UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

**Genealogia, distribuição e história de haplótipos do gene
mitocondrial *NADH4* em populações do *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (Díptera: Culicidae) no Brasil.**

José Eduardo Bracco

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção
do título de Doutor em saúde Pública.**

Área de concentração: Epidemiologia

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Anice M.
Sallum**

São Paulo

2004

ÍNDICE

RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
JUSTIFICATIVAS.....	15
OBJETIVOS	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
1. Coleta dos espécimes	18
2. Populações analisadas	20
3. Extração de DNA	23
4. Amplificação do DNA	23
5. Seqüenciamento genômico	25
6. Alinhamento das seqüências.....	26
7. Análise do polimorfismo.....	26
7.1 Diversidade genética	26
7.2 Testes de neutralidade	26
7.2.1 Teste D de Tajima	27
7.2.2 Testes D* e F* de Fu e Li.....	27
7.3 Análise de clados agrupados.....	28
7.4 Análise de variância molecular (AMOVA)	29
7.5 Distribuição das diferenças pareadas	31
7.6 Análises genealógicas	31
7.6.1 Parcimônia máxima	32
7.6.2 Verossimilhança máxima.....	33
7.6.3 Tempo de divergência	36
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXO.....	108

RESUMO

Informações sobre variabilidade intrapopulacional de vetores biológicos são críticas para o entendimento da transmissão de agentes infecciosos veiculados por esses organismos. Nesse sentido, o presente trabalho caracterizou a variabilidade de fragmento que codifica a subunidade 4 do gene mitocondrial da Nicotinamina Adenina Dinucleotideo Desidrogenase – NADH4 em populações de *Aedes aegypti* do Brasil e de outros países.

Polimorfismos de nucleotídeos únicos foram detectados através da técnica de seqüenciamento genômico. As análises realizadas compreenderam a de variância molecular (AMOVA), clados agrupados (NCA), distribuição de diferenças pareadas. Paralelamente foram examinadas relações evolutivas entre os haplótipos com o emprego dos critérios de parcimônia máxima e verossimilhança máxima.

Os resultados mostram que há polimorfismo do fragmento nas populações analisadas, levando à proposição de dois clados geneticamente independentes (monofiléticos).

Inferências de caráter histórico suportam a hipótese de que um dos clados inclui seqüências de indivíduos de populações que chegaram às Américas durante os séculos XVII e XVIII pelo tráfico negreiro, e outro, formado por populações introduzidas mais recentemente, se originou de populações asiáticas.

Possíveis implicações epidemiológicas da variabilidade genética apresentada pelas populações do *Ae. aegypti* são também discutidas.

ABSTRACT

Knowledge about intrapopulacional variation of biological vectors is critical for understanding the dynamics of the transmission of an infectious agent. The major objective of the present study is to characterize the variability of a gene fragment, which codes for the subunit 4 of the mitochondrial gene of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase – *NADH4* among *Aedes aegypti* populations from Brazil comparing with that of several other countries.

Single nucleotide polymorphism was detected employing genomic sequencing techniques. Nucleotide sequences were analyzed using molecular variance (AMOVA), nested clade (NCA) and mismatch distribution methods. Additionally, evolutionary relationships among haplotypes were estimated employing maximum parsimony and maximum likelihood criterions.

The results show that the fragment of the mitochondrial gene (*NADH4*) is polymorphic, and that the populations of *Ae. aegypti* from Brazil are grouped into two genetically distinct, monophyletic clades

Historical inferences support the hypothesis that one clade includes sequences from individuals that may be introduced in the Americas in the 17th and 18th centuries during the slave trade from Africa to America. The second clade consists of sequences of individuals that may be introduced in Brazil more recent, probably from Asian populations.

Epidemiological consequences because of the genetic variability among populations of *Ae. aegypti* in Brazil are discussed.

INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti*, vetor primário dos vírus Dengue subtipos 1-4 (DEN 1-4) e Febre Amarela (FA), é considerado Culicidae autóctone do continente Africano, onde convivem as formas silvestre e domiciliada. Acredita-se que seu centro de dispersão seja a Etiópia (OPAS, 1995).

Sua presença no continente Americano data dos séculos XVII e XVIII. Provavelmente foi trazido nos navios negreiros a partir da África ocidental. Na segunda metade do século XIX, a forma domiciliada desse inseto estava presente em cidades do continente Asiático (Smith, 1956). Atualmente, sua distribuição compreende grande faixa tropical e subtropical, indo de 45° N a 35° S de latitude (Fig. 1) (Slosek, 1986).

Fig. 1 - Áreas infestadas por *Aedes aegypti* e com transmissão de dengue em 2000.

Fonte: Center of Disease Control and Prevention (CDC) website.

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-distribution-2002.thml>.

Nos séculos XVIII e XIX o *Ae. aegypti* foi o responsável por grandes epidemias de febre amarela urbana em vários países, tais como Estados Unidos, Cuba, Colômbia e Brasil (PAHO, 2004).

Em consequência de importantes epidemias de febre amarela urbana o governo brasileiro assinou, em 1929, contrato com a Fundação Rockefeller para o combate à febre amarela em todo o território nacional. A campanha de controle focalizou a eliminação do vetor urbano, o *Ae. aegypti*. Em 1940, a Fundação Rockefeller mostrou-se preocupada com a introdução do *Anopheles gambiae* no nordeste do território brasileiro. Por esse motivo, concentrou as atividades no combate ao anofelino e não renovou o contrato para o controle do *Ae. aegypti*. Esse fato levou à criação, em janeiro de 1940, do Serviço Nacional de Febre Amarela (SNFA) (Franco, 1961).

A criação do SNFA levou a mudanças de estratégias, ou seja, passou-se de visão de controle, onde o vetor era combatido assim que infestasse uma cidade, a uma atuação mais ofensiva, buscando o *Ae. aegypti* onde ele estivesse presente, tanto nas cidades como nas zonas rurais (Franco, 1961).

Os primeiros resultados foram tão promissores que, em poucos anos, o *Ae. aegypti* foi eliminado de grande parte do país, principalmente das regiões norte, sul e centro-oeste. Mesmo no nordeste, em regiões com altos índices de infestação, houve redução

acentuada do problema.

Em decorrência do sucesso obtido com o programa de combate ao mosquito, os organizadores da XI Conferência Sanitária Pan-Americana, realizada no Rio de Janeiro em 1942, propuseram “*voto de aplauso por esse progresso sanitário*”. Paralelamente, aconselhou-se aos governos dos países que ainda estavam enfrentando problemas com esse vetor “*que organizem serviços destinados à erradicação, baseados nos planos adotados pelo Brasil*” (Franco, 1961). O “Manual de Normas Técnicas e Administrativas” elaborado pelo governo brasileiro foi adotado por outros países americanos que vinham enfrentando problemas relacionados à presença do *Ae. aegypti* (OPAS, 1959).

Na tentativa de eliminar o *Ae. aegypti* da região nordeste, em 1947, o Serviço Nacional de Febre Amarela (SNFA) adotou o método denominado perifocal com aplicação do Dicloro-Difenil-Triclorometano (DDT) para o combate às formas aquáticas e aladas. A aplicação dessa técnica levou à eliminação dos últimos focos do *Ae. aegypti* encontrados no interior do Estado da Bahia em 1955 (OPAS, 1959; Franco, 1961).

Estava assim erradicado o *Ae. aegypti* do território brasileiro. Em 1958 a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) declarou o país livre desse vetor. Numa campanha continental outros países lograram eliminar o *Ae. aegypti*, casos de Argentina, Bolívia, Chile,

Colômbia, Equador, México, Paraguai, Peru e vários países da América central e do caribe. Porém, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname, E.U.A. e algumas ilhas do caribe não obtiveram êxito em suas respectivas campanhas de erradicação (Fig. 2).

No ano de 1967, surge foco do *Ae. aegypti* em Belém do Pará (PA), provavelmente originado de ovos trazidos por tráfego de embarcações entre o Brasil e a Guiana e/ou Venezuela. Esse foco foi prontamente eliminado (Scaff & Galvão, 1968). Em 1976 registrou-se a presença de *Ae. aegypti* em Salvador (BA) e desde então não se obteve sucesso nas tentativas de eliminação e o vetor dispersou-se pelo Brasil pelas regiões norte e nordeste. Atualmente o *Ae. aegypti* está presente em todos os estados da federação brasileira (OPAS, 1991; Ministério da Saúde, FUNASA – dados não publicados) (Fig. 2).

Fig. 2 - Áreas infestadas pelo *Ae. aegypti* nas Américas anos de 1930, 1970 e 1998.
Fonte: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-ae-aegypti-distribution.htm>
acessada em 10/07/2004.

No estado de São Paulo, os primeiros registros da presença de *Ae. aegypti* datam de 1980, na zona portuária de Santos, quando os focos foram prontamente eliminados.

No entanto, em 1985, a espécie foi novamente registrada na região oeste do Estado, provavelmente vinda de Mato Grosso e/ou Paraná (Glasser, 1997). A partir daí, não houve sucesso na sua eliminação e esse culicídeo espalhou-se para todas as regiões do Estado de São Paulo. Em 2002, 482 dos 645 municípios (74,7%) estavam infestados pelo *Ae. aegypti* (SUCEN, 2002 – Div. de Orientação Técnica, relatório Interno).

O *Ae. aegypti* é espécie complexa. Mattingly (1957) foi o primeiro a registrar a natureza politípica do *Ae. aegypti*. Nesse sentido, propôs duas subespécies baseadas na morfologia e na distribuição geográfica: o *Ae. aegypti formosus*, de coloração escura, é usualmente encontrado em áreas silvestres ao sul do deserto do Saara, África. A subespécie *Ae. aegypti aegypti* tem coloração castanha e é encontrada em ambientes domiciliares com distribuição nas planícies costeiras da África, sendo essa última a forma encontrada em localidades geográficas fora do Continente Africano (Tabachnick & Powell, 1979).

Existem variações morfológicas, fisiológicas e comportamentais que são utilizadas para a distinção das duas subespécies

mencionadas. No Quênia, África, existem pelo menos três formas do *Ae. aegypti*. A de coloração mais clara, que utiliza recipientes para acumulação de água dentro das casas como criadouro, é denominada “forma doméstica”. Outra, que se cria em recipientes descartáveis ao redor das casas ou em fendas nos troncos dos coqueiros, feitas para os nativos alcançarem os cocos, apresenta variações da cor escura e é chamada “forma peridoméstica”. Por último, a “forma selvagem” é caracterizada pela sua cor escura e por passar sua fase larval em buracos de árvores ou pedras, dentro da floresta (Tripis & Hausermann, 1975 *apud* Tabachnick & Powell, 1978).

De modo geral, os mosquitos mostram grande capacidade adaptativa, evidenciada pela existência de complexos de espécies filogeneticamente relacionadas ou crípticas, e de mutantes resistentes a diversas condições ambientais (Besansky e col, 1992). Além disso, é freqüente a seleção de populações de mosquitos que apresentam resistência múltipla a inseticidas químicos ou biológicos utilizados no controle (Ferre & Rie, 2002; Bourguet e col., 2000; Groeters & Tabachnik, 2000; Hemingway, 2000 e Hemingway & Ranson, 2000).

Atualmente, existem vários métodos que possibilitam a mensuração e a análise da variabilidade genética. Loxdale & Lushai (1998) publicaram extensa revisão de marcadores moleculares utilizados para examinar a variabilidade genética de populações de mosquitos.

Várias regiões genômicas de DNA de espécies vetoras já foram clonadas, caracterizadas e seqüenciadas. Entre elas estão as que apresentam variabilidade e que, portanto, são úteis para o reconhecimento de espécies crípticas, estudos filogenéticos ou de estrutura genética de populações. Entre esses marcadores destacam-se seqüências de genes do DNA mitocondrial (Walton e col., 1999; Alvarez & Hoy, 2002).

Genes ou fragmentos do DNA mitocondrial (mtDNA) têm sido usados extensivamente como marcadores moleculares para se fazerem inferências sobre parâmetros populacionais, tais como taxas de migração, fluxo gênico, tamanho efetivo da população e história evolutiva. Como o mtDNA tem tamanho efetivo de apenas um quarto em relação ao DNA nuclear, efeitos de processos aleatórios como deriva genética tentem a ser mais drásticos, com a fixação ou perda de haplótipos. Disso resulta polimorfismo que pode ser utilizado como marcador genético inter ou intra-específico. Acresce considerar que o fato do mtDNA apresentar herança materna e na maioria dos casos não sofrer recombinação gênica (para exceções, Pereira, 2000) é adequado para a realização de análises filogenéticas de linhagens maternas (Avice, 1994).

O seqüenciamento de haplótipos desse tipo de DNA se mostrou ferramentas poderosas para a análise da variabilidade genética intra e interpopulacionais (Birungi & Munstermann, 2002). Assumindo-se o

neutralismo e o modelo de sítios infinitos, os padrões de variação na frequência de determinados haplótipos mitocondriais podem ser usados para estimar a taxa de fluxo gênico e a estrutura genética de populações (Walton e col. 2000). Sequências de mtDNA são usadas na construção de redes que propiciam informações sobre tamanho populacional nas populações passadas e sobre fluxo gênico. Por exemplo, a história evolutiva de haplótipos levou a inferências sobre a origem e expansão de populações humanas no passado. Esses dados foram utilizados para a reconstrução e datação dos principais movimentos dessas populações humanas (Pereira e col., 2000).

No caso de populações do *Ae. aegypti*, vários trabalhos, desde o final da década de 1970, mostram a existência de variabilidade. Nesse sentido, mostrou-se que o isolamento genético pode não estar associado à distância geográfica (Tabachnick & Powell, 1978; 1979). Paralelamente, observou-se que diferentes linhagens podem ter sido introduzidas numa mesma região (de Souza e col., 2000) e que marcadores mitocondriais permitem estimar a taxa de migração efetiva (Nm) e a variância do tamanho efetivo (N_e) de populações naturais (Gorrochotegui-Escalante e col., 2000). Diferentes conjuntos de haplótipos podem coexistir numa mesma localidade (Ravel e col., 2001) e que distintas populações de *Ae. aegypti* podem apresentar variabilidade nas taxas de infecção pelos vírus da febre amarela e dengue (Lourenço-de-Oliveira e col., 2004; Lourenço-de-Oliveira e col., 2002). Além disso, existem populações brasileiras de *Ae. aegypti* que

apresentam diferentes graus de alteração na suscetibilidade aos inseticidas químicos utilizados no controle (Macoris e col., 1999 e Macoris e col., 2003).

A existência de variabilidade genética em populações naturais do *Ae. aegypti* pode ter significado epidemiológico importante. Diferenças genéticas podem ser responsáveis por alterações na capacidade e na competência vetoras, na suscetibilidade do vetor aos inseticidas, resistência térmica, entre outros fatores. Dessa maneira, as distintas populações devem ser avaliadas de modo que as medidas de controle adotadas sejam adequadas aos problemas e populações do vetor.

O uso de inseticidas químicos, aliado aos esforços para a redução de criadouros (o chamado controle mecânico), o inverno mais rigoroso nas regiões sul e sudeste e a seca na região nordeste do Brasil podem ter gerado estruturação genética das diversas populações de *Ae. aegypti* por deriva e/ou seleção. Populações geograficamente próximas podem estar geneticamente isoladas, enquanto outras mais distantes podem apresentar maior similaridade devido a fluxo gênico mantido por dispersão passiva de ovos.

O aumento do intercâmbio comercial do Brasil com outros países, notadamente a partir de meados da década de 1980, pode ser fator de introdução de diferentes linhagens de *Ae. aegypti* no território nacional, notadamente em cidades que possuem portos com grande

capacidade, como por exemplo os de Santos, Belém e Manaus. Essas novas introduções podem acarretar em diferenças entre populações de características com importância epidemiológica tais como competência vetorial e resistência a inseticidas.

O presente trabalho objetiva caracterizar o grau de diferenciação genética entre as várias populações do *Ae. aegypti* do Brasil e estimar as relações genealógicas entre elas.

JUSTIFICATIVAS

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, afetando principalmente países em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80 milhões de pessoas se infectem anualmente, em 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue (WHO, 2004).

O mosquito transmissor da forma urbana da dengue, o *Ae. aegypti*, encontrou no mundo moderno condições favoráveis para rápida dispersão. O processo de urbanização acelerada que criou cidades com deficiências de abastecimento de água e de limpeza, a enorme utilização de materiais não facilmente biodegradáveis, o intenso intercâmbio comercial internacional através de meios de transportes rápidos e eficientes e as mudanças climáticas, além do processo de migração humana, favoreceram e aceleraram a dispersão do mosquito *Ae. aegypti* e do vírus dengue.

Dessa maneira, o mosquito passou a estar presente em áreas onde não existia, possibilitando a introdução de variantes de vírus dengue e a ocorrência de epidemias, intensificadas pelos movimentos de migração e urbanização desordenada (OPAS, 1991).

Com essas condições, o *Ae. aegypti* espalhou-se por área onde

vivem cerca de 2,5 bilhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2004). Nas Américas, está presente desde os Estados Unidos até o Uruguai, com exceção apenas do Canadá e do Chile, por razões climáticas e de altitude (OPAS, 1991).

No Brasil as condições sócio-ambientais são favoráveis à expansão do *Ae. aegypti* e possibilitam a dispersão desse vetor, desde sua re-introdução em 1976 (Ministério da Saúde, dados não publicados). Dado que atualmente esse vetor está presente em todos os estados da federação, é obvio que as técnicas adotadas nas campanhas de controle do vetor não foram eficazes para impedir a expansão do *Ae. aegypti* no Brasil e em outras regiões do continente Americano.

Programas essencialmente centrados no combate químico, com baixíssima ou mesmo nenhuma participação da comunidade, sem integração intersetorial e com pequena utilização do instrumental epidemiológico mostraram-se incapazes de conter um vetor com capacidade de adaptação aos ambientes criados pela urbanização acelerada e sem planejamento adequado.

OBJETIVOS

Geral:

1. estimar a variabilidade genética de populações do *Aedes aegypti* do Brasil.

Específicos:

2. caracterizar o polimorfismo de fragmento do gene mitocondrial *NADH4*;
3. estabelecer as relações genealógicas entre os haplótipos de *Ae. aegypti* incluídos neste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta dos espécimes

As amostras de populações brasileiras, venezuelanas e norte americanas foram obtidas através de coleta de ovos em cidades infestadas pelo *Ae. aegypti*, seguindo metodologia padronizada pela FUNASA (1999, relatório interno). Resumidamente, nos municípios selecionados segundo a importância epidemiológica (tamanho do município, importância como pólo regional e número de casos - Macoris e col., 2003), as armadilhas de oviposição (ovitrapas) foram distribuídas geograficamente seguindo padrão de “malha”. O número de quadrantes corresponde ao número de armadilhas previsto por município. Para estimar o tamanho da amostra, considerou-se o número de edificações dos municípios, seguindo critério definido para o “Programa Nacional de Monitoramento da Suscetibilidade do *Aedes aegypti*” (Tabela 1).

Tabela 1. Base de cálculo do número de ovitrampas a serem instaladas.

Nº DE EDIFICAÇÕES	Nº DE OVITRAMPAS
01 a 20.000	50
20.001 a 60.000	100
60.001 a 120.000	150
120.001 a 500.000	200
> 500.000	300

As armadilhas de oviposição consistem de um frasco de 500 mL com água de torneira, nos quais foram colocadas palhetas de madeira parcialmente mergulhadas em água. Estas serviram de substrato para que as fêmeas selvagens depositassem os ovos. Depois de instaladas, as armadilhas ficaram expostas pelo período de 1 semana, antes da coleta das amostras.

As palhetas foram levadas para o laboratório e analisadas para verificar a presença dos ovos. Aquelas que estavam positivas foram separadas e colocadas em água para que ocorresse a eclosão dos ovos, o que ocorreu, em média, após dois dias.

As larvas resultantes foram criadas em caixas plásticas medindo, aproximadamente, 20 x 40 x 10 cm contendo água filtrada mantida a temperatura de 25 °C, aproximadamente. Como alimento, foram adicionados a cada caixa plástica 0,5 g de ração comercial para camundongo dissolvido em água.

Uma amostra aleatória dos indivíduos adultos, identificados como sendo de *Ae. aegypti*, segundo descrição de Belkin e col. (1970), foram estocados em etanol 100% a -70 °C até serem processados para a obtenção do DNA total. Espécimes identificados como sendo de outras espécies, como por exemplo, *Ae. albopictus* também foram estocados a -70 °C para futuros projetos.

Os espécimes provenientes do Peru, Guatemala, Senegal, Guiné, Uganda, Cingapura, Camboja e Taiti foram obtidos através do intercâmbio com pesquisadores desses países. Os espécimes na forma de adultos foram enviados em etanol absoluto.

2. Populações analisadas

No total, 43 localidades foram amostradas (Fig. 3):

Brasil: Região Norte: Boa Vista (RR), Porto Velho (RO), Rio Branco (AC), Manaus (AM), Belém (PA), Ananindeua (PA), São Luis (MA). Região Nordeste: João Pessoa (PB), Quixeramobim (CE), Pacujá (CE), Milhã (CE), Salvador (BA), Feira de Santana (BA). Região Centro-Oeste: Várzea Grande (MT), Campo Grande (MS). Região Sudeste: Cariacica (ES), Belo Horizonte (MG), Leandro Ferreira (MG), Rio de

Janeiro (RJ), Nova Iguaçu (RJ), Presidente Prudente (SP), Araçatuba (SP), Bauru (SP), Marília (SP), Campinas (SP), Potim (SP), São Sebastião (SP), Santos (SP), Porto de Santos (SP). Região Sul: Foz do Iguaçu (PR), Maringá (PR).

Venezuela: Maracay;

Peru: Lima, Piura, Iquitos;

Guatemala: Cidade da Guatemala;

Estados Unidos: Fort Lauderdale (Flórida);

Senegal: Dakar;

Guiné: Conakri;

Uganda: Entebbe;

Cingapura: Cingapura;

Camboja: Phnom Penh e

Taiti: Papeete.

Fig. 3 - Locais de amostragem das populações do *Aedes aegypti*

3. Extração de DNA

O DNA total de indivíduos adultos foi obtido seguindo-se o protocolo de extração com Fenol-Clorofórmio descrito em Sambroock e col. (1989). O DNA foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Para evitar possíveis contaminações entre amostras, o DNA extraído foi ressuspensionado e alíquotado em porções de 20 µL e estocado a -20 °C.

4. Amplificação do DNA

Fragmentos do gene mitocondrial da subunidade 4 da *NADH* desidrogenase (“Nicotinamina Adenina Dinucleotideo Desidrogenase”) foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

As reações de amplificação do fragmento *NADH4* por PCR foram realizadas num volume final de reação de 50µL contendo Mg⁺⁺ 2,0mM, Tris-HCl 20,0mM pH 8,4, KCl 50mM, 0,5mM de cada iniciador, dNTPmix 0,2mM, 2unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1µL de DNA molde. Os iniciadores foram desenhados a partir de seqüências homólogas seqüenciadas de populações mexicanas do *Aedes aegypti* depositadas no GenBank sob os números de acesso AF334865, AF334864 e AF334856 (Gorrochotegui-Escalante e col, 2002):

iniciador F 5'-ATTGCCTAAGGCTCATGTAG -3' 612 - 631*

iniciador R 5'-TCGGCTTCCTAGTCGTTCAT -3' 982 - 1001*

Um controle negativo, consistindo de uma reação de amplificação sem o DNA molde (substituído por ddH₂O), foi incluído em toda reação. O programa do termociclador foi configurado para um passo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, e uma elongação final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram purificados usando-se uma solução de Polietileno Glicol (PEG) 8000 (20% em NaCl 2,5M), adicionada na proporção de 1:1. A mistura foi agitada rapidamente e incubada a 37 °C por 15 minutos e em seguida centrifugada e o precipitado lavado com etanol 80% gelado por duas vezes.

* posição de alinhamento com sequência do gene NADH subunidade 4 de *Anopheles gambiae* depositada no GenBank sob número de acesso L20934.

5. Seqüenciamento genômico

O seqüenciamento dos fragmentos ortólogos amplificados foi feito utilizando-se os mesmos iniciadores da PCR, o “sense” em uma das reações e o “anti-sense” na outra.

Para as reações, utilizou-se o ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit com Ampli Taq® DNA Polymerase. A reação de seqüenciamento foi padronizada para volume final de 10µL. Para cada reação foram utilizados 2µL de BigDye™, 2µL de tampão 2.5X (diluído de solução 5x de Tris-HCl 400mM, pH 9,0, MgCl₂ 10mM), 1µL do iniciador (10 µM), 1µL de produtos de PCR e 4µL de água Milli-Q autoclavada.

O programa do termociclador foi configurado para uma etapa inicial de desnaturação a 96 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos, e uma etapa final de 4 °C com acréscimo na temperatura de 1 °C por segundo. Os produtos das reações de seqüenciamento foram purificados por precipitação com isopropanol. A eletroforese dos produtos das reações de seqüenciamento para a determinação das seqüências de nucleotídeos das duas fitas do fragmento de DNA foi realizada no seqüenciador automático ABI Prism® 377 (Applied Biosystems, USA). A eletroforese ocorreu a 51°C por 7 horas, com 1200 leituras por hora em voltagem de 1.680 V.

6. Alinhamento das seqüências

As seqüências consenso foram obtidas pela edição visual das seqüências “sense” e “non-sense” de cada indivíduo. Para isso foi utilizado o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Para cada par de seqüências do mesmo indivíduo, todos os sítios foram conferidos para que a seqüência consenso não contivesse erros de seqüenciamento. Após sua edição, as seqüências consensos foram alinhadas visualmente. Realizou-se análise de seqüências por similaridade com o auxílio do algoritmo BLAST (Altschul e col., 1990) para a conferência de que os produtos dos seqüenciamento eram de fato fragmentos de gene *NADH4*. Não foi necessária a introdução de indels para o completo alinhamento das seqüências.

7. Análise do polimorfismo

7.1 Diversidade genética

Para a determinação do número de cópias, haplótipos, sítios polimórficos (S), transições, transversões, conteúdo G+C e a estimativa das diversidades haplotípica (Hd), nucleotídica (π) e do número médio de diferenças nucleotídicas (K) utilizou-se o programa DnaSP (Rozas e col., 2003).

7.2 Testes de neutralidade

As análises de variabilidade genética devem levar em consideração, além de processos estocásticos como por exemplo deriva genética, forças que podem estar envolvidas nas alterações das freqüências alélicas e/ou haplotípicas, entre elas mutação, migração e seleção natural (Tajima, 1989).

No sentido de testar se forças evolutivas determinísticas estariam agindo sobre a variabilidade haplotípicas das amostras analisadas, realizaram-se três testes de neutralidade: o teste D de Tajima (Tajima, 1989) e os testes F^* e D^* de seletividade neutra (Fu & Li, 1993) implementados pelo pacote estatístico existente no programa DnaSP 3.0 (Rozas e col., 2003).

7.2.1 Teste D de Tajima

Tajima (1989) propôs que as diferenças entre o número médio de diferenças entre nucleotídeos (π) e o número de sítios polimórficos (S) pode ser utilizado para testar o modelo neutralista de evolução molecular (Kimura 1983), já que o primeiro (π) não é afetado pela freqüência dos nucleotídeos os polimórficos de determinado sítio (Hartl, 2000). O programa DnaSP assume que essa estatística segue distribuição Beta ao calcular os limites de confiança de D (teste bi-caudal).

7.2.2 Testes D^* e F^* de Fu e Li

Os testes estatísticos D^* e F^* , propostos por Fu & Li (1993),

foram realizados a fim de testar hipóteses preditas pela teoria neutralista de evolução molecular (Kimura, 1983). O programa DnaSP usa os valores críticos obtidos por Fu & Li (1993) para obter a significância estatística dos valores observados D^* e F^* nas amostras.

7.3 Análise de clados agrupados

O programa TCS (Clement e col., 2002) foi utilizado para estimar uma árvore parcimoniosa não enraizada com 95% de chance de estimar a verdadeira relação entre os haplótipos. O programa reúne todas as seqüências idênticas como um haplótipos e, então, calcula a freqüência dos haplótipos na amostra. Essas freqüências são então utilizadas para estimar a idade relativa dos haplótipos (Donnelly & Tavaré, 1986; Castelloe & Templeton, 1994 ambos apud Clement e col., 2002). Uma matriz de distância absoluta é calculada para todos os pares de haplótipos. A probabilidade de parcimônia, definida pelas equações (Templeton e col., 1992), é calculada para as diferenças pareadas até que a probabilidade supere 95%. O número de diferenças mutacionais associadas à probabilidade imediatamente anterior ao limite de 95% é o máximo de conexões mutacionais entre pares de haplótipos justificados pelo critério de parcimônia. Essas conexões resultam numa rede de haplótipos com 95% de chance de ser a solução mais parcimoniosa (Clement e col., 2002).

O programa GeoDis (Posada e col., 2000) foi utilizado para estimar as “distâncias dos clados” (“clade distance” - D_c), que permitem avaliar o quão geograficamente distribuídos estão os indivíduos de determinado clado.

O mesmo programa foi empregado para estimar a “distância do agrupamento” (“nested distance” - D_n), que mede a distância de um clado ao centro geográfico de sua categoria (Templeton e col., 1995).

A análise combinada dessas duas distâncias permite a distinção entre fatores históricos, tais como vicariância e expansão de distribuição, daqueles ecológicos, como fluxo gênico restrito. Para a interpretação da significância dos resultados obtidos, utilizou-se a chave de inferências proposta por Templeton (2001). Resumidamente, é uma chave dicotômica que através do padrão de distâncias significativamente pequenas ou grandes obtido em simulações, auxilia na interpretação dos resultados dos testes de significância das distâncias D_c e D_n .

7.4 Análise de variância molecular (AMOVA)

A estrutura genética das populações foi investigada pela análise de variância molecular (AMOVA) baseada na variância das frequências haplotípicas, levando em consideração o número de mutações entre os haplótipos (Φ_{st}) (Excoffier e col., 1992). Uma análise hierarquizada,

separando-se os componentes de co-variância devido a diferenças dentro de populações, entre populações num mesmo agrupamento e entre agrupamentos intrapopulacionais foi testada contra a hipótese nula de não associação através de 1.000 permutações, utilizando-se o programa Arlequin 2.000 (Scheineider e col., 2000).

Para a detecção de estruturação geográfica entre os diversos haplótipos, a análise de variância molecular (AMOVA) necessita da partição da variação genética total (σ^2_T) em componentes de co-variância atribuíveis a uma forma hierarquizada. Deste modo, três níveis hierárquicos são testados: diferenças dentro de uma mesma população (Φ_{st}), entre populações dentro de um mesmo grupo (Φ_{sc}) e entre grupos de populações (Φ_{ct}).

O que se quer testar é, na verdade, essa hierarquização arbitrária, que deve levar em conta fatores como distância geográfica, barreiras geográficas ou outros elementos que possam ser responsáveis pela redução do fluxo gênico entre as populações e, portanto, responsável pela estruturação geográfica das populações.

O teste é feito contra a distribuição nula da co-variância. Essa distribuição é obtida por permutação (ao menos 1.000), seguindo-se as metodologias, a saber, para obter a distribuição nula do componente intrapopulacional, coloca-se aleatoriamente cada indivíduo numa população, mantendo constante o tamanho da amostra. Os componentes de variação são estimados por permutação

de matrizes. Esse procedimento é utilizado para se obter a distribuição nula de F_{st} e σ^2_c .

Outro esquema de permutação assume que as regiões são reais, porém as populações dentro delas não, permutando indivíduos dentro de agrupamentos regionais sem dar importância à população. Esse procedimento é utilizado para se obter uma distribuição nula de F_{sc} e σ^2_b . A distribuição nula de F_{ct} e σ^2_a é conseguida assumindo-se que, enquanto as populações são reais, o agrupamento regional não o é, permutando populações inteiras por esses agrupamentos (Excoffier e col., 1992).

7.5 Distribuição das diferenças pareadas

É a distribuição do número observado de diferenças entre todos os pares de haplótipos e é usada para se fazerem inferências sobre a história demográfica de populações. Usualmente, assume a forma multimodal em amostras tomadas de populações em equilíbrio pois reflete a forma aleatória das árvores gênicas. Em populações que passaram por recente processo de expansão demográfica assume a forma unimodal (Rogers & Harpending, 1992; Slatkin & Hudson, 1991).

7.6 Análises genealógicas

As análises genealógicas foram realizadas com dois objetivos

principais: (1) estimar as relações evolutivas entre os haplótipos e (2) estimar o tempo de divergência entre os principais clados. Para isso, foram analisadas seqüências de 181 indivíduos provenientes de várias partes do mundo. Como grupos externos, utilizaram-se as seqüências homólogas de *Anopheles gambiae* (L20934) e de *Aedes japonicus* (AF305879) depositadas no GenBank.

7.6.1 Parcimônia máxima

A análise de parcimônia máxima foi realizada utilizando-se a estratégia de busca heurística. Os caracteres não foram ordenados, recebendo pesos iguais ao passo que os não informativos foram excluídos da análise. A árvore inicial foi obtida por adição simples das seqüências usando-se o algoritmo de adição de passos (“stepwise addition”). O algoritmo usado para realizar o “branch-swapping” foi o “tree-bisection-reconnection (TBR)”. A seguir, os caracteres receberam pesos, utilizando-se a técnica de pesagem sucessiva (Farris, 1969).

O índice de consistência re-escalonado foi usado para se aferir pesos aos caracteres. O procedimento foi repetido cinco vezes, até que o peso dos caracteres e o comprimento das topologias se estabilizassem. Isso foi feito utilizando-se o mesmo procedimento de busca heurística descrito anteriormente. As topologias derivadas da análise com pesagem sucessiva foram comparadas com o conjunto

daquelas obtidas na busca com os caracteres de pesos iguais. As árvores comuns a ambos os subconjuntos foram usadas para gerar a topologia de consenso estrito. A busca foi repetida 1.000 vezes com 10 réplicas em cada busca.

O suporte para as relações entre os haplótipos foi estimado com a análise de “bootstrap” por re-amostragens da matriz original de dados sob o critério de parcimônia. Foram feitas 1.000 pseudo-réplicas utilizando-se apenas os caracteres informativos. A árvore inicial foi obtida por “stepwise addition” e o algoritmo de “branch-swapping” foi o “TBR”.

7.6.2 Verossimilhança máxima

Para obter o modelo de substituição de nucleotídeos apropriado (frequência das bases, parâmetro alfa da distribuição gama, matriz das taxas de substituição de nucleotídeos e proporção de sítios invariáveis), bem como uma topologia inicial para a busca da árvore de verossimilhança máxima, utilizou-se a topologia obtida pelo método de "agrupamento de vizinhos" ("neighbor-joining" - NJ) gerada pelo programa PAUP* (Swofford, 2004).

Foram testados os 56 modelos de evolução de nucleotídeos incorporados no programa ModelTest 3.0 (Posada & Crandall, 1998), que compara 14 modelos básicos de substituição. Todos os 14 modelos foram avaliados com e sem heterogeneidade de taxas

evolutivas. A heterogeneidade foi ajustada de três maneiras, a saber: (1) usando-se o modelo de distribuição gama, com seis categorias de taxas; (2) o de sítios invariantes e (3) a associação entre a distribuição gama e o modelo de sítios invariantes (Swofford e col., 1996). Utilizou-se um teste de razão de verossimilhança ("hierarchical Likelihood Ratio Test" - hLRT) (Huelsenbeck & Rannala, 1997; Swofford e col., 1996) para avaliar a significância da diferença entre os valores de verossimilhança de cada árvore obtida com os diferentes modelos de substituição de nucleotídeos de complexidade crescente devido ao acréscimo de parâmetros.

Paralelamente, calculou-se a significância da diferença dos valores de verossimilhança usando-se o método denominado AKAIKE. Se os métodos hLRT e AKAIKE discordaram na escolha do modelo, optou-se pelo mais simples pois, como já foi dito, modelos mais complexos incorporam um número maior de parâmetros o que leva a uma maior incerteza, o que não é desejado.

Escolhido o modelo e estimados os parâmetros para a busca inicial, passou-se à análise para gerar a topologia de verossimilhança máxima. Como árvore inicial para a busca da topologia de maior verossimilhança utilizou-se a mesma árvore gerada pelo algoritmo de distância NJ. Os parâmetros utilizados na busca inicial foram aqueles obtidos para o modelo de evolução mais adequado aos dados em análise. O método para gerar topologias foi o de busca heurística

usando o algoritmo "stepwise-addition" e o valor de verossimilhança foi estimado assim como os parâmetros de substituição de nucleotídeos.

A seguir realizou-se nova busca, utilizando-se o algoritmo NNI ("Neighbor-Nearest interchange") como perturbador da topologia inicial, os parâmetros foram novamente estimados e uma nova árvore foi gerada da maneira anterior.

Essa estratégia de perturbação da topologia foi repetida por mais quatro vezes, mudando-se o algoritmo e usando-se os parâmetros da busca anterior. Assim, realizaram-se duas buscas com o algoritmo perturbador SPR ("Subtree Pruning-Regrafting") e duas com o TBR ("Tree Bisection-Reconnection") até que os valores dos parâmetros se estabilizassem e fosse gerada a topologia com o maior valor de verossimilhança.

Novamente o suporte para as relações entre os haplótipos foi estimado com a análise de "bootstrap" não paramétrica por re-amostragens da matriz de dados sob o critério de verossimilhança. Foram feitas 1.000 réplicas. A árvore inicial foi obtida por "stepwise addition" e a perturbação da topologia inicial foi feita por troca de ramos, através do algoritmo TBR. Os parâmetros utilizados foram aqueles para a topologia gerada na segunda repetição com o algoritmo TBR, como foi descrito anteriormente.

7.6.3 Tempo de divergência

O teste de razão de verossimilhança (LRT) foi empregado para a verificação da possibilidade de que todas as linhagens incluídas nas análises apresentassem a mesma taxa evolutiva. Para tanto, foram obtidos os valores de verossimilhança para as topologias com o relógio molecular relaxado e com o relógio molecular forçado (Felsenstein, 1988) utilizando-se o mesmo modelo evolutivo das análises sob critério de máxima parcimônia. Foi avaliada, então, a significância estatística da diferença entre os escores de ambas as topologias, com aproximação de χ^2 e (n-2) graus de liberdade, sendo "n" o número de táxons terminais. O relógio molecular foi calibrado utilizando-se dados da literatura para a datação da divergência entre os gêneros *Anopheles* e *Aedes* (Ureta-Vidal e col., 2003).

RESULTADOS

As análises foram baseadas em fragmento do gene mitocondrial *NADH4* de 180 indivíduos sendo 116 de populações brasileiras e 65 de outros países. Foram encontrados 21 haplótipos (Anexo I), sendo 8 exclusivos de populações brasileiras, 7 exclusivos de populações estrangeiras e 6 compartilhados entre populações brasileiras e estrangeiras. Como esperado, por se tratar de fragmento de gene mitocondrial de INSECTA, as seqüências dos indivíduos utilizados neste estudo são ricas em adenina e timina, apresentando conteúdo A+T de ~70 % (Tabelas 2 e 3).

Os haplótipos presentes no Brasil apresentaram substituições de nucleotídeos em 21 dos 361 sítios, 18 sinônimas e 3 não sinônimas, sendo 20 (95,2%) transições e apenas 1 (4,8%) transversão. O conteúdo G+C foi de aproximadamente 30%, a diversidade haplotípica (*Hd*) apresentada foi de 0,686. A diversidade nucleotídica (π) apresentou valor de 0,01829 e o número médio de diferenças nucleotídicas (*k*) foi de 6,60345 (Tabela 4).

Tabela 2. País, localidade de coleta, abreviação usada, coordenada geográfica, tamanho da amostra e haplótipos observados em *Ae. aegypti*.

País	local de amostragem	abrev.	coordenadas	N	haplótipo (n)
Brasil	Ananindeua (PA)*	ANA	01° 22' S 48° 23' O	2	R (2)
	Araçatuba (SP)	ARA	21° 12' S 50° 25' O	3	A (1); R (1); T (1)
	Bauru (SP)	BAU	22° 19' S 49° 04' O	3	A (1); R (2)
	Belém (PA)*	BEL	01° 27' S 48° 29' O	5	A (2); C (1); O (2)
	Belo Horizonte (MG)	BHT	19° 55' S 43° 56' O	3	A (3)
	Boa Vista (RR)*	BOV	02° 49' N 60° 40' O	5	F (1); M (4)
	Campinas (SP)	CAM	22° 54' S 47° 05' O	5	A (2); R (3)
	Campo Grande (MS)*	CAG	20° 27' S 54° 37' O	5	A (3); R (2)
	Cariacica (ES)*	CAR	20° 16' S 40° 25' O	5	A (3); M (2)
	Feira de Santana (BA)*	FEI	12° 15' S 38° 57' O	3	A (3)
	Foz do Iguaçu (PR)*	FOZ	25° 33' S 54° 35' O	2	A (1); R (1)
	João Pessoa (PB)	JPE	07° 07' S 34° 52' O	3	A (3)
	Leandro Ferreira (MG)*	LEA	19° 42' S 45° 02' O	2	A (1); R (1)
	Manaus (AM)	MAN	03° 08' S 60° 01' O	4	M (4)
	Marília (SP)	MAR	21° 56' S 49° 53' O	1	L (1)
	Maringá (PR)*	MGA	23° 25' S 51° 55' O	3	A (1); R (1); U (1)
	Milhã (CE)*	MIL	05° 40' S 39° 11' O	3	A (3)
	Nova Iguaçu (RJ)*	NOV	22° 45' S 43° 27' O	8	A (8)
	Pacujá (CE)*	PAC	03° 59' S 40° 41' O	3	A (2); B (1)
	Porto Velho (RO)*	PVH	08° 45' S 63° 54' O	5	A (1); N (1); R (3)
	Potim (SP)*	POT	22° 50' S 45° 14' O	3	A (2); F (1)
	Pres. Prudente (SP)	PPD	22° 07' S 51° 22' O	3	R (3)
	Quixeramobim (CE)*	QUI	05° 12' S 39° 17' O	3	A (3)

Tabela 2 cont...

	Rio Branco (AC)*	BRA	09° 58' S 67° 48' O	5	R (5)
	Rio de Janeiro (RJ)*	RIO	22° 54' S 43° 14' O	8	A (8)
	Salvador (BA)*	SAL	12° 59' S 38° 31' O	5	A (4); D (1)
	Santos (SP)	SANT	23° 57' S 46° 20' O	5	F (2); H (1); O (2)
	Santos-porto (SP)	PORT	23° 57' S 46° 20' O	2	M (2)
	São Luiz (MA)*	SAO	02° 31' S 44° 16' O	4	A (3); C (1)
	São Sebastião (SP)	SSB	23° 48' S 45° 25' O	3	H (1); O (1); P (1)
	Várzea Grande (MT)*	VAZ	15° 32' S 56° 17' O	2	A (1); R (1)
Peru	Iguitos	IQU	03° 82' S 72° 30' O	7	O (7)
	Lima	LIM	11° 81' S 77° 07' O	8	O (8)
	Piura	PIU	04° 49' S 80° 38' O	7	A (4); M (3)
Venezuela	Maracay*	MRY	10° 14' N 67° 35' O	7	G (1); O (6)
Guatemala	Cidade da Guatemala	GUA	14° 37' N 90° 31' O	7	O (7)
E.U.A.	Fort Lauderdale*	FLD	26° 07' N 80° 08' O	5	F (1); H (1); O (1); Q (1); S (1)
Senegal	Dakar	DAK	14° 40' N 17° 26' O	5	E (3); F (1); I (1)
Guiné	Conakri †*	CNK	09° 30' N 13° 43' O	4	J (4)
Uganda	Entebe	ENT	00° 04' N 32° 28' L	7	J (6); K (1)
Cingapura	Cingapura	CIN	01° 17' N 103° 51' L	6	J (2); N (4)
Camboja	Phnom Penh*	PPH	11° 35' N 104° 55' L	2	N (2)
Taiti	Papeete*	PPT	17° 32' S 149° 34' O	4	N (4)

* - Lourenço-de-Oliveira e col., 2003

† - *Aedes aegypti formosus*

Tabela 3 – Frequências, absolutas e relativas, e ocorrência dos haplótipos do fragmento do gene mitocondrial NADH4 de *Ae. aegypti*.

haplótipo	freq. absoluta	freq. relativa	país de ocorrência
A	61	0,339	Brasil e Peru
B	1	0,005	Brasil
C	2	0,011	Brasil
D	1	0,005	Brasil
E	3	0,017	Senegal
F	6	0,033	Brasil, E.U.A.
G	1	0,005	Venezuela
H	3	0,017	Brasil, E.U.A.
I	1	0,005	Senegal
J	12	0,067	Guiné, Uganda, Cingapura
K	1	0,005	Uganda
L	1	0,005	Brasil
M	17	0,094	Brasil, Peru
N	10	0,050	Brasil, Cingapura, Camboja, Taiti
O	30	0,167	Brasil, Peru, Venezuela, Guatemala, E.U.A.
P	1	0,005	Brasil
Q	1	0,005	E.U.A.
R	25	0,139	Brasil
S	1	0,005	E.U.A.
T	1	0,005	Brasil
U	1	0,005	Brasil

Tabela 4. Análise do polimorfismo observado entre as seqüências brasileiras analisadas.

	Brasil
No. de seqüências	116
No. de haplótipos (h)	14
No. de sítios polimórficos (S)	21
No. de transições	20
No. de transversões	1
No. substituições sinônimas	18
No. substituições não-sinônimas	3
Conteúdo G+C	0,303
Diversidade haplotípica (Hd)	0,686
Variância da Hd	0,00141
Erro padrão da Hd	0,038
Diversidade nucleotídica (π)	0,01829
Variância de π	0,000006
Erro padrão de π	0,00076
No. médio de diferenças nucleotídicas (k)	6,60345

Os resultados dos testes de neutralidade estão resumidos na Tabela 5. Nenhum dos testes apontou desvios significantes da neutralidade. Assim, a premissa do modelo de sítios-infinitos, ou seja, de que cada mutação ocorre sempre num sítio diferente pôde ser aceita (Bertorelle & Slatkin, 1995).

Tabela 5 – Testes de neutralidade

Teste	Brasil	Clado 1	Clado 2
D de Tajima	1,72542 ^{ns}	-1,21193 ^{ns}	-1,05140 ^{ns}
D* de Fu & Li	-0,35930 ^{ns}	0,19251 ^{ns}	-1,72634 ^{ns}
F* de Fu & Li	0,52789 ^{ns}	-0,27909 ^{ns}	-1,77708 ^{ns}

ns = não significante, $P > 0.10$

Para a detecção de estruturação geográfica entre os diversos haplótipos, foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA). Um primeiro passo foi realizar o teste sem qualquer hierarquização “*a priori*”, considerando todas as localidades amostradas como um “modelo-ilha” para mtDNA no qual não há o grupo hierárquico superior Φ_{ct} . Essa análise resultou num valor de $\Phi_{st} = 0,45979$ altamente significativo, mostrando que há estruturação nas populações do *Ae. aegypti* amostradas (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) sem agrupamentos

fonte da variação	graus de liberdade	componentes de variação	% da variação	P	Estatística Φ
entre populações	30	1,53922 (σ^2_a)	45,98	NT	NT
dentro de populações	85	1,80843 (σ^2_b)	54,02	< 0,001	$\Phi_{st} = 0,45979$
total	115	3,34765 (σ^2_T)	100,00		

NT = não testado

A seguir, passou-se a buscar hipótese de associação geográfica que pudesse estar correlacionada com a variância observada. Nas análises iniciais as populações foram agrupadas nas cinco regiões administrativas do território nacional, a saber: regiões norte, nordeste, centro-oeste, sudeste e sul. A análise utilizando-se desse agrupamento mostrou a maioria da variação em nível intrapopulacional e que, portanto, essa não era a explicação adequada para a variação encontrada (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise de variância molecular (AMOVA) com agrupamento [região norte] x [região nordeste] x [região centro-oeste] x [região sudeste] x [região sul]

fonte da variação	graus de liberdade	componentes de variação	% da variação	<i>P</i>	Estatística Φ
entre grupos	4	0,59080 (σ^2_a)	16,74	< 0,05	$\Phi_{ct} = 0,16743$
entre populações dentro dos grupos	26	1,12159 (σ^2_b)	31,79	< 0,001	$\Phi_{sc} = 0,38177$
dentro de populações	85	1,81627 (σ^2_c)	51,47	< 0,001	$\Phi_{st} = 0,48528$
total	115	3,52866 (σ^2_T)	100,00		

Outra hipótese testada foi a de separação das populações da região nordeste das demais populações, visto que essa região apresenta exclusivamente haplótipos de grupo particular (como se mostrará a seguir). A porcentagem da variação intrapopulacional diminuiu, mas continuava a ser o maior componente (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise de variância molecular (AMOVA) com agrupamento [pops. nordeste] x [resto das populações]

fonte da variação	graus de liberdade	componentes de variação	% da variação	<i>P</i>	estatística Φ
entre grupos	1	1,27481 (σ^2_a)	29,98	6,84x10 ⁻³	$\Phi_{ct} = 0,29975$
entre populações dentro dos grupos	29	1,16177 (σ^2_b)	27,32	< 10 ⁻⁵	$\Phi_{sc} = 0,39011$
dentro de populações	85	1,81627 (σ^2_c)	42,71	< 10 ⁻⁵	$\Phi_{st} = 0,57293$
total	115	4,25285 (σ^2_T)	100,00		

Todas as outras quatro possíveis combinações entre as regiões administrativas brasileiras foram testadas e, apesar dos índices apresentarem valores significantes mesmo após correção do valor de α pela método de Bonferroni (Sokal & Rohlf, 1995), nenhuma foi suficiente para explicar, geograficamente, a variação apresentada pelas seqüências (dados não apresentados). Portanto, outras hipóteses, que não a da associação geográfica, tiveram que ser testadas.

A estruturação genética, ou seja, a associação não aleatória de alelos ou haplótipos, pode estar relacionada ao fluxo gênico restrito, eventos históricos (fragmentação, expansão geográfica,

colonização) ou a combinação desses fatores (Templeton e col., 1995).

Templeton e col. (1995) propuseram a estratégia de análise para separar os componentes históricos dos contemporâneos. Com o uso da parcimônia estatística (Templeton, 1998; Posada e col. 2000), foi possível definir rede única de conexões parcimoniosas para os 14 haplótipos presentes nas populações brasileiras do *Ae. aegypti*, que estão conectados por 8 ou menos passos mutacionais (Fig. 4).

Essa análise mostra a presença de grande estruturação nos níveis superiores do agrupamento, nível 2 (Tabela 9), com a presença de dois clados distintos, separados por 8 passos mutacionais: o clado 1, compreendendo os haplótipos **A**, **B**, **C**, **D**, **F** e **H** e o clado 2, composto por **L**, **M**, **N**, **O**, **P**, **R**, **T** e **U**. Vale lembrar que os haplótipos **E**, **G** e **I**, exclusivos de populações não brasileiras, conectam-se ao clado 1 e os haplótipos **J**, **K**, **Q** e **S**, ao clado 2 (dados não apresentados).

É interessante notar que, de acordo com o modelo de fluxo gênico restrito por isolamento por distância e seguindo a teoria da coalescência, é esperado que o haplótipo mais antigo tenda a ser aquele mais freqüente e mais disperso, caso do haplótipo **A** (de Brito e col., 2002; Templeton e col., 1995; Neigel & Avise, 1993).

Fig. 4 - Rede de haplótipos do fragmento do gene NADH subunidade 4 de populações brasileiras do *Ae. aegypti* com o esquema proposto em Templeton e col. (1987). Cada linha da rede significa uma única mudança de nucleotídeo. Os círculos vazios (O) significam nós interiores que não estão presentes na amostra. As letras correspondem à denominação de cada haplótipo encontrado (Tabela 2). Agrupamentos 1-x representam haplótipos agrupados em clados com 1 passo mutacional enquanto os 2-x clados de 1 passo mutacional agrupados em clados de 2 passos mutacionais.

A rede de haplótipos definiu as comparações de agrupamentos que foram investigadas na busca de estruturação populacional e fluxo gênico (Templeton e col., 1995) que estão apresentadas na Tabela 9 e na Figura 4.

O teste de contingência permutacional exato constatou valores significantes para os clados 2-1 e para o cladograma total (Tabela 9). Dessa maneira, a hipótese nula de não associação geográfica para esses clados deve ser rejeitada.

Tabela 9 - Análise de contingência agrupada de associações geográficas.

clado	teste de contingência exata	probabilidade
1-3	12,48	0,4810
1-4	48,89	0,6560
1-9	2,40	0,6540
1-10	13,00	0,0760
2-1	91,27	0,0013*
2-2	40,30	0,1340
2-3	14,00	0,1520
cladograma total	155,79	0,0000*

* - estatisticamente significante ao nível de 0,05.

Os resultados da análise de significância das distâncias D_c e D_n estão apresentados na Figura 5. No agrupamento mais superior, ou seja, o cladograma total, os valores de D_c e D_n para o clado 2-1 mostraram-se significantemente menores do que o esperado. Para o clado 2-3 eles foram significantemente maiores.

Com o auxílio da chave de inferência proposta por Templeton (2001) levantaram-se hipóteses de eventos históricos que podem explicar o padrão de distâncias encontrado. As distâncias significantemente pequenas apresentadas pelo agrupamento 2-1 e as significantemente grandes pelo 2-3 levaram à inferência de fragmentação populacional passada, separando os dois grupos (Fig. 5).

Haplótipos (0-passos)			Clados de 1-passo			Clados de 2-passos											
nome	<i>Dc</i>	<i>Dn</i>	nome	<i>Dc</i>	<i>Dn</i>	nome	<i>Dc</i>	<i>Dn</i>									
H	0	0	1-1	44	1042												
F	0	0	1-2	1121	1354												
A	1036	1044	1-4	1050	1051												
B	0	1174															
C	238	1380															
D	0	581															
I-T	917	-85															
			I-T	-288	198	2-1	1068 ^P	1148 ^P									
R	1117	1111	1-3	1089	1085												
T	0	591															
I-T	1117	520															
N	0	0							1-6	0	1531						
O	1145	1087							1-9	995	1239						
P	0	682															
			I-T	-236	195	2-2	119	1215									
U			1-5	0	1068												
L	0	1022	1-10	1437	358												
M	1526	1566															
			I-T	1436	358	2-3	1399 ^G	1417 ^G									
						I-T	315 ^G	246 ^G									
						1-2-3-4-9: Fragmentação Passada											

Fig. 5 - Análise de clados agrupados dos haplótipos de NADH4 de populações brasileiras do *Ae. aegypti*. *Dc* e *Dn* são apresentadas para cada nível da análise. As letras **P** e **G** referem-se a distâncias significativamente pequenas e grandes, respectivamente. As diferenças médias entre as distâncias *Dc* e *Dn* de nós interiores (representados em cinza) e nós terminais.

Para verificar se algum dos clados havia passado por recente expansão geográfica, fez-se a análise de distribuição das diferenças pareadas (“mismatch distribution”), primeiramente com todos os haplótipos presentes nas populações brasileiras e depois com cada um dos clados obtidos na análise de clados agrupados (Fig. 6).

Quando se analisou a distribuição com pareamento entre todas as populações, ela apresentou caráter multimodal, com picos em 1, 5, 12 e 14 diferenças (figura 6A). A distribuição para as populações presentes no clado 2 também foi multimodal, com picos em 0, 2, 4, 8 e 13 diferenças (figura 6C).

Já a distribuição das diferenças pareadas do clado 1 foi claramente unimodal, com picos em 0, 3 e 5 diferenças (figura 6B). Isso se explica quando a composição do clado foi analisada: um haplótipo freqüente (haplótipo **A**, freqüência absoluta de 59) conectado aos haplótipos **B**, **C** e **D** (1 passo mutacional, 1 representante em cada haplótipo) e aos haplótipos **F** (4 representantes, 2 passos) e **H** (2 representantes, 5 passos).

Fig. 6 - Distribuição das diferenças pareadas entre seqüências de fragmento do gene mitocondrial NADH subunidade 4, obtidas de populações brasileiras (A), clado 1 (B) e clado 2 (C), do *Aedes aegypti*.

Os resultados das análises genealógicas estão representados nas Figuras 7, 8 e 9. Utilizou-se o critério de parcimônia máxima para a busca das relações genealógicas entre os haplótipos presentes em todas as populações amostradas para este estudo. Sequências homólogas de *An. gambiae* e *Ae. japonicus* foram utilizadas para o enraizamento das topologias.

Percebe-se, na Figura 7, a existência de dois clados monofiléticos idênticos aos clados 1 e 2 resultantes da análise de clados agrupados. O suporte "bootstrap" do clado 1 é de 92%, o que reflete a robustez do mesmo. A maioria das relações dentre os haplótipos incluídos nesse clado está resolvida, à exceção daquelas entre **A**, **B**, **C** e **D**.

Em contraste, o clado 2 é representado por dois grupos grandes. Em ambos, as relações não foram resolvidas, resultando em politomias. O agrupamento mais basal compreende os haplótipos **M**, **L**, **J**, **K** e **U** e o outro, os **R**, **O**, **T**, **P**, **N**, **Q** e **S**. Os suportes "bootstrap" para as relações observadas foram menores do que 50%.

Com o objetivo de estabelecer as relações evolutivas entre as seqüências do clado 2, foi feita análise filogenética sob o critério de verossimilhança máxima (Fig. 8). O modelo de evolução de nucleotídeos adotado foi o K81uf + G. A topologia de verossimilhança máxima mostra que as populações estão separadas em dois grupos formados pelos mesmos haplótipos da análise sob critério de

parcimônia máxima.

Fig. 7 - Árvore de consenso estrito gerada a partir de 12 topologias com caracteres pesados, obtidas pelo método de parcimônia máxima, mostrando os valores de "bootstrap". Comprimento = 44 passos; Índice de consistência = 0,705; Índice de retenção = 0,882; Índice de consistência reescalado = 0,621; Índice de homoplasia = 0,295. *An. gambiae* e *Ae. japonicus* como grupos externos.

Fig. 8 - Topologia de verossimilhança máxima gerada utilizando o modelo K81uf + G. Os números que aparecem acima dos ramos são os valores de “bootstrap” obtidos para as relações geradas em análise sob o critério de verossimilhança. *An. gambiae* e *Ae. japonicus* são os grupos externos. $-\ln L = 817,95732$

A hipótese de relógio molecular foi testada com o uso do teste de razão de verossimilhança (LRT). Os resultados dos escores de verossimilhança máxima foram: sem relógio: 860,6106; com relógio escore 879,4938, 23 táxons, g.l. = 21. A hipótese do relógio molecular foi rejeitada, indicando que pelo menos uma das seqüências apresentava taxa evolutiva significativamente diferente das demais.

Para a identificação de quais linhagens apresentavam taxas maiores ou menores do que a média geral, foi empregado o teste do comprimento de ramos ("branch-length test"), implementado no software LinTree (Takezaki e col., 1995).

O comprimento médio da raiz até os ramos terminais foi 0,018913. Todos os valores de comprimentos dos ramos dos haplótipos apresentaram probabilidade maior ou igual a 90% de estarem dentro do intervalo de confiança do valor médio, com exceção do haplótipo U, que apresentou $P = 0,296$, mostrando ser essa a seqüência desviante.

Após a identificação da linhagem significativamente diferente da média, esta foi retirada das análises e uma nova bateria de testes foi realizada para a confirmação de que não haveria outras situações de taxas discordantes, permitindo a inclusão do relógio molecular nas análises. A partir desse ponto, os comprimentos de ramos foram novamente estimados, empregando-se os critérios de máxima verossimilhança, considerando taxas evolutivas homogêneas e com

base no modelo evolutivo adequado para o novo conjunto de dados, no caso, HKY85 + G.

Feito isso, o relógio molecular foi calibrado utilizando-se 200 milhões de anos como sendo a estimativa de divergência entre os gêneros *Anopheles* e *Aedes* (Ureta-Vidal e col., 2003). A divergência entre os clados 1 e 2 foi estimada em aproximadamente 35 milhões de anos, inferido da Figura 9, que mostra a árvore de verossimilhança máxima com o relógio molecular forçado e sem o haplótipo U.

Fig. 9 - Árvore de verossimilhança máxima gerada utilizando-se o modelo HKY85 + G, calibrada para o relógio molecular com dados de Ureta-Vidal e col. (2003). $-\ln L = 879,49380$

Definidos os dois clados, passou-se à caracterização de cada um deles. Assim, as Figuras 10 e 11 mostram a contribuição de cada haplótipo em seu respectivo clado (1 ou 2). No clado 1, o haplótipo **A** tem a maior frequência (86%). No clado 2, os haplótipos **R** (53%), **M** (26%) e **O** (11%) são os mais freqüentes.

As distribuições de cada haplótipo por regiões brasileiras estão representadas nas Figuras 12 (clado 1), 13 (clado 2) e 14. Nota-se que na região nordeste só existem haplótipos do clado 1 que também é predominante nas regiões sudeste e centro-oeste. Nas demais regiões predominam haplótipos presentes no clado 2 (Fig. 14).

A Figura 15 mostra as localidades brasileiras nas quais estão presentes haplótipos do clado 1, enquanto a Figura 16 mostra as representantes do clado 2.

Quando se faz representação semelhante, porém considerando-se os haplótipos nas populações não-brasileiras, nota-se que as Américas apresentam representantes dos dois clados, assim com a África Ocidental. A parte leste da África, assim como a Ásia, apresentam apenas haplótipos do clado 2 (Fig. 17).

Fig. 10 - Frequências relativas de cada haplótipo de fragmento do gene mitocondrial NADH subunidade 4, obtidas de populações brasileiras do *Aedes aegypti* dentro do clado 1.

Fig. 11 - Frequências relativas de cada haplótipo dentro de fragmento do gene mitocondrial NADH subunidade 4, obtidas de populações brasileiras do *Aedes aegypti* do clado 2.

Fig. 12 - Distribuição dos haplótipos do clado 1 de fragmento do gene mitocondrial *NADH* subunidade 4, obtidas de populações brasileiras do *Aedes aegypti* por regiões do Brasil.

Fig. 13 - Distribuição dos haplótipos do clado 2 de fragmento do gene mitocondrial *NADH* subunidade 4, obtidas de populações brasileiras do *Aedes aegypti* por regiões do Brasil.

Fig. 14 - Distribuição relativa dos clados 1 (azul) e 2 (vermelho) do *Ae. aegypti* por regiões administrativas do Brasil.

Fig. 16 - Distribuição geográfica dos haplótipos do fragmento do gene mitocondrial NADH subunidade 4 de populações de *Ae. aegypti* no Brasil agrupados no clado 2.

Fig. 17 - Distribuição geográfica dos haplótipos do fragmento do gene mitocondrial NADH subunidade 4 das populações não-brasileiras do *Ae. aegypti*. Em azul, haplótipos do clado 1 e em vermelho, do clado 2.

DISCUSSÃO

Estudos genealógicos ajudam entender processos populacionais, eventos filogenéticos e de especiação. Isto por que, eles incorporam dimensão temporal, e portanto evolutiva, ao relacionamento entre haplótipos ou alelos e esses podem ser relacionados com padrões espaciais (Sunnucks, 2000).

Vários tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados com grande variedade de propósitos, por exemplo, estudos de estruturação populacional, identificação de espécies, separação de espécies crípticas, co-evolução parasito-hospedeiro, reconstrução da história evolutiva de organismos inferiores e superiores e construção de árvores da vida. Schlotterer (2004) apresenta extensa revisão sobre o assunto.

Os resultados das presentes análises mostram que os indivíduos de *Ae. aegypti* coletados em várias localidades do Brasil têm parâmetros populacionais de variabilidade genética semelhante ao de outras populações do inseto estudadas.

Assim, em trabalho recente realizado com populações mexicanas do *Ae. aegypti*, e utilizando o mesmo fragmento do gene *NADH4*, Gorrochotegui-Escalante e col. (2000) estimaram em 0,01430 a diversidade nucleotídica (π). No presente trabalho, o valor estimado de π foi 0,01883 para todas as populações e 0,01829 quando foram consideradas apenas as brasileiras, valores semelhantes aos

encontrados para as populações mexicanas. Vale assinalar que os valores são de 3 a 8 vezes maiores do que aqueles obtidos para *Anopheles gambiae* (0,0038) e *An. arabiensis* (0,0023 - 0,0051) (Besansky e col., 1997) e *An. albimanus* (0,0045 - 0,0051) (de Merida e col., 1999).

Estimando-se os valores de π para o clado 1 (0,0030) e clado 2 (0,0089) das amostras brasileiras, os valores se aproximaram daqueles já encontrados para *Anopheles*. Porém, o valor estimado para o clado 1 foi quase 3 vezes menor do que o do clado 2.

O mesmo raciocínio pode ser feito quando se analisa os valores de número médio de diferenças nucleotídicas (k). Neste estudo, incluindo-se todas as populações, o valor de k foi 6,798. Excluindo-se as amostras dos outros países, o valor de k para as populações brasileiras foi 6,603.

Vale assinalar que em se analisando os cladogramas 1 e 2 separadamente, os valores de k são 1,368 e 3,217, respectivamente. Novamente os valores do clado 1 foram 3 vezes menores que os do clado 2. Assim, pode-se inferir que este é mais polimórfico do que aquele.

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier e col., 1992) mostraram grande estruturação nas populações analisadas (Tabelas 6, 7 e 8). Em todas as análises

realizadas, a maior parte das variações foi observada entre indivíduos de populações coletadas em um mesmo município.

Não foi possível propor hipótese que explicasse a associação geográfica de grupos de populações pela AMOVA. De fato, todos os possíveis agrupamentos entre as regiões administrativas brasileiras foram testados, sempre mostrando que o componente de co-variância de maior proporção era o intrapopulacional.

A análise de clados aninhados mostrou a existência de dois grupos distintos, separados por oito passos mutacionais (Fig. 4). Um deles, chamado clado 1, é composto de 6 haplótipos, denominados **A**, **B**, **C**, **D**, **F** e **H**. Como se pode observar na figura 4, há pouca estruturação no clado 1. Este é composto pelos supracitados 5 haplótipos que se mostraram relacionados por genealogia do tipo estrela de ramos curtos, com um haplótipo central **A** que está separado de **B**, **C** e **D** por apenas um passo mutacional e de **F** por dois.

A forma de “estrela” é característica de populações em expansão geográfica. Ou seja, existe um haplótipo mais freqüente e disperso, situado no interior, que está conectado aos menos freqüentes, localizados na periferia da distribuição. Estes distanciam-se por apenas um passo mutacional (de Brito e col., 2002; Slatkin & Hudson, 1991; Fu, 1997).

Outro resultado que corrobora essa hipótese é a forma unimodal da distribuição das diferenças pareadas para o clado 1 (Fig. 6B).

A interpretação da significância das distâncias D_c e D_n mostrou que nos agrupamentos dos níveis inferiores (haplótipos, 0 passos) e de 1 passo (agrupamentos 1-1, 1-2, 1-4) a hipótese nula de panmixia não pôde ser descartada. Dessa maneira, demonstrou-se que há fluxo gênico entre as populações do clado. Porém, nos agrupamentos em níveis superiores (2 passos), observamos valores significativamente pequenos para as D_c 's e para as D_n 's no clado 1.

Distâncias pequenas significam agrupamento confinado a determinada região geográfica. De fato, apesar de presente em todas as regiões do país, o clado 1 mostra-se predominante numa faixa contínua representada pelas regiões costeiras do nordeste e do sudeste (Fig. 15).

O clado 2 (agrupamento 2-3) apresentou estrutura mais complexa. Observou-se a existência de reticulação entre os haplótipos bem como D_c e D_n significantemente maiores do que o esperado.

Como pode ser visto na Figura 16, os haplótipos agrupados no clado 2 são freqüentes nas regiões sudeste, centro-oeste e norte. Porém as grandes distâncias geográficas entre as populações dessas regiões do país levam às distâncias D_c e D_n significativamente

grandes.

Esse resultado pode estar associado à lacuna de amostragem, visto que não existem amostras de regiões do centro-oeste, como dos estados de Goiás, Tocantins. Acresce-se as poucas amostras dos estados do Amazonas e Pará (Figs. 3, 15 e 16).

A interpretação das significâncias das distâncias estimadas na análise do cladograma total, através da chave de inferências proposta por Templeton (2001), levou à inferência de fragmentação passada entre esses dois agrupamentos.

Resultados semelhantes foram obtidos nas análises genealógicas: utilizando-se os critérios de parcimônia máxima e de verossimilhança máxima observou-se a existência dos mesmos agrupamentos, clados principais 1 e 2 de mtDNA nas amostras de *Ae. aegypti* (Figs. 7 e 8).

A calibração do relógio molecular levou a uma estimativa de divergência entre esses dois clados de 35 milhões de anos, colocando a divergência no oligoceno do período terciário (Fig. 9).

Os relacionamentos genealógicos dentro dos clados foram mais bem resolvidos sob o critério de verossimilhança máxima, provavelmente porque as análises sob esse critério levam em consideração o comprimento dos ramos ao gerar topologias (Arbogast, 1999). Sob o critério de verossimilhança máxima, as mutações são

consideradas mais prováveis em ramos longos do que em ramos curtos. Como resultado, alguns caracteres que sob o critério de máxima parcimônia seriam não informativos, podem o ser sob o critério de verossimilhança máxima (Swofford e col., 1996).

Além do maior número de caracteres informativos reconhecidos pela análise de verossimilhança máxima, outra característica faz com que essa seja a melhor abordagem para o presente conjunto de dados. Tipicamente o critério de verossimilhança máxima é o método de inferência filogenética com a menor variância associada e portanto é o método menos afetado por erros de amostragem quando o número de caracteres por táxon é relativamente pequeno. Este é o caso dos fragmentos aqui seqüenciados (Swofford e col., 1996).

Essa qualidade faz do método de verossimilhança máxima a melhor abordagem para estudos de filogeografia intraespecífica com o intuito de se maximizar o número de indivíduos e de localidades amostrados ao invés do número de nucleotídeos (Arbogast, 1999).

Com referência à estimativa de tempo de divergência entre os clados 1 e 2 algumas considerações devem ser feitas. O LRT, quando aplicado ao conjunto total de dados, rejeitou a hipótese de taxas de evolução constantes pela distribuição do χ^2 . Embora Goldman (1993) tenha questionado a aproximação do χ^2 para o teste estatístico LRT, Yang e colaboradores (1994) e Yang & Kumar (1996), após simulações, demonstraram que este teste é aceitável na maioria dos casos, desde

que se empregue o modelo de substituição de nucleotídeo apropriado. Com esta abordagem, no entanto, é possível apenas identificar que há linhagens com taxas evolutivas desviantes. No entanto, não é possível determinar qual ou quais são estas linhagens.

Portanto, para a identificação das seqüências desviantes, foi realizado o teste de comprimento de ramos. Dessa maneira verificou-se que o haplótipo **U**, presente na população de Maringá (Tabela 2), desviava significativamente da média dos comprimentos dos ramos. De fato, a figura 5 mostra que o haplótipo **U** está a quatro passos mutacionais do haplótipo **M** com o qual se conecta com o restante do clado 2.

Maringá é uma importante cidade situada a noroeste do estado do Paraná, que tem relacionamento comercial e/ou turístico com o norte da Argentina e Paraguai. Provavelmente uma amostragem mais detalhada, que incorporasse amostras desses dois países, poderia conectar esse haplótipo com o resto do cladograma por menor número de passos mutacionais.

A distribuição dos haplótipos no território brasileiro não é homogênea. Os haplótipos do clado 1, relacionados com amostras de populações do Senegal, são predominantes nos estados do nordeste e sudeste. Estão presentes em cidades importantes como Salvador e Rio de Janeiro, mas também em cidade pequenas como Milhã, Pacujá e Quixeramobim (Tabela 2, Fig. 15). Em trabalho recente, usando

marcadores isoenzimáticos, Lourenço-de-Oliveira e col. (2004) mostram que as populações do sudeste se mostraram bastante homogêneas. Vale lembrar que a amostragem desse trabalho tinha, como populações da região sudeste, amostras das cidades do Rio de Janeiro (RJ), Nova Iguaçu (RJ) e Potim (SP).

No presente estudo, todos os indivíduos das cidades do Rio de Janeiro (N=8) e Nova Iguaçu (N=8) compartilham o mesmo haplótipo (A), enquanto que dos três exemplares amostrados de Potim, dois apresentaram o mesmo haplótipo A e o outro o haplótipo F, distante apenas dois passos mutacionais (Tabela 2, Fig. 4).

Por outro lado, os haplótipos do clado 2, relacionados com haplótipos presentes na África central, Ásia e Américas do Norte e Central, estão presentes em cidades brasileiras com importantes portos comerciais, caso de Belém, Manaus, Santos e São Sebastião (Tabela 2, Fig. 16).

Todas as análises realizadas para este estudo mostram a existência de duas linhagens de DNA mitocondrial nas populações do *Ae. aegypti* do Brasil. Dessas duas linhagens, uma (clado 1) está relacionada com amostras provenientes do Senegal, E.U.A., Venezuela e Peru, enquanto a outra linhagem (clado 2) está relacionada com amostras do leste africano (Uganda), Ásia (Cingapura, Camboja e Taiti) e também com todas as outras populações americanas amostradas (E.U.A., Guatemala, Venezuela e Peru) (Fig. 17). Fica claro

que nas Américas co-existem os dois clados, um relacionado com populações do oeste africano e outro com populações do leste africano e Ásia.

Esse padrão de dois clados foi encontrado em estudos realizados com populações mexicanas do *Ae. aegypti* utilizando o mesmo marcador mitocondrial. Nessas populações, as análises AMOVA mostraram que 72% da variância era interpopulacional. Dois clados foram propostos, um englobando as amostras da península de Yucatan e da costa do Pacífico e outro, com populações da região nordeste do México (Gorrochotegui-Escalante e col., 2002).

A existência de duas linhagens de DNA mitocondrial distintas nas populações analisadas para o presente estudo reflete a existência de duas linhagens matriarcais com histórias distintas e separadas por 35 milhões de anos. Tabachnick (1991) também propôs duas linhagens matriarcais como explicação para a existência de duas subespécies distintas, o *Ae. aegypti aegypti* e o *Ae. aegypti formosus*, no continente africano. Segundo o autor, dessas duas subespécies foi o *Ae. aegypti aegypti* que infestou as Américas e o Caribe nos séculos XVII e XVIII (Powell & Tabachick, 1980).

Em trabalho clássico, Powell & Tabachick (1980) estudaram a variabilidade genética de 19 a 22 *loci* em 34 populações de *Ae. aegypti aegypti* e de *Ae. aegypti formosus* da África, Caribe, América do Norte

e do Sul e Ásia. Como resultado, os autores demonstraram que esses culicídeos apresentavam diferenças genéticas significativas que seriam importantes para a proposição de inferências sobre a origem geográfica das populações. Os autores separaram as populações estudadas em 7 grupos, a saber: (1) subespécie *formosus* do Leste Africano, (2) subespécie *aegypti* do Leste Africano, (3) subespécie *formosus* do Oeste Africano, (4) Caribe, (5) E.U.A, (6) América do Sul (Venezuela) e (7) Ásia. As populações do Caribe, América do Sul e EUA mostraram-se mais relacionadas com populações do *Ae. aegypti aegypti* do Leste Africano. Por outro lado, as populações da Ásia, apesar de morfologicamente parecidas com o *Ae. aegypti aegypti*, agruparam-se independente, porém próximo das duas populações do *Ae. aegypti formosus* que estão relacionadas geneticamente. Dessa maneira, os autores sugeriram que as populações asiáticas de *Ae. aegypti aegypti* estariam mais relacionadas com a subespécie *formosus*. Infelizmente os autores não mencionaram as datas das coletas. Tendo em vista que o trabalho foi submetido para publicação em 1979, as coletas foram realizadas em anos anteriores, portanto no mínimo, em 1978, o que nos dá o panorama da dispersão do vetor anterior a ocorrência das epidemias de dengue no Brasil, que tiveram início em 1982.

É importante citar o trabalho de Failloux e col. (2002). Os autores mostram que as taxas infecção pelo vírus dengue, sorotipo DEN-2, estão relacionadas com a subespécie, sendo que o *Ae. aegypti*

aegypti mostrou altas taxas enquanto a subespécie *formosus*, baixas.

O *Ae. aegypti* sofreu longa campanha de controle. Uma das primeiras campanhas destinadas à erradicação da febre amarela urbana e o controle do vetor, *Ae. aegypti*, data de 1902, no interior do estado de São Paulo, encabeçada por Emílio Ribas (Figueiredo, 1996). Logo a seguir, em 1905, no estado do Rio de Janeiro, campanhas similares foram comandadas por Oswaldo Cruz (Bryan e col. 2004).

Em 1929, a Fundação Rockefeller iniciou a campanha com abrangência nacional com a utilização de inseticidas não sintéticos, tais como o petróleo ou verde de Paris. Em 1940 o Serviço Nacional de Febre Amarela assumiu a campanha com vastas regiões do país já livres do *Ae. aegypti*.

Os focos remanescentes encontravam-se na região nordeste. Após a introdução do DDT em 1947, a campanha fez uso intensivo desse inseticida sintético até meados da década de 1950, quando o Brasil foi declarado livre desse culicídeo (Bryan e col. 2004; OPAS, 1961; Franco, 1961).

Para se ter idéia da magnitude da campanha, de 1931 a 1957 1.882 dos 1.894 municípios existentes foram inspecionados para a presença do *Ae. aegypti*. O número de casas visitadas foi de 617.021.537 enquanto que o de depósitos chegou a 3.414.210.354.

Entre os anos de 1947 e 1957, 3.523.548 casas e 26.821.231 depósitos foram tratados com DDT. Durante esses anos, dentre as localidades brasileiras onde utilizou-se o DDT 97% estavam localizadas em 5 estados do nordeste: Alagoas, Bahia, Paraíba,

Pernambuco e Rio Grande do Norte (Fig. 18) (OPAS, 1959).

Figura 18 – Áreas e localidades trabalhadas durante a campanha de erradicação do *Ae. aegypti* no Brasil, de 1931 a 1957. Reproduzido de OPAS (1959).

Na ocasião, a avaliação do sucesso da campanha foi feita através de verificações em municípios das diversas unidades da federação. Porém, enquanto o controle atingiu cerca de 100% dos municípios existentes, a fase de verificação ficou bem aquém disso. A Figura 19 mostra a relação entre o número de municípios inspecionados e o de não inspecionados para verificação da eliminação do *Ae. aegypti* em decorrência da campanha de erradicação. Nota-se que em algumas unidades da federação, 100% dos municípios foram verificados, casos de Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe, além da cidade do Rio de Janeiro (antigo distrito federal) e Fernando de Noronha que à época pertencia ao estado de Pernambuco.

Em outros estados, o número de municípios inspecionados foi bem baixo. São os casos de Goiás, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul. É provável que esse baixo número tenha sido decorrência da situação epidemiológica desses estados, que apresentavam baixos índices de infestação. No entanto, outros estados que estavam amplamente infestados, casos da Bahia e do Piauí, não tiveram 100% de seus municípios verificados (OPAS, 1959).

Em 1958, houve uma extensa vistoria, acompanhada por técnicos da OPAS, para que o Brasil fosse declarado “livre do *Aedes aegypti*”. Assim, quatro estados do nordeste, Bahia, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, foram escolhidos para a verificação

com a justificativa de que os últimos focos se encontravam nessa região.

Figura 19 – Municípios inspecionados e não inspecionados, por estado da federação, durante a campanha de erradicação do *Ae. aegypti*. Anos de 1931 a 1957. Fonte: OPAS, 1959.

Dos 150 municípios existentes no estado da Bahia, apenas 50 foram verificados. Em Pernambuco, apenas 10% dos municípios foram verificados, na Paraíba, 35 entre 41 e no Rio Grande do Norte, de 94 municípios, apenas 8 foram verificados.

Com o relaxamento das atividades de controle nas décadas seguintes houve a “re-introdução” do *Ae. aegypti* no território brasileiro. Um primeiro foco estabeleceu-se em 1967, na cidade de Belém. Porém esse foco foi rapidamente debelado. Na época afirmou-se que se tratava de uma nova linhagem: “... *A reinfestação foi processada por uma raça de mosquitos resistentes aos inseticidas clorados diferente portanto da que existia anteriormente no Brasil, que era muito sensível a estes inseticidas...*” (Franco, 1969). Acredita-se que a “re-introdução” se deu de forma definitiva a partir do estado da Bahia onde foi encontrado o primeiro foco do *Ae. aegypti* em 1976 (Schatzmayr, 2000). Desde então, o número de cidades brasileiras infestadas pelo *Ae. aegypti* só aumentou.

Obviamente, considerando-se o uso em larga escala de DDT, era de se esperar a seleção de linhagens do *Ae. aegypti* resistentes aos organoclorados, classe química do DDT. Na verdade, já haviam relatos de que isso estivesse ocorrendo em outras partes do mundo (Mouchet, 1967; Mouchet & Chastel, 1966; Coker, 1966; Wood, 1965). Provavelmente o fato se repetiu no Brasil, com linhagens nordestinas do *Ae. aegypti* resistentes ao DDT sendo selecionadas e re-infestando

áreas consideradas livres desse vetor.

Os resultados das análises realizadas para o presente estudo levaram à seguinte hipótese evolutiva para as linhagens de mtDNA do *Ae. aegypti* presentes no Brasil: linhagens do *Ae. aegypti aegypti* chegaram ao Brasil através do tráfico de escravos, durante os séculos XVII e XVIII. Aqui se estabeleceram e foram as responsáveis pelas grandes epidemias de febre amarela urbana iniciadas no final do século XVII e que duraram até o início do século XX (OPAS, 2004; Figueiredo, 1996). Com a campanha de erradicação do *Ae. aegypti*, essa linhagem sofreu redução populacional drástica, o que fez com que a variabilidade genética diminuísse, incluindo-se o polimorfismo do mtDNA. Porém, as linhagens resistentes ao DDT sobreviveram e recolonizaram a parte leste do território brasileiro a partir do estado da Bahia. Atualmente, essas linhagens seriam representadas pelos haplótipos do clado 1 que estariam se dispersando pelo território brasileiro a partir da região nordeste. O baixo polimorfismo apresentado pelos haplótipos desse clado seria resultado do efeito gargalo gerado pela campanha de erradicação.

A já referida expansão geográfica desse clado, acrescida do fato de que as amostras do nordeste apresentaram apenas haplótipos desse mesmo clado, particularmente em cidades pequenas com pouco ou nenhum intercâmbio com grandes centros, corroboram essa hipótese.

Vale assinalar o trabalho de Glasser & Gomes (2000), demonstrando que durante a infestação do estado de São Paulo pelo *Ae. aegypti* a dispersão dessa espécie, de uma cidade infestada para outra não infestada, ocorreu em curtas distâncias: nos municípios onde o vetor se estabelecia, 75% deles distavam apenas 34 Km do município infestado mais próximo. Dessa maneira, demonstrou-se que apesar do *Ae. aegypti* possuir grande potencial de dispersão, a infestação de novos municípios se deu a curtas distâncias.

O mesmo tipo de dispersão por curtas distâncias foi relatado num estudo usando marcadores isozímicos em populações brasileiras do *Ae. aegypti* (Lourenço-de-Oliveira e col., 2004).

Os haplótipos do clado 2, relacionados com populações asiáticas, teriam chegado às Américas mais recentemente, provavelmente na década de 1980 por dispersão passiva em decorrência das atividades de comércio, grandemente ampliadas com países estrangeiros como consequência dos processos de globalização.

De fato, dos 15 maiores parceiros comerciais do Brasil, entre os anos de 1998 e 2000, temos os EUA, sete países europeus, 4 latino-americanos e 3 asiáticos. Atualmente os países asiáticos são responsáveis por 25,5 % das exportações mundiais (Brasil, 2004).

Esses haplótipos do clado 2 estão presentes em cidades com portos importantes, tais como Belém, Manaus, Santos (Figs. 16 e 20).

Provavelmente indivíduos portadores desses haplótipos tenham chegado ao país vindos diretamente da Ásia ou via Estados Unidos e entrado pelos principais portos e daí se dispersando por rotas comerciais terrestres.

A Figura 16 mostra uma dessas possíveis rotas, ligando as cidades amostradas do sudeste com cidades da região norte, passando pela região centro-oeste. Esse corredor é importante via de escoamento da produção brasileira de grãos produzidos nas regiões sul e sudeste e que são exportados pelo porto de Belém. O que se propõe é que o tráfico de veículos e de embarcações que voltam das regiões norte e centro-oeste tenham possibilitado a dispersão desse vetor até as regiões sudeste e sul. Daí, ele teria se espalhado pelo padrão de curta distância proposto por Glasser e Gomes (2000). Considerando que as importações provenientes da Ásia chegando ao Brasil via zona franca de Manaus, pode-se pensar que as cepas asiáticas foram introduzidas via Manaus-Belém.

A maior variabilidade genética observada nessa linhagem pode ser devida às múltiplas introduções e/ou variabilidade pré-existente das linhagens introduzidas. Esse fato se reveste de grande importância pois, como mostraram Failloux e col. (2002), diferenças genéticas entre populações do *Ae. aegypti* dependem da história de migração e colonização da população em questão e essas diferenças se mostraram associadas à suscetibilidade ao vírus DEN-2.

De fato, informações a respeito de variabilidade genética intrapopulacional são críticas para o entendimento da história evolutiva de organismos e, mais especificamente, de mosquitos e portanto, sobre a epidemiologia das doenças por eles transmitidas.

Fig 20 - Principais portos de importação e exportação no Brasil.

Nesse sentido vários trabalhos têm relacionado variabilidade em

Ae. aegypti e características como a suscetibilidade ao vírus dengue DEN-2 . Assim, Lourenço-de-Oliveira e col. (2004) mostraram que as populações brasileiras são altamente suscetíveis a essa linhagem do vírus dengue e a taxa se mostra heterogêneas entre as populações amostradas.

No México, Bennett e col. (2002) relataram taxas de infecção de 24 a 83%, com as amostras da península de Yucatan mostrando valores maiores que as outras (vale lembrar que há duas linhagens de DNAm no México - Gorrohotegui-Escalante e col., 2000).

Na Guiana Francesa todas as populações amostradas apresentaram altas taxas de infecção (Fouque e col., 2001).

Além disso, diferentes linhagens podem apresentar diferentes respostas aos inseticidas utilizados no controle das populações. Guiyun e col., mostraram que marcadores neutros do tipo polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) estavam associados por “efeito carona” ao locus *EST-4* que confere resistência a inseticidas organofosforados, podendo assim ser genotipados.

No Brasil, as populações do *A. aegypti* apresentam taxas heterogêneas de infecção pelo vírus da Febre Amarela (Lourenço-de-Oliveira e col., 2004 e 2002).

A Figura 21 mostra o cruzamento dessas informações sobre taxa de infecção ao vírus da febre amarela (Lourenço-de-Oliveira e

col., 2004) com a variabilidade dos haplótipos de mtDNA encontradas no presente estudo, representadas pelos clados 1 e 2.

Nota-se que as menores taxas de infecção estão associadas ao clado 1, com exceção da amostra de CNK, provavelmente por tratar-se da subespécie *formosus*.

Fig 21 – Porcentagem de fêmeas infectadas pelo vírus da Febre Amarela por população. As abreviações são as mesmas da tabela 2. CNK – *Ae. aegypti formosus*. Adaptado de Lourenço-de-Oliveira e col., 2004. Barras azuis representam haplótipos do clado 1; vermelhas do clado2 e verdes de ambos.

Portanto, a introdução de linhagens distintas desse vetor tem

enorme importância epidemiológica visto que novas linhagens podem apresentar diferentes suscetibilidades aos vírus e aos inseticidas utilizados no controle.

CONCLUSÕES

1. Há duas linhagens de mtDNA nas populações do *Aedes aegypti* analisadas, tanto as brasileiras como as de outros países;
2. As duas linhagens, separadas por 8 passos mutacionais, divergiram há aproximadamente 35 milhões de anos;
3. A linhagem representada pelo clado 1 apresenta menor polimorfismo quando comparada à outra linhagem, chamada clado 2;
4. Evidências históricas e genéticas suportam a hipótese de que a linhagem do clado 1 seja remanescente de linhagens presentes em populações do *Ae. aegypti* que chegaram ao Brasil entre os séculos XVIII e XIX, vindas da parte ocidental da África trazidas pelo tráfico de escravos;
5. A linhagem representada por haplótipos do clado 2 está presente em importantes cidades portuárias, sugerindo introdução por via marítima;
6. As populações que apresentam exclusivamente a linhagem representada pelo clado 1 se mostraram menos suscetíveis à infecção experimental pelo vírus da febre

amarela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990)
- "Basic local alignment search tool." **J. Mol. Biol.** **215**: 403 - 410.
- Alvarez, J.M. & Hoy, M.A. (2002) – Evaluation of the ITS2 DNA sequences in separating closely related populations of the parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, **95(2)**: 250–256.
- Arbogast, B.S. (1999) - Mitochondrial phylogeography of the new world flying squirrels (*Glaucomys*): implication for pleistocene biogeography. **J. Mammal.** **82**: 142 - 155.
- Avise, J.C. (1994) – Molecular markers, natural history and evolution. New York. Chapman & Hall, eds. 684 pp..
- Ballinger-Crabtree, M.E.; Black IV, W.C. & Miller, B.R. (1992) – Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RADP-PCR) for differentiate and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47(6)**: 893-901.
- Beebe, N. W.; Ellis, J. T.; Cooper, R. D. & Saul, A. (1999) - DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. **Insect Mol. Biol.**,

8: 381-390.

Belkin, J.N.; Heinemann, S.J. & Page, W.A. (1970) – Mosquitoes studies (Diptera, Culicidae) XXI. The culicidae of Jamaica.

Contrib. Amer. Ent. Inst., 4(1), 458 pp.

Bennett, K.E.; Olson, K.E.; Muñoz, M.L.; Fernandez-Sallas, I.; Farfan-Ale, J.A.; Higgs, S.; Black IV, W.C. & Beaty, B.J. (2002) – Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and United States.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 67(1): 85 – 92.

Bertorelle G, Slatkin M. (1995) - The number of segregating sites in expanding human populations, with implications for estimates of demographic parameters. **Mol Biol Evol.**, **12(5)**: 887 - 892.

Besansky, N.J.; Finnerty, V. & Collins, F.H. (1992) - Molecular perspectives on the genetics of mosquitoes. **Adv. Genet.**, **30**: 123-184.

Besansky, N.J.; Lehmann, J.A.; Fahey, G.T.; Fontenille, D.; Braack, L.E.O.; Hawley, W.A. & Collins, F.H. (1997) – Patterns of mitochondrial DNA 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 Brazil and United States. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, **95(1)**: 125-132.
- Black IV, W.C.; McLain, D.K. & Rai, K.S. (1989) - Patterns of variation in the rDNA cistron within and among world populations of a mosquito *Aedes albopictus* (Skuse). **Genetics**, **121(3)**: 539-50
- Bourguet, D.; Genissel, A. & Raymond, M. (2000) - Insecticide resistance and dominance levels. **J. Econ. Entomol.**, **93(6)**: 1588-1595.
- BRASIL, Ministério das Relações Exteriores (2004) – Evolução do comércio exterior Brasil-Mundo. Página acessada na Internet: <http://www.braziltradenet.gov.br/InformacoesEspecificas/IndicadoresEconomicos.aspx>
- de Brito, A.A; Manfrin, M.H. & Sene, F.M. (2002) – Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Gen. Mol. Biol.**, **25(2)**: 161 – 171.
- Bryan, C.S; Moss, S.W. & Kahn, R.J. (2004) – Yellow fever in the Americas. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** **18**: 275 – 292.
- Castelloe, J. & Templeton, A.R. (1994) - Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. **Mol. Phylogenet. Evol.** **3**: 102 -113.
- Clement, M.; Snell, Q. & Walker, P. (2002) - TCS: Estimating gene genealogies. <http://csdl.computer.orgdl/proceedings/ipdps/200>

- Coker, W.Z. (1966) - Linkage of the DDT-resistance gene in some strains of *Aedes aegypti* (L.). **Ann Trop Med Parasitol.**, **60(3)**: 347 - 356.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) - Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, **131(2)**: 479 - 491.
- Failloux, A.B.; Vazeille, M. & Rodhain, F. (2002) - Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. **J. Mol. Evol.**, **55(6)**: 653 - 663.
- Farris, J.S. (1969) - A successive approximations approach to character weighting. **Syst Zool.**, **18**: 374 - 385.
- Felsenstein, J. (1988) - Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. **Annu Rev Genet.**, **22**: 521 - 565.
- Ferre, J. & Van Rie, J. (2002) - Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Entomol.**, **47**: 501-533.
- Figueiredo, L.T.M. (1996) - A febre amarela na região de Ribeirão Preto durante a virada do século XIX - importância científica e repercussões econômicas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **29(1)**: 63 - 76.

- Fouque, F.; Vazeille, M.; Mousson, L.; Gaborit, P.; Carinci, R.; Issaly, J.; Rodhain, F. & Failloux, A.B. (2001) - *Aedes aegypti* in French Guiana: susceptibility to a dengue virus. **Trop. Med. Int. Health.**, **6(1)**: 76 - 82.
- Franco, O. (1961) – A Erradicação do “*Aedes aegypti*” do Brasil. **Rev. Bras. Mal. Deonças Trop.** **13**: 43-48.
- Franco, O. (1969) – Reinfestação do Pará pelo *Aedes aegypti*. **Rev. Bras. Mal. Deonças Trop.** **21(4)**: 729-731.
- Fritz, G.N.; Conn, J.; Cockburn, A. & Seawright, J. (1994) - Nucleotide sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Mol. Biol. Evol.**, **11**: 406-416.
- FU, Y.X. (1997) – Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, **133**: 693 – 709.
- Fu, Y.-X., & Li, W.-H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, **133**: 693-709.
- FUNASA (1999) – Reunião técnica para discutir status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Brasília, DF, 73 pp.
- Gale, K. & Crampton, J. (1989) - The ribosomal genes of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Eur. J. Biochem.**, **6**; **185(2)**: 311-317.

- Gimeno, C.; Belshaw, R. & Quicke, D.L. (1997) - Phylogenetic relationships of the Alysinae/Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) and the utility of cytochrome b, 16S and 28S D2 rRNA. **Insect Mol. Biol.**, **6(3)**: 273-284.
- Glasser, C.M. (1997) – Estudo da infestação do Estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Dissertação de mestrado. Depto. de Epidemiologia. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. 130 pps.
- Glasser, C.M & Gomes, A. C. (2000) – Infestação do estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Rev. Saúde Pública**, **43**: 570 – 577.
- Goldman, N. (1993) - Statistical tests of models of DNA substitution. **J. Mol. Evol.** **36**:182 - 198.
- Gorrochotegui-Escalante, N.; Gomez-Machorro, C.; Lozano-Fuentes, S.; Fernandez-Salas, I.; Munoz, M.L.; Farfan-Ale, J.A.; Garcia-Rejon, J.; Beaty, B.J. & Black IV, W.C. (2002) – Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **66(2)**: 213 – 22.
- Gorrochotegui-Escalante, N.; Munoz, M.L.; Fernandez-Salas, I.; Beaty, B.J. & Black IV, W.C. (2000) – Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **62(2)**: 200-209.
- Guiyun, Y.; Chadee, D.D. & Severson, D.W. (1998) – Evidence for

- genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. **Genetics**, **148**: 793 – 800.
- Groeters, F.R. & Tabachnik, B.E. (2000) - Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance. **J. Econ. Entomol.**, **93(6)**:1580-1587.
- Hall, T.A. (1999) – BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.** **42**: 95 – 98.
- Hartl, D.L. (2000) - A primer of population genetics. 3^a Edição. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 180 pp..
- Hemingway, J. (2000) - The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, **30(11)**:1009-1015.
- Hemingway, J. & Ranson, H. (2000) - Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Ann. Rev Entomol.**, **45**: 371-391.
- Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. (1997) - Phylogenetic methods come of age: testing hypotheses in an evolutionary context. **Science**, **276(5310)**: 227 - 232
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, R. (2002) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Distributed by the author. Department of Biology, University of Rochester.
- Kimura, M. (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution.

Cambridge University Press, Cambridge, MA, 384 pp..

Krzywinski, J.; Wilkerson, R. C. & Besansky, N. J. (2001) - Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. **Mol. Phyl. Evol.**, **18**: 479-487.

Kumar, A. & Rai, K.S. (1990) - Chromosomal localization and copy number of 18S + 28S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae). **Hereditas**, **113(3)**: 277-289

Lourenço-de-Oliveira, R.; Vazeille, M.; Filippis, A.M.B & Failloux, A.B. (2004) - *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Trans. R. Soc. Topp. Med. Hye.**, **98**: 43 – 54.

Lourenço-de-Oliveira, R.; Vazeille, M.; Filippis, A.M.B & Failloux, A.B. (2002) – Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **97(3)**: 437 – 439.

Loxdale, H.D. & Lushai, G. (1998) – Molecular markers in entomology. **Bull. Entomol. research**, **88**: 577-600.

Macoris, M. L.; Andrighetti, M.T.; Takaku, L.; Glasser C.M.; Garbeloto, V.C. & Bracco, J.E. (2003) - Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98(5)**: 703 - 708.

- Macoris, M.; Andrighetti, M.T.; Takaku, L.; Glasser, C.M.; Garbeloto, V.C.; & Cirino, V.C. (1999) - Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of Sao Paulo, Brazil. **Rev Saúde Publica; 33(5):** 521-522.
- Maddison, D. R. & Maddison, W. P. (2000) - MacClade 4. Analysis of phylogeny and character evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Marchi, A. & Pili, E. – (1994) - Ribosomal RNA genes in mosquitoes: localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Heredity, 72 (Pt 6):** 599-605.
- Mattingly, P.F. (1957) – Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. I. Taxonomy and bionomics. **Ann. Trop. Med. Parasitol., 51:** 392-408.
- de Merida, A.M.P.; Palmieri, M.; Yurrita, M.M.; Molina, A.; Molina, E. & Black IV, W.C. (1999) – Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. **Am. J. Trop. Hyg., 61:** 230 – 239.
- Miller, B. R.; Crabtree, M. B. & Savage, H. M. (1997) - Phylogenetic relationships of the Culicomorpha inferred from 18S and 5.8S ribosomal DNA sequences (Diptera: Nematocera). **Insect Mol. Biol., 6:** 105-114.
- Morlais, I. & Severson, D.W. (2003) - Intraspecific DNA variation in nuclear genes of the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**

12(6): 631 - 639.

Mouchet, J. (1967) - Insecticide-resistance in *Aedes aegypti* and allied species. **Bull World Health Organ., 36(4):** 569 - 577.

Mouchet, J. & Chastel, C. (1966) - Resistance to insecticides in *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* in Phnom-Penh (Cambodia). **Med. Trop., 26(5):** 505 - 515.

Neigel, J.E. & Avise, J.C. (1993) - Applications of a random-walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. **Genetics, 135:** 1209 - 1220.

Onyabe, D.Y. & Conn, J.E. (1999) - Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera:Culicidae). **Insect Mol. Biol., 8:** 435-442.

Organização Pan-Americana de Saúde (1991) – Diretrizes relativas à prevenção e ao controle da dengue hemorrágica nas Américas. Washington.

Organización Pan-Americana de la Salud 1995) – Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. **Publicación Científica nº 548. Washington.**

Organización Pan-Americana de la Salud (1959) – La Erradicación del *Aedes aegypti* en el Brasil. Evolución y Éxito de una Gran Campaña. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**

47(1): 1-12.

Orita, M.; Suzuki, Y; Sekiya, T. & Hayashi, K. (1989) – Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polimerase chain reaction. **Genomics 5:** 874- 879.

PAHO (2004) – The fight against *Aedes aegypti*. http://www.paho.org/english/dbi/es/pro_salute/history140.pdf. Acesso 16/08/2004.

Paskewitz, S.M.; Wesson, D.M. & Collins, F.H. (1993) - The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. **Insect Mol. Biol., 2(4):** 247-57.

Pereira, L.; Prata, M.J. & Amorim, A. (2000) - Diversity of mtDNA lineages in Portugal: not a genetic edge of European variation. **Ann. Hum. Genet., 64:** 491 - 506.

Porter, C.H. & Collins, F.H. (1991) - Nucleotide Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). **Am. J. Trop. Med. Hyg., 45:** 271-279.

Porter, C.H. & Collins, F.H. (1996) - Phylogeny of nearctic members of the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. **Mol. Phylogenet. Evol., 6(2):** 178-88.

Posada D, & Crandall, K.A. (1998) - MODELTEST: testing the model of

- DNA substitution. **Bioinformatics**, **14(9)**: 817 - 818.
- Posada, D.; Crandall, K.A. & Templeton, A.R. (2000) - GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Mol Ecol.**, **(4)**:487 - 488.
- Powell, J.R. & Tabachnick, W.J. (1980) - Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. **Science** **208(20)**: 1385 - 1387.
- Ravel, S.; Monteny, N.; Olmos, D.V.; Verdugo, J.E. & Cuny, G. (2001) - A preliminary study of population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. **Acta Trop.** **78**: 241-250.
- Rogers, A.R. & Harpending, H. (1992) - Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Mol. Biol Evol.**, **9**: 552 - 569.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** **19**: 2496-2497.
- Sallum, M. A. M.; Schultz, T. R.; Foster, P. G.; Aronstein, K.; Wirtz, R. A. & Wilkerson, R. C. (2002) - Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. **Syst. Entomol.**, **27**: 361-381.
- Sambroock, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) - Molecular

Cloning. A laboratory Manual, 2nd ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press.**

Scaff, L.M. & Galvão, S.S. (1968) – A Reinfestação do Pará pelo *Aedes aegypti*. Situação Atual. **Rev. Bras. Mal. Doenças Trop.** **21(3)**: 615-626.

Schatzmayr, H.G. (2000) - Dengue situation in Brazil by year 2000. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **95(1)**: 179 - 181.

Schneider, S.; Roessli, D. & Excoffier, L. (2000) – Arlequin ver. 2000. A software for population genetic data analysis. **Genetics and Biometry laboratory.** University of Geneva, Switzerland.

Schlotterer C. (2004) - The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nat. Rev. Genet.**, **5(1)**:63 - 69.

Schlotterer, C.; Hauser, M.T.; von Haeseler, A. & Tautz, D. (1994) - Nucleotide comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.**, **11**: 513-22.

Severini, C.; Silvestrini, F.; Mancini, P.; La Rosa, G. & Marinucci, M. (1996) - Nucleotide sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Insect Mol. Biol.**, **5**: 181-186.

Slatkin, M. & Hudson, R.R. (1991) – Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponential growing

- populations. **Genetics**, **129**: 555 – 562.
- Slosek, J. (1986) – *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. **Soc. Sci. Med.**, **23(3)**: 249-257.
- Smith, C.E.G. (1956) – The history of dengue in tropical Asia and its probable relations to the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Trop. Med. Hyg.**, **59**: 243-251.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1995) - Biometry. W.H. Freeman & Co., New York. 88 pps..
- de Souza, G.B.; Avilés, G. & Gardenal, C.N. (2000) – Allozymic polymorphism in *Aedes aegypti* populations from Argentina. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** **16(3)**: 206-209.
- SUCEN (2002). Div. de Orientação Técnica, relatório Interno. 43 pp.
- Swofford, D.L. (2002) – Paup*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4. Sunderland, Sinauer Associates.
- Swofford, D.L.; Olsen, G.J.; Waddell, P.J. & Hillis, D.M. (1996) - Phylogenetic inference. Pp. 407 515, in **Molecular Systematics** (D.M. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable, eds). Sinauer, Suderland, Massachusetts.
- Sunnucks, P. (2000) - Efficient genetic markers for population biology.

Trends Ecol. Evol.,15(5):199-203.

Tabachnick (1992) - Microgeographic and temporal genetic variation in populations of the bluetongue virus vector *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). **J. Med. Entomol., 29(3): 384-394.**

Tabachnick, W.J & Powell, J.R. (1978) – Genetic structure of the east African domestic populations of *Aedes aegypti*. **Nature 272(6): 535-537.**

Tabachnick, W.J & Powell, J.R. (1979) – A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Genet. Res. camb., 34: 215-229.**

Tabachnick, W.J.; Wallis, G.P.; Aitken, T.H.; Miller, B.R.; Amato, G.D.; Lorenz, L.; Powell, J.R. & Beaty, B.J. (1985) - Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations. **Am. J. Trop. Med. Hyg., 34(6): 1219-1224.**

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics, 123: 585-595.**

Takezaki, N; Rzhetsky, A. & Nei, M. (1995) - Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. **Mol Biol Evol 12(5):823-33.**

Templeton, A.R. (2001) – Inference key for the nested haplotype tree

analysis of geographical distances. http://inbio.byu.edu/Faculty/kac/crandall_lab/geodis.html

Templeton, A.R. (1998) – Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Mol. Ecol**, **7**: 381 – 397.

Templeton, A.R., Routman, E. & Phillips, C.A. (1995) - Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**, **140**(2): 767 - 782.

Templeton, A.R.; Boerwinkle, E. & Sing, C.F. (1987) – A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics**, **117**: 343 – 351.

Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997) - The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, **24**: 4876-4882.

Ureta-Vidal, A.; Ettwiller, L. & Birney, E. (2003) - Comparative genomics: genome-wide analysis in metazoan eukaryotes. **Nat Rev Genet.**, **4**(4):251 – 262.

- Walton, C.; Handley, J. M.; Kuvangkadilok, C.; Collins, F. H.; Harbach, R. E.; Baimai, V. & Butlin, R. K. (1999) - Identification of five species of the *Anopheles dirus* complex from Thailand, using allele-specific polymerase chain reaction. **Med. Vet. Entomol.**, **13**: 24-32.
- Walton, C.; Handley, J. M.; Tun-Lin, W.; Collins, F. H.; Harbach, R. E.; Baimai, V. & Butlin, R. K. (2000) - Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. **Mol. Biol. Evol.**, **17**: 962-974.
- Wesson, D.M.; Porter, C.H. & Collins, F.H. (1992) - Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Mol. Phylogenet Evol.**, **1(4)**:253-269.
- WHO, 2004 - <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/> acessado em 09/10/2004
- Wood, R.J. (1965) – A genetical study of DDT-resistance in the Trinidad strain of *Aedes aegypti* L. **Bull. World Health Organ.**, **32**: 563 - 574.
- Yang, Z., and Kumar, S. (1996) - Approximate methods for estimating the pattern of nucleotide substitution and the variation of substitution rates among sites. **Mol. Biol. Evol.** **13**: 650 - 659.
- YANG, Z.; GOLDMAN, N. & FRIDAY, A. E. (1994) - Comparison of models for nucleotide substitution used in maximum likelihood

phylogenetic estimation. **Mol. Biol. Evol.** **11**:316 - 324.

ANEXO

Anexo I - Alinhamento das seqüências do fragmento do gene *NADH4* em *Aedes aegypti* presentes neste estudo.

	
	10 20 30 40 50
haplot_A	TAAGGCTCAT GTAGAGCCC CTGTCTCAGG GTCTATAATT TTGGCAGGTG
haplot_B	A.....
haplot_C	
haplot_D	A.....
haplot_E	
haplot_F	
haplot_G	T.....
haplot_H	T.....
haplot_I	T.....
haplot_J	T.....
haplot_K	T.....
haplot_L	T.C.....
haplot_M	T.C.....
haplot_N	T.....
haplot_O	T.....
haplot_P	T.C.....
haplot_Q	
haplot_R	T.....
haplot_S	T.....
haplot_T	T.C.....
haplot_U	TC.....T.....

	
	60 70 80 90 100
haplot_A	TTTTATTAAA ATTAGGAGGG TATGGCTTAT TACGGGTATT TTCTTTAATG
haplot_B	
haplot_C	
haplot_D	
haplot_E	
haplot_F	
haplot_G	
haplot_H	
haplot_I	T.....
haplot_J	T.....
haplot_K	A.....T.....
haplot_L	T.....
haplot_M	T.....
haplot_N	T.....
haplot_O	T.....
haplot_P	T.....
haplot_Q	T.....
haplot_R	T.....
haplot_S	T.....
haplot_T	T.....
haplot_U	T.....

							
	110	120	130	140	150		
haplot_A	CAAGTTT	TTAG	GTATAAA	ATT	TAATTAT	ATT	TGAATTAGTA TTAGCTTAAT
haplot_B							
haplot_C							
haplot_D							
haplot_E							
haplot_F							
haplot_G							
haplot_H							
haplot_I							
haplot_J						C	T
haplot_K						C	T
haplot_L						C	T
haplot_M						C	T
haplot_N						C	T
haplot_O						C	T
haplot_P						C	T
haplot_Q						C	T
haplot_R			G			C	T
haplot_S			G			C	T
haplot_T			G			C	T
haplot_U						C	T

							
	160	170	180	190	200		
haplot_A	TGGGGG	GAGTT	TTAGTTAGTT	TAATTTGTTT	ATGACAAATA	GACTTAAAGG	
haplot_B							
haplot_C							
haplot_D							
haplot_E							
haplot_F	...A						
haplot_G	...A						
haplot_H	...A						
haplot_I	...A						
haplot_J	...A						T
haplot_K	...A						T
haplot_L	...A						T
haplot_M	...A						T
haplot_N	...A						T
haplot_O	...A						T
haplot_P	...A						T
haplot_Q	...A						T
haplot_R	...A						T
haplot_S	...A						T
haplot_T	...A						T
haplot_U	...A						T

							
	210	220	230	240	250		
haplot_A	CTTTAATTGC	TTATTCTTCG	GTTGCTCATA	TAGGGATCGT	ATTAAGAGGA		
haplot_B							
haplot_C							
haplot_D							
haplot_E							
haplot_F							
haplot_G							
haplot_H				T			
haplot_I				T			
haplot_J				T			
haplot_K				T			
haplot_L				T			
haplot_M				T			
haplot_N				T			
haplot_O		A		T			
haplot_P		A		T			
haplot_Q		A		T			
haplot_R				T			
haplot_S		A		T			
haplot_T				T			
haplot_U				T			

						
	260	270	280	290	300	
haplot_A	TTAATAACAA	TAACTTATTG	GGGATTAAAT	GGGTCGTATA	CTTTAATAAT	
haplot_B						
haplot_C						
haplot_D						
haplot_E				A		
haplot_F			C	A		
haplot_G			C	A		
haplot_H				A	C	
haplot_I				A		
haplot_J		A		A		
haplot_K		A		A		
haplot_L		A		A		
haplot_M		A		A		
haplot_N		A	T	A		
haplot_O		A	T	A		
haplot_P		A	T	A		
haplot_Q		A	T	A		
haplot_R		A	T	A		
haplot_S		A	T	A		
haplot_T		A	T	A		
haplot_U		A		A		

	
	310 320 330 340 350
haplot_A	TGCTCATGGG TTATGTTCTT CTGGGTTATT TTGTTTGGCT AATATTTCTT
haplot_B	
haplot_C	C.....
haplot_D	
haplot_E	
haplot_F	
haplot_G	
haplot_H	
haplot_I	
haplot_J	C.....
haplot_K	C.....
haplot_L	C.....
haplot_M	
haplot_N	C.....
haplot_O	C.....
haplot_P	C.....
haplot_Q	C.....
haplot_R	C.....
haplot_S	C.....
haplot_T	C.....
haplot_U	

	
	360
haplot_A	ATGAACGACT A
haplot_B	
haplot_C	
haplot_D	
haplot_E	
haplot_F	
haplot_G	
haplot_H	
haplot_I	
haplot_J	
haplot_K	
haplot_L	
haplot_M	
haplot_N	
haplot_O	
haplot_P	
haplot_Q	
haplot_R	
haplot_S	
haplot_T	
haplot_U	