

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DA AMAZÔNIA**

Estudo da Variabilidade Genética em Populações de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) no Estado do Amazonas, por meio de RAPD-PCR

**Mestrando: Fábio Raphael Moreira Cáuper
Orientador(a) Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos**

Manaus – AM
2007

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DA AMAZÔNIA**

Estudo da Variabilidade Genética em Populações de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) no Estado do Amazonas, por meio de RAPD-PCR

Mestrando: Fábio Raphael Moreira Cáuper

Dissertação apresentada ao Departamento de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador(a) Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos

Manaus – AM
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Cáuper, Fábio Raphael M.

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Aedes albopictus* (DIPTERA: CULICIDAE) NO ESTADO DO AMAZONAS, POR MEIO DE RAPD-PCR. Fábio Raphael Moreira Cáuper. - Manaus, 2006.

61 p.

Dissertação de Mestrado - UEA

Aedes albopictus 2. Genética de populações 3. RAPD 4. Variabilidade genética 5. Dengue.

SINOPSE

Foi analisada a variabilidade genética em populações de *Aedes albopictus*, procedentes de três bairros da cidade de Manaus (Cidade Nova, Colina do Aleixo e Compensa), e do município de Tabatinga, no Estado do Amazonas, por meio da técnica de RAPD/PCR. Das quatro populações analisadas, a de Tabatinga mostrou maior variabilidade genética, tanto pela percentagem de locos polimórficos ($P = 100,00$), quanto pelas heterozigozidades ($H_o = 0,3929$; $H_e = 0,3981$). A menor variabilidade genética foi detectada na população da Compensa ($P = 91,83$; $H_o = 0,3122$). Das três populações de Manaus, a da Cidade Nova mostrou maior variabilidade genética ($P = 97,95$; $H_o = 0,3662$). O valor de F_{st} foi de $0,0662 \pm 0,0096$, indicando baixa estruturação genética entre as populações. A distância genética entre as populações foi muito pequena ($D = 0,0156 - 0,0786$), mostrando que as mesmas são geneticamente muito próximas.

Palavras chave: *Aedes albopictus*, Genética de populações, Variabilidade genética, RAPD/PCR, Dengue.

**“A Deus Pai, Filho e Espírito Santo,
que cuida, ama e nunca abandona os
seus.**

À minha filha amada

Geovana Raphaela L. Cáuper,

IM MEMORIAN

“Venho com este trabalho, demonstrar minha gratidão a quem muito devo:”

Meus avós paternos,

Dr. Hugo de Lima Cáuper

Profª. Maria do Carmo de Barros Cáuper

Quando em vida, foi amigo, avô e pai de todas as horas. Com suas idéias e perseverança, ao longo de nossas conversas, influenciou-me para lutar por meus objetivos.

Uma pessoa maravilhosa que conquistou uma carreira brilhante e, mesmo fechando seus olhos, nos proporcionou viver a vida em estado de permanente celebração.

Também em vida, amiga, avó e mãe de todos os momentos. Com seu exemplo, mesmo após cinco gestações, perseverou e chegou a cursar faculdade.

Juntos construíram a minha base. A eles o meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao criador, Deus, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Melhor Amigo fiel não há.

Aos meus pais, Gerson Barros Cáuper e Ivana do Socorro Moreira Cáuper.

Ao Curso de Mestrado em Biotecnologia, pelo aprendizado de excelente qualidade e, pela oportunidade.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, por ceder toda a sua estrutura para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde – (CPCS -INPA) pela atenção deliberada durante a realização das atividades no Laboratório de Malária e Dengue.

À FAPEAM pela bolsa de estudo concedida, tornando possível a realização do curso.

À Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos, pela orientação, pela amizade dispensada, pela confiança depositada e por tornar possível a realização deste estudo.

Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei pelo apoio logístico no desenvolvimento deste projeto.

Ao Mestre Juracy de Freitas Maia pela preciosa colaboração, apoio técnico, esclarecimentos sempre que solicitado e pela amizade.

Em especial, às minhas tias do meu coração, Gení Cáuper e Gláucia Cáuper, pelo incansável apoio, incentivo, colaboração e sempre presente em todos os momentos, vos agradeço.

Também em especial, à Luciana Lima de Brito, pelo carinho, companheirismo, apoio e incentivo para a conclusão desse.

Aos meus tios Glíder Cáuper e Gilmar Cáuper e às minhas primas Glícia e Glenda pelos momentos de descontração.

Aos meus irmãos Flávio Cáuper e Hugo Cáuper pela amizade, ajuda nas coletas de campo e compreensão dos momentos de ausência.

À minha família que sempre me incentivou a lutar pelos meus ideais.

À Dra. Raquel Borges pelas conversas produtivas e repletas de conhecimento e por todos os momentos de convívio.

À Dra. Iléa Brandão Rodrigues pela amizade sincera.

Aos colegas Ricardo, Paulo, André, Mellina, Cleonice e Paulinha, pela ajuda desde a coleta, criação dos mosquitos, preparação e análise dos géis até na elaboração da dissertação.

A todos os funcionários do Laboratório de Malária e Dengue, pelo auxílio nos momentos necessários durante a realização das atividades.

Aos funcionários Bosco, Bastos e Elias, pela ajuda nas coletas e demais atividades de campo.

Em especial a Adelina, Maria do Desterro e Zilá, por tornar os dias difíceis em simples momentos de alegria.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional (antes, durante e sempre).

RESUMO

Na análise da variabilidade genética em populações de *Aedes albopictus*, procedentes dos bairros da Cidade Nova, Colina do Aleixo e Compensa da cidade de Manaus e município de Tabatinga no Estado do Amazonas, utilizou-se a técnica de RAPD/PCR. Os resultados da análise dos perfis de RAPD revelaram 86 bandas (locos) nas quatro populações, variando entre 320 a 2.100 pb. Das quatro populações analisadas, a de Tabatinga mostrou maior variabilidade genética, tanto pela percentagem de locos polimórficos ($P = 100,00$), quanto pelas heterozigozidades ($H_o = 0,3929$; $H_e = 0,3981$). A menor variabilidade genética foi detectada na população da Compensa ($P = 91,83$; $H_o = 0,3122$). Das três populações de Manaus, a da Cidade Nova foi a que mostrou maior variabilidade genética ($P = 97,95$; $H_o = 0,3662$). O teste de qui-quadrado para diferenciação de populações foi significativo ($\chi^2 = 466,7269$; $GL = 98$; $P < 0,0001$). A análise da estrutura genética populacional mostrou o valor médio de $F_{st} = 0,0662 \pm 0,0096$, indicativo de uma baixa estruturação genética. Mesmo assim, este resultado indica que o fluxo gênico está ocorrendo entre as populações, e os cruzamentos, possivelmente, ainda sejam aleatórios. Os valores de distância genética foram muito baixos ($D = 0,0156 - 0,0786$), indicando que as populações são muito próximas geneticamente, sendo as de Tabatinga e Compensa as que mostraram o valor de distância mais elevado (0,0786). Todavia, a menor distância genética foi detectada entre as populações da Cidade Nova e da Colina do Aleixo (0,0156).

O elevado polimorfismo observado nas quatro populações analisadas pode ser decorrente da própria estrutura genética destas populações, como estratégia adaptativa ao ambiente amazônico.

ABSTRACT

It has been used the RAPD/PCR technics to analysis the genetic Variability in *Aedes albopictus*, from Cidade Nova, Colina do Aleixo and Compensa neighborhoods of the city of Manaus and Tabatinga municipality in Amazonas state.

The results of the RAPD profile analysis revealed 86 bands (locos) in the four populations with variations between 320 and 2.100 pb. Among the four analized populations, the n from Tabatinga has showed greater genetic variability. Even though by the polymorphic locus percentage ($P = 100,00$) or by its heterozigosity ($H_o = 0,3929$; $H_e = 0,3981$). The smallest genetic variability was detected at the Compensa population ($P = 91,83$; $H_o = 0,3122$). Of the three Manaus populations the one from Cidade Nova has shown the greatest genetic variability ($P = 97,95$; $H_o = 0,3662$) The q-square test for population differentiation has been significative ($\chi^2 = 466,7269$; $GL = 98$; $P < 0,000$). The genetic structure was tested being its average value of $F_{st} = 0,0662 \pm 0,0096$, showing a low genetic structure. Even though, this result has shown that genetic flux is happening among populations and the crossing is much probably aleatory. The values of genetic distances were very low ($D = 0,0156 - 0,0786$), showing that, populations are genetically very close, being Tabatinga and Compensa, the shortest genetic distance was detected among Cidade Nova and Colina do Aleixo populations (0,0786).

The high polymorphism observed on the four analyzed populations cold be a suspicion of a greater genetic plasticity, occurring from its own genetic structure as an adaptable strategy to the Amazonian environment.

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Distribuição Geográfica e Biologia de <i>Aedes albopictus</i>	1
I.2. Importância Médica.....	4
I.3. Técnicas Moleculares e a Variabilidade Genética em <i>Aedes</i>	6
II – OBJETIVOS.....	10
III – MATERIAL E MÉTODOS.....	11
III. 1. Área de Estudo.....	11
III. 2. Obtenção das Amostras.....	13
III. 3. Extração do DNA Genômico.....	16
III. 4. Quantificação e Diluição do DNA.....	16
III. 5. Marcadores RAPD	17
III. 5.1. Amplificação do DNA e Eletroforese.....	17
III. 6. Análise Estatística.....	20
III. 6.1. Estimativa do Número de Locos Polimórficos e Heterozigosidade Média.....	21
III. 6.2. Análise da Estrutura Genética Populacional.....	22
III. 6.3. Análise de Distância e Similaridade Genética entre as Populações.....	22
IV – RESULTADOS.....	24
IV. 1. Análises dos perfis eletroforéticos.....	24
IV. 2. Análises Populacionais.....	31
IV. 2.1. Estimativas das Medidas de Variabilidade Genética.....	30
IV. 2.2. Análise da Estrutura Genética das Populações.....	32
IV. 2.3. Análise da Distância e Similaridade Genética entre as Populações.....	33
IV. 2.4. Relações Genéticas entre as Populações.....	34
V – DISCUSSÃO.....	35
V. 1. Perfis Eletroforéticos de RAPD.....	35
V.1. Estimativa da Variabilidade Genética das Populações.....	36
V.2. Estrutura e Diferenciação Genética das Populações.....	43

VI – CONCLUSÕES.....	47
VII. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de <i>A. albopictus</i> no Estado do Amazonas.....	12
Figura 2. Mapa da cidade de Manaus por zona e bairros, com a localização dos pontos de coletas.....	13
Figura 3. Armadilhas de pneus cortados horizontalmente pela metade e preenchidos com água em 2/3 de sua capacidade.....	15
Figura 4. Manutenção de <i>A. albopictus</i> no insectário. A - Cuba esmaltadas contendo larvas; B – Gaiola de madeira contendo machos e fêmeas; C – copos plásticos com fêmeas isoladas para a desova.....	15
Figura 5. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> . Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 05. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).....	26
Figura 6. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> . Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 07. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).....	26
Figura 7. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> . Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 10. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).....	27
Figura 8. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> . Amostras: 1 a 2 (Cidade Nova), 3 a 6 (Tabatinga), 7 a 10 (Colina do Aleixo), 11 a 14 Compensa, 15 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 12. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).....	27
Figura 9. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> . Amostras: 1 a 2 (Cidade Nova), 3 a 6 (Tabatinga), 7 a 10 (Colina do Aleixo), 11 a 14 Compensa, 15 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 14. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).....	28

Figura 10. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> . Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 16. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).....	28
Figura 11. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> . Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 17. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).....	29
Figura 12. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> . Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 20 (Cidade Nova). Primer OPAB 18. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).....	29
Figura 13. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> . Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 19. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).....	30
Figura 14. Dendrograma agrupando as populações de <i>Aedes albopictus</i> com base na distância genética. Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética - UPGMA (Nei, 1987).....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções - tampões, e seus respectivos reagentes, utilizados nos experimentos.....	19
Tabela 2. Número de locos (bandas) por primer obtidos nas quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> do Estado do Amazonas.....	25
Tabela 3. Estimativa da variabilidade genética em quatro populações de <i>Aedes albopictus</i> no Estado do Amazonas.....	32
Tabela 4. Matriz de distância e similaridade genética entre as três populações de <i>Aedes albopictus</i> da Cidade de Manaus (AM). Valores acima da diagonal correspondem à identidade genética não enviesada e abaixo da diagonal correspondem à distância genética não enviesada (Nei, 1978).....	33

I – INTRODUÇÃO

I. 1. Distribuição Geográfica e Biologia de *Aedes albopictus*

Aedes albopictus Skuse (1894) pertence ao subgênero *Stegomyia*, do Grupo Scutellaris. É originário da Ásia, ocorre em toda região Oriental, sudeste da Nova Guiné (COLLES, 1973), na maioria das ilhas do Oceano Índico e oeste de Madagascar. Teve sua dispersão incrementada em outras partes do mundo a partir de 1980 (GOMES et al., 1999), por meio do transporte de mercadorias, contendo larvas desse mosquito.

Inúmeras pequenas introduções no continente Norte Americano foram observadas no final dos últimos anos, e em 1985 um crescimento populacional substancial de *A. albopictus* foi descoberto em Houston, Texas (SPRENGER & WUITHIRANYAGOO, 1986). A partir dessa data, inúmeros trabalhos vêm descrevendo a expansão dessa espécie pelo continente Norte Americano. Hawley (1988) relata que, infestações em pneus descartados foram identificadas na maior parte dos estados ao leste e ao norte do Rio Mississippi. Conseqüentemente, devido ao extensivo comércio de pneus usados transportados por navios, rapidamente se estendeu ao leste da América do Norte. Já na Europa, segundo Romi (2001), este mosquito se difundiu em nove regiões e 30 províncias da Itália na última década, tendo sido introduzido neste país através de embarcações com mercadorias vindas dos Estados Unidos. Mais recente, teve seu primeiro registro na Espanha durante o mês de agosto de 2004, na cidade Sant Cugat del Vallès (ARANDA et al., 2006).

Aedes albopictus vem se espalhando normalmente pelos países da América Central e do Sul. Foi registrado no México em 1988, e teve seu primeiro

registro na Argentina, em março de 1998, na cidade de San Antonio, província de Misiones (ROSSI et al., 1999). No continente sul americano alastrou-se a partir da mesma década do ocorrido na América do Norte. No Brasil, seus primeiros registros ocorreram no Rio de Janeiro em 1986 (FORATTINI, 1986). Naquele mesmo ano, a espécie já era encontrada nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, e no ano seguinte, no Espírito Santo (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Posteriormente foi encontrado pela primeira vez em Londrina, Paraná, pela FUNASA (Fundação Nacional de Saúde) em 1993. No ano de 2001, por meio de isca humana, foram capturados e identificados exemplares desta espécie na Mata Atlântica, na Praia de Itaguaçu, na Ilha de São Francisco, litoral norte de Santa Catarina (LÖWENBERG-NETO & NAVARRO-SILVA, 2002).

No ano seguinte, em 2002, agentes de saúde, por meio de larvitampas, detectaram a presença de larvas de *A. albopictus* em criadouros naturais na área urbana do município de Medicilândia, no estado do Pará, que posteriormente foi confirmada pela equipe técnica do Instituto Evandro Chagas (SEGURA et al., 2003). No ano de 2005, durante as atividades de campo de rotina do programa de controle da dengue, foram detectados espécimes desses mosquitos no estado do Ceará (MARTINS et al., 2006).

No Estado do Amazonas foi encontrada pela primeira vez em junho de 1996, nas intermediações de Tabatinga, onde apesar dos esforços do serviço de vigilância entomológica, sua disseminação não foi impedida (VELEZ et al., 1998), tendo sido registrada sua ocorrência no município de Manaus pela primeira vez em agosto de 2002 (FÉ et al., 2003).

Segundo Gomes et al. (1999), devido sua rápida dispersão essa espécie vem demonstrando elevada capacidade para utilizar uma ampla variedade de

criadouros artificiais, sem abandonar ecótonos naturais, Os locais para as posturas têm como característica comum a superfície rugosa e o ambiente escuro, que de maneira genérica, correspondem aos oferecidos pelos pneus, sendo estes citados anteriormente como principal veículo de ovos desse mosquito pelo mundo. Quanto aos criadouros naturais, foram encontrados abrigando as formas imaturas, ocos de árvores, tocos de bambus, bromélias, buracos em rochas e no solo.

A sobrevivência das larvas e o período de desenvolvimento dessas formas sofrem influência de acordo com a temperatura e precipitação pluviométrica, assim como a disponibilidade de nutrientes. Calado & Silva (2002) estudaram o desenvolvimento das formas imaturas (ovo, larva e pupa) de colônias de *A. albopictus* mantidas em laboratório no estado do Paraná em diferentes temperaturas, e concluíram que o aumento da mesma leva à diminuição do período de desenvolvimento de todos os estádios imaturos. Em condições naturais, a faixa de temperatura mais adequada para o desenvolvimento dessa espécie em criadouros naturais ou artificiais varia nos limites de 17°C a 23°C (GOMES et al., 1995).

A produtividade de criadouros tem sido incorporada aos estudos sobre esses vetores, pois as identificações desses recipientes, bem como sua produtividade, permitem que fossem mais bem direcionadas as ações de vigilância e controle (BRITO & FORATTINI, 2004). O controle desta distribuição é realizado com ajuda da FUNASA, que recebe de todos os Estados brasileiros, por intermédio do Sistema de Informação de Febre Amarela e Dengue (FAD), dados sobre informações de *Aedes aegypti* e *A. albopictus*. Entretanto, esta última não é espécie-alvo nos programas de controle de dengue, fato este que pode interferir quanto à sua notificação pelos estados brasileiros. Assim, no estudo de atualização de sua

distribuição até o ano de 2002, observou-se sua presença em 20 dos 27 estados brasileiros (SANTOS, 2003).

I. 2. Importância Médica

A dengue é uma doença infecciosa causada por um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, que ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais do mundo, inclusive no Brasil. As epidemias geralmente ocorrem no verão, durante ou imediatamente após períodos chuvosos. Existem quatro tipos diferentes de vírus do dengue: 1, 2, 3 e 4. No Brasil, circulam os tipos 1, 2 e 3, e este último foi detectado desde dezembro de 2000, tendo sido isolado em janeiro de 2001 no Estado do Rio de Janeiro. O dengue pode ser transmitido por fêmeas de mosquitos culicídeos pertencentes ao gênero *Aedes*, sendo o *A. aegypti* o mais importante transmissor da doença, por ser de fácil propagação, devido à sua antropofilia e seus hábitos urbano-domésticos (FORATTINI, 1965; FIGUEIREDO, 1994; MS/FNS, 1994), que picam durante o dia, ao contrário dos anofelinos, que picam durante a noite. Esta hematofagia somente ocorre com os adultos fêmeas.

Sob o ponto de vista epidemiológico, os mosquitos da família Culicidae desempenham papel significativo na transmissão de infecções virais. São responsáveis por cerca de metade das enfermidades causadas pelo gênero *Flavivirus* (SERPA, 2004). Os transmissores de dengue, principalmente o *A. aegypti*, proliferam-se dentro ou nas proximidades de habitações (casas, apartamentos, hotéis, etc) em qualquer depósito de água limpa (caixas d'água, cisternas, latas, pneus, cacos de vidro, vasos de plantas). As bromélias, que acumulam água na

parte central (aquário), também podem servir como criadouros. A transmissão do dengue é mais comum em cidades, mas também pode ocorrer em áreas rurais.

Na Ásia, *A. albopictus* tem sido incriminado como um dos mais importantes vetores de dengue e febre amarela. Hotta (1998) considera que essa espécie foi a principal vetora de epidemias de dengue decorrentes no Sul do Japão, nos anos de 1942 a 1944. Mitchell et al. (1987), estudando linhagens de *A. albopictus*, em Houston, nos Estados Unidos, demonstraram em laboratório, a eficiência vetorial deste mosquito para os quatro sorotipos virais do dengue.

Apesar de não ter sido ainda incriminada como transmissora de arboviroses no Brasil, estudos laboratoriais demonstram a capacidade vetorial dessa espécie para os quatro sorotipos do dengue (MILLER & BALLINGER, 1988), onde ela pode se tornar ponte entre ciclos urbanos e silvestres de febre amarela, dengue e outras arboviroses (GOMES et al., 1999). Na América do Norte, também em condições laboratoriais, conseguiu-se isolar os vírus Potosi e da encefalite eqüina do tipo leste (MITCHELL, 1991).

A análise genética veio sugerir que tanto as populações de *A. albopictus* dos Estados Unidos como as brasileiras foram originadas do Japão (KAMBHAMPATI et al., 1991). Este fato ressalta a importância epidemiológica desta espécie, pela possibilidade de vir a ser vetora de doenças nas Américas.

Sua capacidade vetorial no continente asiático e facilidade de dispersão geram grande preocupação aos Órgãos de Saúde quanto à presença dessa espécie no Brasil, e especialmente na bacia amazônica.

I. 3. Técnicas Moleculares e a Variabilidade Genética em *Aedes*

Devido à sua relevante importância e a padronização de técnicas moleculares, vários estudos em genética de populações, citogenética e biologia molecular têm sido realizados em mosquitos vetores de doenças (RAI et al., 1974). Os marcadores isoenzimáticos vêm sendo utilizados para a determinação da variabilidade genética de mosquitos vetores de doença. Santos et al. (2005) analisaram dezoito loci enzimáticos em espécimes larvais de *Anopheles intermedius* e *Anopheles mattogrossensis*, para estimar a variabilidade e diferenciação genética entre estas espécies, na Amazônia brasileira. Costa-Ribeiro et al. (2006) utilizaram dez sistemas enzimáticos, e encontraram níveis elevados de diferenciação genética entre populações de *A. aegypti* do Rio de Janeiro.

A localização de genes de competência vetorial e de resistência a inseticidas, pode ser feita com o auxílio da citogenética molecular. Campos et al. (2003) realizaram a padronização de técnicas de preparo de cromossomos politênicos, retirados dos tubos de Malpighi de formas imaturas de *A. aegypti*.

Da mesma forma que *A. aegypti*, *A. albopictus* possui importância epidemiológica relevante, com alguns atributos experimentais: simplicidade na manutenção em laboratório, alto potencial reprodutivo, curto período de geração e a estocagem de ovos por longo período.

Por meio de estudos utilizando seqüências de DNA, foi possível conhecer a estrutura genética de populações de vários mosquitos em nível intra e interespecíficos, assim como identificar espécies crípticas, que são muito comuns nesses grupos de insetos. Sousa et al. (2001) utilizaram a técnica de RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA – Polimerase Chain Reaction*) para estudar

relações genéticas entre populações de *A. aegypti* da Argentina. Dessa forma, vários marcadores moleculares vêm sendo utilizados pelos geneticistas tanto em estudos na investigação da variabilidade genética, quanto em diagnósticos moleculares.

As análises de PCR têm-se mostrado uma ferramenta muito eficaz na identificação de várias espécies pertencentes a complexos de espécies de mosquitos. Xu et al. (1998) demonstraram que a amplificação do DNA ribossomal, através da PCR, tem ajudado muito na identificação de espécimes do complexo *Anopheles dirus*.

Dentre os marcadores moleculares, a técnica de RAPD-PCR, que é uma variação da técnica de PCR desenvolvida por Williams et al. (1990), se caracteriza por utilizar um “primer”, ao invés de um par de “primers”, sendo este arbitrário, e amplificar regiões desconhecidas da molécula de DNA, empregadas para verificar regiões de polimorfismo genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Sousa et al. (1999), através dessa técnica, estimaram um grau de polimorfismo aproximadamente três vezes maior que o valor obtido com aloenzimas, em seis populações de *Aedes albifasciatus* da Argentina.

A variabilidade genética é uma condição fundamental para que haja evolução adaptativa de uma espécie, uma vez que a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações, em função da adaptação ao ambiente (HARTL, 1981). As primeiras evidências da variação genética em populações foram observadas em *Drosophila*, por meio de variantes enzimáticas associadas a métodos eletroforéticos. Vários trabalhos já foram realizados utilizando outros marcadores moleculares para análise da variabilidade genética em espécies de mosquitos do gênero *Aedes*.

Townson (1969) realizou os primeiros estudos sobre padrões eletroforéticos em *A. aegypti*, com o uso de isoenzimas em eletroforese de gel de poliacrilamida, descrevendo a variabilidade genética em três regiões de esterases de mosquitos coletados em Liverpool. Tabachnick & Powell (1976) foram os pioneiros em trabalhos desenvolvidos com *A. aegypti* envolvendo genética de populações. Neste estudo, analisaram 22 locos enzimáticos em três populações desse mosquito, coletadas em diferentes vilas no Quênia e observaram nove locos monomórficos, concluindo que havia diferenças significativas nas frequências gênicas de vários locos entre as populações.

Lourenço-de-Oliveira et al. (2003) utilizaram a análise isoenzimática para verificar a diversidade genética e o padrão no fluxo gênico em populações de *A. albopictus* do Brasil, dos Estados Unidos e das Ilhas Cayman. Os dados obtidos mostraram elevada diferenciação genética estabelecida entre as populações brasileiras e as americanas, e a taxa de infecção com vírus da dengue e da febre amarela revelou maior diferenciação entre as duas populações brasileiras, do que entre as populações americanas.

Estudos com RAPD, para detectar a diferenciação e variabilidade genética nesse grupo de mosquitos também vêm sendo feitos. Ayres et al. (2003) encontraram grandes diferenças genéticas entre 15 populações de *A. aegypti* em cinco Estados do Brasil. Estudos para estimar relações genéticas entre populações desta mesma espécie na Argentina demonstraram pouca diferenciação entre suas populações, considerando que ovos, larvas ou pupas deste inseto podem ser facilmente transportadas, podendo assim facilitar a troca de fluxo gênico entre as populações (SOUSA et al., 2001).

Santos et al. (2003), visando entender o padrão de infestação do *A. aegypti*, utilizaram RAPD para analisar a diferenciação genética desta espécie de diferentes regiões geográficas do Estado de São Paulo. Com os resultados obtidos verificaram que a origem de infestação permanece obscura, mas certamente está relacionada a mosquitos de origens diferentes daqueles que infestaram a região oeste e norte do Estado, na década de 1980.

Ballinger-Crabtree et al. (1992) utilizaram esta técnica para identificar e diferenciar populações de *A. aegypti* de 11 regiões geográficas. A análise da frequência dos fragmentos de RAPD, produzidos na população por três “primers” diferentes, permitiu discriminação exata de 80% dos indivíduos entre populações geográficas e 100% entre subespécies (*A. aegypti* x *A. aegypti formosus*).

II – OBJETIVOS

Considerando a importância epidemiológica de *A. albopictus*, o presente estudo tem por objetivo estudar a variabilidade genética em populações dessa espécie, procedentes de quatro localidades do Estado do Amazonas visando conhecer a estrutura e a constituição genética de suas populações, por serem requisitos essenciais para implementar estratégias de controle desse vetor. O projeto tem como objetivos específicos:

- Caracterizar geneticamente as populações por meio de RAPD-PCR;
- Determinar o nível de variabilidade e diferenciação genética entre as populações;
- Determinar os índices de similaridade e distância genética entre as populações a partir do índice de Nei (1978), para inferir os possíveis processos evolutivos relacionados à introdução, adaptação e dispersão do *A. albopictus* no Estado do Amazonas.

III – MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em três fases complementares. Na primeira, foi efetuada coleta dos espécimes em excursão a campo, na segunda, levantamento bibliográfico visando fundamentação teórica e na terceira, análise do material em laboratório, conforme a descrição a seguir.

III. 1. Área de Estudo

Tabatinga está localizada no meio da selva amazônica, na margem esquerda do Rio Solimões, faz fronteira com a Colômbia e o Peru, sua temperatura oscila entre 25° e 32°C. Possui uma área de 3.225 Km² (IBGE, 2007). Segundo a Fundação Nacional de Saúde (1996), o primeiro registro de *A. albopictus* no Estado do Amazonas, ocorreu nesta localidade em 1996 (Figura 1).

A cidade de Manaus está situada à margem esquerda do Rio Negro, próximo ao encontro com as águas do Rio Solimões no centro geográfico da Amazônia (3° 08' 07" latitude sul, 60° 01' 34" longitude oeste) numa área de 11.401 Km², com uma população estimada no Censo em 01.07.2006, de 1.688,524 habitantes (IBGE, 2007). Apresenta características de clima equatorial quente e úmido, com temperaturas médias anuais sempre acima de 22°C, chuvas abundantes (2.500 mm), intensa radiação, elevada umidade do ar e baixas velocidades de ventos. Nesta região, destacam-se duas estações: o maior período com precipitação pluvial que é o “inverno regional”, compreendendo os meses de janeiro a abril; e o período mais seco “verão amazônico”, de junho a novembro.

A ocorrência de invasões na periferia da cidade de Manaus se dá devido à sua expansão, ocasionando o surgimento e o crescimento de áreas

urbanizadas em ambientes, até então, naturais. Nestas áreas, a falta de serviços essenciais de saneamento básico, a precariedade das residências e a proximidade da mata propiciam o acúmulo de artefatos de uso humano descartados no ambiente, contribuindo para proliferação de mosquitos, aumentando desta maneira, o contato homem-vetor, possibilitando a transmissão de doenças nesses locais (TADEI, 2001).

Diante do exposto, três bairros localizados em áreas urbanas e periurbanas da cidade de Manaus, Estado do Amazonas, foram selecionados para as coletas de larvas: Compensa, Colina do Aleixo e Cidade Nova (Figura 2), no período de maio a novembro de 2004, e maio a julho de 2005.

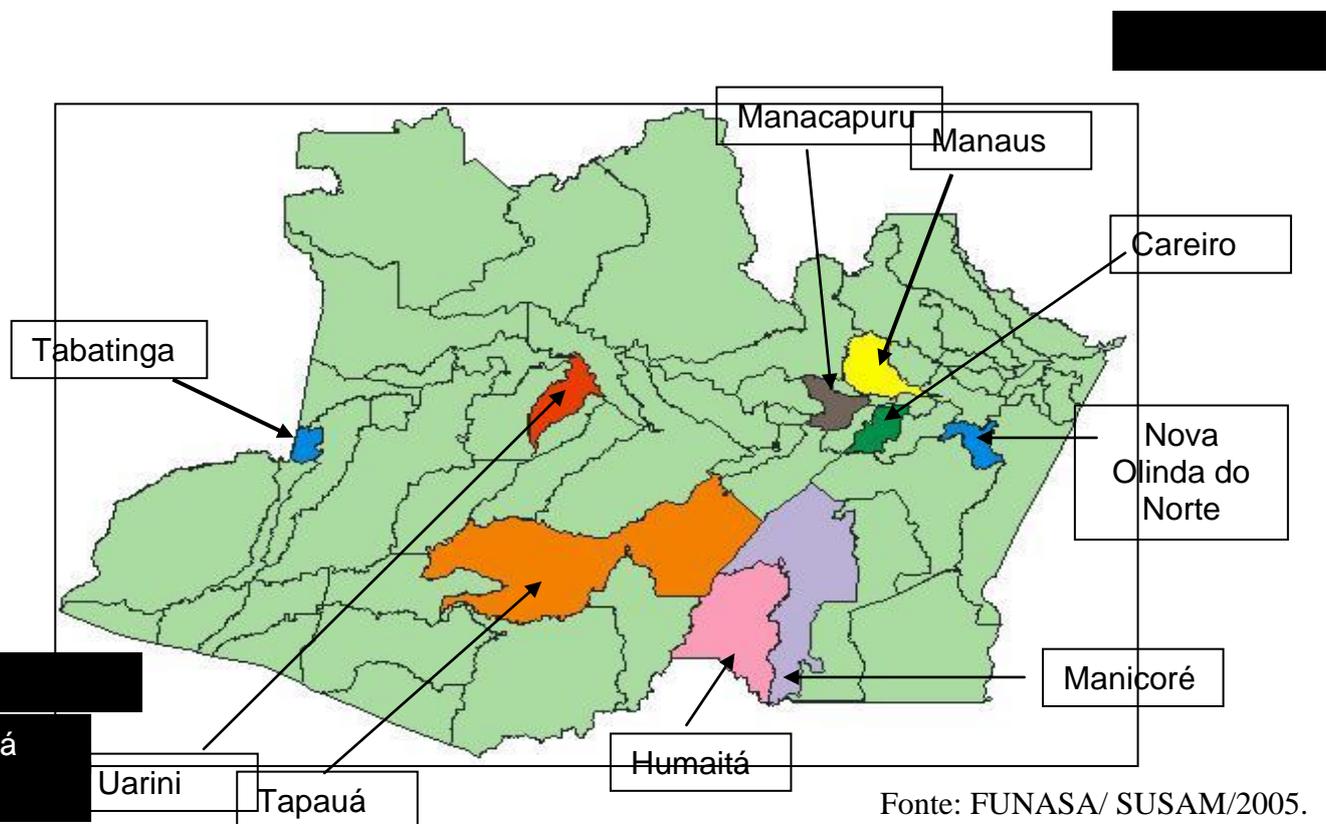
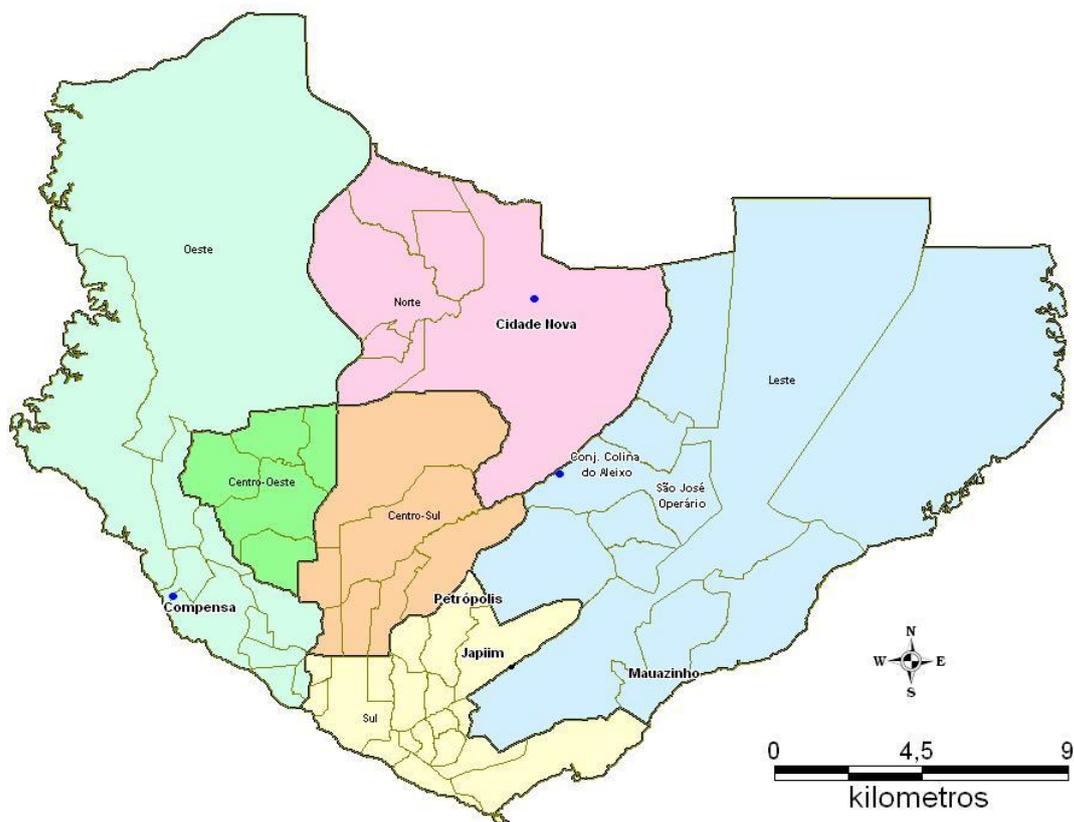


Figura 1. Distribuição de *A. albopictus* no Estado do Amazonas.



Fonte: ASTEC/FVS/AM – INPA 2006

Figura 2. Mapa da cidade de Manaus por zona e bairros, com a localização dos pontos de coletas.

III. 2. Obtenção das Amostras

Para coleta de larvas e pupas de *A. albopictus* foram utilizadas armadilhas que consistem de pneus cortados horizontalmente pela metade e preenchidos com água em 2/3 de sua capacidade (Figura 3), de modo a deixar uma superfície interna da parede para desova. Estas armadilhas foram instaladas em locais sombreados, úmidos e com vegetação a uma altura de aproximadamente 80 cm do solo. As inspeções ocorreram semanalmente para a coleta das formas imaturas dos mosquitos. Em cada área foram instaladas cinco a seis armadilhas, distribuídas ao longo da extensão da mata e em residências nas áreas urbanas.

Larvas e pupas de *A. albopictus* foram coletadas nos horários de 7h30 às 11h30 da manhã. Os espécimes foram capturados com auxílio de uma peneira de

malha fina, sendo em seguida transportados para uma bacia coletora e pipetados para frascos de boca larga com parte da água do criadouro. A água das armadilhas dos pneus foi completada quando estava abaixo do nível indicado e trocada quando apresentava excesso de material orgânico. Os materiais externos, como galhos e folhas, dentre outros, que caíam dentro das armadilhas eram retirados, quando estes dificultavam a coleta das larvas. Os frascos foram acondicionados em uma caixa térmica de poliestireno e transportados até o insectário do Laboratório de Vetores da Malária do INPA.

Larvas e pupas foram mantidas em cubas esmaltadas de 16 cm de diâmetro, por 6 cm de altura e cobertas com filó, preso por um elástico, até a emergência dos adultos (Figura 4.A). Após sua emergência, os adultos foram transferidos com auxílio de um aspirador entomológico manual para uma gaiola com armação de madeira e coberta com tela de náilon nas laterais, onde ocorreram os cruzamentos aleatórios (Figura 4.B). Os machos foram alimentados em solução de sacarose a 10% e o repasto sangüíneo das fêmeas foi realizado em um hamster (*Mesocricetus auratus*). Em seguida, as fêmeas foram isoladas para postura individual, em copos plásticos contendo papel de filtro umedecido, e após a oviposição (Figura 4.C), foram identificadas por meio da chave de Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

As larvas de cada desova foram transferidas para cubas esmaltadas individuais e mantidas até o estágio adulto, segundo a metodologia utilizada por Santos et al. (1981). Larvas de 4º estágio, pupas e adultos foram mantidos sob congelamento em um freezer a -70°C , até as análises moleculares.



Figura 3. Armadilhas de pneus cortados horizontalmente pela metade e preenchidos com água em 2/3 de sua capacidade.



Figura 4. Manutenção de *A. albopictus* no insectário. A - Cuba esmaltadas contendo larvas; B – Gaiola de madeira contendo machos e fêmeas; C – copos plásticos com fêmeas isoladas para a desova.

III. 3. Extração do DNA Genômico

Para a extração do DNA foram utilizados os procedimentos de Williams et al. (1990) e Wilkerson et al. (1995), com algumas modificações. Na tabela 1 estão representadas as Soluções e tampões, com seus respectivos reagentes, utilizados nas análises moleculares.

Cada mosquito foi homogeneizado em 50 µL de tampão de lise – TL com um bastão de acrílico, em microtubos de 1,5 ml. Adicionou-se 100 µL de TL para remover resíduos das paredes do tubo e do bastão. Os tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos e centrifugados a 14000 rpm por 30 segundos. Adicionou-se 100 µL de acetato de potássio. O material é deixado em gelo por 1 hora. Após novamente centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos, o material foi transferido para um microtubo de 0,5 mL onde adicionou-se 2 volumes (500 µL) de etanol absoluto e deixa-se a -20°C por 1 hora (ou “over night”).

Novamente o material foi centrifugado a 14000 rpm por 30 minutos. Adicionou-se 500 µL de etanol a 70% e centrifugou-o novamente a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o material precipitado foi secado. O precipitado após ter sido resuspendido em 15 µL de água milli-Q autoclavada, foi estocado a temperatura de -20°C.

III. 4. Quantificação do DNA Genômico

As quantificações do DNA foram determinadas em um espectrofotômetro específico de DNA, marca Pharmacia, modelo Gene Quant Pro, com absorvância entre 260 e 280 nm e diluição de 1:35 para 10 ng/µL em água milli-

Q autoclavada. Os resultados das concentrações, de cada amostra de DNA extraído, foram interpretados e os cálculos de diluição foram feitos segundo a fórmula: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, onde C_1 é a concentração inicial, obtida a partir do espectrofotômetro, V_1 é o volume total do DNA extraído, C_2 é a concentração final desejada de 10 ng, e V_2 é o volume final a ser encontrado.

III. 5. Marcadores RAPD

A desvantagem do caráter dominante dos marcadores RAPD é superada por inúmeras vantagens, como: facilidade de uso, baixo custo, utilização de pouca quantidade de DNA genômico, geração de grande quantidade de polimorfismo amostrado e possibilidade de automatização. Para esse estudo foram selecionados nove oligonucleotídeos que apresentaram boa reprodutibilidade e nitidez, sendo estes: OPAB 05: 5'- CCCGAAGCGA - 3'; OPAB 07: 5'- GTAAACCGCC -3'; OPAB 10: 5'- TTCCCTCCCA -3'; OPAB 12: 5'- CCTGTACCGA - 3'; OPAB 14: 5'- AAGTGCGACC -3'; OPAB 16: 5'- CCCGGATGGT -3'; OPAB 17: 5'- TCGCATCCAG -3'; OPAB 18: 5'- CTGGCGTGTC -3'; OPAB 19: 5'- ACACCGATGG - 3'. Cada "primer" foi ressuspendido numa concentração de 10 ng/ μ l em água milli-Q autoclavada e armazenado a -20°C .

III. 5.1. Amplificação do DNA e Eletroforese

Para a detecção de fragmentos polimórficos de DNA através da técnica RAPD-PCR, foi utilizado o DNA de uma larva de cada postura. As amplificações foram feitas conforme os procedimentos de Williams et al. (1990) e Wilkerson et al.

(1995), com algumas modificações, onde o DNA do mosquito de cada população amostrada foi amplificado em termo-ciclador marca Perking-Elmer, programado para 45 ciclos, com as seguintes etapas: desnaturação das fitas de DNA (1 minuto a 94°C), anelamento dos primers (1 minutos a 36°C), alongamentos das fitas sintetizadas (2 minutos a 72°C), um ciclo de alongamento final (7 minutos a 72°C).

Os produtos amplificados foram fracionados em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídio (5 ng/ μ L). Em seguida, foram visualizados e fotografados em um aparelho de fotodocumentação de gel, modelo Eagle Eye II (Stratagene) com luz ultravioleta de 300 nm de comprimento de onda.

Tabela 1. Soluções - tampões, com seus respectivos reagentes utilizados nas análises moleculares.

Solução	Reagentes
Tampão de Extração	1% SDS; 50mM Tris-HCl, pH 8; 25mM EDTA, pH 8; 25mM de NaCl
Álcool 70%	Álcool Etanol absoluto Água Milli-Q autoclavada
Solução de dNTP	Concentração igual a 20 mM. Diluídos em água Milli-Q autoclavada visando obter concentração estoque de 2,5 mM.
Tampão Tris-EDTA-Borato (TBE 10X) pH 8,3	Tris Base Ácido Bórico EDTA Água estéril
Gel de Agarose 1,5% (p/v)	Agarose UltraPure TM (Invitrogen) Tampão TBE (1X)
Solução de Brometo de Etídio	Foi feito uma solução estoque de 10 ng/ml. Em seguida foi retirado 200 µl desta solução e adicionado em 2 L de água.
Solução de “primers” (Oligonucleotídeos Iniciadores)	Diluídos em água Milli-Q autoclavada, com concentração estoque de 10 ng/µl

III. 6. Análise Estatística

As bandas nos géis corados com brometo de etídio foram contadas por comparação, utilizando-se o critério de ausência e presença das bandas. Os fragmentos foram selecionados e os tamanhos dos pares de bases, determinados para cada fragmento. Marcadores de RAPD são tratados como alelos mendelianos do tipo dominante. Nesse caso, é impossível a estimativa direta das frequências alélicas. Os dados de RAPD são de natureza binária (presença ou ausência de bandas) e a partir das matrizes (binárias) são calculados os coeficientes de similaridade. Embora a técnica de RAPD tenha limitações, como a de não poder identificar genótipos heterozigotos de homozigotos dominantes, seu poder de detecção de polimorfismo é uma vantagem significativa para a determinação da variabilidade genética.

Para a análise da variabilidade genética das quatro populações de *A. albopictus* foi utilizado o Programa *Tools for Population Genetics Analyses* (TFPGA) na Opção – Marcadores Dominantes para Organismos Diplóides (MILLER, 1997). Nesse caso, cada banda é assumida como sendo um loco. A presença da banda representa o genótipo dominante, logo, este contém os dois genótipos (homozigoto dominante e heterozigoto), enquanto a ausência da banda representa o genótipo homozigoto recessivo. A estimativa da frequência alélica foi obtida da raiz quadrada das frequências de bandas ausentes observadas.

III. 6.1. Estimativa do Número de Locos Polimórficos e Heterozigosidade Média

A quantidade de variação existente em uma população natural pode ser expressa numericamente pela proporção de locos polimórficos, ou simplesmente o polimorfismo da população (AYALA & KIGER, 1984). Via de regra a definição de loco polimórfico é baseada em dois critérios: um que considera o alelo mais comum com frequência igual ou inferior a 0,99 (MORTON et al., 1966) e o outro que leva em conta o alelo mais freqüente com frequência igual ou menor que 0,95 (AYALA, 1982). Para os cálculos da proporção de locos polimórficos foi utilizado o programa TFPGA (MILLER, 1997), e o critério adotado foi o que considera o alelo mais comum com frequência igual ou menor que 0,95.

A heterozigosidade, medida de diversidade genética, pode se aplicar a diferentes níveis de classificação hierárquica, como populações dentro de uma região geográfica. A heterozigosidade média observada (H_o) foi obtida pela média aritmética das proporções do número total de heterozigotos em relação ao número total de indivíduos entre os locos analisados. A heterozigosidade esperada (H_e) não viesada calculada por:

$$\hat{H}_e = 2n(1 - \sum \hat{x}_i^2) / (2n - 1)$$

onde n é o número de indivíduos amostrados, x_i é a frequência populacional do i -ésimo alelo de um loco, fazendo-se a média aritmética entre os locos estudados, (NEI, 1978). As heterozigosidades médias observadas e esperadas de cada população foram também estimadas pelo programa TFPGA (MILLER, 1997), que

adota o critério de que todas as populações estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

III. 6.2. Análise da Estrutura Genética Populacional

O coeficiente F é também chamado de “índice de fixação” e está relacionado com o grau de endocruzamento. Sua interpretação é baseada no modelo de Wright (1951) que é um modelo de estrutura populacional, onde a população total está subdividida em demes ou subpopulações que podem encontrar-se isolada ou não. A estatística de F baseia-se na probabilidade de se obter o mesmo alelo por amostragem em uma população diplóide finita com N indivíduos. Essa probabilidade é de $1/(2N)$. Conseqüentemente, uma proporção $1/(2N)$ dos zigotos formados será portadora de alelos idênticos por descendência em cada loco, em função simplesmente do tamanho efetivo da população.

O F_{st} mede o grau de diferenciação genética entre as subpopulações, onde o coeficiente de ancestralia (“ θ ”) representa a probabilidade de que dois indivíduos pertencentes à subpopulações diferentes possuam um alelo idêntico por descendência (ou seja, proveniente de um ancestral comum). No entanto, neste caso o valor de “ θ ” será P , o qual indica a diferenciação genética entre as populações, calculado no programa TFPGA (MILLER, 1997).

III. 6.3. Análise de Distância e Similaridade Genética entre as Populações

A análise de distância e similaridade genética foi obtida do programa

TFPGA (MILLER, 1997). A similaridade genética de Nei (1978) se fundamenta na probabilidade de amostrar alelos idênticos entre duas populações, dividida pela probabilidade de amostrar alelos idênticos em cada uma das duas populações. É obtida através da seguinte fórmula:

$$I = \frac{xy}{\sqrt{(x+y)}}$$

Onde x é a frequência do alelo A na população x e y a frequência do mesmo alelo na população y. Se duas populações X e Y são monomórficas para o mesmo alelo, dizemos que a identidade é igual a um. No entanto, quando duas populações X e Y são monomórficas para alelos diferentes, a identidade é igual a zero.

A distância genética entre duas populações é dada pelo negativo do logaritmo neperiano da identidade.

$$D = -1_n I$$

A similaridade segue uma escala de 0 a 1 e a distância de 0 a infinito.

Com base na matriz de distância e similaridade genética entre as populações, foi construído um dendrograma, mostrando o agrupamento das mesmas a partir de suas frequências alélicas. Na construção do dendrograma foi utilizado o método UPGMA (unweighted pairing group method with arithmetic mean) obtido no programa TFGA (MILLER, 1997), que é um modelo de agrupamento hierárquico. Através deste método, as populações com menores distâncias são sucessivamente agrupadas até construir um diagrama hierárquico que representa a proximidade das diferentes populações a diferentes níveis de distância genética (NEI, 1978).

IV. RESULTADOS

IV.1 Análise dos perfis eletroforéticos

Embora a técnica de RAPD tenha limitações, como a de não poder identificar genótipos heterozigotos, seu poder de detecção de polimorfismo é uma vantagem significativa para a determinação da variabilidade genética. Os resultados da análise da variabilidade genética baseada nos perfis de RAPD-PCR, a partir de nove “primers” (iniciadores) revelaram 86 bandas (locos) nas quatro populações, variando entre 320 e 2.100 pb (Tabela 2).

O perfil eletroforético dos dez locos analisados com o “primer” OPAB 05 variou entre 420 a 1900 pb. O fragmento de 800 pb foi detectado em praticamente todos os indivíduos da população da Cidade Nova (Figura 5). Com o “primer” OPAB 07 foram revelados nove locos, apresentando variação entre 670 a 2.100 pb, mas nenhum apresentou especificidade nas populações. Entretanto, o fragmento de 670 pb não foi detectado na população da Compensa (Figura 6). O perfil eletroforético com o “primer” OPAB 10 apresentou 10 locos, com variação entre 380 a 2.100 pb, onde o fragmento de 500 pb não foi revelado na população da Compensa e da Cidade Nova.(Figura 7). Com o “primer” OAB 12 foram detectados oito locos, variando entre 320 a 2.000 pb, dos quais, o fragmento de 1.300 pb foi o mais freqüente nas populações (Figura 8). Dos 12 locos selecionados com o “primer” OPAB 14, não houve nenhum que fosse comum as quatro populações, no entanto, o fragmento de 480 pb não foi observado na população da Colina do Aleixo nem na população da Compensa (Figura 9). O perfil eletroforético com “primer” OPAB 16 revelou nove locos, variando entre 420 a 2.000 pb. Verificou com este “primer” que

nenhum fragmento foi comum às quatro populações (Figura 10). Com o “primer” OPAB 17 revelou nove locos, variando de 580 a 1.600 pb, dos quais, nenhum apresentou especificidade (Figura 11). Dentre os nove locos selecionados, que variaram entre 500 a 2.000 pb, com o “primer” OAB 18, o fragmento de 1.000 pb foi comum em todas as populações. Nenhum loco apresentou especificidade (Figura 12). Os dez locos selecionados com o “primer” OAB 19, variaram entre 460 a 2.000 pb. Com este “primer”, nenhum loco apresentou especificidade, no entanto, o fragmento de 1.250 pb foi o mais freqüente nas quatro populações (Figura 13).

Tabela 2. Número de locos (bandas) por primer obtidos nas quatro populações de *A. albopictus* do Estado do Amazonas.

Primer	Número de locos (bandas)	Varição de pares de bases (pb)
OPAB 05	10	420 a 1.900
OPAB 07	9	670 a 2.100
OPAB 10	10	380 a 2.100
OPAB 12	8	320 a 2.000
OPAB 14	12	400 a 2.000
OPAB 16	9	420 a 2.000
OPAB 17	9	580 a 1.600
OPAB 18	9	500 a 2.000
OPAB 19	10	460 a 2.000
Total: 09	86	Varição total = 320 e 2.100

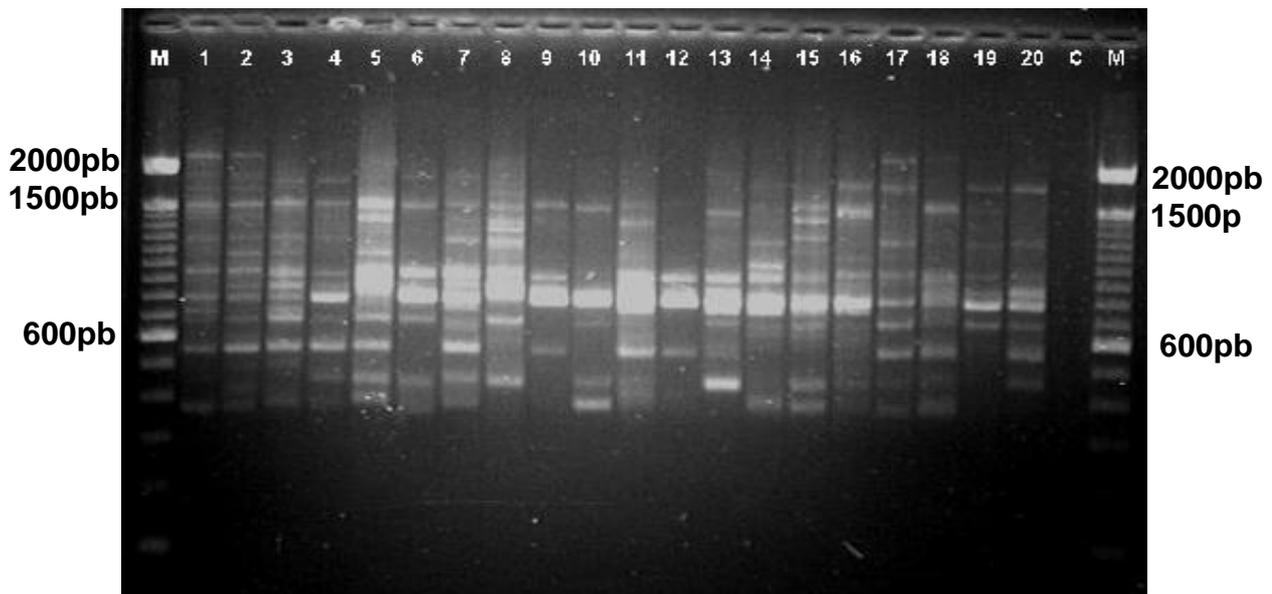


Figura 5. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de *A. albopictus*. Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 05. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).

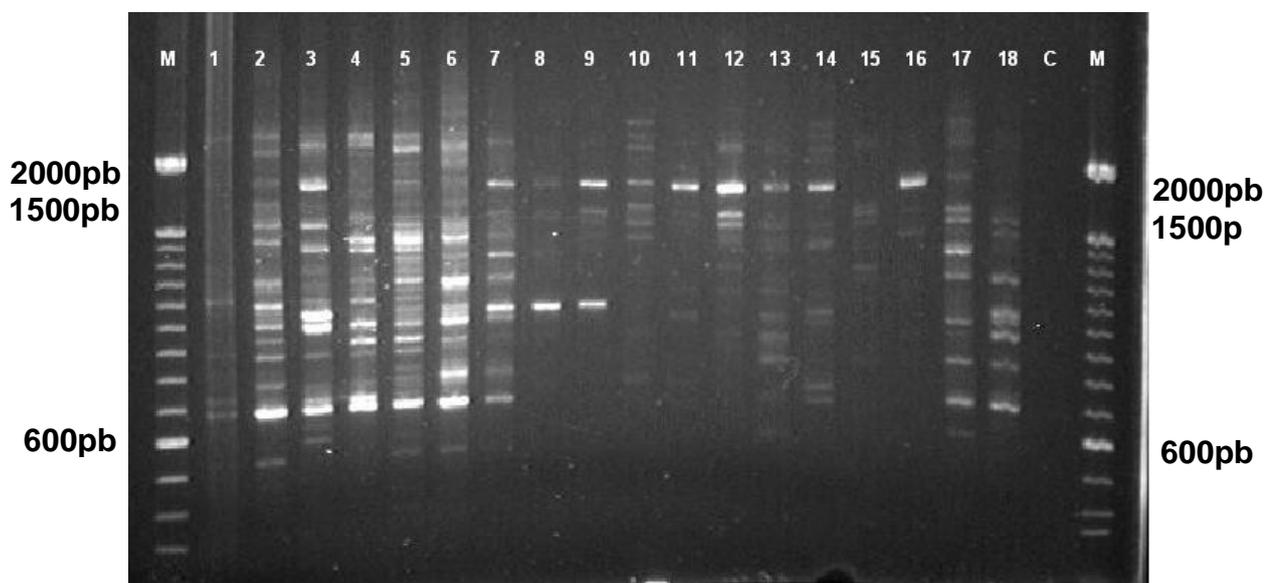


Figura 6. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de *A. albopictus*. Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 07. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).

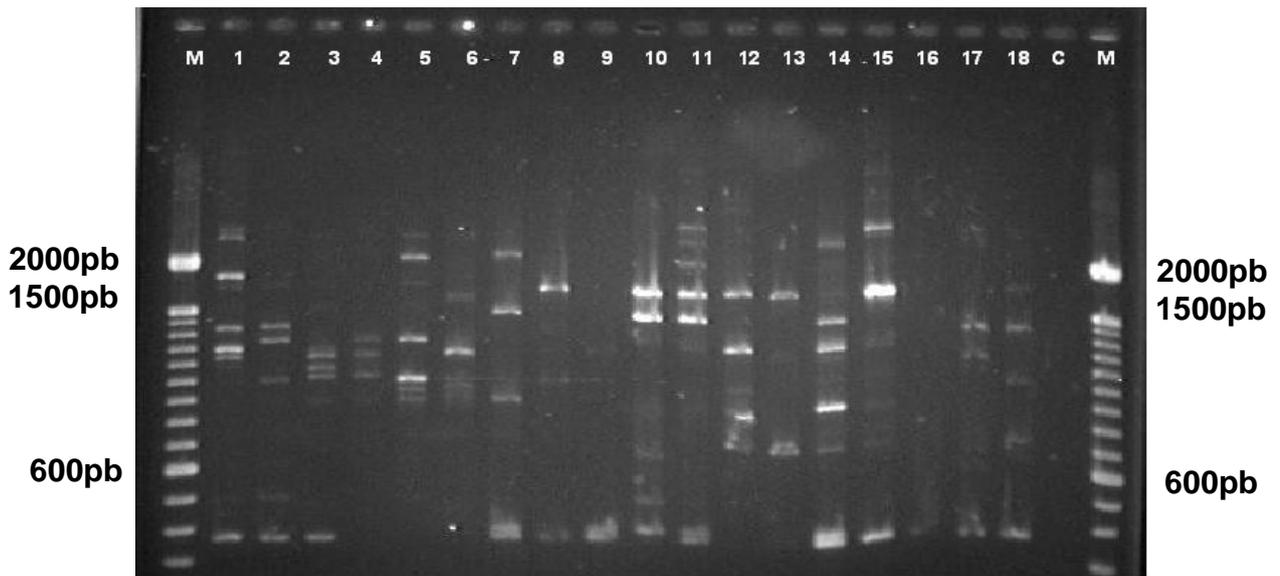


Figura 7. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de *A. albopictus*. Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 10. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).

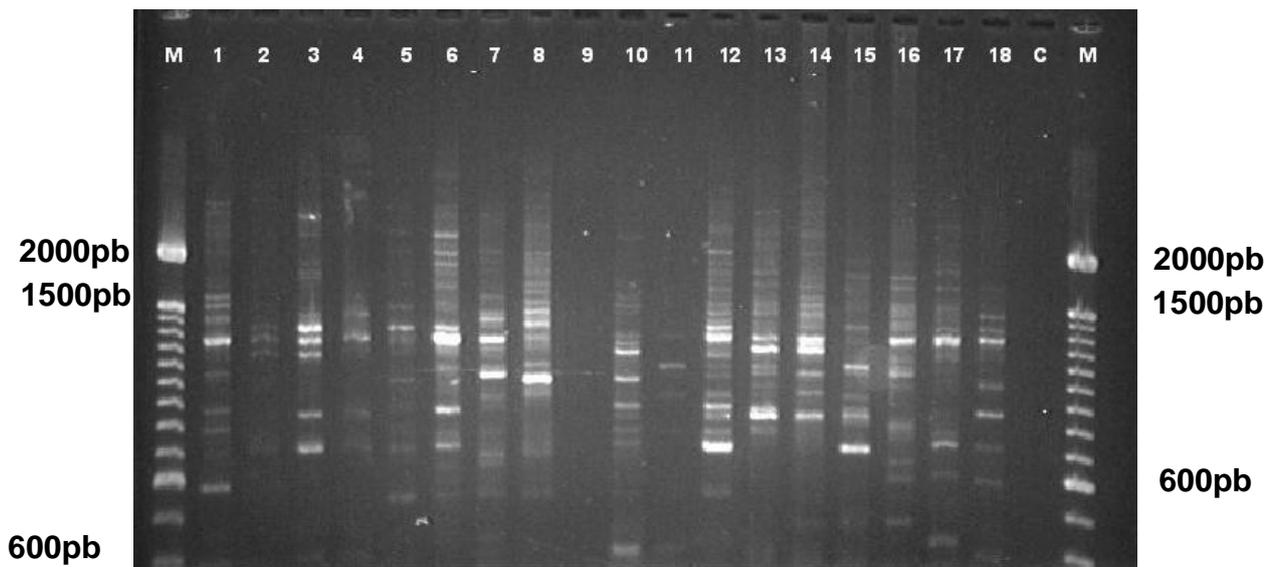


Figura 8. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de *A. albopictus*. Amostras: 1 a 2 (Cidade Nova), 3 a 6 (Tabatinga), 7 a 10 (Colina do Aleixo), 11 a 14 Compensa, 15 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 12. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).

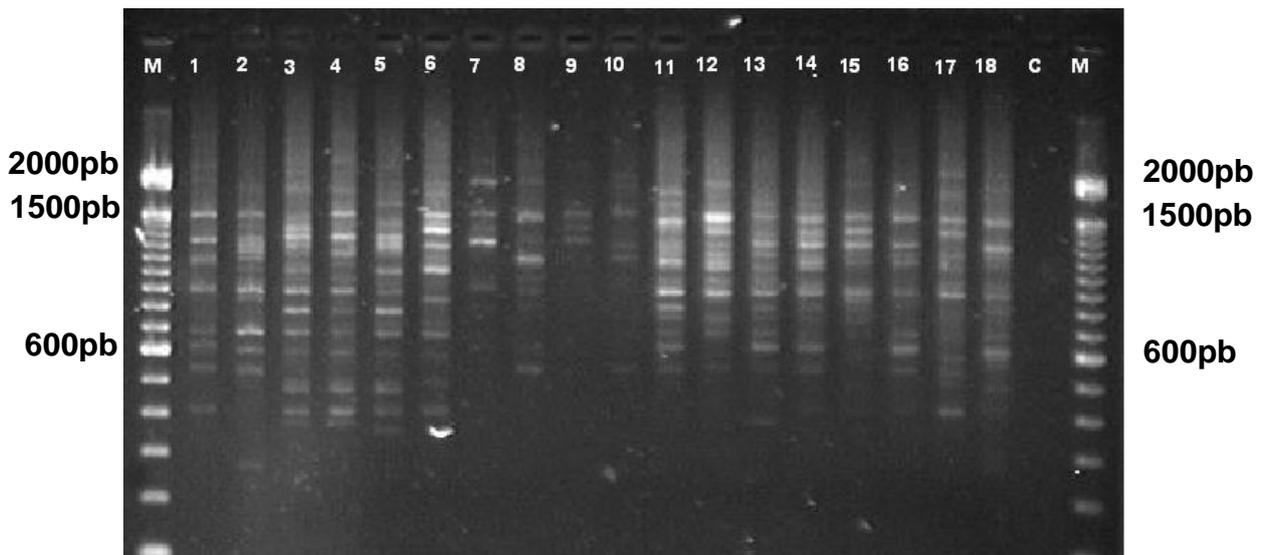


Figura 9. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de *A. albopictus*. Amostras: 1 a 2 (Cidade Nova), 3 a 6 (Tabatinga), 7 a 10 (Colina do Aleixo), 11 a 14 Compensa, 15 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 14. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).

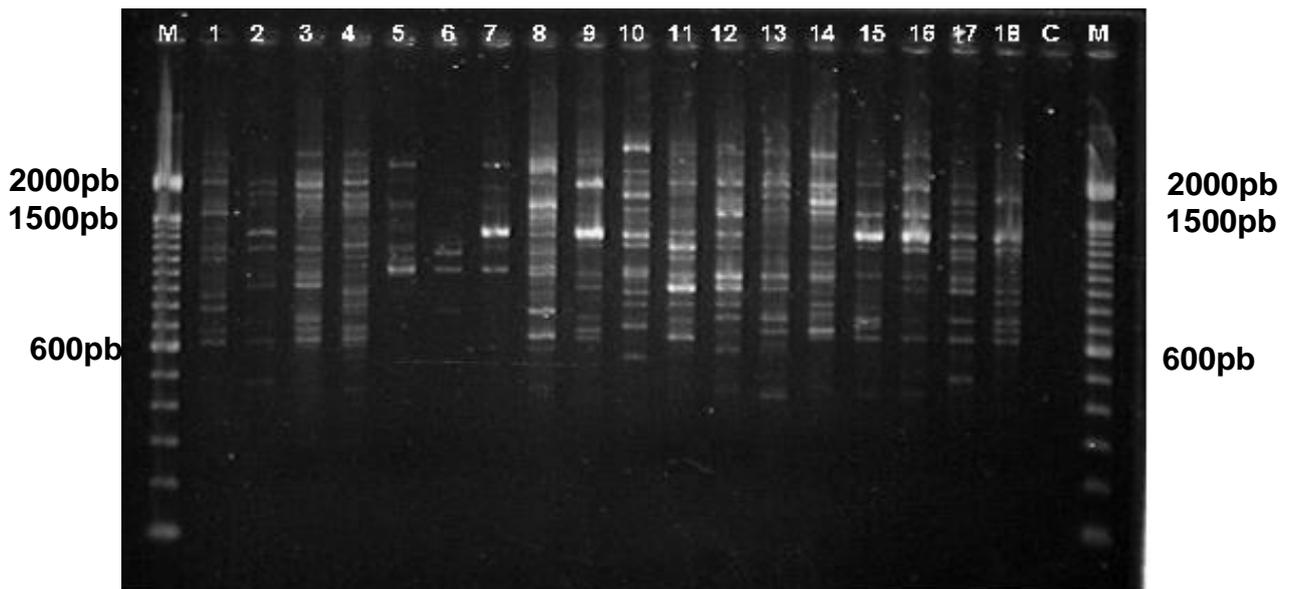


Figura 10. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de *A. albopictus*. Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 16. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).

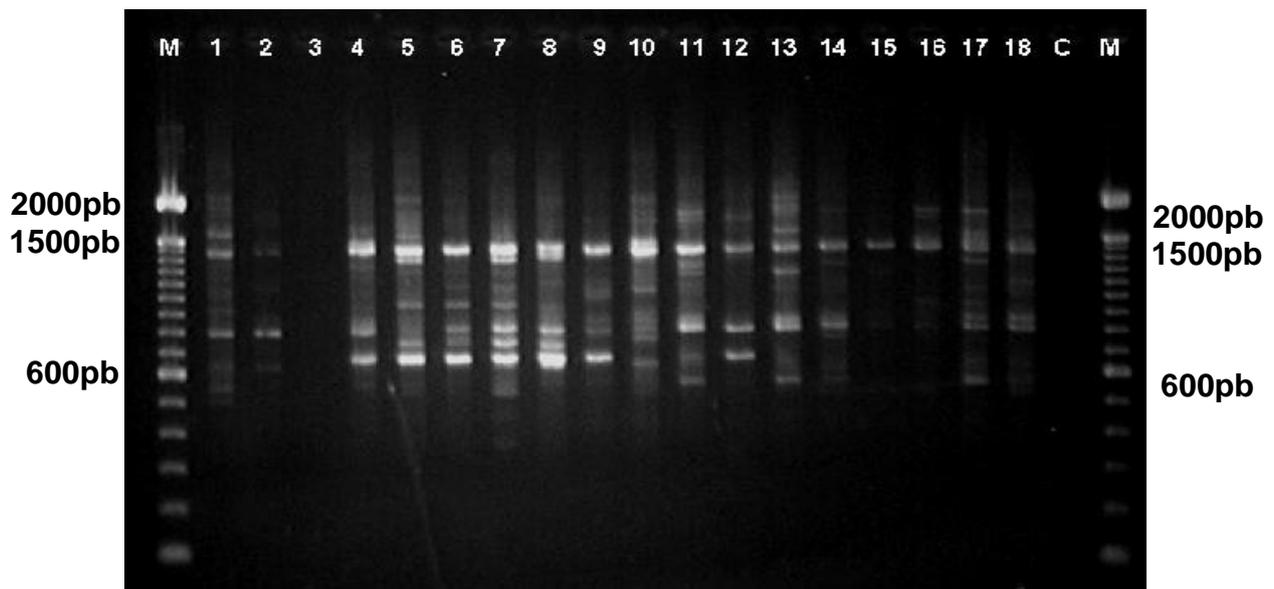


Figura 11. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de *A. albopictus*. Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 17. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).

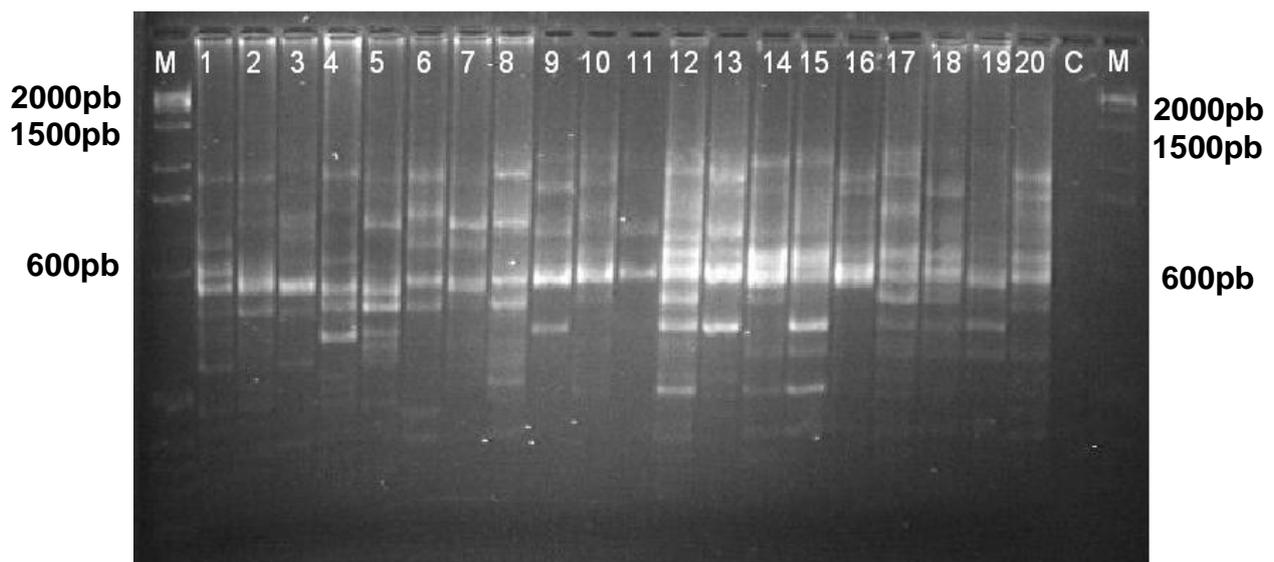


Figura 12. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de *A. albopictus*. Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 20 (Cidade Nova). Primer OPAB 18. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).

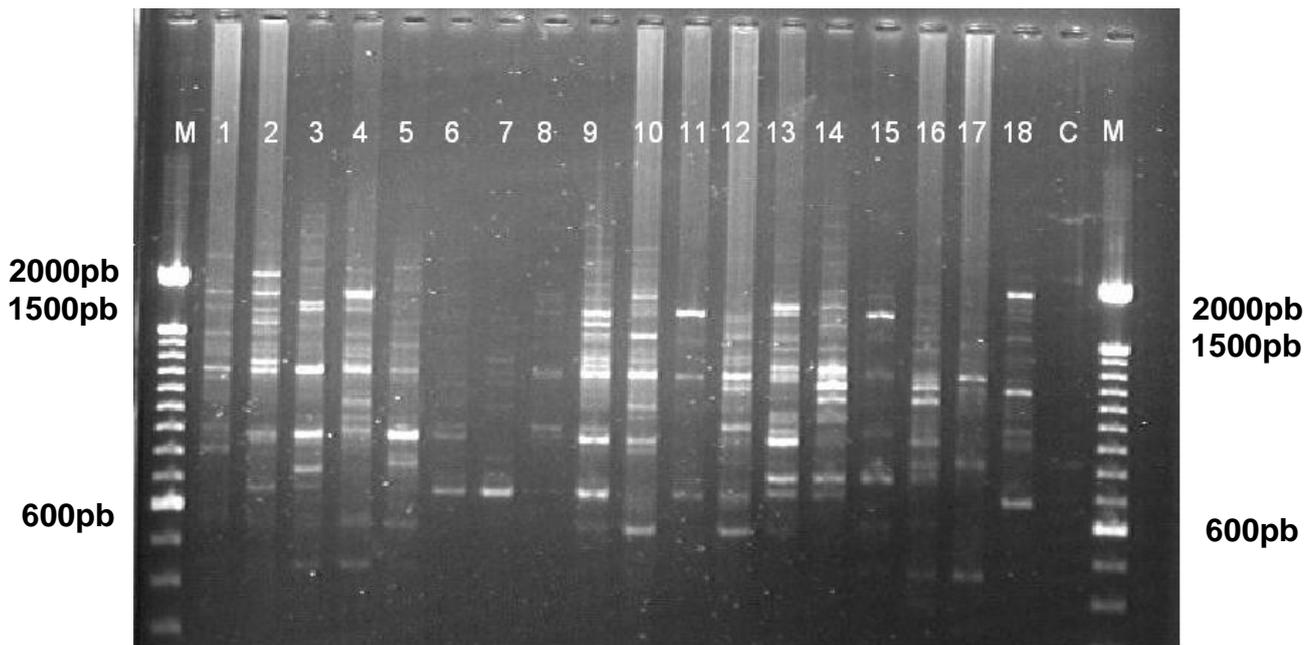


Figura 13. Perfil da variabilidade genética em quatro populações de *A. albopictus*. Amostras: 1 a 4 (Cidade Nova), 5 a 8 (Tabatinga), 9 a 12 (Colina do Aleixo), 13 a 16 Compensa, 17 a 18 (Cidade Nova). Primer OPAB 19. C = Controle e M = marcador molecular (100pb DNA Ladder).

IV.2 Análises Populacionais

IV.2.1. Estimativas das Medidas de Variabilidade Genética

As medidas de variabilidade genética, a percentagem de locos polimórficos e heterozigosidades observadas e esperadas em cada população, estão representadas na tabela 3. Os dados mostram um elevado polimorfismo, cujos valores de locos polimórficos variaram de 91,83 a 100,00. No entanto, as heterozigosidades observadas e esperadas apresentaram valores mais baixos, mesmo assim, considerados elevados para populações desse grupo de mosquitos ($H_o = 0,3122 - 0,3929$; $H_e = 0,3165 - 0,3981$, respectivamente). Das quatro populações analisadas, a de Tabatinga mostrou maior variabilidade genética, tanto

pela percentagem de locos polimórficos ($P = 100,00$), quanto pelas heterozigosidades ($H_o = 0,3929$; $H_e = 0,3981$). A menor variabilidade genética foi detectada na população da Compensa ($P = 91,83$; $H_o = 0,3122$).

Considerando as três populações de Manaus, a da Cidade Nova foi a que mostrou maior variabilidade genética ($P = 97,95$; $H_o = 0,3662$). Este resultado deve-se possivelmente, à existência de grandes fragmentos florestais neste bairro, onde a pressão antrópica pela ação de inseticida é menos intensa do que em certas áreas da cidade, favorecendo a formação de habitats ideais para o desenvolvimento dessa espécie, que é de origem silvestre. Estas condições possibilitam livre fluxo gênico entre os indivíduos nessa população.

A maior variabilidade observada na população de Tabatinga deve-se, provavelmente, ao fato dessa espécie ter sido registrada pela primeira vez nessa localidade, em 1996, conforme informações da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), sendo mais antiga do que as populações dos demais municípios do Estado, como por exemplo, as da cidade de Manaus, que tiveram seus primeiros registros em 2002 (FUNASA). Dentre um grande número de fatores, as características ambientais afetam a capacidade de uma espécie sobreviver, se reproduzir, e principalmente, dela se estabelecer num determinado local (DOBZANSKY, 1973). Por ser mais antiga do que as populações de Manaus, a de Tabatinga teve mais tempo de adaptação àquele ambiente, por isso teve grande possibilidade de maior fluxo gênico e introdução de novos alelos. Um outro fator que deve também contribuir para a maior variabilidade genética observada nesta população é a localização geográfica de Tabatinga, que faz fronteira com Colômbia e Peru.

Tabela 3. Estimativa da variabilidade genética em quatro populações de *Aedes albopictus* no Estado do Amazonas.

População	Número Médio de Amostras por Loco	Percentagem de Locos Polimórficos *	Heterozigosidade Média	
			Observada	Esperada **
Cid. Nova	38,08	97,95	0,3621	0,3670
Colina do Aleixo	33,55	93,87	0,3447	0,3501
Compensa	36,85	91,83	0,3122	0,3165
Tabatinga	39,32	100,00	0,3929	0,3981

* Freqüência do alelo mais comum menor ou igual a 0,95 (AYALA, 1982)

** Heterozigosidade esperada de Hardy-Weinberg, estimativa não enviesada (NEI, 1978).

IV.2.2. Análise da Estrutura Genética das Populações

O teste de qui-quadrado a partir do “Exact Test” (RAYMOND & ROUSSET, 1995) foi significativo ($\chi^2 = 466,7269$; GL= 98; $P < 0,0001$) mostrando certa diferenciação genética entre as populações. Possivelmente, isto pode estar relacionado à ação antrópica, origens diferentes, e à própria estrutura genética das populações. A estrutura genética foi testada, com base no método θ , sendo seu valor médio de $F_{st} = 0,0662 \pm 0,0096$, indicando uma baixa estruturação genética. Mesmo assim, este resultado indica que o fluxo gênico está ocorrendo entre as populações, e os cruzamentos ainda sejam aleatórios.

IV.2.3 Análise da Distância e Similaridade Genética entre as Populações

A partir dos dados das frequências alélicas estimadas, construiu-se uma matriz de distância e similaridade genética entre as quatro populações, utilizando-se a metodologia proposta por Nei (1978). Os dados da Tabela 4 mostram que os valores de distância genética foram muito baixos ($D= 0,0156 - 0,0786$), indicando que as populações são muito próximas geneticamente, sendo Tabatinga e Compensa as populações que mostraram o valor de distância mais elevado (0,0786). No entanto, a menor distância genética foi detectada entre as populações da Cidade Nova e da Colina do Aleixo (0,0156).

Considerando somente as populações de Manaus, a maior distância genética foi observada entre Compensa e Cidade Nova, enquanto a maior similaridade foi detectada entre Colina do Aleixo e Cidade Nova (Tabela 4).

Tabela 4. Matriz de distância e similaridade genética entre as quatro populações de *Aedes albopictus* no Estado do Amazonas. Valores acima da diagonal correspondem à identidade genética não enviesada e abaixo da diagonal correspondem à distância genética não enviesada (NEI, 1978)

População	Cidade Nova	Colina do Aleixo	Compensa	Tabatinga
Cidade Nova	*****	0,9845	0,9786	0,9510
Colina do Aleixo	0,0156	*****	0,9831	0,9394
Compensa	0,0216	0,0171	*****	0,9244
Tabatinga	0,0502	0,0625	0,0786	*****

IV. 2.4 Relações Genéticas entre as Populações

Na figura 10 está representado o dendrograma de distância genética entre as populações, segundo Nei (1978), com base no programa TFPGA (MILLER, 1997). Verifica-se nesta figura, que as populações foram separadas em três “clusters”: o primeiro, formado pela Cidade Nova e Colina do Aleixo; o segundo, separando estas duas com a da Compensa; e o terceiro formado apenas por Tabatinga. Estes resultados mostram as três populações de Manaus muito semelhantes geneticamente, que formam um grupo homogêneo, um pouco diferenciado da população de Tabatinga.

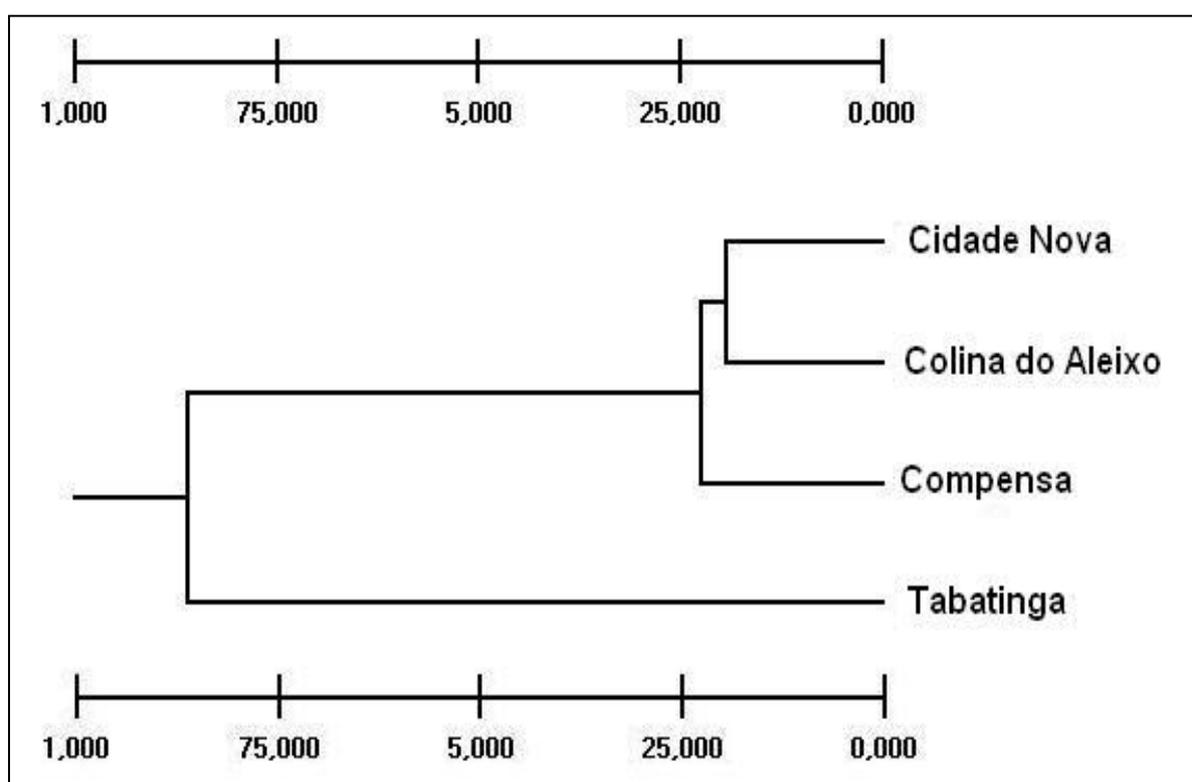


Figura 14. Dendrograma agrupando as populações de *Aedes albopictus* com base na distância genética. Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética - UPGMA (NEI, 1987).

V. DISCUSSÃO

V. 1. Perfis Eletroforéticos de RAPD

Os resultados da análise dos perfis de RAPD-PCR, a partir de nove “primers” (iniciadores) revelaram 86 bandas (locos) nas quatro populações, variando entre 280 e 2500 pb. Kambhampati et al. (1992) avaliando a importância da técnica de RAPD para aplicações entomológicas em espécies de mosquitos do gênero *Aedes sp*, analisaram populações de *A. albopictus* criados em laboratórios, utilizando apenas dois “primers” e revelaram 14 locos variando de 184 a 1531 pb. Ayres et al., (2002) analisaram a variabilidade genética de seis populações de *A. albopictus* procedentes de três estados brasileiros e revelaram 47 bandas (locos), variando entre 120 a 2000 pb, utilizando quatro “primers”. Os resultados destes autores diferem em parte dos observados no presente trabalho, mas esta diferença, possivelmente, seja porque eles utilizaram menor número de “primers”.

Santos et al. (2003) estudando as relações genéticas entre populações de *A. aegypti* de diferentes regiões do Estado de São Paulo utilizando este mesmo marcador, baseado em seis “primers” detectaram 58 locos. No entanto, Ayres et al. (2003) analisando a diferenciação genética de populações dessa espécie procedentes de cinco estados brasileiros e uma da Florida, Estados Unidos detectaram menor número de locos (47) variando de 120 a 2200 pb, utilizando apenas quatro “primers”. Corroborando com estes dados, Sousa et al. (2001) estudaram a estrutura genética dessa espécie na Argentina, selecionando três “primers” que revelaram 17 bandas variando de 500 a 2000 pb. Entretanto, Paduan et al. (2006), também por meio de RAPD, estudaram a variabilidade desta espécie

com populações provenientes de seis estados brasileiros e uma de Rockefeller, Porto Rico. Os cinco “primers” selecionados revelaram 21 bandas variando de 250 a 1500 pb.

Considerando-se os padrões eletroforéticos obtidos neste estudo, verifica-se que as populações de *A. albopictus* de Manaus e de Tabatinga analisadas, mostram o número de bandas (locos) e a variação do peso molecular desses fragmentos semelhantes aos de populações de *A. aegypti* do Brasil, e de alguns países do continente americano.

V. 2. Estimativa da Variabilidade Genética das Populações

A variação genética é um pré-requisito para que haja evolução adaptativa, uma vez que a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações, em função da adaptação ao ambiente (HARTL, 1981). Os fatores genéticos são responsáveis pela maioria das características que contribuem para o sucesso dos insetos vetores, tais como susceptibilidade, competência vetorial e resistência a inseticidas (AYRES et al., 2003).

A percentagem de locos polimórficos teve variação de 91,83% a 100,00%, onde o maior valor foi detectado na população de Tabatinga (P= 100,00%), e o menor na população da Compensa (P = 91,83%). Tais resultados mostram nível de polimorfismo bastante elevado. Estes valores corroboram em parte com os descritos por Magalhães Jr. (2005), ao realizar os primeiros estudos sobre variabilidade genética de *A. albopictus*, por meio de isoenzimas em populações de três bairros (Colina do Aleixo, Mauzinho e Compensa) da cidade de Manaus. Dentre elas, a população da Compensa foi também a menos polimórfica (44,4%);

Mauzinho e Colina do Aleixo apresentaram maior polimorfismo (P= 50,0%). É importante salientar que os valores de polimorfismos e heterozigosidades obtidos diretamente do DNA correspondem aproximadamente a duas vezes, ou mais, o nível que se encontraria em aloenzimas (Apostol et al., 1996). Silva et al. (2006) utilizando isoenzimas descreveram a variabilidade dessa espécie em outros bairros adjacentes de Manaus (Cidade de Deus, Petrópolis e Terra Nova), e verificaram que a percentagem média de locos polimórficos foi de 40,0% para as três populações. Ayres et al. (2002), estudando a evolução da variabilidade genética em populações de *A. albopictus* oriundas de três estados brasileiros, por meio de RAPD, descreveram um polimorfismo variando de 75,5% a 87,2%. Segundo os autores, estes valores de polimorfismo foram considerados elevados para populações desse mosquito. Os valores obtidos com as populações dessa mesma espécie no presente trabalho foram ainda mais elevados (P = 91,83% a 100,00%), de maneira a corroborar com o elevado polimorfismo descrito por outros autores.

Fraga et al. (2003) analisando populações de *A. aegypti*, também na cidade de Manaus, por meio de isoenzimas, detectaram uma variação na percentagem de locos polimórficos de 44,4% – 55,6%, também considerada elevada por estes autores, com esse marcador molecular. Dinardo-Miranda & Contel (1996) encontraram resultados similares em populações paulistas deste vetor. Em populações desse mosquito coletadas no Quênia, Tabachnick & Powell (1976), encontraram variação em 59% dos locos.

Sousa et al. (1999) utilizando RAPD, analisaram a variabilidade genética em populações de *A. albifasciatus* da Argentina e encontraram a heterozigosidade e polimorfismo variando entre 0,19 – 0,31 e 61% – 89%, respectivamente. Segundo estes autores, tais valores correspondem

aproximadamente três vezes mais do valor obtido em estudos prévios com base em 16 locos isoenzimáticos, nestas mesmas populações.

De acordo com esses parâmetros, verifica-se que as populações de *A. albopictus* de Manaus e Tabatinga, apresentam níveis de polimorfismo mais elevados do que as populações de outras regiões, e inclusive, as de *A. aegypti*.

Nevo (1978) assinala que a heterozigosidade é uma melhor medida de variação gênica que o polimorfismo, visto que é menos dependente do tamanho da amostra e, embora tenha a desvantagem de ser afetada pela escolha dos locos, pode ser definida menos ambigualmente.

Em relação às heterozigosidades das quatro populações analisadas, a de Tabatinga mostrou maiores valores, tanto na heterozigosidade observada, quanto na esperada ($H_o = 0,3929$; $H_e = 0,3981$), enquanto a menor heterozigosidade foi detectada na população da Compensa ($H_o = 0,3122$; $H_e = 0,3165$). Considerando as três populações de Manaus, a da Cidade Nova foi a que mostrou maior heterozigosidade ($H_o = 0,3662$; $H_e = 0,3670$). Entretanto, os valores descritos neste trabalho discordam com os encontrados por Magalhães Jr. (2005) por meio de isoenzimas, em populações de *A. albopictus* da cidade de Manaus. Este reportou heterozigosidade média observada inferior ($H_o = 0,078 - 0,081$). Silva et al. (2006) utilizando à mesma técnica de isoenzimas detectou valores de heterozigosidade observada variando entre 0,132 – 0,238 em outros bairros adjacentes na mesma cidade. Apesar de serem ligeiramente superiores, estes valores corroboram com os descritos por Ayres et al. (2002), em populações de *A. albopictus* oriundas de três estados brasileiros, por meio de RAPD. Esses autores concluíram também que a variabilidade genética observada nas populações brasileiras locais era resultante de um balanço entre a deriva genética e um fluxo gênico restrito nessas populações.

Lourenço-de-Oliveira et al. (2003) analisaram a diversidade genética entre populações de *A. albopictus* procedentes do Brasil, dos Estados Unidos e das Ilhas Caiman, usando como marcador molecular, as isoenzimas. Os autores concluíram que, tanto as populações do Brasil quanto as dos Estados Unidos eram altamente diversificadas. Fraga et al. (2003) verificaram a variabilidade genética de populações de *A. aegypti* de Manaus por meio de isoenzimas e obtiveram valores de heterozigosidade média observada ($H_o = 0,109 - 0,152$) mais baixos. No entanto, Ayres et al. (2003) utilizando RAPD, reportaram um nível mais elevado de heterozigosidade observada ($H_o = 0,274$) em algumas populações brasileiras desta espécie. Sousa et al. (2001) utilizando a mesma técnica, mostraram que populações argentinas dessa mesma espécie também possuem um nível elevado de heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,350$). Valores elevados de heterozigosidade também têm sido detectados em populações de *A. aegypti* procedentes de Porto Rico ($H_o = 0,354$) por Apostol et al. (1996). Yan et al. (1999) empregando um outro marcador molecular, RFLP - Restriction fragment length polymorphism, em estudos populacionais deste mesmo vetor, também obtiveram valores elevados, variando de 0,44 a 0,58. Resultado semelhante foi observado por esses autores utilizando o marcador AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism, no mesmo estudo onde a heterozigosidade média esperada entre as populações foi 0,39.

Costa-da-Silva et al. (2005) por meio de fragmento do gene ND4 do DNA mitocondrial, reportaram variabilidade genética elevada a nível interpopulacional de *A. aegypti* em três cidades do Peru.

Vários estudos têm sido realizados sobre a variabilidade genética em outras espécies de mosquitos vetores de doenças. Santos et al. (2005) estudando a

variabilidade genética entre duas espécies de anofelinos, *Anopheles intermedius* e *Anopheles mattogrossensis*, na Amazônia brasileira utilizando marcadores isoenzimáticos, demonstraram baixa variabilidade genética nas populações de *A. mattogrossensis* ($H_o = 0,081$; $P = 44,4$), e valores mais inferiores nas populações de *A. intermedius* ($H_o = 0,048$; $P = 33,3$). Isto provavelmente, pode estar relacionado com o tipo de nicho ocupado por estas espécies, visto que somente podem ser encontradas em algumas áreas restritas. Também utilizando isoenzimas, valores semelhantes foram descritos por Carvalho-Pinto & Lourenço-de-Oliveira (2004) em populações de *Anopheles cruzii* oriundas de quatro estados brasileiros, onde a heterozigosidade média observada variou de 0,211 a 0,386. Esses mesmos autores observaram valores muito similares em populações de *Anopheles bellator* procedentes de três estados brasileiros e uma da Ilha de Trinidad, na República de Trinidad Tobago, em 2003, onde a heterozigosidade observada variou de 0,210 a 0,319 (CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2003). Pinedo-Cancino et al. (2006), estudando a diversidade genética de *Anopheles darlingi* na Amazônia Peruana, região de Iquitos, por meio de RAPD, registraram valores de heterozigosidade média esperada variando de 0,27 a 0,32. Entretanto, Manguin et al. (1999) reportaram valores mais baixos de heterozigosidade média esperada (0,063 - 0,122), em populações desse mosquito coletada em diferentes países da América do Sul.

A maior variabilidade observada na população de Tabatinga, provavelmente, deve-se ao fato dessa ter sido introduzida a mais tempo do que as populações de Manaus. Por ser mais antiga, esta população teve mais tempo de adaptação a aquele ambiente. Nevo (1978) relata que a diversidade ambiental desempenha papel importante na manutenção da variação genética, e a partir daí,

alguma forma de seleção natural (balanceada, direcional, disruptiva, dependente da frequência, entre outras) pode atuar como fator determinante na estrutura genética da população e na diferenciação. Tabatinga faz fronteira com Colômbia e Peru, e o transporte de mercadorias vindas de outros países possibilita trazer indivíduos de outras populações, permitindo o acasalamento desses com os da população de Tabatinga. Tais cruzamentos permitem que alelos novos sejam introduzidos nessa população, conferindo-lhe um aumento na variabilidade genética.

Considerando-se os dados de locos polimórficos e heterozigosidade média obtidos nesse estudo, verifica-se que as populações de *A. albopictus* de Manaus e Tabatinga mostraram níveis de variabilidade genética similares aos de outras populações desse mosquito e, inclusive, as populações de *A. aegypti*, analisadas com vários marcadores moleculares no Brasil, e em diferentes partes do mundo (FRAGA et al., 2003; AYRES et al., 2003; SOUSA et al., 2001; YAN et al., 1999; COSTA-DA-SILVA et al., 2005; BOSIO et al., 2005)

O elevado polimorfismo observado nas quatro populações analisadas pode ser indicativo de uma maior plasticidade genética, decorrente da própria estrutura genética destas populações, como estratégia adaptativa ao ambiente amazônico. Nas áreas em que há ocorrência de grandes fragmentos florestais, tais como Cidade Nova e Colina do Aleixo, onde a ação antrópica é menor as populações desse mosquito tendem a ter maior heterozigosidade. Diferentemente, a população da Compensa, que além de ser um bairro totalmente urbanizado, sofre intensa atuação de agentes de saúde com aplicação de inseticidas nas campanhas de combate a dengue, que tem como alvo principal à espécie *A. aegypti*. Fato este reduz drasticamente a densidade populacional de outros mosquitos inclusive a espécie *A. albopictus*. Diante disso, a possibilidade de ocorrer endocruzamentos, e

conseqüentemente, a redução da variabilidade genética. Nasci (1995) relata que em algumas áreas dos EUA, repetidos programas de controle têm causado redução das populações de *A. albopictus* e a conseqüente mortalidade de seus indivíduos tem levado a uma homogeneização daquela população.

Segundo Honório & Lourenço-de-Oliveira (2001), a interação entre *A. albopictus* e *A. aegypti* requer atenção, pois essas espécies se desenvolvem essencialmente nos mesmos criadouros artificiais e são muito comuns em áreas com grande concentração humana. Diante disso, um outro fator que pode ser indicativo de uma maior plasticidade genética das populações de *A. albopictus* na região amazônica é o fato dessa espécie em Tabatinga poder ter influenciado na drástica redução da abundância das populações de *A. aegypti* naquela região. O mesmo foi observado por Hawley (1988) na América do Norte, em Houston, Texas, onde a introdução de *A. albopictus* foi associada com o declínio da abundância de *A. aegypti*. Em contraste, no Sudeste da Ásia, foi observada por esse mesmo autor, que a redução da abundância de *A. albopictus* era resultante da interação competitiva com *A. aegypti*. No Brasil, Passos et. al (2003) registraram a dominância de *A. aegypti* sobre *A. albopictus* no litoral do sudeste, no município de São Sebastião, no Estado de São Paulo.

Apesar de ainda não se ter certeza da transmissão do vírus da dengue por *A. albopictus* no Brasil, os dados desse trabalho sobre a variabilidade e estrutura genética nas populações analisadas no Estado do Amazonas sugerem a possibilidade desta espécie ser uma transmissora em potencial da dengue.

V. 2. Estrutura e Diferenciação Genética das Populações

A estrutura genética de populações é uma consequência dos padrões de endocruzamento e da magnitude de fluxo gênico entre as subpopulações. Taxas elevadas de fluxo gênico entre as subpopulações e a tendência para o cruzamento aleatório intrapopulacional podem levar a uma diminuição da estrutura genética, enquanto que, o contrário, aumentará a estrutura genética (EANES & KOEHN, 1978).

Nas quatro populações analisadas, observou-se uma baixa estruturação microgeográfica, conforme mostram os valores de $F_{st} = 0,0662 \pm 0,0096$. Esses valores são relativamente baixos, indicando a ocorrência de fluxo gênico entre essas populações. O mesmo foi observado por Ayres et al. (2002), quando descreveram que os níveis de G_{st} das populações de *A. albopictus* dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro são baixos (0,077). Estes autores sugerem que, esses dados podem ser explicados pela proximidade entre esses estados e o tempo de introdução desta espécie nestes locais. Da mesma maneira existe proximidade geográfica entre as populações dos bairros de Manaus, podendo explicar o baixo valor de F_{st} (0,0662). Esses dados corroboram com os descritos por Magalhães Jr. (2005) quando analisou a estrutura genética de populações de *A. albopictus* de Manaus por meio de isoenzimas, quando encontrou índice mais inferior de F_{st} (0,020), indicativo de livre fluxo gênico entre as populações naquele período.

Costa-Ribeiro et al. (2006), realizando estudos relacionando os padrões genéticos de acordo com escalas geográfica e temporal em populações de *A. aegypti* procedentes de várias áreas do Rio de Janeiro, encontraram nível de F_{st}

mais elevado (0,091), sendo o maior valor encontrado em amostras coletadas na estação chuvosa, sugerindo baixa dispersão da espécie.

Os valores obtidos neste trabalho são bem inferiores quando comparados com os de Sousa et al. (2001) que estudaram o relacionamento genético em populações de *A. aegypti* da Argentina por meio de RAPD. Estes autores encontraram valores de F_{st} , bem mais elevados utilizando métodos estatísticos diferentes (F_{st} de Wright = 0,250; método θ = 0,249; e F_{st} de Lynch and Milligan = 0,300). Estes autores atribuem os valores encontrados a distância geográfica entre as populações argentinas, que possibilitou a redução no fluxo gênico, e conseqüentemente, maior estruturação genética entre as populações, de forma que, as mesmas durante o processo evolutivo tornam-se cada vez mais diferenciadas.

Nyanjom et al. (2003), por meio de marcadores de microssatélites, reportaram baixos valores de diferenciação genética (F_{st} = 0,038) em populações de *Anopheles arabiensis*, o principal vetor de malária nas regiões da Etiópia e Eritrea. Segundo esses autores, os baixos valores entre as populações de *A. arabiensis* são consistentes com a estrutura genética das populações de espécies de anofelinos no leste da África.

Os dados de distância e similaridade genética nas populações de *A. albopictus* do Amazonas estão mostrando grande similaridade genética, sendo a maior distância genética observada entre as populações de Tabatinga e da Compensa ($D= 0,0786$), e a menor entre as populações da Cidade Nova e Colina do Aleixo ($D= 0,0156$). Similaridade genética elevada também foi observada por Magalhães Jr. (2005) em outras populações de Manaus, onde a maior distância genética foi entre as populações da Colina com as da Compensa e Mauzinho

(0,003) e a menor distância foi entre as populações da Compensa e Mauzinho (0,001). Ayres et al. (2002), utilizando a técnica de RAPD em populações de *A. albopictus* de três estados brasileiros, detectaram valores de distância genética maiores entre as populações de Pernambuco, Rio de Janeiro e Minas Gerais (0,149) e a menor distância entre as populações do Rio de Janeiro e Minas Gerais com valores $\leq 0,050$.

No entanto, Fraga et al. (2003), estudando populações de *A. aegypti* de Manaus baseadas na análise isoenzimática, encontraram valores de distância e similaridade genética mais baixos ($D= 0,003 - 0,016$), semelhantes aos observados nas populações de Manaus desse estudo.

As relações genéticas entre as populações indicaram que as da Cidade Nova e Colina do Aleixo são geneticamente muito próximas, pois estão agrupadas em um mesmo “cluster”, possivelmente, por estes bairros possuírem uma localização muito próxima uma da outra, permitindo livre fluxo gênico. A população da Compensa que foi separada em outro “cluster“, é um bairro mais antigo e encontra-se do outro lado da cidade. Por ser mais antigo e possuir vários registros de casos de dengue nos últimos anos, vem sofrendo intensa atuação de agentes de saúde com aplicação de inseticidas nas campanhas de combate a dengue, que tem como alvo principal a espécie *A. aegypti*. Conseqüentemente, esse fato reduz drasticamente a densidade populacional de *A. albopictus*. Alfenas (1998) relata que a redução no tamanho de uma população têm efeito sobre as gerações subseqüentes, pois essa será iniciada por poucos indivíduos e sua variabilidade genética dependerá da amostra de alelos trazida por estes. Um efeito fundador pode essá causando a redução da variabilidade genética e diferenciação na população da Compensa, separando-a em outro “cluster”.

Um outro fator que deve ser levado em consideração é a localização da Compensa próxima as do Centro da cidade e do Porto Fluvial do bairro do São Raimundo. Esse fato pode reduzir a troca gênica com as demais populações, e o transporte de mercadorias vindas de outros municípios possibilita trazer indivíduos de outras populações, permitindo o acasalamento desses com os da população da Compensa, proporcionando uma pequena diferenciação genética. A população de Tabatinga que formou um terceiro “cluster” e está separada das demais de Manaus, provavelmente deve-se ao fato dessa estar geograficamente mais distante, e ter sido introduzida há mais tempo no Estado do Amazonas do que as populações de Manaus. Diante destes dados, pode-se sugerir que as populações de Manaus e de Tabatinga tenham sido originadas de populações oriundas de localidades diferentes.

VI – CONCLUSÕES

A análise dos dados das populações de *A. albopictus*, com base no uso de RAPD, possibilitou concluir que:

1. Os dados obtidos neste trabalho mostraram que, as quatro populações analisadas são geneticamente muito similares e de elevada variabilidade genética, tanto pelo número de locos polimórficos, quanto pelas heterozigosidades. Entre as quatro populações analisadas, a de Tabatinga mostrou maior variabilidade genética, a menor variabilidade genética foi detectada na população da Compensa. Considerando as três populações de Manaus, a da Cidade Nova foi a que mostrou maior variabilidade genética.
2. O teste de qui-quadrado a partir do “Exact Test” foi significativo ($\chi^2 = 466,7269$; GL= 98; $P < 0,000$) mostrando certa diferenciação genética entre as populações.
3. Apesar da baixa estruturação genética observada indicando uma pequena diferenciação entre as populações, o fluxo gênico está ocorrendo entre elas, e os cruzamentos ainda são aleatórios.
4. Os valores de distância genética encontrados entre as populações de *A. albopictus* são indicativos de uma espécie monotípica.
5. As populações de *A. albopictus* analisadas apresentaram variabilidade genética elevada, quando comparadas com outras populações desta espécie em outros estados brasileiros. Estes dados sugerem que, apesar desta espécie ter sido registrada recentemente no Estado do Amazonas, demonstra uma elevada plasticidade genética, adaptação ao ambiente, e possivelmente capacidade vetorial. A diferenciação observada deve-se, provavelmente, a população de

Tabatinga, que faz fronteiras com outros países, e foi introduzida a mais tempo no Estado do Amazonas.

VII. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALFENAS, A. C. *Eletroforese de Isoenzimas e proteínas afins fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos*. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.

APOSTOL, B. L.; BLACK, W. C. 4TH.; REITER, P.; MILLER, B. R. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, v. 143, p. 1727-1738, 1996.

ARANDA, C.; ERITJA, R; ROIZ, D. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Medical and veterinary Entomology*; v. 20, p. 150-152, 2006.

AYALA, F. J. *Population and Evolutionary Genetics*. Menlo Park, California, The Benjamin Cummings Publishing Company, 1982. 268 p.

AYALA, F. J.; KIGER, J. A. *Modern Genetics*. Menlo Park, CA, The Benjamin Cummings Publishing Co., 2a ed, 1984. 798 p.

AYRES C. F. J.; ROMÃO, T. P. A.; MELO-SANTOS, M. V. A. ; FURTADO, A. F. Genetic Diversity in Brazilian Populations for *Aedes albopictus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.

AYRES, C.F.J.; MELO-SANTOS, M.A.B.; SOLE-CAVA, A.M.; FURTADO, A.F. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *Journal Medical Entomology*, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.

BALLINGER-CRABTREE, M. D.; BLACK IV, W. C.; MILLER, B. R. Use of genetic polymorphisms detected by the random amplified polymorphic DNA - polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 47, n. 6, p. 893-901, 1992.

BOSIO, C. F.; HARRINGTON, L. C.; JONES, J. W.; SITHIPRASASNA, R.; NORRIS, D. E.; SCOTT, T. W. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using Mitochondrial DNA. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 72, n. 4, p. 434-442, 2005.

BRITO, D. E. M.; FORATTINI O. P. Produtividade de Criadouros de *Aedes albopictus* no Vale do Paraíba, SP, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 38, n. 2, p. 209-215, 2004.

CALADO, D. C.; SILVA, M. A. Evaluation of the temperature influence on the development of *Aedes albopictus*. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, n. 2, p. 173-179, 2002.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C.F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. A technique for preparing polytene chromosomes from *Aedes aegypti* (Diptera, Culicinae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 387-390, 2003.

CARVALHO-PINTO, C. J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Isoenzymatic Analysis of Four *Anopheles (Kerteszia) bellator* Dyar & Knab (Diptera: Culicidae) Populations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 8, p. 1045-1048, 2003.

CARVALHO-PINTO, C. J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Isoenzimatic Analysis of Four *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) Populations of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 5, p. 471-475, 2004.

COLLES, D. H. A note on the status of *Aedes malayensis* and distribution of *Aedes albopictus*. *Mosquito Systematics*, v. 5, p. 225-226, 1973.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, 1994. 225 p.

COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L.; BRACCO, J. E. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 539-544, 2005.

COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. Geographic and temporal genetic patterns of *Aedes aegypti* populations in Rio de

Janeiro, Brazil. *Tropical Medicine and International Health*, v. 11, n. 8, p. 1276–1285, 2006.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; CONTEL, E. P. B. Enzymatic Variability in Natural Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 33, n. 5, p. 726-733, 1996.

DOBZANSKY, T. *Genética do processo evolutivo*. Ed. Polígono, São Paulo, 1973. 453 p.

EANES, W. F.; KOEHN, R. K. An analysis of genetic structure in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* L. *Evolution*, v. 32, n. 4, p. 784-797, 1978.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em 02 de maio de 2007.

FÉ, N. F.; BARBOSA, M. G. V.; ALECRIM, W. D.; GUERRA, M. V. F. Registro da ocorrência de *Aedes albopictus* em área urbana do Município de Manaus, Amazonas. *Revista de Saúde Pública*, v. 37, n. 5, p. 674-675, 2003.

FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. 3ª Edição, EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 1998. 220 p.

FIGUEIREDO, L. M. T. Os arbovírus do Brasil. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISADORES NIKKEIS. *Anais da Segunda Reunião Anual, sessão III – virologia*, 1994, p. 45-58.

FORANTTINI, O. P. *Entomologia Médica*. Volume 2, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1965. 506 p.

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuser) no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 20, p. 244-245, 1986.

FRAGA, E. C.; SANTOS, J. M. M.; MAIA, J. F. Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) population from Manaus–AM, Brasil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, n. 2, p. 181-187, 2003.

GOMES, A. C.; GOTLIEB, S. L. D.; MARQUES, C. A. M.; PAULA, M. B.; MARQUES, G. R. M. Duration of larval and pupal development stages for *Aedes albopictus* in natural and artificial containers. *Revista de Saúde Pública*, v. 29, p. 15-19, 1995.

GOMES, A. C.; BITENCOURT, M. D.; NATAL, D., PINTO, P. L. S.; MUCCI, L. F.; PAULA, M. B.; URBINATTI, P. R.; BARATA, J. M. S. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. *Revista de Saúde Pública*, v. 33, p. 95-97, 1999.

HARTL, D.L. *A primer of population genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, 1981. 191 p.

HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 4, supplement, p. 1-39, 1988.

HOTTA, S. Dengue vector mosquitoes in Japan: the role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the 1942-1944 dengue epidemics of Japanese Main Islands. *Medical Entomology and Zoology*, v. 49, p. 274-276, 1998.

HONÓRIO, N.A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 4, p. 385-391, 2001.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Perfil dos Municípios Brasileiros. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Censo 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 02 de maio de 2007.

KAMBHAMPATI, S.; BLACK IV, W. C.; RAI, K. S. Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from alloenzyme analysis. *Heredity*, v. 67, p. 85-93, 1991.

KAMBHAMPATI, S.; BLACK IV, W. C.; RAI, K. S. Random amplified Polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae) Techniques, statistical analysis, and applications. *Journal of Medical Entomology*, v. 29, n. 6, p. 939-945, 1992.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; FILIPPIS, A. M. B.; FAILLOUX, A. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States and the Cayman Islands. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 69, n. 1, p. 105-114, 2003.

LÖWENBERG-NETO P.; NAVARR-SILVA M. Primeiro registro de *Aedes albopictus* no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, n. 2, p. 246-247, 2002.

MAGALHÃES JR, P. F. C. *Análise da variabilidade genética e padrões ontogenéticos em populações de Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus*. 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Produtos Naturais) – Universidade Estadual do Amazonas, Manaus.

MANGUIN, S.; WILKERSON, R. C.; CONN, J. E.; RUBIO-PALIS, Y.; DANOFF-BURG, J. A.; ROBERTS, D. R. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 60, n. 3, p. 364–376, 1999.

MARTINS, V. E. P.; MARTINS, M. G.; ARAÚJO, J. M. P.; SILVA, L. O. R.; MONTEIRO, H. A. O.; CASTRO, F. C.; VASCONCELOS, P. F. C.; GUEDES, M. I. F. Primeiro Registro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Estado do Ceará, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 40, n. 4, p. 737-739, 2006.

MILLER, B. R.; BALLINGER, M. E. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Transactions Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 476-477, 1988.

MILLER, M. P. Tools for population genetic analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Fundação Nacional de Saúde. *Controle de Vetores da Febre Amarela e Dengue*. 1º ed., Brasília, DEOPE, 1996. 95 p.

MITCHELL C. J.; MILLER, B. R.; GUBLER, O. J. Vector competence of *Aedes albopictus* from Houston, Texas, for dengue serotypes 1 to 4, yellow fever and Ross River viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 3, p. 460-465, 1987.

MITCHELL, C. J. Vector competence of North and South American strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses: a review. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 7, p. 446-451, 1991.

MORTON, N. E.; KRIEGER, H.; MI, M. P. Natural selection of polymorphism in Northeast Brazil. *American Journal Human Genetics*, v. 28, p. 153-172, 1966.

NASCI, R. S. Control of *Aedes albopictus* from the perspective of North America. *Parassitologia*, v. 37, p. 123-127, 1995.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v. 89, p. 583-590, 1978.

NEVO, E. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theory Population Biology*, v. 13, p. 121-177, 1978.

NYANJOM, S. R. G.; CHEN, H.; GEBRE-MICHAEL, T.; BEKELE, E.; SHILILU, J.; GUTHURE, J.; BEIER, C.; YAN, G. Population Genetic Structure of *Anopheles arabiensis* Mosquitoes in Ethiopia and Eritrea. *Journal of Heredity*, v. 94, n. 6, p. 457-463, 2003.

PADUAN, K. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. P.; RIBOLLA, P. E. M. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 2, p. 391-395, 2006.

PASSOS, R. A.; MARQUES, G. R. A. M.; VOLTOLINI, J. C.; CONDINO, M. L. Dominância de *Aedes aegypti* sobre *Aedes albopictus* no litoral sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 37, n. 6, p. 729-734, 2003.

PINEDO-CANCINO, V.; SHEEN, P.; TARAZONA-SANTOS, E.; OSWALD, W. E.; JERI, C.; VITTOR, A. Y.; PATZ, J. A.; GILMAN, R. H. Limited Diversity of *Anopheles darlingi* in the Peruvian Amazon Region of Iquitos. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n. 2, p. 238–245, 2006.

RAI, K. S.; LORINER, N.; HLLINAN, E. The current status of genetic methods for controlling *Aedes aegypti*. In: Pal, R.; Whitten, M.J. (Ed.). *The use of genetics in insect control*. Elsevier, North Holland, 1974. p. 119-132.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. *Evolution*, v. 49, p. 1280-1283, 1995.

ROMI, R. *Aedes albopictus* in Italy: un problema sanitario sottovalutato. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, v. 37, n. 2, p. 241-247, 2001.

ROSSI, G. C.; PASCUAL, N. T.; KRSTICEVIC, F. J. First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal American Mosquito Control Association*, v. 15, n. 3, p. 422, 1999.

SANTOS, J. M. M.; CONTEL, E. P. B.; KERR, W. E. Biologia de Anofelinos Amazônicos. II. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus/Boa Vista. *Acta Amazonica*, v. 11, n. 4, p. 789-797, 1981.

SANTOS, J. M. M.; RODRIGUEZ, G.A.; MAIA, J. F.; TADEI, W. P. Variability and genetic differentiation among *Anopheles (Ano.) intermedius* Chagas, 1908 and *Anopheles (Ano.) mattogrossensis* Lutz & Neiva, 1911 (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 531-537, 2005.

SANTOS, R. C. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). *Revista de Saúde Pública*, v. 37, n. 5, p. 671-673, 2003.

SANTOS, V. M.; MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; ÁVILA, P. E.; KIRCHGATTER, K. Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo state, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 45, n. 2, p. 99-101, 2003.

SEGURA, M. N. O.; MONTEIRO, H. A. O.; LOPES, E. S.; SILVA, O. V.; CASTRO, F. C.; VASCONCELOS, F. C. Encontro de *Aedes albopictus* no Estado do Pará, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 37, n. 3, p. 388-389, 2003.

SERPA, L. L. N. Competição intra e interespecífica de larvas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em condições laboratoriais. 2004. 105 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

SILVA, C. B.; SANTOS, J. M. M.; MAGALHÃES JR, P. F. C. Análise da Variabilidade Genética em Populações de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) da Cidade de Manaus-AM. In: XV JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO PIBIC/CNPQ/FAPEAM/INPA. *Anais da XV Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq/FAPEAM/INPA*. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2006. p. 163-164.

SPRENGER, D.; WUITHIRANYAGOOOL, T. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris Country, Texas. *Journal American Mosquito Control Association*, v. 2, p. 217-219, 1986.

SOUSA, G. B.; BLANCO, A.; GARDENAL, C.N. Genetic relationships among *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Argentina using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction markers. *Journal of Medical Entomology*, v. 38, p. 371-375, 2001.

SOUSA, G. B.; DUTARI, G. P.; GARDENAL, C. N. Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) populations in central Argentina determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction markers. *Journal of Medical Entomology*, v. 36, n. 3, p. 400-404, 1999.

TABACHNICK, W.J.; POWELL, J.R. Allozymic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genetics*, v. 83, n. 3, p.75-76, 1976.

TADEI, W. P. Controle da malária e dinâmica dos vetores na Amazônia. In: 7ª REUNIÃO ESPECIAL DA SBPC. *Anais da 7ª Reunião Especial da SBPC (CD-ROM)*. Manaus: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2001. p. 1-6.

TOWNSON, H. Esterase isozymes of individual *Aedes aegypti*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 63, n. 4, p. 413-418, 1969.

VELEZ, I. D.; QUINONES, M. L.; SUAREZ, M.; OLANO, V.; MURCIA, L. M. CORREA, E. *et al.* Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomédica*. v.18: p. 192-198, 1998.

WILKERSON, R. C.; PARSONS, T. J.; KLEIN, T. A.; GAFFIGAN, T. V.; BERGO, E.; CONSOLIM, J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 32, n. 5, p. 697-704, 1995.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFASKI, J.; TINGY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are used as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WRIGTH, S. The genetical structure of populations. *Annals of eugenics* v. 15, p. 313-354, 1951

Xu, X.; Xu, J.; Qu, F. 1998. Differentiation of cryptic species A and D of *Anopheles dirus* complex by polymerase chain reaction. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, v. 16, n. 3, p. 172-175, 1998.

Yan, G.; Romero-Severson, J.; Walton, M.; Chadee, D. D.; Severson, D. W. Population genetics of yellow fever mosquito in Trinidad: Comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment polymorphism (RFLP) marks. *Molecular Ecology*, v. 8, n. 6, p. 951-963, 1999.