populações de *Ae. albopictus* de Manaus estão em equilíbrio genético. O teste *F<sub>s</sub>* de Fu sugeriu também que as populações não se encontram em expansão.
4. Com base nos resultados obtidos para a AMOVA e nos valores de *F<sub>ST</sub>* e *N<sub>m</sub>*, as cinco populações analisadas de Manaus mostraram um baixo nível de estruturação genética. Esse resultado pode ser consequência da recente introdução dessa espécie em Manaus, via efeito do fundador, seguida de recente expansão através dos bairros da cidade. Portanto, a semelhança genética pode ser devida ao tempo insuficiente para haver o acúmulo de diferenças genéticas entre as populações e, não ao extensivo fluxo gênico ocorrendo no presente entre elas.
5. O dendrograma apresentou dois grupos, os quais estão relacionados à presença do H2.

6. Existem evidências de pelo menos duas introduções de *Ae. albopictus* no município de Manaus: uma provavelmente originada da costa Sul e Sudeste do Brasil, e outra proveniente do litoral da Flórida, Estados Unidos.

## 7. Referências Bibliográficas

- Ângella, A. F.; Gil, L. H. S.; Silva, L. H. P.; Ribolla, P. E. M. 2007. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Rondônia, Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102: 953-958.
- Apperson, C. S.; Engber, B.; Levine, J. F. 1989. Relative suitability of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in North Carolina to support development of *Dirofilaria immitis*. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.*, 5: 493-500.
- Attardi, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. *Int. Rev. Cyt.*, 93: 93-145.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. *Champ & Hall*, New York.
- Ayres, C. F. J.; Romão, T. P. A.; Melo-Santos, M. A. V.; Furtado, A. F. Genetic Diversity of Brazilian Populations of *Aedes albopictus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97: 871-875.
- Beaty, B. J.; Marquardt, W. C. 1996. The biology of disease vectors. *University Press of Colorado*. Niwot, USA, 632p.
- Beerntse, B. T.; James, A.; Christensen, B. M. 2000. Genetics mosquito of vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64 91): 115-137.
- Besansky, N. J.; Lehmann, T.; Fahey, G. T.; Collins, F. H. 1997. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. *Genetics*: 147: 1817-1828.

- Birungi, J.; Munstermann, L. E. 2002. Genetic Structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations Based on Mitochondrial ND5 Sequences: Evidence for an Independent Invasion into Brasil and United States. *Annals Of The Entomological Society of America*, 95: p. 125-132.
- Boore, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27 (8): 1767-1780.
- Bracco, J. E.; Capurro, M. L.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Sallum, M. A. M. 2007. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem. Int. Oswaldo Cruz*, 103: 000.
- Brown, W. M.; Prager, E. M.; Wang, A.; Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1967-1971.
- Burla, H.; Jungen, H; Bächli, G. 1986. Population structure of *Drosophila subobscura*: non-random microdispersion of inversion polymorphism in a mountain slope. *Genetica*, 70: 9-15.
- Chareonviriyaphap, T.; Akkratanakul, P.; Huntamai, S.; Nettanomsak, S. 2004. Allozyme Patterns of *Aedes albopictus*, a vector of Dengue in Thailand. *J. Med. Entomol.*, 41 (4): 657-663.
- Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9 (10): 1657-1660.
- Coleman, M.; Vontas, J. G.; Hemingway, J. 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus*. *Eur. J. Biochem.*, 269: 768-779.

- Collins, F. H.; Mendez, M. A.; Rasmussen, M. O.; Mehaffey, P. C.; Besansky, N. J.; Finnerty, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 37-41.
- Conn, J. E.; Mitchell, S. E.; Cockburn, A. F. 1997. Mitochondrial DNA variation within and between two species of Neotropical anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Heredity*, 88: 98-107.
- Consoli, R. A. G. B.; Lourenço-De-Oliveira, R. 1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 225p.
- De Mérida, A. M. P.; Palmeri, M.; Yurrita, M. M.; Molina, M.; Molina, E.; Black Iv, W. C. 1999. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* localities. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.*, 61: 230-239.
- Desjardins, P.; Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 212:5999-634.
- Estrada-Franco, J. G.; Craig Jr., G. B. 1995. Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus*. Washington, Pan American Health Organization. (Technical Paper, 42).
- Etges, W. J. 1984. Genetic structure and change in natural populations of *Drosophila robusta*: systematic inversion and inversion frequency shifts in the Great SmoKy Mountains. *Evolution*, 38: 675-688.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2006. Arlequin ver. 3.0: An intergrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*.

- Failloux, Ana-bella; Vazeille, M.; Rodhain, F. 2002. Geographic genetic variation in population of dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution*, 55:653-663.
- Fé, N. F.; Barbosa, M. G. V.; Alecrim, W. D.; Guerra, M. V. F. 2003. Registration of the occurrence of *Aedes albopictus* in a urban zone in Manaus, Amazonas, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 37(5) 674-675.
- Fonseca, D. M.; Campbell, S.; Crans, W. J.; Mogi, M.; Miyagi, I.; Toma, T.; Bullians, M.; Andreadis, T. G.; Berry, R. L.; Pagac, B.; Sardelis, M. R.; Wilkerson, R. C. 2001. *Aedes (Finlaya) japonicus* (Diptera: Culicidae), a Newly Recognized Mosquito in the United States: Analyses of Genetic Variation in the United States and Putative Source Populations. *J. Med. Entomol.*, 38: 135-146.
- Forattini, O. P. 2002 *Culicidologia Medica*. Vol. 2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.
- Forattini, O. P. 1986. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 20: 244-245.
- Foster, B. E. 1989 *Aedes albopictus* larvae collected from tree holes in Southern Indiana. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.*, 5: 95.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1447: 915-925.
- Gomes, A. de C.; Marques, G.R.A.M. 1988. Encontro de criadouro natural de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 22: 245.

Gomes, A. de C.; Forattini, O. P.; Kakitani, I.; Marques, G. R. A. M.; Marques, C. de A.; Marucci, D.; Brito, M. de. 1992. Microhabitats de *Aedes albopictus* (Skuse) na região do Vale da Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 26: 108-118.

Gray, M. W. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 5: 25-50.

- Ibanez-Bernal, S.; Briseno, B.; Mutebi, J. P.; Argot, E.; Rodriguez, G.; Martinez-Campos, C.; Paz, R.; De La Fuente-San Roman, P.; Tapyá-Conier, R.; Flisser, A. 1997. First Record in América of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak of Reynosa, Mexico. *Med. Vet. Entomol.*, 11:305-309.
- Kambhampati, S.; Black IV, W. C.; Rai, K. S. 1991. Geographic origin of the US and *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. *Heredity*, 67: 85-93.
- Knight, K. L.; Stone, A. 1977. *A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae)*. Vol. 6, 2 ed. The Thomas Say Foundation, Baltimore, Md.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. 2004. MEGA: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163.
- Lang, B. F.; Gray, M. W.; Burger, G. 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 33: 351-397.
- LaPoint, D. A.; Goff, M. L.; Atkinson, C. T. 2007. Comparative susceptibility of introduced-forest dwelling mosquitoes in Hawaii to avian malaria, *Plasmodium relictum*. *Journal of Parasitology*, 91: 843-849.
- Levitan, M. 1978. Studies of linkage in populations. IX. The effects of altitude on X-chromosome arrangement combinations in *Drosophila robusta*. *Genetics*, 89:751-763.
- Liebherr, J. K. 1986. Comparison of genetic variation in two Carabid beetles (Coleoptera) of differing vagility. *Annals of Entomological Society of America*, 79: 424-433.

- Lima Junior, R. S. Estimativas de Variação Genética do gene *ND4* do DNA Mitocondrial em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da Amazônia, Brasil. Dissertação de Mestrado. INPA, Manaus-AM Maio de 2007.
- Lounibos, L. P.; Escher, R. L.; Lourenço-de-Oliveira, R. 2003. Asymmetric Evolution of Photoperiodic Diapause in Temperate and Tropical Invasive Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 96 (4): 512-518.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Vazeille, M.; Fillipis, A. M. B.; Failloux, A. 2004. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98: 43-54.
- Lourenço-de-Oliveira, R.; Vazeille, M.; Fillipis, A. M. B.; Failloux, A. 2003. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, United States and the Cayman Islands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69 (1): 105-114.
- Misof, B.; Anderson, C. L.; Hadrys, H. 2000. A phylogeny of the damselfly genus *Calopteryx* (Odonata) using mitochondrial 16S rDNA markers. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 15: 5-14.
- Mitchell, C. J.; Miller, B. R. 1990. Vertical transmission of dengue viruses by strains of *Aedes albopictus* recently introduced into Brazil. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.*, 6 (2): 251-253.
- Mitchell, C. J. 1995. Geographic Spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in Mediterranean basin. *J. Vec. Ecol*, 20: 44-58.

- Mitchell, C. J.; Niebylski, M. L.; Smith, G. C.; Karabatsos, n. Martin, d. Mutebi, J. P.; Craig Jr, G. B.; Mahler, M. J. 1992. Isolation of eastern equine encephalitis virus from *Aedes albopictus* in Florida. *Science*, 257: 526-527.
- Mitchell, C. J.; Smith, G. C.; Miller B. R. 1990. Vector competence of *Aedes albopictus* for a newly recognized Bunyavirus from mosquitoes collected in Potosi, Missouri. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.*, 6: 523-527.
- Molina-Cruz, A.; De Mérida, A. M. P.; Mills, K.; Rodríguez, F.; Schoua, C.; Yurrita, M. M.; Molina, E.; Palmieri, M.; Black IV, W. C. 2004. Gene Flow Among *Anopheles albimanus* Populations in Central América, South América and the Caribbean Assessed by Microsatellites and Mitochondrial DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71 (3): 350-359.
- Morita, T. 1999. Molecular phylogenetic relationships of the deep-sea fish genus *Coryphaenoides* (Gadiformes: Macro-muridae) based on mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13: 447-454.
- Mousson, L.; Dauga, C.; Schaffner, F.; Vazeille, M.; Failloux, A. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) based on mitochondrial DNA variations. *Gen. Res. Camb.*, 86: 1-11.
- Natal, D.; Urbinatti, P. R.; Taípe-Lagos, C. B.; Cereti-Júnior, W.; Diederichsen, A. T. B.; Souza, R. G.; Souza, R. P. 1997. Encontro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) em Bromeliaceae na periferia de São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 31: 517- 518.
- Nei, M. ; Muruyama T.; Chakraborty, R.1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29: 1-10.

- Neves, D. P. 1976. *Parasitologia humana*. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. 342p.
- Okimoto, R.; Macfarlane, J. L.; Clary, D. O.; Wolstenholme, D. R. 1992. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics*, 130: 471-498.
- O'Meara, G. F.; Evans Jr., L. F.; Gettman, A. D.; Cuda, J. P. 1995. Exotic tanks bromeliads harboring immature *Aedes albopictus* and *Aedes bahamensis* (Diptera: Culicidae) in Florida. *J. Vector Ecol.*, 20: 216-224.
- Pääbo, S.; Higuchi, r. G.; Wilson, A. C. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.*, 264: 9709-9712.
- Peterson, M A. 1995. Phenological isolation, gene flow, and developmental differences among low- and high-elevation populations of *Euphilotes enoptes* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Evolution*, 49: 446-455.
- Posada, D.; Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Rai, K. S. 1991. *Aedes albopictus* in the Américas. *Ann. Rev. Entomol*, 36: 459-484.
- Reisen, W. K.; Lothrop, H. D.; Presser, S. B.; Hardy, J. L.; Gordon, E. W. 1997. Landscape ecology of arboviruses in southeastern California: temporal and spatial patterns of enzootic activity in Imperial Valley, 1991-94. *J. Med./Entomol.*, 34:179-188.

- Richards, C. M.; Moore, W. S. 1996. A phylogeny for the African treefrog family Hyperoliidae based on mitochondrial rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5: 522-532.
- Ríos-Velásquez, C. M.; Codeço, C. T.; Honório, N. A.; Sabrosa, P. S.; Moresco, M.; Cunha, I. C. L.; Levino, A.; Toledo, L. M.; Luz, S. L. B. 2007. Distribution of Dengue Vectors in Neighborhoods with different urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102:617-623.
- Rosen, L.; Shroyer, D. D.; Tesh, R. B.; Freier, J. E.; Lien, J. C. 1983. Transovarial transmission of dengue virus by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 32: 1108-1119.
- Rozas, J.; Sánchez-DelBarrio, J. C.; Messeguer, X.; Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.
- Sá, E. L. R. 2004. Estudo das áreas de ocorrência e dos criadouros preferenciais de *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) em Manaus, Amazonas Brasil. Dissertação de Mestrado, INPA.
- Santos, R. L. C. 2003. Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brazil (1997-2002). *Rev. Saúde Pública*, vol. 37 (5): 671-673.
- Scarpassa, V. M.; Geurgas, S.; Azeredo-Espin, A. M. L.; Tadei, W. P. 2000. Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brasil and Colômbia. *Genetics and Molecular Biology*, 23 (1): 71-78.
- Serufo, J. C.; Montes de Oca, H.; Tavares, V. A.; Souza, A. M.; Rosa, R. V.; Jamal, M. C.; Lemos, J. R.; Oliveira, M. A.; Nogueira, R. M. R.;

- Schatzmayr, H. C. 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88: 503-504
- Snutad, D. P. & Simmons, M. J. 2001. *Fundamentos de Genética*. Guanabara Koogan, 2ed. Rio de Janeiro.
- Spanos, L.; Koutroumas, G.; Kotsyfakis, M.; Louis, C. 2000. The mitochondrial genome of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 9 (2): 139-144.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (\* and other methods). Version 4. 0d65. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts.
- Szalanski, A. L.; Owens, C. B.; Lewter, J. A.; Broce, A. B. 2006. Genetic Structure of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) Populations from Central United States Based on Mitochondrial *ND5* Sequences. *Genetics*, 99: 157-163
- Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.
- Temu, E. A.; Yan, G. 2005. Microsatellite and Mitochondrial Genetic Differentiation of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culidae) from Western Kenya, The Great Rift Valley, and Coastal Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73 (4): 726-733.
- Urbanelli, S., Bellini, R.; Carrieri, M; Salicandro, P.; Cellis, G. 2000. Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity*, 84, 331-337.

- Vazeille, M.; Mousson, L.; Rakatoarinovy, I.; Villeret, R.; Rodhain, F.; Duchemin, J. B.; Failloux, A. B. 2001. Population Genetic structure and Competence as a Vector for Dengue Type 2 Virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.*, 65: p. 491-497.
- Velez, I. D.; Quinone, M. L.; Suarez, M.; Olano, V.; Murcia, L. M.; Correa, e. et al. 1998. Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomedica*, 18: 192-198.
- Wallace, D. C. 1986. Mitochondrial genes and disease. *Hospital Practice*, 21: 77-92.
- Wallace, D. C. 1992. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 61:1175-212.
- Whittaker, R. H. 1975. *Comunities and Ecosystems*. Macmillan, New York.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)