



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

Andreлина Alves de Sousa

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* (DIPTERA:  
CULICIDAE) DA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL**

**São Luís – MA**

**2015**

Andrelina Alves de Sousa

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* (DIPTERA:  
CULICIDAE) DA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL**

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

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

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

**São Luís – MA**

**2015**

S725v Sousa, Andreлина Alves

Variabilidade genética em populações de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) da Região Meio Norte do Brasil / Andreлина Alves de Sousa. \_\_São Luís: UEMA, 2015.

54f.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Claudene Barros.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Maranhão, Mestrado em Ciência Animal.

1. Fluxo gênico. 2. Maranhão. 3. Meio Norte. 4. Microssatélites. 5. Populações. I. Sousa, Andreлина Alves. II. Título.

CDU 616.98:576.858.77

Andreolina Alves de Sousa

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* (DIPTERA:  
CULICIDAE) DA REGIÃO MEIO NORTE DO BRASIL**

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

**APROVADA EM:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

**Prof. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta – Membro**  
**Doutorado em Ciência Animal**  
**Universidade Estadual do Maranhão – CCA/UEMA**

**São Luís - MA**

**2015**

Aos meus pais Vicente de Sousa Neto (*in memorian*) e Francisca das Chagas Alves de Sousa por todo o carinho, educação e amor incondicional, ao meu amado avô Antonio Alves de Souza (*in memorian*) pelo o exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder-me saúde e muita coragem para desenvolver mais um dos meus projetos profissionais e nunca me deixar fraquejar diante dos obstáculos;

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Claudene Barros pela oportunidade, compreensão, paciência e orientação ao longo dessa jornada;

Ao Prof. Dr. Elmary Fraga pelo o apoio, incentivo e co-orientação ao longo da pesquisa;

A Universidade Estadual do Maranhão em nome do corpo docente do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica;

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Palmas – TO em nome do agente de endemias Antoniel Batista Almeida pelo o carinho, parceria, paciência e persistência em me ajudar durante as coletas;

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Gurupi – TO em nome do Coordenador Antonio Luís Brito Siqueira pela parceria e por me permitir acompanhar os agentes durante o trabalho em campo e a agente de endemias responsável pelos pontos estratégicos Rosilene Rodrigues da Silva Costa por todo apoio, carinho, disponibilidade, paciência durante os trabalhos em campo;

A toda minha família (avó, tios, tias, primos e primas) que torcem por mim e em especial, aos meus pais (Vicente e Francisca), meus irmãos (José Augusto, Idelbrando, Eugênio e Amanda Beatriz) e aos meus sobrinhos que são tesouros em minha vida (Alice Catharine, Vicente Neto, Isabelly Caroline, Maria Cecília e João Augusto) por todo o amor e compreensão, mesmo nos momentos importantes em que estive ausente;

Aos meus colegas de turma (2013-2015), em especial Déborah Gaído, Maria Histelle e Daiane Chaves, por todos os momentos bons e ruins compartilhados durante as disciplinas em São Luís e a Eliane Braga líder da nossa turma que sempre se mostrou muito disposta em ajudar a todos da turma, principalmente as “caxienses” com tentativas de solucionar os problemas burocráticos que surgiam junto à coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal;

Um agradecimento todo especial a Thales Caminha, Edna Maria (Dindinha), Júlio Ribeiro, Natália Pereira, Cícero Alves e Carlos Licar que me acolheram com muito carinho em São Luís durante as disciplinas do mestrado;

Aos meus queridos amigos (Bárbara Suelma, Francineto Reis, José Osvaldo, Maria de Fátima Gomes, Liriel de Sousa, José Ari Osvaldo, Claudy Mascarenhas, Robson

Balica, Hérica Romena, Walna Micaelly, Maria Histelle, Marcelo Almeida, Paulo Bryguel), que me acolheram e me acompanharam nas viagens durante algumas coletas;

Aos meus “cheirosos” de Viana Cleycelena Muniz, Ana Paula Lemos, Sidna Garcia, Alcilene Lindoso, Jardiane Abreu, Graça Garcez, Paulo Santos, Maria Belfort, Gracimar Belfort, Raimunda Nonata Belfort, Raimundo João Pereira, Leila Cidreira, Julio Maciel, Antonio Serra, Teodora Ferraz, William Dickson Azevedo, Maria de Jesus Costa, Jonatas Castro, Nathália Vanessa Santos, Macélia Oliveira, Nazaré Gomes, Albanira Gomes, Miguel Coelho, Nila Maria Mendes, Elisângela Santos.

A todos os amigos queridos que sempre acompanharam meus sonhos de perto ou de longe e sempre torceram para o sucesso e concretização dos mesmos (Lígia Maria Matias, Déborah Gaído, Jociel Costa, Francineto Reis, Georgianna Santos, Raquel Rodrigues, Roziadne Fernandes, Sivanne Braga, Katia Carvalho, Sebastiana Ibiapina, Samara Cristina Silva, Maira Rodrigues, Luciana Luz, Luana Luz, Nathália Pereira, Cícero Alves, Lilia Rios, Derise Assunção, Josenice de Lima, Lívia Fonseca, Mônica Falcão, Jaqueline Sampaio, Gizelia Cunha, Rita Nascimento, Francisca Torres, Leda Cabral, Sara Pacheco, Hérica Romena, Daniele Miranda, José Medeiros, Michael Jakson, Larissa Coimbra, Joelma Nascimento, Herderson Francisco, Dail Stanley, Joafreson Rodrigo, Robson Sobral, Ronne David, Leticia Lannucy, Maurício Rodrigues, José Almir, Jivanildo Miranda).

A todos, inclusive aos que por uma vã falha da minha memória eu não tenha citado, minhas desculpas e meu Muito Obrigada!!!

## RESUMO

O *Aedes aegypti* é um vetor de grande importância epidemiológica por ser responsável pela transmissão dos vírus da febre amarela, febre chikungunya e dengue. O presente estudo analisou a variabilidade genética e a dinâmica populacional de *Ae. aegypti* da região meio norte do Brasil com base em sequências do DNA mitocondrial (NADH4) e nuclear (Microssatélites). As coletas foram realizadas em quatro estados da região meio norte (Pará, Piauí, Maranhão e Tocantins), acompanhadas de um agente de endemias, nas quais foram obtidas amostras de larvas, pupas e, na oportunidade, distribuídas armadilhas para ovos que foram deixadas por cinco dias no peridomicílio das residências. O material coletado foi transportado ao laboratório de Genética e Biologia Molecular do Centro de Estudos Superiores de Caxias CESC/UEMA, onde foram aplicados os procedimentos laboratoriais com extração de DNA e PCR. Para gene NADH4 foram sequenciados 119 espécimes distribuídos entre 11 populações do estado do Maranhão, dos quais foram obtidos um fragmento de 337 pb, nove haplótipos, 12 sítios informativos,  $h = 0,673$  e  $\pi = 0,01628$ . A AMOVA indicou que a maior variação observada ocorreu dentro das populações (67,46% -  $F_{ST} = 0,325$ ) com  $P$  significativo ( $<0,001$ ). Os valores de  $F_{ST}$  par a par indicaram restrito fluxo gênico entre as populações. As análises filogenéticas agruparam os haplótipos encontrados no presente estudo com haplótipos de outros estudos pelo o Brasil e pelo o mundo em dois clados bem suportados com 99% de *bootstrap*, indicando a presença de duas linhagens no estado do Maranhão. Para os três locos de microssatélites (T3A7, 3472, C2A8) foram genotipados 237 espécimes distribuídos entre 11 populações da região meio norte, dos quais foram obtidos 18, nove e 19 alelos, respectivamente. As análises detectaram 12 alelos privados, porém apenas dez apresentam uma frequência menor que 5%. Todos os locos (T3A7, 3472, C2A8) apresentaram desvio significativo para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,036 a 1,000 e a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou de 0,185 a 0,876. O coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) mostrou um excesso de heterozigotos (valor do  $f$  negativo) para todos os locos analisados em algumas das populações. A AMOVA indicou maior variação genética dentro das populações (76% -  $F_{ST} = 0,175$ ) com  $P$  significativo ( $<0,001$ ). Os valores de  $F_{ST}$  par a par para as análises de microssatélites indicaram fluxo gênico restrito entre as populações, com indicio de estruturação populacional. Portanto, os níveis de diferenciação genética observados nas populações de *Ae. aegypti* neste estudo mostram a necessidade da implementação de novas estratégias de controle do vetor, pois os intensos tratamentos químicos aos quais o vetor vem sendo submetido nas ultimas décadas e a pressão causada por esses programas de prevenção favorecem a ocorrência de mutações e, conseqüentemente, uma maior adaptação da espécie ao ambiente.

**Palavras-chave:** Fluxo gênico, Maranhão, meio norte, microssatélites, NADH4, populações.



## ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is a vector of great epidemiological importance for it transmits viruses which cause the yellow fever, dengue and the chikungunya fever. This study analyzed the genetic variability and the population dynamics of *Ae. aegypti* at the mid-northern region of Brazil using mitochondrial (NADH4) and nuclear (microsatellites) DNA sequences. Samples of larvae and pupae were collected in four states of the mid-northern region (Pará, Piauí, Maranhão and Tocantins), and sampling was accompanied by an endemism agent. Traps to collect eggs were placed at the vicinity of the visited houses, where they were left for five days. The collected material was transported to the laboratory *Genética e Biologia Molecular* of the *Centro de Estudos Superiores de Caxias CESC/UEMA*, where laboratory procedures for DNA extraction and PCR were performed. The NADH4 genes were sequenced using 119 specimens of 11 populations from the state of Maranhão. One fragment of 337 bp, nine haplotypes, 12 informative sites,  $h= 0.673$  and  $\pi= 0.01628$ , were obtained. The AMOVA indicated that the largest variation occurred within populations (67.46% -  $F_{ST} = 0.325$ ), with significant  $P$  ( $<0.001$ ). The paired  $F_{ST}$  values indicated that the gene flow between populations is restricted. The phylogenetic analyzes grouped the haplotypes found in this study with the haplotypes found in other studies from Brazil and worldwide into two clades, which were supported by 99% bootstrap, indicating the presence of two lineages in the state of Maranhão. Variable number of alleles (18, nine, 19) were obtained from three microsatellite loci (T3A7, 3472, C2A8, respectively), by genotyping 237 specimens from 11 populations from the mid-northern region. The analyses detected 12 private alleles, but only ten alleles had frequency lower than 5%. All loci (T3A7, 3472, C2A8) showed significant deviation to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The observed heterozygosity ( $H_o$ ) ranged from 0.036 to 1.000, and the expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranged from 0.185 to 0.876. The coefficient of inbreeding ( $F_{IS}$ ) showed excessive heterozygotes (negative value of  $f$ ) in all of the loci analyzed in some populations. The AMOVA indicated greater genetic variation within populations (76% -  $F_{ST} = 0.175$ ), with significant  $P$  ( $<0.001$ ). The paired values of  $F_{ST}$  for the analysis of microsatellites suggested restricted gene flow between populations, indicating population structuration. The distinct levels of genetic differentiation observed in the populations of *Ae. aegypti* point out for the necessity of new strategies to its control. The intense chemical treatments and the pressure caused by such prevention programs during the last decades favor the occurrence of mutations, and consequently greater adaptation of the vector mosquito to the environment.

**Keywords:** Gene flow, Maranhão, microsatellites, mid-northern region, NADH4, populations

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Ae. aegypti</i> . _____	<b>13</b>
<b>Figura 2.</b> Molécula de DNA mitocondrial _____	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Área de coleta das amostras analisadas com base no gene mitocondrial NAHD4 no estado do Maranhão, Brasil _____	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b> Área de coleta das amostras analisadas com base em marcadores microssatélites da região meio norte, Brasil _____	<b>20</b>
<b>Figura 5.</b> Relações filogenéticas entre os haplótipos das populações de <i>Ae. aegypti</i> do estado do Maranhão. Com base no algoritmo de Neighbor Joining pelo modelo de distância genética de Tamura Nei com suporte de bootstrap de 1000 repetições. _____	<b>31</b>
<b>Figura 6.</b> Frequência alélica para o locus T3A7 _____	<b>35</b>
<b>Figura 7.</b> Frequência alélica para o locus 3472 _____	<b>36</b>
<b>Figura 8.</b> Frequência alélica para o locus C2A8 _____	<b>37</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Locus microssatélites descritos por Huber et al. (2001) para <i>Ae. aegypti</i> .	24
<b>Tabela 2.</b> Números de haplótipos, sítios informativos, frequência total dos haplótipos e número dos haplótipos para populações de <i>Ae. aegypti</i> do estado do Maranhão com base no gene mitocondrial NAHD4 e haplótipos de outros estudos	27
<b>Tabela 3.</b> Diversidade genética e testes de neutralidade em onze populações de <i>Ae. aegypti</i> analisadas no estado do Maranhão	28
<b>Tabela 4.</b> Análise molecular de variância (AMOVA) nas populações de <i>Ae. aegypti</i> para o estado do Maranhão	28
<b>Tabela 5.</b> $F_{ST}$ par-a-par (diagonal acima) e número efetivo de migrantes $N_m$ (diagonal abaixo) em populações de <i>Ae. aegypti</i> para o estado do Maranhão	30
<b>Tabela 6.</b> Índices de diversidade alélica em populações de <i>Ae. aegypti</i> na região meio norte com base no locus T3A7, 3472 e C2A8	33
<b>Tabela 7.</b> Alelos privados por locus e por população de ocorrência com base nos locos T3A7, 3472 e C2A8	34
<b>Tabela 8.</b> Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para os três locos microssatélites analisados nas populações de <i>Ae. aegypti</i> da região meio norte, Brasil	34
<b>Tabela 9.</b> Valores obtidos para os índices da Estatística- $F$ e Diferenciação genética em populações de <i>Ae. aegypti</i> com base em três locos microssatélites para a região meio norte, Brasil	38
<b>Tabela 10</b> - Análise molecular de variância (AMOVA) nas populações de <i>Ae. aegypti</i> para a região meio norte, Brasil	38
<b>Tabela 11.</b> Comparações dos valores de $F_{ST}$ par a par, diagonal abaixo e número efetivo de migrantes ( $N_m$ ) diagonal acima entre as populações de <i>Ae. aegypti</i> com base nos locos T3A7, 3472 e C2A8	40
<b>Tabela 12.</b> Matriz de distância genética ( $D_a$ ) diagonal abaixo e Similaridade genética ( $D_i$ ) diagonal acima entre as populações de <i>Ae. aegypti</i> com base nos loci T3A7, 3472 e C2A8	40

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1 Biologia do <i>Aedes aegypti</i>	13
1.2 Importância Epidemiológica do <i>Ae. aegypti</i>	14
1.3 Estudos de Variabilidade Genética em Populações de <i>Ae. aegypti</i>	15
1.4 Marcadores moleculares	16
1.4.1 Genoma mitocondrial: Gene NADH4	16
1.4.2 Genoma Nuclear: Microssatélites	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
3.1 Procedência e Obtenção das Amostras	19
3.2 Análises Genéticas	21
3.2.1 Extração do DNA	21
3.2.2 Amplificação do Gene Mitocondrial NADH4 através da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	22
3.2.3 Reação de Sequenciamento	22
3.2.4 Amplificação dos Locos Microssatélites através da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR	23
3.2.5 Genotipagem	24
3.3 Análises dos Dados	25
3.3.1 Gene Mitocondrial NADH4	25
3.3.2 Locos Microssatélites	25
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>26</b>

<b>4. 1</b>	<b>Análise genética em Populações de <i>Ae. aegypti</i> do estado do Maranhão com base no gene Mitocondrial NAHD4</b>	<b>26</b>
<b>4. 2</b>	<b>Análise genética em Populações de <i>Ae. aegypti</i> da região meio norte do Brasil com base em locos microssatélites T3A7, 3472 E C2A8.</b>	<b>31</b>
<b>4. 2. 1</b>	<b>Varibilidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg</b>	<b>31</b>
<b>4. 2. 2</b>	<b>Estimativas da Estrutura Populacional</b>	<b>38</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Distribuição e frequência dos haplótipos e polimorfismo do gene NAHD4 para as populações de <i>Ae. aegypti</i> do estado do Maranhão</b>	<b>41</b>
<b>5. 2</b>	<b>Análise de variância molecular e relações filogenéticas para as populações de <i>Ae. aegypti</i> do estado do Maranhão</b>	<b>43</b>
<b>5. 3</b>	<b>Análise genética em Populações de <i>Ae. aegypti</i> da região meio norte do Brasil com base em locos microssatélites T3A7, 3472 E C2A8</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>55</b>
	<b>Genetic differentiation in populations of <i>Aedes aegypti</i> (Diptera, Culicidae) dengue vector from the Brazilian state of Maranhão</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Biologia do *Aedes aegypti*

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é um mosquito pertencente à ordem Diptera da família Culicidae, originário da África, provavelmente da região da Etiópia, que se encontra amplamente distribuído por todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (COSTA-DA-SILVA et al. 2005; PAUPY et al. 2012). Os mosquitos adultos possuem tórax enegrecido ornamentado com manchas, faixas ou desenhos de escamas claras, geralmente branco-prateadas, estas ornamentações geralmente prolongam-se até o escutelo, estes mosquitos possuem o escudo ornamentado com escamas branco-prateadas formando um desenho em forma de lira (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) (Figura 1).



**Figura 1.** *Ae. aegypti*. Fonte: [www.google.com.br](http://www.google.com.br)

O ciclo biológico do *Ae. aegypti* ocorre em duas fases de desenvolvimento: a aquática (ovos, larvas e pupas) e a terrestre (alados). As larvas passam por quatro estágios de crescimento, com grande mobilidade, alimenta-se de matéria orgânica presente no ambiente onde crescem no período de quatro a oito dias, após este período surgem às pupas que não se alimentam e tem grande mobilidade, fase que dura em média dois dias até a emergência dos adultos que se alimentam de néctar de sucos vegetais a base de carboidratos (machos e fêmeas) e de sangue (fêmeas) para obtenção de proteínas que são essenciais para o

desenvolvimento dos ovos, que normalmente são depositados aderidos à superfície próxima ao espelho d'água (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A introdução desta espécie pelo Novo Mundo provavelmente ocorreu durante as navegações com o comércio de especiarias e escravos entre os séculos XVI a XVIII (PAUPY et al. 2012). No Brasil, o *Ae. aegypti* foi considerado erradicado em 1955 segundo a Organização Pan – Americana da Saúde (OPAS) através do uso do programa de erradicação da febre amarela urbana nas Américas. No entanto em 1960 este programa foi interrompido e em 1976 e 1977 o vetor foi registrado nos Estados da Bahia e Rio de Janeiro (SCARPASSA et al. 2008).

O *Ae. aegypti* tem uma história de expansão por todos os continentes muito bem sucedida, a evolução dos traços anteriormente silvestres para o urbano tornou a espécie bem adaptada ao ambiente doméstico e com estreita associação aos humanos (SEIXAS et al. 2013). A fêmea da espécie se alimenta durante o dia e tem preferência por colocar os seus ovos em depósitos artificiais com água parada e limpa, como o mosquito passou a ter um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico tornou-se a espécie de Culicídeo mais associada ao ser humano, um fator determinante para a ocorrência de epidemias transmitidas pelo o vetor (FRAGA et al. 2013; GLORIA-SORIA et al. 2014).

## **1.2 Importância Epidemiológica do *Ae. aegypti***

O *Ae. aegypti* é um importante vetor dos vírus da febre amarela, febre chikungunya e dengue (DENV – 1, DENV – 2 , DENV – 3, DENV – 4) (SEIXAS et al. 2013). A dengue é uma arbovirose que causa grandes preocupações por ser um problema de saúde pública mundial. É a doença viral aguda de transmissão vetorial que mais causa impacto em termos de morbidez, afeta pessoas de todas as idades e classes sociais e também exige esforços e investimentos cada vez mais intensos dos serviços de saúde pública (CÔRREA et al., 2005). A espécie também é responsável pela transmissão do vírus do gênero *Alphavirus*, causador da febre chikungunya que é uma arbovirose com ciclo de transmissão humano – mosquito – humano com os principais sintomas de artrite severa, artralgias, mialgias, febre alta e fortes dores de cabeça, essa infecção raramente é fatal, porém as dores nas articulações muitas vezes podem ser graves e debilitantes (GONZALEZ et al. 2014)

As transmissões das arboviroses ocorrem pela picada da fêmea de *Ae. aegypti* infectada, que tem hábito domiciliar e predominantemente urbano. Portanto a prevenção de epidemias de dengue e chikungunya dependem fundamentalmente da redução populacional do vetor das doenças no domicílio e peridomicílio (CÔRREA et al., 2005).

De acordo com o Ministério da Saúde (MS) até março de 2015 foram notificados 224.100 mil casos de dengue em todo o Brasil com 102 casos graves, 52 óbitos e 913 casos com sinais de alerta. Os números apresentados representam um aumento de cerca de 162% dos casos de dengue em relação ao mesmo período em 2014. Nos últimos anos tem sido registrada a ocorrência da febre chikungunya no Brasil, uma arbovirose reemergente que também é transmitida pelo o *Ae. aegypti*, e ainda, de acordo com o MS em 2014, foram confirmados 2.773 casos autóctones da doença, ou seja, de pessoas sem registro de viagem para países com transmissão da doença, como República Dominicana, Haiti, Venezuela e Ilhas do Caribe, estes casos foram registrados nos estados do Amapá, Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Roraima. No primeiro trimestre de 2015, foram registrados 1.049 casos autóctones, sendo 459 na Bahia e 590 no Amapá. No entanto entre 2014 e 2015 foram confirmados 100 casos importados da doença em pessoas que viajaram para outros países (MS, 2015).

No último século, o Brasil tornou-se o país com maior número de casos de dengue do mundo representando cerca de 78% de todos casos notificados nas Américas (MENDONÇA et al. 2014). Esses índices revelam que a situação epidemiológica no país é caracterizada pela a expansão vetorial com ocorrência dessas arboviroses em todas as regiões do Brasil. Os índices apresentados são os principais indicativos de que a redução no número dos casos de dengue e chikungunya só são possíveis com o combate ao vetor (CÔRREA et al., 2005). Portanto, novas estratégias de controle dos índices populacionais devem ser adotadas, levando – se em consideração as peculiaridades das diferentes regiões do país com base em informações geradas a partir de estudos que identifique e caracterize as populações de *Ae. aegypti* nas diferentes regiões do Brasil.

### **1. 3 Estudos de Variabilidade Genética em Populações de *Ae. aegypti***

O conhecimento da diferenciação e estruturação genética em populações de insetos vetores é importante para elaboração de programas de controle eficientes que possam atingir as populações competentes vetorialmente e dentro dos limites geográficos necessários interromper a transmissão de arboviroses (URDANETA-MARQUEZ e FAILLOUX, 2010). Desta forma, a partir do uso de sequências de DNA, vários estudos têm enfatizado a importância do conhecimento da estrutura genética das populações de *Ae aegypti* tanto ao nível intra como interpopulacional, bem como, os fatores que possam conduzir as populações às características diferenciadas quanto à competência vetorial, resistência a inseticidas e



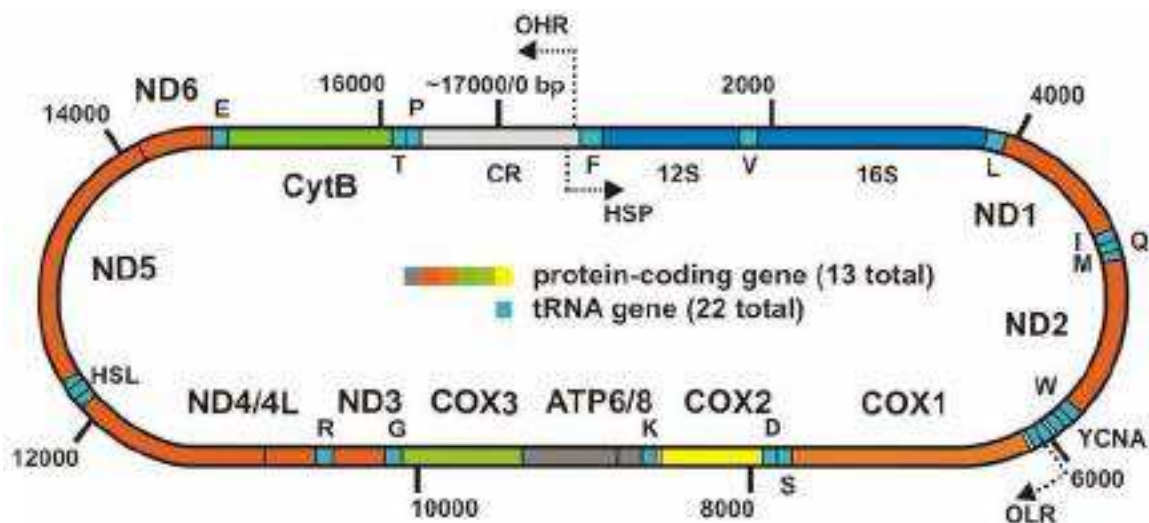
adaptação ecológicas (FRAGA et al., 2003, MOUSSON et al., 2005; BRACCO et al., 2007; LIMA JÚNIOR e SCARPASSA, 2009, TWERDOCHLIB et al., 2012).

Estudos que tratem da variabilidade genética de populações do *Ae. aegypti* na região meio norte do Brasil são incipientes. Considerando a importância epidemiológica do vetor como transmissor de várias arboviroses e os elevados índices populacionais na região meio norte do Brasil faz-se necessário estudos que estimem a variabilidade genética e faça inferência sobre a estrutura das populações, o que permitirá informar quanto a dinâmica populacional da espécie e consequentemente viabilizar novas perspectivas de estudos no que se refere a importância do mosquito como agente transmissor de doenças, e assim, subsidiar novas estratégias de controle do vetor na região.

## 1.4 Marcadores moleculares

### 1.4.1 Genoma mitocondrial: Gene NADH4

O DNA mitocondrial possui uma organização simples com 37 genes, dois codificam RNAs ribossômicos, 13 polipeptídeos relacionados com a fosforilação oxidativa e 22 para RNAs transportadores (Figura 2).



**Figura 2.** Molécula de DNA mitocondrial (FONSECA et al., 2008)

Seu tamanho é de aproximadamente 16.000 pares de bases, porém ele é muito importante para o metabolismo celular (BOORE, 1999). O genoma mitocondrial está presente em grande quantidade em todas as células com cerca de 100.000 cópias, além disso, é de herança materna e, portanto, não sofre recombinação o que o torna uma importante ferramenta para traçar a história evolutiva e filogenia das populações existentes. Uma vez que possui alta taxa de evolução, cerca de dez vezes maior do que o genoma nuclear, por consequência dos

reduzidos mecanismos de reparos na molécula de DNA mitocondrial facilita o acúmulo de mutações o torna uma ferramenta largamente utilizada em estudos de populações de insetos (BIRUNGI e MUNSTERMANN, 2002; DE BRITO et al., 2002; AVISE, 2004; MOUSSON et al., 2005). Para estudos populacionais de vetores frequentemente é usado o gene mitocondrial NADH4, este gene acumula mais rapidamente as substituições de bases nucleotídicas e por ser um gene altamente polimórfico, tem possibilitado aos pesquisadores inferir com relação à ocorrência de diferentes linhagens mitocondriais, quanto à filogeografia e quanto à variabilidade genética de populações de *Ae. aegypti* (TWERDOCHLIB et al., 2012; PAUPY et al., 2012, FRAGA et al., 2013).

#### **1.4.2 Genoma Nuclear: Microssatélites**

Os marcadores microssatélites são pequenas sequências repetidas em tandem, compostas de 1-6 pares nucleotídeos. São abundantes e razoavelmente distribuídos pelo genoma nuclear dos eucariontes (AVISE, 2004). As sequências simples repetidas (SSR) ou microssatélites são consideradas os marcadores moleculares mais polimórficos com altas taxas de mutações que se deve em grande parte pela instabilidade que surgiu no mecanismo específico de mutação chamado de slippage (deslizamento) da DNA polimerase seguida pela falta de reparação ou durante o crossing-over desigual. E, portanto, devido às elevadas taxas de mutações os microssatélites tem se mostrado um marcador eficiente quanto ao aspecto de estimar a variabilidade das populações e inferir quanto à estrutura genética populacional sendo considerado um excelente marcador por envolver padrões de fluxo gênico e diferenciação genética intra e interespecífica. Seu uso como marcador é devido a sua alta variabilidade, expressão codominante e ampla distribuição no genoma (CHAMBERS et al., 2007; ENDERSBY et al., 2009).

Devido a sua elevada taxa de mutações e evolução rápida, os microssatélites podem detectar diferenciação genética, mesmo em espécies fracamente estruturadas, por isso são usados para inferir o fluxo gênico entre as populações contemporâneas; portanto, eles fornecem informações úteis sobre os padrões de dispersão dos vetores, o que é fundamental para os esforços de controle (MENDONÇA et al., 2014).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estimar a variabilidade genética em populações de *Ae. aegypti* pertencentes à região meio norte do Brasil com base em marcadores mitocondriais e nucleares a fim de inferir quanto à dinâmica populacional do vetor na região.

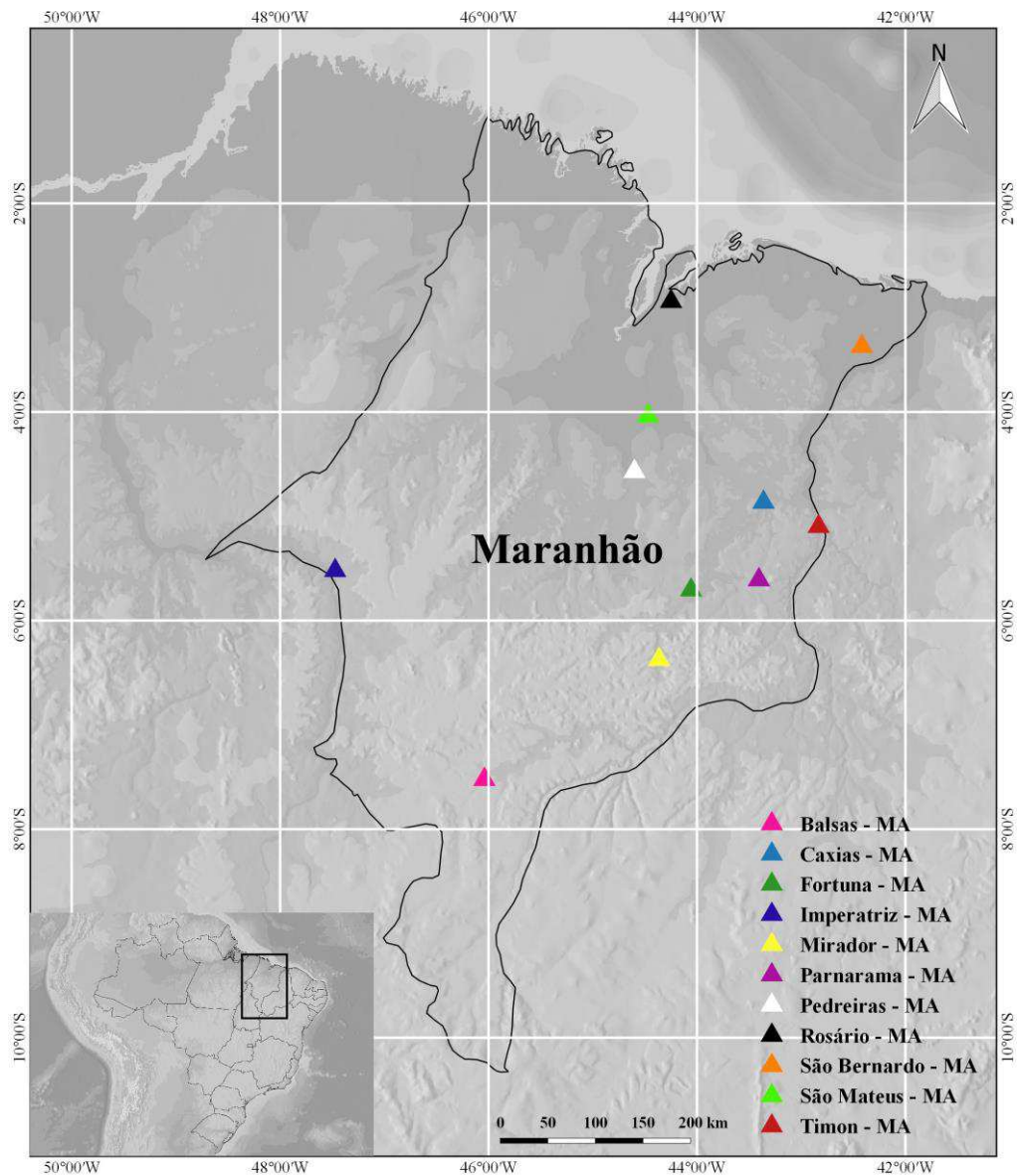
### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar geneticamente as populações de *Ae. aegypti* do estado do Maranhão com base no marcador mitocondrial NADH4;
- Estimar a variabilidade genética nas populações de *Ae. aegypti* da região meio norte que compreende os estados do Maranhão, Pará, Piauí e Tocantins através de marcadores microssatélites;
- Determinar o nível de variabilidade e diferenciação genética inter e intrapopulacional;
- Estimar a distância genética entre as populações;
- Inferir quanto à dinâmica populacional do vetor na região meio norte do Brasil.

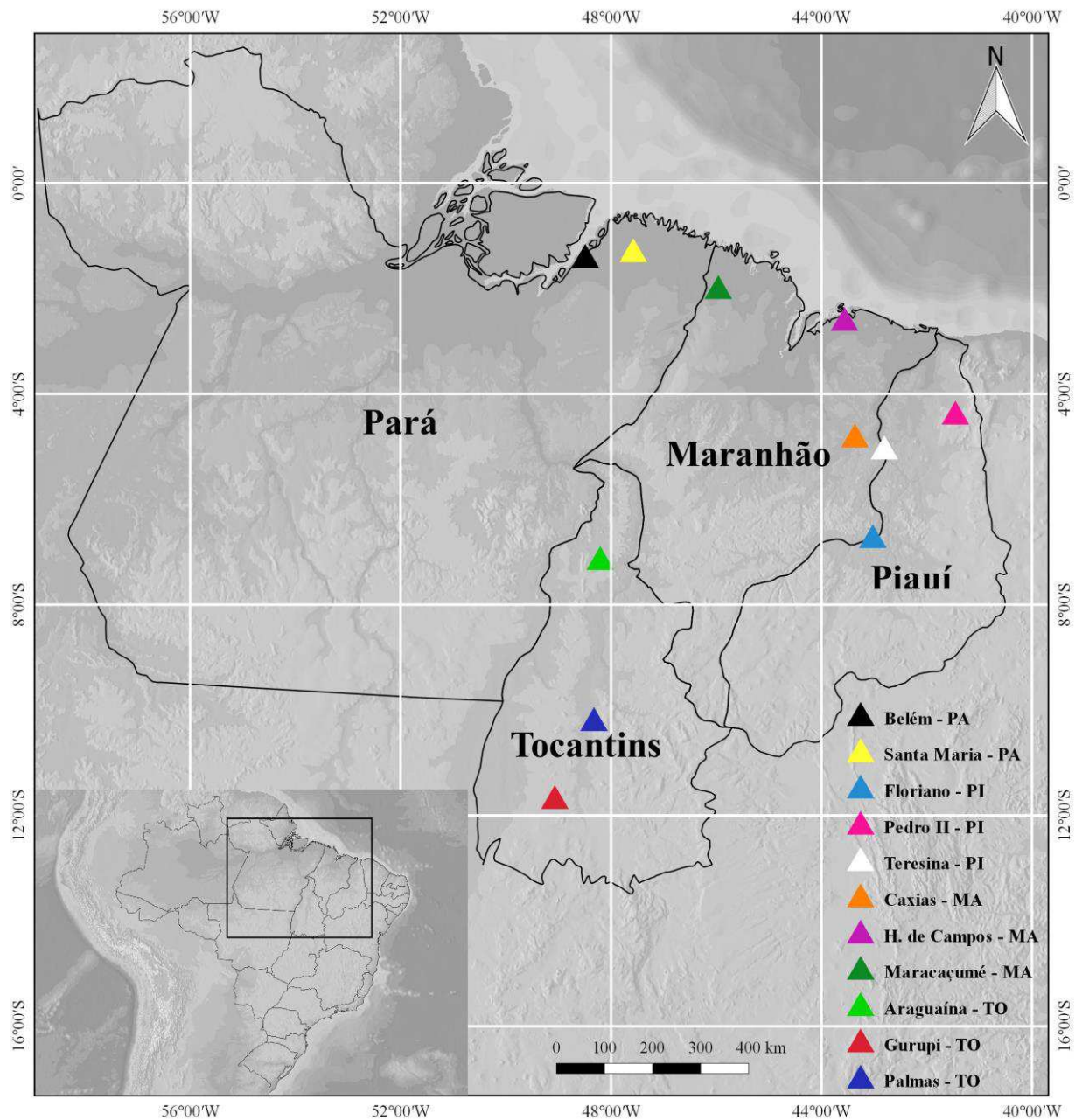
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3. 1 Procedência e Obtenção das Amostras

As amostras foram obtidas em quatro estados da região meio norte do Brasil: Maranhão (Balsas, Caxias, Fortuna, Imperatriz, Humberto de Campos, Maracaçumé, Mirador, Parnarama, Pedreiras, Rosário, São Bernardo, São Mateus e Timon), Tocantins (Araguaína, Gurupi e Palmas), Pará (Belém e Santa Maria) e Piauí (Floriano, Teresina e Pedro II) (Figuras 3 e 4).



**Figura 3.** Área de coleta das amostras analisadas com base no gene mitocondrial NAHD4 no estado do Maranhão, Brasil.



**Figura 4.** Área de coleta das amostras analisadas com base em marcadores microssatélites da região meio norte, Brasil.

As coletas foram realizadas na companhia de um agente de endemias e, nas residências, levando em consideração uma distância mínima de 1 km entre as residências e, nestas foram obtidas larvas, pupas e ainda foram deixadas armadilhas para ovos (APO) no peridomicílio que foram recolhidas após cinco dias. O material coletado foi transportado para Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA (GENBIMOL), no qual, os ovos foram colocados em água para eclodir e as larvas foram alimentadas até o 4º estágio. Todo material biológico coletado foi identificado através de chave taxonômica de Consoli e

Lourenço-de-Oliveira (1994). Após identificação os espécimes foram acondicionados em tubos etiquetados e congelados em um freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior aplicação das técnicas moleculares.

### **3. 2 Análises Genéticas**

#### **3. 2. 1 Extração do DNA**

O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo desenvolvido por Wilkerson et al. (1993) com algumas adaptações que consta das seguintes etapas:

- a) Cada larva foi colocada em um tubo 1,6  $\mu\text{L}$  e como auxílio de bastão de acrílico foram homogeneizadas em 50  $\mu\text{L}$  de Tampão de Lise (TL) = (SDS 1%, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 25 mM pH 8,0 e NaCl 25 mM);
- b) Em cada tubo adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de TL removendo resíduos das paredes do tubo e do bastão;
- c) Incubou-se os tubos em um banho-maria a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos;
- d) Adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de RNase para larva fresca e 10  $\mu\text{L}$  para larva congelada\*;
- e) Centrifugou-se os tubos a 14.000 rpm por 30 segundos;
- f) Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio em cada tubo;
- g) Agitou-se cada tubo através do vortex e deixou-se os mesmos em gelo por uma hora;
- h) Centrifugou-se os tubos a 14.000 rpm por 10 minutos;
- i) Transferiu-se o sobrenadante de cada tubo para um novo tubo;
- j) Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto em cada tubo;
- l) Deixou-se cada tubo a  $-20^{\circ}\text{C}$  por uma hora ou overnight;
- m) Centrifugou-se as amostras a 14.000 rpm por 30 minutos e descartou-se o sobrenadante;
- n) Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de etanol a 70% e centrifugou-se as amostras a 14.000 rpm por dez minutos;
- o) Descartou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado;
- p) Ressuspendeu-se o DNA total em 30  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e estocou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$ ;
- r) Visualizou-se o DNA em minigel de agarose a 1% (50mL TBE 1X/50  $\mu\text{g}$  de agarose ) em uma proporção de 3  $\mu\text{L}$  de tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 5  $\mu\text{L}$  de DNA.

\*Adaptado de acordo com a qualidade de acondicionamento de material biológico.

Cada amostra de DNA foi quantificada em um espectrofotômetro nanodrop (L-Quant/Biotech-Space) sendo as mesmas diluídas em água Milli-Q a uma concentração final de 50 ng/ $\mu\text{L}$  de DNA.

### 3. 2. 2 Amplificação do Gene Mitocondrial NADH4 através da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3. 2. 3 Reação de Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados com o kit “ExoSap-IT” (USB Corporation) conforme recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA usando-se o método didesoxiterminal (SANGER et al., 1977), realizada com o Kit “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas em volume de 10 µL, utilizando-se os seguintes componentes:

- a) 1,5  $\mu\text{L}$  do produto amplificado;
- b) 2,0  $\mu\text{L}$  de primer forward NADH4L (pmol/  $\mu\text{L}$ );
- c) 1,0  $\mu\text{L}$  de Big Dye
- c) 1,5  $\mu\text{L}$  de Tampão 5X para sequenciamento (kit Big Dye)
- d) 4,0  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q;

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

- a) Submeteu-se a placa a um spin (centrífuga de placa);
- b) Adicionou-se 2,5 $\mu\text{l}$  de EDTA (125 mM);
- c) Vedou-se a placa e submeteu-a a um spin;
- d) Adicionou-se 30 $\mu\text{l}$  de Etanol 100%;
- e) Vedou-se a placa e misturou-se invertendo de 4-5x;
- f) Envolveu-se a placa em papel alumínio e deixou-a em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos;
- g) Centrifugou-se a 4.000 rpm por 30 minutos;
- h) Inverteu-se bruscamente a placa para descartar o álcool e secar sobre papel absorvente;
- i) Centrifugou-se a placa invertida por 15 segundos a 1.150 rpm;
- j) Adicionou-se 30  $\mu\text{l}$  de Etanol a 70%;
- l) Vedou-se a placa;
- m) Centrifugou-se a 3.440 rpm por 15 minutos;
- n) Inverteu-se bruscamente para descartar o álcool e secou-se sobre papel absorvente;
- o) Centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- p) Deixou-se a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool;
- q) Ressuspendeu-se a placa com formamida (10 $\mu\text{l}$ ) e submeteu-a à eletroforese através de um sequenciador automático de DNA ABI 3500/Life Technologies (Applied Biosystems).

### **3. 2. 4 Amplificação dos Locos Microssatélites através da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR**

Para o isolamento dos três locos polimórficos a partir de um conjunto de DNA total, empregou-se a técnica de PCR seguindo o protocolo de Schuelke (2000), usando iniciadores específicos, publicados por Huber et al. (2001) (Tabela 1).



**Tabela 1.** Locos microssatélites para *Ae. aegypti*.

Locos	Tipo de Repetição	Fragmentos por pb	Nº. alelos
AET3A7	Hex CGA CAG ATG GTT ACG GAC GG GTC CCG CTC CAA AAA TGC CC	216-272	12
AE3472	Fam CGT AGT GAT TCT GTG ATA TGG CAT CAG ATT CAG TAA	83-117	11
AEC2A8	CGG AAG GAA TCC ATC CAA C Hex GGT GTG GAC AAC TGG AGC	201-246	14

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

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

O protocolo de amplificação dos loci microssatélites constou de uma desnaturação inicial de 1 minuto a 93° C, seguida de 35 ciclos com os seguintes parâmetros:

- 93° C por 30 segundos (desnaturação);
- 58° C por 35 segundos (anelamento);
- 72° C por 1 minuto e 30 segundos (síntese do fragmento ou extensão).

Após os 35 ciclos ocorreram uma extensão final de 30 minutos a 72° C. O produto da PCR foi visualizado em minigel de agarose a 1% em uma proporção de 3 µL de tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 3 µL de PCR.

### 3. 2. 5 Genotipagem

Os produtos de PCR foram diluídos 20X em água Milli-Q. Em 1 µL de cada produto diluído foi adicionado 0,3 µL de 600 LIZ Size Standart e 8,7 µL de formamida. A placa com 96 amostras de 10 µL foi colocada em um termociclador para aquecer a 95°C por 5 min, em seguida foi submetida a uma eletroforese que correspondeu a genotipagem realizada no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 3500/Life Technologies de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos foram analisados utilizando o programa GeneMapper ver. 4.0 (Applied Biosystems).

### 3. 3 Análises dos Dados

#### 3. 3. 1 Gene Mitocondrial NADH4

As sequências obtidas foram editadas através do Programa BIOEDIT, versão 7.0.5.2, (HALL, 1999). As diversidades haplotípica ( $h$ ), as diversidades nucleotídica ( $\pi$ ), os testes de  $D$  (TAJIMA, 1989) e  $F_s$  (FU, 1997) que geram informações quanto à neutralidade seletiva em populações naturais foram realizados através do programa DNAsp versão 5.0 (ROZAS et al., 2009).

No programa ARLEQUIN, versão 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010) foi verificado a existência de populações diferenciadas e avaliado o grau de significância da variabilidade genética que foram estimadas pela distância genética e o fluxo gênico com base em valores de  $F_{ST}$  e número de migrantes por geração ( $Nm$ ), bem como, a análise hierárquica para estimar diferenciação genética inter e intrapopulacional com base na análise molecular de variância (AMOVA).

A relação filogenética entre os haplótipos foi inferida através de árvores filogenéticas pelo o método de Neighbor-Joining, seguindo o modelo de Tamura-Nei com a análise de bootstrap calculada por meio de 1000 repetições através do programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013). Foi incluído como grupo externo duas sequências haplotípicas do gene NADH4 de *Ae. albopictus* (COSTA et al. (2006) – Genbank # EF153761) e *Anopheles marajoara* (WILKERSON et al. (2005) – Genbank # AY846347).

Os haplótipos identificados neste estudo foram comparados com haplótipos provenientes do GenBank de estudos realizados na Ilha de São Luís, Maranhão #KF922333–KF922342 (FRAGA et al., 2013); na Amazônia #EU650405-EU650417 (LIMA JÚNIOR e SCARPASSA, 2009); no México #AF334842-AF334865 (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE et al., 2002); no Peru #DQ177153-DQ177155 (COSTA-DA-SILVA et al., 2005); no Paraná #JN089748-JN089755 (TWERDOCHLIB et al., 2012); em outras regiões do Brasil #AY906835-AY906853 (PADUAN e RIBOLLA, 2008) e das Américas, África e Ásia #DQ176828-DQ176831, #DQ176833-DQ176843, #DQ176845-DQ176849 (BRACCO et al., 2007).

#### 3. 3. 2 Locos Microsatélites

Os resultados das genotipagens analisadas no programa GeneMapper ver. 4.0 (Applied Biosystems) para a visualização do padrão dos alelos foram inseridos com os dados genotípicos diploides montados em uma planilha no formato Excel.

No programa GenALex 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012) foram realizadas as análises de variabilidade genética a partir da frequência e distribuição dos alelos por locos e por população, com base nessas análises foram obtidas as heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e foi testado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação, bem como os cálculos dos níveis de diferenciação genética segundo a estatística  $F$  de Wright -  $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  e  $F_{ST}$  par a par (WEIR e COCKEHAM, 1984); matriz de distância genética ( $D_a$ ) e similaridade genética ( $D_i$ ).

A Análise Molecular de Variância (AMOVA) foi realizada no programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010) onde a diferenciação genética inter e intrapopulacional foi analisada a partir de subdivisão das populações em grupos. A significância do índice de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) que representa a quantidade de diferenciação e fluxo gênico entre as populações (NEIGEL, 2002) foi estimada através de 1023 permutações aleatórias.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise genética em Populações de *Ae. aegypti* do estado do Maranhão com base no gene Mitocondrial NAHD4

Para o gene NAHD4 foi obtido 119 sequências de *Ae. aegypti* com 337 pares de bases compreendendo 11 populações no estado do Maranhão. A análise apresentou nove haplótipos e 12 sítios informativos. O haplótipo H2 foi o mais frequente ( $f = 51$ ) representando 42,86%, ocorrendo em todas as populações estudadas, exceto na população de Parnarama. O haplótipo H1 ( $f = 44$ ) foi o segundo mais frequente com 36,97% não sendo observado nas populações de Fortuna e Rosário. O haplótipo H3 foi o terceiro mais frequente ( $f = 10$ ) com 8,40% observado nas populações de Caxias, Fortuna, Parnarama, Rosário, São Bernardo. O haplótipo H7 ocorreu apenas na população de Pedreiras com uma frequência de 5,88% ( $f = 7$ ). Os haplótipos H5 e H8 apresentaram a mesma frequência ( $f = 2$ ) representando apenas 2,38% com o haplótipo H5 ocorrendo nas populações de Fortuna e Parnarama e o haplótipo H8 na população de Rosário. Já os haplótipos H4, H6 e H9 foram encontrados como haplótipos únicos, sendo observados nas populações de Fortuna, Imperatriz e São Mateus respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Números de haplótipos, sítios informativos, frequência total dos haplótipos e número dos haplótipos para populações de *Ae. aegypti* do estado do Maranhão com base no gene mitocondrial NAHD4 e haplótipos de outros estudos.

<sup>1</sup> NH	Sítios informativos		<sup>2</sup> Freq	Populações										<sup>3</sup> Outros estudos							
	11111222 22	5912367145 69		<sup>4</sup> Bal	Cax	Fort	Imp	Mir	Par	Ped	Ros	SBer	SMat	Tim	PR	AM	BR	AAA	Peru	Mex	SL
H1	TGCTAATTAT AC		44	8	8	-	11	4	5	1	-	1	1	5	H3	H6	-	-	-	-	H6
H2	CATCGACCGA GT		51	2	1	6	5	2	-	2	6	10	9	8	H4	H10	-	H5	H2	H1	H1
H3	CATCGACCGA GC		10	-	4	2	-	-	2	-	1	1	-	-	H2	-	H2	-	-	H20	H2
H4	CGTTGACCGA GT		1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	TGCTAATTAA AC		2	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	TGCTAGTTAT AC		1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	TACTAATTAA AT		7	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	H1	H1	H11	H15	H3	-	-
H8	CATCGACCGA AC		2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H4
H9	CGTCGACCGA GC		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>NH = número de haplótipos, <sup>2</sup>Freq = frequência, <sup>3</sup>Hplótipos de outros estudos;

<sup>4</sup>Bal = Balsas, Cax = Caxias; Fort = Fortuna; Imp = Imperatriz; Mir = Mirador; Par = Parnarama; Ped = Pedreiras; Ros = Rosário; SBer = São Barnardo; SMat= São Mateus; Tim = Timon; PR = Paraná (Twerdochlib et al., 2012); AM = Amazonia (Lima Júnior and Scarpassa, 2009); BR = Brazil (Paduan and Ribolla, 2008); AAA = Americas, Africa, and Asia (Bracco et al., 2007); Peru (Costa-da-Silva et al., 2005); Mex = Mexico (Gorochotegui-Escalante et al., 2002); SL = São Luís, Maranhão (Fraga, et al., 2013).

As diversidades genéticas e os testes de neutralidade foram estimados para todas as populações agrupadas onde observou-se uma diversidade haplotípica de  $h = 0,673$  e nucleotídica de  $\pi = 0,01628$  e para as populações isoladas onde a diversidade haplotípica ( $h$ ) variou entre 0,318 (São Bernardo) e 0,644 (Fortuna) e a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) variou entre 0,00264 (Rosário) e 0,01741 (Mirador). Os testes de neutralidade de  $D$  e  $F_s$ , não foram significativos, considerando todas as populações agrupadas ou populações isoladas, com  $P > 0,05$ , indicando que o polimorfismo está de acordo com o modelo neutro de mutações (Tabela 3).

**Tabela 3.** Diversidade genética e testes de neutralidade em onze populações de *Ae. aegypti* analisadas no estado do Maranhão.

Populações	N	Diversidades Genéticas		D de Tajima	FS de Fu
		$h$	$\pi$		
Balsas	10	0,355	0,01161	0.02622	6.47266
Caxias	13	0,564	0,01567	1.98116	6.19364
Fortuna	10	0,644	0,00765	-1.20010	1.17603
Imperatriz	17	0,522	0,01475	1.50245	7.00032
Mirador	6	0,533	0,01741	1.31709	6.05664
Parnarama	8	0,607	0,01304	0.68813	3.61355
Pedreiras	10	0,511	0,01022	-0.51119	3.53581
Rosário	9	0,555	0,00264	0.71533	0.13355
São Bernardo	12	0,318	0,00584	-1.91083	2.26872
São Mateus	11	0,345	0,00680	-1.67815	2.52366
Timon	13	0,512	0,01674	2.39052	9.44716
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>0,673</b>	<b>0,01628</b>	<b>3.75392</b>	<b>6.24060</b>

N= número amostral,  $h$  = diversidade haplotípica e  $\pi$  = diversidade nucleotídica, Significância para os testes de neutralidade  $P > 0,05$ .

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para investigar a diferenciação genética nas populações, onde verificou-se um  $F_{ST} = 0,325$  com  $P$  significativo ( $p < 0,001$ ) com a maior variação observada dentro das populações 67,46% e a menor variação entre as populações com 32,54% (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise molecular de variância (AMOVA) nas populações de *Ae. aegypti* para o estado do Maranhão.

Tipos de Variação	Componentes de Variação		$F_{ST}$	$P^*$
	Componentes de Variação	Variação (%)		
Entre populações	0,91936	32,54	0,32535	< 0,001
Dentro das populações	1,90637	67,46		

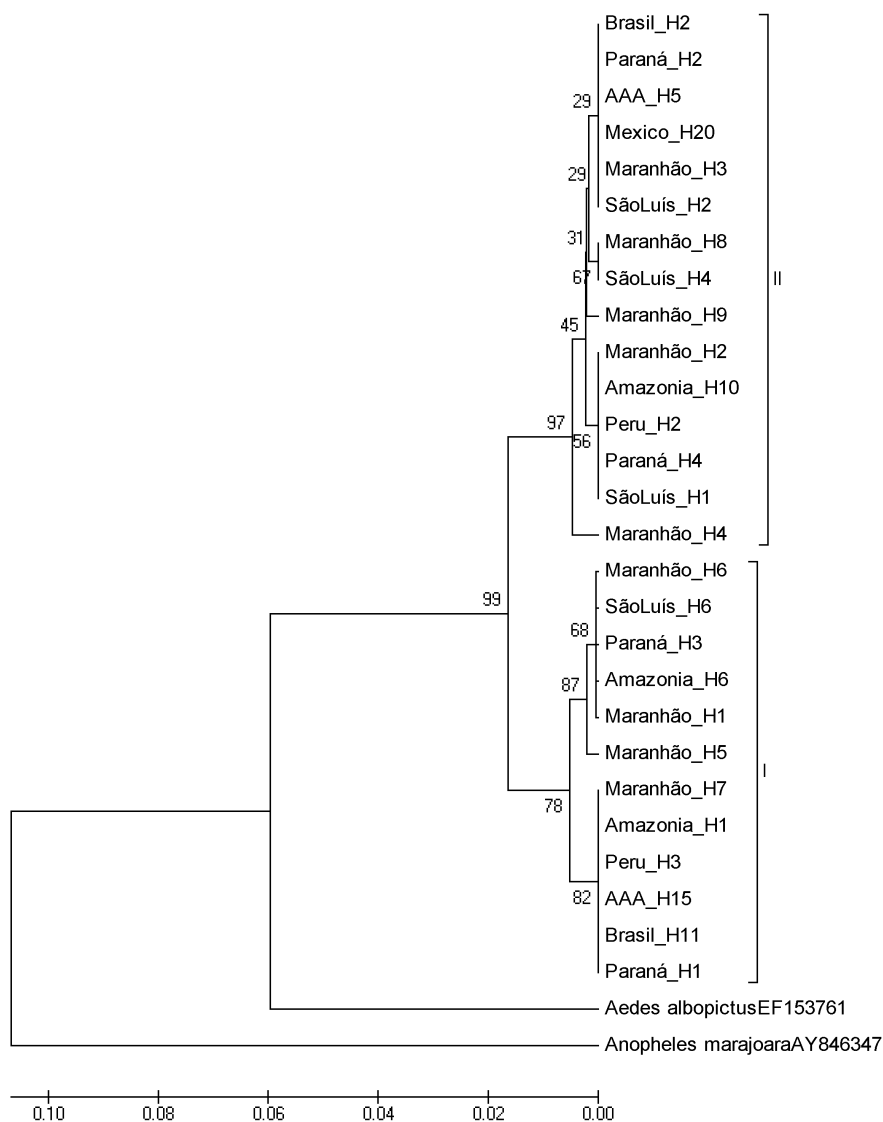
\*Valores de  $P$ , calculados aleatoriamente com 1.023 permutações.

A diferenciação genética representada pelos índices par-a-par de  $F_{ST}$  variou de -0,012 (Balsas/Caxias) a 0,708 (Balsas/Rosário) com  $P < 0,001$  e com relação aos índices de  $Nm$  (número de migrantes por geração) verifica-se que variou de 0,20 (Balsas/Rosário) a  $\infty$  entre várias outras populações do Maranhão como pode ser observado na Tabela 5. A relação filogenética existente entre os nove haplótipos foi gerada relacionando-os com outros haplótipos obtidos em estudos realizados com populações de outras regiões de Brasil e do mundo. A árvore filogenética apresentou dois clados distintos, o clado I incluiu cinco haplótipos (H2, H3, H4, H8 e H9) entre eles o mais frequente (H2) e dois haplótipos únicos (H4, H9); o clado II reuniu quatro haplótipos (H1, H5, H6 e H7), entre eles, o segundo haplótipo mais frequente (H1) e um haplótipo único da população de Imperatriz (H6) (Figura 5).

**Tabela 5.**  $F_{ST}$  par-a-par (diagonal acima) e número efetivo de migrantes  $N_m$  (diagonal abaixo) em populações de *Ae. aegypti* para o estado do Maranhão.

Populations	Balsas	Caxias	Fortuna	Imperatriz	Mirador	Parnarama	Pedreiras	Rosário	S. Bernardo	S. Mateus	Timon
<b>Balsas</b>	-	-0.012	0.592*	-0.060	-0.100	-0.098	0.230	0.708	0.649*	0.620	0.230
<b>Caxias</b>	$\infty$	-	0.387*	-0.043	-0.117	-0.071	0.194	0.503	0.456*	0.423*	0.068
<b>Fortuna</b>	0.34	0.79	-	0.454	0.423	0.546*	0.540*	-0.018	-0.072	-0.088	0.086
<b>Imperatriz</b>	$\infty$	$\infty$	0.60	-	-0.122	-0.073	0.157	0.557*	0.510*	0.481*	0.129
<b>Mirador</b>	$\infty$	$\infty$	0.67	$\infty$	-	-0.124	0.109	0.582	0.505*	0.463	0.030
<b>Parnarama</b>	$\infty$	$\infty$	0.41	$\infty$	$\infty$	-	0.220	0.678	0.616*	0.582*	0.177
<b>Pedreiras</b>	1.66	2.07	0.42	2.68	4.05	1.76	-	0.674*	0.595	0.570*	0.204
<b>Rosário</b>	0.20	0.49	$\infty$	0.39	0.35	0.23	0.24	-	-0.025	-0.017	0.212
<b>S. Bernardo</b>	0.26	0.59	$\infty$	0.48	0.48	0.31	0.34	$\infty$	-	-0.089	0.142
<b>S. Mateus</b>	0.30	0.68	$\infty$	0.53	0.57	0.35	0.37	$\infty$	$\infty$	-	0.110
<b>Timon</b>	1.67	6.78	5.31	3.36	15.8	2.32	1.94	1.85	3.01	4.01	-

\*  $P < 0,001$ ;  $\infty$  = infinito.



**Figura 5.** Relações filogenéticas entre os haplótipos das populações de *Ae. aegypti* do estado do Maranhão. Com base no algoritmo de Neigbor Joing pelo modelo de distância genética de Tamura Nei com suporte de bootstrap de 1000 repetições.

## 4. 2 Análise genética em Populações de *Ae. aegypti* da região meio norte do Brasil com base em locos microssatélites T3A7, 3472 e C2A8.

### 4. 2. 1 Varibilidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As análises a partir dos locos T3A7, 3472 e C2A8 para 237 espécimes genotipados resultaram em 46 alelos, o número de alelos por locos foi 18, nove e 19 respectivamente com média de 5.69 alelos para as populações de *Ae. aegypti* da região meio norte. O número de alelos por locos e por população para o locos T3A7 foi de cinco alelos (Santa Maria – PA e Humberto de Campos – MA) a dez alelos (Pedro II), já para o



locos 3472 foi de um alelo (Santa Maria – PA e Araguaína – TO) a cinco alelos (Floriano – PI) e para o locos C2A8 foi de três alelos (Pedro II e Humberto de Campos – MA) a 13 alelos (Belém – PA) (Tabela 6).

A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) para o locos T3A7 variou de 0,211 (Pedro II – PI) a 0,706 (Caxias – MA) e a esperada ( $H_e$ ) variou de 0,484 (Humberto de Campos – MA) a 0,818 (Gurupi – PA). Para o locos 3472 heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,036 (Maracaçumé – MA) a 1,000 (Caxias – MA e Palmas – TO) e a esperada ( $H_e$ ) variou de 0,185 (Palmas – TO) a 0,725 (Floriano – PI) e para o locos C2A8 heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,111 (Santa Maria – PA) a 1,000 (Humberto de Campos – MA) e a esperada ( $H_e$ ) variou de 0,298 (Santa Maria – PA) a 0,876 (Belém – PA). A média do número de alelos efetivos variou de 1,000 (Santa Maria – PA e Araguaína -TO) a 8,076 (Belém – PA) (Tabela 6).

Entre os índices de coeficiente de endogamia  $F_{IS}(f)$  a variação foi de -0,803 (Humberto de Campos – MA) a 0,841 (Maracaçumé MA). As populações de Belém – PA, Floriano – PI, Pedro II – PI, Teresina – PI, Caxias – MA, Humberto de Campos – MA, Maracaçumé – MA e Araguaína – TO apresentaram valores de coeficiente de endogamia ( $f$ ) negativos o que evidencia heterozigosidade nestas populações (Tabela 6). Houve desvio significativo ( $P < 0,05$ ) do Equilíbrio de Hardy-Weinberg observado em todos os locos nas onze populações analisadas que foi decorrente da ocorrência de alguns homozigotos (Tabela 6).

Doze alelos privados foram observados, porém apenas dez apresentam uma frequência menor do que 5% os mesmos foram observados nas populações de Belém – PA, Santa Maria – PA, Pedro II – PI, Teresina – PI, Caxias – MA, Humberto de Campos – MA (Tabela 7). Os três locos, T3A7; 3472; C2A8 apresentaram desvio significativo para Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ( $*P < 0,05$  após correção de Bonferroni  $\leq 0,006$ ) entre as onze populações analisadas de *Ae aegypti* da região meio norte (Tabela 8).

**Tabela 6.** Índices de diversidade alélica em populações de *Ae. aegypti* na região meio norte com base no locos T3A7, 3472 e C2A8.

Populações	Locos	N	$\hat{A}$	Ne	Ho	He	f
Belém - PA	T3A7	23	7	4,069	0,696	0,754	0,078
	3472	23	3	2,164	0,783	0,538	-0,455
	C2A8	23	13	8,076	0,913	0,876	-0,042
Santa Maria - PA	T3A7	18	5	3,746	0,667	0,733	0,091
	3472	18	1	1,000	0,000	0,000	#N/D
	C2A8	18	5	1,424	0,111	0,298	0,627
Floriano – PI	T3A7	16	6	2,116	0,438	0,527	0,170
	3472	16	5	3,631	0,750	0,725	-0,035
	C2A8	16	6	1,869	0,438	0,465	0,059
Pedro II – PI	T3A7	19	10	3,684	0,211	0,729	0,711
	3472	19	3	2,431	0,947	0,589	-0,609
	C2A8	19	3	1,740	0,263	0,425	0,381
Teresina – PI	T3A7	25	8	2,874	0,400	0,652	0,387
	3472	25	3	1,852	0,560	0,460	-0,217
	C2A8	25	10	2,887	0,440	0,654	0,327
Caxias – MA	T3A7	17	7	2,569	0,706	0,611	-0,156
	3472	17	4	2,714	1,000	0,631	-0,584
	C2A8	17	9	4,481	0,941	0,777	-0,212
Humberto de Campos - MA	T3A7	24	5	1,939	0,333	0,484	0,312
	3472	24	4	2,313	0,958	0,568	-0,688
	C2A8	24	3	2,246	1,000	0,555	-0,803
Maracaçumé – MA	T3A7	28	8	3,424	0,500	0,708	0,294
	3472	28	3	1,291	0,036	0,225	0,841
	C2A8	28	7	3,213	0,893	0,689	-0,296
Araguaína - TO	T3A7	20	6	2,216	0,650	0,549	-0,185
	3472	20	1	1,000	0,000	0,000	#N/D
	C2A8	20	7	5,298	0,800	0,811	0,014
Gurupi - TO	T3A7	27	7	5,481	0,407	0,818	0,502
	3472	27	2	1,338	0,148	0,252	0,413
	C2A8	27	9	4,780	0,630	0,791	0,204
Palmas - TO	T3A7	20	7	2,930	0,400	0,659	0,393
	3472	20	3	1,227	0,100	0,185	0,459
	C2A8	20	8	4,624	0,650	0,784	0,171

N= número amostral,  $\hat{A}$  = número de alelos por locos, Ne=média do número de alelos efetivos,  $\hat{H}_o$ = heterozigosidade observada,  $\hat{H}_e$ = heterozigosidade esperada, f= índice de endogamia, #N/D= valores não calculados.

**Tabela 7.** Alelos privados por locos e por população de ocorrência com base nos locos T3A7, 3472 e C2A8.

Populações	Loco	Alelo	Freq.
Belém – PA	T3A7	237	0,022*
	C2A8	226	0,022*
Santa Maria – PA	C2A8	206	0,028*
		204	0,026*
Pedro II – PI	T3A7	215	0,026*
		217	0,053
		226	0,053
		243	0,026*
Teresina – PI	T3A7	218	0,040*
	C2A8	222	0,020*
Caxias – MA	C2A8	204	0,029*
H. Campos – MA	T3A7	216	0,021*

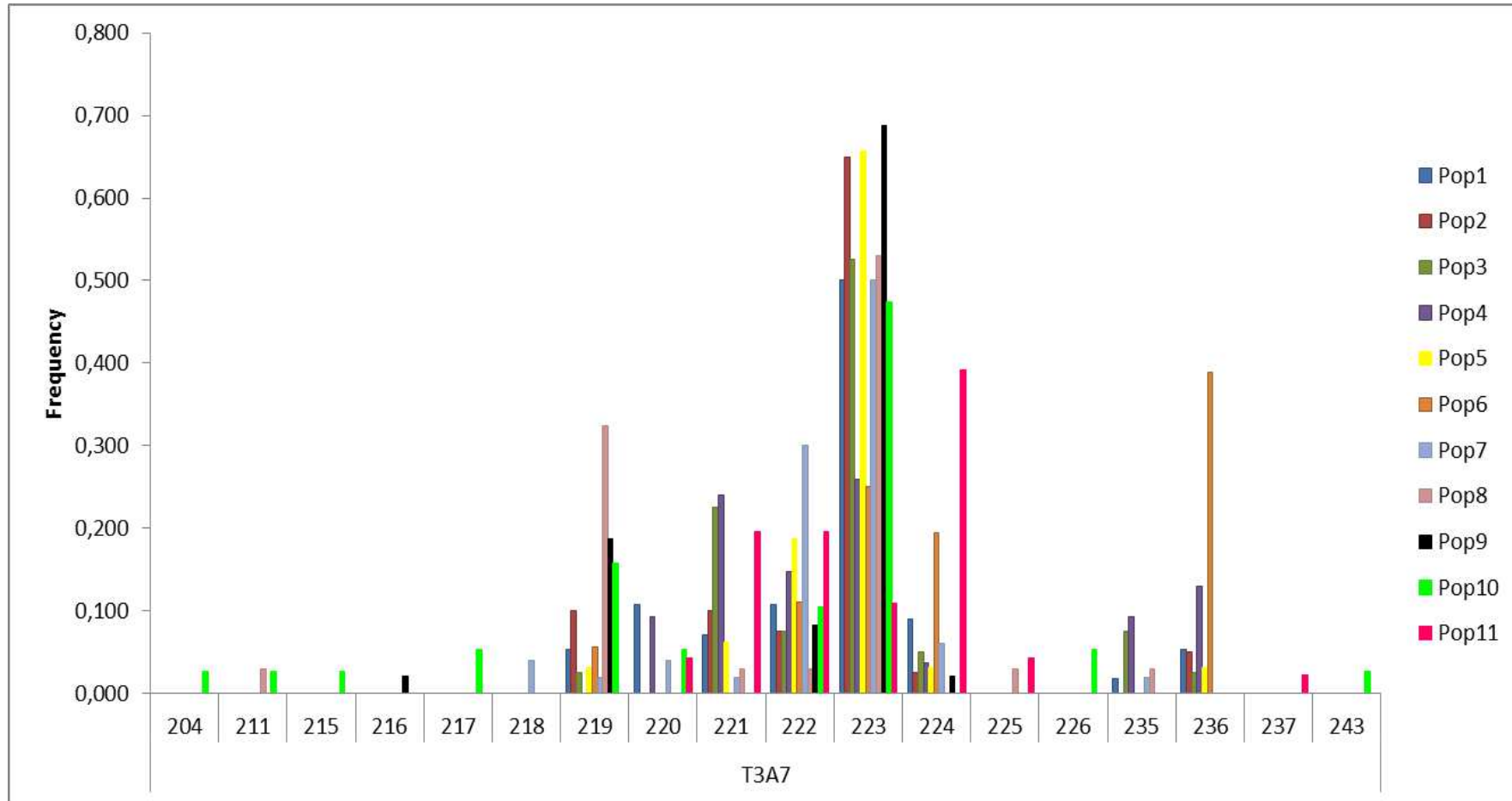
Freq = frequência, \*valores <5%.

**Tabela 8.** Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para os três locos microsatélites analisados nas populações de *Ae. aegypti* da região meio norte, Brasil.

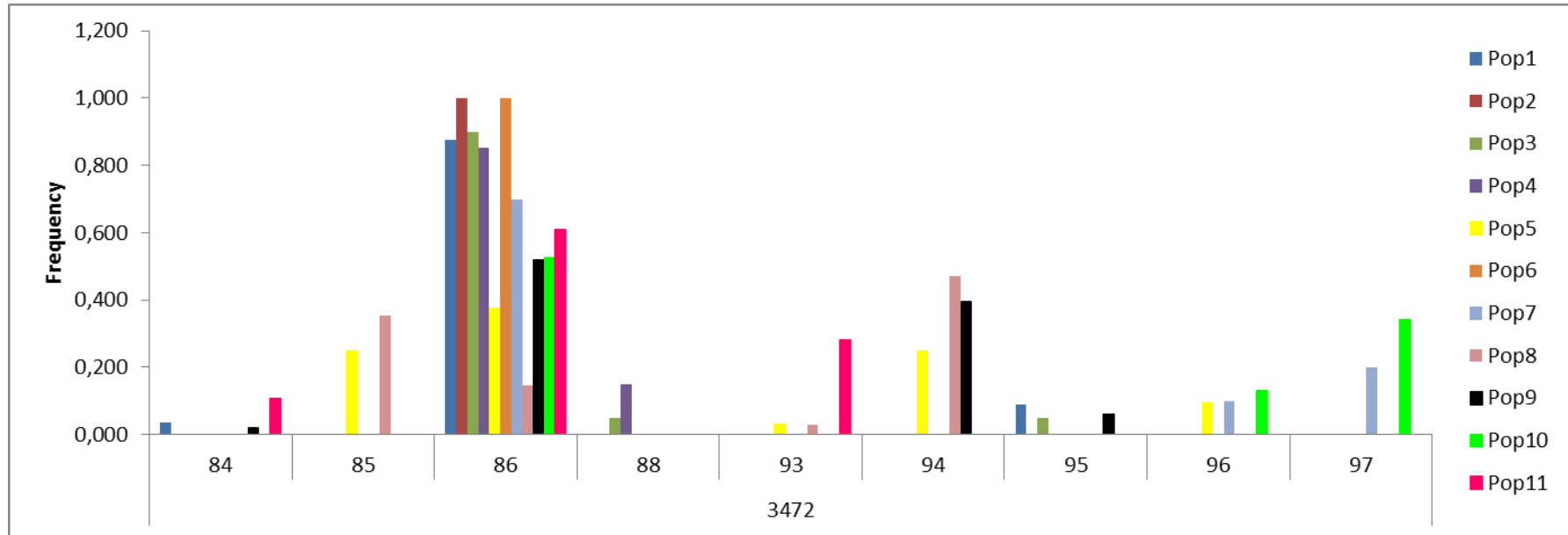
Populações	Locos		
	T3A7	3472	C2A8
Belém - PA	0,008*	0,023*	0,188
Santa Maria – PA	0,011*	am	0,000*
Florianópolis – PI	0,043*	0,036*	0,005*
Pedro II – PI	0,000*	0,002*	0,249
Teresina – PI	0,000*	0,568	0,000*
Caxias - MA	0,010*	0,007*	0,002*
H. Campos – MA	0,000*	0,002*	0,000*
Maracaçumé – MA	0,007*	0,000*	0,000*
Araguaína – TO	0,594	am	0,111
Gurupi – TO	0,000*	0,032*	0,000*
Palmas – TO	0,009*	0,000*	0,000*

\*Alelos que desviaram para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg EHW ( $P < 0,05$ ; correção de Bonferroni  $\leq 0,006$ ), am = alelos monomórficos.

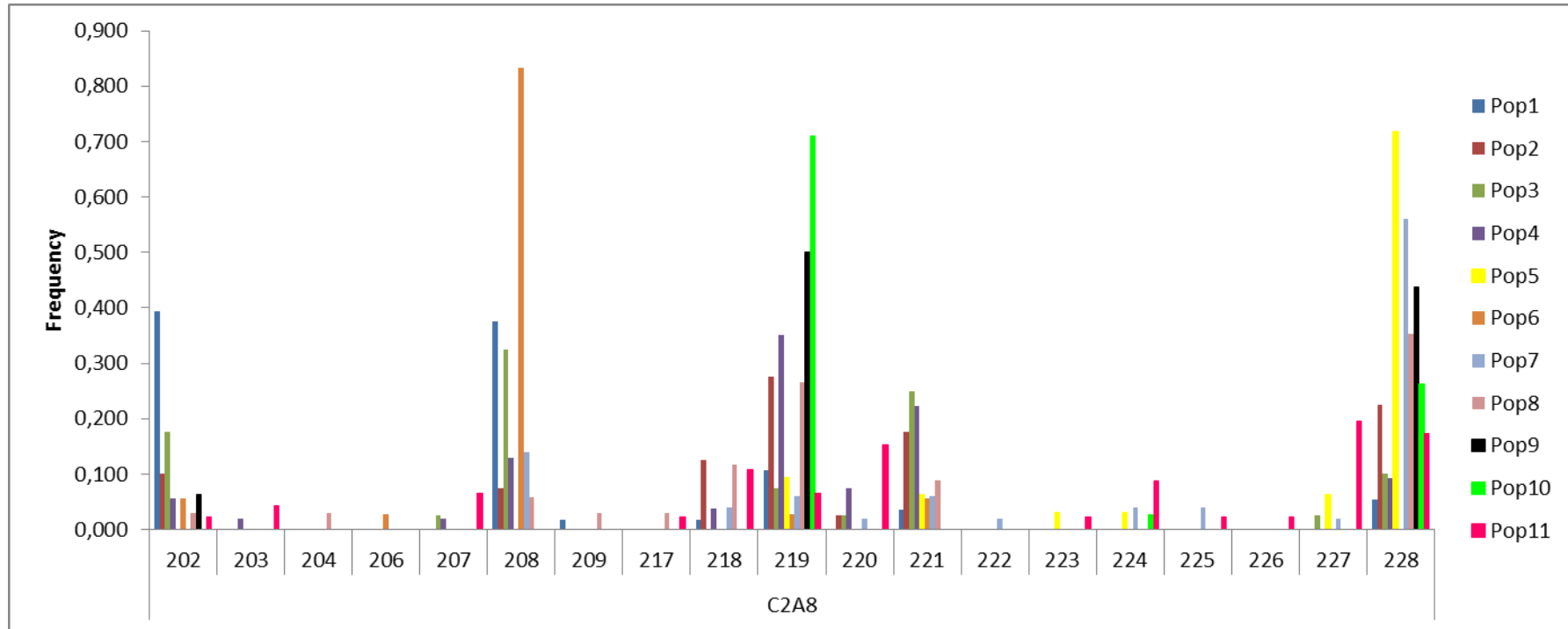
Com relação à frequência o locus T3A7 apresentou 18 alelos distribuídos entre as onze populações analisadas, dentre eles o alelo 223 apresentou a maior frequência ( $f = 20\%$ ) (Figura 6). Para o locus 3472 foram identificados nove alelos para as populações estudadas nas quais o alelo 86 foi o mais frequente ( $f = 71\%$ ) (Figura 7). O locus C2A8 apresentou 19 alelos e para este locus o alelo 219 foi o mais frequência ( $f = 22\%$ ) (Figura 8). Os alelos mais frequentes para todos os locos foram observados em todas as populações analisadas para a região meio norte.



**Figura 6.** Frequência alélica para o locos T3A7 (Pop1 = Maracaçumé – MA, Pop2 = Araguaína – TO, Pop3 = Palmas –TO, Pop4 = Gurupi – TO, Pop5 = Floriano – PI, Pop6 = Santa Maria – PA, Pop7 = Teresina – PI, Pop8 = Caxias – MA, Pop9 = Humberto de Campos – MA, Pop10 = Pedro II – PI, Pop11 = Belém – PA).



**Figura 7.** Frequência alélica para o locus 3472 (Pop1 = Maracaçumé – MA, Pop2 = Araguaína – TO, Pop3 = Palmas –TO, Pop4 = Gurupi – TO, Pop5 = Floriano – PI, Pop6 = Santa Maria – PA, Pop7 = Teresina – PI, Pop8 = Caxias – MA, Pop9 = Humberto de Campos – MA, Pop10 = Pedro II – PI, Pop11 = Belém – PA).



**Figura 8.** Frequência alélica para o locus C2A8 (Pop1 = Maracaçumé – MA, Pop2 = Araguaína – TO, Pop3 = Palmas –TO, Pop4 = Gurupi – TO, Pop5 = Floriano – PI, Pop6 = Santa Maria – PA, Pop7 = Teresina – PI, Pop8 = Caxias – MA, Pop9 = Humberto de Campos – MA, Pop10 = Pedro II – PI, Pop11 = Belém – PA).

#### 4. 2. 2 Estimativas da Estrutura Populacional

Os níveis de diferenciação genética foram analisados segundo a estatística  $F$  de Wright ( $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ ). O coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) mostrou um excesso de heterozigotos (valor do  $f$  negativo) para o locus 3472 ( $P < 0.05$ ). O maior índice de endocruzamento total ( $F_{IT}$ ) foi observado no locus T3A7. Os valores de  $F_{ST}$  por locus variaram de 0.110 (T3A7) a 0.265 (3472). A heterozigosidade média observada foi de 0,533 e heterozigosidade média esperada foi de 0,561 (Tabela 9).

**Tabela 9.** Valores obtidos para os índices da Estatística- $F$  e Diferenciação genética em populações de *Ae. aegypti* com base em três locos microssatélites para a região meio norte, Brasil.

Locos	$F_{IS}$ ( $f$ )	$F_{IT}$	$F_{ST}$	Ho	He
T3A7	0,251	0,334	0,110	0,492	0,697
3472	-0,266	0,070	0,265	0,480	0,379
C2A8	0,006	0,220	0,215	0,643	0,648
<b>Média</b>	<b>-0,003</b>	<b>0,208</b>	<b>0,197</b>	<b>0,533</b>	<b>0,561</b>

$F_{IS}$ = coeficiente de endogamia,  $F_{IT}$ = coeficiente de endocruzamento total  $F_{ST}$ = índice de fixação por comparação entre subpopulações para o total de populações, Ho= heterozigosidade média observada, He=heterozigosidade média esperada,  $P < 0.05$ .

A análise molecular de variância (AMOVA) revelou que a maior variação está dentro das populações (76%) e a diferenciação genética entre as populações foi de 18 %. O índice de diferenciação genética resultou em um  $F_{ST} = 0,175$  ( $P < 0,001$ ), indicando início de estruturação genética entre as populações analisadas (Tabela 10).

**Tabela 10** - Análise molecular de variância (AMOVA) nas populações de *Ae. aegypti* para a região meio norte, Brasil.

Tipos de Variação	Componentes de Variação	Variação (%)	$F_{ST}$	$P^*$
Entre as populações	0,184	18	0,175	<0,001
Entre indivíduos dentro das populações	0,065	06		
Dentro das populações	0,804	76		

\*Valores de  $P$ , calculados aleatoriamente com 1.023 permutações.

A diferenciação genética entre as onze populações estudadas foi realizada a partir dos índices de  $F_{ST}$  par-a-par. Dentre as onze comparações entre as populações da

região meio norte verificou-se que os índices par a par de  $F_{ST}$  variou de 0,019 (Maracaçumé – MA/Palmas – TO) a 0,282 (Santa Maria – PA/Caxias – MA) e os índices de  $Nm$  (migrantes por geração) variou de 0,637 (Santa Maria – PA/Caxias – MA) a 13,123 (Maracaçumé – MA/Palmas – TO) (Tabela 11). Os índices de distância genética ( $D_a$ ) observados entre as populações estudadas revelaram índices de variação de 0,056 (Maracaçumé – MA/Palmas – TO) a 1,341 (Santa Maria – PA/Caxias – MA). Os valores de similaridade genética ( $D_i$ ) variaram de 0,262 (Santa Maria – PA/Caxias – MA) a 0,945 (Maracaçumé – MA/Palmas – TO) (Tabela 12).



**Tabela 11.** Comparações dos valores de  $F_{ST}$  par a par, diagonal abaixo e número efetivo de migrantes (Nm) diagonal acima entre as populações de *Ae. aegypti* com base nos locos T3A7, 3472 e C2A8.

	<b>Bel</b>	<b>SMar</b>	<b>Flor</b>	<b>PedII</b>	<b>Ter</b>	<b>Cax</b>	<b>H.Cam</b>	<b>Mar</b>	<b>Ara</b>	<b>Gur</b>	<b>Pal</b>
<b>Bel</b>	-	1,178	1,806	1,788	2,866	1,564	1,636	2,309	1,710	3,242	2,366
<b>SMar</b>	0,175	-	2,599	0,716	1,195	0,637	0,700	2,600	1,158	2,599	2,599
<b>Flor</b>	0,122	0,276	-	1,768	4,944	4,203	4,000	1,476	1,680	1,578	1,651
<b>PedII</b>	0,123	0,259	0,124	-	2,759	2,159	4,013	1,653	1,895	2,483	1,664
<b>Ter</b>	0,080	0,173	0,048	0,083	-	1,930	2,807	3,011	2,976	3,178	3,405
<b>Cax</b>	0,138	0,282	0,056	0,104	0,115	-	4,477	1,283	1,244	1,417	1,308
<b>H.Cam</b>	0,133	0,263	0,059	0,059	0,082	0,053	-	1,803	2,105	2,000	1,802
<b>Mar</b>	0,098	0,088	0,145	0,131	0,077	0,163	0,122	-	4,745	4,711	13,123
<b>Ara</b>	0,128	0,178	0,130	0,117	0,078	0,167	0,106	0,050	-	4,306	7,206
<b>Gur</b>	0,072	0,120	0,137	0,091	0,073	0,150	0,111	0,050	0,055	-	4,306
<b>Pal</b>	0,096	0,088	0,131	0,131	0,068	0,160	0,122	0,019	0,034	0,030	-

Pará (Bel = Belém, SMar = Santa Maria), Piauí (Flor = Floriano, PedII = Pedro II, Ter = Teresina), Maranhão (Cax = Caxias, HCam = Humberto de Campos, Mar = Maracaçumé), Tocantins (Ara = Araguaína, Gur = Gurupi, Pal = Palmas).

**Tabela 12.** Matriz de distância genética (Da) diagonal abaixo e Similaridade genética (Di) diagonal acima entre as populações de *Ae. aegypti* com base nos loci T3A7, 3472 e C2A8.

	<b>Bel</b>	<b>SMar</b>	<b>Flor</b>	<b>PedII</b>	<b>Ter</b>	<b>Cax</b>	<b>H.Cam</b>	<b>Mar</b>	<b>Ara</b>	<b>Gur</b>	<b>Pal</b>
<b>Bel</b>	-	0,576	0,500	0,478	0,676	0,289	0,491	0,646	0,685	0,718	0,673
<b>SMar</b>	0,552	-	0,369	0,435	0,637	0,262	0,443	0,845	0,716	0,750	0,825
<b>Flor</b>	0,694	0,998	-	0,631	0,854	0,812	0,844	0,555	0,707	0,538	0,610
<b>PedII</b>	0,738	0,814	0,460	-	0,734	0,598	0,837	0,618	0,775	0,723	0,619
<b>Ter</b>	0,391	0,451	0,158	0,309	-	0,560	0,773	0,766	0,859	0,751	0,804
<b>Cax</b>	1,242	1,341	0,208	0,514	0,580	-	0,837	0,433	0,566	0,412	0,458
<b>H.Cam</b>	0,711	0,832	0,169	0,177	0,258	0,178	-	0,670	0,817	0,679	0,678
<b>Mar</b>	0,436	0,168	0,589	0,482	0,267	0,838	0,401	-	0,893	0,839	0,945
<b>Ara</b>	0,378	0,335	0,347	0,255	0,152	0,568	0,202	0,113	-	0,908	0,936
<b>Gur</b>	0,331	0,287	0,619	0,324	0,287	0,886	0,388	0,175	0,096	-	0,906
<b>Pal</b>	0,395	0,192	0,494	0,479	0,218	0,782	0,389	0,056	0,067	0,099	-

Pará (Bel = Belém, SMar = Santa Maria), Piauí (Flor = Floriano, PedII = Pedro II, Ter = Teresina), Maranhão (Cax = Caxias, HCam = Humberto de Campos, Mar = Maracaçumé), Tocantins (Ara = Araguaína, Gur = Gurupi, Pal = Palmas).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Distribuição e frequência dos haplótipos e polimorfismo do gene NAHD4 para as populações de *Ae. aegypti* do estado do Maranhão.

Neste estudo foi encontrado nove haplótipos para o estado do Maranhão um índice maior do que os encontrados por Costa-da-Silva et al. (2005) no Peru; Twerdochlib et al. (2012) no Estado do Paraná e Paupy et al. (2012) na Bolívia. No entanto, menor do que os observados na Ilha de São Luís por Fraga et al. (2013), Lima Júnior e Scarpassa (2009) na Amazônia; Bracco et al. (2007) nas Américas e Gorrochotegui-Escalante et al. (2002) no México.

O haplótipo H2 foi o mais frequente e encontra-se amplamente compartilhado no Estado do Maranhão e em outras regiões, este corresponde ao haplótipo H10 encontrado na Amazônia (LIMA JÚNIOR e SCARPASSA 2009); H1 no México (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE et al. 2002); H2 no Peru (COSTA-DA-SILVA et al., 2005); H5 nas Américas, África e Ásia (BRACCO et al., 2007); H4 no Estado do Paraná (TWERDOCHLIB et al., 2012) e H1 na Ilha de São Luís (FRAGA et al., 2013). A ampla distribuição deste haplótipo sugere que uma linhagem mais antiga do vetor resistiu e se dispersou como resultado do gargalo criado em respostas aos intensos programas de controle de vetores adotado entre décadas de 1950 e 1960 e que sua origem pode ser explicada por mosquitos que resistiram aos tratamentos químicos ou mesmo foram introduzidos de alguns países em que a erradicação nunca ocorreu.

Com relação ao haplótipo H1, apesar de ser o segundo mais frequente não foi encontrado nas populações de Fortuna e Rosário no entanto, este mesmo haplótipo foi observado como H6 na Amazônia (LIMA JÚNIOR e SCARPASSA 2009); H3 no Paraná (TWERDOCHLIB et al., 2012) e H6 da Ilha de São Luís (FRAGA et al., 2013). Com relação a esse haplótipo Lima Júnior e Scarpassa (2009) discutem sobre sua origem e sugerem que ele possa ter surgido no Brasil ou ter sido introduzido por populações de regiões ainda não estudadas. Nossos dados reforçam esta hipótese uma vez que este foi observado apenas em populações do Brasil (Amazônia, Paraná e Maranhão).

O haplótipo H3 foi compartilhado nas populações de Caxias, Fortuna, Parnarama, Rosário, São Bernardo e foi encontrado na Ilha de São Luís como H2

(FRAGA et al., 2013); no México como H20 (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE et al., 2002); em várias regiões do Brasil como H2 (PADUAN e RIBOLLA, 2008).

O haplótipo H7 foi encontrado somente na população de Pedreiras e apesar da baixa frequência este foi verificado como H1 no Estado do Paraná (TWERDOCHLIB et al., 2012); H11 em outras regiões do Brasil (PADUAN e RIBOLLA, 2008); H1 na Amazônia (LIMA JÚNIOR e SCARPASSA 2009); H15 nas Américas, África e Ásia (BRACCO et al., 2007); H3 no Peru (COSTA-DA-SILVA et al., 2005). Com relação a esse haplótipo, Bracco et al. (2007) em extenso estudo realizado pelas Américas, África e Ásia sugerem a ocorrência de introduções múltiplas para as populações de *Ae. aegypti* por eles estudadas apesar do H7 ter baixa frequência no Maranhão a sua presença permite inferir que ele está amplamente distribuído por outras regiões do Brasil e do mundo.

O haplótipo H8 encontrado em Rosário corresponde ao haplótipo H4 da Ilha de São Luís (FRAGA et al., 2013). No entanto, as duas cidades estão situadas na macrorregião norte do Estado que pode ser um indicativo de que este haplótipo tenha uma ampla ocorrência na região Norte do Estado do Maranhão. Dentre as onze populações estudadas no Maranhão os haplótipos H4 (Fortuna), H5 (Fortuna e Parnarama), H6 (Imperatriz) e H9 (São Mateus) não foram observados em outros estudos realizados com *Ae. aegypti* para este marcador molecular, sendo assim, podem representar novas mutações ou mesmo introduções de outros haplótipos de regiões ainda não estudadas ou mesmo haplótipos que ainda não se dispersaram.

Os índices de diversidade genética encontrados neste estudo ( $h = 0,673$ ;  $\pi = 0,01628$ ) foram relativamente altos quando comparados a estudos de Twerdochlib et al. (2012) que no estado do paraná obtiveram  $\pi = 0.01556$ ; Paupy et al. (2012) na Bolívia obteve  $\pi = 0.00159$ ; Costa-da-Silva et al. (2005) em populações do Peru e Bosio et al. (2005) analisando populações na Tailândia estimaram um valor  $\pi = 0,0079$ , Gorrochotegui-Escalante et al. (2002) em um estudo no México estimaram  $\pi = 0,0143$ , Fraga et al. (2013) em um estudo na Ilha de São Luís obteve  $\pi = 0,00748$ . Por outro lado valores de diversidade nucleotídica maiores do que o encontrado neste estudo foram observados em populações da Venezuela com  $\pi = 0,0187$  (HERRERA et al. 2006) e em estudo realizado nas Américas, África e Ásia com  $\pi = 0,01997$  e  $h = 0,82$  (BRACCO et al., 2007).

Os valores de diversidades nucleotídica e haplotípica encontrados em nossas análises é um indicativo da redução do fluxo gênico entre as populações de *Ae. aegypti* no Estado do Maranhão com conseqüente diferenciação genética entre as populações, essa restrição no fluxo gênico pode ser explicada pela redução no tamanho efetivo das populações devido a gargalos populacionais causados por intensos tratamentos químicos que visam o controle dessas populações de vetores através de inseticidas. Nossos resultados corroboram com Ayres et al. (2004) que relataram que estudos em várias partes do Brasil tem revelado que em regiões onde os tratamentos com inseticidas químicos são frequentes as populações analisadas apresentaram altos níveis de diferenciação genética.

Os testes de  $F_s$  (FU, 1997) e  $D$  (TAJIMA, 1989) não foram significativos ( $P > 0,005$ ) indicando que as populações de *Ae. aegypti* do Estado do Maranhão não se encontram em expansão, apesar da presença de haplótipos únicos. Esses resultados corroboram com os resultados de Lima Júnior e Scarpassa (2009) para populações da Amazônia; Twerdochlib et al. (2012) para as populações do Estado do Paraná, Bracco et al. (2007) para populações das Américas e Fraga et al. (2013) para as populações da Ilha de São Luís.

## **5. 2 Análise de variância molecular e relações filogenéticas para as populações de *Ae. aegypti* do Estado do Maranhão.**

Os dados da AMOVA neste estudo mostrou que a maior variação encontra-se dentro das populações com 67,46%;  $F_{ST} = 0,32535$ ;  $P < 0,001$ , assim como àquelas da Amazônia (72,69%;  $F_{ST} = 0,273$ ;  $P = < 0,005$ ) (LIMA JÚNIOR e SCARPASSA, 2009), Paraná (67%;  $F_{ST} = 0,32996$ ;  $P = < 0,005$ ) (TWERDOCHLIB et al., 2012) e Venezuela (77,60%;  $F_{ST} = 0,224$ ;  $P = < 0,005$ ) (HERRERA et al., 2006) indicando assim que as populações do Estado do Maranhão estão em processo de diferenciação genética.

De acordo com Rieger et al. (2006) somente a diversidade genética intraespecífica pode garantir à adaptabilidade das populações e as modificações do meio, sempre sendo alimentada pelo surgimento de novas mutações e de recombinação já existentes. Este estudo, bem como, outros estudos (GORROCHOTECHI-ESCALANTE et al., 2002; BOSIO et al., 2005; COSTA-DA-SILVA et al., 2005; LIMA

JÚNIOR e SCARPASSA, 2009; TWERDOCHLIB et al., 2012; FRAGA et al., 2013) revelam uma maior variação genética intrapopulacional o que pode ser reflexo do sucesso evolutivo desta espécie, pois os resultados da AMOVA apontam para uma estruturação populacional o que pode ser consistente com a presença de diferentes linhagens de *Ae. aegypti* no Estado do Maranhão.

O *N<sub>m</sub>* encontrado no presente trabalho variou de 0.20 (Rosário x Balsas) a 15.8 (Mirador x Timon). Isto indica, que apesar do indicativo de estruturação genética para as populações do Estado do Maranhão, ainda ocorre um relativo fluxo gênico, o que pode ser explicado pela ampla frequência do haplótipo H2. Lima Júnior e Scarpassa (2009) estudando populações de *Ae. aegypti* da Amazônia com o marcador NAHD4 encontraram altos níveis de diferenciação genética e valores de fluxo gênicos que os possibilitaram inferir que mesmo entre populações com longas distância como Santarém e Boa Vista (880 Km) o fluxo gênico foi amplo corroborando com os resultados das análises do presente estudo, pois na hipótese de isolamento por distância foi verificado um valor não significativo para o coeficiente de correlação revelando que não existe relação entre as distâncias genéticas ( $F_{ST}$ ) e as distâncias geográficas (Km) nas populações analisadas no Estado do Maranhão .

A análise da árvore filogenética mostrou dois clados suportados por um *bootstrap* de 99%. Os nossos haplótipos reunidos com haplótipos de outros estudos (BRACCO et al., 2007; LIMA JÚNIOR e SCARPASSA, 2009; TWERDOCHLIB et al., 2012; FRAGA et al., 2013) são consistentes com a presença de duas linhagens genéticas simpátricas, permitindo assim, inferir que as populações do Estado do Maranhão foram fundadas a partir de múltiplas introduções.

### **5. 3 Análise genética em Populações de *Ae. aegypti* da região meio norte do Brasil com base em locos microsatélites T3A7, 3472 E C2A8.**

Nossos resultados mostraram uma variação de 18, nove e 19 alelos para locos T3A7, 3472 e C2A8 respectivamente, diferentemente do obtido por Huber et al. (2002) em populações do Vietnã e Anjos Lima (2011) em populações da Amazônia brasileira que observaram uma variação de 12; 11 e 14 alelos para estes mesmos locos. Portanto, o número de alelos no presente estudo foi superior aos valores obtidos por estes autores exceto para o locos 3472.

Paupy et al. (2012) estudando populações de *Ae. aegypti* da Bolívia, utilizaram dois marcadores mitocondriais e nove marcadores microssatélites, e destes, utilizaram dois dos locos utilizados nas populações estudadas na região meio norte (T3A7 e 3472) nos quais o número máximo de alelos encontrado em cada loco foi de quatro alelos para ambos locos, ou seja, uma variação alélica inferior a obtida neste estudo o que revela que a frequência alélica nas populações da região meio norte foi consideravelmente alta comparada a outros estudos e portanto, estas populações apresentam uma alta diversidade genotípica.

As heterozigosidades observadas e esperadas nas populações de *Ae. aegypti* na região meio norte, apresentaram grande variação com índices que variaram de baixos a altos entre as populações analisadas ( $H_o = 0,111 - 1,000$ ;  $H_e = 0,185 - 0,876$ ). Os maiores índices de heterozigosidades foram encontrados na população de Belém – PA, o excesso de heterozigotos nesta população também foi confirmado pelo índice negativo de endogamia ( $f$ ), (WRIGHT, 1978). A população de Santa Maria – PA apresentou os menores índices de heterozigosidade e o maior valor positivo para o índice de endogamia ( $f$ ), indicando déficit de heterozigotos nesta população.

Os índices de heterozigosidades obtidos por Gloria-Soria et al. (2014) em estudo com populações da Califórnia ( $H_o = 0,463 - 0,556$ ;  $H_e = 0,494 - 0,543$ ); Anjos Lima (2011) em populações da Amazônia Brasileira ( $H_o = 0,42 - 0,61$ ;  $H_e = 0,50 - 0,66$ ); Endersby et al. (2009) em populações da Austrália e Vietnã ( $H_o = 0,432 - 0,575$ ;  $H_e = 0,421 - 0,588$ ) e Olanratmanee et al. (2013) em populações da Tailândia ( $H_o = 0,414 - 0,554$ ;  $H_e = 0,456 - 0,551$ ) foram moderadamente altos, porém com intervalos menores dos obtidos nas populações da região meio norte, ainda assim, esses índices são informativos, pois revelam a ocorrência de excesso de heterozigotos que é consequência de eventos de endogamia entre os indivíduos das populações estudadas.

Entre as onze populações de *Ae. aegypti* analisadas da região meio norte, as populações que apresentaram locos em equilíbrio genético foram Belém – PA, com o locos C2A8; Pedro II – PI com o locos C2A8; Teresina – PI com o locos 3472 e Araguaína – TO com os locos T3A7 e C2A8 as demais populações apresentaram desvio do equilíbrio genético. Anjos Lima (2011) ao analisar quatro populações de *Ae. aegypti* da Amazônia brasileira observou na população de Boa Vista somente um loco em desequilíbrio genético, enquanto que as populações de Porto Velho, Santarém e São

Luís apresentaram dois a três locos em desequilíbrio genético. Huber et al. (2002) analisando populações do Vietnã encontraram alguns locos em desequilíbrio genético, igualmente os encontrados neste trabalho para T3A7, 3472 e C2A8. Em outros estudos foram observados locos em desequilíbrio de ligação (ENDERSBY et al. 2009; WONG et al. 2012; OLANRATMANEE et al. 2013). Uma explicação provável para a deficiência de heterozigotos é que esses locos estejam passando por forte pressão de seleção, presença de alelos nulos, endogamia ou efeito de gargalo.

A AMOVA revelou moderada diferenciação genética nas onze populações da região meio norte com maior porcentagem de variação entre os indivíduos com 76% e com 18% de variação genética entre as populações com um  $F_{ST}$  0,175 ( $P < 0,001$ ). Esses resultados corroboram com os resultados obtidos nas populações da Amazônia Brasileira (ANJOS LIMA, 2011) nas quais a maior variação foi dentro das populações com 68,03% de variação com  $F_{ST} = 0,082$  ( $P < 0,05$ ) e com os resultados obtidos em populações do Vietnã (ENDERSBY et al., 2009) com uma variação genética de 90,92% dentro das populações com  $F_{ST} = 0,069$  ( $P < 0,05$ ). Os valores observados neste estudo são indicativos de que as populações de *Ae aegypti* das análises estão em processo de estruturação genética.

Os valores de  $F_{ST}$  encontrados nas comparações par-a-par revelam a ocorrência de restrito fluxo gênico entre as populações. Os valores de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) variaram de 0,019 entre as populações de Maracaçumé – MA e Palmas – TO com a ocorrência de maior fluxo gênico a 0,282 entre Santa Maria – PA e Caxias – MA com ocorrência de baixo fluxo gênico. Esses resultados são corroborados por outros estudos que observaram a ocorrência de restrito fluxo gênico entre as populações analisadas como Monteiro et al. (2014) em estudo realizado com 20 populações de *Ae. aegypti* da América que obtiveram valores de  $F_{ST}$  par a par variando de 0,04 a 0,39; Olanratmanee et al. (2013) em populações de *Ae. aegypti* da Tailândia observaram valores de  $F_{ST}$  par a par variando de 0,005 a 0,118; Paupy et al, (2012) em trabalho realizado com populações da Bolívia encontraram valores de  $F_{ST}$  par a par variando de -0,005 a 0,152 e Lovin et al. (2009) em pesquisa desenvolvida com populações do Haiti encontraram valores de  $F_{ST}$  par a par variando de 0,014 a 0,104. Em todos esses estudos apesar de restrito fluxo gênico os valores de  $F_{ST}$  foram consistentes para o início de estruturação populacional entre as populações estudadas.

Os índices de fluxo gênico apresentados pelos valores de número de migrantes ( $Nm$ ) e os valores de distância genética ( $D_a$ ) e similaridade genética ( $D_i$ ) confirmam os índices apresentados pelos valores de  $F_{ST}$  par a par. As populações de Maracaçumé – MA e Palmas – TO ( $F_{ST} = 0,019$ ) apresentaram o maior valor de similaridade genética e maior número de migrantes o que confirma que ocorre um relativo fluxo gênico entre essas populações. Neste contexto, as populações de Santa Maria – PA e Caxias – MA ( $F_{ST} = 0,282$ ) apresentaram o maior valor de distância genética e menor número de migrantes o que confirma o restrito fluxo gênico entre essas populações. O relativo fluxo gênico observado entre as populações com longas distâncias como Maracaçumé – MA/Palmas – TO ( $\approx 1.217$  km) permite inferir que há migração por transporte passivo por ação antrópica, uma vez que o *Ae. aegypti* é uma espécie que apresenta dispersão limitada com raio de dispersão de 1km em média. Anjos Lima (2011) em estudo com populações da Amazônia brasileira também encontrou relativo fluxo gênico entre populações com relativas distâncias geográficas ( $\approx 2.273$  km) e, portanto, concluiu que para a ocorrência de fluxo gênico entre populações com significativa distância, a migração dependeu exclusivamente da ação antrópica.

As análises através de três locos microssatélites (T3A7, 3472 e C2A8) em populações de *Ae. aegypti* da região meio norte revelaram um desvio significativo para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os três locos e uma alta frequência alélica, além disso, apesar de apresentarem um relativo fluxo gênico entre algumas populações apresentaram um  $F_{ST}$  0,175 com valor superior ao obtido por Anjos Lima (2011) em populações da Amazônia brasileira ( $F_{ST}$  0,082) e Endersby et al. (2009) em populações do Vietnã ( $F_{ST}$  0,069) em ambas análises o valor de  $F_{ST}$  foi consistente para o indicio de estruturação populacional e diante disso, nossos resultados são reforçados por essas análises, uma vez que as populações da região meio norte apresentaram um índice de diferenciação genética significativo para a estruturação dessas populações.

Os resultados observados no presente estudo revelaram que as populações de *Ae. aegypti* do estado do Maranhão e da região meio norte do Brasil estão em processo de estruturação populacional o que pode ser reflexo das medidas de controle que o vetor é constantemente submetido e assim, como consequência vem adquirindo



maior capacidade adaptativa o que reforça a importância do desenvolvimento de novas estratégias de controle que possam ser mais eficientes na erradicação do vetor.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para as populações de *Ae. aegypti* do estado do Maranhão a partir das análises realizadas com o marcador mitocondrial NAHD4 permitem concluir que:

- ✓ Ocorre nove haplótipos nas populações.
- ✓ O índice de diferenciação genética encontrado foi de um  $F_{ST} = 0,325$  apontando para a estruturação genética entre as populações.
- ✓ Os valores de  $F_{ST}$  par a para foram altos o que revela restrito fluxo gênico entre as populações.
- ✓ As populações estão distribuídas em duas linhagens genéticas distintas.

Os resultados obtidos para as populações de *Ae. aegypti* da região meio norte do Brasil a partir das análises realizadas com os marcadores microssatélites (T3A7, 3472, C2A8) permitem concluir que:

- ✓ Os locos T3A7, 3472, C2A8 foram polimórficos e, portanto, eficientes para a análise da variabilidade e estrutura genética nas populações de *Ae. aegypti*.
- ✓ Foram obtidos um total de 46 alelos, sendo o locus C2A8 o mais polimórfico com 19 alelos.
- ✓ As populações apresentaram desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos.
- ✓ O índice de diferenciação genética encontrado foi de um  $F_{ST} = 0,175$  com indício de estruturação genética entre as populações.
- ✓ Os valores de  $F_{ST}$  par a para foram moderadamente altos com restrito fluxo gênico entre as populações.

Os resultados desse trabalho apontam para um processo de estruturação genética nas populações do Estado Maranhão e Região meio norte, como consequência da ação antrópica que promove forte pressão de seleção pelo uso constante de tratamentos químicos através de inseticidas nos programas de controle das populações de mosquito.

## REFERÊNCIAS

ANJOS-LIMA, S. F. **Variabilidade Genética em Populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) da Amazônia Brasileira, por meio de Marcadores Microsatélites.** Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônica – INPA. Manaus, AM. 74p. 2010.

AVISE JC. **Molecular markers, natural history and evolution.** Sunderland: Sinauer Associates. 2nd edition. 684p. 2004.

AYRES, C.E.J., MELO-SANTOS, M.A.V., PROTA, J.R.M., SOLÉ-CAVA, A.M., REGIS, L., FURTADO, A.F. **Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil.** J Am Mosq Control Assoc 20: 350- 356. 2004.

BIRUNGI J, MUNSTERMANN L. E. **Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States.** Genetics. 95:125-132. 2002.

BOORE J. L. **Animal mitochondrial genomes.** Nucleic Acids Research. 27(8):1767-1780. 1999.

BOSIO CF, HARRINGTON LC, JONES JW, SITHIPRASASNA R, NORRIS DE, SCOTT TW. **Genetic Structure of *Aedes aegypti* Population in Thailand Using Mitochondrial DNA.** Am. J. Trop. Med. Hyg; 72:434-442. 2005.

BRACCO, J.E.; CAPURRO, M.L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SALLUM, M.A.M. **Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 102(5): 573-580. 2007.

CHAMBERS, E.W.; MEECE, J.K.; MCGOWAN, J.A.; LOVIN, D.D.; HEMME, R.R.; CHADEE, D.D.; MCABEE, K.; BROWN, S.E.; KNUDSON, D.L.; SEVERSON, D.W.. **Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever Mosquito *Aedes aegypti*.** J. Hered., 98: 2002-2010. 2007

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Fiocruz, Rio de Janeiro. 225p. 1994.

CÔRREA P. R, FRANÇA E, BOGUTCHI T. F. **Infestação pelo *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais *Aedes aegypti* infestation and occurrence of dengue in the city of Belo Horizonte, Brazil,** Revista de Saúde Pública. 39(1):33-40 33. 2005.

COSTA, M.C.V., PADUAN, K.S., RIBOLLA, P.E., LOURENÇA-De-OLIVEIRA, R., **Temporal Analysis of mitochondrial gene (NDH4) in *Aedes aegypti* populations**

**from endemic and non-endemic areas in Brazil.** Departamento de Entomologia. FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, Brasil. 2006.

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.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100, 539–544. 2005.

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

ENDERSBY, N.M.; HOFFMANN, A.A.; WHITE, V.L.; LOWENSTEIN, S.; RITCHIE, S.; JOHNSON, P.H.; RAPLEY, L.P.; RYAN, P.A.; NAM, V.S.; YEN, N.T.; KITTIYAPONG, P.; WEEKS, A.R. **Genetic structure of *Aedes aegypti* in Austrália and Vietnam revealed by microsatellite and exon primed intron crossing markers suggests feasibility of local control options.** J. Med. Entomol., 46(5): 1074-1083. 2009.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver. 3.5: **A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** Molecular Ecology Resources, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FONSECA, R. R.; JOHNSON, W. E; O'BRIEN, S. J.; RAMOS, M. J.; ANTUNES, A. **The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome.** BMC Genomics, 9:119, doi:10.1186/1471-2164-9-119. 2008.

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

FU, Y.X., **Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection.** Genetics 147, 915–925. 1997.

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

GONZALEZ, M.J. MIRANDA-MASSARI, J.R. BERDIEL, M.J. DUCONGE, J. RODRIGUES-LOPES, J.L. HUNNINGHAKE, R. COBAS-ROSARIO, V.J. **High Dose Intravenous Vitamin C and Chikungunya Fever: A Case Report.** NIH Publis Access J Orthomol Med.; 29(4): 154–156. 2014.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N., GOMEZ-MACHORRO, C., LOZANO-FUENTES, S., FERNANDEZ-SALAS, L., DE LOURDES MUNOZ, M., FARFAN-ALE, J.A., GARCIA-REJON, J., BEATY, B.J., BLACK, W.C. **Breeding structure of**

*Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66, 213–222. 2002.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl. Acids. Symp., Ser. 41: 95-98, 1999.

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

HUBER, K.; MOUSSON, L.; RODHAIN, F.; FAILLOUX, A.B. **Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses.** Mol. Ecol. Notes, 1: 219-222. 2001.

HUBER, K.; LOAN, L.L.; HOANG, T.H.; RAVEL, S. RODHAIN, F.; FAILLOUX, A.B. **Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellites marker.** Heredity, 89: 7-14. 2002.

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

LOVIN, D. D.; WASHINGTON, K. O.; BRUYN, B.; HEMME, R. R.; MORI, A.; EPSTEIN, S. R.; HARKER, B. W.; STREIT, T. G.; SEVERSON, D. W. **Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti.** BMC Genomics 10:590 doi:10.1186/1471-2164-10-590. 2009.

MANTEL, N. **The detection of disease clustering and a generalized regression approach.** Cancer Research. 27: 209-220.7. 1967.

MENDONÇA, B. A. A.; SOUSA, A. C. B. SOUZA, A. P. SCARPASSA, V. M. **Temporal genetic structure of major dengue vector *Aedes aegypti* from Manaus, Amazonas, Brazil.** Acta Tropica 134 (2014) 80–88. 2014.

MONTEIRO, F. A.; SHAMA, R.; MARTINS, A. J.; GLORIA-SORIA, A.; BROWN, J. E.; POWELL, J. E. **Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program.** PLoS Negl Trop Dis 8(9): e3167. doi:10.1371/journal.pntd.0003167. 2014.

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

MS - Ministério da Saúde / Portal da Saúde. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/17034-dengue-liraa-aponta-340-municipios-em-situacao-de-risco>. 2015.

NEIGEL, J.E. **Is FST obsolete?** Conservation genetics, 3: 167-173. 2002.

OLANRATMANEE, P.; KITTAYAPONG, P.; CHANSANG, C.; HOFFMANN, A. A.; WEEKS, A. R.; ENDERSBY, N. M. **Population Genetic Structure of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) at a Micro-Spatial Scale in Thailand: Implications for a Dengue Suppression Strategy.** PLoS Negl Trop Dis 7(1): doi:10.1371/journal.pntd.0001913. 2013.

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

PEAKALL, R. e SMOUSE, P.E. **Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.** Molecular Ecology Notes, v. 6, p. 288-295, 2006

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

ROZAS, J.; LIBRADO, P., DnaSPv5. **A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** Bioinformatics; 25: 1451-1452. 2009.

SANGER, F., NICHLEN, S., COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain termination inhibitors.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74.5463-5468. 1977.

SCARPASSA, V.M., CARDOZA, T.B., CARDOSO JUNIOR, R.P. **Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 78, 895–903. 2008.

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

SEIXAS, G.; PATRÍCIA SALGUEIRO, P.; SILVA, A. C.; CAMPOS, M.; CARINE SPENASSATTO, C.; REYES-LUGO, M.; NOVO, M. T.; RIBOLLA, P. E. M.; PINTO, J. P. S. S.; SOUSA, C. A. ***Aedes aegypti* on Madeira Island (Portugal): genetic**

**variation of a recently introduced dengue vector.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108 (Suppl. I): 3-10, 2013.

TAJIMA, F. **The effect of change in population size on DNA polymorphism.** Genetics 123, 597–601. 1989.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI A., KUMAR, S. **MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** Molecular Biology and Evolution: 30 2725-2729. 2013.

TWERDOCHLIB, A. L.; BONA, A. C. D.; LEITE, S. S.; CRITOLINA, R. F.; WETPHOL, B.; NAVARRO-SILVA, M. A. **Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial NADH4 gene.** Revista Brasileira de Entomologia 56(2): 249–256. 2012.

URDANETA-MARQUEZ, L., BOSIO, C., HERRERA, F., RUBIO-PALIS, Y., SALASEK, M., BLACK, W.C. **Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by mitochondrial DNA variation and nuclear single nucleotide polymorphisms.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 78, 479–491. 2008.

WILKERSON, R. C.; PARSONS, T. J.; ALBRIGHT, D. G.; KLEIN, T. A.; BRAUN, M. J. **Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae).** Inst. Mol. Biol., 1: 205-211. 1993.

WONG, J.; CHU, Y. Y.; STODDARD, S.; LEE, Y.; MORRISON, A. C.; SCOTT, T. W. **Microsatellite-Based Parentage Analysis of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Using Nonlethal DNA Sampling.** J Med Entomol. January ; 49(1): 85–93. 2012.

## ANEXO

*Artigo 1***Genetic differentiation in populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) dengue vector from the Brazilian state of Maranhão**

Andrelina A. de Sousa<sup>1,2</sup>, Elmary Fraga<sup>1</sup>, Iracilda Sampaio<sup>3</sup>, Horacio Schneider<sup>3</sup>,  
Maria Claudene Barros<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Caxias Center for Higher Studies (CESC), Universidade Estadual do Maranhão/UEMA, Caxias – MA, Brasil

<sup>2</sup> Agricultural Sciences Center, Graduate Program in Animal Sciences, Universidade Estadual do Maranhão/UEMA, São Luís – MA, Brasil

<sup>3</sup> Institute for Coastal Studies (IECOS), Bragança Campus, Universidade Federal do Pará/UFPA, Bragança – PA, Brasil

\* [mbdene@yahoo.com.br](mailto:mbdene@yahoo.com.br) (M. C. Barros)

Artigo nas normas da revista PLOS ONE



## Abstract

The *Aedes (Stegomyia) aegypti* is the vector responsible for the transmission of the yellow fever virus, the four dengue fever serotypes (DENV–1, 2, 3, 4), and hemorrhagic dengue fever in tropical and subtropical regions around the world. Many studies have documented large genetic differences among global populations of this species. The present study investigated the genetic differentiation of the populations of dengue vector in the Brazilian state of Maranhão, based on the mitochondrial ND4 marker. A total of 119 sequences were obtained for *Aedes aegypti*, with a fragment of 337 bps, nine haplotypes, 12 polymorphic sites, haplotype diversity of  $h = 0.673$ , and nucleotide diversity of  $\pi = 0.01628$ . The neutrality tests ( $D$  and  $F_s$ ) were not significant. The AMOVA presented an  $F_{ST}$  value of 0.32535, which was highly significant ( $p < 0.001$ ), although the majority of the variation (67.46%) was found within populations, with the remaining 32.54% being found among populations. Possible isolation by distance was tested and a non-significant correlation coefficient ( $r = -0.026$ ;  $p > 0.05$ ) was found using the Mantel test. The phylogenetic relationships among the nine haplotypes indicated the existence of two distinct clades. This finding, together with the population parameters, was consistent with a pattern of genetic structuring that underpinned the genetic differentiation of the study populations in Maranhão, and was characterized by the presence of distinct lineages of *Ae. aegypti*.

## Author Summary

The *Aedes aegypti* is the vector mosquito responsible for the transmission of the yellow fever virus, the four dengue fever serotypes (DENV–1, 2, 3, 4), and hemorrhagic dengue fever in tropical and subtropical countries. The dengue is an arbovirose that causes great preoccupations to the authorities because it is a problem in public health. The dengue is an arbovirose that causes great preoccupations because it is a problem in public health worldwide. Due to the high vector population indices with potential risk for epidemics analyzed the genetic differentiation of populations of *Ae. aegypti* for the State of Maranhão, Brazil through molecular marker. The 119 specimens studied from 11 municipalities in the state showed a high genetic differentiation parameters, indicating the presence of different lineages in the state, which may be a reflection of the treatments with insecticides to which the vector has been evaluated leading to this differentiation. Being so, to know the genetic structure of the populations of *Ae. aegypti* in the State of the Maranhão is to generate information that will help minimize a major public health problem, dengue.

## Introduction

*Aedes (Stegomyia) aegypti* is a mosquito native to Africa, which is now found throughout the tropical and subtropical regions of the world [1,2]. This species is the vector responsible for the transmission of the viruses that cause yellow and chikungunya fevers, the four dengue fever serotypes (DENV–1, 2, 3, and 4), and hemorrhagic dengue fever. This mosquito is mainly urban in distribution, and transmits

viruses through the bite of infected females. The intimate relationship of the species with humans is an important factor determining outbreaks and epidemics [3, 4, 5]. Given this relationship, eradication of dengue fever, in particular, is one of the principal challenges faced by public health authorities worldwide, one that has increased in recent years, with the resurgence and dispersal of the vector over a wide geographic area. Economic and social factors, such as the ongoing expansion of unplanned urban development, population movements, and the resistance of the vector to insecticides, have all contributed to the propagation of dengue fever during recent years [6]

*Aedes aegypti* was considered to have been eradicated from Brazil in 1955, according to the Pan-American Health Organization (PAHO), based on its program for the eradication of urban yellow fever in the Americas. This program was interrupted in 1960, however, and in 1976, the vector was recorded in the state of Bahia, followed by Rio de Janeiro, in 1977 [7]. According to the Brazilian Ministry of Health [8], 515,663 cases of dengue were recorded in Brazil in the first half of 2014, of which, 236 cases were considered to be grave, and 149 resulted in death. The Northeast region accounted for 50,269 cases (9.7% of the total), with 42 grave cases, and 26 deaths. In the state of Maranhão, 1601 cases were notified, including 29 grave cases, and one death. These data reflect the ongoing expansion of the vector in Brazil, and reinforce the conclusion that the number of cases of dengue fever can only be controlled through the reduction of the *Ae. aegypti* populations through systematic eradication programs.

Molecular studies permit the identification of cryptic species, which are common in some groups of insects, as well as inferences on population dynamics. Given the epidemiological importance of the species, a number of studies have emphasized the need to understand the genetic structure of *Ae. aegypti* populations, in particular for the understanding of their differences in their efficiency as vectors, resistance to insecticides, and the ecological adaptations of the species [9, 10]. The analysis of the genetic differentiation of *Ae. aegypti* populations will thus be essential for the identification of new lineages and the dispersal mechanism that may have a significant effect on the spatial distribution of outbreaks of dengue fever [11].

Considering the continuing presence of the vector in the Brazilian state of Maranhão, the present study investigated the genetic characteristics of the local *Ae. aegypti* populations and analyzed population dynamics in the context of the circulation of a number of dengue serotypes which represent a latent potential for the occurrence of major epidemics.

## Material and Methods

### Origin and collection of samples

Specimens (eggs) were obtained from 11 municipalities in the Brazilian state of Maranhão (Figure 1, Table 1) using egg traps, which were set in areas adjacent to domestic residences and retrieved after five days. The eggs were taken to the Genetics and Molecular Biology Laboratory at the Caxias Center for Higher Studies (CESC/UEMA), where they hatched and the larvae were raised until the emergence of the adults for identification using classification key [12]. The adults were then transferred to an entomological cage for mating.

The adult males were fed with a 10% saccharose solution, while the females obtained their blood meals from a hamster (*Mesocricetus auratus*) maintained in the

cage. The individual females were then separated to lay their eggs, and following eclosion, the larvae were fed until the fourth stage of development, based on the protocol of 13. The larvae were then frozen at -20°C for subsequent molecular analyses of the F1 generation of the different clutches.

**Figure. 1.** Map of the Brazilian state of Maranhão, showing the municipalities in which the *Aedes aegypti* specimens were collected.

**Table 1.** Municipalities sampled in the state of Maranhão, Brazil.

Population	Coordinates	Sample Size (N=F1)
Balsas	7°31'58.50" S, 46°02'14.84" W	10
Caxias	4°53'14.15" S, 43°20'23.36" W	13
Fortuna	5°43'23.43" S, 44°09'29.55" W	10
Imperatriz	5°31'53.9" S, 47°29'10.19" W	17
Mirador	6°21'42.93" S, 44°20'56.31" W	6
Parnarama	5°40'08.83" S, 43°05'58.21" W	8
Pedreiras	4°34'29.41" S, 44°35'56.72" W	10
Rosário	2°56'24.00" S, 44°14'26.88" W	9
São Bernardo	3°21'40.96" S, 42°25'08.10" W	12
São Mateus	4°02'25.94" S, 44°28'05.72" W	11
Timon	5°05'59.03" S, 42°50'15.15" W	13
<b>TOTAL</b>		<b>119</b>

## Extraction of the DNA, and the amplification and sequencing of the ND4 gene

The total DNA was extracted using the protocol developed by 14. The amplification of the ND4 gene from the total DNA was conducted using the PCR technique, with the conditions and primers described by 1, in which the forward primer was ND4L: 5' – ATTGCCTAAGGCTCATGTAG – 3' and the reverse primer was ND4H: 5' - TCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT – 3'). The PCR products were purified using ExoSAP-IT, following the manufacturer's recommendations, and sequenced using the dideoxyterminal method 15. At the end of the reaction, the samples were precipitated and washed to remove the unincorporated dyes, and sequenced in a DNA ABI 3500 automatic sequencer. All the specimens were sequenced in both directions.

## Population and phylogenetic analyses

The sequences were edited using the BIOEDIT program, version 7.0.5.2, [16] and aligned in CLUSTAL W [17], using complete sequence of the *Ae. aegypti* ND4 gene as a reference (1 – 1344 pb, Genbank # DQ440274), [18] as well as sequence of the complete mitochondrial genome (Genbank # NC\_010241), [19]. The quality of the chromatograms was evaluated using the DNA Sequencing Analysis Software, version 5.1, [20], and a BlastN survey of the [21], was conducted to verify the possible

correlation between haplotype sequences and the regions of nuclear mitochondrial DNA (NUMTs).

The number of haplotypes (NH) and informative sites (S), haplotype ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ), the mean difference in nucleotides (K), and  $D$  [22] and  $F_s$  [23], which provide information on selective neutrality in natural populations, were all run in DNAsp version 5.0 [24].

The ARLEQUIN program, version 3.01 [25], was used to estimate the genetic distance and gene flow, based on the  $F_{ST}$  values, and the number of migrants per generation ( $Nm$ ), as well as the hierarchical analysis to estimate inter- and intra-population genetic differentiation, based on an Analysis of Molecular Variance (AMOVA). The  $F_{ST}$  was used to estimate the genetic structure of the populations. Genetic isolation by distance was estimated by 26 method, which provides the significance of the correlation between a genetic matrix based on the  $F_{ST}$  values and a matrix of geographic distance (km) using the ALLES IN SPACE package [27].

The phylogenetic relationships among the haplotypes were inferred from a neighbor-joining analysis, following the Tamura-Nei model of genetic distance with a bootstrap analysis based on 1000 repetitions, run in MEGA version 6.0 [28]. Two haplotype sequences of the ND4 gene – from *Ae. albopictus* [29], and *Anopheles marajoara* [30], were included as outgroups (S2 Figure).

The haplotypes identified in the present study were also compared with those available in GenBank. These sequences included those derived from a study on São Luís Island in Maranhão [10], and other regions of Brazil, such as Amazonia [3], Paraná [4], as well as the study of [31]. Further afield, sequences were obtained from Mexico [32] and Peru [1], as well as, research in the Americas [9], (S2 Table).

## Results

### Polymorphism of the ND4 gene and the frequency and distribution of haplotypes

A total of 119 sequences were obtained from the *Ae. aegypti* specimens from Maranhão. The fragments sequenced had a total of 337 base pairs (bps), corresponding to sites 8374 through 8711 of the mitochondrial genome of *Ae. aegypti*, see GenBank #NC\_010241 [19]. A total of nine haplotypes and 12 polymorphic sites were identified in the study populations (Table 2). The H2 haplotype was the most common ( $f = 51$ ), representing 42.86% of the specimens analyzed, and occurring in all populations except that from Parnarama. The second most common haplotype was H1 ( $f = 44$ , 36.97%), which was found in all populations except Fortuna and Rosário.

All the other haplotypes were far less frequent. The third most common, H3 ( $f = 10$ , 8.40%) was recorded only in the Caxias, Fortuna, Parnarama, Rosário, and São Bernardo populations, while H7 ( $f = 7$ , 5.88%) was exclusive to Pedreiras. Haplotype H5 ( $f = 2$ , 2.38%) occurred in Fortuna and Parnarama, while H8, with the same frequency ( $f = 2$ ), was exclusive to Rosário. Haplotypes H4, H6, and H9 were all unique, being recorded in Fortuna, Imperatriz, and São Mateus, respectively. The H2 haplotype is shared with other populations in Maranhão and other regions of Brazil, corresponding to haplotype H10 in Amazonia, for example, and H4 in Paraná and H1 on São Luís Island, as well as other parts of the world, such as Mexico (H1), Peru (H2), and H5 in the Americas, Africa, and Asia. Haplotype H3 was identified on

São Luís Island and other parts of Brazil as H2, and in Mexico as H20. Haplotype H7 was recorded as H1 in Paraná and Amazonia, and H11 in other regions of Brazil, H15 in the Americas, Africa and Asia, and H3 in Peru. Haplotype H8 corresponds to H4 from São Luís Island. The haplotypes H4, H5, H6, and H9 have not been observed in previous studies (Table 2).

Haplotype diversity for the present study population as a whole was  $h = 0.673$ , while nucleotide diversity was  $\pi = 0.01628$ . When each population was considered separately, haplotype diversity ( $h$ ) ranged from 0.318 in the São Bernardo population to 0.644 in Fortuna, while nucleotide diversity ( $\pi$ ) varied between 0.00264 in Rosário to 0.01741 in Mirador. Neither of the neutrality tests ( $D$  and  $F_s$ ) produced significant results ( $P > 0.05$ ), whether for the population as a whole or each local population individually, indicating that the observed polymorphism was consistent with the neutral mutation model (Table 3).

**Table 2.** Number of haplotypes, polymorphic sites, and frequency of haplotypes of the ND4 mitochondrial marker identified in the *Ae. aegypti* populations from the Brazilian state of Maranhão, and haplotypes shared with other studies.

<sup>1</sup> NH	Polymorphic sites		<sup>2</sup> Freq	Population										<sup>3</sup> Other studies							
	11111222 22	5912367145 69		<sup>4</sup> Bal	Cax	Fort	Imp	Mir	Par	Ped	Ros	SBer	SMat	Tim	PR	AM	BR	AAA	Peru	Mex	SL
H1	TGCTAATTAT AC		44	8	8	-	11	4	5	1	-	1	1	5	H3	H6	-	-	-	-	H6
H2	CATCGACCGA GT		51	2	1	6	5	2	-	2	6	10	9	8	H4	H10	-	H5	H2	H1	H1
H3	CATCGACCGA GC		10	-	4	2	-	-	2	-	1	1	-	-	H2	-	H2	-	-	H20	H2
H4	CGTTGACCGA GT		1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	TGCTAATTAA AC		2	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	TGCTAGTTAT AC		1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	TACTAATTAA AT		7	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	H1	H1	H11	H15	H3	-	-
H8	CATCGACCGA AC		2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H4
H9	CGTCGACCGA GC		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>NH = number of haplotypes; <sup>2</sup>F = frequency; <sup>3</sup>The codes are those used in the respective studies for the same haplotype;

<sup>4</sup>Bal = Balsas, Cax = Caxias; Fort = Fortuna; Imp = Imperatriz; Mir = Mirador; Par = Parnarama; Ped = Pedreiras; Ros = Rosário; SBer = São Barnardo; SMat= São Mateus; Tim = Timon; Peru [1]; AM = Amazonia [3]; PR = Paraná [4]; AAA = Americas, Africa, and Asia [9]; ISL = São Luís Island, Maranhão [10]; BR = Brazil [31]; Mex = Mexico [32]; H = haplotype.

**Table 3.** Genetic diversity and the results of the neutrality tests for the 11 *Ae. aegypti* populations from Maranhão, Brazil, analyzed in the present study.

Population	Genetic diversity		Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F<sub>s</sub></i>
	<i>h</i>	$\pi$		
Balsas	0.355	0.01161	0.02622*	6.47266*
Caxias	0.564	0.01567	1.98116*	6.19364*
Fortuna	0.644	0.00765	-1.20010*	1.17603*
Imperatriz	0.522	0.01475	1.50245*	7.00032*
Mirador	0.533	0.01741	1.31709*	6.05664*
Parnarama	0.607	0.01304	0.68813*	3.61355*
Pedreiras	0.511	0.01022	-0.51119*	3.53581*
Rosário	0.555	0.00264	0.71533*	0.13355*
São Bernardo	0.318	0.00584	-1.91083*	2.26872*
São Mateus	0.345	0.00680	-1.67815*	2.52366*
Timon	0.512	0.01674	2.39052*	9.44716*
<b>Total</b>	<b>0.673</b>	<b>0.01628</b>	<b>3.75392*</b>	<b>6.24060*</b>

*h* = haplotype diversity and  $\pi$  = nucleotide diversity. Significance level for the neutrality tests: \* $P > 0.05$ .

### Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and Phylogenetic Relationships

The AMOVA was used to investigate the genetic differentiation in the *Ae. aegypti* populations from Maranhão, and returned a significant  $F_{ST}$  value ( $F_{ST} = 0.32535$ ,  $p < 0.001$ ), with most of the variation (67.45%) being observed within populations, rather than among them, i.e., 32.54% (Table 4).

**Table 4.** Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of the *Ae. aegypti* populations from the Brazilian state of Maranhão.

Type of variation	Component of the Variation	Variation (%)	$F_{ST}$	$P^*$
Among populations	0.91936	32.54	0.32535	< 0.001
Within populations	1.90637	67.46		

\*Value calculated based on 1023 random permutations.

The  $N_m$  values for the pairwise comparisons of the 11 *Ae. aegypti* populations from Maranhão varied from 0.20 (Rosário vs. Balsas) to 15.85 (Mirador vs. Timon). Even so, the correlation coefficient for the Mantel test ( $r = -0.026$ ,  $p > 0.05$ ) was not significant, indicating a lack of isolation by distance (Table 5).

**Table 5.** Pairwise  $F_{ST}$  values (above the diagonal) and the effective number of migrants,  $Nm$  (below the diagonal) in *Ae. aegypti* populations from the Brazilian state of Maranhão.

Populations	Balsas	Caxias	Fortuna	Imperatriz	Mirador	Parnarama	Pedreiras	Rosário	S. Bernardo	S. Mateus	Timon
<b>Balsas</b>	-	-0.012 <sup>ns</sup>	0.592***	-0.060 <sup>ns</sup>	-0.100 <sup>ns</sup>	-0.098 <sup>ns</sup>	0.230 <sup>ns</sup>	0.708***	0.649***	0.620**	0.230 <sup>ns</sup>
<b>Caxias</b>	∞	-	0.387***	-0.043 <sup>ns</sup>	-0.117 <sup>ns</sup>	-0.071 <sup>ns</sup>	0.194*	0.503**	0.456***	0.423***	0.068 <sup>ns</sup>
<b>Fortuna</b>	0.34	0.79	-	0.454**	0.423*	0.546***	0.540***	-0.018 <sup>ns</sup>	-0.072 <sup>ns</sup>	-0.088 <sup>ns</sup>	0.086 <sup>ns</sup>
<b>Imperatriz</b>	∞	∞	0.60	-	-0.122 <sup>ns</sup>	-0.073 <sup>ns</sup>	0.157 <sup>ns</sup>	0.557***	0.510***	0.481***	0.129 <sup>ns</sup>
<b>Mirador</b>	∞	∞	0.67	∞	-	-0.124 <sup>ns</sup>	0.109 <sup>ns</sup>	0.582**	0.505***	0.463*	0.030 <sup>ns</sup>
<b>Parnarama</b>	∞	∞	0.41	∞	∞	-	0.220*	0.678**	0.616***	0.582***	0.177 <sup>ns</sup>
<b>Pedreiras</b>	1.66	2.07	0.42	2.68	4.05	1.76	-	0.674***	0.595**	0.570***	0.204 <sup>ns</sup>
<b>Rosário</b>	0.20	0.49	∞	0.39	0.35	0.23	0.24	-	-0.025 <sup>ns</sup>	-0.017 <sup>ns</sup>	0.212 <sup>ns</sup>
<b>S. Bernardo</b>	0.26	0.59	∞	0.48	0.48	0.31	0.34	∞	-	-0.089 <sup>ns</sup>	0.142 <sup>ns</sup>
<b>S. Mateus</b>	0.30	0.68	∞	0.53	0.57	0.35	0.37	∞	∞	-	0.110 <sup>ns</sup>
<b>Timon</b>	1.67	6.78	5.31	3.36	15.8	2.32	1.94	1.85	3.01	4.01	-

ns = not significant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .



The phylogenetic relationships among the nine haplotypes were analyzed in the context of other haplotypes obtained from studies of other populations from Brazil and other parts of the world. The resulting tree has two distinct clades, with clade I encompassing four haplotypes (H1, H5, H6, and H7) from the present study, including the second most common type (H1) and one (H6) that was unique to the Imperatriz population. Clade II includes the remaining five haplotypes (H2, H3, H4, H8, and H9), one of which (H2) was the most common, and two (H4 and H9) that were exclusive to the Fortuna and São Mateus populations, respectively (Figure 2).

**Figure. 2.** Phylogenetic relationships among the haplotypes of the *Aedes aegypti* populations of the Brazilian state of Maranhão and those recorded in other studies –AAA [9], Amazonia [3], Brazil [31], Mexico [32], Paraná [4], Peru [1] and São Luís Island [10]. The analysis was based on the Neighbor-Joining algorithm using the Tamura-Nei genetic distance model, with bootstrap support estimated from 1000 repetitions.

## Discussion

### Polymorphism of the ND4 gene and the frequency and distribution of haplotypes

The results of the present study of the ND4 mitochondrial marker indicate a relatively high number of haplotypes (nine) in comparison with studies in Peru [1], Bolivia [2], and the Brazilian state of Paraná [4]. However, a larger total number of haplotypes was recorded on São Luís Island by 10, and in Amazonia by 3, as well as in Mexico [32] and the Americas [9].

The H2 haplotype is widespread in the Maranhão sample, and those from other regions, including Amazonia, where it corresponds to haplotype H10, as well as Mexico, where it is known as H1, Peru (H2), H5 in the study of 9, covering the Americas, Africa, and Asia, H4 in Paraná, and H1 on São Luís Island (Table 2). The ample distribution of this haplotype indicates that it represents one of the vector's oldest lineages, which may have dispersed following the bottleneck created by the programs established for the control of the vector in the 1950s and 1960s. This distribution pattern would thus be accounted for either by the resistance of this lineage to the pesticides used by these programs or through its introduction from the countries or regions where there was no eradication.

The H1 haplotype was absent from two populations in Maranhão – Fortuna and Rosário, although it was found in Amazonia, as H6, H3 in Paraná, and H6 on São Luís Island. 3, suggested that this haplotype may have either originated in Brazil or been introduced into the country from a region not yet surveyed. Our results further reinforce this conclusion, given that this haplotype was only observed in Brazilian populations (Amazonia, Paraná, and Maranhão). Haplotype H3 was found in the populations from Caxias, Fortuna, Parnarama, Rosário, and São Bernardo, and was recorded as H2 on São Luís Island and other regions of Brazil, and as H20 in Mexico.

Haplotype H7 was found only in the population from Pedreiras in the present study, but despite its reduced frequency in Maranhão, it has also been recorded in Paraná and Amazonia (as H1) and other regions of Brazil (as H11), as well as H3 in Peru, and H15 in the Americas, Africa, and Asia. The H8 haplotype found in Rosário in the present study corresponds to H4 from São Luís Island. The other haplotypes recorded in the present study – H4 in Fortuna, H5 in Fortuna and Parnarama, H6 in Imperatriz, and H9 in São Mateus – have not been recorded

in any other studies of this molecular marker, which suggests that they may represent either new mutations that have yet to disperse or haplotypes introduced from regions that have yet to be surveyed. The indices of genetic diversity recorded in the present study ( $h = 0.673$  and  $\pi = 0.01628$ ) were relatively high (Table 3), in contrast with the findings of previous studies [1, 2, 4, 9, 10, 32, 33, 34].

The diversity indices found in the present study indicate reduced levels of gene flow between the *Ae. aegypti* populations found in Maranhão, which has resulted in marked genetic differentiation among populations. This low level of gene flow may be related to the reduction in the effective size of the populations resulting from bottlenecks caused by the intense use of insecticides during eradication campaigns. The findings of the present study are consistent with those of 35, who found that populations of *Ae. aegypti* in areas where eradication campaigns were frequent present high levels of genetic differentiation.

The results of the  $D$  [22] and  $F_s$  [23] tests were not significant ( $P > 0.005$ ), which indicates that the populations of *Ae. aegypti* in the state of Maranhão are not undergoing expansion, despite the presence of unique haplotypes. These findings are consistent with those of 3, for Amazonian populations, 4 for populations from the state of Paraná, 9 for those from the Americas, and 10 for the populations on São Luís Island.

## Analysis of Molecular Variance and Phylogenetic Relationships

The results of the AMOVA indicated a higher level of variation within populations (67.46%,  $F_{ST} = 0.32535$ ,  $p < 0.001$ ) than among them (Table 4). When compared with the populations analyzed in Amazonia [3]: 72.69%;  $F_{ST} = 0.273$ ;  $P = < 0.005$ ), Paraná [4]: 67%;  $F_{ST} = 0.32996$ ;  $P = < 0.005$ ), and Venezuela [34]: 77.60%;  $F_{ST} = 0.224$ ;  $P = < 0.005$ ), these results indicate that the Maranhão populations are undergoing a process of genetic differentiation.

The capacity of individuals and populations to adapt to alterations in the environment depends on their intraspecific genetic diversity [36], which is reinforced by new mutations and existing recombinations. As in previous research, such as that of 1, 3, 4, 10, 32, 33, the results of the present study indicated relatively high intra-population variation, which may reflect the evolutionary success of the species, given that the results of the AMOVA indicate the presence of population structuring consistent with the presence of a number of different lineages of *Ae. aegypti* in Maranhão.

The  $Nm$  values recorded in the present study varied from 0.20 (Rosário vs. Balsas) to 15.8 (Mirador vs. Timon). This indicates that, despite the evidence for genetic structuring, these populations are characterized by relatively high levels of gene flow, which may account for the ample distribution and abundance of the H2 haplotype. In Amazonia, 3 found high levels of differentiation in the ND4 marker in populations of *Ae. aegypti* and indices that indicated the occurrence of gene flow between populations separated by relatively long distances, of up to 880 km, as in the case of the cities of Santarém and Boa Vista. These findings were consistent with those in the present study, where there was no evidence of isolation by distance (Table 5). The phylogenetic tree presented two well-supported clades supported by a 99% bootstrap value (Figure 2). These results are consistent with other studies of the ND4 gene in *Ae. aegypti* populations [3, 4, 9, 10], and support the conclusion that the populations in Maranhão originated from multiple introductions.

## Analysis of the quality of the ND4 sequences

Over the past few years, the presence of insertions of the nuclear genome in mitochondrial sequences (NUMTs) has been reported by an increasing number of studies [10, 19, 37, 38, 39]. The sequences containing NUMTs may be amplified by PCR together with the target mtDNA, thus generating misleading results in population studies based on molecular markers [2].

In the present study, however, no NUMTs were identified, so the sequences analyzed represent real mitochondrial DNA lineages. This conclusion is reinforced by the ample occurrence of haplotypes H2 and H3, which correspond to H1 and H20 from Mexico [32], and were validated as true haplotypes rather than NUMTs [37]. Haplotypes H1 and H2 from São Luís Island [10] also corresponded to H1 and H2 from Mexico [32].

## Supporting Information

**S2 Table.** GenBank accession numbers for São Luís Island in Maranhão #KF922333–KF922342, Amazonia #EU650405–EU650417, Paraná #JN089748–JN089755, regions of Brazil – #AY906835–AY906853, Mexico #AF334842–AF334865, Peru #DQ177153–DQ177155, Americas (#DQ176828–DQ176831), Africa (#DQ176833–DQ176843), and Asia (#DQ176845–DQ176849).

**S2 Figure.** GenBank accession numbers from *Ae. albopictus* # EF153761 and *Anopheles marajoara* # AY846347).

## Acknowledgments

Leila Meyer for providing the map of Maranhão.

## References

1. Costa-da-Silva AL, Capurro ML, Bracco JE (2005) Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 539–544. PMID: [16302064](#).
2. Paupy C, Goff GL, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Simon Z B, Hervé J-P, Fontenille D (2012) Genetic Structure and Phylogeographic of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution* 12; 1260–1269. doi: [10.1016/j.meegid.2012.04.012](#). PMID: [22522103](#).
3. Lima Júnior RS, Scarpassa VM. (2009) Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. *Gen. Mol. Biol.* 32, 414–422. doi: [10.1590/51415-47572009005000036](#). PMID: [21637700](#).
4. Twerdochlib AL, Bona ACD, Leite SS, Chitolina RF, Betina Westphal B, Navarro-Silva MA (2012) Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. *Revista Brasileira de Entomologia*; 56: 249–256.
5. Yáñez P, Mamani E, Valle J, Paquita García M, León W, Villaseca P, Torres D, Cabezas C (2013) Variabilidad genética de *Aedes aegypti* determinada mediante el análisis del gen mitocondrial ND4 en once áreas endémicas para dengue en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*; 30(2):246–50.
6. Urdaneta-Marquez L, Bosio C, Herrera F, Rubio-Palis Y, Salasek M, Black WC (2008) Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by

- mitochondrial DNA variation and nuclear single nucleotide polymorphisms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 479–491. PMID: [18337347](#).
7. Scarpassa VM, Cardoza TB, Cardoso Junior RP (2008) Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 895–903. PMID: [18541766](#).
  8. MS/SVS. (2014) Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. v. 45. n° 11. <http://www.saude.gov.br/svs>.
  9. Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MAM (2007) Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 573–580. PMID: [17710301](#).
  10. Fraga E C, Oliveira D R S, Aragão D G, Schneider H, Sampaio I, Barros M C (2013) Genetic Variability and Evidence of Two Distinct Lineages of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) on São Luís Island in Maranhão, Brazil. *The Open Tropical Medicine Journal*, 6, 11-18.
  11. Silva AG, Cunha ICL, Santos WS, Luz SLB, Ribolla PEM, Abad-Franch F (2012) Gene flow networks among American *Aedes aegypti* populations. *Evolutionary Applications*, ISSN 1752-4571. doi: [10.1111/j.1752-4571.2012.0024.x](https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.0024.x). PMID: [23144654](#).
  12. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R (1994) Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Fiocruz, Rio de Janeiro, 225 p.
  13. Santos JMM, Contel EPB, Keer WE (1981) Biologia de anofelinos amazônicos I – Ciclo biológico, postura e estádios de *Anopheles darlingi*, Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus/Boa Vista *Acta Amaz*; 11: 789-97.
  14. Wilkerson RC, Parsons T J, Klein TA, Gaffigan TV, Bergo E, Consolim J (1995) Diagnostic 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* 32(5):697-704. PMID: [7473625](#).
  15. Sanger F, Nichlen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74:5463-5468. PMID: [271968](#).
  16. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*;41:95-98.
  17. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W, improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. PMID: [7984417](#).
  18. Ribeiro JMC, Arcà B, Lombardo F, Calvo E, Phan VM, Chandra PK, Wikel SK (2007) An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 8:6. PMID: [17204158](#).
  19. Behura SK, Lobo NF, Haas B, deBruyn B, Lovin DD, Shumway MF, Puiu D, Romero-Severson J, Nene V, Severson DW (2011) Complete sequences of mitochondria genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 770–777. doi:[10.1016/j.ibmb.2011.05.2006](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.05.2006). PMID: [21640823](#).
  20. Sequencing Analysis Software, versão 5.1. Applied Biosystems [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).
  21. BlastN na Vector Base (<http://www.vectobase.org>)
  22. Tajima F (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123, 597–601. PMID: [2599369](#).
  23. Fu, YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915–925. PMID: [9335623](#).

24. Rozas J, Librado P, DnaSPv5 (2009) A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*; 25: 1451-1452. doi: [0.1093/bioinformatics/btp187](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187). PMID: [19346325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19346325/).
25. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2006) Arlequin ver. 3. 1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*; 47-50. PMID: [19325852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19325852/).
26. Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27: 209-220.7. PMID: [6018555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6018555/).
27. Miller MP (2005) Alleles in Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Inter-Individual Spatial and Genetic Information. *Journal of Heredity*. 96:722–724. PMID: [16251514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16251514/).
28. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: 30 2725-2729. doi: [10/109/molbev/mst197](https://doi.org/10.109/molbev/mst197). PMID: [24132122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132122/).
29. Costa MCV, Paduan KS, Ribolla PE, Lourenço-de-Oliveira R (2006) Temporal Analysis of mitochondrial gene (NDH4) in *Aedes aegypti* populations from endemic and non-endemic areas in Brazil. Departamento de Entomologia. FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.
30. Wilkerson RC, Foster PG, Li C, Sallum MA (2005) Molecular Phylogeny of Neotropical *Anopheles* (Nyssorhynchus) *albitarsis* Species Complex (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98(6), 918-925. PMID: [18079976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18079976/).
31. Paduan KS, Ribolla PEM (2008) Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*; 45: 59–67. PMID: [18283943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18283943/).
32. Gorrochotegui-Escalante N, Gomez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernandez- Salas L, De Lourdes Munoz M, Farfan-Ale JA, Garcia-Rejon J, Beaty BJ, Black WC (2002) Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 213–222. PMID: [12135296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12135296/).
33. Bosio CF, Harrington LC, Jones JW, Sithiprasasna R, Norris DE, Scott TW (2005) Genetic Structure of *Aedes aegypti* Population in Thailand Using Mitochondrial DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72:434-442. PMID: [15827282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15827282/).
34. Herrera F, Urdaneta L, Rivero J, Zoghbi N, Ruiz J, Carrasquel G, Martinez JA, Pernaete M, Villegas P, Montoya A, Rubio-Palis Y, Rojas E (2006) Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 625–633. PMID: [17072474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17072474/).
35. Ayres CEJ, Melo-Santos MAV, Prota JRM, Solé-Cava AM, Regis L, Furtado AF (2004) Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. *J Am Mosq Control Assoc* 20: 350- 356. PMID: [15669374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15669374/).
36. Rieger TT, Campos SRC, Santos JF (2006) A biologia molecular como ferramenta no estudo da biodiversidade, Floresta e Ambiente.13. .2.11-24.
37. Black IV WC, Bernhardt SA (2009) Abundant nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in the *Aedes aegypti* genome. *Insect Mol. Biol.* 18, 705–713. doi: [10.1111/j.1365-2583.2009.00925.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00925.x). PMID: [19849722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19849722/).
38. Leite LAR (2012) Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue. *Biota Neotrop.*, vol.12 (3): <http://www.biotaneotropica.org.br/v12n3/en/abstract?thematic-review+bn02412032012>.
39. Moore M, Massamba S, Goss L, Burugu MW, Sang R, Kamau LW, Kenya EU, Bosio C, Munoz ML, Sharakova M, Black WC (2013) Dual African Origins of Global *Aedes aegypti*

s.l. Populations Revealed by Mitochondrial DNA. *Plos Negl Trop Dis* 7(4):2175.  
doi:[10.1371/journal.pntd.0002175](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002175). PMID: [23638196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23638196/).

