



CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Paulo Bryguel da Cunha

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Aedes aegypti* EM POPULAÇÕES DO NORDESTE
BRASILEIRO ATRAVÉS DE GENE MITOCONDRIAL**

SÃO LUÍS – MA

2016

Paulo Bryguel da Cunha

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Aedes aegypti* EM POPULAÇÕES DO NORDESTE
BRASILEIRO ATRAVÉS DE GENE MITOCONDRIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração: Conservação e Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudene Barros – CESC/UEMA

Co-orientador: Prof. Dr. Elmary Fraga – CESC/UEMA

SÃO LUÍS – MA

2016

C972v Cunha, Paulo Bryguel da

Variabilidade genética de *Aedes aegypti* em populações do nordeste brasileiro através de gene mitocondrial / Paulo Bryguel da Cunha. __Caxias-MA: CESC/UEMA, 2016.

45f.

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Claudene Barros.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Superiores de Caxias, Curso de Mestrado em Ciência Animal.

Paulo Bryguel da Cunha

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Aedes aegypti* EM POPULAÇÕES DO NORDESTE
BRASILEIRO ATRAVÉS DE GENE MITOCONDRIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração: Conservação e Reprodução Animal.

APROVADO EM: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Claudene Barros – Orientadora
Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA

Profa. Dra. Ligia Tchaicka – Membro
Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual do Maranhão – CCN/UEMA

Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta
Doutorado em Ciência Animal
Universidade Estadual do Maranhão - CCA/UEMA

São Luís - MA

2016

Amor e carinho, em especial aos meus queridos pais: Luzinete Vieira da Cunha e Paulo Afonso Silva e minha irmã Martina Navratinova Cunha ao Meu sobrinho Pedro Lucas da Cunha Silva que incondicionalmente sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo que tem concedido em minha vida, por todas as batalhas que consegui vencer;

A Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal, ao corpo docente pelos ensinamentos;

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudos concedida.

Aos Centros de Controle de Zoonozes dos municípios pelo apoio e aos agentes de endemias;

À Prof^a. Dra. Maria Claude Barros (CESC/UEMA) pela orientação, confiança e oportunidade, o que tornou possível a realização desse trabalho;

Ao Prof^o. Dr. Elmary Costa Fraga (CESC/UEMA) pela relevante contribuição para a realização deste trabalho, ensinamentos e discussões que me fizeram crescer;

Aos meus pais, pelos ensinamentos, amor, carinho e compreensão, à minha família (irmãos, tios e primos) pelo apoio e principalmente pela base familiar que sempre foi muito importante e me deu forças para sempre alcançar meus objetivos;

As mestras Andreлина Alves de Sousa; Maria Histelle do Nascimento e a doutoranda Luana Luz dos Reis por todo o incentivo ao longo desta jornada;

A todos os meus amigos de laboratório pelo companheirismo e principalmente pela paciência do convívio do dia-a-dia especialmente (Sulamita, A“DRIANA”, Marcelo Almeida, Márcia, Walna, Priscila, Samira, Daiane, Deborah, Marcelo Ventura, Aryel, Bruno, Daniel, Fábio e Renato);

Aos colegas da turma 2014/2016 do mestrado, em especial a (Thayane, Almerinda, Karol, Luciana, Itala, Emerson) e a toda sala da Justiça;

Aos meus amigos particulares por todos os momentos que passamos juntos e pelo apoio em momentos difíceis em especial (Leticianne, Helton, Lucivaldo, Jucimar (Juca), Carlos, Auricélia, Aylane, Katiane e Rachel (Kell)).

A Dona Jesuslene, seu Cícero, ao David e Lidianne pelo apoio dado.

A Juciane e Darlyson, pelo grande apoio, convívio e paciência no dia a dia no ano em que passamos juntos dividindo o mesmo teto e pela grande amizade de longa data.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

Aedes (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) é o principal vetor do vírus da febre amarela, Chikungunya, Zika Vírus e dos quatro sorotipos do vírus da dengue. O *Ae. aegypti* hoje é considerado cosmopolita e um vetor de grande importância epidemiológica. Neste estudo objetivou-se caracterizar através de marcador molecular o *Aedes aegypti*, bem como, estimar a variabilidade genética de suas populações provenientes da região Nordeste do Brasil a fim de inferir sobre a dinâmica populacional desse vetor. Amostras foram obtidas em cinco estados da região Nordeste (Maranhão; Piauí; Rio Grande do Norte e Paraíba e Sergipe) na forma de larvas, pupa e ovos, este material foi transportado ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA, onde foi processado e realizado a extração de DNA, amplificação gênica via PCR e sequenciamento do gene NADH4. Os dados foram analisados pelos softwares: BioEdit 7.0.5.2, DNASp 4.0, MEGA 6.0, NETWORK, 4.5.1.0 ALERQUIN 3.01, ALLELES IN SPACE. Para o gene NADH4 foram sequenciados 124 espécimes distribuídos entre oito populações da região Nordeste, onde obteve-se um fragmento de 338 pb, sendo 319 conservados, 19 variáveis, 17 filogeneticamente informativos para parcimônia, 21 haplótipos, diversidades haplotípicas e nucleotídicas de $h=0,768$ e $\pi=0,01750$ respectivamente. Os testes de neutralidade de D e F_s não foram significativos, considerando todas as populações agrupadas ou populações isoladas, com $P > 0,05$. Dos 21 haplótipos o mais frequente foi o H1 encontrado em Caxias, Humberto de Campos, Parnaíba, Natal, João Pessoa, Teresina e Aracaju seguido pelo H2 compartilhado em Caxias, Teresina, Parnaíba, Maracaçumé, Natal e João Pessoa e H18 frequente apenas em Natal e Aracaju, haplótipos exclusivos foram observados nas populações de Caxias, Teresina, Parnaíba Humberto de Campos e Natal. A matriz de distância genética mostrou uma variação de 0 à 3% e a análise filogenética revelou dois clados. O resultado da AMOVA revelou um F_{ST} com P significativo ($p < 0,000$). Os valores de F_{ST} par a par variaram de -0.04051(Parnaíba/Caxias) a 0.93670 (Aracaju/Maracaçumé) com P significativo ($p < 0,05$). A magnitude das diversidades e divergência genéticas e a análise filogenética somada ao resultado da AMOVA e correlação genética e geográfica apontam para uma redução do fluxo gênico entre as populações com consequente indício de estruturação populacional e consistência da presença de diferentes linhagens de *Ae. aegypti* na região nordeste.

Palavras chaves: NADH4, População, Nordeste.

ABSTRACT

Aedes (Stegomyia) *aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) is the main vector of the yellow fever virus, Chikungunya, Zika virus and of the four serotypes of the dengue virus. Today *Ae. aegypti* is considered cosmopolitan and a vector of great epidemiologic importance. This study aimed to characterize through molecular marker the *Ae. aegypti*, as well as to estimate the genetic variability of their populations from the Northeast region of Brazil in order to infer about the population dynamics of this vector. Samples were obtained in five states of the Northeast region (Maranhão; Piauí; Rio Grande do Norte, Paraíba and Sergipe) in the form of larvae, pupae and eggs, this material was transported to the Laboratório de Genética e Biologia Molecular of the Centro de Estudos Superiores de Caxias of Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA, where was processed and performed the DNA extraction, gene amplification by PCR and sequencing of NADH4 gene. The data were analyzed by software: BioEdit 7.0.5.2, DNASp 4.0, MEGA 6.0, NETWORK, 4.5.1.0, ALERQUIN 3.01, ALLELES IN SPACE. For the NADH4 gene, were sequenced 124 specimens distributed between eight populations of the Northeast region, where it was obtained a fragment of 338 pb, being 319 preserved, 19 variables, 17 phylogenetically informative for parsimony, 21 haplotypes, haplotype and nucleotide diversity of $h=0.768$ and $\pi=0.01750$ respectively. The tests of neutrality of D and Fs were not significant, considering all grouped populations or isolated populations, with $P > 0.05$. Of the 21 haplotypes, the most frequent was the H1 found in Caxias, Humberto Campos, Parnaíba, Natal, João Pessoa, Teresina and Aracaju followed by H2 shared in Caxias, Teresina, Parnaíba, Maracaçumé, Natal and João Pessoa and H18 frequent only in Natal and Aracaju, exclusive haplotypes were observed in populations of Caxias, Teresina, Parnaíba, Humberto Campos and Natal. The genetic distance matrix showed a variation of 0 to 3% and the phylogenetic analysis revealed two clades. The result of the AMOVA revealed an F_{ST} =with significant P ($p < 0.000$). The F_{ST} values pair to pair varied from -0.04051 (Parnaíba/Caxias) to 0.93670 (Aracaju/Maracaçumé) with significant P ($p < 0.05$). The magnitude of the diversities and genetic divergences and the phylogenetic analysis added to the results of AMOVA and genetic and geographical correlation point to a reduction of gene flow among the populations with consequent indication of population structuring and consistency of the presence of different lineages of *Ae. aegypti* in the Northeast region.

Keywords: NADH4, Population, Northeast.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fases de vida do *Aedes aegypti*: (A) ovos; (B) larva; (C) pupa; (D) adulto. 13
- Figura 2.** Localização das áreas de estudo. 18
- Figura 3.** Rede de haplótipos com base no gene mitocondrial NDH4 para populações de *Ae. aegypti* da região Nordeste 23
- Figura 4.** Correlação de Distância Genética e Geográfica para as populações de *Ae. aegypti* da Região Nordeste baseada no Teste de Mantel. 25
- Figura 5.** Dendograma de Agrupamento de vizinho, algoritmo Tamura Nei, com base no gene mitocondrial NDH4, observado entre os 21 haplótipos de *Ae. aegypti* dos estados da região Nordeste. Os valores dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap*. ARA=Aracajú/SE; PNB=Parnaíba/PI; NT=Natal/RN; HC=Humberto de Campos/MA; CX=Caxias/MA; THE=Teresina/PI; JP=João Pessoa/PB; MCM=Maracaçumé/MA. 26
- Figura 6.** Dendograma de Agrupamento de vizinho, algoritmo Tamura Nei com base no gene mitocondrial NDH4 observado entre haplótipos de *Ae. Aegypti*. Os valores dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap*. ARA=Aracajú/SE; PNB=Parnaíba/PI; NT=Natal/RN; HC=Humberto de Campos/MA; CX=Caxias/MA; THE=Teresina/PI; JP=João Pessoa/PB; MCM=Maracaçumé/MA, AAA=África, América e Ásia. 27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Diversidade genética com base no gene mitocondrial NDH4 nos espécimes de *Ae. aegypti* da Região Nordeste. 21
- Tabela 2.** Haplótipos de *Ae. aegypti* com suas respectivas frequências e localidades de coleta com base no gene mitocondrial NDH4. 22
- Tabela 3.** Matriz de distância genética com base no gene mitocondrial NDH4 para as populações de *Ae. aegypti* para os estados da região nordeste. 24
- Tabela 4.** Análise molecular de variância (AMOVA) com base no gene mitocondrial NDH4 nas populações de *Ae. aegypti* para a região Nordeste, Brasil. 24
- Tabela 5.** Comparações dos valores de F_{ST} para par, com base no gene mitocondrial NDH4, entre as populações de *Ae. aegypti* com base no gene NDH4. 25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. <i>Aedes aegypti</i>	12
1.2. Dengue, Chikungunya e ZikaVírus	13
1.2.1. Dengue	13
1.2.2. Chikungunya	14
1.2.3. Zika Vírus	14
1.3. Controle Vetorial	15
1.4. DNA mitocondrial como marcador molecular	15
1.5. Estudos moleculares com <i>Aedes aegypti</i>	16
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Procedência e Obtenção das Amostras	18
3.2. Técnicas Moleculares (Extração, Amplificação do gene e Sequenciamento)	19
3.3. Análise de Dados	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Frequência dos haplótipos e Testes de Neutralidade	20
4.2. Diversidade genética	23
4.3. Análise de Variância Molecular (AMOVA)	24
4.4. Filogenia dos Haplótipos	26
5. DISCUSSÃO	28
5.1. Frequência e Distribuição dos haplótipos e Testes de Neutralidade	28
5.2. Análise de variância molecular (AMOVA)	30
5.3. Filogenia dos haplótipos	30
6. CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é o principal vetor da dengue no Brasil e nas Américas. Este mosquito pertence à ordem Diptera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, subgênero Stegomyia, gênero *Aedes* (Meigen, 1818), espécie *Aedes aegypti*. Os adultos possuem o corpo enegrecido com manchas, ou seja, escamas claras geralmente branco-prateadas, que se prolongam até o escutelo formando um desenho que lembra à forma de uma “lira” (CONSOLI e LOURENÇO-de-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

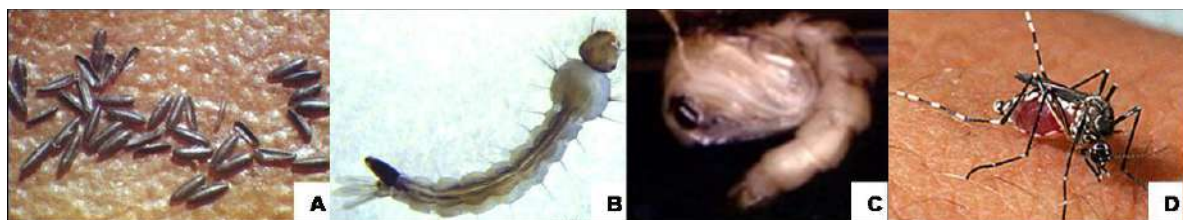
Este vetor é oriundo do velho Mundo e hoje é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais, compreendidas principalmente entre os paralelos (latitudes) 45°N e 35°S ou mesmo fora desses limites, mas dentro das zonas isotermais de 20°C (BRASIL, 2001). A chegada desta espécie pelo Novo Mundo se deu provavelmente durante as grandes navegações com o comércio de especiarias e escravos entre os séculos XVI a XVIII (PAUPY et al., 2012). O vetor tem um aspecto histórico de expansão por todos os continentes muito bem sucedida, a evolução dos traços anteriormente silvestres para o urbano tornou a espécie bem adaptada ao ambiente doméstico e com estreita associação aos humanos (SEIXAS et al., 2013).

O *Ae. aegypti* apresenta desenvolvimento completo, sendo que seu ciclo biológico compreende as seguintes fases: ovos, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 1). Seu ciclo de vida é curto, variando de 8 a 12 dias em regiões tropicais. Os adultos são essencialmente urbanos, as fêmeas são antropofílicas, após o ato de acasalamento realizam o repasto sanguíneo, preferencialmente em humanos, o que é necessário para maturação de seus ovos. Posteriormente, as fêmeas repousam e ao final da digestão procuram recipientes com água para oviposição. Os ovos são depositados isoladamente nas paredes internas de recipientes artificiais como: tonéis, caixas d’água, descartáveis, vasos, pneus, e outros depósitos. Como o mosquito passou a ter um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico tornou-se a espécie de Culicídeo mais associada ao ser humano, um fator determinante para a ocorrência de epidemias transmitidas pelo vetor (CONSOLI e LOURENÇO-de-OLIVEIRA 1994, TAUIL 2002, PINHEIRO e TADEI 2002, PINHEIRO 2005, FRAGA et al., 2013; GLORIA-SORIA et al., 2014).

As condições de clima junto a fatores como: facilidade de reprodução, desenvolvimento dos meios de transporte; grande oferta de recipientes artificiais com água, aumento do uso de descartáveis, concentração populacional em médias e grandes cidades,

problemas de abastecimento de água aliados à capacidade de resistência dos ovos a dessecação, contribuem de forma positiva a sobrevivência do *Ae. aegypti* no Brasil, sendo que atualmente encontra-se espalhado em todas as unidades federadas do país (TAUIL, 2002; PINHEIRO, 2005; BRASIL, 2010, SOARES-DA-SILVA, 2015).

Figura 1. Fases de vida do *Aedes aegypti*: (A) ovos; (B) larva; (C) pupa; (D) adulto.



Fonte: NOCHT, B. (ovos); RUSSEL, R. C. (larva); STICH, A. (pupa); VIEIRA, G. J. (adulto). Fiocruz 2015

1.2 Dengue, Chikungunya e Zika Vírus

1.2.1 Dengue

A dengue é considerada a doença de transmissão vetorial com o maior crescimento no mundo (GUBLER, 2002; BRASIL, 2008). A Organização Mundial de Saúde – OMS, estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas anualmente (WHO, 2013). É endêmica em mais de 100 países na África, nas Américas, no Leste do Mediterrâneo, no Sul e Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico (SAMPAIO, 2010).

É uma doença aguda, sistêmica e de etiologia viral, ocasionada por quatro sorotipos do dengue, do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (MONATH 1996, FIGUEIREDO 2000 e ICTV 2008). É transmitida por mosquitos do Gênero *Aedes* – *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (MARZOCHI 1994, BURKOT et al., 2007).

Nas Américas, a principal espécie incriminada na transmissão da dengue é o *Ae. aegypti* (Diptera, Culicidae) (Linnaeus, 1762). A expansão das áreas de ocorrência do dengue no Brasil e no mundo está associada com a dispersão desse vetor, o que por sua vez é favorecido tanto pela urbanização sem a devida estrutura de saneamento, quanto à globalização da economia. Tais fatores contribuem não só para a dispersão ativa do mosquito como também para a disseminação dos quatro sorotipos da doença (CONSOLI e LOURENÇO-de-OLIVEIRA 1994, TAUIL 2002, TEXEIRA et al., 2009).

Em 2015, foram registrados 1.649.008 casos prováveis de dengue no país – casos notificados, incluindo todas as classificações, exceto descartados – até a semana epidemiológica (SE) 52 (04/01/2015 a 02/01/2016). Nesse período, a região Sudeste registrou

o maior número de casos prováveis (1.026.226 casos; 62,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro- Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%). Foram descartados 600.432 casos suspeitos de dengue no período (BRASIL, 2016).

1.2.2 Chikungunya

A febre de chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), do gênero *Alphavirus* e família *Togaviridae*. A viremia persiste por até dez dias após o surgimento das manifestações clínicas. A transmissão ocorre pela picada de fêmeas dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* infectadas pelo CHIKV. Casos de transmissão vertical podem ocorrer quase que, exclusivamente, durante o período de intraparto em gestantes virêmicas e, muitas vezes, provoca infecção neonatal grave. Pode ocorrer transmissão por via transfusional, todavia é rara se os protocolos forem observados (WEAVER, 2014).

A partir de 2004, foi observada a disseminação, de forma sistemática e contínua, do vírus Chikungunya (CHIKV) por vários continentes e, muito provavelmente, o transporte aéreo de passageiros contribuiu de forma significativa para a dispersão viral, em uma situação semelhante a que ocorreu com o Dengue (NUNES, 2014).

Ultimamente tem sido registrada a ocorrência da febre chikungunya no Brasil e ainda, de acordo com o Ministério da Saúde em 2015, até a semana 52, foram notificados 20.661 casos autóctones suspeitos de febre de chikungunya. Destes, 7.823 foram confirmados, sendo 560 por critério laboratorial e 7.263 por critério clínico-epidemiológico; 10.420 continuam em investigação. Foram registrados três óbitos por febre de chikungunya no Brasil na região Nordeste, sendo dois no estado da Bahia e um em Sergipe (BRASIL, 2016).

1.2.3 Zika Vírus

O vírus Zika é um flavivírus (família *Flaviviridae*) transmitido por *Ae. aegypti* e que foi originalmente isolado de uma fêmea de macaco *Rhesus* febril na Floresta Zika (daí o nome do vírus), localizada próximo de Entebbe na Uganda, em 20 de abril de 1947 (KARABATSOS, 1985). Esse vírus causa doença febril, acompanhada por discreta ocorrência de outros sintomas gerais, tais como cefaleia, exantema, mal estar, edema e dores articulares, por vezes intensas. No entanto, apesar da aparente benignidade da doença, mais recentemente na Polinésia Francesa e no Brasil, quadros mais severos, incluindo comprometimento do sistema nervoso central (síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa e meningite),

associados ao Zika têm sido comumente registrados, o que mostra quão pouco conhecida ainda é essa doença. (OEHLER, 2014; CAMPOS, 2015; ZANLUCA, 2015).

A possibilidade de o vírus Zika ser transmitido por sangue e hemoderivados levanta a questão da inclusão dessa e outras arboviroses na triagem de doadores de sangue, no entanto essa doença ainda não dispõe de kits comerciais para diagnóstico laboratorial; nem será menos oneroso o desenvolvimento de métodos moleculares para detecção do Zika, seja em banco de sangue, seja em laboratórios de saúde pública (VASCONCELOS, 2014).

Foi confirmada transmissão autóctone de febre pelo vírus Zika no país a partir de abril de 2015. Até a semana 52, 19 Unidades da Federação confirmaram laboratorialmente autoctonia da doença (BRASIL 2016).

1.3 Controle Vetorial

No Brasil, desde a década de 20, o controle da dengue é realizado pela eliminação dos estágios imaturos (larvas) de *Ae. aegypti* por meio da eliminação dos criadouros ou da utilização do larvicida químico (CAMARGO et al., 1998, OLIVEIRA 1998, RÊBELO et al., 1999, CARVALHO et al., 2004) como os produtos com princípios ativos organoclorados, organofosforados e mais recentemente piretróides. Os inseticidas químicos apresentam desvantagens e restrições de uso bem conhecidas: são tóxicos ao homem, causam desequilíbrio nos ecossistemas em que são utilizados, por atuarem em insetos benéficos, e quando são intensivamente utilizados podem promover o desenvolvimento de populações de mosquitos resistentes ao inseticida (VILARINHOS et al., 1998, BRAGA e VALLE 2007, QUIMBAYO et al., 2014).

A tendência atual é de restringir o uso de inseticidas químicos e em substituição, incentiva-se o uso de controle biológico e o manejo ambiental (ALVES 1998, POLANCZYK et al 2003, PAMPLONA et al., 2004, GUO et al., 2015). As bactérias entomopatogênicas formadoras de esporos possuem um grande potencial para o controle biológico de insetos. A presença de esporos lhe confere resistência às condições adversas ambientais, conferindo-as facilidade de produção em larga escala industrial (HABIB e ANDRADE 1998, POLANCZYK et al., 2003).

1.4 DNA mitocondrial como marcador molecular

Com grande potencial de promover energia dentro da célula a mitocôndria está presente na quase totalidade das células eucarióticas possuindo um genoma extra cromossomal de hereditariedade materna (BLUTER, 2010). O DNA mitocondrial (DNAm) está

dos animais é constituído de uma molécula circular, de fita dupla, onde são descritos 37 genes dos quais dois codificam RNAs ribossômicos, 13 codificam polipeptídeos relacionados com a fosforilação oxidativa e 22 codificam a formação dos RNAs transportadores (MATIOLI, 2001). Seu tamanho é de aproximadamente 16.000 pares de bases, porém muito importante para o metabolismo celular (LANG et al., 1999; BOORE, 1999).

De acordo com Avise *et al.* (1984) o DNA mitocondrial é um ótimo marcador molecular devido à facilidade em isolá-lo, possuir um grande número de cópias por célula, ter tamanho pequeno e organização simples. É amplamente usado em estudos que envolvam fluxo gênico em vários organismos, pois apresenta alta taxa de evolução, estimada em mais ou menos dez vezes maior do que o genoma nuclear, e por não possuir mecanismos de reparos na molécula de DNA mitocondrial facilita o acúmulo de mutações, tornando-o uma ferramenta muito utilizada em estudos de populações de insetos (BROWER, 1994; BIRUNGI e MUNSTERMANN, 2002; DE BRITO et al., 2002; AVISE, 2004; MOUSSON et al., 2005)

Em estudos com insetos, o gene codificador da desidrogenase subunidade 4 (NADH 4) tem sido amplamente usado para caracterização molecular, estudo de variabilidade genética e estruturação populacional (COSTA-DA-SILVA et al., 2005; HERRERA et al., 2006; BRACCO et al., 2007; LIMA JÚNIOR 2007; OBANDO, 2015). Este gene acumula rapidamente as substituições de bases nucleotídicas e por ser um gene altamente polimórfico tem possibilitado aos pesquisadores inferir à ocorrência de diferentes linhagens mitocondriais, quanto à filogeografia e quanto à variabilidade genética de populações de *Ae. aegypti*. Em função da grande suscetibilidade do vetor estudos utilizando regiões do DNA mitocondrial vem enfatizando aspectos relevantes da diferenciação genética para espécies do gênero *Aedes* (HIRAGI et al., 2009; TWERDOCHLIB et al., 2012; PAUPY et al., 2012; FRAGA et al., 2013).

1.5 Estudos moleculares com *Aedes aegypti*

O gênero *Aedes* desperta grande interesse epidemiológico, quer seja pela sua condição refratária ao vírus na natureza, como também devido ao seu potencial como vetor. Para o sucesso no seu controle biológico é importante conhecer a estrutura genética e os mecanismos que resultaram na diversidade das populações (PATARRO et al., 2013).

A padronização de protocolos moleculares que utilizam sequências de DNA tornou possível o conhecimento da estrutura genética das populações de vários insetos tanto ao nível intra como interespecíficos, bem como, identificar as espécies crípticas que são muito comuns neste grupo. Estudos recentes mostraram que existem diferenças tanto na suscetibilidade aos

inseticidas utilizados no controle como para os diferentes sorotipos do vírus (MACORIS et al., 2003; BRAGA e VALLE, 2007; MACORIS et al., 2007; SOARES-da-SILVA, 2011; OBANDO, 2013).

Estudos que tratem da variabilidade e conhecimento da estrutura genética das populações do *Ae. aegypti* na região Nordeste do Brasil são ainda incipientes. A constante presença desse vetor, bem como, a circulação dos quatro tipos do vírus da doença em todas as regiões do país representa um risco potencial para ocorrência de epidemias da dengue que mostra a necessidade de estudos que nos permita inferir sobre a estrutura populacional deste vetor. Considerando a importância epidemiológica do *Ae. aegypti* como transmissor dos vírus da febre amarela, dengue, febre hemorrágica do dengue, Chikungunya e Zika vírus, conhecer a variabilidade genética e a dinâmica populacional poderá abrir novas perspectivas de estudos no que se refere a sua importância como agente transmissor dessas doenças. Os elevados índices populacionais do mosquito *Ae. aegypti* na região Nordeste do Brasil revelam a necessidade de um estudo que trate da variabilidade e estrutura genética dessas populações, revelando dados sobre a dinâmica dessas populações, e assim, subsidiar informações para programas de controle do vetor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização molecular do *Aedes aegypti*, bem como estimar a variabilidade genética de suas populações provenientes da região Nordeste do Brasil, com base em sequências do DNA mitocondrial, a fim de inferir sobre a dinâmica populacional desse vetor de grande importância epidemiológica.

2.2 Objetivos Específicos

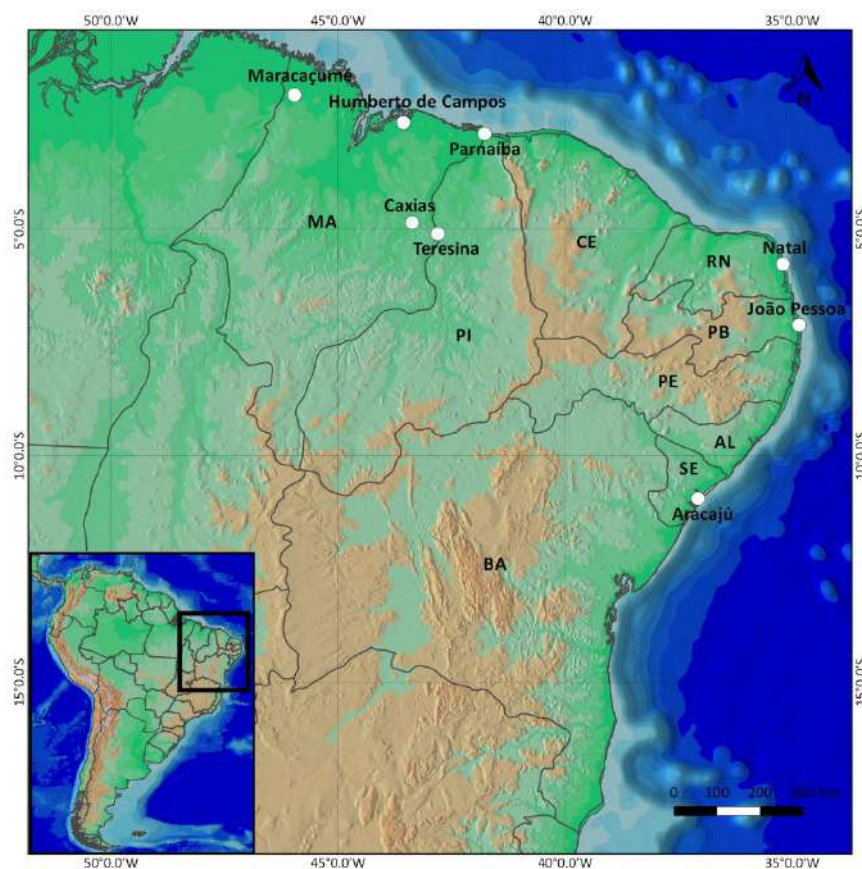
- Caracterizar geneticamente as populações de *Ae. aegypti* da região Nordeste do Brasil através do DNA mitocondrial;
- Estimar a frequência dos haplótipos mitocondriais nas populações;
- Determinar o nível de variabilidade e diferenciação genética intrapopulacional e interpopulacional de *Ae. aegypti*;
- Inferir sobre a dinâmica populacional do *Ae. aegypti* na região Nordeste do Brasil.
- Subsidiar informações para programas de controle do vetor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência e Obtenção das Amostras

A região Nordeste é formada pelos estados de Alagoas (AL), Bahia (BA), Ceará (CE), Maranhão (MA), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Rio Grande do Norte (RN) e Sergipe (SE) (Figura 2). Possui extensão territorial de 1.554.291,744 Km², com população estimada em 56.560.081 habitantes (IBGE, 2015).

Figura 2. Localização das áreas de estudo.



Fonte: Modificado por LIMEIRA FILHO (2015). Criado com o programa Quantum GIS 2.6

As amostras foram provenientes de municípios dos estados do MA (Caxias, Maracáumé e Humberto de Campos), PI (Parnaíba e Teresina), PB (João Pessoa), SE (Aracaju) e RN (Natal). Foram realizadas coletas em Pontos estratégicos (PEs): oficinas mecânicas, borracharias e também no peridomicílio de residências sempre com auxílio de um agente de endemias cedido pelos Centros de Zoonoses dos municípios onde foram obtidas amostras nos estágios de larvas, pupa e ovos. Os ovos foram obtidos com armadilhas para ovos (APO), as mesmas foram instaladas e permaneciam por cerca de cinco dias nas residências onde posteriormente eram retiradas (REITER et al, 1995).

O material coletado foi transportado para Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA (GENBIMOL). Os ovos foram colocados em água para eclodir e as larvas alimentadas até o 4º estágio. Todo material biológico coletado foi identificado através de chave taxonômica de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Após identificação os espécimes foram acondicionados em microtubos, etiquetados e congelado em um freezer a -80° C para aplicação das técnicas moleculares.

3.2 Técnicas Moleculares (Extração, Amplificação do gene e Sequenciamento).

O DNA total foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification da PROMEGA seguindo as instruções do fabricante, sendo que o protocolo foi adaptado para microtubos de 1,5 ml, o protocolo com os procedimentos realizados segue em anexo.

Para o isolamento do gene mitocondrial NADH4 a partir de um conjunto de DNA total empregou-se a técnica de PCR seguindo o protocolo de Schuelke (2000), usando iniciadores específicos publicados por Costa-da-Silva et al.(2005) que consiste das seguintes sequências:

Forward: 5' – NADH4L 5' – ATTGCCTAAGGCTCATGTAG – 3'

Reverse: 5' – NADH4H 5' - TCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT – 3'

A descrição da técnica segue em anexo juntamente com o protocolo adotado.

Os produtos da PCR foram purificados com a enzima “ExoSap-IT” (USB Corporation) conforme recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA usando-se o método didesoxiterminal (SANGER et al., 1977), realizada com o Kit “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction”(Applied Biosystems).

3.3 Análise dos Dados

As sequências foram editadas e alinhadas através do programa BIOEDIT, versão 7.0.5.2, (HALL, 1999). Estimou-se a composição nucleotídica, o número de sítios informativos, as árvores filogenéticas e matriz de distância pelo programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Número de haplótipos, diversidades haplotípicas e nucleotídicas foram obtidos pelo DNAsp versão 4.0 (ROZAS et al., 2006). A rede de haplótipos através do NETWORK 4.5.1.0 (BANDELT et al.,2008). Para inferir quanto à neutralidade seletiva em populações naturais foram utilizados os testes de *D* (TAJIMA, 1989) e *F_s* (FU, 1997). Para verificar a existência de populações diferenciadas e avaliar o grau de significância da variabilidade genética interpopulacional e intrapopulacional foram realizadas a análise de variância molecular através do programa ARLEQUIN, versão 3.01 (EXCOFFIER et al.,

2006). O isolamento genético por distancia geográfica foi testado mediante metodologia testada por Mantel (1967) que é uma estatística geral que testa a significância da correlação entre uma matriz de distancia genética e uma matriz de distancia geográfica, a hipótese de isolamento por distancia foi testada com o auxílio do programa ALLELES IN SPACE (MILLER, 2005).

Foram incluídas 20 sequências haplotípicas do gene NADH4 provenientes do genbank ao nosso banco de dados a fim de confirmar a presença ou ausência de Numts (Anexo). *Ae. albopictus* (EF153761) e *Anopheles marajoara* (AY846350.1) foram utilizadas como grupo externo (*outgroup*).

4. RESULTADOS

4.1 Frequência dos haplótipos e Testes de Neutralidade

Um fragmento de 338 pares de bases (pb) do gene Desidrogenase Subunidade IV (NADH4) do DNA mitocondrial foi sequenciado para 124 espécimes de *Ae. Aegypti* de oito populações provenientes dos estados do Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe. Dos 338pb, 319 foram conservados, 19 variáveis e 17 foram filogeneticamente informativos para parcimônia. A análise apresentou 21 haplótipos, a diversidade haplotípica observada foi de 0,768 e nucleotídica de 0,01750. As maiores diversidades haplotípica ocorreram para as populações de Teresina (0,830), Natal (0,771) e Parnaíba (0,742) respectivamente. Os menores índices de diversidade haplotípica foram constatados nas populações de Aracajú (0,286), Humberto de Campos (0,298), João Pessoa (0,407). As populações com maiores diversidade nucleotídicas foram Parnaíba (0,01838), Caxias (0,01309) e João Pessoa (0,01252), as menores foram constatadas nas populações de Aracajú (0,00085), Humberto de Campos (0,00152) e Maracaçumé (0,00273). Os testes de neutralidade de D e *F_s* não foram significativos, considerando todas as populações agrupadas ou populações isoladas, com $P > 0,05$, indicando que o polimorfismo está de acordo com o modelo neutro de mutações (Tabela 1).

Tabela 1. Diversidade genética com base no gene mitocondrial NDH4 nos espécimes de *Ae. aegypti* da Região Nordeste.

Populações	N	NH	S	<i>h</i>	π	D de Tajima	FS de Fu
Caxias – MA	12	4	12	0,561	0,01309	0,47634	3,208
Humberto de Campos – MA	19	4	4	0,298	0,00152	-1,62049	-1,550
Maracaçumé – MA	13	2	2	0,462	0,00273	1,21425	2,300
Teresina – PI	18	8	16	0,830	0,01466	0,24826	0,401
Parnaíba – PI	12	5	14	0,742	0,01838	1,90002	2,896
João Pessoa – PB	25	3	12	0,407	0,01252	1,12840	7,519
Natal – RN	18	7	13	0,771	0,00920	-0,65969	-0,129
Aracajú- SE	7	2	1	0,286	0,00085	-1,00623	-0,095
Populações agrupadas	124	21	19	0,768	0,01750	1,90002	-0,825

N = número amostral; NH= número de haplótipos; S= sítios polimórficos; *h*= diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica.

Dos 21 haplótipos os mais frequentes foram o H1 encontrado em Caxias, Humberto de Campos, Parnaíba, Natal, João Pessoa; Teresina e Aracaju; H2 em Caxias, Teresina, Parnaíba, Maracaçumé, Natal e João Pessoa; H3 frequente em apenas Caxias e Natal; H5 em Maracaçumé e João Pessoa e H18 em Natal e Aracajú; haplótipos exclusivos foram observados nas populações de Caxias, Teresina, Parnaíba, Humberto de Campos e Natal (Tabela 2). Os índices de polimorfismo também são mostrados nesta tabela. A substituição (AG: nt 21) foi observada e exclusiva nos haplótipos H10 e H12 que caracterizam haplótipos únicos para as populações de Parnaíba e Teresina. A substituição (CT: nt 42) caracteriza os haplótipos únicos em cada população, mas compartilhados pelas populações de Caxias, Teresina, Parnaíba, Maracaçumé, João Pessoa, Humberto de Campos e Natal (H2, H4, H5, H6, H10, H11, H12 e H20). (TA nt 148) caracteriza os haplótipos únicos de Teresina (H14, H15, H16 e H17).

Tabela 2. Haplótipos de *Ae. aegypti* com suas respectivas frequências e localidades de coleta com base no gene mitocondrial NDH4.

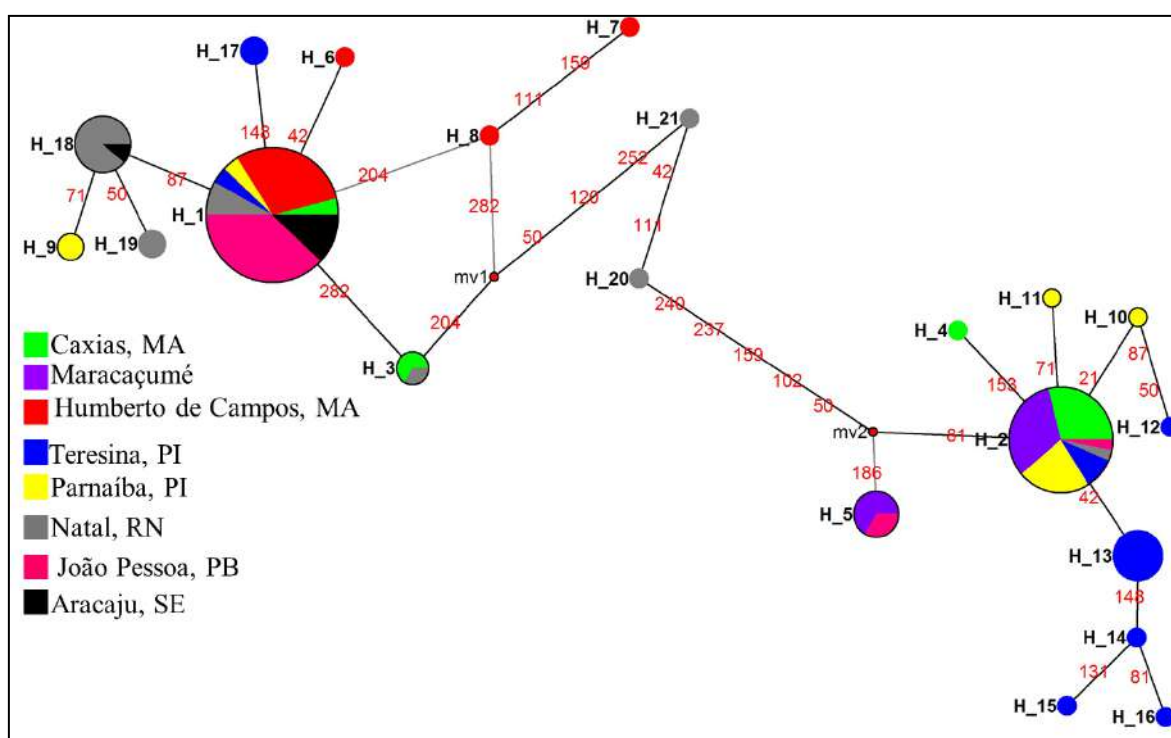
NH	Sítios polimórficos	Freq.	População
	1111111122222 2457880123455803458 1201172101839647022		
H1	ACGTATTCGTTACGCGAGT	50	CAX/MA; H. CAMPOS/MA; PNB/PI; NTL/RN; JP/PB; THE/PI e ARA/SE
H2	.T..G.CTA...T.TATAC	31	CAX/MA, THE/PI, PNB/PI, MCM/MA, NTL/RN e JP/PB
H3	C	3	CAX/MA e NTL/RN
H4	.T..G.CTA..CT.TATAC	1	CAX/MA
H5	.T....CTA...TATATAC	6	MCM/MA e JP/PB
H6	.T.....	1	H. CAMPOS/MA
H7	T....T.T....	1	H. CAMPOS/MA
H8	T....	1	H. CAMPOS/MA
H9	...A.A.....	2	PNB/PI
H10	GT..G.CTA...T.TATAC	1	PNB/PI
H11	.T.AG.CTA...T.TATAC	1	PNB/PI
H12	GTC.GACTA...T.TATAC	1	THE/PI
H13	G.CTA...T.TATAC	7	THE/PI
H14	G.CTA.A.T.TATAC	1	THE/PI
H15	G.CTACA.T.TATAC	1	THE/PI
H16	CTA.A.T.TATAC	1	THE/PI
H17	A.....	2	THE/PI
H18	A.....	9	NTL/RN e ARA/SE
H19	..C..A.....	2	NTL/RN
H20	.TC....TA.....T..AC	1	NTL/RN
H21	..C.....A.....T..AC	1	NTL/RN

NH = número de haplótipos; Freq= frequência; CAX/MA=Caxias; H. CAMPOS/MA=Humberto de campos, THE/PI =Teresina; PNB/PI =Parnaíba; NTL/RN =Natal; JP/PB =João Pessoa; ARA/SE =Aracajú; MCM/MA=Maracaçumé.

A análise dos haplótipos resultou em uma rede de haplótipos não enraizada, onde os 21 haplótipos foram definidos, sendo que os números representam a posição das mutações que separam os haplótipos e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem nas localidades amostradas (Figura 3). A maior frequência de haplótipos foi compartilhada pelo haplótipo1 (H1) nas populações de Caxias/MA, Humberto de Campos/MA, Parnaíba/PI, Natal/RN, João pessoa/PB, Teresina/PI e Aracajú/SE, seguido pelo haplótipo 2 (H2) encontrado em Caxias/MA, Teresina/PI, Parnaíba/PI, Maracaçumé/MA, Natal/RN e João Pessoa/PB. A rede de haplótipo revelou dois grandes grupos nas populações estudadas, sendo um formado pelos haplótipos H1, H3, H6, H7, H8, H9, H17, H18, H19, H20 e H21, sendo o H1 o de maior frequência (f = 50) e que ocorreu em quase todas as populações. O outro grande grupo foi formado pelos haplótipos H2, H4, H5, H10, H11, H12,

H13, H14, H15 e H16, sendo o H2 o segundo mais frequente ($f = 31$) e compartilhado em quase todas as populações analisadas exceto em Humberto de Campos/MA e Aracaju/SE. Ocorreram ainda mais três haplótipos compartilhados, H3 ($f=3$) que foi compartilhado pelas populações de Caxias/MA e Natal/RN; H5 ($f=6$) compartilhado pelas populações de Maracaçumé/MA e João Pessoa/PB e o H18 ($f=9$) compartilhado por Natal/RN e Aracaju/SE. Os demais haplótipos foram exclusivos para cinco das oito populações estudadas Caxias/MA, Humberto de Campos/MA, Teresina/PI, Parnaíba/PI e Natal/RN (Tabela 2, Figura 3).

Figura 3. Rede de haplótipos com base no gene mitocondrial NDH4 para populações de *Ae. aegypti* da região Nordeste



4.2 Diversidade genética

A média da matriz de divergência nucleotídica foi gerada com o algoritmo Tamura-Nei para o gene NADH4 do DNA mitocondrial. A divergência nucleotídica variou de 0 à 3%. Quando analisada a média de divergência genética nas populações isoladas observou-se uma divergência de 2% dentro das populações de Parnaíba e Teresina. Quando comparada a média de divergência genética entre as populações o menor valor encontrado foi de 0% entre Aracaju/SE e Humberto de Campos/MA e o maior valor observado foi de até 3% entre várias populações (Tabela 3).

Tabela 3. Matriz de distância genética com base no gene mitocondrial NDH4 para as populações de *Ae. aegypti* para os estados da região nordeste.

POPULAÇÕES	% DIVERGÊNCIA GENÉTICA							
	Caxias	Maracaçumé	H. Campos	Parnaíba	Teresina	Natal	J. Pessoa	Aracajú
Caxias	1							
Maracaçumé	1	0						
H. Campos	3	3	0					
Parnaíba	2	1	2	2				
Teresina	1	1	3	2	2			
Natal	3	3	1	2	3	1		
J. Pessoa	2	3	1	2	2	1	1	
Aracajú	3	3	0	2	3	1	1	0

4.3 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) foram executados para analisar a diferenciação genética nas populações, onde estas foram agrupadas em cinco grupos hierárquicos (Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe) e constatou-se um $F_{ST} = 0.55922$ com P significativo ($p < 0,000$) com a maior variação observada dentro das populações dentro dos grupos 67,06% e a menor variação dentro das populações com 52,85% (Tabela 4).

Tabela 4. Análise molecular de variância (AMOVA) com base no gene mitocondrial NDH4 nas populações de *Ae. aegypti* para a região Nordeste, Brasil

Tipos de Variação	Componentes de Variação	Variação (%)	F_{ST}	P^*
Dentre os grupos	-061336 Va	-19,91		
Dentre populações dentro grupos	2,06585Vb	67,06	0,55922	<0,000
Dentro populações	1,62830Vc	52,85		

*Valores de P calculados com 1.023 permutações aleatórias.

A diferenciação genética entre as populações representadas pelos valores par-a-par, foi avaliada utilizando-se o índice de fixação (F_{ST}) e a significância do F_{ST} foi obtida através de 1023 permutações aleatórias. O índice de F_{ST} variou de -0.04051(Parnaíba/Caxias) a 0.93670 (Aracajú/Maracaçumé), com P significativo (<0.05), indicando por tanto diferenciação genética entre as populações de *Ae. aegypti* (Tabela 5). O isolamento genético por distancia

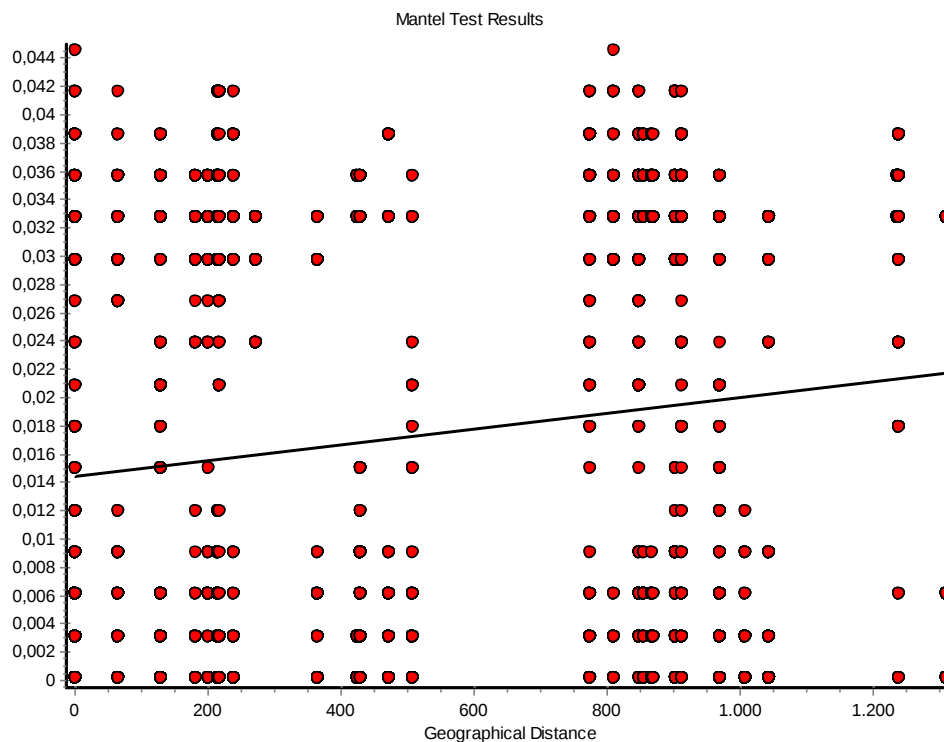
geográfica foi testada e constatou um valor significativo para o coeficiente de correlação para o teste de Mantel ($r = 0,1561$; $p = 0,0009$) (Figura 4).

Tabela 5. Comparações dos valores de F_{ST} para par, com base no gene mitocondrial NDH4, entre as populações de *Ae. aegypti* com base no gene NDH4

Populações	Caxias	Maracaçumé	H.Campos	Parnaíba	Teresina	Natal	J. Pessoa	Aracajú
Caxias	0.00000							
Maracaçumé	0.15218	0.00000						
H. Campos	0.74901	0.93664	0.00000					
Parnaíba	-0.4051	0.22926	0.62569	0.00000				
Teresina	0.01487	0.23630	0.67819	0.01666	0.00000			
Natal	0.57182	0.79490	0.18002	0.43999	0.53034	0.00000		
João Pessoa	0.40277	0.65446	0.12550	0.27928	0.38176	0.09184	0.00000	
Aracajú	0.67508	0.93670	-0.01085	0.52162	0.60567	0.06204	0.08345	0.00000

* $P < 0,000$

Figura 4. Correlação de Distância Genética e Geográfica para as populações de *Ae. aegypti* da Região Nordeste baseada no Teste de Mantel



4.4 Filogenia dos Haplótipos

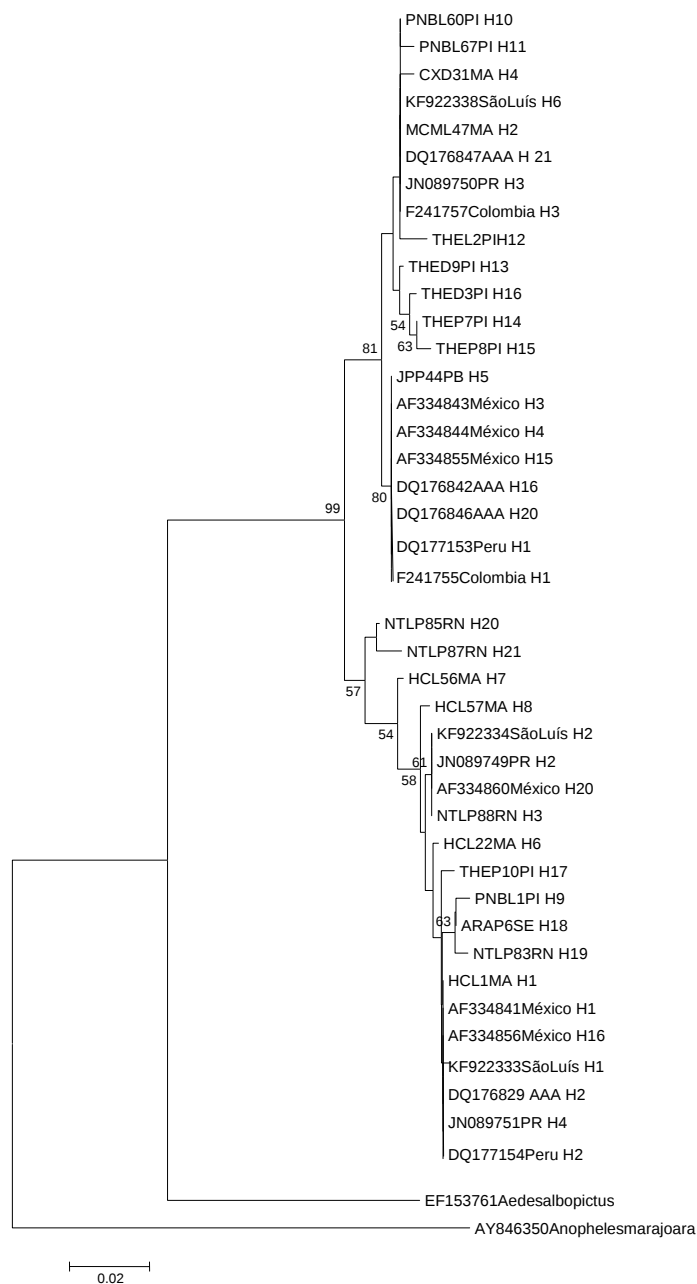
Foram construídos dendogramas para demonstrar a relação filogenética existente entre os 21 haplótipos encontrados na região Nordeste. *Ae. albopictus* e *Anopheles marajoara* foram usados como grupo externo (outgroup). Os dendogramas independente do método usado, Agrupamento de Vizinheiro, Máxima Verossimilhança ou Máxima Parcimônia, mostraram topologias similares com dois clados distintos, sendo que o clado I incluiu 10 haplótipos, entre eles o segundo mais frequente representado por CXD30 e sete haplótipos únicos (CXD31/H4; PNBL60/H10, PNBL67/H11, THEL2/H12, THEP7/H14, THEP8/H15 e THED3/H16). O clado II reuniu 11 haplótipos, entre eles, o mais frequente representado por HCL1/H1, cinco haplótipos únicos (HCL22/H6, HCL56/H7, HCL57/H8, NTLP85/H20 e NTLP87/H21) (Figura 5).

Figura 5. Dendograma de Agrupamento de vizinho, algoritmo Tamura Nei, com base no gene mitocondrial NDH4, observado entre os 21 haplótipos de *Ae. aegypti* dos estados da região Nordeste. Os valores dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap*. ARA=Aracajú/SE; PNB=Parnaíba/PI; NT=Natal/RN; HC=Humberto de Campos/MA; CX=Caxias/MA; THE=Teresina/PI; JP=João Pessoa/PB; MCM=Maracaçumé/MA.



Foi incorporado ao nosso banco de dados sequências do genbank já validadas para verificar a confiabilidade dos dados deste estudo em relação a ausência de pseudogenes do genoma nuclear (Numts) de *Ae. aegypti* e verificar como está as populações do Nordeste brasileiro em relação as populações do mundo (Figura 6).

Figura 6. Dendograma de Agrupamento de vizinho, algoritmo Tamura Nei com base no gene mitocondrial NDH4 observado entre haplótipos de *Ae. aegypti*. Os valores dos ramos correspondem aos valores de *bootstrap*. ARA=Aracajú/SE; PNB=Parnaíba/PI; NT=Natal/RN; HC=Humberto de Campos/MA; CX=Caxias/MA; THE=Teresina/PI; JP=João Pessoa/PB; MCM=Maracaçumé/MA, AAA=África, América e Ásia.



5. DISCUSSÃO

5.1 Frequência e Distribuição dos haplótipos e Testes de Neutralidade

Nos últimos anos, muitos são os estudos que tem discutido a ocorrência de pseudogenes no genoma nuclear (Numts) de *Ae. aegypti*, estes Numts (mtDNA) podem ser amplificados através da PCR em conjunto com o DNA mitocondrial podendo assim levar a conclusões errôneas em nível de população filogenética, uma vez que eles acabam sendo analisados como parte da sequência mitocondrial (HLAING, 2009; MOORE, 2013; FRAGA, 2013). O presente estudo encontra-se livre dessas sequencias consideradas Numts, pois as mesmas foram comparadas com as que estão depositadas no genbank e que são validadas como sequencias verdadeiras e não como pseudogenes (Numts).

O presente trabalho com *Ae. aegypti* utilizando o marcador molecular mitocondrial NDH4 evidenciou 21 haplótipos, sendo superior ao encontrado por Fraga et al. (2013) em um estudo realizado para a ilha de São Luis/MAe por Paupy (2012) em trabalho realizado na Bolívia, porém foi inferior aos revelados por Paduan (2006) em um estudo na região Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste do Brasil e por Bracco et al. (2007) em estudo realizado nas Américas, África e Ásia.

O haplótipo H1 apesar de ser o mais frequente ($f = 50$) não foi encontrado em todas as populações analisadas estando ausente na população de Maracaçumé/MA. O mesmo foi encontrado como H1, H16 e H23 em estudos no México (GORROCHOTECHI-ESCALANTE et al., 2002); como H2 em Piura no Peru (COSTA-DA-SILVA et al., 2005); H2 em estudos para África, Ásia e America do Sul (BRACCO et al., 2007); H4 no Paraná (TWERDOCHLIB, 2012), como H1 para a Ilha de São Luís (FRAGA et al., 2013).

O H14 deste estudo que foi único para a população de Teresina/PI ocorre como H16 na África, Ásia e America do Sul (BRACCO, 2007); H3 no Paraná (TWERDOCHLIB, 2012), H6 na Ilha de São Luís (FRAGA et al, 2013); H3 para Colômbia (OBANDO, 2015). O H19 do presente estudo também único para a população de Natal/RN ocorre como H3 e H15 no México (GORROCHOTECHI-ESCALANTE et al., 2002); H1 em Piura no Peru (COSTA-DA-SILVA et al., 2005), H16 e H20 para África Ásia e América do Sul (BRACCO, 2007) e H1 na Colômbia (OBANDO, 2015).

Os índices de diversidade genética encontrados neste estudo mostrou pouca variação ($h = 0,768$ e $\pi = 0,01750$) quando comparados com trabalho realizado por Sousa (2015) que encontrou $\pi = 0,01628$ em estudo realizado para o estado do Maranhão, no entanto quando comparados a outros estudos, mostrou-se relativamente altos. Twerdochlibet al. (2012) obtiveram $\pi = 0.01556$ no estado do Paraná, Paupy et al. (2012) obtiveram $\pi = 0.00159$ na

Bolívia; Fraga et al. (2013) obtiveram $\pi = 0,00748$ em estudo na Ilha de São Luís; Costa-da-Silva et al. (2005) e Bosio et al. (2005) estimaram um valor $\pi = 0,0079$ em populações do Peru e Tailândia. No entanto Bracco et al. (2007) revelaram uma diversidade nucleotídica maior do que a do presente estudo com $\pi = 0,01997$ em estudo realizado na África e Ásia América.

Quando cada município foi considerado como uma população os valores de diversidade haplotípica variaram de $h = 0,286$ em Aracajú/SE a $h = 0,830$ em Teresina/PI e os valores de diversidade nucleotídica de $\pi = 0,00085$ em Aracajú/SE a $\pi = 0,01838$ em Parnaíba/PI, valores expressivos de diversidade haplotípica e nucleotídica também foram constatados entre populações de Natal/RN ($h = 0,771$) e Parnaíba/PI ($h = 0,742$), para diversidade nucleotídica foram observados valores $\pi = 0,01466$ em Teresina/PI e $\pi = 0,01309$ para população de João Pessoa/PB. Estes resultados revelam um indicativo da redução do fluxo gênico entre as populações da região Nordeste do Brasil com consequente indício de diferenciação populacional. Esta redução do fluxo gênico pode estar atrelada a forma com que se combate o vetor com uso de inseticidas químicos que usado com frequência podem tornar as populações resistentes. Nossos resultados corroboram com Ayres (2004) e Soares-da-Silva et al. (2015) que tem revelado que em regiões onde os tratamentos com inseticidas químicos são frequentes as populações analisadas apresentaram altos níveis de diferenciação genética e Sousa (2015) que relata em seu trabalho para o estado do Maranhão, que a restrição no fluxo gênico pode ser explicada pela redução no tamanho efetivo das populações devido a gargalos populacionais causados por intensos tratamentos químicos que visam o controle dessas populações de vetores através de inseticidas.

Os testes de neutralidade de D (TAJIMA, 1989) e F_s (FU, 1997) não foram significativos com $P > 0,05$, considerando todas as populações agrupadas ou populações isoladas de *Ae. aegypti*, indicando que o polimorfismo está de acordo com o modelo neutro de mutações e que o vetor para a região Nordeste não se encontram em expansão, apesar da presença de haplótipos únicos. Esses resultados corroboram com os resultados de Lima Júnior e Scarpassa (2009) para populações da Amazônia; Twerdochlibet al. (2012) para as populações do Estado do Paraná; Bracco et al. (2007) para populações das Américas; Fraga et al. (2013) para as populações da Ilha de São Luís; Obando (2015) em estudos realizados na Colômbia e Sousa (2015) em um estudo realizado no estado do Maranhão.

Foram analisados para este estudo haplótipos únicos para praticamente todas as populações estudadas exceto para a população de João Pessoa/PB, Maracaçumé/MA e Aracajú/SE. Estes resultados corroboram Fraga et al. (2013) que em estudo para ilha de São

Luís encontrou haplótipos únicos e Sousa (2015) para populações de *Ae. aegypti* em municípios do Maranhão que também relatou haplótipos únicos. Segundo Yáñez et al. (2013) a migração ativa ou passiva realizada pela fêmea do *Ae. aegypti* em busca de locais para ovipor pode apresentar restrições geográficas ou climáticas forçadas e por intermédio do ser humano isto poderá explicar a presença de haplótipos únicos em regiões distintas como os casos de Humberto de Campos/MA e Natal/RN.

5.2 Análise de variância molecular (AMOVA)

Os dados da AMOVA neste estudo mostraram que a maior variação encontra-se dentro das populações dentro dos grupos com 67,06%; $F_{ST} = 0,55922$; $P < 0,000$, bem como, em trabalhos realizados na Amazônia, (72,69%; $F_{ST} = 0,273$; $P < 0,005$) (LIMA JÚNIOR e SCARPASSA, 2009), Paraná (67%; $F_{ST} = 0,32996$; $P < 0,005$) (TWERDOCHLIB et al., 2012) e Venezuela (77,60%; $F_{ST} = 0,224$; $P < 0,005$) (HERRERA et al., 2006) indicando assim que as populações de *Ae. aegypti* da região Nordeste estão em processo de diferenciação genética.

Segundo Rieger et al. (2006) somente a diversidade genética intraespecífica pode garantir à adaptabilidade das populações as modificações do meio, consequentemente o uso excessivo de inseticidas químicos pode levar ao surgimento de novas mutações e de recombinação já existentes. As análises do presente estudo, bem como de outros trabalhos (GORROCHOTECHI-ESCALANTE et al., 2002; BOSIO et al., 2005; COSTA-DA-SILVA et al., 2005; TWERDOCHLIB et al., 2012; FRAGA et al., 2013; OBANDO, 2015; SOUSA, 2015) revelam a maior variação genética intrapopulacional o que pode ser reflexo do sucesso evolutivo desta espécie, já que os resultados da AMOVA foram significativos o que evidencia para uma estruturação populacional. Os resultados de correlação de distância genética e geográfica mostrou um valor significativo, levando a considerar a presença de duas linhagens de *Ae. aegypti* para região Nordeste indicando que o fluxo gênico independe da distância geográfica diferindo assim de outros estudos (HERRERA et al. 2006; LIMA JÚNIOR, 2007; LIMA JÚNIOR e SCARPASSA, 2009).

5.3 Filogenia dos haplótipos

A árvore de haplótipos mostrou dois clados fortemente para as populações de *Ae. aegypti* da região Nordeste, corroborando a maioria dos estudos que utilizaram o gene NADH4 em populações de *Ae. aegypti* (BOSIO et al., 2005; HERRERA et al., 2006; FRAGA et al., 2013; SOUSA, 2015). Os resultados da filogenia somados a magnitude das diversidades

haplotípica e nucleotídica das populações da região Nordeste indicam diferenças significativas entre as populações analisadas, a AMOVA aponta para uma estruturação populacional o que pode ser consistente com a presença de diferentes linhagens de *Ae. aegypti* para as populações analisadas da região Nordeste. Os resultados apresentados neste trabalho revelam informações que devem ser consideradas no controle deste vetor que transmite diversas doenças entre elas: dengue, chikungunya, febre amarela e Zika vírus, pois em áreas urbanas o uso contínuo de inseticidas pode resultar em populações *bottlenecke*/ou populações fundadas com poucos indivíduos que via recolonização fortalecem as mudanças genéticas nas populações ocasionando diferenças na capacidade vetorial do mosquito.

Vários estudos demonstram uma correlação entre estrutura genética de populações e a capacidade vetora do *Ae. aegypti* (FAILLOUX et al., 2002; LOURENÇO-DEOLIVEIRA et al., 2004, FRAGA et al, 2013; OBANDO, 2015). Portanto conhecer a estrutura genética das populações de *Ae. aegypti* para a região Nordeste será um importantíssimo passo para se estudar as possíveis relações entre a capacidade de adaptabilidade deste vetor e da capacidade de transmissão deste de diversas doenças auxiliando assim no melhor entendimento da dinâmica de transmissão.

6. CONCLUSÕES

- Foi encontrado um elevado número de haplótipos (21) na região Nordeste, destes vários (12) foram únicos;
- O haplótipo H1 foi o mais frequente, sendo encontrado em todas as populações, exceto na população de Maracaçumé/MA. O haplótipo H2 foi o segundo mais frequente estando ausente apenas nas populações de Humberto de Campos/MA e Aracaju/SE, mas presente na África, Ásia e America.
- Os índices de diversidade genética encontrados neste estudo foram relativamente altos, a magnitude das diversidades haplotípica e nucleotídica observada é um indicativo da redução do fluxo gênico entre as populações com consequente indício de estruturação populacional;
- Os testes de neutralidade D e F_s não foram significativos sugerindo que o polimorfismo detectado está de acordo com o modelo neutro e indicando que as populações de *Ae. aegypti* para Região Nordeste do Brasil não se encontram em expansão, apesar da presença de haplótipos únicos;
- A análise dos dendogramas encontrados nas populações de *Ae. aegypti* para a região Nordeste mostrou dois clados fortemente distintos;

- A magnitude das diversidades e divergência genéticas e a análise filogenética somada ao resultado da AMOVA e correlação genética e geográfica apontam para uma redução do fluxo gênico entre as populações com consequente indício de estruturação populacional e consistência da presença de diferentes linhagens de *Ae. aegypti* na região nordeste;
- Os resultados apresentados neste trabalho indicam que as populações de *Ae. aegypti* na Região Nordeste podem estar passando por um processo de diferenciação, tendo como consequência, uma maior habilidade na competência vetorial. Isto implica em diferenciar o tratamento nas medidas de controle e no combate a este vetor a fim de não fortalecer geneticamente a linhagem. Portanto conhecer a estrutura genética do *Ae. aegypti* para a Região Nordeste faz-se necessário para gerar informações que visem minimizar o grande problema de saúde pública causado por este vetor da Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika Vírus.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. 1163p.
- AVISE J. C, NEIGEL J. E, ARNOLD J. Demografic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. **Journal of Molecular Evolution**. 20: 99 – 105. 1984.
- AVISE JC. **Molecular markers, natural history and evolution**. Sunderland: Sinauer Associates. 2nd edition.684p.2004
- AYRES, C.E.J., MELO-SANTOS, M.A.V., PROTA, J.R.M., SOLÉ-CAVA, A.M., REGIS, L., FURTADO, A.F. Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macro geographic levels in Brazil. **Journal of the American Mosquito Control Association**. 20: 350- 356. 2004.
- BANDELT H. J, FORSTER P, FORSTER M, ROHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**. 16, 37-48. 2008.
- BIRUNGI J, MUNSTERMANN L. E. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Dipera: culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. **Genetics**. 95:125-132. (2002).
- BOORE, J. L. **Animal Mitochondrial Genomes**. Nucleic Acids Research, v. 27, supl.8, p. 1767- 1780, 1999.
- BURKOT T. R.,HANDZEL T., SCHMAEDICK M. A., TUFA J., ROBERTS J. M, GRAVES P. M. Productivity of natural and artificial containers for *Aedes polynesiensis* and *Aedes aegypti* in four American Samoan villages. **Medical and Veterinary Entomology**. 21: 22–29.2007.
- BLUTER, J. M. **Mitochondrial DNA analysis In: Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. 2. ed. Elsevier, Capítulo 10, p.376-389, 2010.
- BOSIO C. F.; HARRINGTON L. C, JONES J. W, SITHIPRASASNA R, NORRIS D. E, SCOTT T. W. Genetic Structure of *Aedes aegypti* Population in Thailand Using Mitochondrial DNA. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**.72 :434 442. 2005.
- BRACCO J. E, CAPURRO M. L, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, SALLUM M. A. M. Genectic variability of *Aedes aegypti* in the Américas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 102(5):573-580. 2007.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, out-dez. 2007.

BRASIL. FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. **Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor – Manual de Normas Técnicas**. Brasília/DF. 2001.

BRASIL- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (2008). **Guia de vigilância epidemiológica**. 9. ed. Brasília-DF, 2008.

BRASIL. MS- Ministério da Saúde. SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde, **Informe Epidemiológico da Dengue**, Análise de situação e tendências. 2010.

BRASIL. MS- Ministério da Saúde. SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde, **Boletim Epidemiológico da Dengue ; Chikungunya, Zika vírus** . 2016. Disponível em: <http://www.portaldasauade.gov.br/> Acesso em: 26/01/2016.

BROWER A. V. Z. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. **Proceedings National Academy Sciences of the United States of America**.91:6491-6495. 1994.

CAMARGO, M. F.; SANTOS, A. H.; OLIVEIRA, A. W. S.; ABRAÃO, N.; ALVES, R. B. N.; ISAC, E. Avaliação da ação residual do larvicida temefós sobre o *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae) em diferentes tipos de recipientes. **Revista de PatologiaTropical**, v. 27, p. 65-70, 1998.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I.; Zika vírus out break, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. Oct;21(10): 5 p.. 2015.

CARVALHO, M. S. L. E. D.; CALDAS, N. D.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIKAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 623-629, maio. 2004.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz. 228p. 1994

COSTA-DA-SILVA A. L, CAPURRO M. L, BRACCO J. E. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Díptera: Culicidae) from Peru. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 100, supl. 6, p. 639-644, 2005.

DE BRITO R. A, MANFRIN M. H, SENE F. M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila abuzzatii*. **Genetics and Molecular Biology**. 25.2.161-171. 2002.

EXCOFFIER, L.; ROESSLI, D.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.01: **A Software for Population genetic data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory: University of Geneva-Switzerland, 2006.

FAILLOUX ANA-BELLLA, VAZEILLE M, RODHAIN F. Geographic genetic variation in population of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. **Journal of Molecular Evolution**. 55: 653-663. 2002.

FIGUEIREDO L. T. **The Brazilian flaviviruses**. *Microbes Infect* 2: 1643-1649. International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV).(2000) Disponível em: <http://www.ictvonline.org/Acesso em: 10 de outubro de 2015>

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica: identificação, biologia e epidemiologia**. 1. ed. São Paulo: Edusp,. 860p. 2002

FRAGA, E.C.; SANTOS, J.M.M.; MAIA, J.F. Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Manaus-AM, Brazil. **Genetic and Molecular Biology**, 26(2): 181-187. 2003.

FRAGA, E. C.; OLIVEIRA, D. R. S.; ARAGÃO, D. G.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; BARROS, M. C.; Genetic Variability and Evidence of Two Distinct Lineages of *Aedes aegypti*, (Diptera, Culicidae) on São Luis Island in Maranhão, Brazil. **The open Tropical Medicine Journal**. 6, 11-18. 2013.

GORROCHOTEGUI - ESCALANTE N, GOMES-MACHORRO C, LOZANO FUENTES S, FERNANDEZ-SALAS I, MUNOZ M. L, FARFAN - ALE J. A, GARCIA E JON J, BEATY B.J, BLACK IV W. C. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 66 (2):213-222. 2002.

GUBLER D. J. The Changing Epidemiology of Yellow Fever and Dengue, 1900 To 2003: Full Circle? Comp. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. 27:314-330. (2002).

GUO, S.; LI, X.; HE, P.; HO, H.; WU, Y.; H. E, Y. Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. Apr 10, 2015.

GLORIA-SORIA, A. BROWN, J.E. KRAMER, V. YOSHIMIZU, H.M. POWELL, J.R. Origin of the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*, in California. **PLOS neglected Tropical Diseases**. 8, 7, 3029. 2014.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap.12, 1998. p. 383-446.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series.v.41**, p. 95-98, 1999.

HLAING T, TUN-LIN W, SOMBOON P, *et al.* Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. **BMC Genetics**; 10: 11. 2009.

HERRERA F, URDANETA L, RIVERO J, ZOGHBI N, RUIZ J, CARRASQUEL G, MARTINEZ J. A, PERNALETE M, VILLEGAS P, MONTOYA A, RUBIO – PALIS Y, ROJAS E. Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 101(6): 625-633, 2006.

HIRAGI,C.; SIMÕES, K.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; LIMA, L.; MONNERA, R. Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) utilizando Marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 38, supl. 4, p. 542-547, 2009.

KARABATSOS N, editor. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 3rd ed. San Antonio: American **Society of Tropical Medicine and Hygiene**;. 1147 p1985.

LANG, B. F.; GRAY, M. W.; BURGER, G. Mitochondrial Genome Evolution and the Origin of Eukaryotes. **Annual Review of Genetics**. v.33, p. 351-397, 1999.

LIMA JÚNIOR, R. S. Estimativas de Variação Genética do gene ND4 do DNA mitocondrial em *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) da Amazônia, Brasil. **Dissertação**: Mestrado– Manaus: UFAM/INPA, 2007.

LIMA JÚNIOR, R. S.; SCARPASSA, V.M. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA NADH4 gene sequences. **Genetics and Molecular Biology**. 32(2): 414- 422. 2009.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, VAZEILLE M, DE FILIPPIS A. M. B, FAILLOUX A. B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 98:43-54. 2004.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.São Paulo Brazil, to organophosphates Insecticides. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 703-708, 2003.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI M. T.; OTRERA, V. C. G.; CARVALHO, L. R. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 895-900, 2007.

MILLER, M. P., Alleles in Space computer software for the joint analyses of inther individual sapatial and genetic information **Journal of Heredity**. 96: 722-724. 2005

MATIOLI, S. RUSSO. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora. 202 p.

MARZOCHI K. B. F. Dengue in Brazil – Situation, Transmission and Control – A Proposal for Ecological Control. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. 89 (2):235-245. (1994) (2001).

MOORE M, SYLLA M, GOSS L, *et al.* dual African Origins of Global *Aedes aegypti* populations revealed by mitochondrial DNA. **PLOSNe glected Tropical Diseases**. 7: e 2175. 2013

MOUSSON L, DAUGA C, GARRIGUES T, SCHAFFNER F, ZEILLE M, FAILLOUX A. B. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia)* **Cambrigde Journals Online – Genetics Research**. 86:1:1-11. 2005.

NUNES, M. R. T., PALACIOS, G, FARIA, N. R, SOUSA, E. C.J. R., PANTOJA J. A., RODRIGUES, S. G., *et al.* Air travel is associated with intracontinental spread of dengue virus serotypes 1-3 lineages in Brazil. **PLOSNe glected Tropical Diseases**. Apr;8(4), 2014.

OBANDO, O. A. A. Análise da Resistência a Inseticidas e Variabilidade genética de Populações Naturais de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) da Colômbia e do Brasil. 2013. 136f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2013.

OBANDO, O. A. A.; BONA, A. C. D.; DUQUE, J. E. L.; NAVARRO-SILVA, M. A.; Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. **Zoologia**, 32 (1): 14-22, Fevereiro, 2015

OEHLER E, WATRIN L, LARRE P, LEPARC-GOLFRT I, LESTÈRE S, VALOUR F.. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome: case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**. Mar;19 (9), 2014

OLIVEIRA, R. M. A dengue no Rio de Janeiro: repensando a participação popular em saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de janeiro, v. 14, n. 2, p. 69-78, 1998.

PADUAN K. S, ARAÚJO-JÚNIOR J. P, RIBOLLA P. E. M. Genetic variability ingeographical populations of *Aedesaegypti* (Diptera: Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**. 29(2): 391-395. 2006.

PAUPY, C., GOFF, G.L., BRENGUES, C., GUERRA, M., REVOLLO, J., SIMON, Z. B., HERVÉ, J-P., FONTENILLE, D. Genetic Struture and Phylogeografic of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia Infection, **Genetics and Evolution** 12; 1260-1269. 2012.

PAMPLONA, L. G. C., LIMA, J. W. O., CUNHA, J. C. L., SANTANA, E. W. P. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de alvenaria do município de Canindé, Ceará, Brasil após a utilização do peixe *Bettas splendens* como alternativa de controle biológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 400-404, set-out. 2004.

PATARRO, T. F., GUIRADO, M. M.; RAVAZZI, L. M.; BICUDO H. E. M. C. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations determined using pairwise comparisons. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, supl.3, p. 3775-3787. 2013.

PINHEIRO V. C. S, TADEI W. P. Avaliação do efeito residual do temefós em larvas de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) em recipientes artificiais em Manaus, Amazonas, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. 18(6):1529-1536, 2002.

PINHEIRO V. C. S. Controle do Dengue em Manaus-AM: Estudo da positividade/produtividade larvária, viabilidade dos ovos e investigação por RT-PCR dos sorotipos do vírus dengue em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Tese de Doutorado** em Ciências Biológicas - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade da Amazônia, Manaus, Amazonas. 164pp 2005.

POLANCZYK, R. A., GARCIA, M. O., ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 813-816, dez. 2003.

QUIMBAYO, M., RÚA-URIBE, G., PARRA-HENAO, G., TORRES, C. Evaluation of lethal ovitraps as a strategy for *Aedes aegypti* control. **Biomedica**, v. 34, n. 3, p. 473-82, Jul-Sep. 2014.

REBÊLO, J. M. M., COSTA, J. M. L., SILVA, F. S., PEREIRA, Y. N. O; SILVA, J. M. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 15, n. 3, p. 477-486, Jul./Sep. 1999.

REITER, P, AMADOR, M.A, ANDERSON, R.A, CLARK, G.G.. Dispersal of *Aedes aegypti* in the urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 52:177-179, 1995.

RIEGER T. T, CAMPOS S. R. C, SANTOS J. F. A biologia molecular como ferramenta no estudo da biodiversidade, **Floresta e Ambiente**. 13. .2.11-24. 2006.

SAMPAIO, J. C. A longevidade do *Aedes aegypti* durante a estação chuvosa no município de Fortaleza. 2010. 115f. **Dissertação** (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza – Ceará, 2010.

SEIXAS, G., PATRÍCIA SALGUEIRO, P., SILVA, A. C., CAMPOS, M., CARINE SPENASSATTO, C., REYES-LUGO, M., NOVO, M. T.; RIBOLLA, P. E. M., PINTO, J. P. S. S., SOUSA, C. A. *Aedes aegypti* on Madeira Island (Portugal): genetic variation of a recently introduced dengue vector. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 108 (Supl. I): 3-10, 2013.

SOARES-DA-SILVA, J. Controle da Dengue: Isolamento, Caracterização Molecular e Atividade Larvívora de *Bacillus thuringiensis* BERLINER 1911 em *Aedes aegypti* LINNAEUS1762 (Diptera: Culicidae). **Dissertação** de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Manaus, Amazonas 92p. 2011.

SOARES-DA-SILVA, J.; PINEIRO, V. C. S.; LITAIF-ABREU, E.; POLANCZYK, R. A.; TADEI, W. P. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 1-6, 2015.

SOUSA, A. A. Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) da Região Meio Norte do Brasil. **Dissertação** de mestrado, Universidade Estadual do Maranhão/Programa de pós-graduação em Ciência Animal, São Luis, Maranhão, 70 p. 2015.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**. 18: 233-234.2000.

TAMURA K.; STECHER G.; PETERSON D.; FILIPSKI A.; KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729. 2013.

TAUIL P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 18: 867-871. 2002.

TEIXEIRA M. G., COSTA M. C. N, BARRETO F, BARRETO M. L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. 1: 7-18. (2009)

TWERDOCHLIB, A. L.; BONA, A. C. D.; LEITE, S. S.; CHITOLINA, R. F.; ESTPHAL, B.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. **Revista Brasileira de Entomologia**. v.56, supl.2, p. 249–256, Junho, 2012.

VASCONCELOS, P. F. C. Emergência do vírus *Chikungunya*: risco de introdução no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**; 5(3):9-10. 2014.

VILARINHOS, P. T. R.; DIAS, J. M. C. S.; ANDRADE, C. F. S.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. **Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos**. In: ALVES, S. B. (Ed). Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, p. 383-432. 1998

WEAVER, S. C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLoS neglected Tropical diseases**. 8(6) 2014

WHO - World Health Organization. **Global Alert and Response (GAR)**. Publicado em: 2009. Impact of Dengue. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>> Acesso em: 21 dez. 2013.

ZANLUCA C, MELO, V. C. A, MOSIMANN A. L. P. , SANTOS, G. IV.; SANTOS, C. N. D, LUZ, K. The first report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. Jun;110(4):569-72. 2015.

Anexos

Protocolo de extração de DNA kit Wizard Genomic DNA Purification

1. Preparou-se solução composta de EDTA (60 µl) e Nuclei Lysis Solution (250 µl), fez-se em quantidade proporcional as amostras;
2. A solução foi misturada manualmente;
3. Levou-se a solução ao freezer por 5 minutos (proporcional à quantidade dos reagentes), tomando-se o cuidado para não congelar;
4. Para cada µl de cada amostra, foi usado 300 µl da solução preparada para cada um dos tubos;
5. Foi adicionado 10 µl de proteinase K para cada amostra deixando-as em banho Maria a 65° C até degradar todo o tecido (mais ou menos três horas, dependendo do tipo de tecido);
6. Adicionou-se 10 µl de RNase, levou-se os tubos à estufa a 37° C por 30 minutos;
7. Após retirada das amostras da estufa adicionou-se 150 µl do reagente Protein Precipitation.
8. Agitou-se delicadamente os tubos;
9. Agitou-se em vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes;
10. Colocou-se no freezer por cinco minutos, tomando o cuidado para não congelar;
11. Centrifugou-se por 10 min. a 15.000 RPM;
12. Adicionou-se 600 µl de isopropanol (para precipitar o DNA) em um novo tubo.
13. Foi retirado o tubo da centrífuga e em seguida retirou-se o sobrenadante; colocando-o junto com isopropanol;
14. Agitou-se (homogeneizar) gentilmente os tubos;
15. Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
16. Descartou-se o isopropanol e foi colocado o tubo papel absorvente;
17. Em seguida foi adicionado 500 µl de álcool 70% aos tubos e agitou-se gentilmente para visualizar-se o pellet de DNA;
18. Com leves batidas foi desgrudado o pellet do fundo do *ependorf*; caso não esteja, dar-se-á leves batidas no fundo do tubo;
19. Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
20. Em seguida descartou-se o álcool;
21. Submeteu-se as amostras a um spin;
22. Retirou-se o excesso de álcool com a pipeta vermelha, tomando cuidado para não remover o pellet;
23. Colocou-se o tubo aberto na estufa por 10 minutos;
24. Foi adicionado 50 µl de solução DNA Rehydration ou TE;

25. Se o DNA fosse usado no mesmo dia era colocado na estufa por um mínimo de três horas; caso contrário foi deixado em temperatura ambiente por no mínimo 12 horas;
26. Depois do overnight foi colocado no freezer para posterior quantificação;
27. O DNA foi quantificado através da visualização em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 3µl de DNA.

Protocolo e procedimentos adotados para a Amplificação do gene NADH4 através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As reações de PCR foram realizadas em volume de 25 µL, utilizando-se os seguintes componentes:

- 1) 1,0 µL de DNA (50ng/µL);
- 2) 4,0 µL da mistura de dinucleotídeos (A, G, T e C);
- 3) 2,5 µL do tampão de PCR (10X concentrado);
- 4) 1,0 µL de cloreto de magnésio (50 mM);
- 5) 0,25µL de primer forward (100µM/ µL);
- 6) 0,25 µL de primer reverse (100µM/ µL);
- 7) 0,2 µL de taq DNA polimerase (5 U/µL);
- 8) 15,8 µL de água Milli-Q;

O protocolo de amplificação do gene mitocondrial NADH4 constou de uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94° C, seguida de 35 ciclos com os seguintes parâmetros:

- 1) 94° C por 1 minuto (desnaturação);
- 2) 56° C por 30 segundos (anelamento);
- 3) 72° C por 1 minuto (síntese do fragmento ou extensão).

Após os 35 ciclos ocorreram uma extensão final de 7 minutos a 72° C. O produto da PCR foi visualizado em minigel de agarose a 1% em uma proporção de 3µL de tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 3 µL de PCR.

Protocolo de Reação de Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas em volume de 10 µL, utilizando-se os seguintes componentes:

- 1) 1,5 µL do produto amplificado;
- 2) 2,0 µL de primer forward NADH4L (pmol/µL);
- 3) 1,0 µL de Big Dye

4) 1,5 µL de Tampão 5X para sequenciamento (kit Big Dye)

5) 4,0 µL de água Milli-Q;

O produto da reação foi submetido à precipitação com EDTA/Sódio acetato/etanol através do seguinte protocolo:

- 1) Submeteu-se a placa a um spin (centrífuga de placa);
- 2) Adicionou-se 2,5 µL de EDTA (125 mM);
- 3) Vedou-se a placa e submeteu-a a um spin;
- 4) Adicionou-se 30 µL de Etanol 100%;
- 5) Vedou-se a placa e misturou-se invertendo de 4-5x;
- 6) Envolheu-se a placa em papel alumínio e deixou-a em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos;
- 7) Centrifugou-se a 4.000 rpm por 30 minutos;
- 8) Inverteu-se bruscamente a placa para descartar o álcool e secar sobre papel absorvente;
- 9) Centrifugou-se a placa invertida por 15 segundos a 1.150 rpm;
- 10) Adicionou-se 30 µL de Etanol a 70%;
- 11) Vedou-se a placa;
- 12) Centrifugou-se a 3.440 rpm por 15 minutos;
- 13) Inverteu-se bruscamente para descartar o álcool e secou-se sobre papel absorvente;
- 14) Centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- 15) Deixou-se a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool;
- 16) Ressuspendeu-se a placa com formamida (10 µL) e submeteu-a à eletroforese através de um sequenciador automático de DNA ABI 3500/Life Technologies (Applied Biosystems).

Sequências do Genbank incorporadas neste estudo

DQ176847; JN089750; F241757; AF334843; DQ176842; DQ176846; DQ177153; F241755; KF922334; JN089749; AF334860; AF334841; AF334856; KF922333; DQ176829; DQ177154; JN089751; AF334844; KF922338; DQ176847.