

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILM  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM SAÚDE, SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES  
DE *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

**IVANA CRISTINA LOPES DA CUNHA**

MANAUS

2009

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILM  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM SAÚDE, SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

IVANA CRISTINA LOPES DA CUNHA

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES  
DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

Dissertação apresentada ao PPG-SSEA  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Saúde, Sociedade e  
Endemias na Amazônia, na linha de  
pesquisa Biologia dos Agentes Infecciosos  
e Parasitários, e na sub-linha Ecologia e  
Genética de Vetores.

Orientador: Dr Fernando Abad-Franch

Co-orientador: Dr Sérgio Luiz Bessa Luz

MANAUS

2009

Ficha Catalográfica  
Catalogação na fonte pela Biblioteca Central da Universidade Federal do  
Amazonas

Número	CUNHA, Ivana Cristina Lopes da. Variabilidade genética em populações de <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) / Ivana Cristina Lopes da Cunha – Manaus: FIOCRUZ – Instituto Leônidas e Maria Deane / Universidade Federal do Amazonas / Universidade Federal do Pará, 2009.  Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) Instituto Leônidas e Maria Deane / Universidade Federal do Amazonas / Universidade Federal do Pará, 2009.  1. <i>Aedes aegypti</i> 2. introduções    3. Américas
--------	--

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Walter Cunha e Marilza Cunha, pelo amor, apoio, e por serem os meus professores mais importantes.

Ao meu orientador Dr Fernando Abad-Franch, pela orientação e ensinamentos transmitidos ao longo deste mestrado.

Ao meu co-orientador, Dr Sérgio Luiz Bessa Luz, agradeço pela amizade e paciência, e por ter me ensinado as primeiras técnicas em biologia molecular.

Ao projeto PDTSP-Dengue, pelo financiamento que possibilitou a realização deste estudo.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane, pela infra-estrutura que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

À MSc Claudia María Ríos-Velásquez, por ter cedido o material biológico que foi utilizado neste estudo.

Ao amigo Walter Souza Santos, pela amizade verdadeira cultivada desde os tempos de faculdade. Agradeço pela paciência, auxílio e presença em todos os momentos.

Ao namorado e amigo, Ademar Vieira dos Santos Júnior, pela compreensão, cumplicidade e incentivo em todos os momentos.

À minha grande amiga Maria Alcinete da Costa Barbosa, pela amizade incondicional e pelos divertidos momentos vividos no laboratório.

Ao amigo Ricardo Moura Mota, pela imensa ajuda durante as etapas do projeto que foram desenvolvidas em laboratório.

À minha amiga Alexandra Bentes, pelo apoio, motivação e amizade.

À minha amiga Larissa Ramos Chevreuril, pela colaboração e apoio nos momentos difíceis.

À Dra Paloma Helena Fernandes Shimabukuro, pelo auxílio, estímulo e sua disposição de ajudar sempre.

Aos amigos de curso Gustavo Grimmer e Shirley Araújo, pela amizade e convívio ao longo do mestrado.

À amiga Marizete Duarte, secretária da Biodiversidade, pelo auxílio na solução de problemas burocráticos.

Ao Dr Paulo Eduardo Martins Ribolla e à Dra Karina dos Santos Paduan, pelos ensinamentos e receptividade durante a minha estada no Departamento de Parasitologia da UNESP-Botucatu.

Ao diretor do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura de Manaus, Jorge Maia Carneiro, pela amizade e compreensão nas diversas vezes em que precisei ausentar-me do setor de trabalho para desenvolver as atividades do mestrado.

Ao Dr Wanderli Pedro Tadei e ao Dr Toby Vincent Barrett, pelas contribuições na qualificação deste mestrado.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste estudo.

## Resumo

O principal vetor do vírus Dengue é o *Aedes aegypti*, uma espécie originária da África. A presença do vetor nas Américas data dos séculos XVII-XVIII; a primeira introdução no Brasil aconteceu, provavelmente, no início do século XIX. Contudo, o processo de invasão do continente por *Ae. aegypti* ainda é mal compreendido, e as relações entre as dinâmicas de introdução/estabelecimento/expansão do vetor e as tendências epidemiológicas da doença não têm sido avaliadas de forma detalhada. Neste trabalho testamos uma série de hipóteses sobre as origens, número e dinâmicas espaciais e temporais da invasão das Américas por *Ae. aegypti*. As predições-chave foram testadas utilizando uma base de mais de 3000 seqüências de um fragmento do gene ND4 mitocondrial. Esta base, compilada e completada durante o desenvolvimento deste projeto, contém dados de espécimes de cinco regiões das Américas (desde os Estados Unidos até o Sul do Brasil), da África e da Ásia. As análises incluíram os seguintes aspectos: (i) diversidade genética; (ii) padrões espaciais de ocorrência de diferentes haplótipos; (iii) relações genealógicas e filogenéticas; (iv) estruturação genética populacional; e (v) demografia histórica. Os resultados sugerem dois eventos principais, provavelmente antigos, de introdução de *Ae. aegypti* nas Américas. Ambos envolveram a chegada inicial de populações africanas moderadamente diferenciadas à região do Caribe/Norte-Mesoamérica. Uma destas linhagens se dispersou até a Venezuela e avançou para o sul em duas ondas. A primeira onda alcançou o norte da Amazônia, onde algumas sub-populações ficaram isoladas; sugerimos que a dispersão destes vetores foi a responsável pela primeira pandemia americana de dengue (1824-1828). A segunda onda, muito mais recente, resultou na colonização de grande parte da América do Sul. A segunda linhagem, pelo contrário, alcançou o continente Sul-americano pelo Sudeste do Brasil, e se dispersou em direção norte durante a segunda pandemia (1845-

1851); a persistência desta linhagem no país sugere que as campanhas de erradicação nunca alcançaram seu objetivo. O encontro secundário dos descendentes das duas linhagens principais é responsável pelo padrão repetidamente reportado de alta diversidade genética das populações locais. Os dados sugerem que a dispersão passiva do vetor e os efeitos das ações de controle geram um padrão de forte estruturação genética. Em conjunto, os dados genéticos e a evolução recente do perfil epidemiológico da dengue no Brasil indicam que a efetividade das intervenções de controle se viu comprometida pelo processo de descentralização do sistema de saúde nos anos 1990. Finalmente, mostramos como os resultados das análises genéticas podem ajudar no desenho de melhores estratégias de controle e vigilância; eles podem ajudar a identificar sub-populações mais invasivas ou mais diversas do vetor, ou a definir pontos críticos para o controle-vigilância entomológicos. Os dados sugerem que estas intervenções serão importantes inclusive em localidades já colonizadas pelo vetor. Em definitiva, temos desenvolvido, utilizando dados sobre variabilidade genética populacional, uma proposta capaz de dar conta do processo de invasão das Américas por *A. aegypti* e estabelecido as possíveis correspondências entre os padrões de diversidade genética desta espécie de vetor e as dinâmicas espaciais e temporais da epidemiologia da dengue no Brasil.



## Abstract

The most important vector of Dengue virus is *Aedes aegypti*, an originally African mosquito species. The presence of this vector in the Americas dates back to the 17<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> centuries; it is thought to have been first introduced into Brazil by the beginning of the 20<sup>th</sup> century. However, the process of invasion of the continent by *Ae. aegypti* remains poorly understood, and the relationships between the dynamics of vector introduction/establishment/expansion and dengue epidemiological trends have not been thoroughly assessed. Here we test a series of hypotheses regarding the origins, number, and spatial and temporal dynamics of the invasion of the Americas by *Ae. aegypti*. Key predictions were tested using a database composed of over 3000 mitochondrial ND4 gene sequences. This database, which was compiled and completed in the course of the project, contains sequences from specimens collected in five regions of the Americas (from the United States to southern Brazil), in Africa, and in Asia. Analyses covered the following subjects: (i) genetic diversity; (ii) spatial patterns of haplotype occurrence; (iii) genealogical and phylogenetic relationships; (iv) population genetic structuring; and (v) historical demography. Results suggest two major, probably old events of *Ae. aegypti* introduction into the Americas. Both involved the early arrival of moderately divergent African populations to the Caribbean and North-Mesoamerica. One of these lineages dispersed to Venezuela and spread southwards in two invasion waves. The first wave reached northern Amazonia, where some sub-populations became isolated; we suggest that the spread of these vectors was involved in the first American dengue pandemic (1824-1828). The second, much more recent wave resulted in the colonization of most of South America by this lineage. In contrast, the second major lineage reached South America by the Brazilian Southeastern region, and dispersed northwards during the second pandemic (1845-1851); the persistence of this lineage in Brazil suggests that

eradication campaigns were never completely successful. The secondary encounter of the descendants of both major lineages gave rise to the often-reported pattern of high genetic diversity. The data suggest that passive vector dispersal and the effects of control interventions on local populations produce a pattern of strong genetic structuring. The recent evolution of dengue epidemiological patterns in Brazil suggests that health sector reform and decentralization in the 1990s limited the efficacy of control interventions. We finally suggest how the results of studies on vector genetics can be incorporated into the design of better control-surveillance strategies; they can help identify more invasive or more diverse vector populations, or help define critical locations for entomological surveillance and control. Our data show how these interventions should be pursued even in localities already infested by the vector. We have developed, making use of data on population genetic variability, a comprehensive proposal on the process of invasion of the Americas by *Ae. aegypti*, and tentatively established the correspondence between the patterns of genetic diversity of this vector species and the spatial and temporal dynamics of dengue epidemiology in Brazil.

## Índice

<b>1.</b>	<b>Revisão bibliográfica: dengue e seus vetores no Brasil e nas Américas..</b>	<b>1</b>
1.1.	Flavivírus transmitidos por mosquitos: Dengue e Febre Amarela.....	1
1.2.	Os vetores do vírus Dengue.....	5
1.3.	Marcadores moleculares.....	11
1.4.	O DNA mitocondrial.....	12
1.5.	Estudos genéticos sobre <i>Aedes aegypti</i> .....	13
<b>2.</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>Premissas, hipóteses e predições.....</b>	<b>19</b>
3.1.	Premissas: o processo de colonização das Américas por <i>Aedes aegypti</i> .....	19
3.2.	Hipóteses e predições.....	20
3.2.1.	Diversidade genética.....	21
3.2.2.	Padrões espaciais de ocorrência de diferentes haplótipos.....	22
3.2.3.	Relações genealógicas e filogenéticas entre haplótipos.....	23
3.2.4.	Estruturação genética.....	24
3.2.5.	Demografia histórica.....	25
<b>4.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>27</b>
4.1.	Objetivo geral.....	27
4.2.	Objetivos específicos.....	27
<b>5.</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>28</b>
5.1.	Compilação da base de dados.....	28
5.2.	Análise dos dados.....	29
5.2.1.	Diversidade genética.....	29
5.2.2.	Genealogia e filogenia.....	30
5.2.3.	Estruturação genética populacional.....	30
5.2.4.	Demografia histórica.....	31
<b>6.</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>33</b>
6.1.	Diversidade genética das populações americanas de <i>Aedes aegypti</i> .....	33
6.2.	Padrões espaciais de ocorrência de diferentes haplótipos.....	35
6.3.	Genealogia e filogenia do gene mitocondrial ND4 em populações americanas de <i>Aedes aegypti</i> .....	39
6.4.	Estruturação genética das populações americanas de <i>Aedes aegypti</i> .....	43
6.5.	Demografia histórica das populações americanas de <i>Aedes aegypti</i> .....	45
6.5.1.	Base de dados combinada ( $N = 3103$ ).....	45
6.5.2.	Clados I ( $N = 1743$ ) e II ( $N = 1359$ ).....	46
<b>7.</b>	<b>Discussão geral e conclusões.....</b>	<b>49</b>
7.1.	Dinâmicas de invasão das Américas por <i>Aedes aegypti</i> .....	49
7.1.1.	Dinâmica de invasão por representantes do Clado I.....	49
7.1.2.	Dinâmica de invasão por representantes do Clado II.....	53
7.2.	Correspondências com os perfis epidemiológicos históricos.....	60
7.3.	Conclusões.....	64
<b>8.</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>68</b>

## **1. Revisão bibliográfica: dengue e seus vetores no Brasil e nas Américas**

### **1.1. Flavivírus transmitidos por mosquitos: Dengue e Febre Amarela**

O gênero *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) está composto por vírus RNA fita simples envelopados. Estes vírus têm uma ampla distribuição mundial e formam um grupo altamente diverso de agentes patogênicos transmitidos por artrópodes. Os mais importantes dos flavivírus capazes de causar doenças nos seres humanos e transmitidos por mosquitos (Diptera: Culicidae) são o vírus Dengue, o vírus da Febre Amarela (VFA), o vírus do Nilo Ocidental e o vírus da Encefalite Japonesa (Burke & Monath, 2001). Os dois primeiros são transmitidos por vetores do gênero *Aedes*; um deles, *Aedes aegypti*, é particularmente relevante por causa da sua capacidade de infestar áreas urbanas com populações humanas extremamente densas.

A dengue é uma doença febril aguda potencialmente muito grave. A diversidade genética do vírus Dengue se reflete na existência de quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4); todos eles são transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*. A infecção por um dos sorotipos confere imunidade permanente para o mesmo sorotipo, mas não imunidade cruzada para os outros três (Gubler, 1998).

A infecção pelo vírus Dengue pode ser subclínica; nos pacientes que desenvolvem a doença, esta aparece na forma de dois tipos principais de quadro clínico: a febre clássica da dengue (FD, ou dengue clássica) e a febre hemorrágica da dengue (FHD, ou dengue hemorrágica). A sintomatologia das formas clássicas inclui cefaléia intensa com dor retro-orbital, febre, artralgias, mialgias, prostração, erupção cutânea e desidratação. A FHD é uma forma complicada que geralmente começa com tosse, faringite, vômito e dor abdominal; as mialgias e artralgias são raras; as manifestações hemorrágicas incluem petequias, equimoses, hemorragia nasal, conjuntival ou gengival, hematemesa,

melena, hepatomegalia e hemoconcentração com elevação do hematócrito em até 20%; nas formas mais graves, que podem levar ao óbito, aparecem sinais de choque, com hipotensão, pulso rápido e débil e perda de consciência (Rosa et al., 1997).

No conjunto de suas manifestações, esta doença é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 50 milhões de pessoas se infectem anualmente em 100 países de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 500.000 doentes com FHD necessitam de hospitalização, e 12.500 morrem a cada ano (WHO, 2009). O aumento da incidência de FD e FHD tem sido atribuído a múltiplos fatores; destacam, entre eles, o crescimento demográfico acelerado, associado à urbanização desordenada e com infra-estrutura sanitária deficiente; a circulação de múltiplos sorotipos; o aumento do deslocamento aéreo e fluvial, que favorece a dispersão dos vetores e agentes infecciosos entre regiões; as deficiências dos programas de controle; e o desenvolvimento de resistência aos inseticidas pelos vetores (Gubler, 1998).

Os primeiros casos de dengue no Brasil foram registrados na cidade do Rio de Janeiro em 1845. Estes casos deram origem à primeira epidemia no país (1845-1848), coincidindo com o início da segunda pandemia de dengue nas Américas. É provável que a segunda epidemia, que começou dois anos depois e durou três anos (até 1853), estivesse estreitamente relacionada com esta primeira invasão do Brasil pelo vírus dengue e seus vetores. As duas pandemias seguintes (1870-1873 e 1901-1907) ficaram restritas às regiões de Norte-mesoamérica e o Caribe (incluindo a Colômbia no caso da segunda), e não atingiram o Brasil. A doença reapareceu em 1916, no contexto da quinta pandemia (1912-1916), e em 1923, quando uma nova epidemia atingiu o Rio de Janeiro (PAHO, 2009).

Depois, no entanto, o país permaneceu sem registro de casos de dengue por quase 60 anos, o que provavelmente foi devido aos efeitos conjuntos das campanhas de erradicação de *Ae. aegypti* (cuja eliminação foi certificada nos períodos 1958-1966 e 1973-1975) e do status imunológico das populações humanas nas áreas urbanas previamente atingidas pela doença (Tauli, 2002; Wearing & Rohani, 2006; PAHO, 2009).

Os primeiros registros de dengue depois deste período se referem à epidemia que atingiu a cidade de Boa Vista, Roraima, em 1982, e que envolveu os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (Osanai et al., 1983). Esta epidemia se deu no contexto da emergência de DENV-4 nas Américas, que gerou surtos da doença (e a primeira epidemia importante de FHD) no Caribe, América Central, México, os Estados Unidos e o norte da América do Sul; nesta última sub-região, DENV-4 foi identificado pela primeira vez em 1982 em Boa Vista, na Guiana Francesa, no Suriname e na Colômbia, e em 1985 na Venezuela (PAHO, 2009).

Em 1986-1987 foram registradas várias epidemias de dengue, causadas pelo sorotipo DENV-1, nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Alagoas e Ceará (Rosa et al., 1997). Desde então, ciclos epidêmicos têm se registrado periodicamente (1990-1991, 1993, 1995-1996, 1998, 2000, 2002) em diversas áreas do Sudeste, Nordeste e Norte do país; este padrão sugere que o principal mecanismo envolvido na modulação da incidência seja, desde o início dos anos 1990, o perfil imunológico das populações humanas locais em relação com os sorotipos virais circulantes em cada ocasião (Wearing & Rohani, 2006). Desde 2005, a tendência das notificações anuais de casos é progressivamente ascendente; a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS) registrou 346.000 notificações de casos de dengue no ano de 2006 e mais de 550.000 em 2007. Quase 790.000 casos de dengue

foram notificados em 2008 (janeiro-novembro), com mais de 4000 casos confirmados de FHD e mais de 45.000 hospitalizações (cf. Barreto & Teixeira, 2008).

Em Manaus, a primeira epidemia de dengue ocorreu em 1998 (i.e., no contexto da sexta pandemia americana), com 13.873 notificações. A maioria de casos diagnosticados foi causada pelo sorotipo DENV-1, detectado em março; a circulação de um segundo sorotipo (DENV-2) foi detectada em novembro do mesmo ano (Figueiredo et al., 2004).

Segundo dados do MS, circulam atualmente no Brasil três sorotipos do vírus Dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV-3). Recentemente foi reportada a circulação do sorotipo DENV-4 na cidade de Manaus; se confirmado, seria o primeiro registro deste sorotipo no Brasil em 25 anos (Figueiredo et al., 2008).

Um outro flavivírus de grande importância médica é o vírus da febre amarela (VFA), uma doença caracterizada por suas manifestações icterico-hemorrágicas e suas altas taxas de letalidade (~50%). Os ciclos enzoóticos deste vírus, que infecta primatas silvestres, são mantidos por mosquitos do gênero *Haemagogus*; as epidemias aparecem quando o VFA, geralmente trazido por sujeitos não imunes que entraram em contato com mosquitos silvestres, começa a circular em áreas urbanas infestadas por *Ae. aegypti* e cujos habitantes não estão imunizados. A vacinação de sujeitos não imunes e que moram em (ou viajam até) áreas de circulação enzoótica do VFA é a medida preventiva mais eficiente para evitar estas epidemias. No caso da dengue, a prevenção depende quase exclusivamente do controle das populações do mosquito vetor (Barreto & Teixeira, 2008).

## 1.2. Os vetores do vírus Dengue

Como no resto do mundo, o principal vetor de vírus Dengue no Brasil é *Aedes aegypti*. Este mosquito altamente sinantrópico coloniza facilmente ambientes urbanos em regiões tropicais e subtropicais. As fêmeas são fortemente antropofílicas, com atividade hematofágica preferencialmente diurna; elas utilizam depósitos artificiais de água limpa (vasos, garrafas, pneumáticos, baldes etc.) para colocar seus ovos. Estes têm uma alta capacidade de resistir à dessecação, mantendo-se viáveis na ausência de água por até 450 dias (Honório, 1999; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 2004).

*Aedes albopictus* é um importante vetor do vírus Dengue na Ásia, e é susceptível à infecção por diversos *Flavivirus* (Mitchell, 1991; Gratz, 2004). Enquanto *Ae. aegypti* é uma espécie restrita a ambientes urbanos (exceto na sua área de origem na África), *Ae. albopictus* coloniza também ambientes silvestres, estabelecendo seus criadouros em ocos de árvores e outros locais de acúmulo de água; sua eliminação é considerada impraticável por causa desta capacidade. Contudo, *Ae. albopictus* é considerado um vetor relativamente pouco eficiente de vírus Dengue; as fêmeas desta espécie são menos sinantrópicas e menos antropofílicas (e estão menos frequentemente infectadas pelo vírus) do que as de *Ae. aegypti* (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Gratz, 2004).

*Ae. aegypti* é uma espécie biologicamente complexa. O estudo dos padrões de variação morfológica, biológica e de distribuição geográfica de populações africanas do vetor levou Mattingly (1957) a propor a existência de duas subespécies. Enquanto *Ae. aegypti formosus*, de coloração escura, ocorre usualmente em áreas silvestres ao sul do deserto do Saara, *Ae. aegypti aegypti*, de coloração castanha, é encontrada em ambientes domiciliares, com distribuição ampla nas planícies costeiras da África. É esta última subespécie a que, segundo vários especialistas, pode ser encontrada em regiões fora do continente africano (Tabachnick & Powell, 1979). Segundo Failloux et al. (2002), *Ae. aegypti aegypti* apresenta um comportamento estritamente sinantrópico e uma elevada



capacidade vetorial. Por outro lado, *Ae. aegypti formosus* restringe-se a ambientes silvestres e rurais, e apresenta baixa eficiência vetorial.

Diversos estudos têm sugerido a existência de diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre as duas subespécies. No Quênia existem pelo menos três formas de *Ae. aegypti* (cf. Tabachnick, 1991). A de coloração mais clara, que utiliza jarros de água dentro das casas como criadouro, é denominada “forma doméstica”. Outra, que cria em recipientes descartáveis ao redor das casas ou em fendas nos troncos de árvores, apresentando variações da cor escura, é chamada “forma peridoméstica”. Por último, a “forma selvagem” é caracterizada pela sua cor escura e passa a sua fase larval em buracos de árvores ou pedras, dentro da floresta.

Estas e outras evidências sugerem que o mosquito *Ae. aegypti* é originário do continente africano. A região da Etiópia, onde se encontra o maior número de representantes do subgênero *Stegomyia* e onde ocorrem as espécies mais estreitamente relacionadas a este vetor, é apontada como a provável área de origem de *Ae. aegypti* (cf. Tabachnick, 1991).

Christophers (1960, *apud* Tabachnick, 1991) considera que *Ae. aegypti* tornou-se doméstico nos povoados da África. A partir do continente africano, este mosquito se dispersou pelo mundo ao longo das rotas comerciais durante os séculos XVII, XVIII e XIX. A presença do vetor no continente americano data dos séculos XVII e XVIII, e foi associada ao comércio de escravos procedentes da África Ocidental (Tabachnick, 1991).

Provavelmente *Ae. aegypti* foi introduzido pela primeira vez no Brasil no início do século XIX. Campanhas históricas de luta anti-vetorial aparentemente erradicaram a espécie do país em duas ocasiões (1958 e 1973), mas ela foi reintroduzida (ou ressurgiu) após cada uma delas (em 1967 e 1976) e hoje está presente em 26 estados e 4000 municípios brasileiros (Gubler, 2002; Penna, 2003). A consequência destas

reinfestações e da dispersão posterior da espécie (no Brasil e em outros países) foi o estabelecimento de ciclos endêmicos de transmissão do vírus Dengue (Monath, 1994); a combinação de flutuações demográficas das populações do vetor e de variações no status imunológico das populações humanas (em relação com os vírus circulantes) resulta na aparição periódica de surtos epidêmicos de enorme repercussão social, econômica e sanitária (Wearing & Rohani, 2006).

Na ausência de uma vacina eficaz e de tratamento etiológico efetivo, o único elo vulnerável para reduzir a intensidade da transmissão do vírus Dengue é o controle das populações dos mosquitos vetores. O uso de inseticidas é uma das principais ferramentas para o controle da transmissão de doenças veiculadas por vetores (e.g., Palchick, 1996), mas a aparição de populações resistentes impõe a necessidade de monitoramento contínuo e desenvolvimento de novas estratégias (e.g., Ferrari, 1996; Ferre & Rie, 2002). Em Manaus, como em outras cidades do Brasil, a vigilância epidemiológica da dengue está baseada na detecção de formas imaturas de *Ae. aegypti* em reservatórios de água. A eficácia desta estratégia pode estar comprometida pelo fato de que a presença de mosquitos adultos durante os períodos menos chuvosos, quando a densidade vetorial é menor, pode não ser detectada (Ríos-Velásquez et al., 2007). Em geral, os programas de controle que enfatizam o combate químico, com baixa ou nenhuma participação da comunidade, mostraram-se incapazes de conter, no médio-longo prazo, a dispersão de um vetor com altíssima capacidade de adaptação aos ambientes criados pela urbanização acelerada e a degradação ambiental (Penna, 2003).

### **3. Genética de insetos vetores de doenças**

É comum que as populações artificialmente introduzidas de qualquer inseto vetor (como de outros organismos) apresentem menor diversidade genética que as populações da região de origem da espécie (Miura, 2007; Dlugosch & Parker, 2008). A razão é que, na maioria dos casos, somente um número reduzido de subamostras das variantes

genéticas naturais é transportado acidentalmente até as áreas de introdução (cf. Sakai et al., 2001). A baixa diversidade resultante pode aumentar a vulnerabilidade dos vetores às medidas de controle; por exemplo, a probabilidade de tais populações (com repertório genético limitado) desenvolverem resistência a inseticidas é relativamente baixa. No entanto, em certos casos, introduções múltiplas de populações naturais altamente diversificadas podem resultar em um aumento absoluto da heterogeneidade populacional local nas áreas invadidas (Sakai et al., 2001; Miura, 2007; Dlugosch & Parker, 2008; Suárez & Tsutsui, 2008). Por outro lado, a natureza histórica das introduções artificiais, geralmente relacionadas com eventos muito recentes (em termos evolutivos), resulta em um padrão identificável de alta semelhança genética das populações introduzidas com as de suas áreas de origem (Sakai et al., 2001; Miura, 2007; Dlugosch & Parker, 2008). Nas genealogias de fragmentos genômicos altamente variáveis, as populações de origem e as introduzidas formarão um grupo muito coeso (com níveis muito baixos de divergência) independentemente das distâncias geográficas, enquanto populações não relacionadas com o mesmo evento de introdução aparecerão em grupos mais distantes.

A estimativa da variabilidade genética populacional e a análise dos padrões de semelhança/diferença de fragmentos genômicos entre populações geográficas de uma determinada espécie podem, portanto, ajudar a responder questões sobre a origem dos vetores introduzidos e, se for o caso, sobre o número mínimo provável de introduções necessário para gerar tais padrões (Sakai et al., 2001; Lounibos, 2002). As respostas podem, por sua vez, orientar a definição de estratégias de vigilância e controle mais eficientes, fornecendo dados sobre as dinâmicas de invasão e a vulnerabilidade relativa das populações locais de vetores.

O estudo de outros aspectos da composição genética populacional pode oferecer informações valiosas sobre os processos de introdução e expansão de uma determinada espécie. As expectativas sobre estruturação genética espacial, por exemplo, são diferentes para espécies que se expandem ativamente desde os centros de introdução (gerando uma “onda de expansão”) e para as que são transportadas de forma passiva até locais (mais ou menos) distantes do centro de introdução e localizados numa matriz ambiental inapropriada para o estabelecimento de populações secundárias (cf. Sakai et al., 2001). Este segundo modelo (que poderíamos denominar de “caminho de pedras”), se aplica às populações introduzidas de *Ae. aegypti*, que se dispersam de forma passiva e colonizam principalmente áreas urbanas situadas numa matriz inóspita. Os efeitos-fundador seriados, com sucessivos gargalos de garrafa e predominância da deriva genética, que se associam com este tipo de dinâmica (e.g., Graputto et al., 2005), deveriam gerar um padrão de alta estruturação genética com frequências alélicas muito diferentes do esperado em um conjunto de populações conectadas por fluxo gênico irrestrito. No caso de *Ae. aegypti*, estes padrões poderiam, por outra parte, ser reforçados pelos efeitos das atividades de controle vetorial: genótipos raros (que aparecem em muito baixa frequência numa determinada população) serão mais suscetíveis, por mera chance, de sofrer extinções locais (e.g., Bosio et al., 2005).

A demografia histórica das populações introduzidas de um inseto vetor apresenta também certas peculiaridades que devem aparecer refletidas na sua composição genética. Em particular, é quase certo que estas populações foram originadas (recentemente) por um número relativamente baixo de indivíduos, e é evidente que elas sofreram um processo explosivo de crescimento demográfico – acompanhado, em muitos casos, por uma expansão geográfica importante. Estes processos geram padrões de diversidade genética muito diferentes dos observados em populações em equilíbrio

demográfico. Tanto a distribuição de frequências do número de diferenças par-a-par entre seqüências de um determinado gene quanto a frequência relativa de alelos raros ou recentemente derivados podem ser utilizados para comparar os padrões observados com os esperados em populações em equilíbrio (e.g., Rogers & Harpending, 1992; Donnelly et al., 2001; Venkatesan et al., 2007; Hasan et al., 2008; Navarro-Sigüenza et al., 2008). Se conhecemos, para um dado marcador molecular, as taxas de substituição nucleotídica por unidade de tempo, podemos usar este tipo de análise para estimar o tempo transcorrido desde um hipotético evento de crescimento populacional súbito (e.g., Venkatesan et al., 2007).

A análise da variabilidade genética em populações naturais de *Ae. aegypti* pode contribuir, finalmente, à compreensão de fenômenos diretamente relacionados com aspectos epidemiológicos fundamentais. Por exemplo, diferenças genéticas interpopulacionais podem ser responsáveis por diferenças na capacidade e na competência vetorial ou na susceptibilidade do vetor aos agentes infecciosos ou aos inseticidas (e.g., Lourenço-de-Oliveira et al., 2002). Os efeitos das ações de vigilância e controle vetorial também podem ser avaliados indiretamente usando estimativas da diversidade genética populacional; por exemplo, as extinções locais devem ser freqüentes se o controle é altamente efetivo, e as estimativas de fluxo gênico devem ser muito baixas se a vigilância está de fato limitando o transporte passivo de vetores. Finalmente, a caracterização genética de diversas populações de um vetor pode ajudar a focalizar os esforços de controle nas áreas dominadas por genótipos altamente invasivos (e que funcionam como fontes de propágulos) ou a identificar pontos-chave nos quais a vigilância poderia limitar de forma mais efetiva o fluxo gênico entre sub-regiões ou localidades (Sakai et al., 2001). Estes exemplos mostram como a avaliação da variação

genética de populações locais de um vetor pode ajudar a desenhar medidas de controle e vigilância adequadas às condições reais nas áreas de interesse.

O repertório de métodos disponíveis para medir e analisar os padrões de variabilidade genética em populações de um organismo é extenso, e cresceu de forma extremamente rápida nas últimas décadas. Loxdale & Lushai (1998) publicaram uma extensa revisão sobre as características gerais dos marcadores moleculares usualmente utilizados para examinar a variabilidade genética em populações de mosquitos. Apresentaremos um resumo dos aspectos mais relevantes deste tipo de métodos e de suas aplicações ao estudo de problemas relacionados com populações de vetores de doenças humanas.

### **1.3. Marcadores moleculares**

Até os meados dos anos 60, o estudo da diversidade dos organismos vivos dependia exclusivamente da análise de polimorfismos fenotípicos. A contribuição deste tipo de estudo foi gigantesca, em particular desde o desenvolvimento das análises cladísticas, mas sua capacidade de resolução está intrinsecamente limitada pela relativa raridade das variantes fenotípicas, que são, além disso, de difícil quantificação (Behura, 2006). A aplicação de técnicas de caracterização molecular começou com o estudo de variantes protéicas (em particular isoenzimas), e se desenvolveu de forma espetacular quando, a partir de 1980, foi possível detectar diretamente a variabilidade genética nas moléculas de DNA. O desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite obter *in vitro* múltiplas cópias de um determinado segmento de DNA, abriu definitivamente a possibilidade de estudar os polimorfismos genéticos de forma eficiente e, portanto, em larga escala.

Alguns dos marcadores moleculares mais empregados para o estudo de polimorfismos genéticos, além das isoenzimas, são os polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD), o polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição

gerados por digestão com endonucleases (RFLP), os microssatélites, os polimorfismos de conformação de fita simples (SSCP), os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e o seqüenciamento de fragmentos específicos do DNA nuclear ou de organelas citoplasmáticas (mitocôndrias ou cloroplastos) (Loxdale & Lushai, 1998).

Estes e outros marcadores moleculares podem ser utilizados para a elucidação de questões referentes à sistemática, à filogenia e tendências evolutivas ou aos padrões de diversidade e estruturação populacional de insetos vetores de doenças (e.g., Loxdale & Lushai, 1998; Abad-Franch & Monteiro, 2005). Em geral, os marcadores que evoluem mais rapidamente (como os fragmentos do genoma mitocondrial) são mais informativos no estudo da variabilidade intraespecífica (incluindo a variabilidade interpopulacional), enquanto que marcadores mais conservados (como muitos genes nucleares codificadores de proteínas) são mais úteis na investigação das relações evolutivas entre espécies ou táxons supra-específicos (Solé-Cava, 2001).

#### **1.4. O DNA mitocondrial**

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas presentes nas células eucariontes e que têm como principal função o fornecimento de energia para as células. O genoma mitocondrial é uma molécula circular de DNA (DNAm<sub>t</sub>) de fita dupla contendo 37 genes, dois dos quais codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam RNAs transportadores e 13 codificam proteínas envolvidas na respiração celular (Simon et al., 1994). Esta molécula está presente em múltiplas cópias ( $\sim 10^2$ - $10^4$ ) por célula (idênticas para cada organismo individual na imensa maioria dos casos), é haplóide (adquirida por herança materna), praticamente não sofre recombinação e apresenta taxas de evolução (acúmulo de mutações ao longo do tempo) mais altas do que o genoma nuclear (Saccone et al., 2000; Simon et al., 2006; Haag-Liautard et al., 2008). A diversidade genética, as relações filogenéticas entre espécies e entre populações geográficas, a filogeografia de diferentes linhagens e os efeitos de fenômenos demográficos na

composição genética das populações estão entre os aspectos que podem ser estudados usando marcadores mitocondriais (Awise, 1994, 2000; Simon et al., 1994, 2006).

Devido a estas características, diferentes fragmentos do DNAm<sub>t</sub> têm sido extensivamente utilizados como marcadores moleculares em estudos sobre evolução (e.g., Simon et al., 1994, 2006; Sallum et al., 2002; Mousson et al., 2005) e genética de populações de insetos (e.g., Donnelly et al., 2001; Mirabello & Conn, 2006; Conn & Mirabello, 2007).

### **1.5. Estudos genéticos sobre *Aedes aegypti***

Desde o final da década de 1970, diversos estudos têm avaliado a diversidade genética populacional em *Ae. aegypti* utilizando isoenzimas (Tabachnick & Powell, 1979; Powell & Tabachnick, 1980; cf. Tabachnick, 1991). Os resultados sugeriram que os padrões de relacionamento isoenzimático poderiam ser utilizados para realizar inferências sobre a origem geográfica e as dinâmicas de dispersão deste vetor (cf. Tabachnick, 1991).

A utilização de marcadores de DNA no estudo da diversidade genética das populações deste vetor começou nos anos 1990; desde então, diversos grupos de pesquisa de diferentes partes do mundo têm publicado trabalhos baseados na aplicação de técnicas moleculares, incluindo RAPDs, microssatélites, RFLPs e DNAm<sub>t</sub> (e.g., Apóstol et al., 1996; Gorrochotegui-Escalante et al., 2000; Ravel et al., 2002; Bosio et al., 2005; Costa-da-Silva et al., 2005; Mousson et al., 2005; Costa-Ribeiro et al., 2006; Herrera et al., 2006; Paduan et al., 2006; Bracco et al., 2007; Paduan & Ribolla, 2008; Scarpassa et al., 2008; Urdaneta-Márquez et al., 2008).

O gene mitocondrial codificador da subunidade 4 da NADH desidrogenase (ND4) tem sido freqüentemente utilizado em estudos de genética de populações de *Ae. aegypti*. Utilizando este gene, Gorrochotegui-Escalante et al. (2000) estimaram as taxas de fluxo



gênico entre 10 populações de sete localidades ao longo da costa nordeste do México. Sete haplótipos foram detectados, e as análises filogenéticas indicaram a presença de dois clados independentes bem suportados. Na tentativa de determinar a estrutura genética das populações mexicanas desta espécie, Gorrochotegui-Escalante et al. (2002) ampliaram sua amostragem até abranger 38 populações. Foram encontrados 25 haplótipos; as análises filogenéticas mostraram que todos eles pertencem a uma mesma linhagem, sugerindo que os resultados anteriores (Gorrochotegui-Escalante et al., 2000) se deviam a uma amostragem incompleta. As análises de genética populacional mostraram sinais de isolamento das populações da costa nordeste, enquanto as da costa do Pacífico e da península do Yucatán apareceram como geneticamente homogêneas; os resultados sugeriram a existência de fluxo gênico entre populações situadas a distâncias entre 130 e 180 km, e em particular entre as localidades amostradas ao longo da costa ocidental (Gorrochotegui-Escalante et al., 2002).

Costa-da-Silva et al. (2005) utilizaram o gene ND4 para estimar a variabilidade genética de três populações peruanas de *Ae. aegypti* (Lima e Piura, na região da costa, e Iquitos, na Amazônia). Foram encontrados três haplótipos, e as relações entre eles sugeriram a existência de duas linhagens diferenciadas. Estes dados foram combinados com os obtidos de uma ampla amostragem de localidades brasileiras e de amostras pontuais coletadas em outros países (nas Américas, a Ásia e a África) por Bracco et al. (2007). Foram encontrados 20 haplótipos, e as análises genealógicas revelaram a existência de duas linhagens mitocondriais; os autores interpretaram este achado como evidência de múltiplas introduções de *Ae. aegypti* nas Américas, postularam histórias evolutivas independentes para cada linhagem e sugeriram que cada uma delas poderia representar uma unidade taxonômica (talvez uma subespécie) diferente (Bracco et al., 2007). Este padrão geral de partição da diversidade genética de *Ae. aegypti* em dois

clados reciprocamente monofiléticos tem sido sugerido por outros estudos realizados em diferentes regiões das Américas e da Ásia e que utilizaram marcadores mitocondriais, reforçando a idéia de múltiplas introduções em ambos os continentes (Bosio et al., 2005; Herrera et al., 2006; Paduan & Ribolla, 2008; Scarpassa et al., 2008; Urdaneta-Márquez et al., 2008, Lima-Júnior & Scarpassa, no prelo).

Apesar do avanço significativo que estes trabalhos têm representado no conhecimento dos padrões de diversidade populacional, composição haplotípica, relações genealógicas, filogeografia e estruturação genética das populações americanas de *Ae. aegypti*, uma visão compreensiva, coerente e satisfatória do processo de invasão e colonização do continente por esta espécie ainda não foi desenvolvida. Um dos motivos principais desta carência é, provavelmente, que cada um destes esforços analíticos se concentrou numa sub-região discreta; entendemos que somente uma análise conjunta dos dados disponíveis pode fornecer os fundamentos para desenvolver uma proposta abrangente capaz de dar conta deste complexo fenômeno biológico. O presente trabalho pretende fazer uma contribuição nesse sentido. Com tal objetivo, foi compilada e analisada a maior base de dados moleculares (ND4) sobre diversidade genética de *Ae. aegypti* no continente americano. A maioria das seqüências utilizadas se encontra disponível nas bases públicas de dados moleculares; outras foram obtidas durante o desenvolvimento do projeto, e outras foram gentilmente fornecidas pelos autores dos trabalhos originais (em particular pelo Prof. William C. Black IV da Colorado State University e pelo Prof. Paulo E.M. Ribolla e a Dra. Karina S. Paduan da Universidade Estadual Paulista). Embora o foco deste trabalho seja continental, fizemos ênfase na história da invasão e colonização do Brasil por *Ae. aegypti*, e tentamos desenvolver uma proposta que incorporasse questões de relevância epidemiológica para o país e, em particular, para a região Amazônica. Os resultados sugerem a existência de

dois eventos de introdução do vetor no país, cada um dos quais se desenvolveu seguindo dinâmicas espaciais e temporais bem diferenciadas. Propomos uma correspondência explícita entre estas dinâmicas e os principais padrões históricos da epidemiologia da dengue no Brasil. Mostramos a relevância do aumento da conectividade terrestre das cidades do norte da Amazônia no processo de expansão geográfica dos vetores, e como esta expansão gerou os padrões de diversidade genética observados em diversos estudos. Apresentamos dados que indicam que as campanhas de erradicação do vetor dos anos 1950-1970 tiveram um sucesso limitado, e que a efetividade das atividades de controle se viu comprometida pelo processo de descentralização do sistema de saúde nos anos 1990. Sugerimos, finalmente, como os resultados das análises genéticas podem ser integrados no desenho, implantação e avaliação de melhores estratégias de controle e vigilância entomológica.

## 2. Introdução

O principal vetor do vírus Dengue nas Américas é o mosquito *Aedes aegypti*, uma espécie originária da África que se dispersou pelo mundo ao longo das rotas comerciais marítimas durante os séculos XVII, XVIII e XIX. A presença do vetor no continente americano data dos séculos XVII e XVIII (Tabachnick, 1991). No Brasil, *Ae. aegypti* foi introduzido pela primeira vez, provavelmente, no início do século XIX. Com o objetivo de controlar as graves epidemias de febre amarela urbana, campanhas de controle intensivas foram implementadas no início do século XX em diversos países das Américas. Como resultado destes programas de erradicação, iniciados em 1916 e continuados pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) entre 1940 e 1960, *Ae. aegypti* foi considerado erradicado do Brasil em 1958 (PAHO, 2009). Sua reaparição, nove anos depois, no estado do Pará é atribuída à persistência de populações do vetor em países vizinhos (Suriname, Guianas e Venezuela) (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Novas campanhas conseguiram erradicar estas populações reinfestantes em 1973, mas em 1976 a presença do vetor foi registrada no estado da Bahia, em 1977 no estado do Rio de Janeiro e, no início da década de 1980, em Roraima (Schatzmayr, 2000). Desde então, *Ae. aegypti* tem se dispersado por quase 4000 municípios em todos os estados do país. O Amazonas foi um dos últimos estados brasileiros infestados pelo vetor; sua ocorrência na cidade de Manaus foi notificada pela primeira vez em 1996 (Figueiredo et al., 2004). Subseqüentemente, duas grandes epidemias de dengue atingiram a cidade em 1998 e 2001, com 13.873 e 18.504 casos registrados, respectivamente.

As relações entre as dinâmicas de introdução, estabelecimento e expansão do mosquito vetor do vírus Dengue em cada um destes ciclos de infestação-eliminação-reinfestação e as dinâmicas epidemiológicas (históricas e contemporâneas) da doença,

embora pareçam intuitivas (e tenham uma evidente importância social e sanitária), não têm sido avaliadas de forma detalhada até o momento. As narrativas clássicas sobre estes processos enfatizam os aspectos clínico-epidemiológicos, incluindo a circulação de diferentes sorotipos do vírus em diferentes lugares e momentos ou a incidência das diferentes formas da doença em diferentes grupos populacionais. Por sua parte, os estudos sobre ecologia, evolução e genética de populações de *Ae. aegypti*, embora tenham promovido importantes avanços no conhecimento da biologia desta espécie, ainda não têm produzido um panorama geral e coerente das correspondências entre o processo de colonização do território (e as tentativas de evitá-la) e as tendências epidemiológicas dominantes em cada período histórico.

Uma abordagem atraente para enfrentar este desafio consiste em considerar as consequências previsíveis do processo histórico de invasão do território pelo vetor (i.e., introdução de populações fundadoras, estabelecimento das mesmas e posterior expansão geográfica e demográfica) em termos dos padrões de diversidade genética dos descendentes contemporâneos das populações originariamente introduzidas. Esta forma de trabalho permite considerar de forma simultânea várias hipóteses alternativas, julgando cada uma delas em função da relação entre suas previsões e os dados observados. O conhecimento acumulado sobre (i) a história da presença de populações de *Ae. aegypti* no Brasil e nas Américas, (ii) as consequências genéticas dos processos biológicos envolvidos nas invasões por organismos artificialmente introduzidos, e (iii) as grandes tendências epidemiológicas da dengue desde os primeiros registros permite formular algumas destas hipóteses e suas previsões de forma explícita. A existência de bases de dados moleculares cada vez mais completas, e de ferramentas analíticas capazes de extrair a informação contida nessas bases, possibilita a execução de testes de tais hipóteses.

Em particular, este trabalho pretende testar uma série de hipóteses sequenciais sobre as origens, número e dinâmicas espaciais e temporais da invasão das Américas por *Ae. aegypti*. Utilizaremos com este propósito uma base de dados de seqüências de um fragmento do gene ND4 mitocondrial; esta base, compilada e completada durante o desenvolvimento do presente projeto, é provavelmente a mais completa fonte de informação sobre variabilidade genética de populações americanas de *Ae. aegypti* disponível até o momento. Finalmente, a consideração conjunta dos resultados das análises genéticas permitirá delinear uma proposta coerente de explicação das correspondências entre as dinâmicas de introdução e os perfis históricos da epidemiologia da dengue no Brasil.

Apresentamos a seguir, de forma breve, as premissas, hipóteses e predições nas quais se baseia este trabalho.

### **3. Premissas, hipóteses e predições**

#### **3.1. Premissas: o processo de colonização das Américas por *Aedes aegypti***

As populações americanas de *Ae. aegypti* foram introduzidas recentemente (talvez, as primeiras, no século XVII) no continente. Esta introdução ocorreu por alguns (provavelmente poucos) pontos discretos de introdução primária; desde estes pontos, as populações que conseguiram se estabelecer iniciaram um processo de expansão geográfica. Esta dispersão secundária de *Ae. aegypti*, um vetor urbano, ocorre de forma passiva ao longo de rotas de transporte terrestre, marítimo, fluvial e, em alguns casos, aéreo. O território não urbano (a matriz) que separa os centros de estabelecimento destes propágulos é inadequado para a colonização pelo vetor; em consequência, o modelo de expansão pode ser caracterizado como um “caminho de pedras”. Por outra parte, as campanhas e programas de controle vetorial tendem a aumentar as probabilidades de extinção de populações ou sub-populações locais; sabemos que tais esforços foram

relativamente bem sucedidos em amplas áreas geográficas na primeira metade do século XX, mas, no médio prazo, eles falharam: as reintroduções e recolonização de áreas de erradicação e a existência de áreas nas quais a espécie nunca foi erradicada são fortes indícios em favor desta idéia. Contudo, é importante destacar tanto os dados históricos quanto os resultados de diversos trabalhos independentes sugerem fortemente a existência de múltiplas introduções, provavelmente em diferentes momentos, através de diferentes pontos e desde diferentes áreas de origem. Neste caso, os padrões derivados das dinâmicas relacionadas com cada evento de introdução estariam hoje sobrepostos no espaço, dificultando a avaliação separada de cada um deles.

### **3.2. Hipóteses e predições**

As hipóteses alternativas que consideraremos neste trabalho se referem a diferentes aspectos do processo de invasão das Américas e do Brasil por *Ae. aegypti*. Faremos perguntas sobre, sucessivamente, (i) os locais de origem e introdução das populações fundadoras, (ii) as dinâmicas espaciais e temporais de colonização das áreas de interesse, e (iii) as correspondências entre estas dinâmicas e os perfis epidemiológicos da dengue. Em cada caso, consideraremos duas alternativas básicas em relação com o número de introduções (única vs. múltiplas). As predições serão formuladas (para o marcador molecular utilizado) em termos dos padrões esperados, em cada cenário, de (i) diversidade genética, (ii) distribuição e frequência de ocorrência de haplótipos, (iii) relações genealógicas e filogenéticas entre esses haplótipos, (iv) estruturação genética populacional e (v) indícios de mudanças demográficas históricas; finalmente, serão avaliados, de forma qualitativa, os perfis de correspondência espacial e temporal entre os eventos e processos de invasão pelo vetor e as tendências históricas da epidemiologia da dengue no Brasil.

### 3.2.1. Diversidade genética

A diversidade genética será baixa nos descendentes de cada uma das linhagens introduzidas. Isto é consequência do efeito de “gargalo de garrafa” associado com a “subamostragem” aleatória de uma fração não representativa da diversidade genética das populações naturais na área de origem (cf. Sakai et al., 2001; Miura, 2007; Dlugosch & Parker, 2008). Se todos os indivíduos presentes numa determinada área fossem descendentes de um evento singular de introdução recente, a diversidade genética seria extremamente baixa. No caso extremo, se uma introdução envolveu descendentes de uma única fêmea, as seqüências de ND4 deveriam ser idênticas ou quase idênticas em todos os espécimes amostrados. Por outra parte, introduções múltiplas podem resultar num padrão de alta diversidade genética se os descendentes de diferentes linhagens/populações originárias (alopátricas ou parapátricas em condições naturais) se encontram (viram simpátricas) nas áreas de introdução (e.g., Kolbe et al., 2004; Suárez & Tsutsui, 2008). Finalmente, o crescimento demográfico explosivo que segue ao estabelecimento bem-sucedido de um propágulo abre a possibilidade de diversificação local por aparição espontânea de mutações novas. Esta diversificação será mais evidente nas áreas de introdução primária, que é onde as populações introduzidas são mais antigas e tiveram mais tempo para acumular mutações. Este padrão de diversificação local se caracteriza pela ocorrência de diversos haplótipos raros derivados recentemente (separados por 1-2 passos mutacionais) de um ancestral simpátrico e abundante; assim, a diversidade nucleotídica será baixa em presença de um número de haplótipos relativamente grande, mas a diversidade haplotípica será relativamente baixa (por causa da assimetria das freqüências haplotípicas). Em áreas que recebem múltiplas introduções independentes, a coexistência de haplótipos não estreitamente relacionados (i.e., mais divergentes) gerará um perfil de maior diversidade



nucleotídica, mas a diversidade haplotípica se manterá relativamente baixa. Se estas introduções são antigas, tanto a diversidade haplotípica quanto o número de haplótipos terão valores altos. Os padrões de diversidade genética esperados em diversos cenários são resumidos na Tabela 1.

Quadro 1. Padrões esperados de diversidade genética em populações introduzidas

Estimativa de diversidade	Introdução única		Múltiplas introduções		
	Recente	Antiga	Recentes	Recente/Antiga	Antigas
<b>H</b>	↓	↑	↓	↑	↑↑
<b>Hd</b>	↓↓	↓	↓	↑	↑↑
<b>π</b>	↓↓	↓	↑	↑↑	↑↑↑

H, número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; π, diversidade nucleotídica

### 3.2.2. Padrões espaciais de ocorrência de diferentes haplótipos

Em primeiro lugar, haplótipos extremamente semelhantes ou idênticos ocorrerão nas populações-fonte originárias (se é que estas foram amostradas) e naquelas derivadas de seus propágulos – em particular nos locais de introdução inicial. Esta tendência será semelhante em relação à expansão secundária (nas Américas) de cada população introduzida: o haplótipo dominante na fonte aparecerá em vários dos locais de introdução secundária, nos quais pode virar dominante, em particular quando não houver outras populações bem estabelecidas e que invadiram esses locais anteriormente (o que pode também ser consequência dos efeitos de ações de controle vetorial).

Os haplótipos relacionados com eventos mais antigos (primários) de introdução serão dominantes nos locais de introdução; haverá 1-2 haplótipos dominantes, mas a diversificação local (ver acima) gerará haplótipos derivados, algum dos quais pode aparecer em frequências mais ou menos expressivas. As áreas de introdução secundária, mais recente, estarão dominadas por um haplótipo, com poucos o nenhum derivados recentes, que serão muito raros.

No caso de introduções múltiplas, o padrão esperado nos locais de introdução será de vários haplótipos co-dominantes; os mais antigos (introduzidos há mais tempo) aparecerão como ancestrais recentes de um número maior de haplótipos derivados.

### **3.2.3. Relações genealógicas e filogenéticas entre haplótipos**

Cada evento singular de introdução terá duas conseqüências principais: (1) todos os haplótipos derivados do propágulo inicial serão muito semelhantes a este haplótipo e entre si, gerando redes de haplótipos em forma de estrela e árvores filogenéticas com ramos muito curtos; e (2) se a população de origem foi amostrada, haverá haplótipos idênticos ou quase idênticos nela e na população introduzida que descende dela; estes aparecerão, portanto, na mesma posição nas redes genealógicas e nas árvores filogenéticas. Se uma população nativa originou duas ou mais introduções em dois ou mais locais geográficos, este último padrão será semelhante: poderá haver haplótipos idênticos (ou quase) em cada uma das populações introduzidas e na original; se esta não foi amostrada, haverá haplótipos idênticos (ou quase idênticos) em duas populações introduzidas, independentemente de sua localização geográfica (Ásia e América, por exemplo).

Múltiplas introduções gerarão padrões diferentes. (1) As redes de haplótipos conterão mais de um agrupamento em forma de estrela; estes agrupamentos estarão conectados por elos de várias mutações. Para dados intraespecíficos, espera-se que este número seja relativamente baixo (na ordem de <2% de diferenças nucleotídicas), o que deverá aparecer refletido nas árvores filogenéticas. (2) Se as populações de origem foram amostradas, os haplótipos (idênticos ou quase idênticos) correspondentes aparecerão em cada um dos agrupamentos ou sub-redes e em cada um dos clados das árvores filogenéticas.

### 3.2.4. Estruturação genética

As análises às quais faz referência esta seção foram aplicadas exclusivamente às populações americanas de *Ae. aegypti*. Portanto, não fornecem informação sobre os eventos primários de introdução no continente, e sim sobre a dispersão subsequente de cada uma das populações já introduzidas.

Os eventos de dispersão estudados são, sem dúvida, recentes e mediados pela ação do homem. As dinâmicas podem ser descritas como uma série de eventos de dispersão passiva de propágulos seguindo um padrão de “caminho de pedras” representadas por localidades urbanas numa matriz não colonizável pelo vetor. O padrão dominante esperado, portanto, consiste na detecção de sinais de séries de efeitos-fundador (ver Graputto et al., 2005). Isto pode gerar, por mero acaso (“amostragem” acidental de uma ou umas poucas linhagens em cada evento discreto de dispersão de propágulos, gerando gargalos de garrafa), diferenças muito importantes nas frequências haplotípicas (por deriva genética); o resultado seria um padrão de forte estruturação genética.

No cenário de múltiplas introduções, estes processos afetam várias linhagens diferentes introduzidas em diferentes tempos, desde diferentes lugares e por diferentes rotas, e que viajam passivamente entre localidades durante a fase de dispersão secundária. Os componentes estocásticos serão, assim, muito importantes em diversos níveis do processo: “amostragem” das populações-fonte, rotas e locais de introdução, estabelecimento ou não dos propágulos, “amostragem” dos propágulos nos eventos subsequentes de dispersão, estabelecimento e expansão dos mesmos, extinções locais, etc. Embora este cenário possa erodir os sinais de estruturação genética, o padrão geral de dispersão de pequenos propágulos seguindo “caminhos de pedras” deveria ainda resultar numa predominância dos sinais de isolamento/estruturação (Graputto et al., 2005). Se a conectividade entre as “ilhas” do “caminho de pedras” são mais fortes

dentro de cada área geográfica do que entre áreas diferentes, então os dendrogramas de distâncias genéticas mostrarão alguma forma de correspondência geográfica; se há duas populações geograficamente distantes, mas que intercambiam muitos propágulos freqüentemente, então elas aparecerão “inesperadamente” próximas nos dendrogramas.

Finalmente, cabe considerar que os esforços de controle deveriam tender a homogeneizar as populações locais. As linhagens (haplótipos) localmente dominantes têm menos chances de sofrer extinções locais do que representantes de linhagens raras recentemente introduzidas, que serão mais sensíveis aos efeitos estocásticos das ações de controle. Isto deveria aumentar, em geral, os sinais de estruturação genética entre populações; este efeito será ainda mais forte entre populações derivadas de fundadores de diferentes linhagens, e menos forte entre populações derivadas de fundadores da mesma linhagem (no caso extremo, duas populações dominadas por descendentes da mesma linhagem materna [i.e., com um haplótipo dominante idêntico] serão mantidas idênticas, ou quase idênticas, pela remoção estocástica de linhagens raras derivada do controle).

### **3.2.5. Demografia histórica**

Cada uma das populações introduzidas é (claramente) candidata a apresentar um perfil típico de expansão populacional recente; a distribuição de freqüências das diferenças par-a-par entre seqüências (*mismatch distribution*) será unimodal e pouco irregular, e os valores de determinados testes de neutralidade (sobretudo o  $F_s$  e possivelmente de  $F^*$  e  $D^*$ ) serão negativos (ver Materiais e Métodos). No caso de um evento singular de introdução, estes sinais serão evidentes na base de dados combinada. No cenário de múltiplas introduções, os sinais somente serão evidentes nas bases de dados correspondentes aos indivíduos descendentes de cada um dos eventos de introdução. Se a base de dados não fosse dividida segundo este critério (por falta de

informação sobre o padrão de descendência de cada seqüência), os sinais podem interferir mutuamente. Neste caso, podemos esperar os seguintes padrões: (1) a distribuição de *mismatch* não é unimodal; contudo, ela mostrará diferenças evidentes com a esperada numa população em equilíbrio; (2) a irregularidade da distribuição de *mismatch* será provavelmente baixa, e talvez significativamente menor do que numa população em equilíbrio (extremamente irregular); (3) como não há excesso de haplótipos raros (há vários haplótipos freqüentes) nem de haplótipos derivados recentemente (há vários ocupando os lugares basais das filogenias/genealogias), os valores dos testes  $F_s$ ,  $F^*$  e  $D^*$  aparecem como não significativos, embora possam ser (especialmente  $F_s$ ) negativos (ver Materiais e Métodos).

Para um evento singular de introdução, as estimativas do tempo transcorrido desde um hipotético evento de expansão deveriam ser compatíveis com os tempos históricos da introdução de *Ae. aegypti* nas Américas. No caso de múltiplas introduções envolvendo mais de uma linhagem mitocondrial, estas estimativas serão muito maiores do esperado. Isto reflete o fato de que o ancestral comum das seqüências investigadas existiu nas áreas de origem (i.e., na África) muito tempo antes que o processo de introdução tivesse começado. Isto é, de certa forma, análogo à situação observada em alguns animais domésticos: se o evento de domesticação foi único (envolvendo uma só linhagem mitocondrial ou umas poucas linhagens estreitamente relacionadas) e “recente” (e.g., nos últimos 5000-10.000 anos), a diversidade deveria ser ainda muito baixa; se houve diversos eventos de domesticação (envolvendo diversas linhagens mitocondriais), a diversidade seria muito maior e as estimativas do tempo necessário para gerar essa diversidade (desde o ancestral comum) seriam muito maiores do que o tempo de fato transcorrido desde o/s momento/s da domesticação (e.g., Joshi et al., 2004).

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo geral**

Desenvolver, utilizando dados sobre variabilidade genética populacional, uma proposta compreensiva capaz de dar conta do processo de invasão das Américas por *Aedes aegypti*, e estabelecer as possíveis correspondências entre os padrões de diversidade genética desta espécie de vetor e as dinâmicas espaciais e temporais da epidemiologia da dengue no Brasil.

### **4.2. Objetivos específicos**

1. Identificar os principais pontos de introdução de populações de *Ae. aegypti* nas Américas e no Brasil, e definir as rotas de dispersão associadas com esses pontos;
2. Definir o número mínimo de introduções do vetor compatível com a diversidade genética das populações americanas atuais de *Ae. aegypti*;
3. Descrever os padrões espaciais de diversidade e estruturação genética das populações contemporâneas de *Ae. aegypti*, comparando-os com os esperados em relação com diferentes dinâmicas hipotéticas de invasão;
4. Desenvolver e propor um marco espacial e temporal para explicar as correspondências entre os principais eventos de introdução de *Ae.aegypti* no Brasil e a epidemiologia histórica da dengue no país.

## 5. Materiais e métodos

### 5.1. Compilação da base de dados

A base de dados utilizada neste trabalho consiste em 3183 seqüências de um fragmento de 322 pares de bases do gene ND4 do DNAm<sub>t</sub> de *Ae. aegypti*. Esta base foi complementada com 17 seqüências homólogas de outras espécies (*Aedes albopictus*, *Ochlerotatus japonicus*, *Ochlerotatus triseriatus* e *Anopheles gambiae*), que foram utilizadas como grupos externos nas análises filogenéticas. Um total de 3103 seqüências corresponde a populações americanas de *Ae. aegypti*; os dados correspondentes a estas populações incluem as freqüências haplotípicas observadas em cada uma delas, e foram portanto as utilizadas nas análises de genética populacional. O resto, procedente de espécimes africanos e asiáticos, foi utilizado unicamente nas análises genealógicas e filogenéticas. A procedência de cada uma das seqüências utilizadas pode ser consultada na Tabela 1 do Apêndice. A Figura 1 do Apêndice mostra a localização geográfica de cada uma das populações (e grupos de populações) de *Ae. aegypti* das Américas comparadas neste trabalho.

As amostras seqüenciadas durante o desenvolvimento de nosso projeto foram coletadas nas cidades de Manaus (cf. Rios-Velásquez et al., 2007) e Boa Vista; as larvas foram identificadas e estocadas em etanol 95% até o processamento. A extração do DNA foi realizada usando o kit DNeasy (Quiagen®) conforme as recomendações do fabricante. A amplificação do fragmento alvo do gene ND4 mitocondrial seguiu os métodos descritos por Gorrochotegui-Escalante et al. (2000). Os iniciadores usados na PCR foram F (*forward*) 5'-GTD YAT TTA TGA TTR CCT AA-3' e R (*reverse*) 5'-CTT CGD CTT CCW ADW CGT TC-3'. O volume final de reação (25 µl) continha: 2,5 µl de tampão (Tris-KCl 200mM, pH 8,4), 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,25 µl de dNTPs (10mM), 1,5 µl de cada iniciador (*primer*) (Forward e Reverse), 0,3 µl de Taq DNA

polimerase 5U/ $\mu$ l (Invitrogen), 15,95  $\mu$ l de água e 2  $\mu$ l de solução de DNA molde de cada espécime. Um controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA) foi utilizado em todas as reações de PCR. O termociclador foi programado com o seguinte perfil de amplificação: uma temperatura inicial de 95°C por 3 min, 10 ciclos a 92°C por 30 seg, 48°C por 1 min e 72°C por 40 seg, seguido de 40 ciclos a 92°C por 30 seg, 52°C por 35 seg e 72°C por 40 seg, finalizando numa temperatura de extensão de 72°C durante 5 min. Para o seqüenciamento, as amostras amplificadas foram purificadas utilizando o sistema de lavagem para PCR da Wizard®. As reações de seqüenciamento (uma para cada fita complementar) foram realizadas usando os mesmos iniciadores utilizados na amplificação inicial dos produtos. Para as reações utilizou-se o sistema BigDye® *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Após purificação, os produtos foram analisados em um seqüenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems).

Para verificar a qualidade dos eletroferogramas e computar a seqüência consenso foram utilizados os programas Chromas 2.13 (Technelysium Pty. Ltd.) e GeneDoc 2.6.002 ([www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc)). A identidade das seqüências consenso foi verificada por comparação com as seqüências disponíveis nas bases de dados moleculares usando a ferramenta Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)); a presença de códons de parada o sem sentido (que indicaria erros na leitura dos eletroferogramas ou a amplificação e seqüenciamento de pseudogenes nucleares) foi examinada com ajuda do programa MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007). Finalmente, as seqüências foram alinhadas manualmente.



## **5.2. Análise dos dados**

### **5.2.1. Diversidade genética**

O programa DnaSP 4.5 (Rozas et al., 2003) foi utilizado para estimar o número de haplótipos ( $H$ ), a diversidade haplotípica ( $Hd$ ) e nucleotídica ( $\pi_1$ ), a diversidade nucleotídica com correção de Jukes e Cantor ( $\pi_2$ ), o número médio de diferenças nucleotídicas ( $k$ ) e o número de sítios polimórficos ( $S$ ) de cada população ou grupo de populações. As frequências haplotípicas foram computadas no programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005).

### **5.2.2. Genealogia e filogenia**

As relações genealógicas entre os haplótipos únicos identificados (com ajuda do programa DNAsp 4.5) na base de dados de *Ae. aegypti* foram inferidas por meio da construção de uma rede de parcimônia estatística com o programa TCS 1.21 (Clement et al., 2000). Esta análise foi repetida com o alinhamento dos haplótipos isolados de espécimes americanos. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007). Foi construído um dendrograma de haplótipos únicos por agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*) com as distâncias genéticas estimadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta (Tamura et al., 1994); o suporte dos clados foi estimado utilizando 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*.

### **5.2.3. Estruturação genética populacional**

A estruturação genética das populações americanas de *Ae. aegypti* foi investigada através da análise de variância molecular (AMOVA), baseada nas frequências haplotípicas observadas; o programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al., 2005) foi utilizado para estas análises. A estrutura hierárquica foi definida agrupando as doze populações em cinco regiões macro-geográficas (Tabela 5). Foram calculados os componentes da variância total ( $Vt$ ) correspondentes à variação entre indivíduos dentro de cada

população ( $V_c$ ), entre populações dentro de cada região ( $V_b$ ) e entre regiões ( $V_a$ ). A partir destas estimativas foram calculados os índices de fixação  $F_{sc}$  (fração da variação entre populações em relação às regiões,  $V_b/V_b+V_c$ ),  $F_{st}$  (fração da variação entre populações em relação ao total,  $V_a+V_b/V_t$ ) e  $F_{ct}$  (fração da variação entre regiões em relação ao total,  $V_a/V_t$ ). Os valores de significância estatística ( $P$ ) de cada um destes índices foram calculados realizando 10.100 permutações. Finalmente, e utilizando também Arlequin 3.1, foram calculados os valores de  $F_{st}$  entre cada par de populações incluídas no estudo, e foi estimado o número de migrantes que cada par de populações intercambia por geração ( $Nm$ ). Os valores de distância genética linearizada de Slatkin, derivados dos índices de fixação, foram utilizados para construir um dendrograma UPGMA no programa MEGA 4.1.

#### **5.2.4. Demografia histórica**

A existência de sinais de expansão populacional foi investigada computando as frequências relativas das diferenças nucleotídicas par-a-par entre seqüências (Rogers & Harpending, 1992) nos programas DNAsp 4.5 e Arlequin 3.1. As distribuições destas frequências relativas foram avaliadas inicialmente de forma qualitativa por comparação com as frequências esperadas sob os pressupostos de expansão populacional súbita e de equilíbrio. O valor de estatístico  $r$  (do Inglês *raggedness*), que mede a irregularidade da distribuição de *mismatches* (maior em populações em equilíbrio), foi utilizado para obter uma avaliação quantitativa da forma da distribuição (Harpending, 1994); os valores associados de  $P$  foram calculados com 10.000 simulações em Arlequin 3.1. Os testes  $F_s$  (Fu, 1997),  $F^*$  e  $D^*$  (Fu & Li, 1993), desenvolvidos inicialmente para detectar os efeitos da seleção natural sobre fragmentos gênicos usados como marcadores moleculares, podem ser utilizados para evidenciar sinais de expansão populacional (Fu, 1997).  $F_s$  é particularmente sensível às mudanças demográficas, enquanto  $F^*$  e  $D^*$  têm

melhor desempenho na detecção dos efeitos da seleção (Fu, 1997). Valores negativos do teste  $F_s$  de Fu e dos testes  $D^*$  e  $F^*$  de Fu e Li indicam, respectivamente, um excesso de haplótipos raros e um excesso de haplótipos derivados recentemente em relação ao esperado em uma população em equilíbrio. Os valores de  $P$  associados foram calculados em DNAsp 4.5 realizando simulações de coalescência com 10.000 pseudo-réplicas de 100 seqüências amostradas ao acaso. Finalmente, a relação entre os valores estimados de  $tau$  (a data desde um hipotético evento de crescimento populacional súbito, medida em unidades de tempo mutacional) e a taxa de mutação por sítio por geração ( $\mu$ ) foi utilizada para estimar o tempo transcorrido (em gerações) desde um hipotético evento de crescimento populacional súbito ( $t$ ), utilizando a equação  $t = tau/2\mu'$ , onde  $\mu'$  é a taxa de taxa de mutação por sítio por geração e por seqüência ( $322x\mu$ ). Os valores de  $tau$  foram calculados em DNAsp 4.5, e o valor  $\mu$  ( $6,2 \times 10^{-8}$ ) foi tomado do estimado diretamente para o DNA mitocondrial de *Drosophila melanogaster* (Haag-Liautard et al., 2008).

## 6. Resultados e discussão

### 6.1. Diversidade genética das populações americanas de *Aedes aegypti*

A Tabela 2 mostra os valores de  $H$ ,  $Hd$ ,  $\pi_1$ ,  $\pi_2$ ,  $S$  e  $k$  estimados para cada uma das populações e agrupamentos de populações de *Ae. aegypti* das Américas comparadas no presente trabalho.

Tabela 2. Diversidade genética em populações de *Aedes aegypti* das Américas

Região-População	$N$	$H$	$Hd$	$\pi_1(\pm DP)$	$\pi_2$	$S$	$k$
<b>Norte-Mesoamérica</b>							
Costa Nordeste	676	12	0,705	0,01586±0,00038	0,01620	18	5,107
Costa Ocidental	556	13	0,882	0,01989±0,00018	0,02030	18	6,405
Yucatán	751	13	0,870	0,02140±0,00017	0,02185	19	6,892
<b>Total</b>	<b>1983</b>	<b>22</b>	<b>0,888</b>	<b>0,02024±0,00024</b>	<b>0,0266</b>	<b>21</b>	<b>6,516</b>
<b>Venezuela</b>							
Andes-Maracaibo	272	5	0,687	0,01513±0,00037	0,01541	12	4,873
Costa	145	5	0,590	0,00711±0,00086	0,00719	13	2,288
Llanos-Orinoco	209	4	0,496	0,00604±0,00065	0,00610	12	1,944
<b>Total</b>	<b>626</b>	<b>7</b>	<b>0,655</b>	<b>0,01161±0,00048</b>	<b>0,01179</b>	<b>13</b>	<b>3,738</b>
<b>Amazônia</b>							
Central	183	19	0,640	0,01019±0,00076	0,01033	16	3,280
Oriental	36	10	0,827	0,01628±0,00110	0,01657	13	5,243
Ocidental	64	6	0,619	0,00602±0,00148	0,00610	12	1,938
<b>Total</b>	<b>283</b>	<b>24</b>	<b>0,762</b>	<b>0,01176±0,00064</b>	<b>0,01193</b>	<b>18</b>	<b>3,785</b>
<b>Brasil</b>							
Nordeste	39	3	0,148	0,00109±0,00075	0,00110	5	0,351
Sul-Sudeste	134	17	0,722	0,01726±0,00055	0,01762	14	5,559
<b>Total</b>	<b>173</b>	<b>18</b>	<b>0,636</b>	<b>0,01552±0,00085</b>	<b>0,01584</b>	<b>14</b>	<b>4,997</b>
<b>Peru Transandino</b>	<b>38</b>	<b>3</b>	<b>0,582</b>	<b>0,01722±0,00087</b>	<b>0,01760</b>	<b>11</b>	<b>5,546</b>
<b>Américas</b>	<b>3103</b>	<b>45</b>	<b>0,912</b>	<b>0,01957±0,00068</b>	<b>0,01994</b>	<b>24</b>	<b>6,300</b>

$N$ , tamanho da amostra;  $H$ , número de haplótipos;  $Hd$ , diversidade haplotípica;  $\pi_1$ , diversidade nucleotídica;  $DP$ , desvio padrão;  $\pi_2$ , diversidade nucleotídica com correção de Jukes e Cantor;  $S$ , número de sítios polimórficos;  $k$ , número médio de diferenças nucleotídicas

Os dados mostram valores relativamente altos de  $H$  na Amazônia ( $H = 24$ ) e Norte-Mesoamérica ( $H = 22$ ); contudo, a distribuição destes valores entre as populações que compõem cada uma destas regiões é diferente. O número de haplótipos foi muito baixo na Venezuela, apesar de que a base de dados disponível é abrangente ( $N = 626$ ; 3 sub-regiões e 10 áreas de coleta); os resultados observados para as populações transandinas do Peru (3 haplótipos em 38 espécimes) e para as do Nordeste brasileiro (3

haplótipos em 39 espécimes) podem ser consequência da limitada amostragem. O valor de  $H$  foi também alto no Sul-Sudeste brasileiro. Os valores de  $Hd$  foram muito altos em Norte-Mesoamérica, altos no Sul-Sudeste brasileiro, moderados nas populações dos Andes-Maracaibo e da Amazônia Central e muito baixos no Nordeste do Brasil. Também as estimativas de  $\pi$  foram maiores para Norte-Mesoamérica (em particular Yucatán) e o Sul-Sudeste do Brasil, e muito baixas para o Nordeste brasileiro.

Seguindo o esquema proposto na Tabela 3, e observando os dados apresentados na Tabela 2, podemos identificar as populações cujos padrões de diversidade genética são mais semelhantes ao esperado em cada um dos diversos cenários de introdução.

Tabela 3. Padrões esperados e observados de diversidade genética em populações introduzidas de *Aedes aegypti* nas Américas

Estimativa de diversidade	Introdução única		Múltiplas introduções		
	Recente	Antiga	Recentes	Recente/Antiga	Antigas
<b>H</b>	↓	↑	↓	↑	↑↑
<b>Hd</b>	↓↓	↓	↓	↑	↑↑
<b><math>\pi</math></b>	↓↓	↓	↑	↑↑	↑↑↑
População	Brasil Nordeste	Amazônia Central	Andes-Maracaibo	Brasil Sul-Sudeste	Norte-Mesoamérica*

**H**, número de haplótipos; **Hd**, diversidade haplotípica;  **$\pi$** , diversidade nucleotídica; \*Principalmente Yucatán e Costa Ocidental

Assim, os padrões de diversidade genética populacional sugerem que a região de Norte-Mesoamérica, com sinais de ter recebido introduções múltiplas e antigas, tenha sido a principal receptora de propágulos primários e a principal fonte de ondas secundárias de invasão. O Sul-Sudeste do Brasil poderia ter o mesmo papel para a região sul das Américas, e em particular para o Nordeste brasileiro (cujas populações parecem derivar de uma única introdução recente), mas há sinais de que também as populações da Amazônia Central são antigas. A região dos Andes-Maracaibo, na Venezuela, poderia ter recebido duas ou mais ondas recentes de invasão.

## 6.2. Padrões espaciais de ocorrência de diferentes haplótipos

As frequências de ocorrência de cada um dos 45 haplótipos identificados na base de dados americana são apresentadas na Tabela 2 do Apêndice. Estes dados foram utilizados para produzir as Figuras 1 e 2, que mostram as frequências relativas com que cada haplótipo foi detectado nas Américas e em cada uma das regiões investigadas.

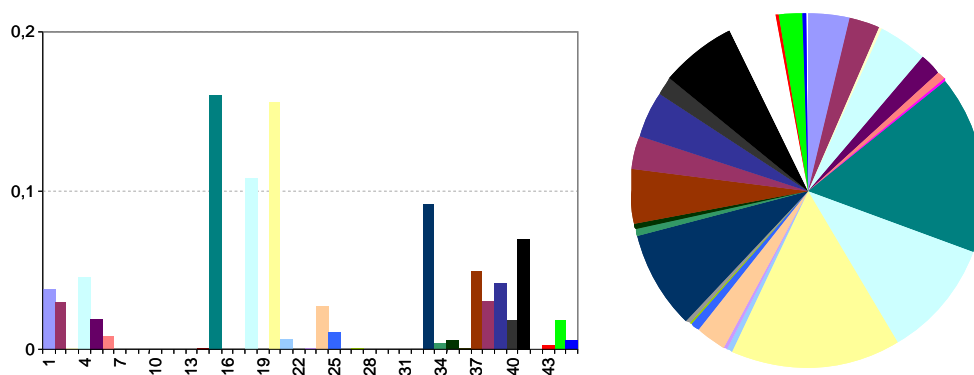


Figura 1. Frequência de ocorrência de 45 haplótipos mitocondriais do gene ND4 (eixo horizontal do gráfico de barras) em 3103 espécimes de *Aedes aegypti* das Américas

O padrão geral que mostra este gráfico se corresponde com a alta diversidade haplotípica ( $Hd = 0,912$ ) reportada na Tabela 2: as frequências de ocorrência de cada um dos numerosos haplótipos são relativamente homogêneas, sem uma clara dominância de 1 ou 2 haplótipos. Contudo, H15 (0,159), H20 (0,155), H18 (0,108) e, em menor medida, H33 e H41, são consideravelmente mais comuns que o resto. Em princípio, como visto acima, este é o perfil esperado num cenário de introduções múltiplas e antigas, sugerindo que pelo menos algumas das populações contemporâneas de *Ae. aegypti* das Américas podem ser descendentes das primeiras ondas de colonização do continente nos séculos XV-XVI. Tabachnick (1991) sugeriu que este fosse o caso das populações do Caribe; nossos dados indicam que esta persistência temporal poderia ter envolvido populações do todo o continente.

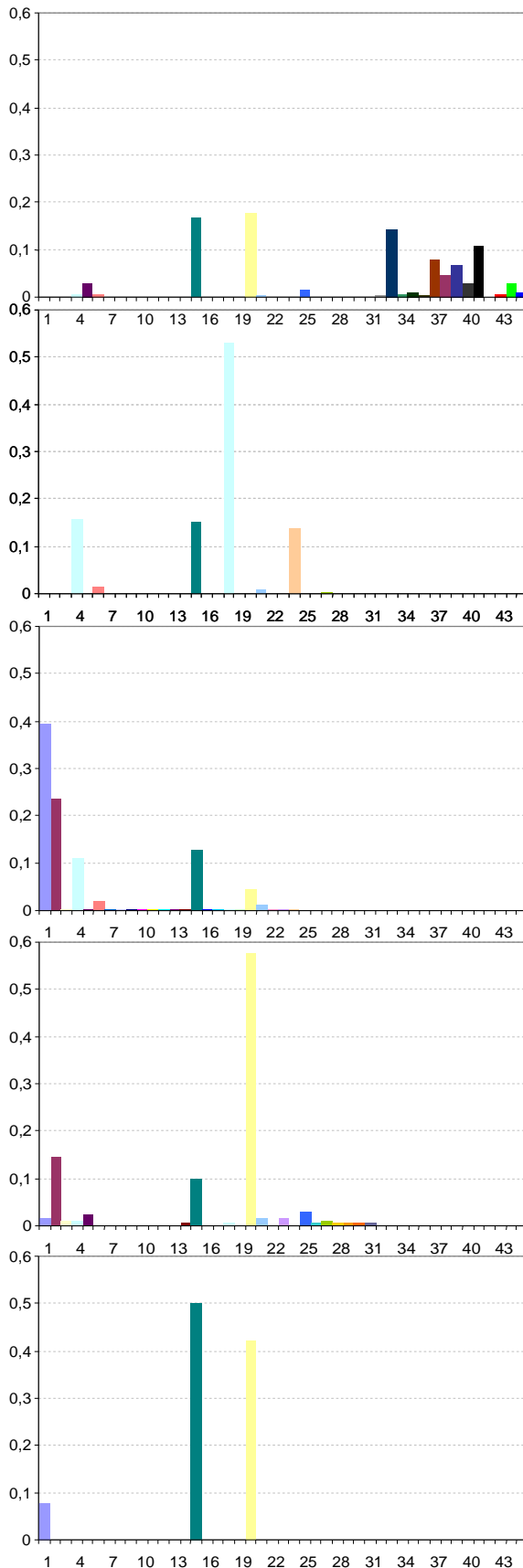


Figura 2. Frequência de ocorrência de 45 haplótipos mitocondriais do gene ND4 (eixo horizontal) de *Aedes aegypti* em cinco regiões geográficas das Américas. De cima para baixo: Norte-Mesoamérica, Venezuela, Amazônia, Brasil (não amazônico) e Peru Transandino. Os detalhes sobre as populações estudadas em cada uma destas regiões são apresentados na Tabela 1 do Apêndice. Os eixos verticais foram desenhados na mesma escala para facilitar as comparações

O haplótipo H15 é o único que aparece em todas as regiões estudadas, e é relativamente comum em Norte-Mesoamérica, onde nenhum haplótipo aparece com frequência superior a 18%. O fato de H15 ser dominante na população peruana pode ser efeito da pequena amostra disponível ( $N = 38$ ). Outros haplótipos amplamente compartilhados são H20 (ausente somente da Venezuela, fortemente dominante no Brasil não amazônico e dominante em Norte-Mesoamérica), H4 (ausente da amostra peruana, moderadamente freqüente na Amazônia e na Venezuela e raro em Norte-Mesoamérica), H18 (dominante na Venezuela e que aparece em baixa freqüência no resto das regiões, exceto o Peru). Os haplótipos mais comuns na Amazônia (H1 e H2) aparecem no Brasil e no Peru. H24, relativamente comum na Venezuela, aparece em baixa freqüência na Amazônia, e H6 foi isolado de alguns poucos espécimes de Norte-Mesoamérica, a Venezuela e da Amazônia.

Em geral, os padrões observados para os haplótipos mais freqüentes sugerem que Norte-Mesoamérica contenha as populações fonte de haplótipos como H15 e, talvez, H20; contudo, o fato deste último ser fortemente dominante no Brasil não amazônico poderia sugerir que esta região representa a fonte de propágulos. A dominância de um haplótipo e o baixo valor de  $H$  sugerem que a Venezuela foi invadida recentemente; o padrão é semelhante no Brasil, mas o número relativamente alto de haplótipos raros poderia indicar, como sugerido acima, duas introduções: a mais recente poderia estar, talvez, relacionada com H20, que teria virado dominante de forma secundária. Na Amazônia, a ausência de um haplótipo claramente dominante e o grande número de haplótipos raros sugerem uma invasão antiga.

A Figura 3 mostra as freqüências haplotípicas em cada uma das 12 populações geográficas estudadas.



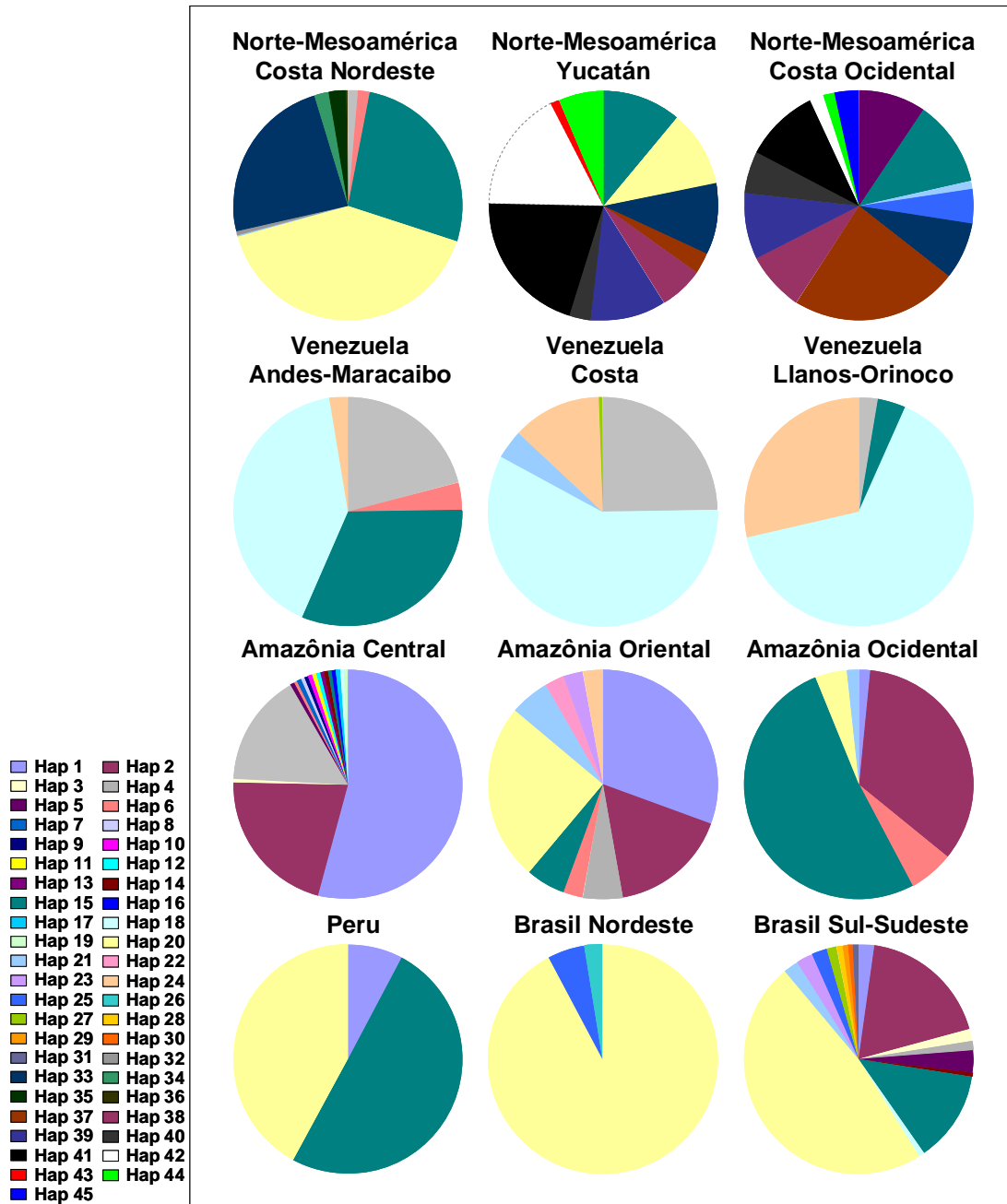


Figura 3. Frequência de ocorrência de 45 haplótipos mitocondriais do gene ND4 de *Aedes aegypti* em 12 populações geográficas das Américas

### **6.3. Genealogia e filogenia do gene mitocondrial ND4 em populações americanas de *Aedes aegypti***

As relações genealógicas entre os 73 haplótipos únicos identificados na base de dados de seqüências americanas, africanas e asiáticas de *Ae. aegypti* foram investigadas mediante a construção de uma rede de haplótipos por parcimônia estatística (Figura 4).

A rede de haplótipos mostra a existência de dois grupos principais, que denominaremos Clado I e Clado II no restante do trabalho. Estes clados correspondem, sem dúvida, aos reportados por diversos autores tanto nas Américas quanto na Ásia (Bosio et al. 2005; Bracco et al., 2007; Paduan & Ribolla, 2008; Scarpassa et al., 2008). Contudo, a amostragem mais densa utilizada no presente trabalho resultou na detecção de alguns haplótipos (H9, H26) que ocupam posições intermediárias na rede; isto pode ser interpretado como evidência contra a idéia, sugerida por Bracco et al. (2007), de que cada um dos clados represente uma unidade taxonômica (uma subespécie) independente. Os resultados das análises filogenéticas (Figura 5) indicam, da mesma forma, que as distâncias genéticas entre os haplótipos de ambos os clados são, em geral, baixas, sugerindo que as amostras pertencem a um único filogrupo (ver também Gorrochotegui-Escalante et al., 2002). A distribuição de haplótipos isolados de espécimes americanos nos dois clados principais é claramente sugestiva de múltiplas introduções. A presença de haplótipos isolados na África em cada um dos clados, em conjunto com as evidências, apresentadas acima, que sugerem que as populações americanas são antigas, pode ser interpretado como uma indicação da origem africana destas populações; contudo, esta questão só poderá ser adequadamente tratada quando uma amostragem abrangente de populações africanas esteja disponível.

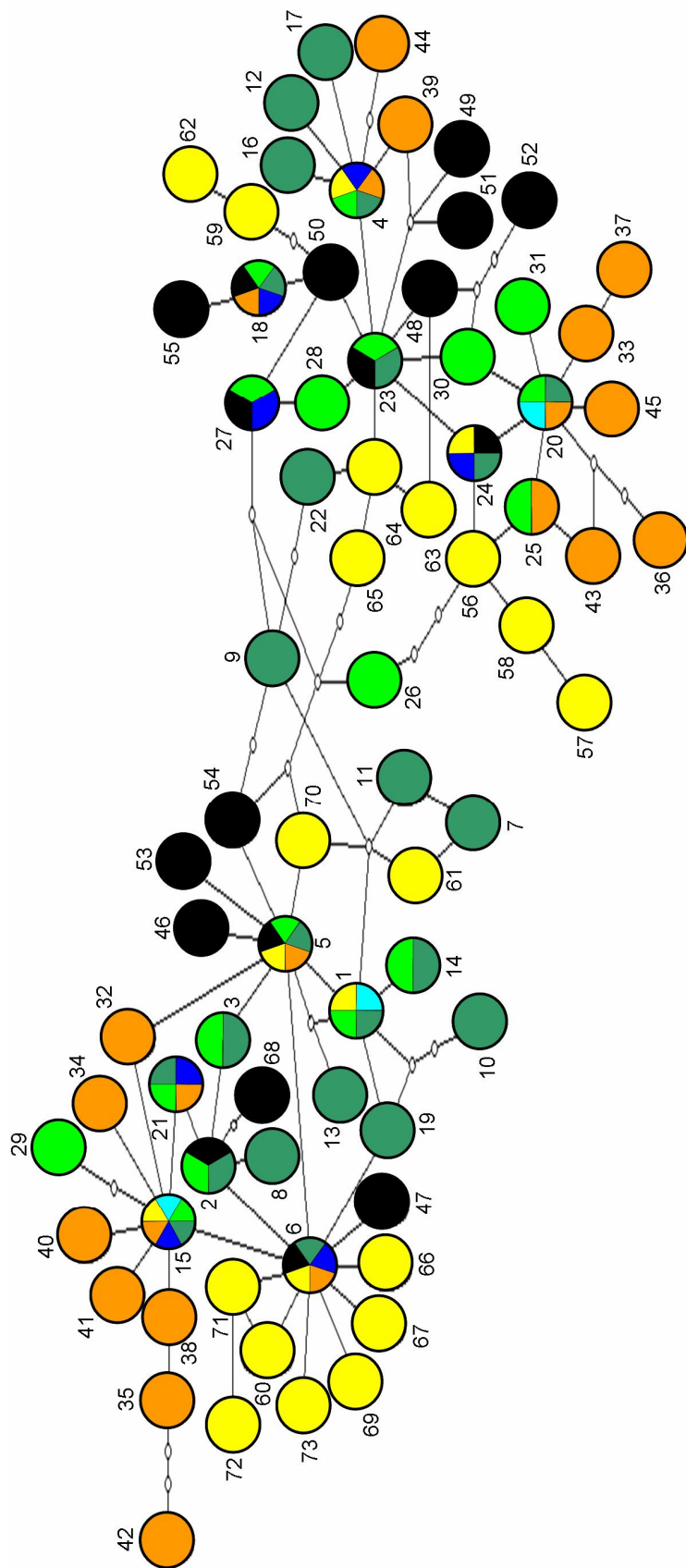


Figura 4. Relações genealógicas entre 73 haplótipos do gene mitocondrial ND4 de *Aedes aegypti* isolados de espécimes das Américas, África e da Ásia: rede de parcimônia estatística. As elipses brancas representam haplótipos não amostrados ou extintos. O código de cores indica a origem geográfica dos indivíduos portadores de cada haplótipo (laranja, Norte-Mesoamérica; azul intenso, Venezuela; verde-escuro, Amazônia; verde-claro, Brasil (não amazônico); azul-claro, Peru; preto, África; amarelo, Ásia)

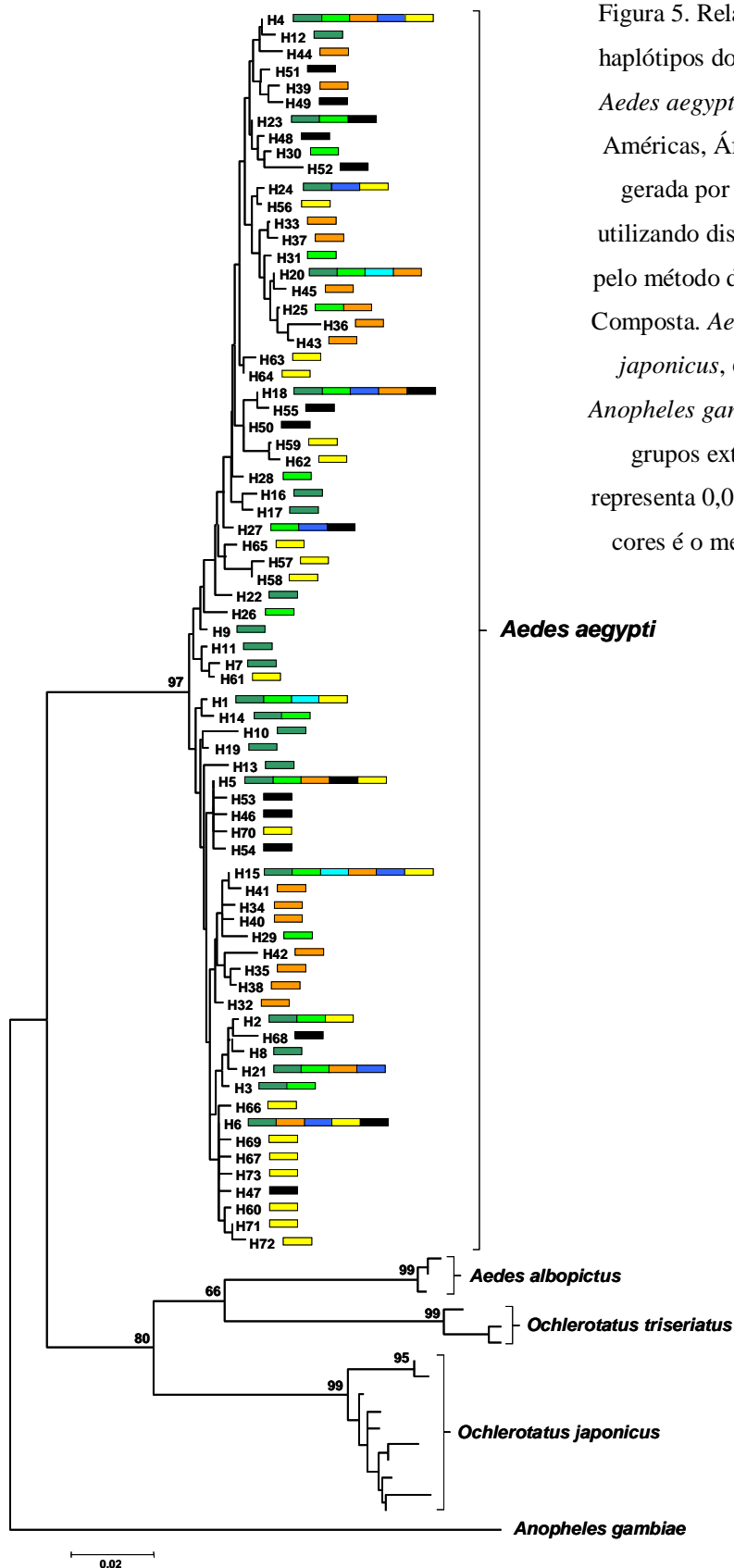


Figura 5. Relações filogenéticas entre 73 haplótipos do gene mitocondrial ND4 de *Aedes aegypti* isolados de espécimes das Américas, África e da Ásia; a árvore foi gerada por agrupamento de vizinhos utilizando distâncias genéticas estimadas pelo método de Máxima Verossimilhança Composta. *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus japonicus*, *Ochlerotatus triseriatus* e *Anopheles gambiae* foram utilizados como grupos externos. A barra da escala representa 0,02 substituições. O código de cores é o mesmo utilizado na Figura 5

Os resultados das análises genealógicas foram interpretados como uma indicação forte de múltiplas introduções de *Ae. aegypti* nas Américas. Com o propósito de concentrar nossa atenção na compreensão destas dinâmicas de invasão e colonização do continente, realizamos análises análogas às apresentadas até o momento em bases de dados separadas contendo as seqüências de representantes de cada um dos clados principais (Figura 6). Estas análises são apresentadas, no contexto da discussão integrada dos resultados obtidos no conjunto do trabalho, na Seção 7.1.

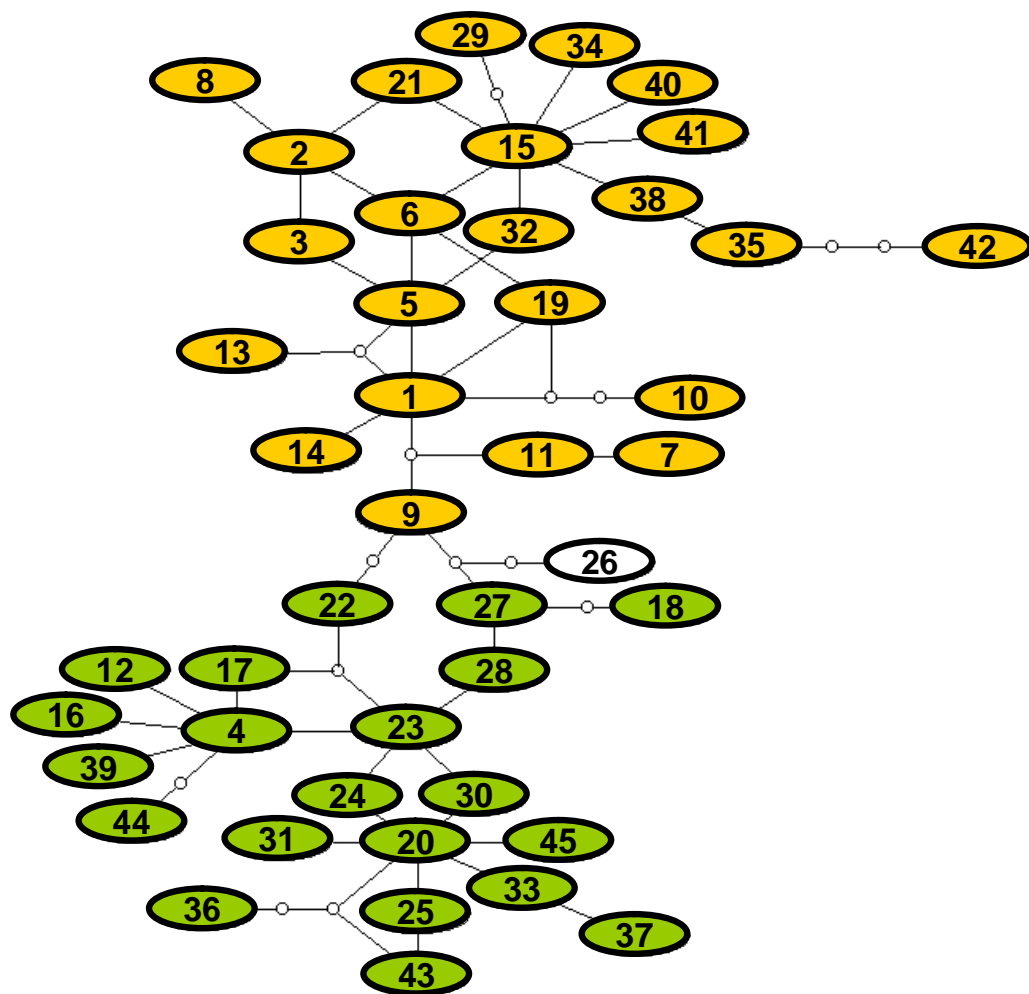


Figura 6. Relações genealógicas entre 45 haplótipos do gene mitocondrial ND4 de *Aedes aegypti* isolados de espécimes das Américas: rede de parcimônia estatística. Os círculos brancos representam haplótipos não amostrados ou extintos. O código de cores indica a presença de dois clados principais (laranja, Clado II e verde, Clado I). A numeração dos haplótipos corresponde a apresentada nas Figuras 4 e 5

#### 6.4. Estruturação genética das populações americanas de *Aedes aegypti*

As análises hierárquicas de variância molecular mostraram sinais claros de forte estruturação genética das populações geográficas de *Ae. aegypti* investigadas (Tabelas 4 e 5). Uma grande fração (~75%) da variação observada correspondeu à variabilidade intra-populacional, ~11% correspondeu à variabilidade inter-populacional e 14% à inter-regional. Os valores altos (e altamente significativos) de todos os índices de fixação sugerem uma marcada estruturação genética nos diferentes níveis de análise. Os resultados foram praticamente idênticos quando a população do Peru Transandino (com  $N = 38$ ) foi excluída das análises.

Tabela 4. Análise hierárquica de variância molecular em 12 populações americanas de *Aedes aegypti* agrupadas em cinco regiões geográficas

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre regiões	4	156,843	0,07080 (Va)	14,24
Entre populações dentro de cada região	7	105,697	0,05362 (Vb)	10,78
Entre indivíduos dentro de cada população	3091	1152,376	0,37282 (Vc)	74,98
<b>Total</b>	<b>3102</b>	<b>1414,916</b>	<b>0,49723 (Vt)</b>	<b>100</b>

Tabela 5. Análise hierárquica de variância molecular em 12 populações americanas de *Aedes aegypti* agrupadas em cinco regiões geográficas: índices de fixação

Índice de fixação	P*
Fct = 0,14238	0,0004
Fsc = 0,12573	<0,0001
Fst = 0,25021	<0,0001

Fct, fração da variação entre regiões em relação ao total (Va/Vt)

Fsc, fração da variação entre populações em relação às regiões (Vb/Vb+Vc)

Fst, fração da variação entre populações em relação ao total (Va+Vb/Vt)

\*Valores calculados com 10,100 permutações

Os valores de *Fst* estimados entre cada par de populações são apresentados no Apêndice, junto com os valores correspondentes das distâncias genéticas de Slatkin e as estimativas do número de migrantes por geração (*Nm*) que intercambia cada par de populações.

Todos os valores de  $F_{st}$  foram altos e altamente significativos; os valores de  $P$  (calculados usando 10.000 permutações) sempre foram  $<0,001$ . Este padrão de indicações consistentes de forte estruturação genética e escasso fluxo gênico entre populações, comumente reportado em estudos sobre *Ae. aegypti* (e.g., Bosio et al., 2005 e Herrera et al., 2006, cujas seqüências não foram incluídas nas nossas análises), é provavelmente o resultado da ação combinada da dinâmica de dispersão passiva do vetor e dos eventos aleatórios de extinção local de linhagens raras associados às ações de controle. As estimativas de  $Nm$  mostram, como esperado, valores muito baixos; contudo, alguns pares de populações poderiam estar intercambiando entre 5 e 8 migrantes por geração.

O dendrograma UPGMA derivado da matriz de distâncias genéticas mostra graficamente estes padrões; podemos observar (i) uma situação de forte isolamento das populações do Nordeste brasileiro, (ii) o agrupamento das populações venezuelanas, (iii) uma situação intermediária das populações do centro e oeste da Amazônia e (iv) o agrupamento das populações Norte-Mesoamericanas, em especial as da Costa Nordeste, com as do Sul-Sudeste brasileiro e a Amazônia Oriental, que aparecem no mesmo clado terminal. Estes resultados sugerem uma conexão relativamente forte entre duas populações muito distantes (Brasil Sul-Sudeste e Norte-Mesoamérica), o que poderia ser resultado da conectividade marítima entre grandes cidades portuárias. A posição da população da Amazônia Oriental sugere, por outra parte, uma maior conectividade com o Sul-Sudeste do que com outras sub-regiões amazônicas. O isolamento aparente do Nordeste poderia ser um efeito da menor amostragem disponível, ou poderia sugerir uma composição genética muito diferente da do resto do continente; de fato, os perfis de diversidade e relacionamento dos haplótipos isolados no Nordeste sugerem que estas populações derivam de um único evento recente de introdução.

## 6.5. Demografia histórica das populações americanas de *Aedes aegypti*

### 6.5.1. Base de dados combinada ( $N = 3103$ )

O gráfico de distribuição de frequências das diferenças par-a-par entre seqüências (*mismatch distribution*) é multimodal para o conjunto de 3103 seqüências. Contudo, os valores observados são muito diferentes dos esperados sob o pressuposto de tamanho constante da população (Figura 7). O valor do estatístico  $r$ , que mede a irregularidade da distribuição de frequências, foi mais baixo do esperado em uma população em equilíbrio ( $r = 0,023$ ;  $P = 0,286$ ), sugerindo indícios de expansão. A Figura 7 compara as frequências observadas e as esperadas em uma população em expansão, mostrando também falta de ajuste. O excesso observado de diferenças par-a-par em valores moderados (10-12) resulta do fato de que a base de dados inclui representantes dos dois clados principais (ver Figura 6), compostos por números semelhantes de indivíduos (1747 e 1356, respectivamente). Como mostram Slatkin e Hudson (1991), este padrão de subdivisão aproximadamente simétrica de linhagens na genealogia origina um “pico” na zona de divergência moderada na distribuição de *mismatches*. Os valores observados de  $F_s$  (-1,429),  $D^*$  (-0,351) e  $F^*$  (0,877) não foram significativamente diferentes do esperado em uma população em equilíbrio ( $P = 0,37$ ; 0,34; e 0,84, respectivamente).

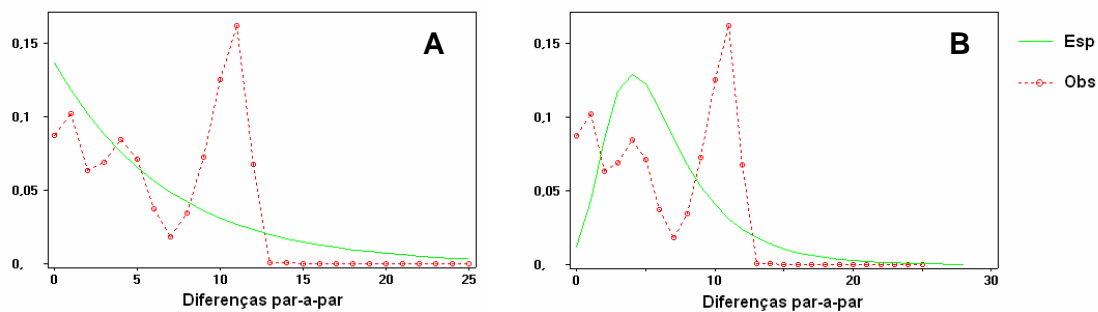


Figura 7. Distribuição de frequências das diferenças par-a-par entre seqüências do gene mitocondrial ND4 de populações americanas de *Aedes aegypti*. **Obs**, valores observados; **Esp**, valores esperados para populações em equilíbrio (A) e em expansão (B)



A consideração conjunta dos valores de  $F_s$ ,  $D^*$ ,  $F^*$  e  $r$  e da distribuição de *mismatch* não permite, portanto, concluir de forma definitiva se o conjunto das populações americanas de *Ae. aegypti* sofreu uma expansão recente – como se espera de uma espécie introduzida em tempos históricos no continente – ou se encontra em equilíbrio. Contudo, o baixo valor de  $r$ , o valor negativo de  $F_s$  e a análise qualitativa dos gráficos de distribuição de *mismatches* sugerem indícios débeis de não-equilíbrio.

Estes resultados aparentemente conflitantes poderiam ser explicados pela presença de mais de uma população, cada uma das quais poderia estar em expansão, na nossa base de dados combinada. Esta possibilidade foi explorada mediante a análise separada das seqüências que conformam cada um dos clados principais definidos pelo padrão de relacionamento genealógico entre haplótipos (Figura 6). O haplótipo H26, cuja posição na rede de haplótipos é intermediária entre os Clados I e II, foi excluído.

### 6.5.2. Clados I ( $N = 1743$ ) e II ( $N = 1359$ )

A Figura 8 mostra os resultados da análise de *mismatch distribution* no grupo de seqüências que compõem o Clado I, e a Figura 9 os relativos ao Clado II. Os resultados dos testes  $F_s$ ,  $D^*$ ,  $F^*$  e  $r$  são apresentados na Tabela 6.

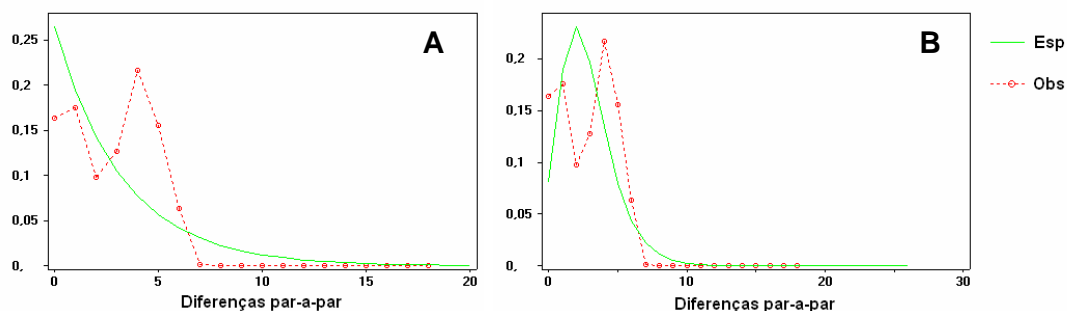


Figura 8. Distribuição de freqüências das diferenças par-a-par entre seqüências do gene mitocondrial ND4 de populações americanas de *Aedes aegypti* do Clado I. **Obs**, valores observados; **Esp**, valores esperados para populações em equilíbrio (**A**) e em expansão (**B**)

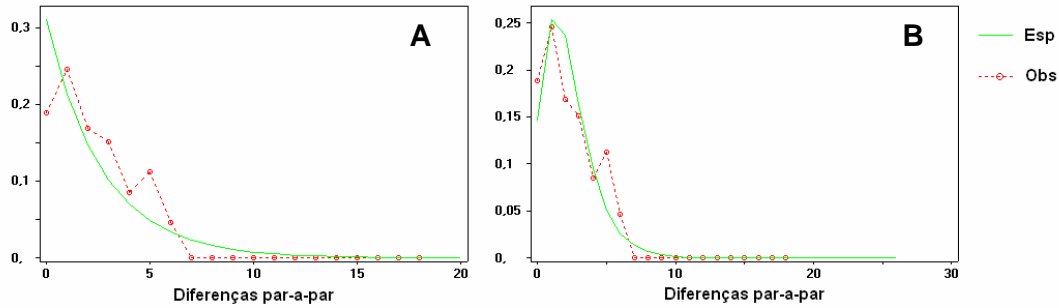


Figura 9. Distribuição de freqüências das diferenças par-a-par entre seqüências do gene mitocondrial ND4 de populações americanas de *Aedes aegypti* do Clado II. **Obs**, valores observados; **Esp**, valores esperados para populações em equilíbrio (**A**) e em expansão (**B**)

Tabela 6. Testes de equilíbrio demográfico em populações de *Aedes aegypti* das Américas

Teste	Clado I		Clado II	
	Valor	P	Valor	P
<i>F<sub>s</sub></i>	-0,89	0,27	-3,994	0,182
<i>D</i> *	0,165	0,573	-1,677	0,078
<i>F</i> *	0,392	0,657	-1,308	0,11
<i>r</i>	0,031	0,51	0,021	0,851

Os resultados destas análises sugerem que as populações americanas de *Ae. aegypti* com haplótipos pertencentes aos Clados I e II (como definidos neste trabalho) não se encontram em equilíbrio. Os valores de *r* e (em menor medida) de *F<sub>s</sub>*, assim como a distribuição de freqüências de *mismatches* e as evidências qualitativas derivadas das análises genealógicas (ver Seção 6.1.3.) sugerem que esta falta de equilíbrio reflita uma expansão populacional relativamente recente. Estas evidências são claramente mais fortes para o Clado II; a distribuição de *mismatches* do Clado I sugere, como visto acima, sinais de estruturação genealógica entre as seqüências, e o valor de *r* é, conseqüentemente, maior. Os testes *D*\* e *F*\*, menos sensíveis às mudanças demográficas (Fu, 1997), não foram significativos, o que pode ser interpretado como uma indicação de que o gene estudado não se encontra sob os efeitos da seleção natural.

A relação entre os valores estimados de  $\tau$  (a data desde um hipotético evento de crescimento populacional súbito, medida em unidades de tempo mutacional), a taxa de mutação por sítio por geração ( $\mu$  [e a taxa de mutação por seqüência por geração; no nosso caso,  $\mu' = \mu \times 322$ ]) e o tempo transcorrido (em gerações) desde um hipotético evento de crescimento populacional súbito ( $t$ ) é definida pela equação  $t = \tau / 2\mu'$ . Os valores estimados de  $\tau$  foram 1,852 (Clado I) e 1,23004 (Clado II) (usando o método implementado pelo programa DNAsp 4.5). A taxa de mutação por sítio por geração foi tomada do valor estimado diretamente para o DNA mitocondrial de *Drosophila melanogaster* ( $6,2 \times 10^{-8}$ ; ver Haag-Liautard et al., 2008), e o número de gerações por ano fixado em 24. Os resultados (~1930 anos para o Clado I e ~1280 anos para o Clado II) são, em princípio, incompatíveis com a presença, em cada um dos clados, de uma única população americana em expansão. Utilizando um valor extremo de 48 gerações/ano, os valores de  $t$  são de ~970 (Clado I) e ~640 anos (Clado II). Estes resultados dependem, em qualquer caso, da aceitação de alguns pressupostos que não podem ser testados com nossos dados (p.ex., sobre a aplicabilidade da taxa de mutação utilizada); contudo, a avaliação conjunta das evidências apresentadas sugere que a presença de duas populações no Clado I seja a causa dos altos valores de  $t$  estimados para este grupo de seqüências.

## 7. Discussão geral e conclusões

### 7.1. Dinâmicas de invasão das Américas por *Aedes aegypti*

Apresentamos, para finalizar, uma consideração conjunta dos resultados obtidos durante o desenvolvimento deste projeto. Fazemos ênfase na estruturação de uma proposta coerente capaz de dar conta do processo de invasão e colonização do continente por cada um dos clados principais identificados nas genealogias do gene ND4 de *Ae. aegypti*. Finalmente, apresentamos, de forma tentativa, uma explicação das correspondências entre este processo e os perfis epidemiológicos da dengue no Brasil.

#### 7.1.1. Dinâmica de invasão por representantes do Clado I

A sub-rede de haplótipos correspondente ao Clado I tem uma aparência geral mais coesa (i.e., menos dispersa) do que a do Clado II (Figura 6); menos de 30% das conexões envolvem mais de um passo mutacional. A inspeção da topologia desta sub-rede sugere, contudo, a presença de uma aglomeração em forma de estrela com o haplótipo H20 em posição central; uma parte do resto de haplótipos aparece relacionada de forma semelhante com H4. A baixa diversidade nucleotídica ( $\pi = 0,0087$ ) e a alta diversidade haplotípica ( $Hd = 0,837$ ) são compatíveis com a existência de duas populações estreitamente relacionadas. Em conjunto com os resultados das análises de distribuição de frequências das diferenças par-a-par entre seqüências, estas observações sugerem, sem ser conclusivas, que o Clado I poderia conter populações derivadas de duas introduções e, ao mesmo tempo, que cada uma destas introduções poderia ser mais recente do que as envolvidas na origem do Clado II (ver abaixo).

Dois dos haplótipos centrais (H4 e H23) da sub-rede que define o Clado I também foram isolados de espécimes coletados no Quênia (H23) e na Tailândia (H4); H24 também ocorre na África (Senegal) e na Ásia (Tailândia), H27 no Quênia e H18 no Senegal. Mais seis haplótipos relacionados foram detectados em populações africanas

(Quênia e Camarões), e oito na Ásia (Tailândia e Myanmar). O fato de haver quatro haplótipos compartilhados entre representantes do Clado I e populações africanas permite supor que a introdução se produziu diretamente desde a África, sem necessidade de postular um caminho mais complexo através da Ásia.

A diversificação local aparente na região norte-mesoamericana (com sete haplótipos únicos), a presença de um haplótipo africano (H18) na mesma região e o padrão de ocorrência dos haplótipos do sub-clado relacionado com H20 sugerem que o processo de colonização começou na região de Norte-Mesoamérica, com introdução secundária de diversos representantes deste Clado (H20, H25, H18 e H4) no Sul-Sudeste do Brasil (Figura 11). O fato de que três haplótipos que aparecem (em baixa frequência) nas populações da região Sul-Sudeste do Brasil (H23, H24 e H27) são compartilhados com populações africanas, mas não aparecem nas amostras mesoamericanas, sugere duas possibilidades alternativas: (a) introduções paralelas diretas desde a África para o Sul-Sudeste e (b) eventos de extinção local em Norte-Mesoamérica; contudo, se estes haplótipos estivessem de fato presentes, em muito baixa frequência, em Norte-Mesoamérica, poderiam simplesmente não ter sido amostrados.

Uma vez estabelecidas no Sul-Sudeste, estas populações se expandiram para o Nordeste (onde só foi detectada a presença de haplótipos do Clado I) e a Amazônia, desde onde H20 alcançou a região trans-andina do Peru. Na Amazônia Oriental aparece H24 (aparentemente uma variante de H20), que alcança frequências altas na sub-região dos Llanos do Orinoco na Venezuela, mas sem sinais de diversificação local.

Os sinais de diversificação local na região Norte-Mesoamericana e na Amazônia sugerem que estas áreas foram colonizadas rapidamente após a introdução inicial. A falta destes sinais na Venezuela, onde H4, H15, H18 e H24 são dominantes, sugere uma invasão recente (e bem-sucedida) da região por representantes desta sub-linhagem. Esta

interpretação é compatível com a idéia de que a colonização envolveu dispersão desde a Amazônia, mas não exclui a possibilidade de eventos independentes de introdução direta (seja desde Mesoamérica ou desde a América do Sul) em tempos recentes.

Estes padrões permitem sugerir que H20 representa o genótipo com mais capacidade invasiva dentro do Clado I; ele colonizou o Sul-Sudeste e o Nordeste do Brasil, a Amazônia Oriental e o Peru Transandino (chegando provavelmente desde a Amazônia Ocidental) com grande sucesso.

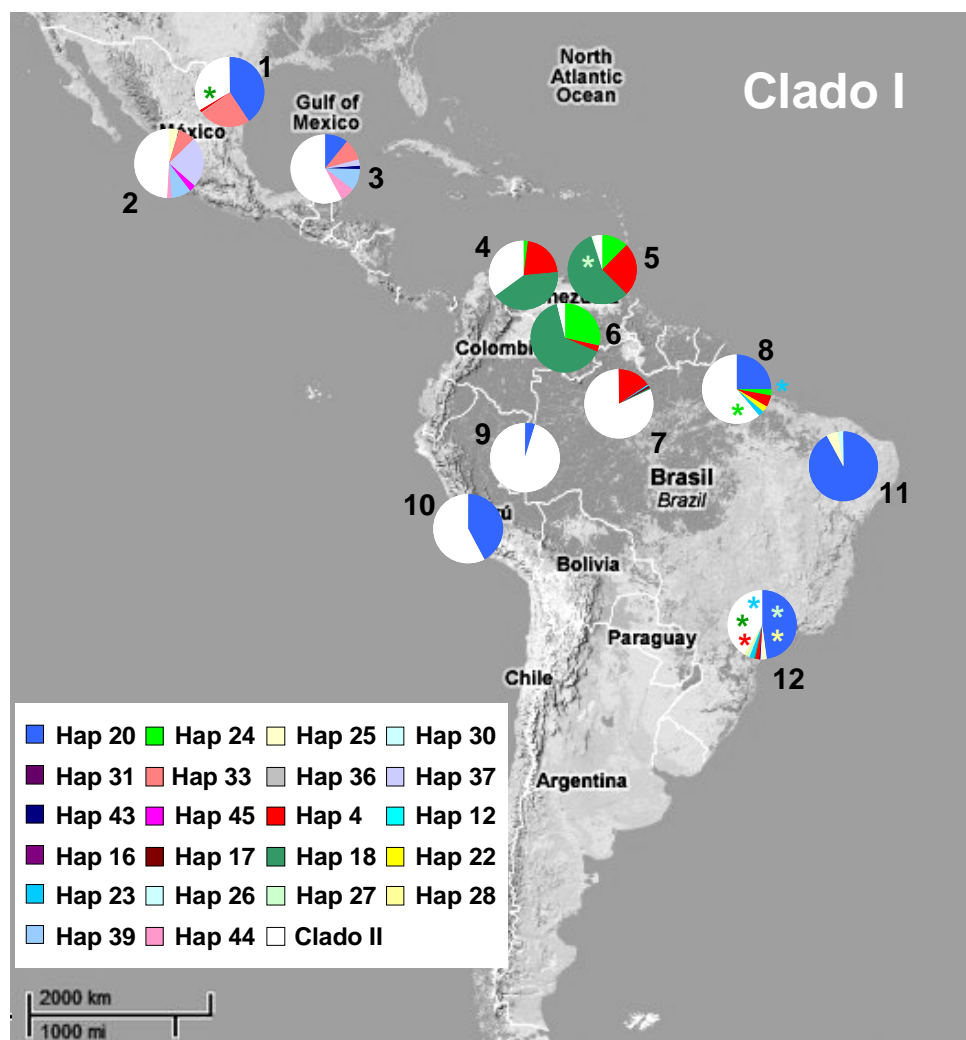


Figura 10. Frequência de ocorrência dos haplótipos do gene ND4 do Clado I em cada uma das 12 populações geográficas comparadas durante este trabalho. Os asteriscos indicam a ocorrência em baixa frequência de haplótipos compartilhados por mais de uma população. A numeração dos haplótipos corresponde a apresentada na Figura 11 (a seguir). (1, Norte-Mesoamérica Costa Nordeste; 2, Norte-Mesoamérica Costa Ocidental; 3, Norte-Mesoamérica Yucatán; 4, Venezuela Andes-Maracaibo; 5, Venezuela Costa; 6, Venezuela Llanos-Orinoco; 7, Amazônia Central; 8, Amazônia Oriental; 9, Amazônia Ocidental; 10, Peru Transandino; 11, Brasil Nordeste; 12, Brasil Sul-Sudeste)

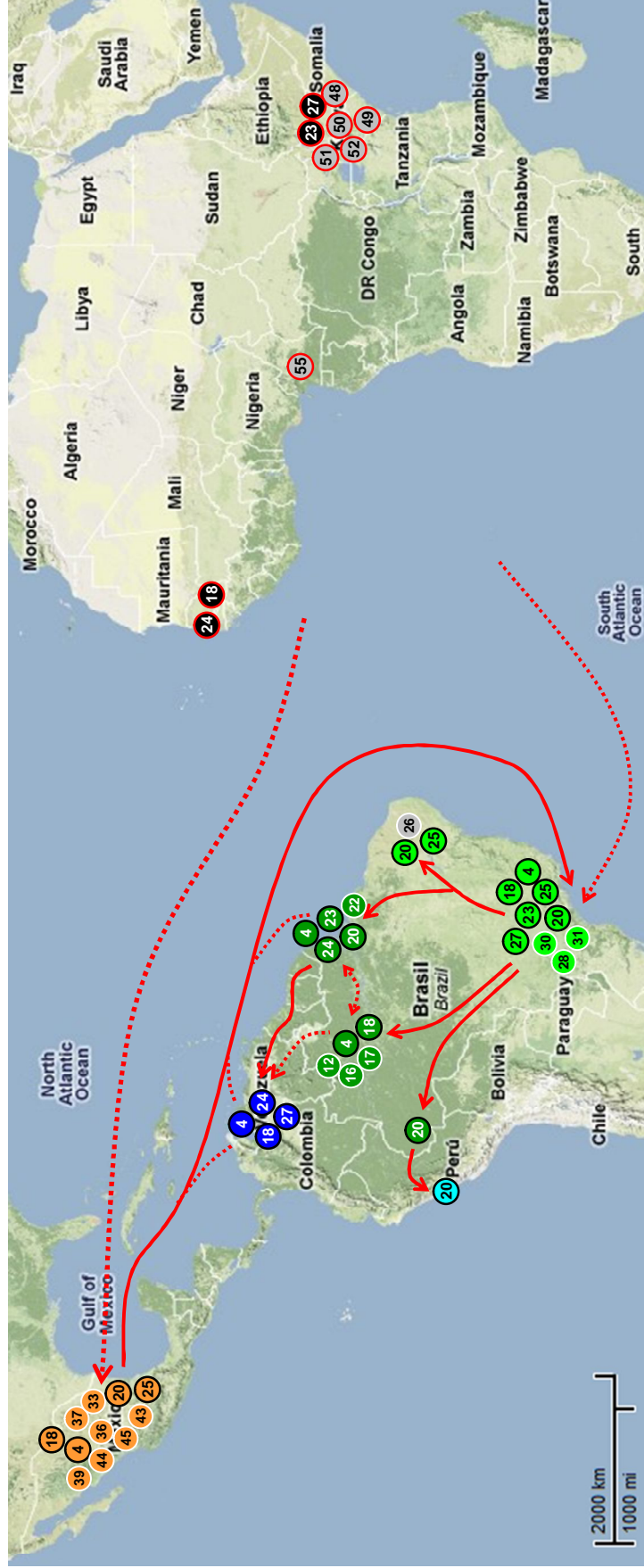


Figura 11. Dinâmicas de invasão do continente americano por representantes do Clado I de *Aedes aegypti*. Os círculos representam haplótipos individuais; o código de cores indica as cinco regiões consideradas (ver Figura 1 do Apêndice e Figura 10 acima). Os círculos com borda preta foram isolados de mais de uma população, enquanto os círculos com borda branca foram isolados de espécimes coletados em apenas uma população. As setas representam as prováveis rotas de introdução e dispersão; as setas pontilhadas desde a África representam, respectivamente, (i) a rota mais provável de introdução (parte superior do mapa) e (ii) a possibilidade de introduções independentes de haplótipos africanos no Sul-Sudeste do Brasil (parte inferior do mapa). A possibilidade de introduções diretas em cidades portuárias da Venezuela e a Amazônia é sugerida pelas linhas pontilhadas conectadas com a seta que indica a principal rota de introdução desde Norte-Mesoamérica para o Sul-Sudeste do Brasil. Os padrões de dispersão fluvial e terrestre entre as populações da Amazônia Oriental, da Amazônia Central e da Venezuela são representados por uma seta contínua (indicando evidências fortes de dispersão) e por setas pontilhadas (indicando possível intercâmbio de migrantes). Os locais de ocorrência de haplótipos compartilhados (círculos pretos) e não compartilhados (círculos cinza) com populações americanas também são indicados; todos estes haplótipos aparecem como estreitamente relacionados nas análises genealógicas

### 7.1.2. Dinâmica de invasão por representantes do Clado II

Os haplótipos H5, H6 e H15 (e H1, em menor medida) foram isolados de espécimes coletados em várias regiões do mundo. Estes genótipos se diversificaram em lugares tão distantes como a Ásia (sobretudo H6), a América do Norte (sobretudo H15) e a Amazônia Central (H5-H1), sugerindo um processo antigo de migração e expansão desde as populações originárias na África.

Este padrão de ampla dispersão mundial implica que devemos ter cautela ao postular que as populações americanas deste Clado foram introduzidas diretamente desde a África; contudo, pensamos que esta continua sendo a explicação mais parcimoniosa. Em primeiro lugar, dois dos três haplótipos que ocupam posições “centrais” nas redes (H5 e H6) foram isolados também de espécimes africanos coletados em Camarões, Guiné, Uganda e Quênia (Figuras 4, e 5). Na Ásia, H6 ocupa a posição central de uma sub-rede em forma de estrela formada por haplótipos muito semelhantes, sugerindo uma introdução relativamente recente seguida de uma expansão populacional no Sudeste Asiático. Por último, na rede de haplótipos isolados de espécimes americanos (Figura 6), H6 apresenta relações mais complexas; sua grande semelhança com H5, um haplótipo provavelmente envolvido em eventos mais antigos de diversificação na Amazônia central (ver abaixo) sugere que este sub-clado foi introduzido nas Américas antes de alcançar o Sudeste Asiático.

A baixa diversidade nucleotídica ( $\pi = 0,0069$ ) e as relações entre os haplótipos (sem subdivisões aparentes na rede de parcimônia) sugerem a possibilidade de que este Clado esteja composto por haplótipos derivados de um único evento de introdução. A alta diversidade haplotípica ( $Hd = 0,811$ ) e a existência de dois centros discretos de diversificação (Norte-Mesoamérica e Amazônia Central; Figura 13) sugerem, por outra



parte, que o processo de colonização do continente por representantes deste Clado foi complexo e relativamente antigo.

A análise conjunta dos padrões geográficos de ocorrência dos diferentes haplótipos e de suas relações genealógicas identificou duas áreas nas quais os haplótipos centrais da rede coexistem com múltiplos haplótipos raros e recentemente derivados. Estas características são as esperadas nos locais de chegada dos propágulos iniciais de uma espécie invasora: é nestes locais onde a expansão populacional pós-estabelecimento é mais antiga, o que aumenta as probabilidades de que haplótipos novos apareçam.

A costa do Golfo do México, que corresponde à região de Norte-Mesoamérica, tem sido identificada como uma área particularmente suscetível de receber espécies invasoras (Drake & Lodge, 2004; Tatem et al., 2006). A Amazônia Central, pelo contrário, não está conectada por rotas tão intensas de tráfego marítimo ou aéreo de longa distância. Podemos concluir, portanto, que a invasão das Américas por *Ae. aegypti* do Clado II se iniciou na América do Norte (provavelmente na costa oriental do México) desde a África (provavelmente a África Ocidental). Os haplótipos que ocupam posições centrais na rede (H6, H5 e H15) são provavelmente os representantes desta população inicial.

Estas populações originais se diversificaram localmente em Norte-Mesoamérica; sete haplótipos derivados, estreitamente relacionados com H15, foram isolados exclusivamente de espécimes coletados nesta região. Contudo, alguns representantes desta população local começaram a se expandir em direção sul; os dados permitem supor que a expansão se deu, embora seguindo as mesmas rotas, em dois tempos diferentes.

### 7.1.2.1. Primeira onda de expansão

Propomos que os haplótipos H5 e H6 foram os primeiros deste Clado a alcançar a Venezuela; H6 foi isolado, em baixa frequência, de espécimes coletados na sub-região dos Andes-Maracaibo, enquanto H5 não está presente na base de dados venezuelana analisada. Se postularmos que a invasão desta região por este primeiro propágulo foi antiga (anterior a 1940-45), tanto a raridade de H6 quanto a ausência de H5 podem ser explicados pelos efeitos das ações intensivas de controle dos anos 1940-70. Em favor desta interpretação está o fato de que ambos os haplótipos reaparecem nas populações amazônicas (sempre em frequências muito baixas), que foram provavelmente originadas a partir de populações chegadas desde a Venezuela.

A invasão da Amazônia por esta sub-linhagem provavelmente seguiu as rotas de transporte terrestre que ligam a Venezuela com o estado de Roraima. A rodovia BR-174 é a única via de comunicação terrestre entre Roraima e o resto do Brasil; embora o projeto de construção desta estrada tenha sido iniciado em 1893, a comunicação somente foi estabelecida em 1977. Podemos supor que, durante o tempo transcorrido entre a invasão das cidades do estado de Roraima (sobretudo Boa Vista e talvez também Pacaraima) e a abertura efetiva da estrada, as populações locais de *Ae. aegypti* ficaram isoladas das do resto do Brasil. Isto, ademais, teria detido a expansão desta sub-linhagem em direção sul, que só pôde continuar quando a abertura da estrada permitiu o transporte terrestre intenso.

Nossos dados mostram que um haplótipo derivado de H5 (H1) é dominante nas populações atuais de *Ae. aegypti* da Amazônia Central (Figura 12). H1 está relacionado com uma série de seis haplótipos restritos a esta sub-região e isolados de espécimes únicos: H9, H10, H11 e H13 do estado de Roraima, e H7 e H19 do estado do Amazonas. A maioria das conexões entre estes haplótipos na rede estimada por

parcimônia estatística (Figura 6) envolve mais de um passo mutacional. Este padrão é semelhante ao esperado quando um propágulo coloniza com êxito uma determinada região, se expande e finalmente se diversifica durante um período de tempo relativamente prolongado. A aparição de outros haplótipos derivados (H2-H8, H3) nesta mesma sub-região reforça esta interpretação.

Em conjunto, o padrão observado é compatível com a idéia de que a colonização da Amazônia Central (em particular o extremo norte) por esta sub-linhagem é antiga (i.e., transcorreu o tempo suficiente para gerar 10 haplótipos derivados) e geograficamente muito restrita (i.e., a maioria destes haplótipos derivados é exclusiva de espécimes locais, sobretudo de Roraima). Isto sugere a possibilidade de que os componentes do sub-grupo H5-H6-H1 (mais os haplótipos localmente derivados deles) tenham permanecido isolados em Roraima durante um longo período de tempo; uma vez aberta a estrada, estas populações teriam se expandido ao longo das rotas comerciais que ligam Manaus com a Amazônia Oriental e Ocidental e com o Sul-Sudeste brasileiro. Esta expansão secundária recente seria a responsável do fato de que alguns haplótipos deste sub-grupo (H1, H2, H6) ocorram em outras sub-regiões, mas sem os sinais de diversificação local detectados na Amazônia Central, e em particular Roraima. Os haplótipos H6 e H2 foram isolados de espécimes coletados nas três sub-regiões amazônicas, e H2 apareceu também em 18,7% dos espécimes no Sul-Sudeste brasileiro. O padrão de distribuição de H2 sugere que este haplótipo se expandiu recentemente, e de forma bem sucedida, desde a Amazônia Central, e que representa, portanto, um genótipo altamente invasivo.

Esta interpretação dos padrões de composição genética das populações de *Ae. aegypti* do extremo norte do Brasil difere da proposta anteriormente por diversos

autores, que postula que elas representam populações residuais sobreviventes dos esforços de erradicação de *Ae. aegypti* (e.g., Mousson et al., 2005; Bracco et al., 2007).

#### **7.1.2.2. Segunda onda de expansão**

O haplótipo H15 parece bem estabelecido na região de Norte-Mesoamérica; ele aparece em frequências relativamente altas (17% dos espécimes da região), e originou uma série de haplótipos geograficamente restritos. Um deles (H21), contudo, se expandiu (junto com o próprio H15) seguindo rotas aparentemente idênticas às postuladas para o sub-clado H5-H6. H15 é freqüente na região dos Andes-Maracaibo (Venezuela) e na Amazônia Ocidental (desde onde alcançou a costa peruana), e ocorre também na população do Sul-Sudeste brasileiro, enquanto H21 aparece em muito baixa freqüência em uma população venezuelana, duas amazônicas (Oriental e Ocidental) e no Sul-Sudeste do Brasil. Nenhum destes dois haplótipos, apesar da sua ampla distribuição geográfica, parece ter sofrido um processo de diversificação na América do Sul como o observado para H5 e H6. Haplótipos recentemente derivados de H15 aparecem, como visto acima, na região da Mesoamérica; somente H29, isolado de um único espécime no Sul-Sudeste do Brasil, parece relacionado com H15 fora dessa região.

Isto sugere que a expansão de H15-H21, embora seguindo o mesmo padrão espacial, se deu muito mais recentemente do que a expansão inicial do Clado II. Estas observações reforçam, portanto, a idéia da existência de duas ondas de colonização da América do Sul por *Ae. aegypti* do Clado II. A primeira teria sido interrompida pela falta de conectividade terrestre entre Roraima e o resto do Brasil (e não necessariamente pelas atividades de erradicação), o que deixou uma população isolada no norte da Amazônia brasileira. A segunda teria acontecido de forma muito recente, talvez coincidindo com a abertura da rodovia BR-174, e envolveu a sub-linhagem H15-H21 e alguns dos haplótipos derivados da população de Roraima (como, sobretudo, H2).

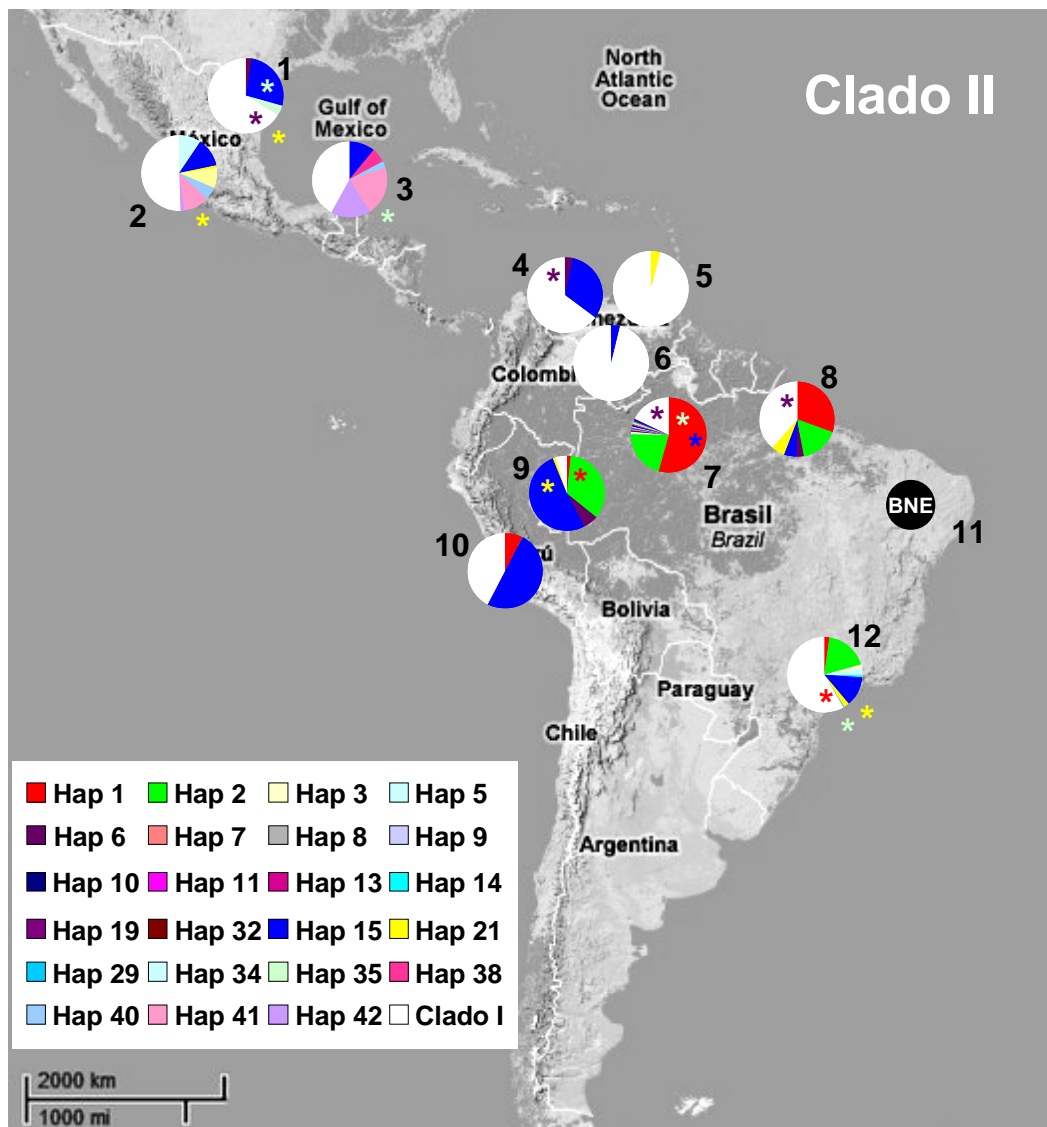


Figura 12. Frequência de ocorrência dos haplótipos do gene ND4 do Clado II em cada uma das 12 populações geográficas comparadas durante este trabalho. Os asteriscos indicam a ocorrência em baixa frequência de haplótipos compartilhados por mais de uma população. A numeração dos haplótipos corresponde a apresentada na Figura 13 (a seguir). (1, Norte-Mesoamérica Costa Nordeste; 2, Norte-Mesoamérica Costa Ocidental; 3, Norte-Mesoamérica Yucatán; 4, Venezuela Andes-Maracaibo; 5, Venezuela Costa; 6, Venezuela Llanos-Orinoco; 7, Amazônia Central; 8, Amazônia Oriental; 9, Amazônia Ocidental; 10, Peru Transandino; 11, Brasil Nordeste; 12, Brasil Sul-Sudeste)



Figura 13. Dinâmicas de invasão do continente americano por representantes do Clado II de *Aedes aegypti*. Os círculos representam haplótipos individuais; o código de cores indica as cinco regiões consideradas (ver Figura 1 do Apêndice e Figura 12 acima). Os círculos com borda preta foram isolados de mais de uma população, enquanto os círculos com borda branca foram isolados de apenas uma população. Os círculos de cor mais pálida sugerem que o haplótipo sofreu extinção local na população correspondente. As setas representam as prováveis rotas de introdução e dispersão; a seta pontilhada desde a África representa a rota mais provável de introdução de haplótipos africanos no continente e nas ilhas do Caribe. A possibilidade de introduções diretas desde o Caribe para cidades portuárias da Venezuela é sugerida por uma seta pontilhada. Os padrões de dispersão por setas contínuas (indicando evidências fortes de dispersão) e por setas tracejadas (indicando possível intercâmbio de migrantes). Os locais de ocorrência de haplótipos africanos compartilhados (círculos pretos) e não compartilhados (círculos cinza) com populações americanas também são indicados; todos estes haplótipos aparecem como estreitamente relacionados nas análises genealógicas

## 7.2. Correspondências com os perfis epidemiológicos históricos

A primeira pandemia de dengue a atingir o Novo Mundo foi a de 1824-1828; os primeiros casos apareceram nas ilhas Virgens, e a doença se espalhou na área do Caribe e do Golfo do México. Na América do Sul, somente a Venezuela e a Colômbia foram atingidas. A segunda grande pandemia (1845-1851) aconteceu depois de um período de mais de 15 anos com surtos localizados da doença (em especial no Caribe e Mesoamérica), mas sem grandes epidemias. Os primeiros casos relacionados com esta segunda pandemia foram detectados em 1845, de forma simultânea, no sul dos Estados Unidos e no Sul-Sudeste do Brasil (Rio de Janeiro); nos anos seguintes, a doença se espalha pelo Sul-Sudeste do Brasil (com duas ondas epidêmicas em 1946-1948 e 1951-1953), seis estados Norte-americanos, Cuba e Peru (PAHO, 2009).

É evidente que estes padrões espaciais e temporais de expansão das primeiras grandes epidemias de dengue nas Américas devem ter emergido de padrões paralelos de dispersão, estabelecimento e crescimento populacional do principal vetor da doença, *Ae. aegypti*. As dinâmicas propostas de invasão do continente pelos representantes dos Clados II e I, respectivamente, sugerem uma explicação parcimoniosa para o paralelismo destes padrões.

Chama a atenção, em primeiro lugar, que tanto os vetores quanto a doença seguem um padrão geral de dispersão norte-sul; a região de Norte-Mesoamérica e o Caribe aparece como a região-fonte de cada uma das grandes pandemias e de cada uma das ondas primárias de invasão do continente por *Ae. aegypti*.

Sugerimos que a primeira pandemia esteve associada à dispersão primária dos representantes do Clado II (o mais antigo) desde Norte-Mesoamérica e o Caribe até o norte da América do Sul (em particular a Venezuela). Algumas populações derivadas teriam alcançado o extremo norte da Amazônia Legal brasileira, ficando depois isoladas

em Roraima (e/ou no estado venezuelano de Bolívar) sem possibilidades de continuar a migração para o sul. Assim, a doença ficou também restrita à região norte do subcontinente.

A segunda pandemia segue um padrão espacial muito diferente. A aparição da doença no epicentro mesoamericano-caribenho é acompanhada pela aparição simultânea de casos no Sudeste do Brasil. Sugerimos que este padrão é o resultado da dispersão de vetores representantes do Clado I, que seguiram, segundo a nossa proposta, exatamente a mesma rota que a doença. Após as primeiras epidemias associadas com a chegada e estabelecimento destes vetores, as ações de controle (e, provavelmente, o desenvolvimento de imunidade natural nas populações humanas das áreas críticas) conseguiram manter a região Sul-Sudeste livre de transmissão por mais de 60 anos – até a chegada do vírus DENV-2 em 1986 (PAHO, 2009). Os dados apresentados neste trabalho sugerem que os efeitos dos esforços de erradicação dos anos 1958-1976 sobre as populações de vetores teriam sido somente parciais; algumas populações derivadas da introdução originária do Clado I sobreviveram, e foram provavelmente responsáveis pelos ciclos de reinfestação registrados em 1967-1972 e desde 1976. O padrão de diversidade observado nas populações brasileiras do Clado I, com um haplótipo claramente dominante (quase sempre H20) e um número relativamente baixo de haplótipos raros, é compatível com os efeitos esperados (séries de gargalos de garrafa e dominância da deriva genética) deste tipo de ações de controle. O caso extremo é representado pelas populações do Nordeste brasileiro (onde o Clado II aparentemente não se estabeleceu), nas quais os espécimes portadores do haplótipo H20 são extremamente dominantes; nossa proposta sugere que este seria o padrão em todo o Brasil se a segunda onda de expansão do Clado II desde Roraima não tivesse acontecido. Contudo, é muito provável que estes efeitos tenham sido atenuados, em



algumas regiões, pela chegada de novos propágulos (pertencentes ao mesmo Clado I), embora sua capacidade de estabelecimento e dispersão pareça limitada (e.g., H26 no Nordeste ou H27 no Sul-Sudeste). Em conjunto, os efeitos das campanhas de erradicação (incluindo a extinção local de algumas variantes raras) devem também contribuir a reforçar os sinais de isolamento genético e estruturação populacional observados neste e noutros estudos (Lourenço-de-Oliveira et al., 2004; Paduan et al., 2006; Paduan & Ribolla, 2008).

A expansão secundária dos representantes do Clado II (as populações isoladas de Roraima e alguns haplótipos adicionais do mesmo Clado) provavelmente aconteceu depois da abertura, no final dos anos 1970, da BR-174. O crescimento demográfico e urbanístico das cidades de Roraima (em particular Boa Vista e Pacaraima), acelerado pela abertura da rodovia, provavelmente foi acompanhado por um crescimento das populações locais de *Ae. aegypti*; as condições para a primeira epidemia de dengue em Boa Vista (altas densidades de vetores infectados e hospedeiros humanos suscetíveis numa paisagem urbana) só se deram no início dos anos 1980. Desde então, representantes deste Clado têm invadido e colonizado a Amazônia Central (em Manaus, a primeira epidemia aconteceu em 1998, coincidindo com a sexta pandemia americana), Oriental e Ocidental e o Sul-Sudeste brasileiro, mas não o Nordeste. O padrão de diversidade haplotípica (vários haplótipos ocorrendo em frequências moderadamente altas) é diferente do observado nas populações brasileiras do Clado I, coincidindo com o esperado se a colonização se deu depois do relaxamento das campanhas de erradicação.

Nossa proposta, portanto, não só ajuda a explicar algumas das grandes tendências históricas da epidemiologia da dengue no Brasil. Os dados sugerem também que os esforços de “erradicação” de *Ae. aegypti* do país nunca tiveram o sucesso anunciado, e que as populações remanescentes (representadas sobretudo por H20) foram

responsáveis por uma parte do processo de reinfestação – enquanto a outra parte foi responsabilidade de populações do Clado II da Amazônia setentrional em expansão secundária. A combinação destas duas expansões recentes (o Clado II desde a Amazônia e o Clado I em direção norte) resultou no encontro secundário de populações derivadas de cada uma das duas introduções principais em cidades de todo o Brasil – exceto, aparentemente, algumas localidades do Nordeste. Uma das consequências deste “reencontro” é o perfil de alta diversidade genética observado (e amplamente comentado) por diversos pesquisadores (Bracco et al., 2007; Paduan & Ribolla, 2008; Scarpassa et al., 2008; Lima-Júnior & Scarpassa, no prelo), e que agora ganha uma explicação simples e coerente. O padrão cíclico que as epidemias de dengue adquiriram desde o final dos anos 1980 e o início dos 1990 sugere que o status imunológico das populações humanas locais (em relação aos sorotipos circulantes em cada ocasião e localidade) é o principal mecanismo envolvido na modulação da incidência (Wearing & Rohani, 2006); as populações locais de vetores, bem estabelecidas e diversificadas, e o impacto das ações de controle vetorial teriam papéis subsidiários na geração destas dinâmicas. Esta última observação contrasta com as evidências de sucesso relativo das campanhas de erradicação desenvolvidas até 1975, e sugere que a eficácia das ações de controle de *Ae. aegypti* se viu comprometida pelo processo de descentralização dos serviços de saúde que começou com a Conferência Nacional de Saúde de 1986 e culminou em 1999 com a transferência dos recursos e tarefas da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) para estados e municípios (Dias, 1986).

### 7.3. Conclusões

Embora seja ainda especulativa em vários detalhes, a interpretação conjunta das evidências apresentadas neste trabalho permite propor, pela primeira vez, uma explicação coerente do complexo processo de invasão e colonização das Américas por *Ae. aegypti*, cujas conseqüências foram (e continuam sendo) catastróficas. Nossa proposta deriva da análise da mais completa base de dados sobre variabilidade genética desta espécie de vetor compilada até o momento. As análises oferecem uma visão de conjunto sobre os padrões espaciais de distribuição desta variabilidade nas Américas, sugerem alguns dos mecanismos e processos envolvidos na gênese de tais padrões e contribuem à compreensão geral das dinâmicas epidemiológicas (históricas e contemporâneas) da infecção por vírus Dengue no Brasil.

O presente trabalho, em definitiva, permitiu:

- (i) Desenvolver uma proposta geral, plausível, coerente e suscetível de refinamento por meio de testes futuros, para explicar o processo de invasão das Américas por *Ae. aegypti*; a formulação de uma proposta com estas características sinaliza múltiplos caminhos de investigação, sugerindo questões específicas e oferecendo hipóteses alternativas para enfrentar cada uma delas, e
- (ii) Estabelecer pela primeira vez, embora de forma tentativa, uma relação explícita entre os padrões de diversidade genética populacional de *Ae. aegypti* e as dinâmicas espaciais e temporais da epidemiologia da dengue no Brasil.

Apresentamos, para concluir, alguns aspectos específicos de nossa proposta que podem contribuir, em nossa opinião, a direcionar atividades futuras de pesquisa sobre os vetores do vírus Dengue no Brasil e nas Américas e a definir estratégias inovadoras (e baseadas em evidências) de vigilância e controle. Neste sentido, nosso trabalho permitiu:

- (i) Identificar os principais pontos de introdução de populações alóctones de *Ae. aegypti* nas Américas, e em particular no Brasil, sugerindo as possíveis fontes originais, e definir as rotas de dispersão associadas com cada um desses pontos;
- (ii) Definir o número provável de introduções bem-sucedidas de *Ae. aegypti* nas Américas;
- (ii) Formular hipóteses testáveis sobre as dinâmicas espaciais e temporais de expansão das populações americanas de *Ae. aegypti*. Por exemplo, as mudanças demográficas sugeridas pelas análises baseadas em um único *locus* deveriam deixar sinais compatíveis em *loci* neutros e não ligados localizados em qualquer ponto do genoma nuclear;
- (iii) Identificar sinais da ocorrência de (a) populações que se diversificaram em áreas geograficamente isoladas (Roraima) e (b) populações residuais que sobreviveram às campanhas de erradicação da segunda metade do século XX (e.g., H20), e estimar a importância relativa de cada uma destas populações no processo de re-expansão e re-colonização do Brasil por *Ae. aegypti*;
- (iv) Identificar sub-populações do vetor (caracterizadas por seu genótipo mitocondrial) com diferente capacidade invasiva, tanto no que se refere à dispersão de propágulos (e.g., genótipos como H5 e H21, que aparecem em muitas localidades dispersas, embora em baixa frequência) como ao potencial de estabelecimento e colonização (e.g., genótipos como H20, H2, H18 ou H1, que viram muito frequentes ou dominantes nas áreas por eles invadidas);
- (v) Comparar os padrões observados de distribuição da diversidade genética (dentro de e entre populações, e entre regiões geográficas) com os esperados em relação com diferentes dinâmicas de invasão. Por exemplo, o padrão observado de partição da variância genética e estruturação populacional é compatível com um cenário de

introduções múltiplas em pontos discretos, seguidas de dispersão passiva de pequenos propágulos a média e longa distância (seguindo um modelo de “caminho de pedras”); este padrão aparece reforçado pelos efeitos das grandes campanhas de erradicação sobre algumas das populações introduzidas no Brasil;

(vi) Identificar áreas de alta diversidade genética (por exemplo, no Brasil, o Sul-Sudeste ou a Amazônia Oriental) nas quais a emergência de variabilidade em relação a traços biológicos importantes (e.g., suscetibilidade a diferentes cepas de flavivírus ou resistência a inseticidas) deva ser monitorada; ao mesmo tempo, esta informação pode ajudar a definir estratégias de vigilância dirigidas a evitar aumentos locais da variabilidade genética (p.ex., limitando o fluxo gênico entre populações dominadas por genótipos de diferentes sub-linhagens). Neste sentido, duas considerações parecem de especial relevância: por uma parte, não há razões para supor que as duas linhagens mitocondriais principais de *Ae. aegypti* presentes nas Américas não sejam capazes de entrecruzar livremente (i.e., intercambiar genes nucleares) nas áreas de co-ocorrência; portanto, a diversidade genética das populações locais deve ser, de fato, maior do que o observado com o marcador utilizado nas nossas análises, que é haplóide e não sofre recombinação. Por outra parte, isto sugere que os benefícios de um sistema de vigilância capaz de limitar o fluxo gênico entre localidades e de atividades de controle capazes de promover a extinção local de variantes gênicas raras serão importantes inclusive nas localidades já colonizadas pelo vetor.

Assim, e numa perspectiva geral, nossos resultados ajudaram a revelar as dimensões do desafio que o controle de *Ae. aegypti* representa nas Américas. Populações de origens diversas foram introduzidas através de diferentes locais em diferentes momentos; se dispersaram rapidamente seguindo rotas terrestres, marítimas, fluviais e possivelmente aéreas; se encontraram de forma secundária em localidades

dispersas por todo o continente; e tiveram um enorme sucesso na colonização das áreas invadidas. Os dados aqui apresentados sugerem que dois eventos principais de introdução-estabelecimento-invasão, um deles dividido em duas ondas de expansão, são responsáveis pelos padrões de diversidade genética observados no continente. Eles também são, provavelmente, responsáveis pelas grandes tendências históricas dos perfis epidemiológicos da dengue no Brasil, e temos desenvolvido e apresentado uma proposta capaz de dar conta das correspondências entre ambos os processos. Cabe destacar, finalmente, que é praticamente seguro que cada um destes processos continua ativo na atualidade. Novas sub-linhagens de vetores estão sendo provavelmente introduzidas cada ano, adicionando variabilidade ao conjunto de genes e gerando propágulos secundários que invadem novas áreas; as evidências sugerem que os sistemas descentralizados de controle vetorial são relativamente ineficazes na contenção destes processos de dispersão. O desenho, desenvolvimento, aplicação e avaliação de estratégias racionais de controle e vigilância (mais eficazes e eficientes do que as disponíveis na atualidade) dependerão, em grande parte, da compreensão adequada destas dinâmicas; este trabalho representa nossa contribuição, esperamos que significativa, a tal compreensão.

## 8. Referências bibliográficas

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F.A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 77, n. 3, p. 437-454, 2005.

APÓSTOL, B.L. et al. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. **Heredity**, v. 76, p. 325-334, 1996.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall, New York, 1994.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, Cambridge, 2000.

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estud. Avanç.**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BEHURA, S. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Mol. Ecol.**, v. 15, n. 11, p. 3087-3113, 2006.

BOSIO, C.F. et al. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 4, p. 434-442, 2005.

BRACCO, J.E. et al. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 573-580, 2007.

BURKE, D.S.; MONATH, T.P. Flaviviruses. In: KNIPE, D.M.; HAWLEY, P.M. (Eds). **Fields Virology (4<sup>th</sup> ed.)**. Lippincott Wilkins, Philadelphia, p. 1043-1125, 2001.

CHRISTOPHERS, S.R. ***Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics, and structure**. Cambridge University Press, New York, 1960.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Mol. Ecol.**, v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.

CONN, J.E.; MIRABELLO, L. The biogeography and population genetics of Neotropical vectors species. **Heredity**, v. 99, n. 3, p. 245-256, 2007.

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2004.

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**, v. 100, n. 6, p. 63-644, 2005.

COSTA-RIBEIRO, M.C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A.B. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 917-921, 2006.

- DIAS, J.C.P. Descentralización y enfermedad de Chagas, Brasil, 2005. In: YADÓN, Z.E. et al. (Eds.). **Descentralização e gestão do controle das enfermidades transmissíveis na América Latina**. Organización Panamericana de la Salud, Buenos Aires, p. 215-230, 2006.
- DLUGOSCH, K.M.; PARKER, I.M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. **Mol. Ecol.**, v. 17, p. 431-449, 2008.
- DONNELLY, M.J.; LICHT, M.; LEHMANN, T. Evidence for recent population expansion in the evolutionary history of the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 18, n. 7, p. 1353-1364, 2001.
- DRAKE, J.M.; LODGE, D.M. Global hot spots of biological invasions: evaluating options for ballast-water management. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 271, n. 1539, p. 575-580, 2004.
- EXCOFFIER, L.G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinform. Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.
- FAILLOUX, A.B.; VAZEILLE, M.; RODHAIN, F. Geographic genetic variation in populations of the Dengue virus vector *Aedes aegypti*. **J. Mol. Evol.**, v. 55, n. 6, p. 653-663, 2002.
- FERRARI, J.A. Insecticide resistance. In: BEATY, B.J.; MARQUARDT, W.C. (Eds.). **The biology of disease vectors**. University Press of Colorado, Colorado, p. 512-529, 1996.
- FERRE, J.; RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 47, p. 501-533, 2002.
- FIGUEIREDO, R.M.P. et al. Doenças exantemáticas e a primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, n. 6, p. 476-479, 2004.
- FIGUEIREDO, R.M.P. et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.
- FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997.
- FU, Y.X.; LI, W.H. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics**, v. 133, n. 3, p. 693-709, 1993.
- GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N. et al. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, n. 2, p. 200-209, 2000.



- GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N. et al. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 2, p. 213-222, 2002.
- GRAPUTTO, A., et al. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. **Mol. Ecol.**, v. 14, n. 14, p. 4207-4219, 2005.
- GRATZ, N.G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Med. Vet. Entomol.**, v. 18, n. 3, p. 215-227, 2004.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microb. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 480-495, 1998.
- GUBLER, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21<sup>st</sup> century. **Trends Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.
- HAAG-LIAUTARD, C. et al. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. **PLoS Biol.**, v. 6, n. 8, p. 1706-1714, 2008.
- HARPENDING, H.C. Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Hum. Biol.**, v. 66, n. 4, p. 591-600, 1994.
- HASAN, A.U. et al. Genetic diversity in two sibling species of the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes on Guadalcanal in the Solomon Islands. **BMC Evol. Biol.**, v. 8, 318, 2008.
- HERRERA, F. et al. Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 62-633, 2006.
- HONÓRIO, N.A. **Estudos de aspectos da biologia do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1984), em área endêmica de dengue, no estado do Rio de Janeiro.** 1999. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.
- HUBER, K. et al. Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh city (Vietnam). **Heredity**, v. 89, p. 7-14, 2002.
- JOSHI, M.B. et al. Phylogeography and origin of Indian domestic goats. **Mol. Biol. Evol.**, v. 21, n.3, p. 454-462, 2004.
- KOLBE, J.J. et al. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. **Nature**, vol. 431, n. 7005, p. 177-181, 2004.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. **Comput. Appl. Biosci.**, v. 10, n. 2, p. 189-191, 1994.

- LIMA-JÚNIOR, R.S; SCARPASSA, V.M. Evidence of two lineages of dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA *ND4* gene sequences. **Genet. Mol. Biol.** (no prelo) (doi: 10.1590/S1415-47572009005000036)
- LOUNIBOS, L.P. Invasions by insect vectors of human disease. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 47, p. 233-266, 2002.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.
- LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bull. Entomol. Research**, v. 88, n. 6, p. 577-600, 1998.
- MATTINGLY, P.F. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem I.—Taxonomy and bionomics. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 51, n. 4, p. 392-408, 1957.
- MIRABELLO, L.; CONN, J.E. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. **Heredity**, v. 96, p. 311-321, 2006.
- MITCHELL, C.J. Vector competence of North and South American strains of *Aedes albopictus* for certain arboviruses: a review. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 7, n. 3, p. 446-451, 1991.
- MIURA, O. Molecular genetic approaches to elucidate the ecological and evolutionary issues associated with biological invasions. **Ecol. Res.**, v. 22, n. 6, p. 876-883, 2007.
- MONATH, T.P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, n. 7, p. 2395-2400, 1994.
- MOUSSON, L. et al. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variation. **Genet. Res.**, v. 86, n. 1, n. 1, p. 1-11, 2005.
- NAVARRO-SINGÜENZA, A.G. et al. Phylogeography of the *Buarremon* brush-finch complex (Aves, Emberizidae) in Mesoamerica. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 47, n. 1, p. 21-35, 2008.
- OSANAI, C.H. et al. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota previa. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.
- PADUAN, K.S. et al. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. **Genet. Mol. Biol.**, v. 29, n. 2, p. 391-395, 2006.
- PADUAN, K.S.; RIBOLLA, P.E.M. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 45, n. 1, p. 59-67, 2008.

- PAHO – Pan-American Health Organization. Dengue. Disponível em: <http://www.paho.org/English/ad/dpc/cd/dengue.htm>. Acesso em: Janeiro de 2009.
- PALCHICK, S. Chemical control of vectors. In: BEATY, B.J.; MARQUARDT, W.C. (Eds.). **The biology of disease vectors**. University Press of Colorado, Colorado, p. 502-511, 1996.
- PAUPY, C. et al. Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. **J. Med. Entomol.**, v. 45, n. 3, p. 391-400, 2008.
- PENNA, M.L.F. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. **Cad. Saúde Públ.**, v. 19, n. 1, p. 305-309, 2003.
- POWELL, J.R.; TABACHNICK, W.J. Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. **Science**, v. 208, n. 20, p. 1385-1387, 1980.
- RAVEL, S. et al. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Côte d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouaké. **Acta Trop.**, v. 82, n. 1, p. 39-49, 2002.
- RÍOS-VELÁSQUEZ, C.M. et al. Distribution of dengue vectors in neighborhoods with different urbanization types of Manaus, state of Amazonas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 617-623, 2007.
- ROGERS, A.R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Mol. Biol. Evol.**, v. 9, n. 33, p.552-569, 1992.
- ROSA, A.P.A.T. et al. Dengue. In: LEÃO, R.N.Q. (Coord). **Doenças infecciosas e parasitárias: Enfoque Amazônico**. CEJUP/Universidade do Estado do Pará, Belém, p. 227-248, 1997.
- ROZAS, J. et al. DNAsp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinform.**, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, 2003.
- SACCONE, C. et al. Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. **Gene**, v. 261, n. 1, p. 153-159, 2000.
- SAKAI, A.K. et al. The population biology of invasive species. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 32, p. 305-332, 2001.
- SALLUM, M.A.M. et al. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. **Syst. Entomol.**, v. 27, n. 3, p. 361-382, 2002.
- SCARPASSA, V.M. et al. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 895-903, 2008.

SCHATZMAYR, H.G. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, Supl. 1, p. 179-181, 2000.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin 3.1, version 2000: An integrated software package for population genetics**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva, 2000.

SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.

SIMON, C. et al. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 37, p. 545-579, 2006.

SLATKIN, M.; HUDSON, R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, v. 129, n. 2, p. 555-562, 1991.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Holos, Ribeirão Preto, p 172-192, 2001.

SUÁREZ, A.V.; TSUTSUI, N.D. The evolutionary consequences of biological invasions. **Mol. Ecol.**, v. 17, n. 1, p. 351-360, 2008.

TABACHNICK, W.J. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease. The yellow fever mosquito. **Am. Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 14-24, 1991.

TABACHNICK, W.J.; POWELL, J.R. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Genet. Res.**, v. 34, n. 3, p. 215-229, 1979.

TAMURA, K. et al. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 101, n. 30, p. 11030-11035, 2004.

TAMURA, K. et al. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TATEM, A.J. et al. Global traffic and disease vector dispersal. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n.16, p. 6242-6247, 2006.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

URDANETA-MÁRQUEZ, L. et al. Genetic relationships among *Aedes aegypti* collections in Venezuela as determined by mitochondrial DNA variation and nuclear single nucleotide polymorphisms. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 3, p. 479-491, 2008.

VENKATESAN, M. et al. Evidence for a population expansion in the West Nile virus vector *Culex tarsalis*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 24, n. 5, p. 1208-1218, 2007.

WEARING, H.J; ROHANI, P. Ecological and immunological determinants of dengue epidemics. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 31, p. 11802-11807, 2006.

WHO – World Health Organization. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em: Abril de 2009.

# APÊNDICE

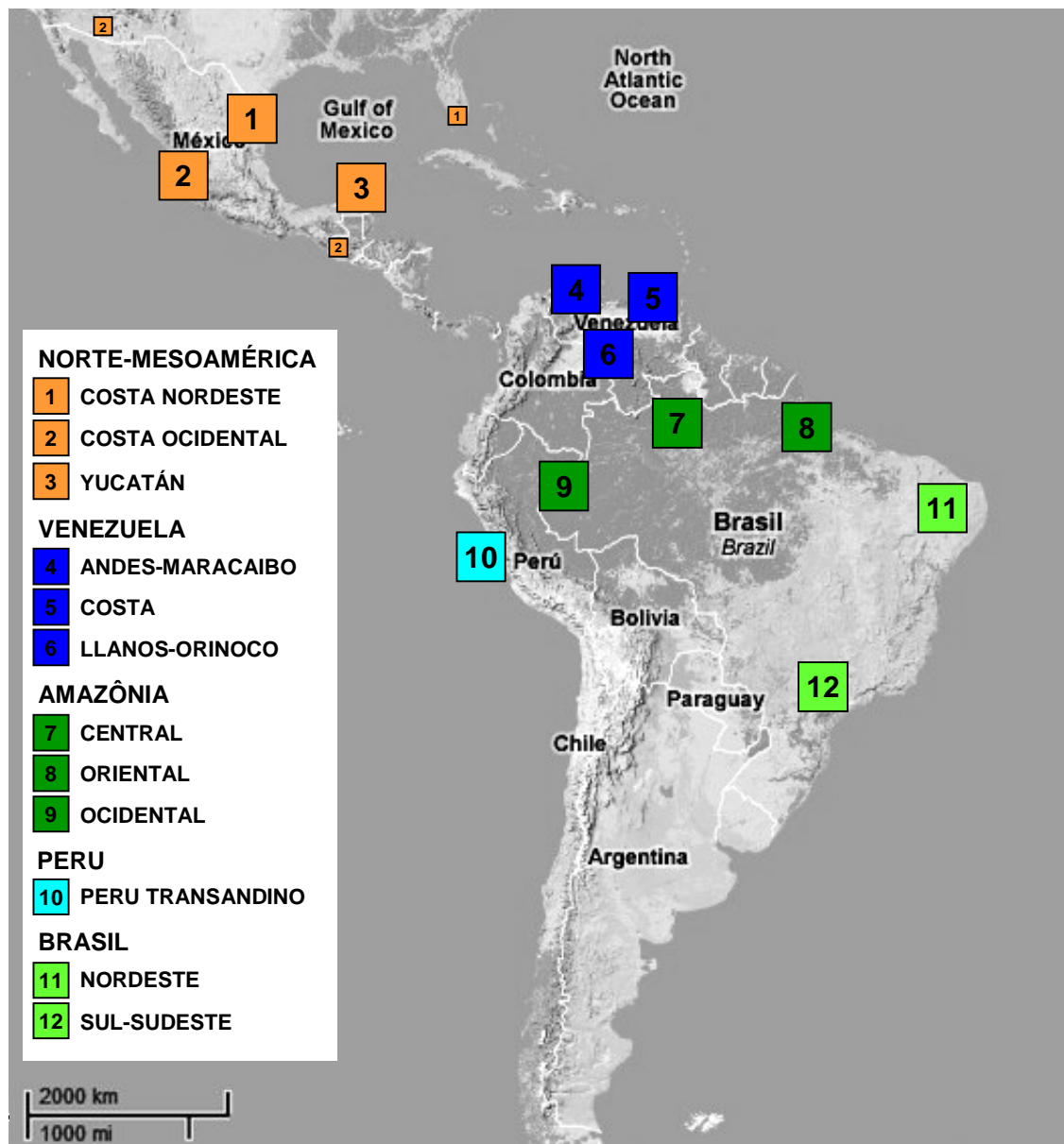


Figura 1. Populações (e grupos de populações) de *Aedes aegypti* estudadas; os detalhes sobre as localidades de coleta dos espécimes e a origem das seqüências utilizadas são apresentados na Tabela 1 deste Apêndice (abaixo)

Tabela 1. Sequências utilizadas neste estudo: regiões, populações e localidades de origem, número (N) e referências

Região	População	Localidades	N	Referências e autores
Norte-Mesoamérica	Costa Ocidental	Tucson, Culiacán, Mazatlán, Puerto Vallarta, Manzanillo, Lázaro Cárdenas, Ixtapa, Coyuca de Benítez, Puerto Escondido, Tapachula, Guatemala	556	Gorochotegui-Escalante et al. (2002)**
	Costa Nordeste	Houston, Nuevo Laredo, Miguel Alemán, Reynosa, Matamoros, Monterrey, Ciudad Victoria, Tampico, Tuxpan, Fort Lauderdale	676	Gorochotegui-Escalante et al. (2002)**
	Yucatán	Minatitlán, Monoacán, Villahermosa, Chetumal, Ciudad del Carmen, Campeche, Mérida, Cancún	751	Gorochotegui-Escalante et al. (2002)**
Venezuela	Andes-Maracaibo	Zulia, Táchira, Lara, Portuguesa	272	Urdaneta et al. (2008)**
	Llanos-Orinoco	Apure, Bolívar, Anzoátegui	209	Urdaneta et al. (2008)**
	Costa	Sucre, Miranda, Maracay	145	Urdaneta et al. (2008)**, Bracco et al. (2007)*
Amazônia	Ocidental	Iquitos, Acre, Rondônia	64	Costa-da-Silva et al. (2005)*, Bracco et al. (2007)*, Lima-Júnior & Scarpassa (no prelo)*, Paduan & Ribolla (2008)**, dados próprios
	Central	Roraima, Amazonas	183	Bracco et al. (2007)*, Lima-Júnior & Scarpassa (no prelo)*, dados próprios
	Oriental	Pará, Maranhão	36	Bracco et al. (2007)*, Lima-Júnior & Scarpassa (no prelo)*
Brasil	Nordeste	Bahia, Ceará, Alagoas	39	Bracco et al. (2007)*, Paduan & Ribolla (2008)**
	Sul-Sudeste	Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Paraná, Mato Grosso do Sul	134	Bracco et al. (2007)*, Paduan & Ribolla (2008)**
Peru Transandino	Peru	Lima, Piura	38	Costa-da-Silva et al. (2005)*, Bracco et al. (2007)*
África	Kenya	-	10	Burugu et al. (não publicado)***
	Senegal	-	5	Bracco et al. (2007)***
	Guinea	-	4	Bracco et al. (2007)***
	Camarões	-	4	Paupy et al. (2008)***
	Uganda	-	7	Bracco et al. (2007)***
Ásia-Pacífico	Tailândia	-	18	Bosio et al. (2005)***, Walton et al. (não publicado)***
	Myanmar	-	16	Walton et al. (não publicado)***
	Camboja	-	6	Bracco et al. (2007)***, Walton et al. (não publicado)***
	Singapura	-	6	Bracco et al. (2007)***
	Tahiti	-	4	Bracco et al. (2007)***
<b>Total</b>			<b>3183</b>	

\*Sequências disponíveis no GenBank e frequências haplotípicas disponíveis na publicação original referenciada

\*\*Sequências disponíveis no GenBank e frequências haplotípicas gentilmente cedidas pelos autores dos trabalhos originais referenciados

\*\*\* Sequências disponíveis no GenBank



Tabela 2. Frequências haplotípicas absolutas do gene mitocondrial ND4 em 12 populações de *Aedes aegypti* das Américas

	Amazônia			Brasil		Peru	Norte-Mesoamérica			Venezuela		Total	
	Central	Oriental	Ocidental	Nordeste	Sul-Sudeste	Peru	Nordeste	Yucatán	Ocidente	Andes	Costa		Orinoco
Hap 1	99	11	1		3	3							117
Hap 2	39	6	22		25								92
Hap 3	1				2								3
Hap 4	29	2			2		9			57	36	6	141
Hap 5	1				4		1	1	53				60
Hap 6	1	1	4				11			10			27
Hap 7	1												1
Hap 8	1												1
Hap 9	1												1
Hap 10	1												1
Hap 11	1												1
Hap 12	1												1
Hap 13	1												1
Hap 14	1				1								2
Hap 15	1	2	33		17	19	181	82	67	86		8	496
Hap 16	1												1
Hap 17	1												1
Hap 18	1				1		1			112	84	135	334
Hap 19	1												1
Hap 20		9	3	33	67	16	274	81					483
Hap 21		2	1		3		1		7		6		20
Hap 22		1											1
Hap 23		1			3								4
Hap 24		1								7	18	60	86
Hap 25				2	3				26				31
Hap 26				1									1
Hap 27					2						1		3
Hap 28					1								1
Hap 29					1								1
Hap 30					1								1
Hap 31					1								1
Hap 32							4						4
Hap 33							163	75	45				283
Hap 34							12						12
Hap 35							17						17
Hap 36							2	1					3
Hap 37								23	131				154
Hap 38								46	47				93
Hap 39								79	51				130
Hap 40								24	31				55
Hap 41								154	60				214
Hap 42								129	10				139
Hap 43								9					9
Hap 44								47	10				57
Hap 45									18				18
Total	183	36	64	36	137	38	676	751	556	272	145	209	3103

Tabela 3. Valores de *Fst* par-a-par entre 12 populações de *Aedes aegypti* nas Américas

	<b>AC</b>	<b>AOr</b>	<b>AOc</b>	<b>BRNe</b>	<b>BRSSe</b>	<b>PE</b>	<b>NMANe</b>	<b>NMAYu</b>	<b>NMAOc</b>	<b>VZAn</b>	<b>VZCo</b>	<b>VZOr</b>
<b>AC</b>												
<b>AOr</b>	0,08045											
<b>AOc</b>	0,31040	0,19991										
<b>BRNe</b>	0,51987	0,37333	0,56351									
<b>BRSSe</b>	0,28098	0,07375	0,20358	0,16466								
<b>PE</b>	0,35261	0,16511	0,16614	0,40481	0,10391							
<b>NMANe</b>	0,31873	0,14214	0,20410	0,22138	0,07596	0,06711						
<b>NMAYu</b>	0,22545	0,11658	0,18149	0,31129	0,13698	0,16304	0,12407					
<b>NMAOc</b>	0,22433	0,13546	0,17835	0,36215	0,17307	0,19152	0,16452	0,05395				
<b>VZAn</b>	0,30926	0,23311	0,21182	0,48140	0,26271	0,23422	0,23496	0,18238	0,17826			
<b>VZCo</b>	0,35685	0,30156	0,39762	0,55748	0,33886	0,41327	0,33678	0,24339	0,24261	0,09392		
<b>VZOr</b>	0,42712	0,37490	0,44370	0,60098	0,39214	0,46217	0,36948	0,27908	0,28092	0,15908	0,06622	

**AC**= Amazônia Central; **AOr**= Amazônia Oriental; **AOc**= Amazônia Ocidental; **BRNe**= Brasil Nordeste; **BRSSe**= Brasil Sul-Sudeste; **PE**= Peru Transandino; **NMANe**= Norte-Mesoamérica Costa Nordeste; **NMAYu**= Norte-Mesoamérica Yucatán; **NMAOc**= Norte-Mesoamérica Costa Ocidental; **VZAn**= Venezuela Andes-Maracaibo; **VZCo**= Venezuela Costa; **VZOr**= Venezuela Llanos-Orinoco

Tabela 4. Matriz de distâncias linearizadas de Slatkin entre 12 populações de *Aedes aegypti* das Américas

	<b>AC</b>	<b>AOr</b>	<b>AOc</b>	<b>BRNe</b>	<b>BRSSe</b>	<b>PE</b>	<b>NMAc</b>	<b>NMAYu</b>	<b>NMAOc</b>	<b>VZAn</b>	<b>VZCo</b>	<b>VZOr</b>
<b>AC</b>												
<b>AOr</b>	0,08748											
<b>AOc</b>	0,45011	0,24985										
<b>BRNe</b>	1,08277	0,59575	1,29098									
<b>BRSSe</b>	0,39079	0,07962	0,25561	0,19712								
<b>PE</b>	0,54465	0,19776	0,19925	0,68013	0,11596							
<b>NMAc</b>	0,46785	0,16569	0,25644	0,28433	0,08221	0,07193						
<b>NMAYu</b>	0,29107	0,13197	0,22173	0,45198	0,15872	0,19480	0,14165					
<b>NMAOc</b>	0,28920	0,15669	0,21706	0,56776	0,20929	0,23689	0,19692	0,05703				
<b>VZAn</b>	0,44772	0,30397	0,26875	0,92826	0,35632	0,30586	0,30711	0,22307	0,21693			
<b>VZCo</b>	0,55486	0,43177	0,66009	1,25979	0,51255	0,70436	0,50779	0,32169	0,32033	0,10365		
<b>VZOr</b>	0,74557	0,59974	0,79760	1,50613	0,64513	0,85933	0,58599	0,38712	0,39066	0,18917	0,07091	

**AC**= Amazônia Central; **AOr**= Amazônia Oriental; **AOc**= Amazônia Ocidental; **BRNe**= Brasil Nordeste; **BRSSe**= Brasil Sul-Sudeste; **PE**= Peru Transandino; **NMAc**= Norte-Mesoamérica Costa Nordeste; **NMAYu**= Norte-Mesoamérica Yucatán; **NMAOc**= Norte-Mesoamérica Costa Ocidental; **VZAn**= Venezuela Andes-Maracaibo; **VZCo**= Venezuela Costa; **VZOr**= Venezuela Llanos-Orinoco

Tabela 5. Matriz do número efetivo de migrantes ( $N_m$ ) entre pares de populações de *Aedes aegypti* das Américas

	<b>AC</b>	<b>AOr</b>	<b>AOc</b>	<b>BRNe</b>	<b>BRSSe</b>	<b>PE</b>	<b>NMANe</b>	<b>NMAYu</b>	<b>NMACo</b>	<b>VZAn</b>	<b>VZCo</b>	<b>VZOr</b>
<b>AC</b>												
<b>AOr</b>	5,71542											
<b>AOc</b>	1,11084	2,00118										
<b>BRNe</b>	0,46178	0,83928	0,38730									
<b>BRSSe</b>	1,27946	6,28000	1,95607	2,53656								
<b>PE</b>	0,91802	2,52826	2,50947	0,73515	4,31167							
<b>NMANe</b>	1,06872	3,01763	1,94976	1,75852	6,08211	6,95094						
<b>NMAYu</b>	1,71780	3,78886	2,25498	1,10624	3,15021	2,56680	3,52986					
<b>NMAOc</b>	1,72890	3,19104	2,30346	0,88065	2,38900	2,11072	2,53915	8,76792				
<b>VZAn</b>	1,11677	1,64490	1,86048	0,53864	1,40321	1,63475	1,62806	2,24149	2,30487			
<b>VZCo</b>	0,90114	1,15802	0,75747	0,39689	0,97552	0,70986	0,98467	1,55431	1,56090	4,82386		
<b>VZOr</b>	0,67063	0,83370	0,62688	0,33198	0,77504	0,58185	0,85326	1,29159	1,27987	2,64307	7,05103	

**AC**= Amazônia Central; **AOr**= Amazônia Oriental; **AOc**= Amazônia Ocidental; **BRNe**= Brasil Nordeste; **BRSSe**= Brasil Sul-Sudeste; **PE**= Peru Transandino; **NMANe**= Norte-Mesoamérica Costa Nordeste; **NMAYu**= Norte-Mesoamérica Yucatán; **NMACo**= Norte-Mesoamérica Costa Ocidental; **VZAn**= Venezuela Andes-Maracaibo; **VZCo**= Venezuela Costa; **VZOr**= Venezuela Llanos-Orinoco

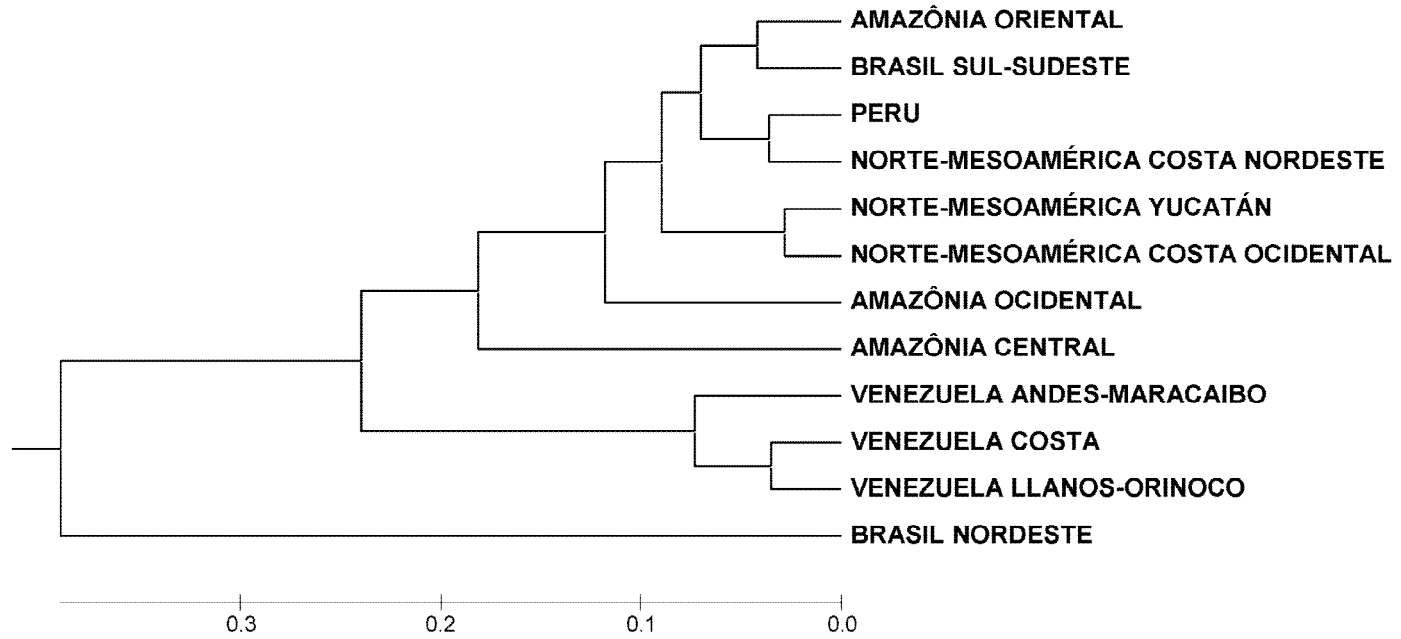


Figura 2. Dendrograma UPGMA derivado da matriz das distâncias genéticas