Mariana Devicari

**Caracterização populacional de *Aedes scapularis* (Diptera; Culicidae):
aspectos moleculares, morfométricos e morfológicos.**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção de Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2010

Mariana Devicari

**Caracterização populacional de *Aedes scapularis* (Diptera; Culicidae):
aspectos moleculares, morfométricos e morfológicos.**

Dissertação apresentada ao Departamento
de Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção de Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno – Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Suesdek

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Devicari, Mariana.

Caracterização populacional de *Aedes scapularis* (Diptera; Culicidae): aspectos moleculares, morfométricos e morfológicos. / Mariana Devicari. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Lincoln Suesdek, Rocha.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Culicídeos de interesse

Versão do título para o inglês: Characterization population of *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae): aspect molecular, morphological and morphometric.

Descritores: 1. *Aedes* 2. Insetos vetores 3. Morfometria 4. DNA Mitochondrial 5. Evolução I. Rocha Lincoln Suesdek II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. III. Título.

ICB/SBIB0173/2010

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

Candidato (a): Mariana Devicari

Título da dissertação: Caracterização populacional de *Aedes scapularis* (Diptera; Culicidae): aspectos moleculares, morfométricos e morfológicos.

Orientador (a): Profº Drº Lincoln Suesdek Rocha

A Comissão julgadora dos trabalhos de defesa da dissertação de mestrado, em sessão publica realizada a ____/____/____.

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 295, referente ao projeto intitulado: "*Caracterização populacional de Aedes scapularis (Diptera: Culicidae): aspectos moleculares, morfométricos e morfológicos*" sob a responsabilidade de Mariana Devicari, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 24 de março de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus queridos pais,
Décio Devicari e Maria Dolores Solá
Cantero Devicari que sempre me
apoiam e me deram muito amor em
todos os momentos da minha vida. Aos
meus irmãos Felipe e Rafael, que
sempre estão ao meu lado. Aos meus
queridos amigos e familiares que
sempre compartilharam bons e maus
momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, carinho, amor, união, aprendizado durante essa etapa.

Ao meu orientador Dr. Lincoln Suesdek Rocha pela oportunidade, pelo ensinamento, pela amizade e pela orientação em todos os momentos da realização do trabalho.

À Camila Moratore, pela amizade desde a época da graduação, e que juntas trilhamos o início da carreira científica.

À Maria Cristina Jurcovich Peruzin pela amizade que foi construída dentro do laboratório e que permanece até hoje e também pela disposição de sempre ajudar.

Aos amigos do laboratório Fábio de Almeida (Fio), Paloma Oliveira Vidal (Pá), Eduardo Kuwabara (Edu) e Vivian Petersen (Cidinha) pela amizade e também porque estiveram sempre presentes em todos os momentos, disciplinas, congressos, discussões científica e também os “happy hour” alegrando sempre os dias.

À Dra. Toshie Kawano (*In memoriam*), que em sua jornada, deixou bons ensinamentos científicos, mas também com sua amizade, cumplicidade, simpatia e carinho nos deixou eternas lembranças e imensa saudade.

A todos do laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, pela amizade e companheirismo, pelos dias de frio e de calor, de tristezas e alegrias que passamos dentro do laboratório.

A Dr. Enéas de Carvalho e Dr. José Salvatore Patané, pela contribuição ao longo desse trabalho.

À Dra Maria Anice Mureb Sallum, que nos mostra e ensina o curioso mundo dos mosquitos, por ceder o espaço para realizar os experimentos, pela dedicação e paciência em ajudar e compartilhar os seus conhecimentos.

A Dr. Delsio Natal, Dr. Mauro Toledo Marrelli, Dr. Paulo Urbinatti e Aristides Fernandes da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo pela contribuição das coletas, identificação dos mosquitos e disposição.

À Sirlei Antunes de Moraes, Maysa Tiemi Motoki e Andressa Godoy Amaral, pela amizade e também pela ajuda para realizar o trabalho.

À Ângela Maria Casemiro de Jesus e Wilma Garcia de Souza secretárias do departamento de Parasitologia do ICB.

À FAPESP pelo apoio financeiro do laboratório. N° de processo: 06/02622-5

Ao CNPQ pelo apoio financeiro. N° de processo: 136597/2009-2

Ao meu avô Salvador Solá Soldevila (*In memoriam*).

Ao Carlos Henrique Chinen pelo apoio, companheirismo, respeito, amor e carinho que me proporciona todos os dias.

A todos amigos e colegas que participam da minha vida e que de alguma forma contribuíram na realização desse trabalho.

Ao “ser” que me ilumina todos os dias.

Aceita o conselho dos outros, mas nunca desistas da tua própria opinião.
William Shakespeare

Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre.
Charles Chaplin

RESUMO

Devicari M. Caracterização populacional de *Aedes scapularis* (Diptera; Culicidae): aspectos moleculares, morfométricos e morfológicos. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A espécie *Aedes scapularis* é um dos culicídeos de grande importância médica. Essa espécie está distribuída amplamente nas Américas, vive em ambientes naturais pouco modificados, rurais e até urbanos. Tem grande competência vetora para diversos arbovírus, e já foi responsável por vetorar o Vírus do Rocio em 1950 no sul do Estado de São Paulo. Esta espécie é suspeita de constituir um complexo de espécies crípticas, e minuciosos estudos populacionais serão realizados para testar esta hipótese. No estado de São Paulo, há ocorrência de *Ae. scapularis* em vários municípios e em situação ambientais diversas, sendo que em duas localidades no estado despertam maior interesse: o município de Pariquera-Açu no sul do Estado e no município de São Paulo, onde essa espécie ocorre em parques urbanos, causando risco a um grande número de pessoas. O objetivo desse trabalho foi testar se há diferenciação genética - morfológica ou se há baixo fluxo gênico entre essas populações podendo diagnosticar existência de espécies crípticas em *Aedes scapularis*. As populações estudadas são Pariquera Açu (PAR), Parque Ecológico do Tietê em São Paulo (PET) e Butantã (BUT). Os parâmetros utilizados para estudar essas 3 populações foram Morfometria geométrica da asa, visando testar diferenças entre forma e tamanho, estudo do gene mitocondrial COI, análise dos espaçadores internos transcritos ITS2 e análise morfológica de ovos. Na análise morfométrica alar mostrou-se que as populações diferem entre si quanto ao formato da asa, nas distâncias fenéticas de mahalanobis, populações de PET e BUT mostraram-se mais aparentadas, ambas da cidade de São Paulo. Já na análise do gene mitocondrial COI, apresentou 21 haplótipos, evidenciados por 23 sítios polimórficos. As diversidades haplotípicas e nucleotídicas globais foram respectivamente de $h = 0,867$ e $d\pi = 0,006$. As amostras PET, BUT e PAR apresentaram respectivamente 12, 5 e 8 haplótipos. Os haplótipos H16 e H14, os mais frequentes, foram os únicos presentes nas três populações. Os demais haplótipos, no entanto, foram exclusivos de cada população. Na análise do ITS2, amplificamos um fragmento com 252pb para populações PET e PAR e 170pb para população do BUT, essas seqüências analisadas mostraram-se idênticas para as três populações, não houve diferenciação populacional na análise do ITS2 em *Aedes scapularis*. Na análise de microscopia eletrônica de varredura dos ovos, não foi possível distinguir populações com descrição do exocório dos ovos, mas na razão comprimento e largura dos ovos, houve divergência populacional. Analisando os resultados obtidos, podemos concluir que a divergência populacional é atestada por padrões geográficos de forma alar, gene mitocondrial COI e razão comprimento e largura dos ovos. A interpretação desses padrões biogeográficos de *Ae. scapularis* como indicadores de espécies crípticas depende ainda do conhecimento da amplitude desses padrões morfo-genéticos, o que requisitará possivelmente a extensão desse estudo a outras localidades.

Palavras-chave: *Aedes scapularis*. Morfometria geométrica alar. DNAm. Citocromo c Oxidase subunidade I. Micrografia de ovos. Microevolução. Parque ecológico do tietê. Pariquera-açu. Butantã.

ABSTRACT

Devicari M. Characterization population of *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae): the molecular, morphological and morphometric. [Master thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The species *Aedes scapularis* is a culicidae of medical importance. This species is widely distributed in the America and live in slightly modified natural environments, and even urban and rural. Has a vector competence for many arboviruses and has been responsible for the vector of Rocio virus in 1950 in the southern state of Sao Paulo.

This species is suspected to constitute a cryptic species complex, and detailed population studies will be conducted to test this hypothesis. In state of São Paulo, have occurrence of *Ae. scapularis* in many cities and several environmental situation, and in two localities in the state most interest: the city of Pariquera Acu in the southern state and the city of São Paulo, where the species occurs in urban parks, causing a risk to large number of people. The aim of this study was to determine differentiation genetic - morphological or if there is low gene flow between populations can diagnose the existence of cryptic species in *Aedes scapularis*. The populations studied are Pariquera Acu (PAR), the Parque Ecológico do Tietê in Sao Paulo (PET) and Butantan (BUT). The parameters used to study these three populations were wing geometric morphometry, in order to test differences in shape and size, the study of mitochondrial COI gene, analysis of internal transcribed spacers ITS2 and morphological analysis of eggs. In morphometric analysis wing showed that the populations differ in the shape of the wing, the Mahalanobis distances phenetic, BUT and PET populations were more closely related, both in São Paulo. In the analysis of mitochondrial COI gene, showed 21 haplotypes, as evidenced by 23 polymorphic sites. The nucleotide and haplotype diversity overall were respectively 0.867 and $h = d\pi = 0.006$. The samples PET, BUT and PAR were respectively 12, 5 and 8 haplotypes. Haplotypes H16 and H14, the most frequent were the only ones present in the three populations. The remaining haplotypes, however, were unique to each population. In the analysis of ITS2, we amplified a fragment with 252pb for PET and PAR populations, for BUT population we amplified 170pb, these sequences are analyzed showed identical for three populations, no have differentiation population in the analysis of ITS2 in *Aedes scapularis*. In the analysis of scanning electron microscopy of the eggs was not possible to distinguish populations, however, it was possible to know the texture and morphology of eggs of this species. Analyzing the results, we conclude that morphologically this species has a population structure showing microevolution happening, but the results of the analysis of mitochondrial gene was not meaningful to say that there is genetic differentiation enters the population. With these data it is still early to pinpoint the species *Aedes scapularis* is part of a complex of cryptic species, and further studies in other locations must be made to diagnose this hypothesis.

Keyword: *Aedes scapularis*. Wing geometric morphometry. mtDNA. Cytochrome c oxidase subunit I. rDNA. ITS2. Micrograph of the eggs. Microevolution. Parque Ecológico do Tietê. Pariquera-Açu. Butantã.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 A espécie <i>Aedes scapularis</i>	12
1.1.1 <i>Pariquera – Açu</i>	15
1.2 Espécies crípticas.....	15
1.3 Estudos do DNA mitocondrial	16
1.4 Estudos do DNA ribossômico	17
1.5 Morfometria geométrica de asas	18
1.6 Micrografia do exocóron de ovos.....	19
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Coletas de espécimes	21
3.2 Análise morfométrica de asas.....	25
3.2.1 <i>Tamanhos de centróides</i>	26
3.2.2 <i>Análise discriminante</i>	27
3.3 Extração de DNA.....	28
3.3.1 <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	29
3.3.2 <i>Amplificação do DNA ribossômico ITS2</i>	30
3.3.3 <i>Amplificações do DNA mitocondrial COI</i>	30
3.3.4 <i>Purificação do produto de PCR</i>	31
3.3.5 <i>Sequenciamento e análise das seqüências</i>	31
3.3.6 <i>Alinhamento das seqüências e análise de haplótipos mitocondriais</i>	32
3.4 Micrografia do exocóron dos ovos	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Variabilidade alar	34
4.1.1 <i>Variação geográfica entre as populações</i>	34
4.1.2 <i>Variação temporal</i>	39
4.1.3 <i>Dimorfismo sexual</i>	39
4.2 Variabilidade do DNA ribossômico	45
4.2.1 <i>DNA ribossômico ITS2</i>	45
4.3 Variabilidade do DNA mitocondrial	47
4.3.1 <i>DNA mitocondrial COI</i>	47
4.4 Análise dos ovos.....	54
5 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS*	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 A espécie *Aedes scapularis*

Ae. scapularis é um mosquito da família Culicidae (Diptera) amplamente distribuída nas Américas. É uma espécie antropofílica e possui capacidade de viver em ambientes naturais pouco modificados, rurais e até urbanos, preferindo áreas alteradas pela ação humana (Forattini et al., 1981; Forattini et al., 1995). *Aedes scapularis* freqüentemente apresenta hábitos endófilos, ou seja, freqüenta o ambiente intradomiciliar para obter abrigo e alimento (Forattini et al., 1995), características que aumentam a sua importância médica.

Sua oviposição ocorre no solo em locais sujeitos a alagamentos decorrentes das chuvas. É capaz de reproduzir-se tanto em criadouros naturais, como coleções de água no solo como em criadouros artificiais (Forattini et al., 1997).

Possui competência vetora para diversos arbovírus prejudicando animais e humanos, assim como encefalite equina venezuelana e febre amarela (Arnell, 1976). É suspeita de transmitir o vírus do Rocio no vale do Ribeira, Brasil na década de 70 (Forattini et al., 1981). Essa grave epidemia aconteceu em 1975-1977, nos municípios de Peruíbe, Itanhaém, Mongaguá localizados no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. Neste período foram diagnosticados 1021 casos nestas regiões mencionadas. A epidemia ocorreu exclusivamente no Vale do Ribeira, levando a uma letalidade de 10% da população e a incidência de seqüelas ficou em torno de 20% dos casos (Tiriba, 1975).

No início não encontravam o responsável vetor da doença, mas logo após uma investigação, conseguiram isolar o vírus em *Aedes scapularis*, sendo apontado como vetor. Essa hipótese foi testada em condições experimentais comprovando-se que o mosquito possui competência vetora para o vírus principalmente mosquitos que foram coletados na

região do Vale do Ribeira (Mitcheel e Forattini, 1984).

Segundo Labarthe et al. (1998) o mosquito *Aedes scapularis* também é considerado vetor natural de *Dirofilaria immitis* in Itacoatiara, essa microfilaria que parasita cães, trouxe problemas para a saúde pública, já que foi encontrado em humanos. Além disso Rachou et al. (1955) constatou que *Wuchereria bancrofti* também pode ser transmitida por *Aedes scapularis*. Na epidemia de febre amarela que ocorreu no estado da Bahia em 2000 (Vasconcelos et al., 2001), foi encontrado uma cepa do arbovirus em *Aedes scapularis*, ou seja, ele também é suscetível ao vírus da febre amarela, e por ser antropofílico pode passar a ser vetor desse vírus,

Aedes scapularis vem sendo relatado como vetor de patógenos de importância para a saúde pública, mas ainda existe uma carência de maiores evidências. A espécie ainda é considerada pouco estudada.

Aedes scapularis está amplamente distribuída no continente americano, e a América do Sul é onde a espécie é mais frequente. (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; Forattini 2002). No Estado de São Paulo, há ocorrência de *Ae. scapularis* em vários municípios, sendo que ao menos duas localidades no Estado despertam atenção: o município de Pariquera-Açu no Vale do Ribeira (Forattini et al., 1997), onde a espécie vive na área rural e tem sido suspeita de transmitir o vírus do Rocio; e o município de São Paulo, onde a espécie ocorre em abundância no parque urbano Ecológico do Tietê (Taípe-Lagos e Natal, 2003), possivelmente representando riscos para a população deste grande centro urbano. Recentemente foi encontrado *Aedes scapularis* no bairro do Butantã na cidade de São Paulo, em uma área urbana trazendo risco para a população (Devicari e Rocha, 2009).

Taxonomicamente, *Ae. scapularis* é considerada uma espécie nominal suspeita de constituir um complexo de espécies crípticas em processo incipiente de divergência (Forattini, 2002), já que apresenta escudo e genitália com grande variabilidade morfológica (Arnell,

1976). Forattini (2002) enfatiza a necessidade de estudos populacionais minuciosos nesta espécie para testar esta hipótese.

Até o momento não se sabe se há diferenciação genético-morfológica ou se há fluxo gênico entre essas três populações Parque Ecológico do Tietê (PET), Parquera-Açu (PAR) e Butantã (BUT). Diante da suspeita de constituir um complexo de espécies, submetemos *Ae. scapularis* a um estudo populacional para dar os primeiros passos para solucionar essa conjectura.

1.1.1 Parquera – Açu

Um outro ponto interessante em salientar, é que foram utilizadas populações de *Aedes scapularis* da região de Parquera –Açu, localizada no Vale do Ribeira, Sudeste do estado de São Paulo, que entre em 1975 a 1979, houve uma epidemia do vírus do Rocio, afetando milhares de pessoas da região, tornando-se um importante local para estudos de Culicídeos. A região possui características que favorecem o aparecimento para novos agentes infecciosos, pela sua alta diversidade de mosquitos e pelo crescimento antrópico. Foi quando em 1983 o posto de pesquisa foi instalado na cidade de Parquera-Açu, servindo de sede para a realizações de observações de campo focalizando a fauna de mosquitos Culicídae. Até hoje essa atividade vem sendo feita, graças a colaboração entre departamento de epidemiologia e o núcleo de pesquisa taxonômica e sistemática em entomologia médica da Faculdade de Saúde Pública– USP. Esse posto faz parte da Universidade de São Paulo, sobre a coordenação da professora Dr^a Maria Anice Mureb Sallum, possuindo infra-estrutura para estudos de culicídeos, vários projetos temáticos foram desenvolvidos subvencionados pela Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

1.2 Espécies crípticas

As espécies crípticas têm chamado grande atenção à entomologia médica. Elas são espécies isomórficas, ou seja, que se originaram de processos de especiação não acompanhados de diferenciação morfológica e são, portanto, morfológicamente indistinguíveis. A precisão na identificação de espécies é primordial no estudo de mosquitos vetores pois que características que referentes ao interesse médico dos mosquitos como, relações parasita-hospedeiro, competência e capacidade vetora, são geralmente espécie-específicas.

Entre os culicídeos, alguns exemplos de complexo de espécies crípticas são *Anopheles albitarsis*, *An. oswaldoi* e *An. triannulatus* (Rosa Freitas et al., 1998). Outro evidente exemplo disso é *Anopheles gambiae* s.l., um complexo africano de sete espécies crípticas que guardam entre si um considerável grau isolamento reprodutivo entre suas espécies crípticas (White, 1974; Hunt et al., 1998). Há suspeitas ainda de que a espécie-tipo deste complexo, *An. gambiae* s.s., seja na realidade outro complexo de espécies, de acordo com resultados de espaçadores intergênicos de DNAr (Gentile et al., 2001). Essas espécies têm importâncias distintas na transmissão da malária na África (Chandre et al., 1999; Della-Torre et al., 2002).

Dentre as abordagens metodológicas que permitem a detecção e caracterização das espécies crípticas, algumas das mais empregadas são apresentadas a seguir:

1.3 Estudos do DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial dos animais tem seu formato em círculo de fita dupla e possui cerca de 37 genes, onde 2 codificam RNAs ribossômicos, 13 codificam polipeptídicos e 22 codificam a formação de RNAs transportadores (Robertis e Hib, 2006). Seu tamanho é de aproximadamente 16.000 pares de bases e o conjunto de suas funções o tornam importante para o metabolismo celular.

Possui uma elevada taxa de mutações, até 10 vezes maior que de DNA nuclear, as quais se acumulam nas sucessivas linhagens. Além disso, o DNA mitocondrial é uma molécula haplóide adquirida por herança materna que não apresenta recombinação gênica. (Wilson et al., 1985). Genes mitocondriais mostraram-se eficientes para identificação e inferências filogenéticas das espécies do gênero *Culex* (Silva, 2009). Devido a essas características, o genoma mitocondrial tem sido usado como marcador molecular em estudos de genética de populações, tais como fluxo gênico, tamanho efetivo das populações e história evolutiva (Spanos et al., 2000). O gene Citocromo oxidase, subunidade I, é amplamente usado em investigações de estrutura populacional de insetos como ilustrado por Scarpassa et al. (2008) que analisou o gene COI para caracterizar 14 populações de *Aedes aegypti* no norte, nordeste, sudeste e centro-oeste do Brasil, resultando em duas linhagens diferentes, provavelmente vindas do leste e oeste da África.

1.4 Estudos do DNA ribossômico

Intercalados aos genes ribossomais altamente conservados, encontram-se os espaçadores internos ITSs que evoluem rapidamente e podem apresentar-se divergentes entre espécies ou populações (Hillis e Dixon, 1991; Roderick, 1996). O seqüenciamento de espaçadores ITS1 e ITS2 do DNA ribossômico tem sido largamente empregado em estudos

envolvendo culicídeos. Os dados de seqüenciamento de ITS2, o espaçador mais utilizado em Culicidae, tem permitido a detecção de complexo de espécies crípticas, como feito para *An. gambiae s.s.* (Gentile et al., 2001) e outros *Anopheles* (Collins e Paskewitz, 1996). Na região neotropical, há também exemplos também do gênero *Anopheles* (Marrelli et al., 1999; Rosa-Freitas et al., 1998).

1.5 Morfometria geométrica de asas

A morfometria geométrica vem sendo usada recentemente e tem ganhado força entre entomólogos, sobre tudo na área de saúde pública, por ser uma ferramenta de alta resolução, ela permite comparar padrões corporais a partir de várias características de uma estrutura corporal complexa. (Rohlf, 1993; Monteiro e Reis, 1999). Pontos anatômicos são utilizados para a coleta dos dados, ou seja, pontos marcados na estrutura corporal de interesse a ser estudado, com isso são tomadas as coordenadas posicionais sobre um plano cartesiano imaginário que delimita a estrutura corporal e posteriormente são ordenadas em tabelas de dados. Com esses dados podem-se comparar as variações morfométricas e estudos estatísticos. (Bookstein, 1997; Rohlf, 1993; Monteiro e Reis, 1999). Muitas vezes essa ferramenta é a única forma de diagnose morfológica de táxons crípticos (Dujardin, 2008).

Variáveis canônicas (VCs) é um tipo de análise possível dentro dos testes estatísticos da morfometria, que descreve diferenciações de forma entre grupos, por exemplo, populações, e utiliza conjunto de dados multivariados. Nessa análise, há redução da dimensionalidade dos dados, que passam a ser expressos como variáveis latentes representadas em gráficos bidimensionais. As variáveis canônicas sumarizam de modo decrescente a magnitude das diferenças de forma entre os grupos em relação às existentes dentro dos grupos, ou seja, a

VC1 apresenta maior resolução de discriminação amostral que a VC2, e assim por diante (Monteiro e Reis, 1999).

Outra análise possível é computar o tamanho de centróide da estrutura a ser estudada, é um descritor multivariado do tamanho isométrico da estrutura. Centróide significa um ponto imaginário que representa o centro geométrico da estrutura, e é determinado pela média dos valores posicionais no plano cartesiano de todos os pontos anatômicos de uma mesma estrutura.

O tamanho do centróide é um vetor que sintetiza todos os valores posicionais considerados no cômputo do centróide. Formalmente, tamanho do centróide é a raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada ponto anatômico ao centróide. Se não houver alometria, essa é a única medida de tamanho que não correlata com as variáveis de forma. O tamanho do centróide, portanto varia com o tamanho da asa e é uma forma de sumarizar o tamanho dessa estrutura em uma única variável.

Na coleta de dados para a morfometria geométrica em Culicídeos, os marcos anatômicos são pontos de cruzamento de nervuras alares. A partir dos dados posicionais desses marcos, pode-se estimar a variação morfométrica intra e interpopulacional, comparar a magnitude das variações (Dujardin, 2008). Um recente estudo de nosso grupo exemplificou essa aplicação teórica no complexo *Culex pipiens* (Morais et al., 2010).

1.6 Micrografia do exocóion de ovos

O córion dos ovos de Culicidae exhibe características morfológicas peculiares, que muitas vezes conferem especializações como proteção à dessecação, permeabilidade a trocas gasosas, flutuação e adesão aos demais ovos quando organizados em “jangadas” (como em *Culex*) (Sahlen, 1996; Service, 2004; Soumaré e Ndiaye, 2005). A descrição morfológica do

córior por micrografia de varredura tem permitido a caracterização dos ovos de diversos culicídeos de interesse médico e tem agregado diversos caracteres de potencial uso taxonômico ou filogenético (Sahlen, 1996; Forattini, 2002; Reinert, 2005). Em geral, os caracteres analisados nos ovos são merísticos, como contagem de tubérculos; morfométricos, como razões matemáticas entre dimensões e também descritivos da ornamentação do exocórior. Essa abordagem tem especial importância para estudos populacionais e de caracterização de complexos de espécies, já que há características morfológicas dos ovos que são espécie-específicas, enquanto outras podem apresentar variação populacional (Sahlen, 1996; Junkum et al., 2004).

2 OBJETIVOS

Comparação de populações de *Aedes scapularis* visando testar as seguintes hipóteses:

1) Há diferenciação genético-morfológica entre a população urbana do Parque ecológico do Tietê (PET.), população urbana Butantã (BUT) e a população rural de Pariquera-Açu (PAR)?

2) Caso haja diferenciação, ela é indicativa da existência de espécies crípticas?

Parâmetros biológicos utilizados na comparação interpopulacional em *Ae. scapularis* :

- DNA mitocondrial – variabilidade de seqüências do gene COI.
- DNA ribossômico – variabilidade de seqüências do espaçador ITS2.
- Morfometria geométrica das asas.
- Micrografia do exocório dos ovos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coletas de espécimes

Os locais de coleta de *Aedes scapularis* figura 1, compreenderam em 3 localidades. Um situado na área urbana do município de São Paulo localizado na zona leste no Parque Ecológico do Tietê (P.E.T), outra situada a 200km de São Paulo uma área semi-rural do município de Pariquera-açu (PAR) no Vale do Ribeira, e por fim utilizamos também populações de *Aedes scapularis* do bairro do Butantan zona oeste da cidade de São Paulo (BUT), como mostra na figura 2.

As coletas foram feitas em diferentes épocas, assim como mostra na tabela 1. As amostras de mosquitos adultos machos e fêmeas foram obtidas através de aspiradores entomológicos nessas localidades, os mosquitos foram mantidos vivos em gaiolas transportáveis até serem trazidas para o laboratório de parasitologia do Instituto Butantan. Foi feita a triagem e identificação do material e então metade das amostras foi armazenada em álcool 70% e a outra metade em microtubos e assim colocados em nitrogênio líquido (-190 °C). Fêmeas com ovários desenvolvidos, antes de serem fixadas em etanol, foram acondicionadas vivas em recipientes de vidro individuais com algodão e papel de filtro úmido, que servirão de substrato para oviposição (Bates e Roca-Garcia, 1945). Os ovos obtidos foram destinados à microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Vale ressaltar que obtivemos algumas doações de amostras de mosquitos da região estudada, a população do PET (A2T1) de 1998, foi doado pelo departamento de epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública –USP, essa coleta doada serviu para comparar a variação temporal.

Figura 1. Fêmea de *Aedes scapularis*.

Butantã – BUT

fonte:www.google.com.br ([2010])

Parque ecológico do Tietê – PET

fonte:www.google.com.br ([2010])

Parquera-Açu – PAR

fonte:www.google.com.br ([2010])

Figura 2. Locais de coleta de *Aedes scapularis*.

Tabela 1- Dados das coletas de *Aedes scapularis* e seu respectivo uso.

Amostra	Espécie	Data da Coleta	Local	Nº aproximado de indivíduos utilizados	Tipo de Análise
A2T1	<i>Ae. scapularis</i>	2/4/1998	PET	50 Machos 50 Fêmeas	M.G
A4T1	<i>Ae. scapularis</i>	19/12/2006	PET	20 Fêmeas e 10 ovos	M.G e Microg. Ovos
A14T2	<i>Ae. scapularis</i>	17/4/2007	PET	20 Fêmeas e 10 Machos	mtDNA
A18T2	<i>Ae. scapularis</i>	26/4/2007	PET	10 Fêmeas	M.G
A21T1	<i>Ae. scapularis</i>	23/4/2007	PAR	10 Fêmeas 10 Machos	mtDNA
A32T1	<i>Ae. scapularis</i>	17/12/2007	PAR	15 Fêmeas 15 Machos	mtDNA
A32T2	<i>Ae. scapularis</i>	18/12/2007	PAR	20 ovos	Microg. Ovos
A32T3	<i>Ae. scapularis</i>	19/12/2007	PAR	20 ovos	Microg. Ovos
A39T1	<i>Ae. scapularis</i>	31/3/2008	PAR	30 Machos 30 Fêmeas	M.G e mtDNA
A39T2	<i>Ae. scapularis</i>	1/4/2008	PAR	20 ovos	Microg. Ovos
A35T3	<i>Ae. scapularis</i>	20/2/2009	BUT	50 Fêmeas 10 Machos	M.G
A48T1	<i>Ae. scapularis</i>	9/12/2008	PET	40 Fêmeas 20 Machos	M.G e mtDNA
A62T1	<i>Ae. scapularis</i>	12/5/2009	PAR	41 Fêmeas 20 machos	M.G
A62T2	<i>Ae. scapularis</i>	13/5/2009	PAR	20 ovos	Microg. Ovos

M.G- Morfometria Geométrica alar; **mtDNA-** Sequenciamento gene COI; **Microg. Ovos**– Análise de microscopia eletrônica de varredura em Ovos.

3.2 Análise morfométrica de asas

A metodologia de morfometria geométrica foi semelhante à empregada por Moraes et al. (2010). As asas direita e esquerda de machos e fêmeas, após remoção das escamas, foram montadas com resina Entellan entre lâmina-lamínula para análise morfométrica. Imagens dessas asas foram capturadas através de câmera digital Leica 320 acoplada a um microscópio estereoscópico Leica S6, no aumento de 40 X. Utilizei para análise, cerca de 60 indivíduos (30 machos e 30 Fêmeas) de cada população como mostra na tabela 1.

Baseado nas imagens, e com o auxílio do programa TpsDig2 V.2.14 (QSC - James Rohlf), foram tomadas as coordenadas posicionais de 18 pontos anatômicos sobre um plano cartesiano, como mostra na figura 3.

3.2.1 Tamanhos de centróides

Asas foram comparadas intra e interpopulacionalmente quanto ao tamanho isométrico, representado pelo tamanho do centróide, por meio de análises estatísticas ao nível de rejeição $\alpha=0,05$. O teste de normalidade estatística Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar se as amostras analisadas apresentavam distribuição Gaussiana (distribuição normal), onde $p > 0,1$. Os outros testes estatísticos empregados foram: o Teste T paramétrico para amostras de distribuição normal e variância homogênea, Teste T com correção de Welch para amostras de distribuição normal, porém variâncias não-homogêneas e teste não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras de distribuição não-normal.

Figura 3. Asa e consenso alar de *Aedes scapularis*. (A) Asa com pontos anatômicos. (B) Representação gráfica do consenso alar formado pelos 18 pontos anatômicos ligados por linhas para facilitar a visualização.

3.2.2 Análise discriminante

A forma alar foi comparada também por análise multivariada discriminante.

Nesta análise, testou-se se a classificação dos indivíduos por análise discriminante coincidia com a classificação natural dos grupos (populações, sexo, etc.). Para avaliar a acurácia da classificação, testes de reclassificação com validação foram feitos usando-se o software PAD, (Dujardin, 2008). Ou seja, excluindo-se a asa a ser classificada e reinserindo-a como dado suplementar logo após classificação do restante do grupo.

Nas comparações de grupos por análise discriminante, foram obtidas variáveis canônicas, que são variáveis latentes que sumarizam as dissimilaridades entre as amostras classificadas *a priori*, sob perspectiva multivariada (Monteiro e Reis, 1999).

Derivadas dessa análise, distâncias métricas de Mahalanobis nos eixos discriminantes foram computadas para avaliar o grau relativo de similaridade entre as amostras. Quando pertinente, valores dessas distâncias foram representados em fenogramas construídos pelo método de UPGMA.

3.3 Extração de DNA

Foram analisados 15 indivíduos de fêmeas de cada população Pariquera – Açu (PAR), Parque Ecológico do Tietê (PET) e Butantã (BUT), para seqüenciar o gene mitocondrial COI e também o espaçador interno transcrito ITS2 do DNA ribossômico. A extração do DNA total foi feita isoladamente para cada indivíduo, segundo o método de Jowett (1986), com algumas modificações: Os indivíduos conservados em nitrogênio líquido foram macerados em solução de homogeneização [Tris-HCl 10 mM (pH= 7,5), NaCl 60 mM, EDTA 50 mM]. Aos homogeneizados foi adicionada a solução de lise [SDS 1,25%, Tris-HCl 0,3 M (pH = 9,0),

EDTA 0,1 M, sacarose 5%, proteinase K a 100 µg/ml]. A mistura foi incubada a 65 °C por 1 hora para “lise” das células e clivagem das proteínas em peptídeos menores pela proteinase K.

A seguir, procedeu-se uma incubação a 4 °C por 45min e logo após uma centrifugação a 12.000 g a 4 °C. Após a centrifugação formaram-se duas fases na mistura. O precipitado, que contém peptídeos, foi descartado e o sobrenadante contendo ácidos nucleicos e sais foi transferido para outro microtubo e misturado com 2 volumes de etanol 100% para a precipitação do DNA. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g à temperatura ambiente, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em 1 ml de etanol 70%, e assim as amostras foram submetidas a uma última centrifugação à temperatura ambiente e 12.000 g por 5 minutos. O precipitado foi seco e ressuspendido em 20 µl de H₂O destilada para cada amostra, que foram então armazenadas a -20 °C.

3.3.1 Eletroforese em gel de agarose

Corridas de Eletroforese foram realizadas para conferir a amplificação do espaçador ITS2, foi utilizado cuba transversal com 50 ml de gel, a 80 V por 30min em TAE 1 X como tampão de corrida. Utilizando 2µl do produto amplificado, 1 µl de azul de bromofenol e 1µl de xilenocianol 1X. Foram utilizados 1µl de peso molecular de 100 pb (Fermentas) como padrão para a comparação do peso molecular da amplificação. Os géis forma fotografados em fotodocumentador digital UVP sob irradiação Ultravioleta de 300 nm.

3.3.2 Amplificação do DNA ribossômico ITS2

O espaçador ITS2 foi amplificado por PCR a partir das amostras de DNA genômico nas seguintes condições, conforme Behbahani et al. (2005): “primers” 5.8Sf 5’ATCACTCGGCTCATGGATCG3’ e 28Sr 5’ATGCTTAAATTTAGGGGGTAGTC3’; Condições de reação: 1x tampão de reação; 0,2 mM dNTPs; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada “primer”; 0,04 U/μl Taq DNA polimerase; água mili-Q e DNA genômico em volume total da reação 50 μl; programa do termociclador: 95 °C, 5min (1 ciclo); 95 °C, 1min; 50 °C, 1min; 72 °C, 1,5min (35 ciclos); e 72 °C por 10min (1 ciclo). A amplificação foi conferida em eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989).

3.3.3 Amplificações do DNA mitocondrial COI

A amplificação do gene COI do DNA mitocondrial, foi realizada pelo método da PCR, que permitiu a obtenção de inúmeras cópias desse gene. As reações foram preparadas utilizando as seguintes concentrações finais das soluções: 1X da solução estoque do tampão 10X (Tris-KCL 20mM, PH 8,4), 0,4mM de dNTP (10mM), 2,0 mM de MgCl₂ (50mM), 0,5uM de cada primer (*Forward e reverse*), 1 U de Taq polymerase e água estéril para completar o volume final de 25μl de reação para cada tubo de 0,2ml.

Os iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação do gene COI foram publicados por Folmer et al. (1994), e consistem nas seqüências: LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' para fita *forward* e HC02198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' para a fita *reverse*. O ciclo de amplificação consistiu em: temperatura inicial de 94°C por 5 min, seguidos de 40min de 94 °C por 1min, 50

°C por 2min, 72 °C por 2min, com um ciclo de extensão final de 72 °C por 10min. A amplificação foi checada com eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989).

3.3.4 Purificação do produto de PCR

Os fragmentos amplificados por PCR do ITS2 do DNA ribossômico, antes de serem seqüenciados, foram purificados com o kit Concert PCR Purification (Invitrogen), para eliminação de traços de DNA polimerase, “primers” e demais moléculas presentes na reação da PCR. Já para purificação do produto de PCR do gene mitocondrial COI, utilizamos PEG 8000, para cada µl do produto de PCR (aproximadamente 23 µl) foi adicionado 1 µl de PEG 8000 (20% Polyethylene Glycol 8000 / 2,5M NaCl), foram misturados por inversão e incubados a 37 °C por 15min. Após incubação, os tubos foram centrifugados em temperatura ambiente por 15min a 12.000RPM, foi descartado o sobrenadante e adicionado 200µl de álcool 80% e levado novamente para a centrifuga a 4 °C por 10min a 12.000RPM, após repetir 2x a lavagem com álcool, o *pellet* foi seco em concentrado a vácuo e ressuspendido em 25µl de água estéril.

3.3.5 Seqüenciamento e análise das seqüências

O seqüenciamento do ITS2 foi feito nos sentidos *forward* e *reverse* da seqüência, para o seqüenciamento do gene mitocondrial COI, seqüenciamos apenas no sentido *forward*. Utilizamos o kit comercial ABI Prism® (Appllied Biosystems, Foster, Califórnia, USA) dGTP BigDyeTerminator v3 para o seqüenciamento, para cada reação foram utilizados 1 µl do PCR, 0,5 µl de Big dye, 2,0µl tampão, 1,125 µl dos respectivos primer, (5.8 Sf e 28Sr para ITS2) e (LCO 1490 para COI) e água estéril para completar 10µl.

As reações do seqüenciamento para ITS2 e COI, foram feitas em termociclador com os ciclos de temperaturas de: 96 °C por 2min e 35ciclos de 45s a 96 °C, 30s a 50 °C, 4min a 60 °C. Após reação de seqüenciamento, as amostras do ITS2, foram purificadas e levadas para o Instituto de Química da Universidade de São Paulo para serem seqüenciados no seqüenciador ABI PRISM[®] (Applied Biosystems, Foster, Califórnia, USA) 3100 GeneticAnalyzer /HITACHI.

As amostras da reação de seqüenciamento de COI foram purificadas em coluna de Sephadex[®] G-50 (GE Healthcare, USA), que foram aplicadas com cuidado nas colunas e centrifugadas por 6min a 1,4RPM em temperatura ambiente, após purificação, o pellet foi seco em concentrador a vácuo (eppendorf).

Os tubos foram enviados a empresa Genomic Engenharia molecular para serem corridas no seqüenciador modelo 3130xl da Applied Biosystems.

As seqüências foram alinhadas e editadas no programa Chromas PRO v 1.5 (Technelysium Pty Ltd, Stanford, Austrália).

3.3.6 Alinhamento das seqüências e análise de haplótipos mitocondriais

As seqüências foram alinhadas e editadas no programa Chromas PRO v 1.5 (Technelysium Pty Ltd), além disso utilizamos o Clustal W (Larkin et al., 2007) para criar alinhamentos múltiplos. Foram geradas matrizes de distância para cada população com ajuda do programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) para comparar as seqüências do gene COI de cada população. As matrizes foram geradas utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980) e Jukes Cantor, modelos com valores bem semelhantes.

A diversidade haplotípica foi analisada através do programa DNAsp v 5.10 (Rozas et al., 2003). Dados das seqüências das 3 população foram utilizadas para calcular a diversidade haplotípica e nucleotídica, e sítios polimórficos das seqüências.

3.4 Micrografia do exocóron dos ovos

Ovos de *Ae. scapularis* foram preparados para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) conforme o seguinte método (Alencar et al., 2005). Após limpeza em água destilada, os ovos foram fixados com glutaraldeído a 2,5% e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1%, ambos em tampão cacodilato de sódio a 0,1M e pH 7,2.

Na seqüência, os ovos foram lavados em mesmo tampão e desidratados em série de etanol (50%, 70%, 80%, 90% e 100%). Posteriormente foi feita secagem do material em aparelho de ponto crítico e montagem do mesmo em porta-amostras (*stubbies*) para MEV, utilizando fita adesiva de carbono. O material foi então submetido a “sputtering”, ou seja, recobrimento por ouro. Para a obtenção das imagens utilizamos o microscópio eletrônico de varredura LEO 440I, no laboratório de microscopia eletrônica de varredura no departamento de Geologia Sedimentar e Ambiental – Instituto de Geociências – USP. Foram obtidas imagens das características dos ovos, assim como micrópila, exocóron, tamanho, textura etc. Foram analisados ao menos 20 ovos de *Aedes scapularis* da população de Pariquera-Açu (PAR) e Parque Ecológico do Tietê (PET).

4 RESULTADOS

4.1 Variabilidade alar

4.1.1 Variação geográfica entre as populações

A análise discriminante da forma alar feita entre as três populações PET, PAR e BUT, acusou diferenciação entre elas, porém com alguma intersecção no morfoespaço das variáveis canônicas (Figura 4). Morfológicamente, a população PAR mostrou-se mais distanciada das três segundo as distâncias de Mahalanobis, sendo que a menor distância verificada ficou entre BUT e PET, ambas localidades situadas dentro do município de São Paulo (Figura 5).

Os diagramas alares de grades possibilitaram identificar a variação morfológica alar média real entre as amostras. Em fêmeas de PET os pontos anatômicos 16-17 são próximos entre eles e o ângulo formado pelos pontos 1,10,11 é mais semelhante a 180°, em contraste para amostra PAR (Figura 6) . Já a diferenciação entre BUT e PET foi mais pronunciada na posição relativa dos pontos 13, 14, 17 e 18. Analisando-se os pontos 16 e 17 na amostra populacional de PAR, vemos que eles são mais distantes entre si nas fêmeas e mais distais nos machos, embora nesse sexo não haja diferença no comprimento relativo da asa (Figura 6).

Foram computados tamanho de centróide de machos e fêmeas das populações, comparando entre elas, podemos perceber que o tamanho da asa de fêmeas se pronunciou diferenciada entre as populações, já em machos não houve uma diferenciação significativa (Figura 7).

Figura 4. Morfoespaço das variáveis canônicas geradas na comparação de formas alares das populações de fêmeas de *Ae. scapularis* de três localidades.

Figura 5. Dendrograma a partir da matriz de dissimilaridades com valores de distâncias de mahalanobis entre as populações de fêmeas de *Ae. scapularis*

Figura 6. Diagrama de grades com fêmeas e machos comparando as três populações estudadas. BUT- Butantã, PAR- Pariquera-Açu, PET- Parque ecológico do Tietê. Os tracejados paralelos foram posicionados nos pontos anatômicos para comparações.

Figura 7. Tamanho de centróides de fêmeas e machos comparando as populações.

4.1.2 Variação temporal

Para estimar variação da geometria alar dos mosquitos durante um espaço de tempo, utilizamos a população do Parque Ecológico do Tietê (PET). Ao longo de 9 anos (1998 - 2007), fêmeas e machos daquela população sofreram alteração de forma alar, conforme demonstrado pela análise discriminante aplicada para avaliação em histogramas da variação da forma entre as amostras nomeadas PET07 e PET98 (Figura 8).

Dentro daqueles 9 anos, nos diagramas de grades, entre as fêmeas a distância entre os pontos anatômicos 16 – 17 diminuiu e a distância entre os pontos 11-12 aumentou (Figura 9). Já em machos, as asas tornaram-se proporcionalmente mais longas no período. Não houve diferenciação nos pontos anatômicos entre esses 9 anos nos diagramas de grades (Figura 9).

Ainda durante aquele período, houve aumento no tamanho dos centróides das asas nos dois sexos (Teste T; $p < 0,001$), assim como mostra na figura 10. Esta análise, em particular, não teve objetivos comparativos populacionais.

4.1.3 Dimorfismo sexual

A forma da asa foi também diferente entre os sexos permitindo a diagnose inequívoca de machos e fêmeas, ao menos entre as amostras PET e PAR. A amostra BUT não foi incluída no estudo de dimorfismo sexual de forma por ter número reduzido de machos (Figura 11).

De acordo com as distâncias de Mahalanobis obtidas por análise discriminante, o dimorfismo sexual é ainda maior que a diferenciação populacional, sendo que indivíduos do mesmo sexo agruparam-se independentemente da procedência geográfica. As distâncias de Mahalanobis entre os sexos resultaram em valores entre 8,57 e 9,51, dependendo da localidade geográfica. Por outro lado, comparando-se amostras entre as duas localidades, as distâncias de Mahalanobis variaram de 4,01 (fêmeas) a 5,08 (machos).

Testes de reclassificação com validação permitiram a identificação do sexo de todos os indivíduos com 100% de acerto. Observando-se os histogramas de variáveis canônicas das populações de PET e PAR (Figura 11) percebe-se que machos e fêmeas se separaram no gráfico de histograma.

Variação Temporal
2007 x 1998
Fêmeas

Variação Temporal
2007x1998
Machos

Figura 8. Variação temporal de forma (fêmeas e Machos) em amostras entre os anos 1998 2007 (PET98 e PET07, respectivamente). Histogramas englobam indivíduos pelo seu valor de variável canônica (eixo X).

Figura 9. Diagramas de deformação em grades mostram conformações alares nos valores extremos da variável canônica. Variação temporal de Fêmeas e Machos de 1998 a 2007. Os tracejados paralelos foram posicionados nos pontos anatômicos para comparações.

Figura 10. Tamanhos de centróides alares. Variação temporal para cada sexo é estatisticamente significativa. Dimorfismo sexual é estatisticamente significativo apenas em PET98.

Dimorfismo Sexual
Aedes scapularis
PAR

Dimorfismo sexual
Aedes scapularis
PET

Figura 11. Histogramas de variáveis canônicas das asas, mostrando dimorfismo sexual nas populações de PET- Parque ecológico do Tietê e PAR- Pariquera-Açu.

4.2 Variabilidade do DNA ribossômico

4.2.1 DNA ribossômico ITS2

Para cada população um fragmento de DNA ribossômico com 252pb correspondentes ao ITS2 foi amplificado. Ricas em bases CG (55%), as seqüências foram depositadas no banco de dados genéticos GenBank, número de acesso FJ156757 e FJ439563.1 (PAR), FJ156758 e FJ156758.1 (PET).

No seqüenciamento da população do Butantã (BUT), obtivemos uma seqüência consenso do ITS2 de comprimento 134 pb, a qual foi depositada no GenBank, sob número de acesso GU058031 (BUT). O restante da porção 3' do ITS2 de BUT (cerca de 170 pb) não pôde ser determinado pois houve dubiedade de leitura, provavelmente causado por algum ITS2 intragenomicamente variante (Figura 12).

As seqüências de DNA foram idênticas para as três populações e por sua vez, foram 85% semelhantes para ITS2 de *Aedes punctator* e 84% semelhantes para outras espécies de *Aedes* disponíveis no GenBank.

BUT

```

1   TTGAGTGCCTATATTTATCTATTCAACTATACGTGCGTGCGCGTCCCACGTCCGGGTGGA
61  CAGGCGCACGGCCCATGAGCACGTATGCGGCGTGACGTTTTCCCGCCCGCCCCGGTGGC
121 GGTAAAACGTTGAA

```

PET

```

1   TTGAGTGCCTATATTTATCTATTCAACTATACGTGCGTGCGCGTCCCACGTCCGGGTGGA
61  CAGGCGCACGGCCCATGAGCACGTATGCGGCGTGACGTTTTCCCGCCCGCCCCGGTGGGC
121 GGTAAAACGTTGAAGATAGTCAGGCGCGTCGCCGGTCTCGCACAGGCGGCGCGGTTGATG
181 AATACATCCCATAGGCCACCAACCAACCTGTTGGCTATGTTGTATTCCATCACACCCCGA
241 TATAGACAAATATATACACAT

```

PAR

```

1   TTGAGTGCCTATATTTATCTATTCAACTATACGTGCGTGCGCGTCCCACGTCCGGGTGGA
61  CAGGCGCACGGCCCATGAGCACGTATGCGGCGTGACGTTTTCCCGCCCGCCCCGGTGGGC
121 GGTAAAACGTTGAAGATAGTCAGGCGCGTCGCCGGTCTCGCACAGGCGGCGCGGTTGATG
181 AATACATCCCATAGGCCACCAACCAACCTGTTGGCTATGTTGTATTCCATCACACCCCGA
241 TATAGACAAATATATACACATAGGCCTCAATAATGTGTGACTACCCCTAAATTTAGCAT

```

Figura 12. Espaçador ribossômico ITS2 de *Ae. scapularis*, populações PAR, PET E BUT.

4.3 Variabilidade do DNA mitocondrial

4.3.1 DNA mitocondrial COI

Ao todo, 47 indivíduos geraram seqüências do gene COI analisáveis, sendo o fragmento obtido do gene de aproximadamente de 600pb. Comparando-se as seqüências entre as populações, foram identificados 21 haplótipos dentre os indivíduos analisados, sendo que as freqüências haplotípica encontram-se listadas na Tabela 2. A diversidade haplotípica encontrada foi de $h = 0,867$ e nucleotídica de $d\pi = 0,006$. A população do Parque ecológico do Tietê (PET) apresentou 12 haplótipos diferentes, sendo que 10 são exclusivos da população. Na população do Butantã (BUT), obtiveram 5 haplótipos sendo que 3 são exclusivos dela. Já em Pariquera-Açu (PAR), encontramos 8 haplótipos, sendo que 6 são exclusivos da população.

Os haplótipos H14 e H16 foram os mais freqüentes entre os indivíduos, além do fato de estarem presentes nas três populações.

A distância genética entre os haplótipos calculada com base no método Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980) encontra-se sumarizada em matriz de distância (Tabela 3). A maioria dos haplótipos encontrados apresentaram uma distância genética de valores que variam de 0,002 a 0,019.

Um dendrograma das relações filogenéticas entre os haplótipos foi construído a partir do método de amalgamação Neighbour-Joining mostrando a similaridade entre os 21 haplótipos do COI em *Aedes scapularis* (Figura 13). A distância genética entre as populações, também calculada por K-2-P, alcançou valores quase idênticos nas três comparações pareadas (Tabela 4).

A rede filogenética de haplótipos, construída utilizando-se o algoritmo de Median Joining (Bandelt et al., 1999) e adotando o modelo de evolução molecular por parcimônia, encontra-se na figura 14, onde o número de indivíduos encontrado para cada haplótipo é proporcional ao tamanho da elipse na rede. A Tabela 5 ilustra as variações nucleotídicas qualitativas nos 21 haplótipos encontrados.

Tabela 2- Distribuição Haplotípica da frequência das 3 populações de *Aedes scapularis*.

População de <i>Aedes scapularis</i>				
Haplótipos	PET	BUT	PAR	Total
H1			2	2
H2	1			1
H3			1	1
H4		1		1
H5		1		1
H6			1	1
H7	1		1	2
H8	1			1
H9	1			1
H10			2	2
H11			1	1
H12			1	1
H13	1			1
H14	4	1	6	11
H15		1		1
H16	2	6	6	14
H17	1			1
H18	1			1
H19	2			2
H20	1			1
H21	1			1
Total	17	10	21	48

PET= Parque Ecológico do Tietê; **BUT**= Butantã; **PAR**= Pariquera-Açu.

Tabela 3 - Distância genética baseada no modelo de Kimura 2 parâmetros (1980) entre os diferentes Haplótipos do gene COI de *Aedes scapularis*.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21
H1	*																				
H2	0.004	*																			
H3	0.008	0.008	*																		
H4	0.009	0.009	0.002	*																	
H5	0.006	0.009	0.009	0.008	*																
H6	0.011	0.011	0.008	0.006	0.006	*															
H7	0.006	0.006	0.006	0.008	0.008	0.006	*														
H8	0.008	0.008	0.008	0.009	0.009	0.008	0.002	*													
H9	0.008	0.008	0.008	0.009	0.009	0.008	0.002	0.004	*												
H10	0.008	0.008	0.008	0.006	0.006	0.004	0.002	0.004	0.004	*											
H11	0.009	0.009	0.006	0.004	0.008	0.006	0.004	0.006	0.006	0.002	*										
H12	0.013	0.017	0.017	0.015	0.011	0.013	0.011	0.013	0.013	0.009	0.011	*									
H13	0.008	0.011	0.011	0.009	0.006	0.008	0.006	0.008	0.008	0.004	0.006	0.009	*								
H14	0.009	0.013	0.013	0.011	0.008	0.009	0.008	0.009	0.009	0.006	0.008	0.011	0.006	*							
H15	0.011	0.015	0.015	0.013	0.009	0.011	0.009	0.011	0.011	0.008	0.009	0.013	0.008	0.002	*						
H16	0.009	0.009	0.009	0.008	0.008	0.006	0.004	0.006	0.006	0.002	0.004	0.011	0.006	0.004	0.006	*					
H17	0.011	0.011	0.011	0.009	0.009	0.008	0.006	0.008	0.008	0.004	0.006	0.013	0.008	0.006	0.008	0.002	*				
H18	0.011	0.008	0.011	0.009	0.009	0.008	0.006	0.008	0.008	0.004	0.006	0.013	0.008	0.006	0.008	0.002	0.004	*			
H19	0.008	0.008	0.008	0.006	0.009	0.008	0.006	0.008	0.008	0.004	0.006	0.013	0.008	0.006	0.008	0.002	0.004	0.004	*		
H20	0.011	0.011	0.011	0.009	0.009	0.008	0.006	0.008	0.008	0.004	0.006	0.013	0.008	0.006	0.008	0.006	0.008	0.008	0.008	*	
H21	0.015	0.019	0.019	0.017	0.013	0.015	0.013	0.015	0.011	0.011	0.013	0.017	0.011	0.009	0.011	0.013	0.015	0.015	0.015	0.011	*

Figura 13. Dendrograma de distância genética entre os haplótipos construído pelo método neighbor joining.

Tabela 4- Distância genética entre as populações, PAR, PET e BUT, baseada no polimorfismo Do gene mitocondrial COI.

	PAR	PET	BUT
PAR	*		
PET	0.006	*	
BUT	0.005	0.006	*

Tabela 5 - Sítios variáveis dos 21 haplótipos encontrados no gene COI em *Ae. scapularis*. N= número de indivíduos que compartilham cada haplótipo. Números representam o local na sequência que ocorreu a mudança.

Posições das mudanças nucleotídicas																									
Haplótipos	64	65	145	148	181	205	235	268	280	286	295	304	322	328	331	364	376	379	380	397	400	494	529	N	
H1	G	A	G	A	A	A	T	G	A	G	A	C	A	T	C	C	C	G	G	G	C	G	G	2	
H2	G	A	G	A	A	A	T	G	A	G	A	C	A	T	C	C	C	G	G	A	C	A	G	1	
H3	A	A	G	A	A	A	T	A	A	G	A	C	A	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	1	
H4	A	A	G	A	A	A	T	A	A	G	A	C	G	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	1	
H5	A	A	A	A	A	A	T	G	A	G	A	C	G	T	C	C	C	G	G	G	C	G	G	1	
H6	A	A	A	A	A	A	T	G	A	G	A	C	G	T	T	C	C	G	G	A	C	G	A	1	
H7	G	A	A	A	A	A	T	G	A	G	A	C	A	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	2	
H8	G	A	A	A	A	A	T	G	A	G	A	C	A	T	C	C	C	G	A	A	C	G	A	1	
H9	G	A	A	A	A	A	T	G	A	G	A	T	A	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	1	
H10	G	A	A	A	A	A	T	G	A	G	A	C	G	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	2	
H11	G	A	A	A	A	A	T	A	A	G	A	C	G	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	1	
H12	G	A	A	A	A	A	C	G	A	G	A	C	G	T	C	C	T	A	G	G	T	G	A	1	
H13	G	A	A	A	A	A	T	G	A	G	A	C	G	T	C	T	C	G	G	G	C	G	A	1	
H14	G	A	A	G	A	A	T	G	G	G	A	C	G	T	C	C	C	G	G	G	C	G	A	11	
H15	G	A	A	G	A	A	T	G	G	G	A	C	G	C	C	C	C	G	G	G	C	G	A	1	
H16	G	A	A	G	A	A	T	G	A	G	A	C	G	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	14	
H17	G	A	A	G	A	A	T	G	A	A	A	C	G	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	1	
H18	G	A	A	G	A	A	T	G	A	G	A	C	G	T	C	C	C	G	G	A	C	A	A	1	
H19	G	A	G	G	A	A	T	G	A	G	A	C	G	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	2	
H20	G	G	A	A	A	A	T	G	G	G	A	C	G	T	C	C	C	G	G	A	C	G	A	1	
H21	G	A	A	A	G	G	T	G	G	G	G	T	G	T	C	C	C	G	G	G	C	G	A	1

Figura14. Rede de haplótipos para as amostras de *Aedes scapularis*, cada círculo representa um haplótipo e cada cor uma população. Haplótipos H14 e H16 são os mais frequentes nas populações.

4.4 Análise dos ovos

A razão entre a largura e o comprimento dos ovos de PET e PAR (Figura 15) variou e alcançou valores significativamente diferentes entre essas populações (Teste T, $p < 0,001$). A micrografia eletrônica revelou uma ornamentação peculiar na face externa do endocócion, caracterizada pela presença de losangos sub regulares (Figura 16). O exocócion não foi observado em sua totalidade, pois foi removido no processo de fixação química dos ovos. Não foram detectadas diferenças populacionais quanto à ornamentação. Ovos de BUT não foram analisados, pois não obtivemos oviposição.

Figura 15. Gráficos descritivos da razão comprimento/largura dos ovos de *Ae. scapularis*. DP e EP = Desvio-padrão e erro-padrão, respectivamente. Diferença das distribuições de PET e PAR é estatisticamente significativa.

Figura 16. Micrografias de ovos de *Ae. scapularis*. Seta indica micrópila de PET (com colar) e de PAR (sem colar). Barra=10 μ m.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi possível ampliar os conhecimentos acerca do culicídeo *Ae. scapularis*, espécie que apesar de sua importância médica ainda é pouco conhecida. Dentre as informações agregadas, além das que se referem à estruturação populacional, alguns aspectos evolutivos biológicos foram abordados preliminarmente, como comentados a seguir.

Entre as informações de cunho “não-populacional”, o dimorfismo sexual de forma alar mostrou-se conspícuo em *Aedes scapularis* e a distinção entre machos e fêmeas foi inequívoca nos testes de sexagem feitos a partir de caracteres alares. Foram também detectadas variabilidade individual e populacional na forma das asas, entretanto tais variações não impediram a diagnose dos sexos.

Por outro lado, o tamanho das asas não se mostrou correlato ao sexo quanto observado para a “forma”. O dimorfismo sexual de tamanho não se pronunciou em ambas as populações, sendo que em São Paulo machos foram menores que fêmeas e em Pariquera-Açu, ambos os sexos tiveram tamanhos equivalentes. Ademais, fêmeas das duas localidades diferiram quanto ao tamanho, enquanto que os machos foram semelhantes quanto ao este parâmetro em ambos os locais. Os dados sugerem que o formato alar é considerado mais confiável na sexagem dos indivíduos, a forma é evolutivamente mais estável que o tamanho da asa, sendo útil em estudos que necessitam identificação do sexo de indivíduos quando caracteres sexuais tradicionais não são visíveis, assim nos estudos feitos por Jirakanjanakit et al. (2007, 2008) que utilizaram asas de *Aedes aegypti* para comparar variações de forma e tamanho de asas.

Na análise de variação temporal, utilizamos a populações do Parque Ecológico do Tietê PET de duas coletas feitas com intervalo de 9 anos entre elas e submetemos assim a análise morfométrica das asas. Para análise de variáveis canônicas detectamos diferenças quanto ao tamanho e forma da asa. Asas de *Ae. scapularis* aumentaram de tamanho nesses 9 anos, similarmente ao observado por Jirakanjanakit et al. (2008), que detectaram uma

tendência de aumento da asas em 15 gerações de *Ae. aegypti* em cativeiro. Portanto, supomos que ciclos de aumento/diminuição de tamanho possam durar alguns anos. Variação temporal de caracteres alares é um fato e deve ser levado em consideração quando asas são usadas em taxonomia. Diagnoses de espécies baseadas em caracteres alares como usualmente feito para o complexo *Culex pipiens* (Linam e Nielsen, 1962), poderão ter de ser cuidadosamente reconsideradas.

Quanto à diferenciação populacional de *Ae. scapularis*, o principal objeto de investigação neste trabalho, diversas interpretações podem ser tecidas. Observando isoladamente cada marcador biológico empregado, temos impressões diferentes, porém não contraditórias, acerca da estruturação populacional da espécie. A forma das asas foi marcadamente divergente entre as três populações geográficas PAR, PET, BUT, tanto em machos como em fêmeas. A pequena sobreposição dos grupos no morfoespaço das variáveis canônicas reforça a idéia de que as conformações predominantemente típicas de cada localidade. Embora seja uma estimativa indireta, tal padrão de diferenciação alar nos locais geograficamente distintos tem sido interpretado na literatura entomológica como indicador de baixo fluxo gênico (revisão em Dujardin, 2008).

Agregando-se isso, o seqüenciamento do gene mitocondrial COI revelou 21 haplótipos, evidenciados por 23 sítios polimórficos. As diversidades haplotípicas e nucleotídicas globais foram respectivamente de $h = 0,867$ e $d\pi = 0,006$. As amostras PET, BUT e PAR apresentaram respectivamente 12, 5 e 8 haplótipos, sendo os haplótipos H16 e H14, os mais freqüentes, os únicos presentes nas três populações e o H7 compartilhado por PET e PAR. Os demais haplótipos, no entanto, foram exclusivos de cada população. Confrontando esse resultado com outro estudo semelhante com *Aedes aegypti*, a diversidade haplotípica para COI foi de $h = 0,740$ e nucleotídica de $d\pi = 0,006$ (Scarpassa et al, 2008), valores bem semelhantes ao aqui obtidos para *Aedes scapularis*.

O número amostral relativamente pequeno em cada população 17, 10 e 21 indivíduos (PET BUT PAR, respectivamente) na análise do DNA mitocondrial, nos limita a formular hipóteses aprofundadas sobre época de expansões populacionais e centros de dispersão, ainda assim, os dados levam a crer que a separação PET – BUT - PAR é antiga o suficiente para a formação de vários haplótipos, já que poucos são compartilhados e a variação haplotípica por localidade também é alta.

A alta diversidade haplotípica indica que variabilidade genética das espécies é grande e que essas populações não tenham sofrido “bottlenecks” recentemente. Analogamente, podemos extrapolar a interpretação supondo que o patrimônio alélico que define as formas alares também encontra-se rico. Se a analogia estiver correta, a variação interpopulacional de forma alar observada não é decorrente de perda de variabilidade genética por deriva, mas sim, devida à redução de fluxo gênico por distanciamento geográfico. Ademais, a correlação existente entre as distâncias geográficas e as distâncias fenéticas alares das respectivas populações dão suporte à nossa hipótese de diferenciação por distanciamento. As distâncias genéticas, praticamente equidistantes entre as três populações, associadas à baixa similaridade genética e à alta variabilidade haplotípica, são outras evidências da hipótese de rico patrimônio genético (alélico). O fluxo gênico interpopulacional não parece ser alto, mas ainda assim, mesmo em populações BUT e PET do mesmo município (São Paulo), as variabilidades genética e fenotípica são bastante expressivas. Fica também claro que as distâncias genéticas interpopulacionais, ao contrário das distâncias fenéticas, não se correlacionaram com as distâncias geográficas, o que sugere que os padrões evolutivos do gene COI não foram delineados por influência exclusiva do distanciamento físico entre essas populações.

Sem entrar nesses questionamentos de processos microevolutivos, a divergência populacional é atestada por padrões geográficos de forma alar e de gene mitocondrial COI. Ambos marcadores têm reconhecida utilidade na percepção de estruturação populacional.

Outro marcador biológico que reforça a idéia de divergência geográfica é a razão comprimento-largura dos ovos. Embora esse parâmetro não tenha sido medido em BUT, nas demais amostras populacionais ele se mostrou distintivo. Muito pouco é conhecido sobre microevolução de caracteres de ovos em Culicidae, mas no senso comum, variação intra-específica de ovos é diagnóstica de espécies crípticas apenas quando correlacionadas com outros caracteres genéticos e morfológicos peculiares (Linley et al., 1996; Junkum et al., 2004).

A descrição do exocóron dos ovos de *Ae. scapularis* por meio de microscopia eletrônica de varredura, não foi feita aqui com perspectiva comparativa populacional, mas permitiu caracterizá-lo quanto à morfologia geral para a espécie. Recentemente foi publicado um artigo que traz a descrição geral dos ovos dessa espécie por microscopia eletrônica (Santos-Mallet et al., 2010), o qual revelou que o formato geral dos ovos é elíptico, o comprimento é de $620.4 \pm 16.74 \mu\text{m}$, a largura $163.7 \pm 16.90 \mu\text{m}$ e sua superfície é ornamentada com células coriônicas contendo tubérculos. Tal descrição está de acordo com os parâmetros observados neste presente trabalho.

Se por um lado os caracteres de asas, DNA mitocondrial e ovos acusaram diferenciação populacional, por outro, o DNA ribossômico apresentou-se homogêneo intra e interpopulacionalmente. O ITS2 não foi analisado em sua completude, o que não nos permite descartar a possibilidade de haver polimorfismos que não foram detectados. Ainda com essa limitação, podemos inferir que é pouco provável a existência de polimorfismo nessas populações, afinal esta porção do DNA sofre evolução em concerto e em geral acusa situações em que há baixo fluxo gênico. Com base nos dados pode-se supor também que a velocidade

de evolução do ITS2 é menos que a velocidade de evolução da forma das asas, sequência do COI e morfometria de ovos.

Há casos de espécies de culicídeos que apresentam diferenças no ITS2 (Marrelli et al., 2006). Embora não tenhamos analisado o ITS2 inteiro, uma vez que a porção analisada foi de 252 pb em PAR e PET, caso essas amostras de *Ae. Scapularis* fossem representativas de espécies diferentes, seria esperado haver algum polimorfismo geograficamente fixo. Certamente, para confirmarmos tal suposição, este estudo deverá ser continuado.

Em suma, o presente trabalho sugere que os diferentes parâmetros biológicos evoluem em velocidades diferentes. Reforça ainda essa suposição, ao menos no que se refere às asas, o fato de ter havido variação alar entre o curto período de 9 anos.

Dessa forma, ainda que isoladamente os marcadores biológicos divirjam, o conjunto dos resultados nos faz aceitar que há estruturação populacional em *Ae. Scapularis*. No entanto, seria prematuro afirmar que há espécies crípticas representadas nas amostras investigadas. A interpretação desses padrões biogeográficos de *Ae. Scapularis* como indicadores de espécies crípticas depende ainda do conhecimento da amplitude desses padrões morfo-genéticos, o que requisitará possivelmente a extensão desse estudo a outras localidades.

6 CONCLUSÕES

- Em *Ae. Scapularis* existe variação interpopulacional quanto à forma alar, sequência do gene mitocondrial COI e quanto à razão largura/comprimento dos ovos.
- Não foram detectadas variações interpopulacionais na porção estudada do espaçador ribossômico ITS2 e na ornamentação do exocóron.
- As distâncias morfológicas (alares) entre as três populações são correlatas às distâncias geográficas entre elas.
- As variações populacionais observadas não constituem indícios definitivos de que há espécies crípticas entre essas populações.
- Existe dimorfismo sexual de forma alar
- A variação da forma alar pode ocorrer em intervalos tão curtos quanto 9 anos.
- Os parâmetros biológicos investigados parecem evoluir em velocidades diferentes.
- Populações de São Paulo (BUT e PET) são geneticamente e morfolologicamente distintas, porém expressivamente polimórficas nesses parâmetros.

REFERÊNCIAS*

- Alencar J, Guimarães AE, Gil-Santana HR, Santos-Mallet JR. Scanning electron microscopy of eggs of *Ochlerotatus* (Protomacleaya) *terrens* Walker. J Am Mosq Control Assoc. 2005;21(4):355-9.
- Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIII. A revision of the *scapularis* group of *Aedes* (*Ochlerotatus*). Contrib Amer Entomol Inst. 1976;13(3):1-144.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol. 1999;16:37-48.
- Bates M, Roca-Garcia M. The laboratory studies of *Saimiri Haemagogus* cycle of jungle yellow fever. Am J Trop Med. 1945;25:203-16.
- Behbahani A, Dutton TJ, Davies N, Townson H, Sinkins SP. Population differentiation and *Wolbachia* phylogeny in mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group. Med Vet Entomol. 2005;19(1):66-71.
- Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, Carnevale P and Guillet P. Current distribution of pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. Parasitologia. 1999;41:319-22.
- Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles species*. Insect Molecular Biology. 1996;5(1):1-9.
- Della-Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR, Coluzzi M. Speciation within *Anopheles gambiae*: the glass is half full. Science. 2002;298:115-17.
- Devicari M, Rocha LS. Morphological variability in urban populations of the mosquito *Aedes scapularis* (Diptera; Culicidae). In: Reunião Científica do Instituto Butantan; 2009; São Paulo. São Paulo: Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan; 2009.
- Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol. 2008;8(6): 875-90.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol. 1994;3(5):294-9.
- Forattini OP, Gomes AC, Santos JLF, Galati EAB, Rabello EX, Natal D. Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae em mata residual no Vale do Ribeira, S.Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública. 1981;15:557-86.
- Forattini OP. Culicidologia Médica. São Paulo: EDUSP; 2002. 864 p.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 9 - Synanthropy and epidemiological role of *Aedes scapularis* in South-Eastern Brazil. Rev. Saúde Pública. 1995;29:199-207.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 may 22]

- Forattini OP, Kakitani I, Sallum MAM. Encontro de criadouros de *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) em recipientes artificiais. *Revista de Saúde Pública*. 1997;31:519-22.
- Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR, Cacconel A. Attempts to molecularly distinguish cryptic *taxa* in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molec Biol*. 2001;10:25-32.
- Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. (The Quarterly) *Rev Biol*. 1991;66:441-53.
- Hunt RH, Coetzee M, Fettene M. The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998;92:231–35.
- Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP. The geometry of the wing of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* in isofemale lines through successive generations *Infection. Genetics and Evolution*. 2008;8:414-21.
- Jirakanjanakit NS, Leemingsawat S, Thongrunkiat C, Tapiwathnasorn S, Singhanityom C, Bellec and Dujardin J P. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti*. *Tropical Medicine and International Health*. 2007;12(11):1354–60.
- Jowett T. Preparation of Nucleic Acids. In: Roberts DB, editor. *Drosophila*, a practical approach. Oxford, U.K. 1986. p. 389.
- Junkum A, Jitpakdi A, Komalamisra N, Jariyapan N, Somboon P, Bates PA, Choochote W. Comparative morphometry and morphology of *Anopheles aconitus* form B and C eggs under scanning electron microscope. *Rev Inst Med trop S. Paulo*. 2004;46(5):257-62.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16:111-20.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-8.
- Linam JH, Nielsen LT. Notes on the taxonomic separation of adult females of *Culex pipiens* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Mosq News*. 1962;22:290-293.
- Linley JR, Lounibos LP, Conn J, Duzak D, Nishimura N. A description and morphometric comparison of eggs from eight geographic populations of the south American malaria vector *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Journal of The American Mosquito Control Association*. 1996;12(2):275-92.
- Marrelli MT, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, Lourenço-De-Oliveira R, Kloetzel JK, Marinotti O. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 1999;36:679-84.

Marrelli MT, Sallum MAM, Marinoti O. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy - A critical review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101: 817-832.

Mitchell CJ, Forattini OP. Experimental transmission of Rocio Encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. Jour Med Entomol. 1984;21 (1):34-7.

Monteiro LR, Reis SF. Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto: Holos; 1999. 189 p.

Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(5):672-6.

Rachou RG, Lima MM, Neto JAF, Martins CM. Inquérito epidemiológico de filariose bancroftiana em uma localidade de Santa Catarina, como fase preliminar de uma prova profilática. Constatação de transmissão extradomiciliária por um novo vetor, *Aedes scapularis*. Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1955;7:51-70.

Reinert JF. List of species described in the egg stage of tribe Aedini (Diptera: Culicidae) with their literature citations. J Am Mosq Control Assoc. 2005;21(3):252-62.

Robertis E de, Hib J. Bases da biologia celular e molecular. 4. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2006.

Roderick GK. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. Annu Rev Entom. 1996;41:325-52.

Rohlf FJ. Relative warp analysis and example of its application to mosquito wings. In: Marcus LF, Bello E, Garcia-Valdcasas, editors. Contributions to morphometrics. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales; 1993. p. 135-59.

Rohlf FJ. TpsRelw, relative warps analysis [Computer program]. Vesion 1.36. New York: Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2003a.

Rohlf FJ. TpsRegr, shape regression [Computer program]. Version 1.28. New York: Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2003b.

Rosa-Freitas MG, Lourenco-de-Oliveira R, de Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission Source. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1998;93(5):651-55.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics Applications Note. 2003;19(18):2496-97.

Sahlen G. Egg shell ultrastructure in four mosquito genera (Diptera, culicidae). J Am Mosq Control Assoc. 1996;12(2 Pt 1):263-70.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory manual. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 1989.

Santos-Mallet JR, Muller GA, Gleiser RM, Alencar J, Marques WA, Sarmento JS, Marcondes CB. Scanning Electron Microscopy Of The Eggs Of *Aedes scapularis* from Southern South America. Journal of the American Mosquito Control Association. 2010;26(2):205–9.

Scarpassa VM, Cardoza TB, Cardoso RP. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2008;78(6):895–903.

Service M. Medical Entomology for Students. 3rd ed. Liverpool: School of Tropical Medicine; 2004. p. 302.

Silva BD. Estudos taxonômicos de espécies do gênero *Culex* (Diptera: Culicidae) da região neotropical, utilizando a subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase. [dissertação (Mestrado em Epidemiologia)]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2009.

Soumaré ML, Ndiaye M. Ultrastructural studies of mosquito ovogenesis. Tissue and Cell. 2005;37:117–24.

Spanos L, Koutroumbas G, Kotsyfakis M, Louis C. The mitochondrial genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Insect Molecular Biology. 2000;9(2):139-44.

StatSoft, Inc. Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc.; 1995. Available from: <http://www.statsoft.com> [2009 jun 05].

Taipe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. Rev Saúde Pública. 2003;37(3):275-9.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 2007;24:1596-1599.

Tiriba AC. Epidemia de encefalite atribuída a arbovírus, ocorrida no litoral sul do estado de São Paulo em 1975: contribuição para o estudo clínico, São Paulo. [tese (Livre-Docência)], São Paulo, SP: Escola Paulista de Medicina; 1975.

Vasconcelos PF, Costa ZG, Travassos-da-Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VL, et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil: implications of climatic alterations in disease spread. J Med Virol 2001;65:598-604.

Wilson AC, Cann RL, Carr SM, Steve MC, George M, Gyllensten UB, et al. Mitochondrial dna and two perspectives on evolutionary genetics. Biol J Lin Soc. 1985;26:375-400.

White GB. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1974;68:278–301.