



Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Departamento de Saúde Coletiva



Mestrado em Saúde Pública

Epidemiologia Molecular do *Aedes albopictus* (Díptera: Culicidae)

Mestranda: **Duschinka Ribeiro Duarte Guedes**
Orientadora: **Dra. Constância F. J. Ayres**

Recife, 2006

DUSCHINKA RIBEIRO DUARTE GUEDES

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO *Aedes albopictus* (DIPTERA:
CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Saúde Coletiva - NESC do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/MS para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, área de concentração em Controle de Endemias e Métodos de Diagnósticos.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

RECIFE
2006

DUSCHINKA RIBEIRO DUARTE GUEDES

Dissertação analisada e aprovada pela comissão examinadora em Abril de 2006.

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres
(Orientadora) CPqAM – FIOCRUZ

EXAMINADORES

Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta (Titular)
CPqRR – FIOCRUZ

Dra. Lêda Narcisa Régis (Titular)
CPqAM – FIOCRUZ

Dr André Freire Furtado (Suplente)
CPqAM – FIOCRUZ

Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura (Suplente)
UPE

Dedico este trabalho ao meu alicerce
Minha família.
E a Constância Ayres pela dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres por todas as orientações e ensinamentos transmitidos ao longo desses cinco anos de agradável convívio. Agradeço pela confiança, pelo incentivo e pela contribuição no meu crescimento profissional.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, pela infra-estrutura e financiamento que possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Dra. Leda Régis, ao Dr. Paulo Pimenta, à Dra. Patrícia Moura e ao Dr. André Furtado, pelas contribuições indispensáveis que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Dra. Maria Alice Varjal pela contribuição e pelas preciosas sugestões que em muito enriqueceram este trabalho.

Ao Dr. Frederico Abath, à Dra. Patrícia Moura, à Dra. Marise Sobreira e à Dra. Valéria Pereira pelas contribuições na qualificação deste trabalho.

Ao Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) do CPqAM pela colaboração neste trabalho. Especialmente Dra. Marli Tenório, Dra. Patrícia Furtado, Dra. Ana Silva e Geórgia pelo apoio, incentivo e colaboração.

À Prefeitura da Cidade do Recife que forneceu o material indispensável para a realização deste trabalho.

À equipe de campo do Departamento de Entomologia do CPqAM pela realização das coletas que engrandeceram este trabalho.

Aos colegas do Departamento de Entomologia pelo agradável convívio.

Ao Marcelo Paiva, cuja participação em minha vida foi fundamental em mais uma conquista, pela paciência, amor, cumplicidade, apoio e incentivo em todos os momentos.

À Ana Lisa Gomes e Danielle Moura, cujas participações foram de grande importância na finalização deste trabalho.

À minha família pelo amor incondicional e pelo apoio. Meu querido avô Raimundo, minha gratidão. Aos meus pais por tudo que tem feito, pelos ensinamentos, respeito e paciência e ao meu irmão Élvio.

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

RESUMO

O *Aedes albopictus* foi detectado pela primeira vez no Brasil em 1986 no Rio de Janeiro e, atualmente pode ser encontrado em grande parte do território brasileiro. Este mosquito é capaz de transmitir em condições laboratoriais pelo menos 22 arboviroses, dentre elas dengue e febre amarela. Apesar de sua importância, são poucos os estudos no Brasil que revelam a estrutura genética deste vetor. O objetivo deste estudo foi caracterizar a estrutura genética de populações naturais de *Ae. albopictus* coletadas na Região Metropolitana do Recife, no Rio de Janeiro e Minas Gerais e avaliar o seu papel como possível vetor na transmissão do Dengue. Para a análise de variabilidade genética foram utilizados dois genes do DNA mitocondrial: citocromo c oxidase II (COII) e nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4 (ND4). Nesta análise utilizando a técnica de SSCP foi identificado um total de oito haplótipos para o gene COII em 252 amostras analisadas e onze haplótipos para o gene ND4 em um total de 273 amostras. Os resultados sobre a análise da variância molecular (AMOVA) para ambos os genes sugeriram que essas populações estão sob forte influência da deriva genética, pois foi identificada uma alta diferenciação genética entre essas populações. Os resultados mostraram que as populações provenientes do município de Moreno foram as mais polimórficas para os dois genes, pois identificamos nestas populações a maioria dos haplótipos encontrados. O município de Moreno é circundado por uma área de mata onde podem existir populações de *Ae. albopictus* com uma alta variabilidade genética que podem atuar como uma fonte para colonizar áreas anteriormente tratadas. As populações do Rio de Janeiro e Minas Gerais foram consideradas idênticas, pois apresentaram os mesmos haplótipos para o gene ND4. A análise do DNA mitocondrial associado à técnica de SSCP, constitui uma ferramenta eficiente na caracterização da estrutura genética de populações naturais. Este marcador também poderá ser útil na epidemiologia molecular para traçar rotas de dispersão desta espécie e monitorar o impacto das intervenções dos programas de controle de uma maneira rápida e precisa. Com a finalidade de investigar o envolvimento deste culicídeo na transmissão do vírus dengue foram coletados espécimes de *Ae. albopictus* em áreas randômicas e em residências onde foram relatados casos com suspeita de Dengue. Estas amostras foram testadas por RT-PCR e isolamento viral em culturas de células C6/36. Dos 217 *pools* de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* testados para a detecção do vírus Dengue na técnica de RT-PCR, 10 *pools* foram positivos. Destes, 9 *pools* foram de *Ae. aegypti* e apenas um *pool* de *Ae. albopictus* proveniente do município de Moreno contendo 2 fêmeas coletadas na fase adulta. Este foi o primeiro achado no Brasil da identificação do vírus Dengue em amostras de *Ae. albopictus*, coletados em campo na forma adulta. No entanto, nenhuma amostra foi positiva para o isolamento em cultura de células C6/36. Os dados sobre vigilância entomológica sugerem que ocorre a circulação do DENV-1 nas populações do *Ae. albopictus* que pode ter ou não implicação no processo de transmissão. Mesmo assim, a presença do *Ae. albopictus* não deve ser mais negligenciada dentro do Programa Nacional de Controle da Dengue. A crescente e acelerada expansão deste mosquito em território brasileiro, associada à sua competência vetorial já comprovada, pode torná-lo uma ameaça aos programas de controle, podendo vir a desempenhar um papel importante, ainda que secundário, na transmissão do vírus Dengue no país.

Palavras chave: *Aedes albopictus*, DNA mitocondrial, vigilância entomológica.

ABSTRACT

The *Aedes albopictus* was detected for the first time in Brazil in 1986, in Rio de Janeiro and, nowadays can be found in most of the national territory. This mosquito is a competent vector, under experimental conditions, for at least 22 arboviruses including Dengue and yellow fever viruses. Despite its importance, very few studies revealed the genetic structure of this vector in Brazil. The objective of this study was to characterize the genetic structure of natural populations of *Ae. albopictus* collected in the Metropolitan Region of Recife, Rio de Janeiro and Minas Gerais, and evaluate its role as a possible vector in Dengue virus transmission. For the genetic diversity analysis, two genes from the mitochondrial DNA were analyzed using Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP): cytochrome c oxidase II (COII) and NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4). Eight haplotypes were identified for COII gene in a total of 252 samples analyzed, and for the ND4 gene eleven haplotypes were identified in a total of 273 samples. The results of the analysis of molecular variance (AMOVA), for both genes, suggested that these populations are under strong influence of the genetic drift effect due to its high genetic differentiation among the populations within the groups. Our findings indicated that the populations from the municipality of Moreno were the most polymorphic for both genes, where the majority of haplotypes were found. Moreno municipality is surrounded by a forest area where may exist populations with high genetic diversity which could play a role as a source to colonize treated areas. The populations from Rio de Janeiro and Minas Gerais were considered identical, sharing the same haplotypes for ND4 gene. The mitochondrial DNA analysis associated to the SSCP technique constitutes an efficient tool in the genetic structure characterization of natural populations. This marker can also be useful in molecular epidemiology to trace dispersal roots of this species and monitoring the impact of the interventions of control programs in a quick and precise way. To investigate the role of this species in Dengue virus transmission, samples of *Ae. albopictus* were collected randomly and in residences where Dengue cases were reported. These samples were tested by RT-PCR technique and were inoculated onto C6/36 cells. In entomological surveillance from a total of 217 pools of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* tested by RT-PCR, we found 10 positive pools for Dengue virus. Out of these, nine pools were *Ae. aegypti* and only one pool was *Ae. albopictus* from Moreno, containing two adult females. This is the first report of the detection of Dengue virus in field-caught *Ae. albopictus* naturally infected in Brazil. However, no sample was positive for the isolation in culture of cells C6/36. Our findings in entomological surveillance suggest that DENV-1 is circulating in *Ae. albopictus* population, but the implication of this result in Dengue virus transmission is still unclear. Our data also indicate that vector program control could be directed not only to *Aedes aegypti* but also to *Aedes albopictus* populations, especially in areas where this species is abundant. Establishments of new *Ae. albopictus* populations in the Americas, especially in dengue-sensitive areas, are still in progress, modifying population genetic composition and, consequently, dengue transmission pattern in endemic areas. The potential vector of this species, which continues to spread to new areas, is still in a formative stage. The presence of this species in the urban areas represents a risk for the interaction of this mosquito with the urban human population.

Key words: *Aedes albopictus*, mitochondrial DNA, entomological surveillance

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fêmea do <i>Aedes albopictus</i> durante o repasto sanguíneo.	03
Figura 2. Criadouros naturais e artificiais do <i>Aedes albopictus</i> .	04
Figura 3. Ilustração do ciclo evolutivo do <i>Aedes albopictus</i> .	05
Figura 4. Ilustração do princípio da técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).	08
Figura 5. Organização do DNA mitocondrial com seus genes codificantes e a região controle (<i>Control</i>). <i>IrRNA</i> , subunidade ribossomal grande; <i>srRNA</i> , subunidade ribossomal pequena; <i>ND1</i> , <i>ND2</i> , <i>ND3</i> , <i>ND4</i> , <i>ND4L</i> , <i>ND5</i> e <i>ND6</i> , subunidades da NADH desidrogenase; <i>Cyt b</i> , citocromo b; <i>COI</i> , <i>COII</i> e <i>COIII</i> , subunidades da citocromo c oxidase; <i>ATP6</i> e <i>ATP8</i> , subunidades ATPase.	10
Figura 6. Isolamento do vírus Dengue em cultura de células C6/36 (pontos brilhantes) através da reação de imunofluorescência indireta.	13
Figura 7. Esquema ilustrando a primeira reação da RT-PCR do vírus Dengue resultando em um fragmento de 511 pb do cDNA, comum aos 4 sorotipos virais.	14
Figura 8. Gel de agarose 2.0% mostrando os produtos da segunda reação da RT-PCR para cada sorotipo viral. DENV-1 amplifica um fragmento de 482 pb; o DENV-2, 119 pb; DENV-3, 290 pb e o DENV-4, 392 pb.	15
Figura 9. Visualização em gel de agarose 0.8% dos produtos de PCR do gene citocromo c oxidase II. Poços 1 a 15 : espécimes de <i>Aedes albopictus</i> provenientes do bairro de Engenho do Meio-Recife/PE; M -Marcador de peso molecular λ <i>Hind</i> III.	28
Figura 10. Gel de agarose 0.8% mostrando os produtos da digestão dos fragmentos de PCR do gene citocromo c oxidase II pela enzima de restrição <i>Hinf</i> I. Poços 1 a 8 : espécimes de <i>Aedes albopictus</i> provenientes dos bairros de Jacarepaguá-RJ e Bonança-Moreno (poços 9 a 18); M -Marcador de peso molecular λ <i>Hind</i> III.	29
Figura 11. Zimograma ilustrando os diferentes padrões (haplótipos) de SSCP (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 e H8) do gene mitocondrial citocromo c oxidase II.	30

Figura 12.	Dendrograma calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) mostrando as relações filogenéticas entre os oito haplótipos do gene mitocondrial citocromo c oxidase II. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um bootstrap de 1.000 replicações usando o modelo de distância genética de Kimura 2-parâmetros (1980).	34
Figura 13.	Dendrograma calculado pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA) a partir das diferenciações genéticas entre as populações de <i>Aedes albopictus</i> , baseadas no polimorfismo do gene mitocondrial COII.	37
Figura 14.	Gel de agarose 0.8 % mostrando os produtos de PCR do gene mitocondrial ND4. Poços 1 a 11 : espécimes de <i>Aedes albopictus</i> provenientes de Passos-MG; M -Marcador de peso molecular λ <i>Hind</i> III.	38
Figura 15.	Zimograma ilustrando os diferentes padrões (haplótipos) de SSCP (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10 e H11) do gene mitocondrial ND4.	39
Figura 16.	Dendrograma calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) mostrando as relações filogenéticas entre os onze haplótipos do gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um bootstrap de 1.000 replicações usando o modelo de distância genética de Kimura 2-parâmetros (1980).	43
Figura 17.	Dendrograma calculado pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA) a partir das diferenciações genéticas entre as populações de <i>Aedes albopictus</i> , baseadas no polimorfismo do gene mitocondrial ND4.	46
Figura 18.	Análise em gel de agarose dos produtos da RT-PCR gerados a partir da segunda amplificação com os <i>primers</i> específicos TS1, TS2, TS3 e TS4. Poço 1 -controle negativo; poços 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 11 -amostras negativas para o vírus Dengue; poço 3 -amostra positiva (DENV-1) em <i>Ae. aegypti</i> ; poço 6 -amostra positiva (DENV-3) em <i>Ae. aegypti</i> e poço 12 : controle positivo da reação (DENV-2) . PM - Marcador de peso molecular para os três sorotipos (DENV-1, 2 e 3).	48
Figura 19.	Gel de agarose 2.0% mostrando os produtos da RT-PCR em amostras de <i>Aedes albopictus</i> . Poço 1 -Controle negativo; poços 2, 3, 4, 5, 6 e 7 -amostras negativas para o vírus Dengue; poço 8 -amostra positiva (DENV-1); poço 9 -controle positivo (DENV-3). PM - Marcador de peso molecular para os três sorotipos (DENV-1, 2 e 3).	49

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Localização dos sítios de coleta das amostras de <i>Aedes albopictus</i> .	20
Tabela 2. <i>Primers</i> usados na técnica de RT-PCR para identificação dos diferentes sorotipos do vírus Dengue e suas respectivas seqüências.	27
Tabela 3. Número de indivíduos observados para cada haplótipo do gene COII nas populações de <i>Aedes albopictus</i> .	31
Tabela 4. Frequências dos diferentes haplótipos do gene COII encontrados entre as seqüências analisadas nas populações de <i>Aedes albopictus</i> .	32
Tabela 5. Índices de polimorfismos do gene COII em populações de <i>Aedes albopictus</i> .	33
Tabela 6. Distância genética baseada no modelo de Kimura 2-parâmetros (1980) entre os diferentes haplótipos do gene COII de <i>Aedes albopictus</i> .	34
Tabela 7. Matriz de diferenciação genética entre populações de <i>Aedes albopictus</i> , baseada no polimorfismo do gene COII calculada a partir do método da estatística F.	36
Tabela 8. Número de indivíduos observados para cada haplótipo do gene ND4 nas diferentes populações de <i>Aedes albopictus</i> .	40
Tabela 9. Frequências dos diferentes haplótipos do gene ND4 encontrados entre as seqüências analisadas nas populações de <i>Aedes albopictus</i> .	41
Tabela 10. Índices de polimorfismos do gene ND4 em populações de <i>Aedes albopictus</i> .	42
Tabela 11. Distância genética baseada no modelo de Kimura 2-parâmetros (1980) entre os diferentes haplótipos do gene ND4 <i>Aedes albopictus</i> .	44
Tabela 12. Matriz de diferenciação genética entre populações de <i>Aedes albopictus</i> , baseada no polimorfismo do gene ND4 calculada a partir do método da estatística F.	45
Tabela 13. Prevalência da infecção pelo vírus Dengue em amostras de <i>Aedes</i> spp. coletadas na Região Metropolitana do Recife, no período de Março/2004 a Janeiro/2006 estimada pelo método <i>Pool Screen</i> .	51

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

- cDNA (Complementary DNA) → DNA complementar;
- COII → Citocromo c oxidase II;
- DENV (Dengue virus) → vírus Dengue;
- DNA → cido desoxirribonucléico;
- DNAm_t → DNA mitocondrial;
- dNTP (deoxynucleotide triphosphates) → Dinucleotídeo trifosfato
- DTT (Dithiothreitol)
- KCl → Cloreto de potássio
- L1 → Larva de primeiro estdio;
- L2 → Larva de segundo estdio;
- L3 → Larva de terceiro estdio;
- L4 → Larva de quarto estdio;
- mM → Milimolar (10^{-3} molar);
- μ l → Microlitros (10^{-6} litros);
- M → Molar;
- MgCl₂ → Cloreto de magnésio;
- MIR (Minimum Infection Rate) → Taxa de infecção mínima;
- NaCl → Cloreto de sódio;
- NaOH → Hidróxido de sódio;
- ND4 → Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4;
- ng → nanogramas (10^{-9} g)
- pb → pares de bases;
- PCR (Polymerase Chain Reaction) → Reação em Cadeia da DNA Polimerase;
- PFU → Unidade formadora de placa;

- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) → Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente;
- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) → Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição;
- RNA → Ácido ribonucleico;
- RNAr → RNA ribossomal;
- RNAt → RNA transportador;
- rpm → Rotações por minuto
- RT-PCR → PCR por Transcriptase Reversa;
- SNP → (Single Nucleotide Polymorphism) → Polimorfismo de sítio único;
- SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) → Polimorfismo de conformação da fita simples;
- U → unidades

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	xi
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. O <i>Aedes albopictus</i> (SKUSE, 1894).	03
2.2. Importância Médica	05
2.3. Variabilidade genética em culicídeos vetores	06
2.4. SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples)	07
2.5. DNA Mitocondrial	09
2.6. Vigilância Epidemiológica	12
III. JUSTIFICATIVA	17
IV. PERGUNTA CONDUTORA	18
V. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo Geral	18
5.2. Objetivos Específicos	18
VI. MATERIAIS E MÉTODOS	19
6.1. Variabilidade genética do DNAm	19
6.1.1. Amostragem	19
6.1.2. Extração de DNA	19
6.1.3. PCR do gene citocromo c oxidase II (COII)	20
6.1.4. PCR do gene nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4 (ND4)	21

6.1.5. Reação de digestão (RFLP ou Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição)	21
6.1.6. SSCP ou Polimorfismo de Conformação da Fita Simples	22
6.1.7. Reação de sequenciamento	22
6.1.8. Análise estatística	22
6.2. Isolamento e identificação do vírus Dengue em mosquitos do gênero <i>Aedes</i>	23
6.2.1. Amostragem	23
6.2.2. Considerações éticas	24
6.2.3. Isolamento viral em cultura de células C6/36	24
6.2.4. Extração de RNA	25
6.2.5. RT-PCR (PCR por Transcriptase Reversa)	26
VII. RESULTADOS	28
7.1. Polimorfismo do gene COII	28
7.2. Polimorfismo do gene ND4	38
7.3. Detecção do vírus Dengue em amostras de <i>Aedes sp.</i> através da RT-PCR	47
7.4. Isolamento do vírus Dengue em amostras de <i>Aedes sp.</i> através da cultura de células C6/36	49
VIII. DISCUSSÃO	52
IX. CONCLUSÕES	58
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
XI. ANEXO I (Termo de Consentimento)	66
XII. ANEXO II (Comitê de Ética)	68
XIII. ARTIGO	70

I. INTRODUÇÃO

O *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894), conhecido como “tigre asiático”, é um mosquito oriundo das florestas tropicais do sudeste da Ásia (SMITH, 1956). Durante décadas, este mosquito se dispersou rapidamente e, atualmente, pode ser encontrado na África, Ásia, Europa e Américas (Norte e Sul) (GRATZ, 2004). Nas Américas, este culicídeo foi detectado pela primeira vez em Houston, Texas em 1985. Em 1989, já se encontrava em 18 estados dos Estados Unidos da América (RAI, 1991). No Brasil, o *Aedes albopictus* foi observado pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro (FORATTINI, 1986). No mesmo ano, a espécie já era encontrada em Minas Gerais e em São Paulo e, no ano seguinte, no Espírito Santo. A disseminação do *Ae. albopictus* nas Américas pode ter ocorrido, principalmente, devido ao transporte de pneus usados com o Japão que proporcionou uma mecanismo ideal de dispersão das formas imaturas deste culicídeo (REITER; SPRENGER, 1987).

Desde a sua introdução no Brasil, observa-se uma crescente e acelerada expansão do *Ae. albopictus*, onde apenas sete estados brasileiros ainda não relataram infestação por essa espécie: Amapá, Acre, Roraima, Tocantins, Ceará, Piauí e Sergipe (SANTOS, 2003). Na Região Metropolitana do Recife (RMR), o primeiro registro do *Aedes albopictus* ocorreu em áreas remanescentes de Mata Atlântica, no ano de 1999 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2000). Em 2002, a presença desta espécie foi detectada em nove bairros da Região Metropolitana do Recife: Dois Irmãos, Dois Unidos, Cordeiro, Várzea, Ilha do Leite, Afogados, Torre, Ibura e Imbiribeira sendo que em Dois Irmãos e Dois Unidos a prevalência do *Aedes albopictus* superou a do *Aedes aegypti* (ANASTÁCIO, 2002).

A introdução e permanência do *Ae. albopictus* no Brasil podem trazer sérios problemas à saúde pública por vários motivos. Primeiro este mosquito é considerado o principal vetor do dengue em epidemias no Japão, Indonésia, Seychelles, Tailândia, Malásia (HAWLEY, 1988) e, mais recentemente, no Havaí (EFFLER *et al.*, 2005). Em experimentos laboratoriais, o *Ae. albopictus* mostrou-se capaz de transmitir pelo menos 22 tipos de arboviroses, entre elas, dengue e febre amarela (GRATZ, 2004). Esta espécie também foi encontrada infectada naturalmente com o vírus da febre do Nilo Ocidental, podendo estar relacionada com a epidemiologia desta doença nos Estados Unidos (HOLICK *et al.*, 2002).

Apesar deste culicídeo não estar relacionado a nenhuma epidemia no Brasil, larvas de *Ae. albopictus* naturalmente infectadas com o vírus dengue foram encontradas na cidade de Campos Altos (MG) (SERUFO *et al.*, 1993). Estudos anteriores demonstraram em laboratório, que uma linhagem desta espécie proveniente do sudeste do Brasil (Cidade de Cariacica, ES) foi capaz de transmitir todos os quatro sorotipos virais do Dengue e uma cepa do vírus da febre amarela silvestre (MILLER; BALLINGER, 1988). Um estudo sobre suscetibilidade oral em amostras de *Aedes albopictus* do Rio de Janeiro mostrou que esta espécie apresentou uma alta taxa de infecção pelo sorotipo 2 do vírus Dengue quando comparada a uma colônia de *Aedes aegypti* usada como controle (LOURENÇO DE OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Um segundo fator relevante é que devido à sua ampla valência ecológica, este culicídeo se adapta facilmente aos ambientes rural, urbano e peri-urbano, podendo servir de elo entre os ciclos silvestre e urbano da febre amarela. O terceiro fator importante é a sua capacidade de transmitir o vírus verticalmente, através de ovos infectados, possibilitando estabelecer novos focos de dengue com a importação de materiais que contenham ovos infectados. Em 1995, o vírus Dengue foi isolado em machos de *Ae. albopictus* provenientes do México, sugerindo uma transmissão transovariana entre a espécie (IBANEZ-BERNAL *et al.*, 1997). Posteriormente, Castro *et al.* (2004) demonstraram que a alta taxa de infecção pelo sorotipo 2 do vírus Dengue e a transmissão para a progênie em uma linhagem brasileira do *Ae. albopictus* reforça a hipótese que esta espécie pode ter um papel fundamental na manutenção do vírus dengue na natureza, podendo ser uma ameaça aos programas de controle deste país.

Por essas razões, o conhecimento mais aprofundado da biologia do vetor (estruturação genética e dinâmica populacional) e o monitoramento dos sorotipos virais circulantes na espécie são fatores cruciais para o estabelecimento de estratégias de controle mais eficientes. Apesar de sua importância epidemiológica, são poucos os estudos no Brasil que revelem o padrão de dispersão deste vetor e sua implicação na transmissão do Dengue.

Sendo assim, a presente proposta visa analisar a diversidade genética e estrutura populacional do *Aedes albopictus* em três populações naturais do Brasil através da análise do DNA mitocondrial e monitorar os sorotipos circulantes nas populações do vetor na Região Metropolitana do Recife (RMR) através da RT-PCR e do isolamento viral em cultura de células C6/36.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894).

O *Aedes albopictus* é um díptero da família Culicidae, pertencente à subfamília Culicinae que na sua forma adulta apresenta tórax enegrecido, freqüentemente ornamentado com manchas, faixas ou desenhos de escamas claras, geralmente branco-prateadas (Figura 1). De hábito diurno, o *Ae. albopictus* é muito eclético quanto ao hospedeiro, sendo o homem e as aves os mais freqüentes. Pode ser encontrado no interior do domicílio, porém é mais comum no peridomicílio.



Fonte: www1.odn.ne.jp/.../images/t-Aedes_albopictus.gif

Figura 1: Fêmea do *Aedes albopictus* durante o repasto sangüíneo.

Assim como o *Aedes aegypti*, o *Ae. albopictus* pode ser encontrado tanto em criadouros naturais (internódios de bambu, buracos em árvores, casca de frutas) quanto em criadouros artificiais (Figura 2). Os criadouros artificiais, por sua vez, podem ser tanto aqueles abandonados pelo homem a céu aberto quanto os de uso doméstico para armazenamento de água. Como exemplos de criadouros artificiais podemos citar: pneus, latas, caixas d'água, piscinas. Nesses criadouros, as fêmeas depositam seus ovos, isoladamente, em um substrato úmido, próximo à água ou em local inundável (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).



Figura 2: Criadouros naturais e artificiais do *Aedes albopictus*.

Em países de climas temperados, os ovos de *Ae. albopictus* podem sobreviver por vários meses durante o inverno. Esta capacidade deve-se a um fenômeno denominado diapausa que é caracterizado pela suspensão de função e desenvolvimento desses ovos. Nos culicídeos, este fenômeno ocorre quando a larva de primeiro estágio já está formada sendo presente nas populações de clima temperado e ausente nas populações de clima tropical. Os ovos com desenvolvimento completo, quando colocados em contato com a água, desencadeiam o processo de eclosão das larvas dando início ao ciclo de desenvolvimento (HAWLEY *et al.*, 1989).

O ciclo de desenvolvimento do *Ae. albopictus* compreende quatro estágios: ovo, larva (4 estágios: L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto (Figura 3). O crescimento e o desenvolvimento das larvas variam com a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro. Este ciclo geralmente se desenvolve em um curto espaço de tempo, podendo variar entre 10 e 15 dias, contribuindo para o aumento da densidade populacional desta espécie.

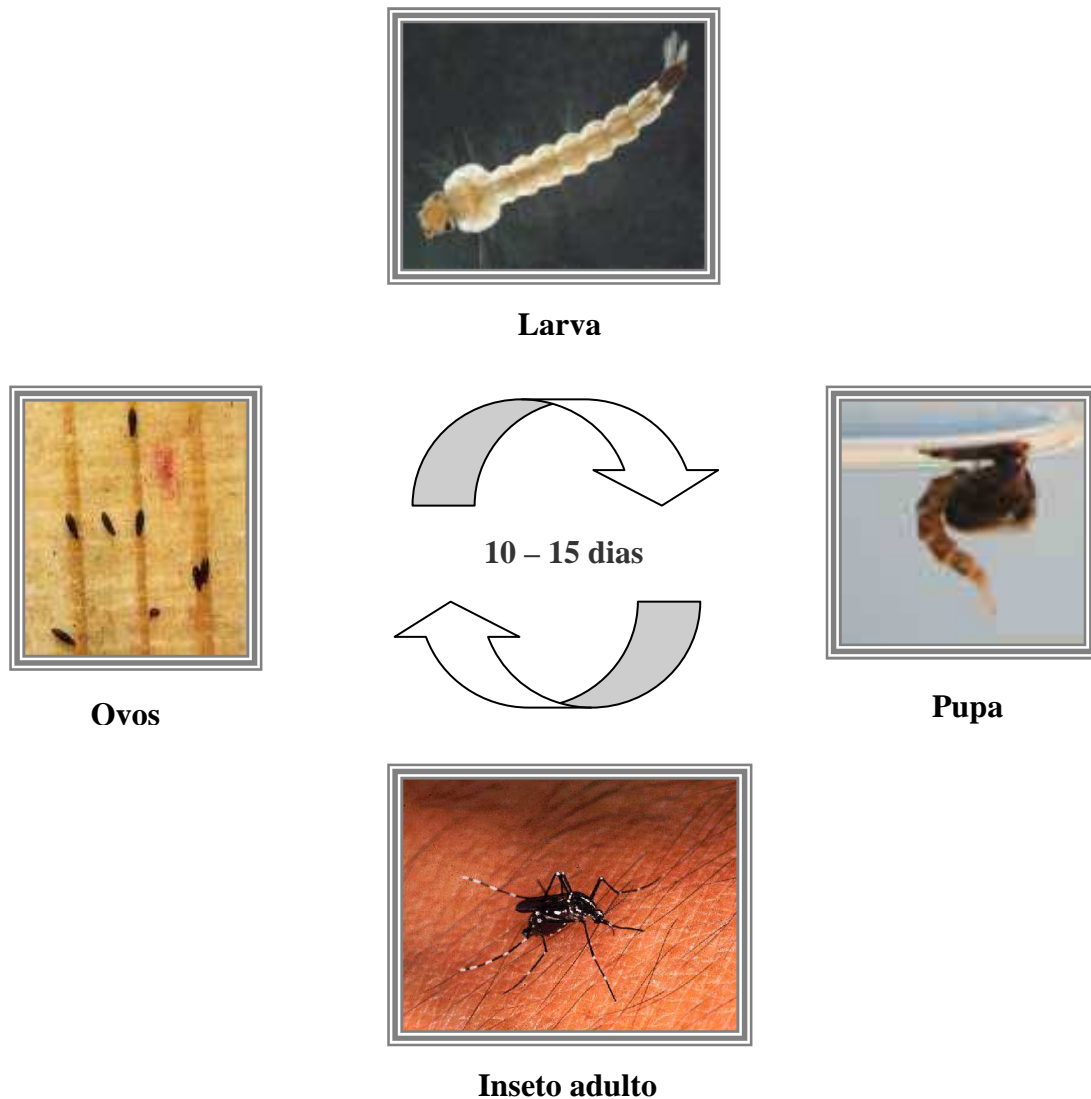


Figura 3. Ilustração do ciclo evolutivo do *Aedes albopictus*.

2.2. Importância Médica

Segundo Mitchell (1995), uma espécie só poderá ser considerada vetor de uma determinada arbovirose se: 1) ocorrer o isolamento do vírus em estudo em espécimes coletados diretamente da natureza; 2) for demonstrado que o mosquito se infectou após uma alimentação artificial utilizando o sangue de um hospedeiro na fase de viremia ou uma suspensão de vírus; 3) for demonstrado que o vírus pode ser transmitido para um hospedeiro através de uma picada ou se for encontrado vírus nas glândulas salivares do mosquito e 4) ocorrerem evidências em campo confirmando uma associação entre a

espécie de mosquito estudada e a população de vertebrados na qual a infecção viral esteja ocorrendo.

Apesar do *Ae. albopictus* não ser considerado um vetor de arboviroses no Brasil, estudos demonstraram que em condições laboratoriais esta espécie é capaz de transmitir 22 tipos de arboviroses. Dentre as mais importantes estão a dengue (incluindo os quatro sorotipos), febre amarela, Chikungunya e Ross River (GUBLER *et al.*, 2001), e mais recentemente, o vírus da Febre do Nilo Ocidental, o qual foi isolado em espécimes de *Ae. albopictus* coletados em campo na Pensilvânia (HOLICK *et al.*, 2002).

2.3. Variabilidade genética em culicídeos vetores

A caracterização das variações genéticas no nível molecular pode ser feita através de marcadores moleculares. Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de uma sequência de DNA, correspondente a uma região codificante ou não (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Um marcador para ser considerado bom e informativo deve ser: 1) variável; 2) abundante; 3) de comportamento previsível quanto à taxa de mutação, padrão de herança e localização cromossômica e 4) fácil de analisar. Os marcadores mais empregados são: Isoenzimas, Polimorfismo de DNA Amplificado Randomicamente (RAPD), Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP), Microssatélites, SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples) e Sequenciamento do DNA mitocondrial (DNAm) e de genes de RNA ribossomal (RNAr). Alguns desses marcadores serão descritos a seguir.

O estudo da variabilidade genética em populações naturais de *Aedes albopictus* através de marcadores moleculares tem sido utilizado com o objetivo de entender a dinâmica populacional desta espécie recém introduzida. Urbanelli *et al.* (2000) analisaram através da técnica de aloenzimas a estrutura genética de 18 populações de *Ae. albopictus* provenientes da Itália em comparação com duas populações dos Estados Unidos, 4 populações do Japão e 4 populações da Indonésia. Dos 18 *loci* estudados entre as populações da Itália, 15 apresentaram polimorfismo, sugerindo a presença de deriva genética local. A colonização desta espécie na Itália pode ter ocorrido de maneira semelhante à que ocorreu nos Estados Unidos, com amplas e repetidas introduções. Um dos fatores que reforçam esta hipótese é a similaridade genética existente entre as

populações da Itália e dos Estados Unidos, em decorrência do intenso transporte de pneus entre os dois países.

Ayres *et al.* (2002) utilizaram a técnica de RAPD em populações de *Ae. albopictus* provenientes de três estados do Brasil (Rio de Janeiro, Minas Gerais e Pernambuco) para estimar os níveis de variabilidade genética e fluxo gênico entre essas populações. Os autores concluíram que as populações do Rio de Janeiro e Minas Gerais eram mais similares geneticamente quando comparadas às populações de Pernambuco. Concluíram também que a variabilidade genética observada nas populações brasileiras locais era resultante de um balanço entre a deriva genética e um fluxo gênico restrito nessas populações.

Em 2003, Lourenço de Oliveira *et al.* analisaram a diversidade genética entre populações de *Ae. albopictus* provenientes do Brasil, dos Estados Unidos e das Ilhas Caiman, usando como marcador molecular as isoenzimas. Os autores concluíram que tanto as populações do Brasil quanto a dos Estados Unidos eram altamente diversificadas. Esta diversidade foi mais significativa entre as amostras coletadas dentro de uma mesma cidade, resultante de um fluxo gênico restrito.

2.4. SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples)

A técnica de SSCP detecta mutações pontuais na molécula de DNA. Esta técnica é baseada no princípio de que a mobilidade de uma fita simples da molécula de DNA no gel durante a eletroforese depende tanto do seu tamanho quanto da conformação que assume. O número de conformações é formado quando ocorre um segundo pareamento entre as bases da fita simples. As mutações pontuais que afetam as interações intramolécula devem, no entanto, mudar a conformação da molécula alterando a mobilidade durante a eletroforese (HISS *et al.*, 1994) (Figura 4). Em um estudo de sensibilidade da técnica, Hayashi (1991) concluiu que o SSCP pode detectar 99% das mutações pontuais nas moléculas de DNA com tamanho variando entre 100 e 300 pares de bases (pb). Nas moléculas de DNA que possuem um tamanho que varia de 350 a 450 pb, o SSCP conseguiu detectar até 89% das mutações pontuais.

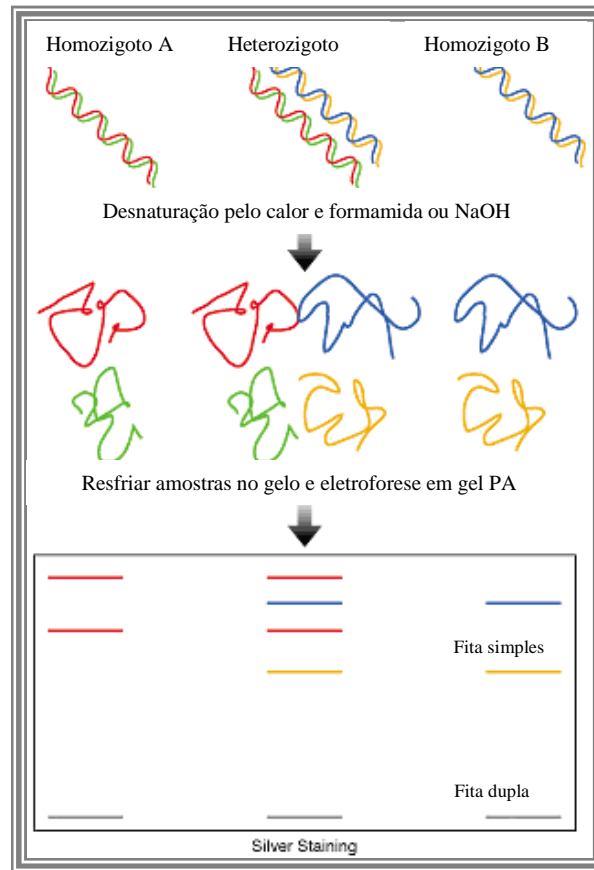


Figura 4: Ilustração do princípio da técnica de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

A técnica de SSCP é bastante usada como um marcador molecular na identificação de espécies crípticas, na diferenciação de espécies que são morfológicamente semelhantes, além de permitir uma análise rápida e de baixo custo. No trabalho de Koekemoer *et al.* (1999), a técnica de SSCP foi usada para distinguir 4 membros do grupo *Anopheles funestus*. Apesar das espécies deste grupo serem morfológicamente semelhantes, elas exibem diferenças quanto à sua capacidade de transmitir doenças ao homem. Os resultados mostraram que cada espécie do grupo exibiu padrões de bandas diferentes no gel, demonstrando que a técnica é bastante eficaz na identificação destas espécies crípticas. Fulton *et al.* (2001) demonstraram a eficácia da técnica na construção de mapas de ligação do mosquito *Aedes aegypti* através da identificação de polimorfismos de sítio único (SNP-Single Nucleotide Polymorphism) com marcadores de DNA complementar (cDNA).

Em estudos sobre variabilidade genética através da análise do DNA mitocondrial, o SSCP é usado na identificação dos diferentes haplótipos encontrados para, posteriormente, serem seqüenciados e estas seqüências analisadas segundo os índices de genética de populações, como fluxo gênico, distância genética e diversidade nucleotídica. Hodgkinson *et al.* (2002) analisaram o polimorfismo do gene da citocromo B do DNA mitocondrial de *Lutzomyia longipalpis* através do SSCP e concluíram que a técnica aumentou a eficiência na detecção da variabilidade do gene com a identificação dos diferentes haplótipos possibilitando, desta forma, uma análise de um maior número de amostras em menos tempo.

2.5. DNA Mitocondrial

O DNA mitocondrial (DNAMt) foi descoberto em 1960 e, desde então, tem sido usado como uma ferramenta importante na análise de genética de populações de insetos. A organização desta molécula é relativamente simples, sendo constituída por uma dupla fita circular contendo 37 genes, dos quais 2 codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam RNAs transportadores e 13 codificam proteínas. Além destes genes, todo DNA mitocondrial possui uma região não-codificante, que é responsável pelo controle da replicação e transcrição do genoma da mitocôndria. Esta região, denominada Região Controle ou D-Loop é extremamente rica em adenina e timina, sendo também conhecida como região rica em A+T (HOY, 2003) (Figura 5).

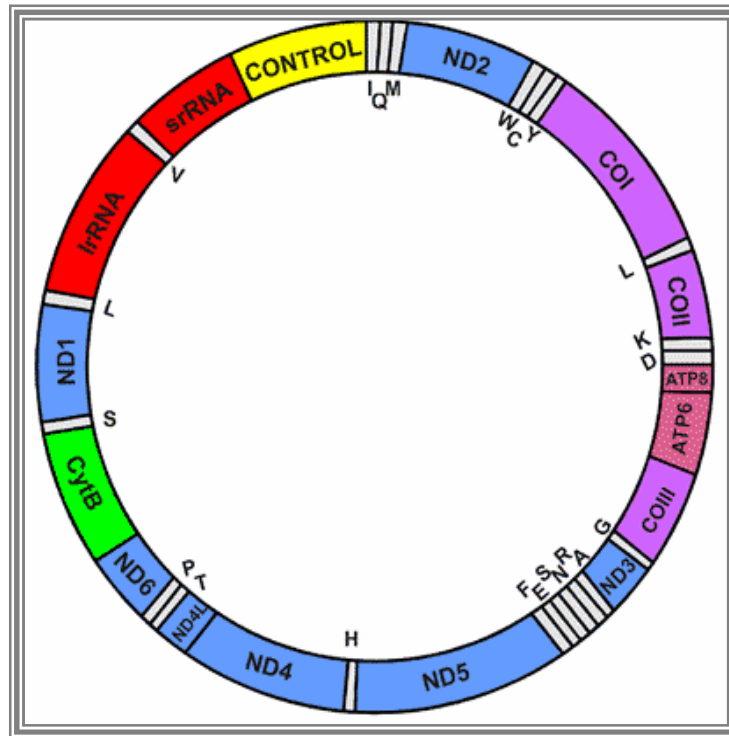


Figura 5: Organização do DNA mitocondrial com seus genes codificantes e a região controle (*Control*). IrRNA, subunidade ribossomal grande; srRNA, subunidade ribossomal pequena; ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6, subunidades da NADH desidrogenase; Cyt b, citocromo b; COI, COII e COIII, subunidades da citocromo c oxidase; ATP6 e ATP8, subunidades ATPase.

O genoma mitocondrial é herdado matematicamente não sofrendo, portanto recombinação. A herança materna do DNA mitocondrial possibilita que esta molécula seja usada como um importante marcador molecular com o objetivo de traçar a história evolutiva de uma determinada espécie e determinar a filogenia entre as populações existentes, independente de terem sofrido efeitos de adaptação e/ou seleção (TABACHNICK; BLACK IV, 1996). Outra característica importante do DNA mitocondrial, além da simples organização da sua molécula e da herança materna é a sua alta taxa de evolução. O DNA mitocondrial evolui 10 vezes mais rápido que o DNA nuclear, pois não existem mecanismos de reparo nesta molécula, facilitando o acúmulo de mutações. Por essa razão, as variações intraespecíficas são facilmente detectadas (RAI, 1991).

Apesar desta alta taxa de evolução, os indivíduos apresentam normalmente um tipo de molécula de DNAm em todas as células de todos os tecidos. Embora exista uma

homogeneidade qualitativa das moléculas de DNAm em um mesmo indivíduo, existe uma diferença entre a taxa de acúmulo de mutações entre os diferentes genes ou regiões desta molécula. Os genes codificadores das subunidades da NADH desidrogenase, citocromo c oxidase e RNAt são os genes que acumulam mais rapidamente as substituições de bases. Porém, os genes codificadores para as unidades ribossômicas e para o citocromo b estão entre os genes mais conservados do genoma mitocondrial. As regiões A+T ou D-loop são as mais variáveis, podendo acumular mutações do tipo substituições de bases ou inserção/deleção. As inserções e/ou deleções podem levar a uma alteração no tamanho da molécula (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001).

Neste trabalho, destacaremos dois genes do genoma mitocondrial: Citocromo C oxidase subunidade II (COII) e Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4 (ND4). Ho *et al.* (1995) analisaram a diversidade genética do gene COII em amostras de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* coletadas em Taiwan, encontrando uma homologia de 88% entre as seqüências nucleotídicas estudadas e uma homologia de 95% quando analisados os aminoácidos correspondentes destas seqüências. Jinfu e Chaohui (2002) também analisaram a variabilidade genética do COII nas espécies *Anopheles sinensis*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes albopictus*. Entre essas espécies foi detectada uma homologia de 82% entre as seqüências nucleotídicas, enquanto que os aminoácidos correspondentes apresentaram um grau de similaridade de 85%. Cook *et al.* (2005) utilizaram o gene da COII e da COI para caracterizar *Aedes furcifer* Edwards e *Aedes taylori* Edwards, duas espécies de mosquitos responsáveis pela transmissão de arboviroses no Senegal. As variações detectadas entre as seqüências serviram como base para desenvolver um sistema de identificação destas duas espécies através da técnica de RFLP usando enzima de restrição.

Em relação ao gene mitocondrial ND4, Gorrochotegui – Escalante *et al.* (2002) compararam populações de *Ae. aegypti* de várias regiões do México estudando o polimorfismo deste gene para estabelecer a estrutura de reprodução desta espécie. Os autores detectaram que o padrão de estruturação desta espécie varia por região. Bosio *et al.* (2005) caracterizaram a estrutura genética de populações de *Aedes aegypti* na Tailândia utilizando a técnica de SSCP do gene ND4. Os autores concluíram que a estruturação desta espécie não varia por região, ao contrário do que aconteceu no México. Este resultado pode ter ocorrido por três fatores: o transporte destes mosquitos através das atividades humanas pode ter aumentado a similaridade genética entre as

populações geograficamente distantes. Um outro fator que poderia ter influenciado no padrão genético dessas populações seria o efeito da deriva genética, processo estocástico que alterou a variabilidade dessas populações independente das distâncias geográficas. E um terceiro fator, seriam os efeitos dos esforços no controle destes mosquitos levando essas populações locais a sofrerem o efeito de “gargalo de garrafa” afetando profundamente a variabilidade genética.

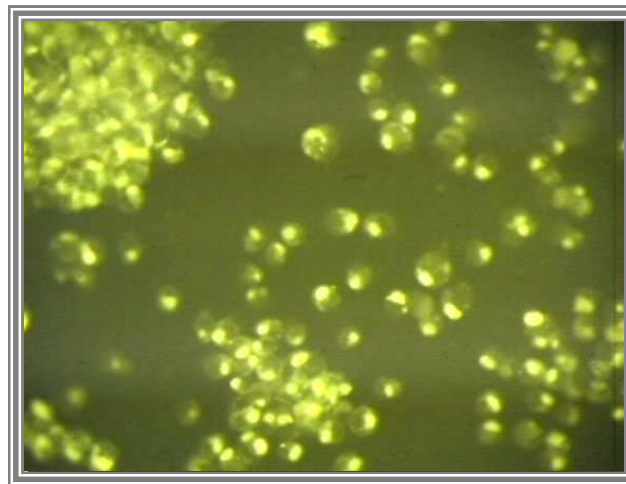
2.6. Vigilância Epidemiológica

A dengue é uma das mais importantes arboviroses transmitidas por insetos vetores na atualidade. Estima-se que 50 milhões de pessoas são infectadas por ano com, aproximadamente, 500.000 casos de dengue hemorrágica confirmados e pelo menos 12.000 mortes em decorrência desta doença. O aumento da densidade populacional e conseqüentemente a falta de infra-estrutura que não oferece condições satisfatórias de habitação e de saneamento para toda a população, principalmente nos países em desenvolvimento, contribui substancialmente para o aumento do número de criadouros de culicídeos do gênero *Aedes*. Outros fatores que contribuem para a expansão desses mosquitos são a falta de um programa de controle de vetores efetivo e o aumento do transporte aéreo, permitindo a dispersão de ovos infectados (GUBLER, 1998).

A vigilância epidemiológica envolve uma seqüência de ações que dependem da situação epidemiológica do município. Nos municípios com transmissão endêmica de dengue, o objetivo da vigilância epidemiológica é fornecer as informações necessárias sobre a situação epidemiológica do município para interromper a transmissão viral, através da diminuição da infestação e/ou eliminação do *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus*, visando impedir o aparecimento da dengue hemorrágica, já que nessa área a população está sensibilizada por um ou mais sorotipos do vírus. Esta vigilância deve ser realizada de forma contínua, principalmente nos períodos interepidêmicos, onde também existe a circulação do vírus Dengue (FOUQUE; GARINCI; GABORIT, 2004). O monitoramento e identificação dos diferentes sorotipos circulantes, tanto em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica da doença, bem como em mosquitos coletados em campo ou através de armadilhas de oviposição, constituem uma ferramenta importante na vigilância epidemiológica do dengue. Essas ações podem ser relevantes para determinar a magnitude e severidade das epidemias (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Neste trabalho, empregamos duas técnicas para detecção dos sorotipos circulantes em

amostras de *Aedes* spp.: o isolamento de vírus em culturas de células C6/36 e a técnica de PCR por transcriptase reversa(RT-PCR).

Existem quatro métodos utilizados na rotina de isolamento viral do Dengue, são eles: inoculação intracerebral em camundongos, inoculação em cultura de células de mamíferos, inoculação do vírus em mosquitos e a inoculação de amostras em cultura de células de mosquitos. Em relação à cultura de células de mosquitos são três as linhagens utilizadas para esta prática: clone C6/36 (*Aedes albopictus*), TRA 284 (*Toxorhynchites amboinensis*) e AP 61 (*Aedes pseudoscutellaris*). Dentre estas linhagens citadas, o clone de células C6/36 de *Aedes albopictus* é a mais usada. A utilização dessas células proporciona um método rápido, sensível e de baixo custo para o isolamento do vírus Dengue. Os antígenos do vírus presentes nas culturas de células infectadas podem ser detectados através da imunofluorescência indireta (Figura 6). Esta técnica é menos sensível que a inoculação intratorácica do vírus em mosquitos adultos, mas devido à capacidade de processar um grande número de amostras ao mesmo tempo, ela tornou-se a técnica padrão para isolamento viral (DE PAULA; FONSECA, 2004).



Fonte: www.cdc.gov/NCIDOD/dvbid/dengue/slideset/spanish/set1/vi/slides14.htm.

Figura 6: Isolamento do vírus Dengue em cultura de células C6/36 (pontos brilhantes) através da reação de imunofluorescência indireta.

A RT-PCR tem sido usada no diagnóstico de diversas doenças e, nos últimos anos, revolucionou o diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas demonstrando ser bastante útil no diagnóstico da dengue (DE PAULA; FONSECA, 2004). Lanciotti *et al.* (1992) desenvolveram uma técnica de RT-PCR com *primers* consenso desenhados para anelar em qualquer um dos 4 sorotipos originando um fragmento de 511 pares de base. Primeiro, uma cópia do cDNA de uma porção do genoma viral é produzida através de uma reação utilizando uma enzima transcriptase reversa (Figura 7) e, posteriormente, é realizada uma PCR padrão usando *primers* específicos para cada sorotipo do Dengue. Com este método, o vírus dengue pode ser detectado logo na fase aguda da doença e, às vezes, durante a fase de convalescença (DE PAULA; FONSECA, 2004). Os produtos são então visualizados em gel de agarose 2.0% (Figura 8).

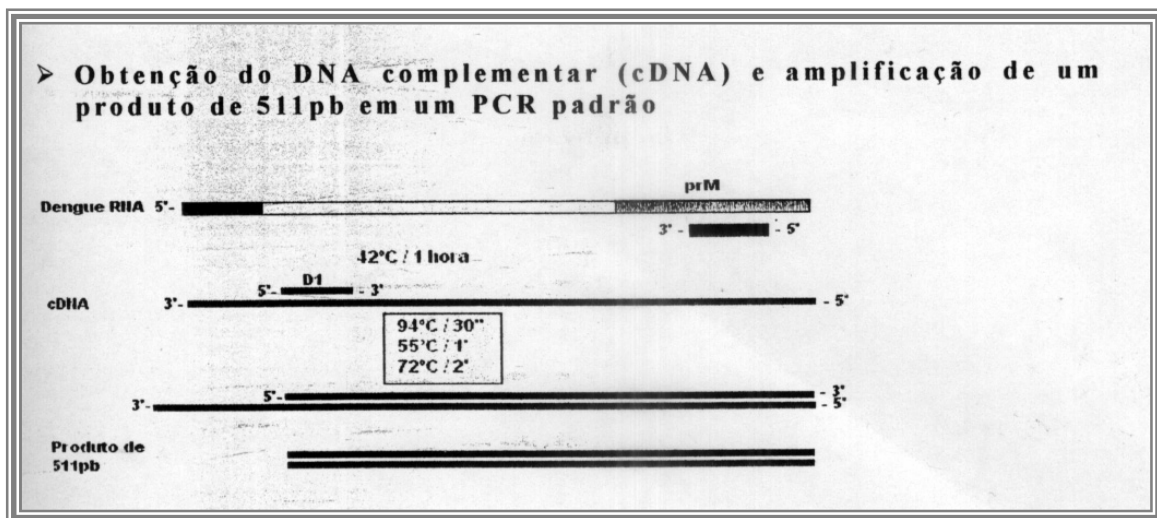
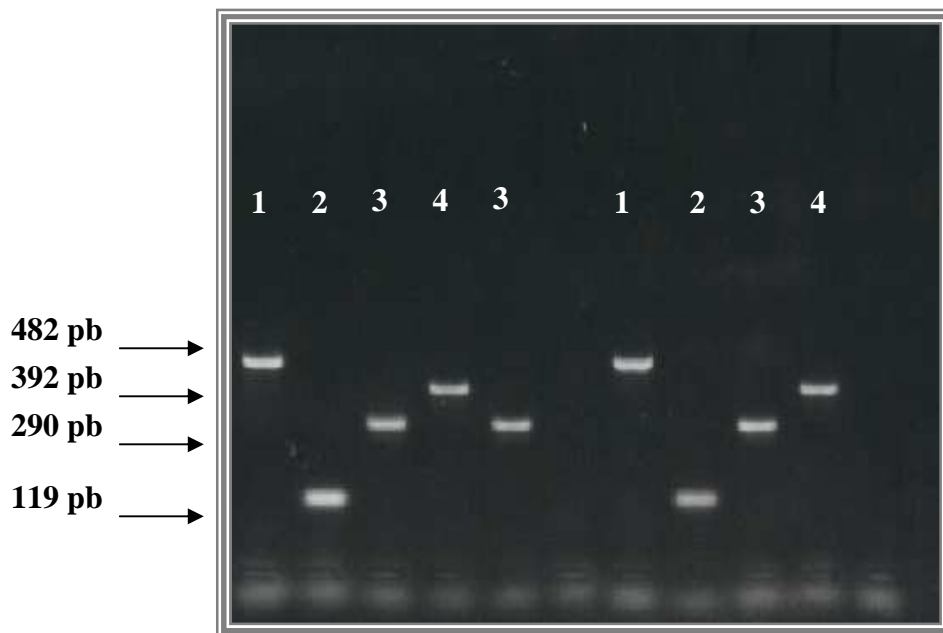


Figura 7: Esquema ilustrando a primeira reação da RT-PCR do vírus Dengue resultando em um fragmento de 511 pb do cDNA, comum aos 4 sorotipos virais.



Fonte: Fotografia gentilmente cedida pela Dra. Marli Tenório (LAVITE, CPqAM/FIOCRUZ).

Figura 8: Gel de agarose 2.0% mostrando os produtos da segunda reação da RT-PCR para cada sorotipo viral. DENV-1 amplifica um fragmento de 482 pb; o DENV-2, 119 pb; DENV-3, 290 pb e o DENV-4, 392 pb.

Diversos trabalhos foram descritos usando a vigilância virológica em mosquitos com o objetivo de elaborar um modelo de prevenção das epidemias de dengue. Chow *et al.* (1998) utilizaram a técnica de RT-PCR para monitorar os sorotipos circulantes em mosquitos do gênero *Aedes* coletados em áreas infectadas pelo Dengue em Singapura. Apesar de o *Ae. aegypti* ser considerado o principal vetor responsável pela transmissão do dengue, o *Ae. albopictus* também se mostrava presente na área urbana de Singapura e poderia desempenhar um papel importante, ainda que secundário. Os resultados mostraram que o *Ae. aegypti* teve um papel importante no começo da epidemia, enquanto que o *Ae. albopictus* desempenhou um papel fundamental na manutenção do vírus circulante após o início da epidemia, favorecendo um aumento do número de casos. Na China, onde o *Ae. albopictus* é o principal vetor da Dengue, Zuo e Shu (2004) realizaram um estudo de isolamento, identificação e análise filogenética de uma linhagem do vírus Dengue coletada na Província de Guizhou. Apesar de não haver nenhuma epidemia de dengue relatada nesta província, o vírus dengue sorotipo 2 proveniente da cidade de Mawei foi isolado através da cultura de células C6/36 e confirmado por ensaio de imunofluorescência indireta e através da RT-PCR.

Em território brasileiro, os dados mostram que existem três sorotipos do vírus Dengue circulando: DENV-1, DENV-2 e DENV-3, com a possibilidade da introdução do sorotipo 4, em razão do intenso transporte aéreo e marítimo entre o Brasil e outros países do continente americano, bem como países de outros continentes afetados pelo DENV-4 (TEIXEIRA *et al.*, 2005). A co-circulação de mais de um sorotipo e o aumento da densidade populacional dos vetores responsáveis pela transmissão da doença são fatores que podem favorecer o risco de mais uma epidemia com um aumento no número de casos de dengue hemorrágica.

III. JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças transmitidas pelo *Ae. albopictus* comprovadas em condições laboratoriais, a dengue é a que desempenha um papel de maior importância no âmbito da saúde pública. Cerca de dois bilhões de pessoas vivem em áreas onde é possível a sua transmissão. Como não existem vacinas nem tratamento específico, a prevenção e o controle dessa epidemia dependem do controle do vetor responsável pela sua transmissão.

Embora o *Ae. albopictus* esteja sujeito às pressões de controle em áreas infestadas pelo *Ae. aegypti*, não é espécie-alvo do controle da dengue. Apesar de não estar claro o efeito que a presença do *Ae. albopictus* possa ter na transmissão do vírus dengue nas Américas, a sua convivência com o *Ae. aegypti* requer atenção, pois esta convivência pode aumentar o risco de uma epidemia urbana em razão do aumento da densidade vetorial. Além disso, a presença do *Ae. albopictus* em áreas silvestres no Brasil favorece o contato entre vetor e outros vírus autóctones, os quais podem evoluir dentro de novos vetores e aumentar a sua patogenicidade e transmissibilidade.

Desta forma, o conhecimento aprofundado sobre a estruturação genética e dinâmica populacional desta espécie é crucial, uma vez que populações geneticamente diferentes podem apresentar diferenças quanto a sua capacidade e competência vetorial. Além disso, o monitoramento dos sorotipos circulantes numa população vetora, durante os períodos epidêmicos e inter-epidêmicos, pode constituir uma alternativa eficaz para prevenir as epidemias.

IV. PERGUNTA CONDUTORA:

Qual o grau de diversidade genética entre as populações naturais de *Aedes albopictus* dos estados de Pernambuco, Rio de Janeiro e Minas Gerais e a taxa de infecção pelo vírus dengue em populações naturais de *Aedes albopictus* nas populações da Região Metropolitana do Recife (RMR)?

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral:

- Conhecer a diversidade genética e estrutura populacional em populações naturais de *Ae. albopictus* e avaliar o seu possível papel como vetor da Dengue.

5.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar o grau de variabilidade genética nas populações naturais de *Ae. albopictus*, utilizando marcadores genéticos de herança materna;
- Caracterizar a estrutura genética das populações de *Ae. albopictus*;
- Descrever a diversidade genética em genes mitocondriais do *Ae. albopictus*;
- Identificar e isolar sorotipos virais do Dengue, circulantes nas populações naturais deste mosquito na RMR (caso ocorra a transmissão por este vetor);
- Estimar a taxa de infecção pelo vírus Dengue em amostras de *Aedes* spp. coletadas na RMR.

VI. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Variabilidade genética do DNAm

6.1.1. Amostragem

As amostras de *Ae. albopictus* foram coletadas em 10 localidades do estado de Pernambuco (PE), 2 localidades do Rio de Janeiro (RJ) e 1 localidade de Minas Gerais (MG). As amostras provenientes do estado de PE foram obtidas através de armadilhas de oviposição (ovitrapas) adaptadas do modelo de Fay e Perry (1965). Os ovos, larvas e pupas foram mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) sob condições padrão (temperatura, 26°C ± 1°C; umidade relativa do ar de 60 a 80% e fotoperíodo 12:12 h C/E) até a fase adulta do inseto. Estes, por sua vez, foram sacrificados em câmara fria (-70°C) e, posteriormente, mantidos em microtubos separados por localidade de origem em freezer a -20°C até sua utilização. As amostras provenientes dos estados do RJ e MG foram gentilmente cedidas pelo biólogo Marcelo Carvalho de Rezende, credenciado pela FUNASA ao Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). A procedência das amostras está mostrada na tabela 1.

6.1.2. Extração de DNA

Os DNAs genômicos foram extraídos de acordo com o protocolo descrito por Ayres *et al.* (2002). A extração foi realizada de acordo com as etapas descritas a seguir.

Insetos individuais foram macerados em 400 µl de tampão de lise (NaCl 0,4 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 2 mM, pH 8,0), 7,0 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 72 µl de SDS 10%. O macerado foi, então, incubado a 65°C “overnight”. Após a adição de 420 µl de NaCl 5M à suspensão, a mistura foi homogeneizada por 1 min, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 20 min. O DNA foi precipitado do sobrenadante pela adição de igual volume de isopropanol, incubado a -20°C por 1 hora e centrifugado a 14.000 rpm por 20 min. O pellet foi, finalmente, lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em 300 µl de TE (TRIS-EDTA, 10:1 mM). Após a extração, as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até sua utilização nas reações de PCR. A qualidade e quantidade do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% utilizando-se marcador de peso molecular λ Hind III por comparação da intensidade das bandas.

Tabela 1: Localização dos sítios de coleta das amostras de *Aedes albopictus*.

Estado	Localidade/Município	Nº de amostras processadas para análise de variabilidade genética
Minas Gerais	Passos	20
	Campo Grande/ Recife	20
	Casa Forte/ Recife	50
	Dois Irmãos/ Recife	50
	Engenho do Meio/ Recife	50
	Morro da Conceição/ Recife	50
Pernambuco	Parnamirim/Recife	18
	Sucupira/ Jaboatão	21
	Bonança / Moreno	53
	Cohab/ Moreno	40
	Nossa Senhora de Fátima/Moreno	56
Rio de Janeiro	Manguinhos	19
	Jacarepaguá	14
Total		461

6.1.3. PCR do gene citocromo c oxidase II (COII)

As reações de PCR foram realizadas seguindo o protocolo de Ho *et al.* (1995). Em um volume final de 25 µl, foi usada a seguinte mistura: 0.2 mM de cada dNTP, 15 µM de cada *primer* (Forward: 5'-AGATTATTATCTTTTATAAGA-3', Reverse: 5'-TTGCTTTCAGTCATCTAATG-3'), 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 2.5 µl de Tampão (Tris-HCl 200 mM pH 8.4 e KCl 200 mM), MgCl₂ 2 mM, Albumina Sérica Bovina (BSA) 0.1% e 3 ng do DNA molde. A mistura foi amplificada em um termociclador (BIOMETRA-Thermo Trio Block) programado para 1 ciclo a 94°C por 5 min; 5 ciclos a 94°C por 1 min, 47°C por 45 s, 72°C por 30 s; 30 ciclos a 94°C por 1 min, 47°C por 1 min, 72°C por 1 min e um ciclo final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão Tris-

Borato-EDTA (TBE) (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M e EDTA 0,002 M, pH 8,3), corado com brometo de etídeo e fotografado em um transiluminador de ultravioleta.

6.1.4. PCR do gene nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4 (ND4)

As reações de PCR foram realizadas seguindo o protocolo de Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2000). Em um volume final de 25 µl, foi usada a seguinte mistura: 0.25 mM de cada dNTP, 0.3 µM de cada *primer* (Forward: 5'-GTDYATTTATGATTRCCTAA-3', Reverse: 5'-CTTCGDCTTCCWADWCGTTC-3'), 1.5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 2.5 µl de Tampão (Tris-HCl 200 mM pH 8.4 e KCl 200 mM), MgCl₂ 2 mM, BSA 0.1% e 5 ng do DNA molde. A mistura foi amplificada em um termociclador (BIOMETRA-Thermo Trio Block) programado para 1 ciclo a 95°C por 5 min; 10 ciclos a 92°C por 1 min, 48°C por 1 min; 72°C por 2 min; 32 ciclos a 92°C por 1 min, 50°C por 35 s, 72°C por 2 min e um ciclo final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M e EDTA 0,002 M, pH 8,3), corado com brometo de etídeo e fotografado em um transiluminador de ultravioleta.

6.1.5. Reação de digestão (RFLP ou Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição)

Os produtos de PCR do gene COII foram submetidos a uma digestão com enzimas de restrição. Esta digestão teve a finalidade de diminuir o tamanho do fragmento de PCR, aumentando assim, a sensibilidade da técnica de SSCP na detecção do maior número de mutações possíveis. Estas enzimas foram selecionadas através da construção do mapa de restrição da seqüência usando o Map Draw, ferramenta do programa DNA star versão Windows 3.85 (1989-1995). Estas reações foram realizadas em um volume final de 20 µl, usando a seguinte mistura: 4,0 µl do tampão próprio para a enzima de restrição estudada, 2U da enzima *Hinf* I (Invitrogen) para cada 20 ng de DNA e 8 µl do produto de PCR. A digestão foi mantida a 37°C por 4 horas.

6.1.6. SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples)

O protocolo da técnica de SSCP seguiu o protocolo de Hiss *et al.* (1994) com modificações no que diz respeito à coloração com prata.

Na reação de COII, para cada 20 µl da reação de digestão foram retirados 10 µl e transferidos para um microtubo de 500 µl contendo 5 µl de tampão de amostra (NaOH 10 mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%). Na reação de ND4, para cada 25 µl do produto de PCR foram retirados 3 µl da reação e transferido para um microtubo de 500 µl contendo 10 µl do tampão de amostra (NaOH 10mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol 0,05%).

Estas misturas foram aquecidas a 95°C por 6 minutos para desnaturação da dupla fita e, então, colocadas diretamente no gelo. Posteriormente, todo o volume foi aplicado no gel de poliacrilamida 8% com 5 mm de espessura. A eletroforese foi realizada a temperatura ambiente por 5 h a 200 V e 25 mA.

6.1.7. Reação de sequenciamento

Com o objetivo de confirmar a identidade dos fragmentos amplificados, os produtos de PCR identificados para cada um dos diferentes haplótipos dos genes COII e ND4 foram seqüenciados. Antes de serem seqüenciados, estes produtos foram purificados com o *kit* de purificação *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech). A purificação teve como objetivo retirar excessos de *primer*, dNTP e enzimas, com a finalidade de não prejudicar o sequenciamento.

As amostras para sequenciamento foram preparadas de acordo com o protocolo do *kit* de sequenciamento Big Dye Terminator Ready Reaction (Applied Biosystems). A mistura foi amplificada em um termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) programado para 1 ciclo a 96°C por 2 min; 35 ciclos a 96°C por 45 s, 50°C por 30 s e a 60°C por 120 s. O sequenciamento foi realizado no seqüenciador automático ABI 3100 da Applied Biosystems.

6.1.8. Análise estatística

O alinhamento das seqüências dos diferentes haplótipos para cada gene foi realizado no programa MEGA versão 3.0 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). Com este programa, também foram calculadas as matrizes de distância entre os diferentes haplótipos dos dois genes e construídos seus respectivos dendrogramas. Também no

MEGA foram montados dendrogramas pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA) para a visualização do agrupamento das populações de acordo com o polimorfismo de cada gene mitocondrial. A estimativa da frequência de sítios polimórficos (S), a diversidade nucleotídica (π) e a diversidade de haplótipos (h) foram analisadas de acordo com Nei e Tajima (1981) utilizando o programa DnaSP 4.10 (ROZAS *et al.*, 2003). A partir das frequências dos haplótipos em cada população estudada, foi calculado pelo método da estatística F (WEIR; COCKERHAM, 1984) através do programa Arlequin versão 2.000 (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000) o grau de diferenciação genética entre as populações tanto para o gene COII quanto para o gene ND4. Com este mesmo programa foi feita a análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992), a qual determina se a variação ocorrida entre as populações estudadas pode ser explicada por variações ocorridas dentro das populações, entre populações diferentes dentro de um mesmo grupo ou entre os grupos.

6.2. Isolamento e identificação do vírus Dengue em mosquitos do gênero *Aedes*

6.2.1. Amostragem

Neste trabalho, foram realizadas duas metodologias para a coleta dos mosquitos. No município de Moreno, as coletas foram realizadas de maneira aleatória, sem nenhuma relação com possíveis casos de dengue identificados no município. Os adultos foram capturados em locais de repouso no peridomicílio. Estes adultos foram sacrificados em freezer a -70°C , separados por localidade e por sexo e mantidos a -70°C até a sua utilização.

Em Recife, a metodologia adotada foi a coleta direcionada, ou seja, os espécimes foram coletados exclusivamente no intradomicílio e entornos das residências onde haviam sido relatados casos suspeitos de Dengue, confirmados ou não. Este trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) do CPqAM, o qual forneceu os endereços dos pacientes. Os mosquitos adultos encontrados nos ambientes intra e peri-domiciliares foram capturados com a utilização do aspirador costal modelo CDC (The Modifield CDC backpack aspirator, Modelo 1412) para posterior detecção dos possíveis sorotipos virais circulantes. Também foram instaladas armadilhas de oviposição na residência do paciente e retiradas após um período de 7 ou 8 dias após a instalação. Os ovos, larvas e pupas foram mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia do CPqAM até a fase

adulta do inseto. Os insetos adultos, coletados em campo, foram sacrificados em freezer a -70°C e, posteriormente, mantidos em microtubos separados por localidade e sexo a -70°C até sua utilização. Os adultos provenientes dos ovos, larvas e pupas das armadilhas de oviposição foram sacrificados em freezer a -70°C e, posteriormente, separados em microtubos apenas por localidade. A partir desses *pools* foram preparados inóculos que foram utilizados para isolamento do vírus dengue em cultura de células C6/36 e para detecção de vírus pela técnica de RT-PCR.

6.2.2. Considerações éticas

Todos os pacientes que receberam a equipe de campo do Departamento de Entomologia do CPqAM nas suas residências, receberam e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de mosquitos intradomiciliar e peridomiciliar, do projeto *Vacina de Dengue baseada em epítomos, tetravalente e direcionada ao compartimento MMCI* (ANEXO I). Este projeto foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP nº 49049).

6.2.3. Isolamento viral em cultura de células C6/36

Para se fazer o isolamento do vírus, foram macerados insetos individuais ou *pools* de mosquitos (variando de 2 a 40 insetos) em meio Leibovitz (Gibco) manutenção, contendo 2% de soro fetal bovino e antibióticos. A concentração final dos antibióticos usados foi de 2,5 mg/ml de fungizon, 100.000 U/ml de penicilina e 0,05 g/ml de estreptomicina em pó (HULL *et al.*, 1984). O macerado foi removido com uma micropipeta de 1 ml para um microtubo de 1,5 ml e mantido por mais 1 hora em geladeira, sendo então estocado a -70°C para posterior inoculação em cultura de células C6/36 de *Aedes albopictus* (IGARASHI, 1978).

A cultura C6/36 foi examinada diariamente durante 14 dias após a inoculação. Após essa etapa foram realizadas lâminas tanto dos inóculos com efeito citopático típico do vírus dengue, como daqueles que não apresentaram este efeito. As lâminas foram preparadas pelo método indireto de suspensão fluorescente, usando-se anticorpos monoclonais para DENV- 1, 2, 3 e 4 e um policlonal para o grupo Flavivírus, segundo a técnica de Henchal *et al.* (1982). Em seguida foram analisadas sob microscópio de imunofluorescência. Os anticorpos monoclonais foram fornecidos pelo Instituto Evandro Chagas, Fundação Nacional de Saúde (Belém - PA).

6.2.4. Extração de RNA

Os RNAs foram extraídos utilizando o método da extração pela sílica de acordo com o protocolo descrito por Boom *et al.* (1990). A extração foi realizada de acordo com as etapas descritas a seguir.

Em um microtubo de 1,5 ml foi colocada a seguinte mistura: 860 µl de tampão de lise (L6) (24 g de Isotiocianato de Guanidina, 20 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 6.4, 4.4 ml de EDTA 0.2 M pH 8.0 e 520 µl de Triton X-100), 40 µl de sílica e 100 µl da amostra (inóculo preparado a partir dos *pools* de mosquitos). A mistura foi homogeneizada rapidamente e, em seguida, colocada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Durante o repouso, esta mistura foi homogeneizada a cada 2 ou 3 minutos. Após o repouso, a mistura foi centrifugada por 10 s em centrífuga refrigerada e o sobrenadante foi descartado, por inversão do tubo, em uma solução de NaOH 10N.

A etapa seguinte consistiu na lavagem do *pellet* de sílica: duas vezes com 1 ml de tampão de lavagem (L2) (48 g de Isotiocianato de Guanidina e 40 ml de Tris-HCl 0.1 M pH 6.4), duas vezes com 1 ml de etanol 70% e uma vez com 1 ml de acetona PA. Após cada lavagem com o tampão L2, etanol e acetona, a mistura foi homogeneizada rapidamente, centrifugada por 10 s e o sobrenadante descartado na solução de NaOH 10N. Após as etapas de lavagem, o *pellet* foi seco a 56°C (termobloco), com as tampas abertas, por 10 min. Foi preparada uma mistura de 60 µl de água (Milli-Q estéril) e 1 µl de RNAsin (estoque contendo 1U/µl) (Invitrogen) para cada amostra e adicionada em cada microtubo de 1.5 ml. A mistura foi homogeneizada e incubada novamente a 56°C, com as tampas fechadas, por 10 min. Após a incubação, a mistura foi homogeneizada rapidamente e centrifugada em uma centrífuga refrigerada por 2 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi retirado e transferido, usando ponteiras com barreira, para um novo microtubo de 1.5 ml devidamente registrado.

Os RNAs extraídos, antes de serem utilizados na RT-PCR, foram tratados com a enzima DNase I, Recombinant (Invitrogen). Esta etapa consiste em evitar a contaminação das amostras com o DNA do mosquito eliminando, assim, os falsos positivos do diagnóstico.

6.2.5. RT-PCR (PCR por Transcriptase Reversa)

O mesmo material usado para o isolamento de vírus em cultura de células C6/36 foi usado também na técnica de RT-PCR, seguindo o protocolo de Lanciotti *et al.* (1992). Esta reação foi realizada em dois ciclos distintos. Em um primeiro ciclo da PCR foi usado um par de *primers* consenso (Tabela 2) para o grupo Flavivírus que amplifica um fragmento de 511 pb. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µl, usando a seguinte mistura: 5 µl de tampão contendo Tris-HCl 200 mM pH 8.4 e KCl 200 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 0.20 mM de cada dNTP, 50 mM de DTT, 25 pmoles de cada *primer* (Dcon 1 e Dcon 2), 1U de RNAsin (Invitrogen), 1.0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1.0 U de RT-AMV (Invitrogen) e 5 µl do RNA extraído. A mistura foi amplificada em um termociclador (BIOMETRA-Thermo Trio Block) programado para 1 ciclo a 42°C por 1 h; 30 ciclos a 94°C por 35 s, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e um ciclo final a 72°C por 10 min.

Posteriormente, foi realizado um segundo ciclo com *primers* específicos para cada sorotipo viral (TS1, TS2, TS3 e TS4) que amplifica fragmentos de 489 pb, 119 pb, 290 pb e 392 pb para os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µl, usando a seguinte mistura: 5 µl de tampão contendo Tris-HCl 200 mM pH 8.4 e KCl 200 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 0.20 mM de cada dNTP, 25 pmoles do *primer* Dcon 1, 12.5 pmoles de cada *primer* específico (TS1, TS2, TS3 e TS4), 1.0 U de Taq DNA Polimerase, 5 µl do produto do primeiro ciclo (diluído dez vezes). A mistura foi amplificada em um termociclador (BIOMETRA-Thermo Trio Block) programado para 18 ciclos a 94°C por 35 s, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e um ciclo final a 72°C por 10 min. Os produtos da RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M e EDTA 0,002M, pH 8,3) e corado com brometo de etídeo. Após a eletroforese de 40 min a 120 V, os géis foram fotografados em um transiluminador de ultravioleta.

Tabela 2: *Primers* usados na técnica de RT-PCR para identificação dos diferentes sorotipos do vírus Dengue e suas respectivas seqüências.

<i>Primers</i>	Seqüência 5' → 3'
Dcon 1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG
Dcon 2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA

Para estimar a prevalência de infecção de mosquitos do gênero *Aedes* spp. nas amostras coletadas no período de Março/2004 a Janeiro/2006 foi usado o software *Pool Screen* (KATHOLI *et al.*, 1995). Para comparar as taxas de infecção viral nas espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi usado o cálculo de taxa de infecção mínima (MIR- Minimum Infection Rate). Este índice é calculado dividindo-se o número de *pools* infectados por espécie pelo número total de mosquitos testados para cada espécie, multiplicado por 1.000 (CHOW *et al.*, 1998).

VII. RESULTADOS

7.1. Polimorfismo do gene COII

Em todos os indivíduos analisados observou-se um fragmento de 700 pb, sem variação no tamanho do amplicon. A figura 9 mostra 15 dos 440 produtos de PCR amplificados para o gene da COII.

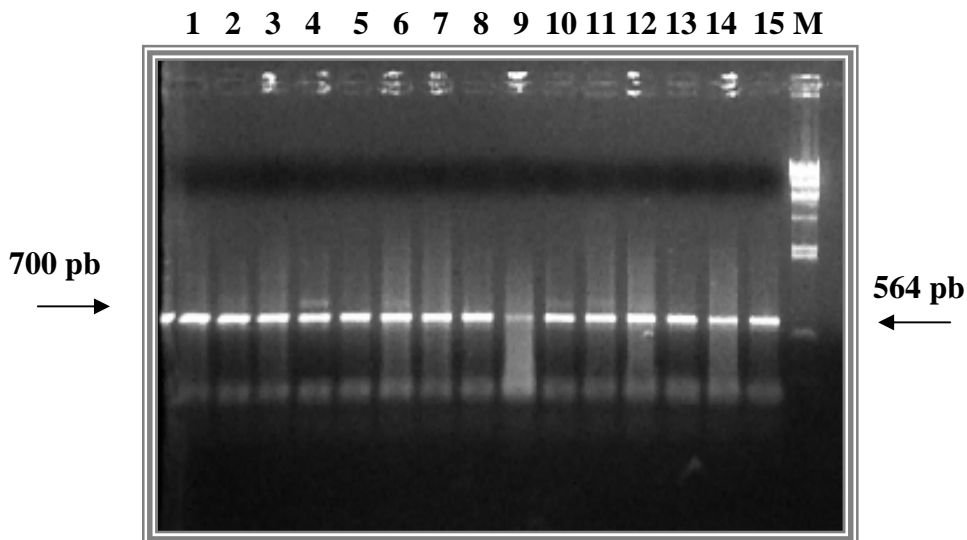


Figura 9: Visualização em gel de agarose 0.8% dos produtos de PCR do gene citocromo c oxidase II. Poços 1 a 15: espécimes de *Aedes albopictus* provenientes do bairro de Engenho do Meio-Recife/PE; M-Marcador de peso molecular λ *Hind* III.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade da técnica de SSCP, todos os produtos de PCR da COII foram digeridos com a enzima de restrição *Hinf* I. A figura 10 mostra 18 dos 447 produtos de PCR digeridos, que resultou em três fragmentos menores possibilitando assim uma maior detecção de mutações nas seqüências analisadas. Não houve variação detectável pela digestão com a enzima *Hinf* I.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M

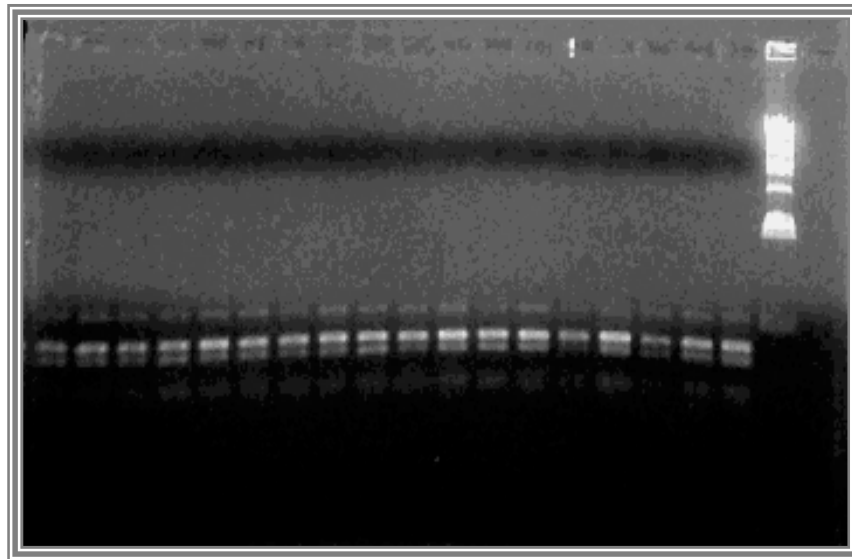


Figura 10: Gel de agarose 0.8% mostrando os produtos da digestão dos fragmentos de PCR do gene citocromo c oxidase II pela enzima de restrição *Hinf* I. Poços **1** a **8**: espécimes de *Aedes albopictus* provenientes do bairro de Jacarepaguá-RJ; poços **9** a **18**: espécimes de *Aedes albopictus* provenientes do bairro de Bonança-Moreno; **M**-Marcador de peso molecular λ *Hind* III.

Todos os produtos da digestão foram utilizados na técnica de SSCP. No entanto, apenas 252 amostras apresentaram boa visualização pela coloração por prata e, por essa razão, foram selecionadas para identificação dos diferentes haplótipos. No total foram identificados oito haplótipos diferentes (Figura 11). O haplótipo 1 foi o mais comum entre as populações analisadas, estando presente em todas as populações com exceção das provenientes de Engenho do Meio (PE) e Passos (MG). O haplótipo 3 foi o segundo mais comum, sendo encontrado nas populações do município de Moreno, Sucupira e Campo Grande (PE). O haplótipo 6, mais freqüente na população de Passos também foi encontrado nas populações de Campo Grande, Casa Forte e Nossa Senhora de Fátima (PE). Os haplótipos 2 e 8 foram encontrados exclusivamente nas populações de Bonança e Engenho do Meio (PE), respectivamente. Os haplótipos 5 e 7 foram considerados raros, exclusivos da população de Nossa Senhora de Fátima (PE). Das populações analisadas, sete delas mostraram-se monomórficas, ou seja, apenas um haplótipo foi identificado nessas populações. A população de Nossa Senhora de Fátima

foi a mais polimórfica. Nela identificamos 6 dos 8 haplótipos encontrados nesta análise. A distribuição dos diferentes haplótipos de COII encontrados em cada população está mostrada na tabela 3.

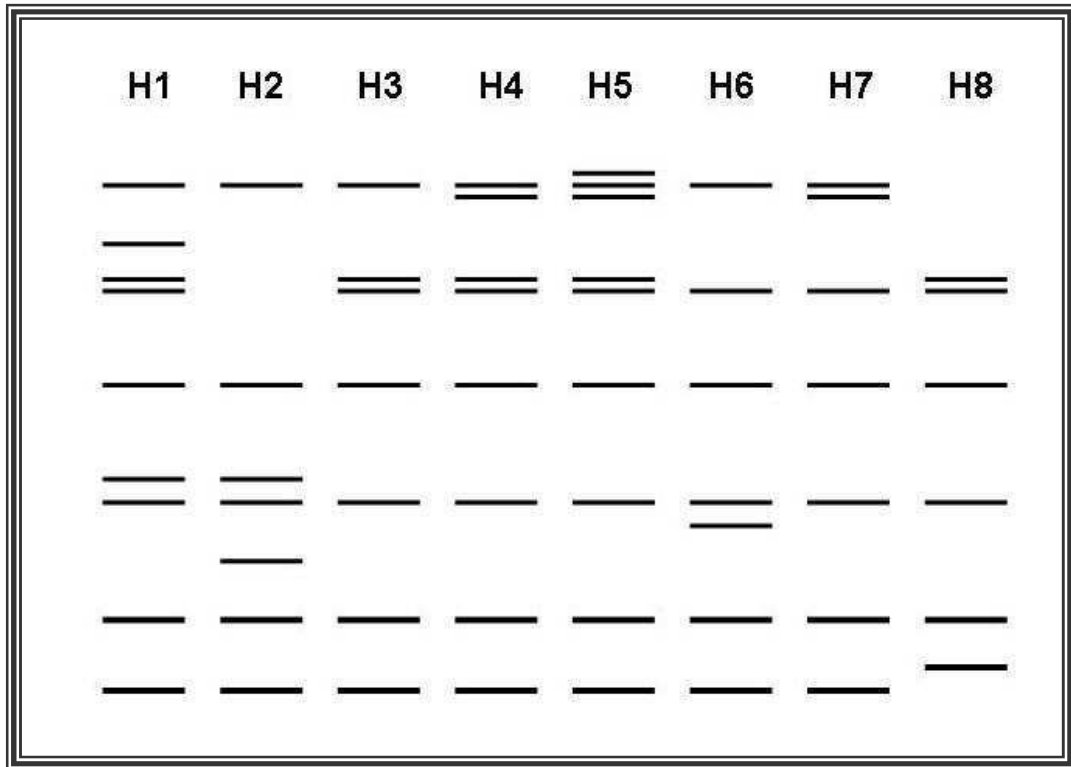


Figura 11: Zimograma ilustrando os diferentes padrões (haplótipos) de SSCP (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 e H8) do gene mitocondrial citocromo c oxidase II.

Tabela 3: Número de indivíduos observados para cada haplótipo do gene COII nas populações de *Aedes albopictus*.

População	Haplótipos							
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
Passos	-	-	-	-	-	12	-	-
Campo Grande	13	-	02	-	-	01	-	-
Casa Forte	17	-	-	-	-	02	-	-
Dois Irmãos	18	-	-	-	-	-	-	-
Engenho do Meio	-	-	-	-	-	-	-	18
Morro da Conceição	22	-	-	-	-	-	-	-
Parnamirim	16	-	-	-	-	-	-	-
Sucupira	18	-	01	-	-	-	-	-
Bonança	06	05	09	01	-	-	-	-
Cohab	06	-	03	-	-	-	-	-
Nossa Senhora de Fátima	19	-	32	01	01	01	01	-
Manguinhos	14	-	-	-	-	-	-	-
Jacarepaguá	13	-	-	-	-	-	-	-
Total	162	05	47	02	01	16	01	18

As frequências dos diferentes haplótipos identificados nas populações estudadas estão mostradas na tabela 4. Na tabela 5 estão dispostos os diferentes haplótipos encontrados nas diferentes populações, o número de sítios polimórficos entre os diferentes haplótipos encontrados em cada população (S), a média do número de nucleotídeos diferentes (k) e a diversidade nucleotídica (π). O SNP ou polimorfismo de sítio único do gene COII mostrou, através do cálculo da diversidade nucleotídica, que as populações de *Ae. albopictus* analisadas no presente trabalho apresentaram um alto nível de polimorfismo, com uma média de 46 SNP por 1000 pb ($\pi = 0,04679$). Também foi observado que as substituições do tipo transversão foram mais frequentes do que as

substituições do tipo transição, na proporção de 1: 1,3. A frequência de C+G encontrada foi baixa, em torno de 19,5%.

Com base no cálculo de distância genética par a par entre os haplótipos, foi montada uma matriz de distância e construído um dendrograma que mostra as relações entre os haplótipos encontrados no gene COII (Figura 12). A maioria dos haplótipos encontrados apresentou uma distância genética com valores que variaram entre 0,003 a 0,011. No entanto, os haplótipos H7 e H8 apresentaram um elevado índice de diferenciação comparando com os demais haplótipos, com valores que variavam entre 0,079 a 0,178 (Tabela 6).

Tabela 4: Frequências dos diferentes haplótipos do gene COII encontrados entre as seqüências analisadas nas populações de *Aedes albopictus*.

Haplótipo	Número de seqüências	Frequência
H1	162	0,643
H2	5	0,020
H3	47	0,186
H4	2	0,008
H5	1	0,004
H6	16	0,063
H7	1	0,004
H8	18	0,071
Total	252	1

Tabela 5: Índices de polimorfismos do gene COII em populações de *Aedes albopictus*

Populações	K	Haplótipo	Nº de sítios polimórficos (S)	<i>k</i>	π
Passos	1	H6	-	-	
Campo Grande	3	H1; H3; H6	9	6,000	0,01310
Casa Forte	2	H1; H6	8	8,000	0,01739
Dois Irmãos	1	H1	-	-	-
Engenho do Meio	1	H8	-	-	-
Morro da Conceição	1	H1	-	-	-
Parnamirim	1	H1	-	-	-
Sucupira	2	H1; H3	11	11,000	0,01719
Bonança	4	H1; H2; H3; H4	16	8,833	0,02083
Cohab	2	H1; H3	11	11,000	0,01719
Nossa Senhora de Fátima	5	H1; H3; H4; H5; H6; H7	34	11,333	0,03139
Manguinhos	1	H1	-	-	-
Jacarepaguá	1	H1	-	-	-
Total	8	H1; H2; H3; H4; H5; H6; H7; H8	65	16,893	0,04679

K: Número de haplótipos por população, *k*: média no número de diferentes nucleotídeos e π : diversidade nucleotídica.

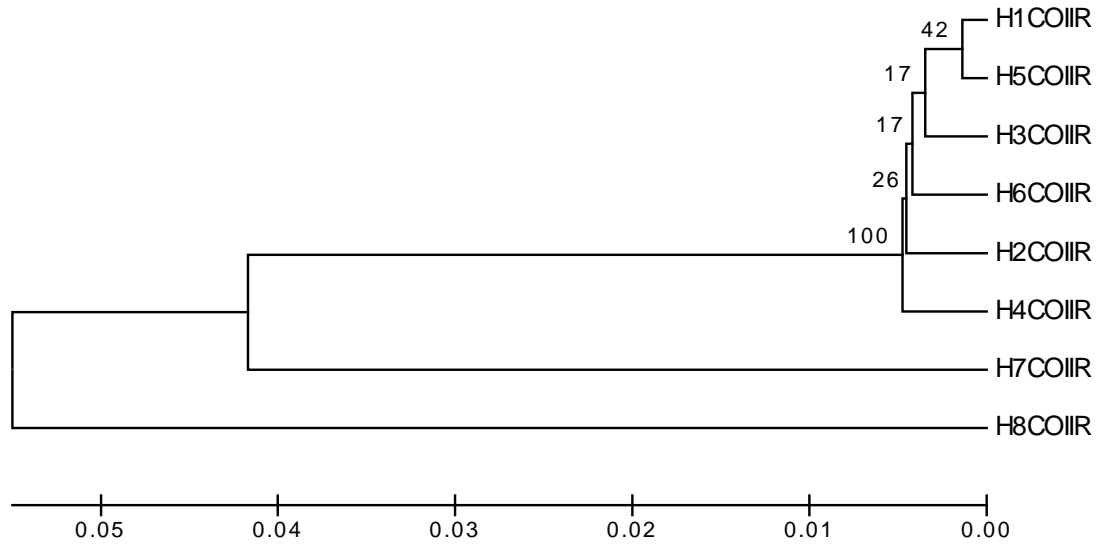


Figura 12: Dendrograma calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) mostrando as relações filogenéticas entre os oito haplótipos do gene mitocondrial citocromo c oxidase II. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um bootstrap de 1.000 replicações usando o modelo de distância genética de Kimura 2-parâmetros (1980).

Tabela 6: Distância genética baseada no modelo de Kimura 2-parâmetros (1980) entre os diferentes haplótipos do gene COII de *Aedes albopictus*.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
H1	-							
H2	0.006	-						
H3	0.006	0.011	-					
H4	0.006	0.011	0.011	-				
H5	0.003	0.008	0.008	0.008	-			
H6	0.006	0.011	0.011	0.011	0.008	-		
H7	0.079	0.085	0.085	0.085	0.082	0.085	-	
H8	0.095	0.101	0.101	0.101	0.095	0.101	0.178	-

Na tabela 7 foram dispostos os valores de diferenciação genética entre as populações, resultantes da análise da estatística F baseada na frequência dos haplótipos em cada população. A partir desses resultados foi construído um dendrograma calculado pelo método da média aritmética não ponderada (Figura 13).

Tabela 7: Matriz de diferenciação genética entre populações de *Aedes albopictus*, baseada no polimorfismo do gene COII calculada a partir do método da estatística F.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.Passos	-												
2.Campo Grande	0.79469	-											
3.Casa Forte	0.86521	0.00001	-										
4.Dois Irmãos	1.0000	0.10048	0.05147	-									
5.Eng. do Meio	1.0000	0.83832	0.89800	1.0000	-								
6.M. da Conceição	1.0000	0.12134	0.06690	0.0000	1.0000	-							
7.Parnamirim	1.0000	0.08889	0.04270	0.0000	1.0000	0.0000	-						
8.Sucupira	0.93538	0.00664	0.00202	0.00001	0.94594	0.00791	0.00001	-					
9.Bonança	0.58001	0.25195	0.38186	0.48183	0.62615	0.51005	0.46620	0.41300	-				
10.Cohab	0.78248	0.00001	0.17827	0.37931	0.82692	0.42105	0.35570	0.20990	0.07807	-			
11.N. S. de Fátima	0.60061	0.27791	0.39957	0.46809	0.63026	0.48367	0.45967	0.41071	0.03771	0.08094	-		
12.Manguinhos	1.0000	0.07615	0.03283	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.00001	0.44929	0.32979	0.45068	-	
13.Jacarepaguá	1.0000	0.06920	0.02733	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.00001	0.44027	0.31579	0.44591	0.0000	-

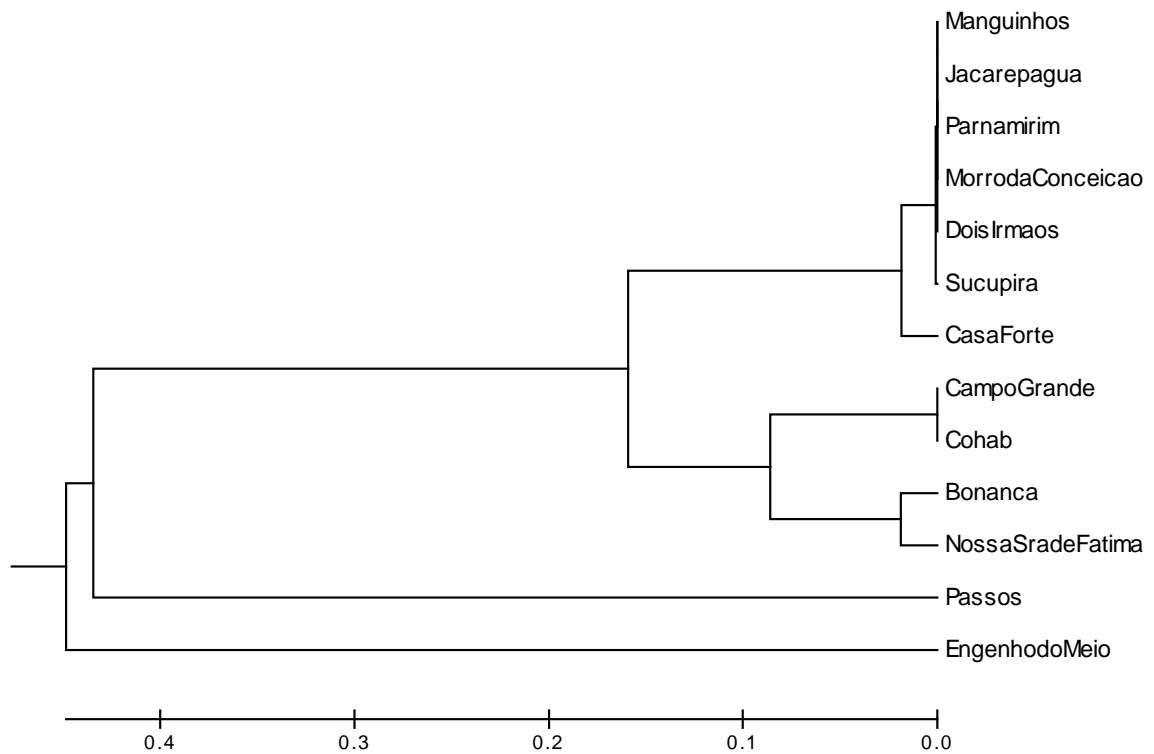


Figura 13: Dendrograma calculado pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA) a partir das diferenciações genéticas entre as populações de *Aedes albopictus*, baseadas no polimorfismo do gene mitocondrial COII.

A análise de variância molecular (AMOVA) entre as populações foi realizada de quatro maneiras diferentes. Na primeira análise, não foi seguida nenhuma hierarquia entre as populações, sendo analisadas todas as populações como um grande grupo. Os resultados mostraram que a maior fonte de variação encontrada (~75,78%) foi decorrente das variações detectadas entre as populações. Esta análise produziu um valor de F_{st} de 0,75782 ($p < 10^{-5}$). Na segunda análise, as populações foram divididas em 2 grupos, região nordeste e região sudeste. Os resultados mostraram que, neste caso, a maior fonte de variação encontrada (~73,47%) ocorreu entre as populações dentro de cada grupo. Na terceira análise, quando as populações foram separadas por estados, a maior variação encontrada (~70,01%) ocorreu entre as populações dentro do grupo. Na quarta análise, quando separadas por cidades, a maior fonte de variação observada (~76,10%) também ocorreu entre as populações dentro de um mesmo grupo.

7.2. Polimorfismo do gene ND4

Em todos os indivíduos analisados observou-se um fragmento de 385 pb, sem variação no tamanho do amplicon. A figura 14 ilustra 11 dos 414 produtos de PCR amplificados para o gene ND4.

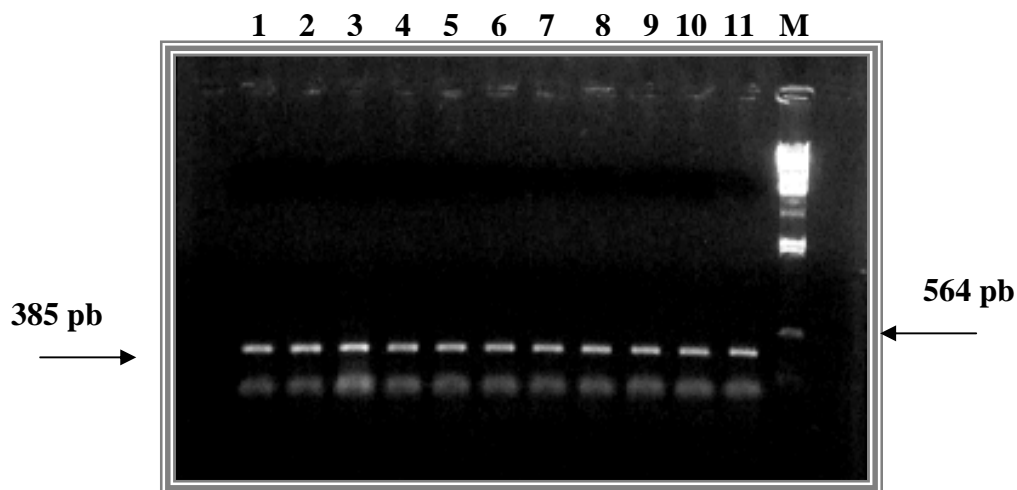


Figura 14: Gel de agarose 0.8 % mostrando os produtos de PCR do gene mitocondrial ND4. Poços 1 a 11: espécimes de *Aedes albopictus* provenientes de Passos-MG; M-Marcador de peso molecular λ Hind III

Após a amplificação do gene ND4, todos os produtos de PCR foram utilizados para o SSCP. Dentre todas as amostras testadas, 273 foram selecionadas para identificação dos diferentes haplótipos. No total foram identificados onze haplótipos diferentes (Figura 15). O haplótipo 2 foi o mais comum entre as populações analisadas, estando presente nas 3 localidades do município de Moreno e em Dois Irmãos, Morro da Conceição e Sucupira (PE). O segundo haplótipo mais freqüente foi o haplótipo 11, presente nas populações do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Casa Forte (PE). O haplótipo 8 foi identificado nas populações de Engenho do Meio e Morro da Conceição (PE). O haplótipo 6 foi identificado nas populações de Dois Irmãos e Cohab (PE). Os haplótipos 3 e 5 foram identificados nas populações de Cohab e Nossa Senhora de Fátima do município de Moreno (PE). O haplótipo 10 foi detectado nas populações de Dois Irmãos e Parnamirim (PE). Os haplótipos 1, 4, 7 e 9 foram considerados raros e exclusivos das populações de Campo Grande, Nossa Senhora de Fátima, Dois Irmãos e Engenho do

Meio, respectivamente (PE). Para este gene, oito populações mostraram-se monomórficas, sendo identificado apenas um haplótipo em cada população. No entanto, nesta análise foram identificadas 2 populações polimórficas, Cohab e Nossa Senhora de Fátima (PE), que pertencem ao mesmo município. A distribuição dos diferentes haplótipos de ND4 encontrados nas populações está mostrada na Tabela 8.

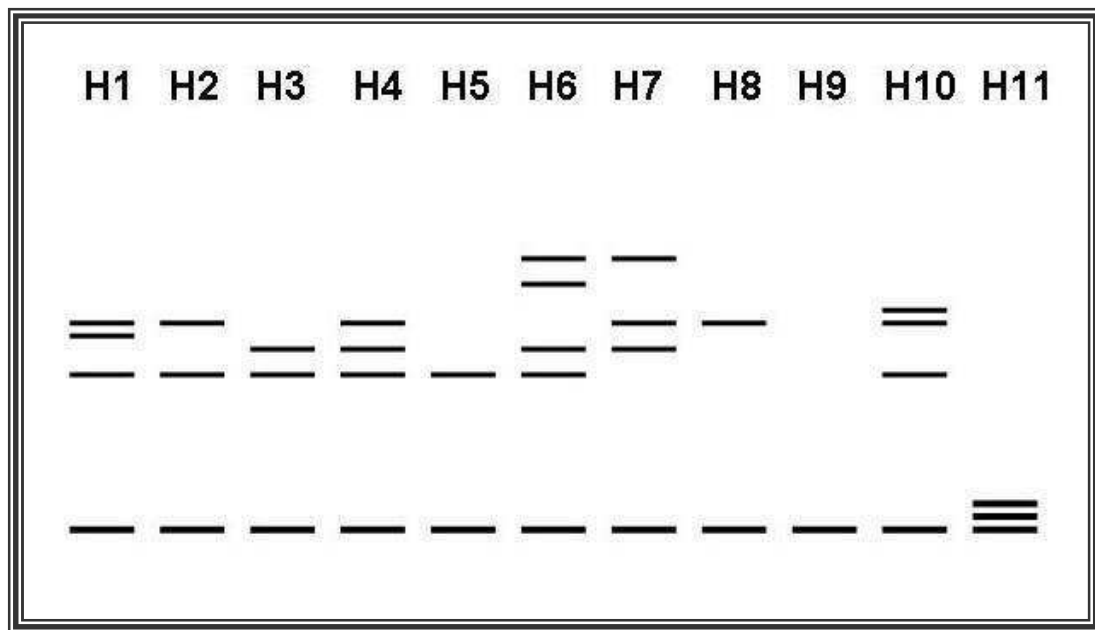


Figura 15: Zimograma ilustrando os diferentes padrões (haplótipos) de SSCP (H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10 e H11) do gene mitocondrial ND4.

Tabela 8: Número de indivíduos observados para cada haplótipo do gene ND4 nas diferentes populações de *Aedes albopictus*.

População	Haplótipos										
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
Passos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Campo Grande	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Casa Forte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Dois Irmãos	-	11	-	-	-	01	09	-	-	10	-
Engenho do Meio	-	-	-	-	-	-	-	08	01	-	-
Morro da Conceição	-	12	-	-	-	-	-	14	-	-	-
Parnamirim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-
Sucupira	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bonança	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cohab	-	09	04	-	10	13	-	-	-	-	-
Nossa Senhora de Fátima	-	24	14	04	01	-	-	-	-	-	-
Manguinhos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
Jacarepaguá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
Total	19	88	18	04	11	14	09	22	01	25	62

As frequências dos diferentes haplótipos identificados nas populações estudadas estão mostradas na tabela 9. Na tabela 10 estão apresentados os diferentes haplótipos encontrados nas populações analisadas, o número de sítios polimórficos entre os diferentes haplótipos encontrados em cada população (S), a média do número de nucleotídeos diferentes (k) e a diversidade nucleotídica (π). O SNP do gene ND4 também mostrou um alto nível de heterogeneidade, com uma média de 108 SNPs por 1000 pb ($\pi = 0,10831$). Também foi observado que as substituições do tipo transversão

foram maiores do que as substituições do tipo transição, na proporção de 1: 1,4. O cálculo da composição nucleotídica também mostrou uma baixa frequência de C+G, sendo esta frequência de 31,1%.

Tabela 9: Frequências dos diferentes haplótipos do gene ND4 encontrados entre as seqüências analisadas nas populações de *Aedes albopictus*.

Haplótipo	Número de seqüências	Frequência
H1	19	0,070
H2	88	0,322
H3	18	0,066
H4	04	0,015
H5	11	0,040
H6	14	0,051
H7	09	0,033
H8	22	0,080
H9	1	0,004
H10	25	0,092
H11	62	0,227
Total	273	1

Tabela 10: Índices de polimorfismos do gene ND4 em populações de *Aedes albopictus*.

Populações	K	Haplótipo	Nº de sítios polimórficos	<i>k</i>	π
Passos	1	H11	-	-	-
Campo Grande	1	H1	-	-	-
Casa Forte	1	H11	-	-	-
Dois Irmãos	4	H2; H6; H7; H10	17	8,500	0,02568
Engenho do Meio	2	H8; H9	12	12,000	0,04096
Morro da Conceição	2	H2; H8	14	14,000	0,03714
Parnamirim	1	H10	-	-	-
Sucupira	1	H2	-	-	-
Bonança	1	H2	-	-	-
Cohab	4	H2; H3; H5; H6	171	87,000	0,25740
Nossa Senhora de Fátima	4	H2; H3; H4; H5	169	85,333	0,24879
Manguinhos	1	H11	-	-	-
Jacarepaguá	1	H11	-	-	-
Total	11	H1; H2; H3; H4; H5; H6; H7; H8; H9; H10; H11	139	27,727	0,10831

K: Número de haplótipos por população, *k*: média no número de diferentes nucleotídeos e π : diversidade nucleotídica.

Com base no cálculo de distância genética par a par entre os haplótipos, foi montado um dendrograma calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) que mostra as relações entre os haplótipos encontrados do gene ND4 (Figura 16). A maioria dos haplótipos encontrados apresentou uma diversidade genética com valores variando entre 0,008 a 0,048. No entanto, o haplótipo H5 apresentou um elevado índice de diferenciação genética comparando com os demais haplótipos, com valores que variavam entre 0,793 a 0,831 (Tabela 11).

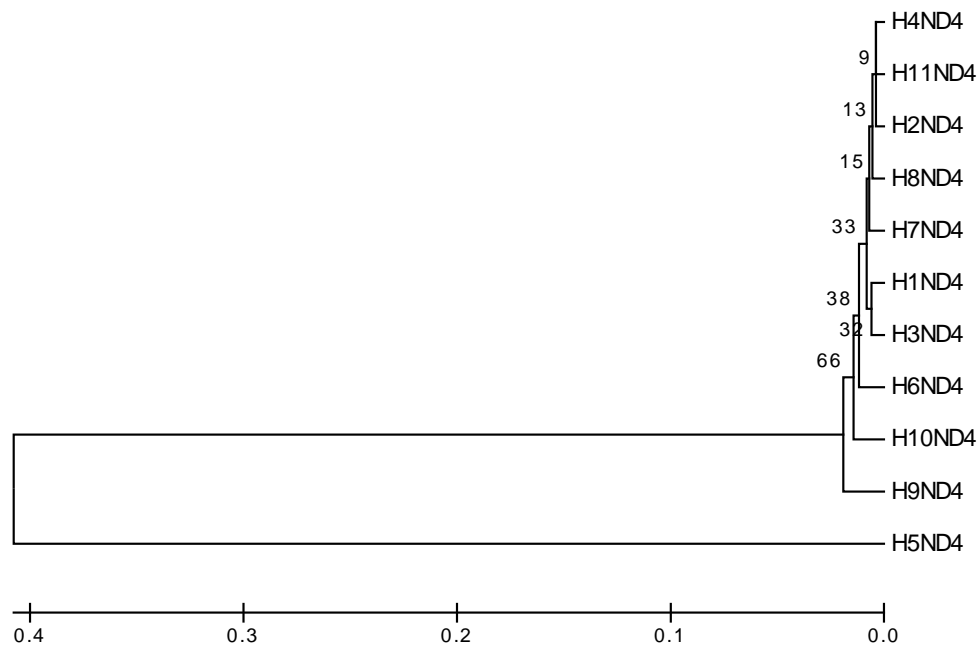


Figura 16: Dendrograma calculado a partir do método da média aritmética não ponderada (UPGMA) mostrando as relações filogenéticas entre os onze haplótipos do gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um bootstrap de 1.000 replicações usando o modelo de distância genética de Kimura 2-parâmetros (1980).

Tabela 11: Distância genética baseada no modelo de Kimura 2-parâmetros (1980) entre os diferentes haplótipos do gene ND4 *Aedes albopictus*.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
H1	-										
H2	0,020	-									
H3	0,012	0,016	-								
H4	0,012	0,008	0,008	-							
H5	0,829	0,805	0,814	0,804	-						
H6	0,028	0,024	0,024	0,016	0,829	-					
H7	0,020	0,016	0,016	0,008	0,815	0,024	-				
H8	0,020	0,016	0,016	0,008	0,817	0,024	0,016	-			
H9	0,044	0,036	0,040	0,032	0,815	0,048	0,040	0,032	-		
H10	0,036	0,024	0,032	0,024	0,831	0,040	0,032	0,024	0,044	-	
H11	0,020	0,008	0,016	0,008	0,793	0,024	0,016	0,008	0,028	0,016	-

Na tabela 12 estão dispostos os valores de diferenciação genética entre as populações analisadas, resultantes da análise da estatística F baseada na frequência dos haplótipos em cada população. A partir desses resultados foi construído um dendrograma calculado pelo método da média aritmética não ponderada (Figura 17).

Tabela 12: Matriz de diferenciação genética entre populações de *Aedes albopictus*, baseada no polimorfismo do gene ND4 calculada a partir do método da estatística F.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.Passos	-												
2.Campo Grande	1.0000	-											
3.Casa Forte	0.0000	1.0000	-										
4.Dois Irmãos	0.5963	0.5910	0.5678	-									
5. Eng. do Meio	0.9315	0.9291	0.9171	0.4599	-								
6. M. da Conceição	0.7155	0.7106	0.6890	0.2646	0.2401	-							
7.Parnamirim	1.0000	1.0000	1.0000	0.3921	0.9171	0.6890	-						
8.Sucupira	1.0000	1.0000	1.0000	0.3911	0.9291	0.4789	1.0000	-					
9.Bonança	1.0000	1.0000	1.0000	0.3526	0.9095	0.4358	1.0000	0.0000	-				
10.Cohab	0.5655	0.5605	0.5390	0.1962	0.4367	0.2838	0.5390	0.4326	0.3974	-			
11. N. S. de Fátima	0.6335	0.6294	0.6117	0.1959	0.5228	0.2530	0.6117	0.2536	0.2248	0.1919	-		
12.Manguinhos	0.0000	1.0000	0.0000	0.5615	0.9134	0.6830	1.0000	1.0000	1.0000	0.5331	0.6070	-	
13.Jacarepaguá	0.0000	1.0000	0.0000	0.5549	0.9095	0.6768	1.0000	1.0000	1.0000	0.5270	0.6020	0.0000	-

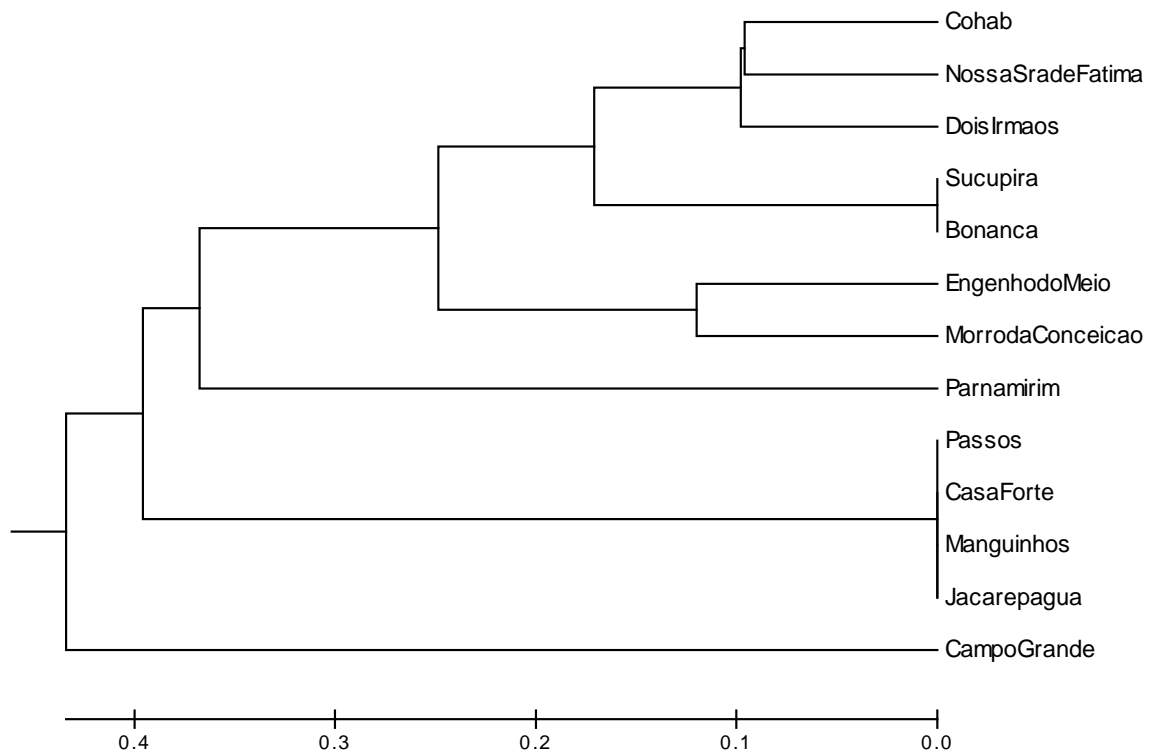


Figura 17: Dendrograma calculado pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA) a partir das diferenciações genéticas entre as populações de *Aedes albopictus*, baseadas no polimorfismo do gene mitocondrial ND4.

A análise de variância molecular (AMOVA) entre as populações foi realizada de quatro maneiras diferentes. Na primeira análise, não foi seguida nenhuma hierarquia entre as populações, sendo analisadas todas as populações como um grande grupo. Os resultados mostraram que a maior fonte de variação encontrada (~ 67,14%) foi decorrente das variações detectadas entre as populações. Esta análise produziu um valor de F_{st} de 0,67142 ($p < 10^{-5}$). Na segunda análise, as populações foram divididas em 2 grupos, região nordeste e região sudeste. Os resultados mostraram que a maior fonte de variação encontrada (~ 63,82%) ocorreu entre as populações dentro de cada grupo. Na terceira análise, quando as populações foram separadas por estados, a maior variação encontrada (~58,55%) também ocorreu entre as populações dentro de cada grupo. Na quarta análise, quando separadas por cidades, a maior fonte de variação entre as populações (~ 62,39%) também ocorreu entre as populações dentro de cada grupo.

7.3. Detecção do vírus Dengue em amostras de *Aedes* spp. através da RT-PCR

Durante o período de Maio/2004 a Janeiro/2006, um total de 267 espécimes de *Aedes aegypti* perfazendo um total de 51 *pools* e 271 espécimes de *Aedes albopictus* totalizando 34 *pools*, todos coletados em campo, foram testados pela técnica de RT-PCR. Neste mesmo período, um total de 2.583 espécimes de *Aedes aegypti* divididos em 122 *pools* e 118 espécimes de *Aedes albopictus* divididos em 10 *pools* foram obtidos através das armadilhas de oviposição (ovitrampas). Todos os *pools* de mosquitos coletados pelas ovitrampas também foram utilizados na detecção do vírus Dengue pela RT-PCR. Dentre as amostras de *Aedes aegypti* analisadas foram identificados 9 *pools* positivos, dos quais três *pools* foram provenientes das coletas de adultos e seis *pools* provenientes das coletas de ovos. Nas coletas de adultos foram identificados dois sorotipos distintos: o DENV-1, presente em 67% das amostras e o DENV-3 identificado em 33% das amostras. Nas coletas de ovos foram identificados três sorotipos distintos: o DENV-1, identificado em 50% das amostras testadas; o DENV-2, identificado em 16% das amostras testadas e o DENV-3, identificado em 34% das amostras testadas. A figura 18 ilustra dois *pools* positivos identificados em amostras de adultos da espécie *Ae. aegypti* originadas de ovos coletados em campo.

Dentre as amostras de *Ae. albopictus* analisadas, apenas 1 *pool* proveniente das coletas de adultos foi positivo para a presença do vírus Dengue. O sorotipo identificado nesta amostra foi o sorotipo 1 (Figura 19). Nas amostras provenientes da coleta de ovos não foi identificado nenhum *pool* positivo para o vírus Dengue. A partir dos resultados da RT-PCR foi calculado pelo método de *Pool Screen* o índice de prevalência do vírus Dengue no período de Maio/2004 a Janeiro/2006 nas populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* coletadas em campo e através das ovitrampas (Tabela 13). O mês de Agosto apresentou a maior prevalência de infecção vetorial pelo vírus Dengue, com base na identificação de *pools* positivos nas coletas de adultos. Nas coletas de ovos a partir das ovitrampas, a maior prevalência foi identificada no mês de Setembro. A taxa de infecção mínima (MIR) calculada a partir das coletas de adultos para as espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi de 11,24 e 3,69 por 1.000 mosquitos analisados, respectivamente. Nas coletas através das ovitrampas, foram detectados *pools* positivos apenas para a espécie *Ae. aegypti* e a MIR calculada foi de 2,32 por 1.000 mosquitos analisados.

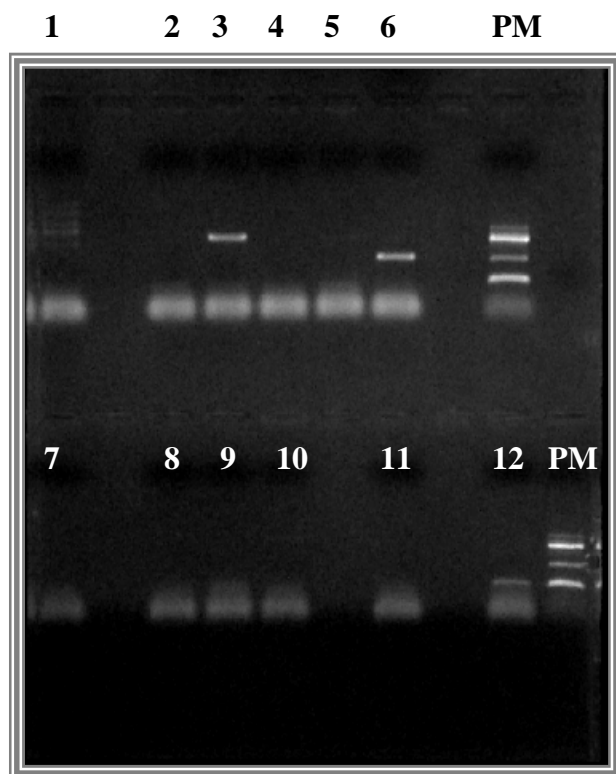


Figura 18: Análise em gel de agarose dos produtos da RT-PCR gerados a partir da segunda amplificação com os *primers* específicos TS1, TS2, TS3 e TS4. Poço **1**-controle negativo; poços **2, 4, 5, 7, 8, 9, 10** e **11**-amostras negativas para o vírus Dengue; poço **3**-amostra positiva (DENV-1) em *Ae. aegypti*; poço **6**-amostra positiva (DENV-3) em *Ae. aegypti* e poço **12**: controle positivo da reação (DENV-2) . **PM** - Marcador de peso molecular para os três sorotipos (DENV-1, 2 e 3).

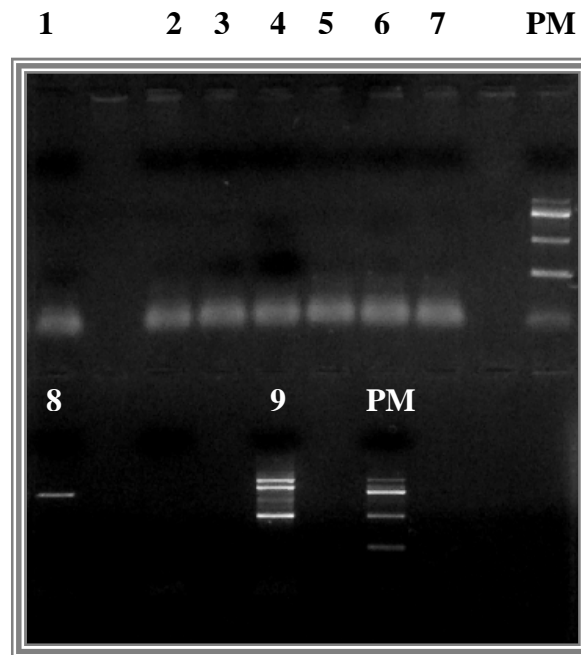


Figura 19: Gel de agarose 2.0% mostrando os produtos da RT-PCR em amostras de *Aedes albopictus*. Poço 1-Controle negativo; poços 2, 3, 4, 5, 6 e 7-amostras negativas para o vírus Dengue; poço 8-amostra positiva (DENV-1); poço 9-controle positivo (DENV-3). PM - Marcador de peso molecular para os três sorotipos (DENV-1, 2 e 3).

7.4. Isolamento do vírus Dengue em amostras de *Aedes* spp. através da cultura de células C6/36

Um total de 78 *pools* de *Ae. aegypti* foi testado em cultura de células C6/36, dos quais 58 *pools* foram provenientes das coletas de ovos e 20 *pools* foram provenientes das coletas de adultos. Após 14 dias de inoculadas, nenhuma das amostras testadas apresentou efeito citopático. O resultado negativo dessas amostras foi confirmado com a imunofluorescência indireta, que não apresentou reação com o anticorpo policlonal para o gênero Flavivírus. Uma amostra positiva de *Ae. aegypti* para o RT-PCR também foi testada para o isolamento em cultura de células C6/36, a qual não apresentou efeito citopático. O teste de imunofluorescência indireta também confirmou o resultado apresentado pela cultura de célula, sendo não-reagente com o anticorpo policlonal para o gênero Flavivírus. A amostra de *Ae. albopictus* positiva para o DENV-1 foi inoculada

em cultura de células C6/36 e também não apresentou efeito citopático com a confirmação pelo teste de imunofluorescência.

Tabela 13: Prevalência da infecção pelo vírus Dengue em amostras de *Aedes* spp. coletadas na Região Metropolitana do Recife, no período de Maio/2004 a Janeiro/2006 estimada pelo método *Pool Screen*.

Mês/ano da coleta	Coletas de adultos				Coletas de ovos			
	<i>Aedes aegypti</i>		<i>Aedes albopictus</i>		<i>Aedes aegypti</i>		<i>Aedes albopictus</i>	
	Nº de <i>pools</i> positivos (total)	Prevalência estimada em % (IC)	Nº de <i>pools</i> positivos (total)	Prevalência estimada em % (IC)	Nº de <i>pools</i> positivos (total)	Prevalência estimada em % (IC)	Nº de <i>pools</i> positivos (total)	Prevalência estimada em % (IC)
Maio/2004	-	-	0 (05)	-	-	-	-	-
Junho/2004	-	-	1 (17)	1,39 (0,87 a 14,81)	-	-	-	-
Julho/2004	0 (01)	0	0 (11)	0	-	-	-	-
Dezembro/2004	0 (03)	0	-	-	1 (14)	0,38 (0,23 a 4,19)	0 (01)	0
Janeiro/2005	0 (02)	0	-	-	0 (09)	0	-	-
Fevereiro/2005	0 (06)	0	0 (01)	0	2 (25)	0,66 (0,38 a 3,92)	-	-
Março/2005	0 (02)	0	-	-	0 (09)	0	-	-
Abril/2005	0 (06)	0	-	-	0 (16)	0	-	-
Maio/2005	0 (10)	0	-	-	1 (19)	0,62 (0,39 a 6,9)	0 (02)	0
Junho/2005	1 (04)	15,11 (5,71 a 62,44)	-	-	0 (02)	0	-	-
Julho/2005	0 (02)	0	-	-	0 (09)	0	0 (01)	0
Agosto/2005	2 (06)	25,84 (10,54 a 68,46)	-	-	1 (17)	0,25 (0,16 a 2,96)	0 (03)	0
Setembro/2005	-	-	-	-	1 (02)	2,18 (0,16 a 9,40)	-	-
Outubro/2005	0 (06)	0	-	-	-	-	-	-
Novembro/2005	0 (03)	0	-	-	-	-	-	-
Dezembro/2005	-	-	-	-	-	-	-	-
Janeiro/2006	-	-	-	-	-	-	0 (03)	0
Total	3 (51)		1 (34)		6 (122)		0 (10)	

IC = Intervalo de confiança

VIII. DISCUSSÃO

Este trabalho representa a primeira análise da estrutura genética de populações naturais de *Aedes albopictus* provenientes de diferentes estados do Brasil, através do DNA mitocondrial.

No presente trabalho, oito haplótipos diferentes foram detectados para o gene COII em um total de 252 indivíduos analisados, o que resultou em um polimorfismo de 3,17%. Este valor foi menor do que o encontrado em populações naturais de *Ae. aegypti* do Brasil analisadas pelo mesmo gene, cujo polimorfismo encontrado foi de 5,7% (GUEDES, 2003). Para o gene ND4, em um total de 273 indivíduos analisados foram encontrados onze haplótipos diferentes, que resultou em um polimorfismo de 4,03%. Este valor foi considerado elevado quando comparado aos valores descritos para as populações de *Ae. aegypti* do México, Tailândia e Peru (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE *et al.* 2000, 2002; BOSIO *et al.*, 2005; COSTA-DA-SILVA; CAPURRO; BRACCO, 2005). As populações provenientes do município de Moreno foram as mais polimórficas para ambos os genes. Este município é circundado por uma área de mata onde podem existir populações de *Ae. albopictus* com uma alta variabilidade genética e que podem atuar como uma fonte para colonizar áreas urbanas anteriormente tratadas. As populações do Rio de Janeiro e Minas Gerais foram consideradas idênticas pela análise do gene ND4. Nossos dados corroboraram com Ayres *et al.* (2002), que analisaram as populações de *Aedes albopictus* provenientes do Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais (MG) e Pernambuco (PE) pela técnica de RAPD. Neste trabalho, os autores atribuíram a variação genética observada entre as populações brasileiras à deriva genética associada a um fluxo gênico restrito e concluíram que as populações do RJ e MG eram geneticamente mais próximas do que as populações de PE com a formação de dois grupos distintos.

A média da diversidade nucleotídica (π) encontrada em todos os haplótipos das populações analisadas para o gene COII foi de 0,04679. Para o gene ND4, o valor de π encontrado foi de 0,10831. Isto indica que o gene COII é mais conservado que o ND4. A alta diversidade nucleotídica encontrada neste gene nas populações estudadas no presente trabalho pode ter ocorrido devido à presença de um haplótipo encontrado apenas nas populações de Cohab e Nossa Senhora de Fátima, localizadas no município de Moreno. O dendrograma mostrou que este haplótipo apresentou-se bem divergente quando comparado aos demais.

A diversidade nucleotídica encontrada nos dois genes mitocondriais do *Ae. albopictus* também foi comparada com a diversidade nucleotídica de genes nucleares de *Ae. aegypti*. Neste trabalho encontramos uma variação nucleotídica de 46 SNPs por 1000 pb ($\pi = 0,04679$) para o gene COII e de 108 SNPs por 1000 pb ($\pi = 0,10831$) para o gene ND4. A maioria das substituições ocorridas nos dois genes foi do tipo sinônimas, sugerindo que estes genes podem estar sob seleção positiva. Morlais e Severson (2003) identificaram, em 25 genes nucleares analisados, uma variação nucleotídica média de 12 SNPs por 1000 pb ($\pi = 0,0122$). Estes autores concluíram que a diversidade nucleotídica varia de acordo com o papel desempenhado por cada gene nuclear. Essas diferenças podem ser explicadas em razão do marcador molecular utilizado, o DNA mitocondrial, que apresenta uma taxa de evolução 10 vezes maior que o DNA nuclear, uma vez que este genoma não possui mecanismo de reparo (RAI, 1991).

A caracterização da estrutura genética através da análise do DNA mitocondrial tem sido bastante estudada em populações de mosquitos. Os resultados da AMOVA para os dois genes estudados nas populações de *Ae. albopictus* mostraram que as variações encontradas entre as populações foram resultantes de variações ocorridas entre as populações dentro de um grupo. Os grupos foram separados em quatro análises: sem hierarquia, divididos por região (Nordeste e Sudeste), por estados (MG, RJ e PE) e divididos por cidades. Os índices de fixação F_{st} e F_{ct} para os dois genes foram considerados elevados e significantes e indicaram uma alta estruturação dessas populações. As variações encontradas dentro das populações podem sugerir influência da deriva genética, que atua no aumento da variação genética entre as populações. Como consequência, seria esperado encontrar alguns haplótipos raros ou restritos a uma única população ou a populações geograficamente próximas.

Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2000), analisaram o polimorfismo do gene ND4 em populações naturais de *Ae. aegypti* no México e detectaram sete haplótipos em um total de 574 indivíduos analisados, com uma variação de 1,22%. A diversidade nucleotídica encontrada entre aquelas populações foi de 0,01434. Em 2002, Gorrochotegui-Escalante *et al.* aumentaram o número de indivíduos submetidos ao mesmo tipo de análise e detectaram a presença de 25 haplótipos que resultou em uma variação de 1,26%. Os resultados da AMOVA mostraram que a maioria das variações encontradas foi resultante de variações detectadas entre mosquitos dentro do mesmo sítio de coleta, ou seja, dentro das populações. Os autores concluíram que o padrão de estruturação genética variou por região. Nas populações de *Ae. aegypti* provenientes da

Tailândia foi identificada uma pequena variação, onde apenas 7 haplótipos foram identificados em um total de 1346 indivíduos, proporcionando uma variação de 0.5% (BOSIO *et al.*, 2005). Nessas populações o valor de π encontrado foi de 0,00793, aproximadamente, duas vezes menor quando comparada às populações do México e dez vezes menor quando comparadas às populações de *Ae. albopictus* do presente trabalho. Os dados da AMOVA mostraram que a maioria das variações encontradas (~57%) também foi resultante de variações detectadas dentro das populações, porém não foi detectada nenhuma relação na diminuição da distância genética com o aumento da distância geográfica. Apenas 18% das variações encontradas foram resultantes de variações identificadas entre as populações dentro de um grupo. Porém, este valor foi altamente significativo e, por essa razão, os autores concluíram que essas populações da Tailândia estavam sob influência da deriva genética. Nas populações de *Ae. aegypti* provenientes do Peru, a diversidade nucleotídica encontrada foi de 0,00790 (COSTA-SILVA; CAPURRO; BRACCO, 2005). Corroborando os dados descritos no presente trabalho, os autores também observaram que a maioria das substituições ocorridas nos dois genes foi do tipo sinônima. Os autores também identificaram uma alta estruturação dessas populações ($F_{st} = 0.64568$ e $F_{sc} = 0.77804$), o que reforçou a hipótese de fluxo gênico restrito entre elas. Os resultados apresentados neste trabalho também corroboraram os de Gomes Jr (2005), que caracterizou populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* em dois bairros da Região Metropolitana do Recife através do SSCP do gene COII ao longo de um ano. O autor concluiu que existe uma alta diferenciação genética observada entre as populações estudadas, a qual varia nas diferentes épocas do ano.

A alta variabilidade genética encontrada entre as populações estudadas sugere que essas populações de *Ae. albopictus* podem apresentar variações no seu padrão de transmissão de doenças. Mesmo assim, os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a análise do DNA mitocondrial associado ao SSCP é uma ferramenta eficiente na caracterização da estrutura genética de populações naturais recém introduzidas em um determinado local. Este marcador também poderá ser útil na epidemiologia molecular para traçar rotas de dispersão desta espécie e monitorar o impacto das intervenções dos programas de controle de uma maneira rápida e precisa.

Devido à falta de uma vacina segura e eficaz contra os quatro sorotipos do vírus Dengue, a prevenção das epidemias depende substancialmente do controle dos vetores responsáveis pela sua transmissão. No período de Maio a Junho de 2004, todas as

coletas foram realizadas em áreas randômicas do município de Moreno onde foram capturados apenas mosquitos adultos. Dentre as amostras coletadas, apenas um *pool* foi de *Ae. aegypti* e todos os *pools* restantes foram da espécie *Ae. albopictus*. De um total de 34 *pools* analisados pela técnica de RT-PCR, apenas 1 *pool* formado por 2 fêmeas coletadas na forma adulta foi positivo para o vírus Dengue e o sorotipo identificado na amostra foi o DENV-1. Este foi o primeiro achado no Brasil da identificação do vírus Dengue em amostras de *Ae. albopictus*, coletados em campo na forma adulta. Os dados sobre vigilância entomológica mostraram que durante o período de Dezembro de 2004 a Janeiro de 2006, foi identificada nas amostras de *Ae. aegypti* analisadas provenientes da Região Metropolitana do Recife a circulação por transmissão horizontal dos sorotipos DENV-1 e DENV-3; e por transmissão vertical ou transovariana, a circulação de três sorotipos do vírus Dengue: DENV-1, DENV-2 e DENV-3. O sorotipo mais freqüente observado nas amostras positivas de *Ae. aegypti* foi o DENV-1. No entanto, nenhuma amostra foi positiva para o isolamento em cultura de células C6/36, o que comprova a maior sensibilidade da técnica RT-PCR em detectar a presença de partículas virais presentes no mosquito, mesmo em pequenas quantidades. Urdaneta *et al.* (2005) testaram a sensibilidade da técnica RT-PCR em detectar a presença de vírus em *pools* de *Ae. aegypti*. Os autores utilizaram diferentes concentrações para o título viral inoculado nos mosquitos e diferentes tamanhos de *pools* e obtiveram, através deste experimento, um limite de detecção de 0,1PFU/ml para cada sorotipo do vírus Dengue em *pools* de 5 mosquitos. Este limite foi mantido mesmo com o aumento do tamanho do *pool* para 100 mosquitos. Para o isolamento em cultura de células C6/36, o limite de detecção para os três sorotipos do Dengue disponíveis em nosso laboratório foi de 10^3 PFU/ml (dados não publicados). Esses resultados são de grande importância para estudos epidemiológicos, quando são coletadas um grande número de amostras de mosquitos e, por essa razão, necessitam ser separadas por *pools*.

Em todas as residências, onde foram encontrados mosquitos da espécie *Ae. aegypti* infectados com o vírus Dengue, os pacientes apresentaram IgG ou IgM positivos, o que indica que estes pacientes tiveram contato com o vírus. Os testes para detecção de anticorpos anti-IgM e anti-IgG, através de ensaios de ELISA, são bastante utilizados em testes diagnóstico para confirmação da infecção pelo vírus Dengue. Sangsang *et al.* (2005) analisaram através da técnica de ELISA a resposta dos anticorpos anti-IgM e anti-IgG específicos contra o vírus Dengue durante a evolução da doença em pacientes provenientes de um hospital da Tailândia. Este estudo corroborou estudos

anteriores que confirmou que a resposta dos anticorpos anti-IgM é mais eficiente nas infecções primárias, enquanto que a resposta dos anticorpos anti-IgG é mais eficiente nas infecções secundárias do que nas primárias, especialmente nos estágios iniciais da doença (VAUGHN *et al.*, 1997; CHANAMA *et al.*, 2004; INNIS, 1997).

A densidade populacional do *Ae. aegypti* foi superior à do *Ae. albopictus* na maioria das coletas analisadas, com exceção das coletas realizadas no município de Moreno, onde o *Ae. albopictus* é predominante. Diversos estudos apontam o monitoramento do vírus Dengue em amostras de *Aedes* spp. como uma das formas de se prevenir grandes epidemias. Em Singapura, Chow *et al.* (1998) detectaram uma taxa de infecção mínima para o *Ae. aegypti* de 57,6 mosquitos contaminados para cada 1.000 mosquitos analisados. Para o *Ae. albopictus*, a taxa mínima de infecção foi de 50 mosquitos contaminados para cada 1.000 mosquitos analisados. Diallo *et al.* (2003) detectaram, numa situação de transmissão silenciosa do Dengue, uma taxa de infecção mínima de 2,74 mosquitos contaminados para cada 1.000 analisados. Em áreas rurais do sul da Índia, onde o *Ae. aegypti* é o principal vetor do dengue, a taxa de infecção mínima foi de 2,19 por 1000 mosquitos, enquanto que para o *Ae. albopictus* foi de 2,75. Aquele foi o primeiro caso de isolamento do vírus Dengue em *Ae. aegypti* em área rural da Índia (TEWARI *et al.*, 2004). Os dados aqui apresentados sugerem que os valores da MIR identificados não retratam a taxa de infecção vetorial natural, em razão do número de mosquitos capturados de maneira aleatória não ter sido significativo. Os resultados apresentados pelo método de *Pool Screen*, para estimar a prevalência de infecção nestes mosquitos, não podem ser comparados diretamente com os resultados da MIR relatados, por tratar-se de duas metodologias diferentes.

Os resultados mostram a ocorrência de infecção natural pelo DENV-1 nas populações de *Ae. albopictus* provenientes do município de Moreno. Durante o período em que foram realizadas as coletas para o presente estudo, foram confirmados quinze casos de dengue em Moreno por testes clínicos e sorológicos. No entanto, nenhuma das amostras destes pacientes foram submetidas à identificação do sorotipo presente por cultura de células C6/36 ou por RT-PCR e, por esta razão, não existe a confirmação epidemiológica do envolvimento do *Ae. albopictus* na transmissão do Dengue. Mesmo assim, a presença do *Ae. albopictus* não deve ser mais negligenciada dentro do Programa Nacional de Controle da Dengue principalmente nas áreas onde esta espécie é abundante. Uma vez que o homem é o único reservatório do vírus no ambiente urbano, é provável que as fêmeas infectadas tenham adquirido o vírus através de uma pessoa

infectada. Sendo assim, a crescente e acelerada expansão deste mosquito em território brasileiro, associada à sua competência vetorial já comprovada, pode torná-lo uma ameaça aos programas de controle, podendo vir a desempenhar um papel importante, ainda que secundário, na transmissão do vírus Dengue no país.

IX. CONCLUSÕES

- As populações de *Ae. albopictus* analisadas neste trabalho exibem uma alto grau de diversidade genética no genoma mitocondrial e estão diferenciadas quando oriundas de estados diferentes;
- As populações da região sudeste (MG e RJ) apresentaram uma baixa diferenciação genética, enquanto que nas populações da Região Metropolitana do Recife esta diferenciação foi considerada alta;
- O SSCP mostrou ser uma técnica bastante informativa na caracterização da estrutura genética de espécies como *Ae. albopictus*, introduzida no Brasil a menos de 30 anos;
- As variações observadas para os genes COII e ND4, em todas as populações estudadas, foram maiores ao nível intrapopulacional;
- O diagnóstico de infecção vetorial revelou a circulação do sorotipo 1 do vírus Dengue na população de *Ae. albopictus* de Moreno-PE. Nas populações de *Ae. aegypti* do Recife foi identificada a circulação, por transmissão horizontal, do DENV-1 e DENV-3 e por transmissão vertical do DENV-1, DENV-2 e DENV-3;
- Apesar da detecção do vírus Dengue na população de *Ae. albopictus* de Moreno, não é possível afirmar o envolvimento desta espécie no ciclo de transmissão local da doença;
- A taxa de infecção pelo vírus Dengue nas populações de *Aedes* spp. estimada no presente trabalho não representa a taxa de infecção vetorial natural em razão do número de mosquitos capturados de maneira randômica não ter sido significante.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. M. R. *et al.* Primeiro registro de *Aedes albopictus* em área de Mata Atlântica, Recife, PE, Brasil. *Rev. Saude Publica*, v. 34, n. 3, p. 314-315, 2000.

ANASTÁCIO, D. B. Estudo da distribuição espacial da resistência ao inseticida químico Temephos em populações de *Aedes aegypti* no município de Recife-PE. p. 14. Monografia apresentada para conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas-Faculdade Frassinetti do Recife (FAFIRE), 2002.

ARIAS, M. A.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos de DNA. In: MARTIOLI, S. R. (ed) *Biologia Molecular e Evolução*, São Paulo: Holos editora, p. 143-152, 2001.

AYRES, C. F. J. *et al.* Genetic Diversity in Brazilian Populations of *Aedes albopictus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.

BOOM, R. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

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.

CASTRO, M. G. *et al.* Dengue virus detection by using reverse transcription polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 8, p. 809-814, 2004.

CHANAMA, S. *et al.* Analysis of specific IgM response in secondary dengue infection: level and positive rates in comparison with primary infection. *J. Clin. Virol.*, v. 31, p. 185-189, 2004.

CHOW, V. T. K. *et al.* Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 58, n. 5, p. 578-86, 1998.

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

COOK, S. *et al.* Mitochondrial markers for molecular identification of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae) involved in transmission of arboviral disease in West Africa. *J. Med. Entomol.*, v. 42, n. 1, p. 19-28, 2005.

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. 639-644, 2005.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. L. Dengue: a review of the laboratory tests. A clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

DIALLO, M. *et al.* Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 9, p. 362-366, 2003.

EFFLER, P. V. *et al.* Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 11, n. 5, p. 742-749, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v. 131, p. 479-491, 1992.

FAY R. W.; PERRY S. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, v. 25, p. 276-281, 1965.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. 2^a ed., EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 220 pp. 1998.

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Brasil. *Rev. Saude Publ. Sao Paulo*, v. 20, p. 244-45, 1986.

FOUQUE, F.; GARINCI, R.; GABORIT, P. Epidemiological and entomological surveillance of the co-circulation of DEN-1, DEN-2 and DEN-4 viruses in French Guiana. *Trop. Med. Int. Health*, v. 9, n. 1, p. 41-46, 2004.

FULTON, R. E. *et al.* SSCP analysis of cDNA markers provides a dense linkage map of *Aedes aegypti* genome. *Genetics*, v. 158, p. 715-726, 2001.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.*, v. 18, p. 215-227, 2004.

- GOMES JR, P. P. Variação genética em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. 75p. Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 2005.
- 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.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 1, n. 3, p. 480-496, 1998.
- GUBLER, D. J. *et al.* Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environ. Health Perspect.*, v. 109 (Suppl. 2), p. 223-233, 2001.
- GUEDES, D. R. D. Análise da diversidade genética do DNA mitocondrial em populações de *Aedes aegypti* do Brasil. 43f. Monografia apresentada para conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biomédicas-Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 2003.
- HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 4 (Suppl.), p. 1-40, 1988.
- HAWLEY, W. A. *et al.* Overwintering survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs in Indiana. *J. Med. Entomol.*, v. 26, n. 2, p. 122-129, 1989.
- HAYASHI, K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Method Appl.*, v. 1, p. 34-38, 1991.
- HENCHAL, E. A. *et al.* Dengue virus specific and Flavivírus group reactive determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 31, p. 830-836, 1982.

HISS, R. H. *et al.* Molecular taxonomy using single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of mitochondrial ribosomal DNA genes. *Insect Mol. Biol.*, v. 3, n. 3, p. 171-182, 1994.

HO, C. M. *et al.* Gene for cytochrome C oxidase subunit II in the mitochondrial DNA of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, v. 32, n. 2, p. 174-180, 1995.

HODGKINSON, V. H. *et al.* Rapid identification of mitochondrial cytochrome B haplotypes by single strand conformation polymorphism in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, v. 39, n. 4, p. 689-694, 2002.

HOLICK, J. *et al.* Discovery of *Aedes albopictus* infected with West Nile virus in southeastern Pennsylvania. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 18, p. 131, 2002.

HOY, M. A. Molecular Systematics and Evolution of Arthropods. Em: Insect Molecular Genetics. An introduction to principles and applications. Academic Press of Elsevier Science, p. 363-365, 2003.

HULL, B. *et al.* Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 33, n. 6, p. 1248-50, 1984.

IBANEZ-BERNAL, S. *et al.* First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med. Vet. Entomol.*, v. 11, p. 305-309, 1997.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.*, v. 40, n. 3, p. 531-44, 1978.

INNIS, B. L. Antibody responses to dengue virus infection. Em: Gubler D. J., Kuno G., eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International, 1997: pp. 221-245.

JINFU, W.; CHAOHUI, H. Molecular divergence of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in three mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 18, n. 4, p. 301-306, 2002.

KATHOLI, C. R. *et al.* Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. *J. Infect. Dis.*, v. 172, p. 1414-1417, 1995.

- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, v. 16, p. 111-120, 1980.
- KOEKEMOER, L. L. *et al.* Single-strand conformation polymorphism analysis for identification of four members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. *J. Med. Entomol.*, v. 36, n. 2, p. 125-130, 1999.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, v. 5, p. 150-163, 2004.
- LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, The United States and Cayman Islands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 69, p. 105-114, 2003.
- MILLER, B. R.; BALLINGER, M. E. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: Vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 82, p. 476-77, 1988.
- MITCHELL, C. J. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in Mediterranean Basin. *J. Vector Ecol.*, v. 20, p. 44-58, 1995.
- NEI, M.; TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, v. 97, p. 145-163, 1981.
- RAI, K. S. *Aedes albopictus* in the Americas. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 36, p. 459-484, 1991.
- REITER, P.; SPRENGER, D. The used tire trade: a mechanism of the world-wide dispersal of container breeding mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 3, p. 494-501.
- ROZAS, J. *et al.* DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and others methods. *Bioinformatics*, v. 19, p. 2496-2497, 2003.

SA-NGASANG, A. *et al.* Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Epidemiol. Infect.*, p. 1-6, 2005.

SANTOS, R. LA C. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). *Rev. Saude Publica*, v. 37, n. 5, p. 671-673, 2003.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. *ARLEQUIN, Version 2.000: A software for population genetic data analysis*. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.

SERUFO, J. C. *et al.* Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 88, p. 503-504, 1993.

SKUSE, F. A. A. The banded mosquito of Bengal. *Indian Mus. Notes* 3:20, 1894.

SMITH, C. E. G. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59, p. 243-251, 1956.

TABACHNICK, W. J.; BLACK IV, W. C. Population genetics in vector biology. In: Marquardt W. C. & Beaty B. J. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, Niwot, p. 417-437, 1996.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad. Saude Publica*, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, 2005.

TEWARI, S. C. *et al.* Dengue vector prevalence and virus infection in a rural area in south India. *Trop. Med. Int. Health*, v. 9, n. 4, p. 499-507, 2004.

URBANELLI, S. *et al.* Population Structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity*, v. 84, p. 331-337, 2000.

URDANETA, L. *et al.* Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by DNA polymerase chain reaction. *Infect. Genet. Evol.*, v. 5, p. 177-184, 2005.

VAUGHN, D. W. *et al.* Dengue in early febrile phase: viremia and antibody responses. *J. Infect. Dis.*, v. 176, p. 322-330, 1997.

ZUO, L.; SHU, L. P. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a dengue virus strain from *Aedes albopictus* collected in Ma wei town in Guizhou Province, China. *Chin. Med. J.*, v. 117, n. 12, p. 1847-1849, 2004.

XI. ANEXO I



Centro de Pesquisas

AGGEU MAGALHÃES



FIOCRUZ

Ministério da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE MOSQUITOS INTRADOMICILIAR E PERIDOMICILIAR DO PROJETO *Vacina de Dengue baseada em epitopos, tetravalente e direcionada ao compartimento MMCI*

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Prezado Sr (a),

Estamos realizando um estudo sobre a Dengue. Para conhecer mais sobre a doença, precisamos fazer a coleta do mosquito vetor e transmissor do vírus da dengue. Para isto, precisamos colocar armadilhas de captura de mosquitos na sua residência. O Sr (a) estará contribuindo para o melhor entendimento da Dengue e para o desenvolvimento de uma vacina contra doença e tem garantido os seguintes direitos:

- 1) A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa;
- 2) A liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isto traga prejuízo à continuação dos meus cuidados e tratamento;
- 3) A segurança de que não será identificado(a) e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a sua privacidade;
- 4) Caso sejam encontrados mosquitos positivos para o vírus da dengue, além do Departamento de Vigilância Sanitária das Secretarias de Saúde do Município e do Estado serem informados, também o serão os habitantes da residência para que medidas efetivas de controle e eliminação dos criadouros sejam tomadas.

Gostaríamos de contar com a sua colaboração e se o sr(a) concordar em participar, pedimos que assine este papel dizendo que entendeu as explicações e está concordando.

Eu, _____, RG N^o _____,

Tendo recebido as informações e ciente dos meus direitos acima relacionados, concordo em participar deste estudo. Recife, ____ / ____ / ____.

Assinatura do responsável por menores de 18 anos, participantes da pesquisa:

XII. ANEXO II



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM

Título do Projeto: "Epidemiologia Molecular do *Aedes albopictus* (Díptera: Culicidae)".

Pesquisador responsável: Duschinka Ribeiro Duarte Guedes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 15.02.2005

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 04/05

PARECER

A Comissão considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96 e complementares

Recife, 02 de março de 2005

Ana Maria A. Santos

Dr^a Ana Maria Aguiar dos Santos
Médica
Coordenação
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

XIII. ARTIGO

FIRST REPORT OF FIELD-CAUGHT *Aedes albopictus* (DIPTERA: CULICIDAE) NATURALLY INFECTED WITH DENGUE VIRUS IN BRAZIL

DUSCHINKA R. D. GUEDES, MARLI TENÓRIO, CLÁUDIO J. DA SILVA, MARIA ALICE V. DE MELO-SANTOS, LÊDA REGIS CONSTÂNCIA F. J. AYRES AND ANDRÉ F. FURTADO

Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Brasil;

Abstract. Virological surveillance of dengue viruses in *Aedes* spp. populations constitutes a powerful tool for early prediction of dengue outbreaks. The role of *Ae. albopictus* in dengue transmission in Brazil is unclear. Nevertheless, this species introduced in the country in 1986, spreads so rapidly that nowadays it is present in almost all urban areas. From May 2004 to January 2006 adults mosquitoes and eggs of *Ae. albopictus* were caught from selected dengue-sensitive areas in Brazil and assayed by RT-PCR. From 44 pools analyzed, one was positive for DENV-1. This is the first report of DENV detection from field-collected adult females of *Ae. albopictus* in Brazil.

Aedes albopictus (Skuse), known as the “Asian tiger”, is a mosquito originated from the tropical forests of Southeast Asia.¹ During decades, this species has spread so fast and, nowadays, it can be found in Asia, Africa, Europe, Americas (North and South) and Australia.^{2, 3} In 1985, large populations of *Ae. albopictus* were discovered throughout Texas, and by 1989 this species was widely distributed within 18 states in the United States.⁴ The initial invasion and spread of this species in Brazil occurred in the state of Rio de Janeiro (RJ) in 1986.⁵ In the same year, it was found in São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) and Espírito Santo (ES).⁶ Currently, this species is present in 20 of the 27 Brazilian states.⁷

Under experimental conditions, *Ae. albopictus* is a competent vector for at least 22 arbovirus, including all four serotypes of Dengue and yellow fever viruses.² Recently, this species was also found naturally infected with West Nile virus in Pennsylvania.⁸ *Ae. albopictus* has the ability to colonize different environments, and could also sustain cycles of the yellow fever transmission in enzootic areas by connecting the sylvatic and the urban environments.⁶ Besides that, the species has the possibility of naturally transmitting the Dengue serotypes 2 and 3 vertically.⁹ In the Americas, *Ae. albopictus* has never been incriminated as a dengue vector, but it has been found naturally infected with Dengue virus in Mexico.⁹ Additionally, in a serological survey in Campos Alto City, in the state of Minas Gerais (Southeastern Brazil), a small number of cases of dengue were reported but no *Aedes aegypti* was found. In the same locality, an entomological survey isolated DENV-1 from two pools of larvae of *Ae. albopictus* collected from used tires.¹⁰

The prevention and control of dengue outbreaks depend upon the surveillance of cases and mosquito control. Therefore, according to Brazilian Program for dengue control, *Ae. albopictus* is not considered as a target species, consequently, only the domestic breeding sites are eliminated or treated. From May 2004 to January 2006 we conducted an entomological surveillance based on the detection of Dengue serotypes circulating in *Ae. albopictus* populations from the municipalities of Moreno and Recife, Pernambuco, Brazil using the RT-PCR technique.

We analyzed a total of 389 mosquitoes. The specimen collection was conducted using two distinct methodologies. From the municipality of Moreno, 270 adult mosquitoes were randomly collected in peridomiciliar area using a battery-operated, back-packed aspirator. In addition, 58 mosquitoes were obtained from eggs collected using ovitraps. In Recife, the mosquito collections were made in houses where clinical

suspected cases of Dengue infection were identified. Sixty mosquitoes were obtained from eggs collected using ovitraps and only one adult mosquito was collected in domiciliary area by suction. The adults were sorted by locality, sexed and stored at -70° C until used for the RT-PCR. Eggs were reared to adults in the insectarium of the Department of Entomology at the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, under standard conditions (temperature 26° C ± 1° C, relative humidity 60% to 80% and 12:12-h light/dark cycle). After five days, dead mosquitoes were discarded, and live ones were stored at -70° C until tested. Using the silica method, total RNAs were extracted from adults and assayed for dengue viral RNA by semi-nested PCR.¹¹ Before semi-nested PCR assay, all the RNAs products were treated with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen) to eliminate DNA contaminants.

From a total of 44 pools of *Ae. albopictus* tested for RT-PCR, only one pool containing two field collected females, was found positive for dengue virus serotype 1 (Table and Figure). This is the first report of DENV detection in field-collected adult females of *Ae. albopictus* in Brazil. The minimum infection rate (MIR) was estimated as 3,69 per 1.000 mosquitoes. In Singapore, where *Ae. albopictus* plays a secondary but important role in dengue transmission, the average MIRs were 50.0.¹²

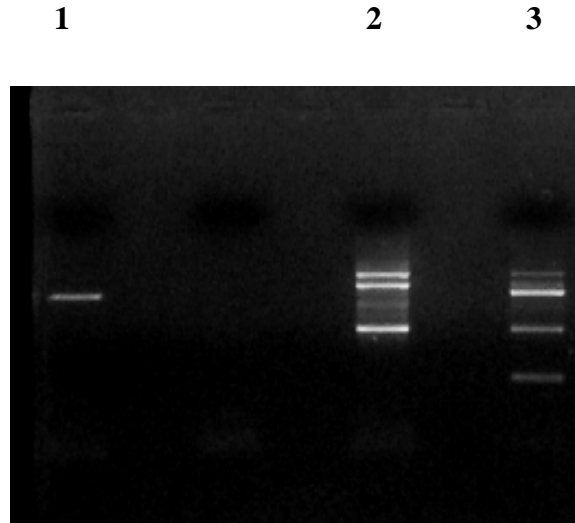


Figure. Agarose gel analysis of the second-round amplification with type-specific primers TS1, TS2, TS3 and TS4. Lane 1- confirmation of dengue type 1 in *Aedes albopictus* mosquito; Lane 2 – positive control (DEN3); lane 3-molecular marker for dengue virus resulting from the mixture of DENV1, DENV2 and DENV3.

The positive pool was formed by 2 females collected from the municipality of Moreno, where *Ae. albopictus* is more abundant than *Ae. aegypti* (Melo-Santos, unpublished data). Fifteen dengue cases were confirmed by clinical and serological tests in Moreno within the period when mosquito samples have been taken for this study. However, since human blood samples have not been examined for dengue virus identification, there is no epidemiological confirmation for the involvement of *Ae. albopictus* in dengue virus transmission. Nevertheless, since human is the only reservoir in urban environments, it is reasonable to suppose that the positive female (s) has acquired the virus from an infected person. The presence of this species in the urban areas might be considered therefore as a risk for dengue virus transmission. These data suggest that vector control program could be directed not only against *Ae. aegypti* but also against *Ae. albopictus* populations, especially in areas where this species is abundant.

Ae. albopictus samples from Rio de Janeiro and others southeastern Brazilian cities have demonstrated to be susceptible to DENV transmission, suggesting that this species may play a role in the maintenance of the dengue virus transmission.¹³ In some districts within the Recife Metropolitan Region, *Ae. albopictus* predominates over *Ae. aegypti*, however no effort is made to direct control measures to *Ae. albopictus* breeding places. Consequently, the introduction of new *Ae. albopictus* population and the spread of this species in the Americas, especially in dengue-sensitive areas, associated with its vector capacity in transmitting DENV is a threat for dengue control campaigns. Therefore, entomological surveillance for monitoring dengue virus in vector populations needs to be continuously used as an early warning system to predict outbreaks.

REFERENCES

1. Smith CEG, 1956. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *J Trop Med Hyg* 59: 243-251.
2. Gratz NG, 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 18: 215-227.
3. Russel RC, Williams CR, Sutherst RW, Ritchie SA, 2005. *Aedes* (Stegomyia) *albopictus*- a dengue threat for Southern Australia. *Commun Dis Intell* 29: 296-298.
4. Rai KS, 1991. *Aedes albopictus* in the Americas. *Annu Rev Entomol* 36: 459-484.
5. Forattini OP, 1986. Identificação de *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* no Brasil. *Rev Saude Publ Sao Paulo* 20: 244-245.
6. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R, 1994. *Principais Mosquitos de Importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz.
7. Santos RLAC, 2003. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). *Rev Saude Publica* 37: 671-673.
8. Holick J, Kyle A, Ferraro W, Delaney RR, Iwaseczk M, 2002. Discovery of *Aedes albopictus* infected with West Nile virus in Southeastern Pennsylvania. *J Am Mosq Control Assoc* 18: 131.
9. Ibanez-Bernal S, Briseno B, Mutebi JP, Argot A, Rodrigues G, Martinez Campos C, Paz R, de la Fuente San Roman, P, Tapia Conyer R, Flisser A, 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med Vet Entomol* 11: 305-309.
10. Serufo JC, Oca HM, de Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, Lemos JR, Oliveira MA, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 503-504.
11. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV, 1992. Rapid detection and typing of dengue virus from clinical samples by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 545-551.
12. Chow VTK, Chan YC, Young R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, Lam-Phua SG, Tan BT, 1998. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am J Trop Med Hyg* 58: 578-586.

13. Lourenço de Oliveira R, Vazeille M, de Fillipis AM, Failloux AB, 2003. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States and Cayman Islands. *Am J Trop Med Hyg* 69: 105-114.

TABLE.
Reverse transcription-polymerase chain reaction-positive *Aedes albopictus* mosquito pool and dengue virus serotype detected

Locality	Total n° of mosquitoes		N° of pools assayed (N° of positive pools)		Dengue virus serotype detected		
	Mosquitoes collected by ovitrap	Mosquitoes collected in adult stage	Mosquitoes collected by ovitrap	Mosquitoes collected in adult stage	DENV-1	DENV-2	DENV-3
	Moreno	58	270	03 (0)	33 (1)	1	0
Recife	60	01	07 (0)	01 (0)	0	0	0
Total	118	271	10 (0)	34 (1)			