PALOMA OLIVEIRA VIDAL

**Estudo genético e morfológico de populações de *Aedes aegypti*
(Culicidae) na área metropolitana de São Paulo – SP**

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

**Área de concentração: Biologia
da Relação Patógeno-
Hospedeiro**

**Orientador: Prof. Dr. Lincoln
Suesdek**

**São Paulo
2010**

RESUMO

Vidal PO. Estudo genético e morfológico de populações de *Aedes aegypti* (Culicidae) na área metropolitana de São Paulo (SP) [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Aedes aegypti é uma espécie de mosquito da família Culicidae (Diptera) proveniente da região africana. Atualmente está distribuída por quase todo o mundo, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais. O controle das suas populações é considerado assunto de saúde pública por ser o vetor de agentes etiológicos de doenças graves como a dengue e a febre amarela. Devido à inexistência de uma vacina para combater o vírus dengue, a alternativa atual é controlar o vetor. Estudos populacionais são de grande importância para o desenvolvimento de estratégias de controle, no entanto, no Estado de São Paulo há uma carência de estudos populacionais referente ao *Ae. aegypti*. Devido a esse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a variabilidade genética e fenotípica de quatro populações de *Ae. aegypti* na área metropolitana de São Paulo, Butantã, Guarulhos, Osasco e Suzano. As distâncias geográficas entre essas localidades são no máximo 50 km e no mínimo 13,5 km. A assimetria bilateral alar quanto à forma foi tênue e em relação ao tamanho não se mostrou mais acentuada em nenhuma das populações analisadas. As quatro populações revelaram alto dimorfismo sexual de forma e tamanho, sendo asas de fêmeas maiores que asas de machos. As análises interpopulacionais de forma em ambos os sexos mostraram variabilidade morfológica alar que, no entanto não indica estruturação populacional. Não foi observada correlação entre valores de distância fenética alar e distância geográfica para machos ($r = -0,03$) e fêmeas ($r = 0,34$). Nas análises genéticas foram utilizados cinco *loci* microssatélites. Foi encontrada uma média de cinco alelos por *locus*. A heterozigosidade média esperada variou de 0,512 a 0,609. Dos *loci* analisados 65 % não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido ao déficit ou excesso de heterozigotos. Estruturação populacional foi detectada (F_{st} global = 0,062, $p < 0,05$) e baixo fluxo gênico ($N_m = 0,47$) foi presumido nas quatro localidades. Esses resultados apontam para uma heterogeneidade genética entre essas populações, distanciadas em pequenas escalas geográficas. Foi observada correlação entre as distâncias genética e geográfica ($r = 0,76$). Os dois marcadores populacionais aqui empregados aparentemente têm graus de resolução distintos para eventos microevolutivos, tendo sido DNA microssatélite ligeiramente mais sensível para acusar estruturação populacional.

Palavras-chave: Morfometria geométrica alar. Microssatélites. Microevolução. Mosquitos. Culicídeos.

ABSTRACT

Vidal PO. Genetic and morphological study of *Aedes aegypti* (culicidae) population in São Paulo (SP) metropolitan area. [Master thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Aedes aegypti is a mosquito species of Culicidae family (Diptera) originary from Africa. It currently occurs in most of the world, with more frequency in tropical and subtropical regions. The control of their populations is considered a public health subject because this mosquito is the vector of etiologic agents that causes serious diseases such as dengue and yellow fever. Since vaccines are still under development, dengue prevention depends primordially on vector control. Populational studies of *Ae. aegypti* are important to develop control strategies, but unfortunately the State of São Paulo lacks such studies. Despite this context, the objective of this work was to evaluate genetic and phenotypic variability of population samples of *Ae. aegypti* from four collecting sites in the metropolitan area of São Paulo city: Butantan, Guarulhos, Osasco and Suzano. Geographic distances between locations ranged from 13.5 to 50 km. The wing asymmetry is non-significant for size and tenuous for shape from four populations analyzed. The four populations revealed strong sexual dimorphism concerning shape and size, being the wings of females larger than those of males in all populational samples. The interpopulational analysis of shape for females and males showed morphological variability in wings, but did not indicate population structure. Pairwise genetic distances among populations were not correlated to the geographic distances for males ($r = -0.03$) and females ($r = 0.34$). For genetic analysis we used five microsatellite *loci*. All five *loci* were polymorphic (mean alleles/*locus* = 5). The mean expected heterozygotes ranged from 0.512 to 0.609. Of the *loci* analyzed, 65 % were not in Hardy-Weinberg equilibrium due to either deficit or excess of heterozygote. Populational structure was detected (global $F_{st} = 0.062$; $p < 0.05$) and low gene flow ($N_m = 0.41$) was presumed among four locations. These results indicate a genetic heterogeneity among these populations within a small geographic scale. Pairwise genetic distances among populations were correlated to the geographic distances ($r = 0.76$). The two populational markers used here apparently have different degrees of resolution for microevolutionary events, being that microsatellite DNA were slightly more sensitive in revealing populational structure.

Keywords: Wing geometric morphometrics. Microsatellites. Microevolution. Mosquitoes. Culicidae.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A espécie *Aedes aegypti*

A família Culicidae é representada por aproximadamente 3.500 espécies de insetos. A grande importância dessa família é devida ao fato de seus representantes estarem envolvidos na transmissão de patógenos ao homem. O *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus 1762 é natural da região afrotropical onde são encontrados os outros membros do grupo (Belkin, 1962). Trata-se de uma espécie classicamente tida como tropical e subtropical com sua distribuição que, beirando o cosmopolitismo, é em parte resultante das atividades humanas. Originalmente descrito no Egito, o que lhe conferiu seu epíteto específico (*aegypti*), a espécie tem acompanhado o homem em sua permanente migração (Nelson, 1986; Christophers, 1960).

São insetos holometábolos, apresentando metamorfose completa durante o seu desenvolvimento. Assim, como qualquer culicídeo, apresenta duas fases no seu ciclo de vida, uma aquática (larva e pupa) e uma terrestre (ovo e o indivíduo adulto), como ilustrado na Figura 1. As larvas se alimentam de partículas em suspensão na água e tem duração de 4 a 8 dias, no estágio de pupa não ocorre alimentação, e tem duração de 2 dias, o período que ocorre cada estágio depende principalmente da temperatura e disponibilidade de alimento (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002). Está entre as espécies de mosquito que passa mais rapidamente pela fase imatura, já que as fêmeas normalmente depositam os ovos em recipientes pequenos.

Machos e fêmeas adultas se alimentam de néctar de fluidos açucarados, mas somente as fêmeas são hematófagas, picando durante todo o dia, apresentando hábito diurno. O sangue é a fonte de proteínas que se fazem necessárias em sua alimentação para a maturação dos ovos. Em geral a fêmea faz uma postura após cada repasto sanguíneo.

Quanto à sua capacidade de dispersão, na sua forma ativa, apresenta-se reduzida. Machos raramente atingem mais que 100 metros além do lugar de onde se originou por isso a sua presença é um indicador seguro de criadouros próximos. Havendo aglomeração humana e muitos criadouros disponíveis as fêmeas não parecem necessitar de grandes deslocamentos, cerca de 100 a

500 metros, por outro lado na falta desses recursos elas tendem a se deslocar por distâncias maiores (Maciel-de-Freitas e Lourenço-de-Oliveira, 2006).

Figura 1. Ciclo de vida do *Ae. aegypti*.
Fonte: Instituto Oswaldo Cruz (2010).

Em 2003, Braks et al. demonstraram que no Rio de Janeiro a distribuição, densidade e frequência de *Ae. aegypti* estavam associadas a presença humana, sendo este um mosquito mais abundante no domicílio e peridomicílio. Esta espécie apresenta hábitos sinantrópicos e antropofílicos, sendo considerado o culicídeo que tem maior interação com os seres humanos.

1.2 O vetor *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* foi reconhecido como transmissor da febre amarela em 1881 (Rodriguez e Finlay, 1971). Em 1906, Brancroft publicou as primeiras evidências de que o mosquito também era o vetor de dengue, fato posteriormente confirmado por Agramonte, em 1906, e por Simmons, em 1931 (Centers for Disease Control, 1979). O *Ae. aegypti* é um eficiente vetor do vírus dengue especialmente devido ao comportamento hematófago intermitente, podendo assim se alimentar em mais de um hospedeiro durante um único ciclo

gonotrófico, período que representa o tempo que ocorre a ingestão de sangue até a postura dos ovos (Mackenzie et al., 2004). Estudo mostrou que as fêmeas de *Ae. aegypti* tem preferência e freqüentemente se alimentam de sangue humano devido à baixa concentração do aminoácido isoleucina (Harrington et al., 2001)

Provavelmente esse vetor teve a introdução nas Américas através de barcos vindos da Europa, que cruzavam o Atlântico durante as primeiras explorações e colonizações européias ao Novo Mundo no século XV (Bisset, 2002). Os primeiros registros de sua identificação em terras brasileiras foram em 1898, por Lutz, e em 1899, por Ribas apud Franco, 1969.

A ocorrência de epidemias da febre amarela levou ao combate do vetor a partir da década de 1940. A espécie foi erradicada em 1955, sendo encontrada mais tarde em 1967 no estado do Pará. A segunda erradicação ocorreu em 1973. Em 1976 foi detectado na cidade de Salvador, na Bahia e a partir dessa data nunca mais foi eliminada totalmente do país (Tauil, 2002).

Atualmente, o *Ae. aegypti* é o principal vetor do vírus da dengue no Brasil, presente nos 26 estados e no Distrito Federal (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010). Encontra-se em alta densidade próxima a áreas densamente povoadas por humanos (Lourenço-de-Oliveira et al., 2004). A espécie exibe casos de resistência a inseticidas (Luz et al., 2003; Braga et al., 2004; Da-Cunha et al., 2005; Macoris et al., 2003) e apresenta uma alta capacidade vetorial para o vírus da dengue. Além disso, a urbanização descontrolada e as migrações são fatores adicionais que favorecem tanto o vetor quanto à disseminação do vírus (Gubler, 1998; Herrera et al., 2006). Esse fato associado a péssimas condições de saneamento básico, moradia inadequada e a fatores culturais/educacionais favorecem condições ecológicas à transmissão dos vírus da dengue (Lines et al., 1994) pelo mosquito *Ae. aegypti*, seu principal vetor.

O vírus dengue e da febre amarela pertencem ao gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae, ambos transmitidos, em ciclos urbanos, pelo *Ae. aegypti*. O vírus da dengue apresenta quatro sorotipos (DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4) e é o único dentro da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, que não necessita manutenção de ciclos em ambientes silvestres. Os sorotipos são antigenicamente diferentes, porém apresentam a mesma epidemiologia (Gubler, 2002).

A dengue é uma arbovirose que se tornou um grave problema de saúde pública no Brasil, assim como em outras regiões tropicais do mundo (World Health Organization, 2010). Cerca de 100 milhões de casos ocorrem em cada ano no mundo (Monath, 1994). Segundo Braga e Valle (2007) a doença tem se destacado entre as enfermidades reemergentes e é considerada a mais importante das doenças virais transmitidas por artrópodes.

1.3 Controle populacional *versus* microevolução

Tentativas de redução populacional de *Ae. aegypti* constituem a principal forma de combate à dengue, já que as vacinas ainda estão em desenvolvimento. Os mosquitos de modo geral, apresentam grande capacidade adaptativa, evidenciada pela existência de mutantes resistentes a diversas condições ambientais e de complexos de espécies filogeneticamente relacionadas ou crípticas. Estratégias para o controle desse culicídeo têm sido desenvolvidas há décadas, entre elas, aplicação de inseticidas, controle biológico e os recentes métodos alternativos de construção de mosquitos transgênicos (Speranca e Capurro, 2007; Yakob et al., 2008) também utilizado para outros mosquitos (Marrelli et al., 2007; Wilke et al., 2009). Os métodos utilizados até hoje apresentaram eficácias diversas dependendo da situação em que são empregados, e freqüentemente enfrentam como fator limitante a microevolução dos mosquitos.

A “microevolução” é explicada como o conjunto de alterações evolutivas ocorridas em níveis taxonômicos infra-específicos, como por exemplo, em populações (Futuyma, 1997; Ridley, 2003). Devido à conjunção de fatores bióticos e abióticos que ocorrem dinamicamente em populações, os processos microevolutivos surgem como variações alélicas quantitativas ou qualitativas e mais raramente como amplificações gênicas ou rearranjos cromossômicos. Com o tempo, e com a influência do fluxo gênico, esses processos podem culminar em diferenciação ou convergência desses padrões nas entidades biológicas envolvidas (Futuyma, 1997; Ridley, 2003).

Os Culicídeos em geral apresentam flutuações populacionais amplas e freqüentes, e seu ciclo de vida é influenciado por condições ambientais instáveis como temperatura, regime pluviométrico, disponibilidade de coleções

hídricas e pela presença humana (Hayes, 1975; Mouchet e Carnevale, 1997; Kovats, 2000; Forattini, 2002; Ahumada et al., 2004). Devido ao conjunto desses fatos eles apresentam reprodução rápida, podendo completar um ciclo de vida em poucos dias. Essas propriedades em conjunto resultam freqüentemente em rápida evolução de suas populações. Um exemplo é o culicídeo *Culex quinquefasciatus* e a evolução de sua resistência a inseticida ao longo de poucos anos (Yebakima et al., 2004).

Outra questão importante na evolução de populações de mosquitos é a diferenciação de populações geograficamente isoladas. É comum encontrar variações geográficas entre populações de culicídeos cuja distribuição geográfica é ampla e descontínua a ponto de constituir barreiras ao intenso fluxo gênico. Um exemplo de tal situação é a variabilidade genética encontrada nas diversas populações de *Ae. aegypti* ao redor do mundo (Powell et al., 1980).

Para estudo da microevolução, em geral, adota-se como passo inicial à caracterização de populações, as quais são descritas quanto a padrões genéticos, morfológicos, comportamentais e comparadas ao longo de transectos geográficos ou temporais. Em um primeiro momento, o conjunto de dados permite o reconhecimento de padrões microevolutivos, enquanto que com o acúmulo de informações ao longo dos anos, existe a possibilidade de observar processos microevolutivos.

1.4 Detectando variação populacional com múltiplas abordagens

A utilização de múltiplos parâmetros comparativos pode fornecer maior robustez aos testes de hipóteses em caracterização populacional que vise descrever padrões e processos microevolutivos. Uma vez que os caracteres em uma espécie evoluem em taxas e velocidades diversas, a utilização de múltiplos parâmetros permite encontrar o marcador cujo nível de resolução é próximo do desejado, aumentando as chances de serem detectadas variações fenotípicas e genotípicas (Sene et al., 1988; Reinert et al., 1997; Rocha, 2005; Savard et al., 2006).

Um estilo de estudo populacional multiparamétrico que tem sido recentemente valorizado e encorajado na entomologia médica é a combinação de genética populacional e morfometria corporal (revisão em Dujardin, 2008). Tanto a morfometria tradicional como a geométrica tem capacidade de detectar variação populacional (Falconer, 1981; Dujardin e Slice et al., 2007). Com isso, informações necessárias podem ser fornecidas para criar-se um mapa preliminar, apontando áreas em que se devem aprofundar os estudos e investir na utilização de métodos moleculares. Além disso, podem ser obtidas informações importantes para a entomologia médica.

Na Província de Barinas (Venezuela), a geometria alar de *Rhodnius prolixus* foi utilizada recentemente para compreender a reinfestação das casas e do peridomicílio após aplicação de inseticidas (Feliciangeli et al., 2007). As conclusões deste estudo foram plenamente apoiadas por um posterior estudo genético (Fitzpatrick et al., 2008).

Estudo realizado em Niakhar, Senegal por Paupy et al. (2010) utilizou marcadores microssatélites e análise do padrão abdominal para avaliar a variabilidade genética e morfológica de populações de *Ae. aegypti*. Temu e Yan (2005) estudaram a diferenciação de populações de *Anopheles arabiensis*, importante vetor da malária que coexiste com outros vetores da malária em toda África, ao longo da costa do Kênia através de marcadores microssatélites e da seqüência do gene mitocondrial ND5. Para testar a variabilidade genética de populações de *Anopheles darlingi* em uma escala microgeográfica (cerca de 100 km) no oeste da Colômbia, Gutiérrez et al. (2010) utilizaram o gene mitocondrial COI e marcadores microssatélites para entender melhor a contribuição genética potencial das populações locais aos programas de controle da malária. A seguir serão descritos os marcadores utilizados no desenvolvimento do presente trabalho.

1.5 Morfometria geométrica das asas

Espécies e populações podem eventualmente apresentar variações morfológicas não notáveis à observação direta, como variações na razão entre múltiplas dimensões de uma determinada estrutura corporal. Por isso torna-se

necessário recorrer a abordagens alternativas, como as análises morfométricas. A morfometria é a formalização matemática das dissimilaridades entre formas geométricas de objetos, uma ferramenta de alto poder de resolução que permite a comparação de padrões corporais a partir de caracteres multivariados, ou seja, considerando-se simultaneamente várias características de uma estrutura corporal complexa (Rohlf, 1993; Monteiro e Reis, 1999).

A partir dos dados gerados por morfometria podem-se efetuar estudos estatísticos da variação morfométrica, comparar a magnitude das variações, entre outras abordagens (Bookstein, 1997; Rohlf, 1993; Monteiro e Reis, 1999). As principais propriedades da morfometria geométrica são as possibilidades de análises multivariadas, com múltiplas variáveis simultaneamente e a possibilidade de recuperar informações de forma e tamanho independentemente. Conseqüentemente seu poder de resolução é alto e permite gerar diversos marcadores taxonômicos ou populacionais.

Em insetos, asas são preferenciais por se tratar de uma estrutura bidimensional, evitando erros de posicionamento e deformação, além disso, as asas apresentam características potencialmente herdáveis e assim sendo sujeita a evolução. Existem trabalhos em que a morfometria geométrica demonstrou o caráter herdável e presumivelmente poligênico do formato alar em *Ae. aegypti* mantidos em cativeiro (Jirakanjanakit, 2008; Dujardin, 2008).

Estudo realizado por Moraes et al. (2010) com populações de *Culex quinquefasciatus* do Brasil e de La Plata, Argentina, utilizando morfometria geométrica, observaram que as amostras brasileiras são morfologicamente diferentes da amostra da Argentina quanto ao formato alar. Foi observada diferença em relação às populações do Norte e do Sul do Brasil, sugerindo que a morfologia das asas pode ser utilizada para uma avaliação preliminar da estrutura populacional de *Cx. quinquefasciatus* no Brasil.

A forma da asa tem sido cada vez mais utilizada na identificação e caracterização de espécies. Estudo realizado com vetores da dengue, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coletados em várias partes do mundo, mostrou que a microevolução da forma alar não produz sobreposição interespecífica significativa, independentemente da origem geográfica da espécie (Henry et al.,

2010). Naquele estudo, tanto a forma como o tamanho das asas exibiram-se espécie-específicos. Exemplos como esse mostram a utilidade da MG como complemento para diagnosticar exemplares desses mosquitos quando não estão bem preservados.

1.6 DNA nuclear - Microssatélites

Os marcadores microssatélites também conhecidos como SSRs (sequências simples repetidas) estão entre os marcadores mais polimórficos encontrados hoje nos genomas de animais e plantas. São caracterizados por uma sequência de 1-6 nucleotídeos repetidos em *tandem* espalhados em todo o genoma (Weber e May, 1989; Schlötterer, 2000). Por serem freqüentes, os *loci* microssatélites podem estar intimamente associados a *loci* conservados que contêm regiões codificadoras. O polimorfismo alélico ocorre em um *locus* SSR devido a mudanças no número de repetições, que pode ser devido a mutações, permutação desigual e erros da polimerase.

Os SSRs apresentam numerosas vantagens quando comparados com outros marcadores moleculares, pois são altamente polimórficos e informativos, a herança é codominante permitindo a discriminação entre homozigotos e heterozigotos. Além disso, são multialélicos e possuem alta reprodutibilidade, características importantes para análise baseada em marcadores moleculares. Esses marcadores são baseados em PCR (amplificação pela reação da polimerase em cadeia) e, portanto, necessitam de pequena quantidade de DNA, são abundantes e neutros.

Marcadores SSRs têm sido usados com sucesso para estudos genéticos populacionais de insetos vetores de importância médica como *Anopheles* (Muturi et al., 2010; Scarpassa e Conn, 2007), *Glossina* (Bouyer et al., 2007; Solano et al., 2000), *Culex* (Venkatesan e Rasgon, 2010; Huang et al., 2009) e *Ae. aegypti* (Hlaing et al., 2010; Paupy et al., 2008; Slotman et al., 2007; da Costa-Ribeiro et al., 2006; Herrera et al., 2002; Ravel et al., 2001). A utilização desses marcadores em estudos genéticos populacionais ajuda a investigar a base genética do vetor avaliando a variação populacional e com isso desenvolver estratégias de controle genético.

Variações baseadas em análises SSRs têm fornecido evidências de que o armazenamento de água e os hábitos humanos podem afetar na diferenciação genética do *Ae. aegypti* (Huber et al., 2002). Além disso, marcadores SSRs fornecem uma medida de divergência sensível e, portanto, podem distinguir populações que tenham divergido recentemente (Lanzaro et al., 1995), já que essas regiões de microssatélites evoluem rapidamente.

1.7 Estudos de diferenciação populacional de *Aedes aegypti* no Brasil

Devido ao fato de o *Ae. aegypti* ser vetor de doenças graves como a dengue e a febre amarela vários estudos relacionados a genética populacional tem sido desenvolvido no Brasil. Mais de 300 trabalhos já foram publicados endereçados ao estudo populacional de *Ae. aegypti* (base de dados ISI Web of Science, 2010). Citaremos alguns deles: Da Costa-Ribeiro et al. (2007) através de marcadores isoenzimáticos observaram baixo fluxo gênico entre populações localizadas na região sudeste e região sul não havendo evidência de dispersão passiva de *Ae. aegypti* por veículos entre as diferentes rotas ligando as áreas metropolitanas analisadas. O trabalho de Ayres et al. (2004) também utilizando isoenzimas, analisaram a estrutura genética de populações naturais de *Ae. aegypti* em níveis micro e macrogeográfico no Brasil, observando grande diferenciação genética populacional. No ano anterior, Ayres et al. (2003) mostraram diferenciação genética micro e macrogeográfica no Brasil utilizando marcadores RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*).

Sousa-Polezzi e Bicudo (2005) analisaram a variação genética de duas populações de *Ae. aegypti* em duas cidades brasileiras São José do Rio Preto (SP) e Goiânia (GO) detectados através de alterações nos padrões de esterase ao longo do tempo. Esses autores presumiram que, alterações nos padrões de esterase fossem resultado de fatores como a seleção por condições ambientais e deriva genética. O elevado uso de inseticidas causa alterações no padrão de esterase. Dados obtidos no mesmo período pelas autoridades responsáveis para controlar o mosquito revelaram uma crescente resistência dos mosquitos em São José do Rio Preto.

No Rio de Janeiro, Da Costa-Ribeiro et al. (2006), realizaram um trabalho populacional comparando a variabilidade genética de populações

separadas por uma distância linear mínima de 8,2 km e máxima de 32,4 km utilizando marcadores microssatélites e comparando com marcadores isoenzimáticos. Quando comparado com polimorfismo, os microssatélites se mostraram mais eficientes que as isoenzimas, mostrando uma grande variação genética.

1.8 *Aedes aegypti* no Estado de São Paulo

Considerado erradicado do Brasil em 1955, o *Ae. aegypti* foi reintroduzido posteriormente. A reinfestação no estado de São Paulo foi identificada no período de 1980 e 1981, sendo os focos eliminados. Em 1985 através de um levantamento feito em pontos estratégicos para instalação e desenvolvimento deste vetor (borracharias, depósitos de pneus, ferros-velhos, etc.) foi detectada a presença do mosquito em 12 municípios do Estado. No final de 1985 já existiam 09 municípios com infestação domiciliar pelo *Ae. aegypti*.

Entre 1986 e 1996, verificou-se contínua, rápida e ampla dispersão de *Ae. aegypti*, ocupando principalmente as regiões Oeste, Norte e Central do Estado. Em 1995, o número de municípios que apresentavam infestação pela espécie era de 416, distribuídos em áreas nas quais residiam aproximadamente 8 milhões de pessoas. Desde então, a expansão geográfica desse vetor continua ocorrendo (Superintendência do Controle de Endemias, 2009).

Nos últimos anos o Estado de São Paulo tem revelado grandes ocorrências de dengue, só no primeiro semestre de 2010 ocorreram mais de 150.000 casos de dengue autóctone (Centro de Vigilância Epidemiológica, 2010). Devido à falta de uma vacina para combater a doença, o que precisa ser feito atualmente é controlar o vetor. Para isso trabalhos referentes ao estudo populacional do *Ae. aegypti* são de grande importância para entender o processo de evolução e dispersão desses mosquitos. Apesar disso, as populações de *Ae. aegypti* no Estado de São Paulo ainda são pouco estudadas.

Tendo em vista a questão do *Ae. aegypti* no Estado de São Paulo e as problemáticas populacionais, propomos um estudo de caracterização populacional de *Ae. aegypti* combinando marcadores moleculares do tipo microssatélites com morfometria geométrica alar. A exemplo dos trabalhos já citados acreditamos que esses métodos poderão ser úteis também aqui no estado de SP. Além disso, a correlação da genética populacional com morfometria alar poderá trazer mais informações para os métodos estimativos de estrutura populacional de *Ae. aegypti*.

2 CONCLUSÕES

- Há acentuado dimorfismo sexual alar de forma e tamanho em *Ae. aegypti*;
- Fêmeas de *Ae. aegypti* apresentam tamanhos alares maiores que os machos;
- Assimetria bilateral alar foi tênue para ambos os sexos;
- Existe variabilidade morfológica alar que indica ligeira diferenciação mas não acusa evidente estruturação populacional;
- Todos os *loci* microssatélites foram polimórficos para as populações de *Ae. aegypti* do BUT, GUA, OSA e SUZ;
- Há uma diferenciação genética moderada entre os grupos geográficos considerados ($F_{st} = 0,0622$), indicando que essas populações estão estruturadas;
- Baixo fluxo gênico foi encontrado entre as populações analisadas de *Ae. aegypti* na área metropolitana de São Paulo ($N_m = 0,47$);
- Distância geográfica é um bom indicador de distância genética para as populações de *Ae. aegypti* da área metropolitana de São Paulo, porém não se correlacionou com distância fenética.
- Possivelmente as velocidades de evolução dos caracteres alares e das regiões microssatélites são diferentes.
- A MG provavelmente poderá ser útil para estudos populacionais em níveis macrogeográficos;
- Os resultados gerados no presente trabalho demonstraram que os marcadores microssatélites são mais adequados para avaliar estrutura genética de amostras coletadas em um pequeno espaço geográfico.

REFERÊNCIAS¹

Agnew P, Haussy C, Michalakakis Y. Effects of density and larval competition on selected life history traits of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2000;37(5):732-5

Ahumada JA, Lapointe D, Samuel MD. Modeling the population dynamics of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), along an elevational gradient in Hawaii. J Med Entomol. 2004;41(6):1157-70.

Ayres CFJ, Melo-Santos MAV, Prota JRM, Sole-Cava AM, Regis L, Furtado AF. Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. J Am Mosq Control Assoc. 2004;20(4):350-6.

Ayres CFJ, Melo-Santos MAV, Sole-Cava AM, Furtado AF. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae), the major dengue vector in Brazil. J Med Entomol. 2003;40(4):430-5.

Belkin JN. The mosquitoes of the South Pacific (Diptera: Culicidae). Berkeley: University of California Press; 1962. 576 p.

Bello F, Becerra V. Genetic variability and heterogeneity of Venezuelan equine encephalitis virus vector *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) populations of the Colombian Atlantic coast, based on microsatellite loci. Genet Mol Res. 2009;8(3):1179-90.

Bisset JA. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Rev Cub Med Trop. 2002;54(3):202-19.

Bond JE, Beamer DA, Hedin MC, Sierwald P. Gradual evolution of male genitalia in a sibling species complex of millipedes (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae: *Anadenobolus*). Invertebr Syst. 2003;17:711-17.

Bookstein FL. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge: Cambridge University press; 1997. 455 p.

¹ 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> [2010 May 22].

Bouyer J, Ravel S, Dujardin JP, Meeus T, Vial L, Thévenon S, Guerrini L, Sidibé I, Solano P. Population Structuring of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) According to Landscape Fragmentation in the Mouhoun River, Burkina Faso. J Med Entomol. 2007;44(5):788-95.

Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MAM. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:573–80.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epidemiol Serv Saúde. 2007;16(2):113-18.

Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(2):199-203.

CDC - Centers for Disease Control. Control of Dengue. Vector Topics. 1979; 2:1-39.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/den10_import_autoc.htm. [2010 jul 27].

Christophers SR. *Aedes aegypti* (L.), the Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press; 1960. 739 p.

Da Costa-Ribeiro MCV, Lourenco-de-Oliveira R, Failloux AB. Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in southeastern and southern Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(2):303-9.

Da Costa-Ribeiro MCV, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(8):917-21.

Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(4):441-4.

Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infection Genetics and Evolution. 2008;8(6):875-90.

Dujardin JP, Slice D. Geometric morphometrics. Contributions to medical entomology. In: Tibayrenc M. Encyclopedia of Infectious Diseases. Modern Methodologies. United States: Wiley & Sons; 2007. p. 435-47.

Falconer DS. Introduction to quantitative genetics. Longman: London and New-York; 1981. 300 p.

Feliciangeli M, Sanches-Martin M, Marrero R, Davies C, Dujardin J. Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela). Acta Trop. 2007;101(2):169-77.

Fitzpatrick S, Feliciangeli MD, Sanchez-Martin MJ, Monteiro FA, Miles MA. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(4):e210

Forattini OP. Culicidologia Médica. São Paulo: EDUSP; 2002. 864 p.

Franco O. Reinfestação do Pará por *Aedes aegypti*. Rev Bras Malariol Doencas Trop. 1969;21(4):729-31.

Futuyma DJ. Evolutionary Biology. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 1997. 763 p.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev. 1998;11(3):480-96.

Gutiérrez LA, Gómez GF, González JJ, Castro MI, Luckhart S, Conn JE, CORREA MM. Microgeographic Genetic Variation of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(1):38-47.

Hayes J. Seasonal changes in population structure of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): study of an isolated population. J Med Entomol. 1975;12(2):167-78.

Henry A, Thongsripong P, Fonseca-Gonzalez I, Jaramillo-Ocampo N, Dujardin JP. Wing shape of dengue vectors from around the world. Infect Genet Evol. 2010;10(2):207–14.

Herrera F, Urdaneta L, Rivero J, Zoghbi N, Ruiz J, Carrasquel G, Martinez JA, Pernalet M, Villegas P, Montoya A, Rubio-Palis Y, Rojas E. Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(6):625-33.

Herrera F, Urdaneta L, Rivero J, Zoghbi N, Ruiz J, Carrasquel G, Martinez JA, Pernalet M, Villegas P, Montoya A, Rubio-Huber K, Le Loan L, Hoang TH, Ravel S, Rodhain F, Failloux AB. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. Mol Ecol. 2002;1(9):1629-35.

Hlaing T, Tun-Lin W, Somboon P, Socheat D, Setha T, Min S, Thaung S, Anyaele O, Silva B, Chang MS, Prakash A, Linton Y, WALTON C. Spatial genetic structure of *Aedes aegypti* mosquitoes in mainland Southeast Asia. Evolutionary Applications. 2010;3:319-39.

Huang S, Hamer GL, Molai G, Walker ED, Goldberg TL, Kitron UD, Andreadis TG. Genetic variation associated with mammalian feeding in *Culex pipiens* from a West Nile virus epidemic region in Chicago, Illinois. Vector Borne Zoonotic Dis. 2009;9(6):637-42.

Huber K, Luu Le L, Chanta N, Failloux AB. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. Acta Trop. 2004;90(1):23-29.

Huber K, Le Loan L, Hoang TH, Ravel S, Rodhain F, Failloux AB. Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. Mol Ecol. 2002;11(9):1629-35.

Instituto Oswaldo Cruz. O mundo macro e micro do mosquito *Ae. aegypti*. Direção de Genilton José Vieira. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2010. 1 DVD.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. Inf Gen Evol. 2008;8(4):414-21.

Jirakanjanakit NS, Leemingsawat S, Thongrunkiat C, Apiwathnasorn S, Singhaniyom C, Bellec, Dujardin JP. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Trop Med Int Health. 2007;12(11):1354–60.

Jowett T. Preparation of Nucleic Acids. In: Roberts DB, editor. *Drosophila*, a practical approach. Oxford: Roberts DB; 1986. 389 p.
Kovats RS. El Nino and human health. Bull World Health Organ. 2000;78(9):1127-35.

Lanzaro GC, Zheng L, Toure YT, Traore SF, Kafatos FC, Vernick KD. Microsatellite DNA and isozyme variability in a West African population of *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol. 1995;4(2):105-12.

Lines J, Harpham T, Leake C, Schofield C. Trends, priorities and policy directions in the control of vector-borne diseases in urban environments. Health Policy Plann. 1994;9(2):113-29.

Lien JC. New Species of Mosquitoes from Taiwan (Diptera : Culicidae) Part V. Three New Subspecies of *Aedes* and Seven New Species of *Culex*. Trop Med. 1968;10(4):217-62.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004;98(1):43-54.

Luz PM, Codeco CT, Massad E, Struchiner CJ. Uncertainties regarding dengue modeling in Rio de Janeiro, Brazil. Mems Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(7):871-8.

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and Dengue viruses. Nat Med. 2004;10(12):98-109.

Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. Mems Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(5):703-08.

Maciel-de-Freitas R, Lourenco-de-Oliveira R. Presumed unconstrained dispersal of *Aedes aegypti* in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Saude Publica. 2009;43(1):8-12.

Marrelli MT, Rasgon J, Jacobs-Lorena M. Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on Plasmodium-infected blood. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(13):5580-3.

Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91(7):2395-400.

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. Mems Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(5):672-6.

Mouchet J, Carnevale P. Impact des transformations de l'environnement sur les maladies à transmission vectorielle. Sante. 1997;7(4):263-9.

Mpho M, Callaghan A, Holloway GJ. Temperature and genotypic effects on life history and fluctuating asymmetry in a field strain of *Culex pipiens*. Heredity. 2002;88:307-12

Mpho M, Holloway GJ, Callaghan A. A comparison of the effects of organophosphate insecticide exposure and temperature stress on fluctuating asymmetry and life history traits in *Culex quinquefasciatus*. Chemosphere. 2001;45(6-7):713-20.

Muturi EJ, Kim CH, Baliraine FN, Musani S, Jacob B, Githure J, Novak RJ. Population Genetic Structure of *Anopheles Arabiensis* (Diptera: Culicidae) in a Rice Growing Area of Central Kenya. J Med Entomol. 2010;47(2):144-51.

Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA. 1973;70(12):3321-33.

Nelson MJ. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud; 1986.

Paupy C, Brengues C, Ndiath O, Toty C, Hervé JP, Simard F. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. Infect Genet Evol. 2010;10(4):473-80.

Paupy C, Brengues C, Kamgang B, Herve JP, Fontenille D, Simard F. Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) in North Cameroon. J Med Entomol. 2008;45(3):391-400.

Paupy C, Chanta N, Huber K, Lecoq N, Reynes JM, Rodhain F, Failloux AB. Influence of breeding sites features on genetic differentiation of *Aedes aegypti* populations analyzed on a local scale in Phnom Penh municipality of Cambodia. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(1):73-81.

Peruzin MCJ. Análises comparativas populacionais de *Culex quinquefasciatus* em dois locais do Estado de São Paulo. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009. 96 f.

Powell JR, Tabachnick WJ, Arnold J. Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. Science. 1980;208(4450):1385-7.

Ravel S, Monteny N, Velasco Olmos D, Escalante Verdugo J, Cuny G. A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. Acta Trop. 2001;78(3):241-50.

Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Heredity. 1995;86:248-9.

Reinert Jf, Kaiser PE, Seawright JA. Analysis of the *Anopheles* (*Anopheles*) *quadrimaculatus* complex of sibling species (Diptera: Culicidae) using morphological, cytological, molecular, genetic, biochemical, and ecological techniques in an integrated approach. J Am Mosq Control Assoc. 1997;13:1-102.

Ridley M. Evolution. Boston: Blackwell Scientific; 2003. 768 p.

Rocha LS. Caracterização de populações de *Anastrepha sororcula* Zucchi 1979 (Diptera: Tephritidae) por análises cromossômicas, morfométricas e moleculares [tese (Doutorado em Genética e Biologia Evolutiva)]. São Paulo: Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo; 2005. 127 f.

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.

Savard J, Tautz D, Lercher MJ. Genome-wide acceleration of protein evolution in flies (Diptera). BMC Evol Biol. 2006;6(7):1-6.

Scarpassa VM, Conn JE. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(3):319-27.

Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma. 2000;109(6):365–71.

Sene FM, Pereira MAQR, Vilela CR. Contrasting Patterns of Differentiation Inferred from Traditional Genetic Markers in the Process of Speciation. Pacific Science. 1988;42:81-8.

Slotman MA, Kelly NB, Harrington LC, Kitthawee S, Jones JW, Scott TW, Caccone A, Powell JR. (2007) Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. Mol Ecol Notes. 2007;7:168-71.

Solano P, De La Rocque S, De Meeus T, Cuny G, Duvallet G, Cuisance D. Microsatellite DNA markers reveal genetic differentiation among populations of *Glossina palpalis gambiensis* collected in the agropastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. Insect Mol. Biol. 2000;9(4):433–39.

Souza JMG, Gouveia M, Perondini ALP, Selivon D. Asymmetry of frontal bristles and postocular setae in species and hybrids of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). Gen Mol Biol. 2007;30(1):145-51.

Sousa-Polezzi RC, Bicudo HEMC. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by changes in the esterase patterns. Genetica. 2005;125(1):43–53.

Speranca MA, Capurro ML. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(4):425-33.

StatSoft, Inc. Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc; Available from: <http://www.statsoft.com>. 2004. [2010 ago 13].

SUCEN- Superintendência do Controle de Endemias. Dengue e Febre amarela. Disponível em: http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/dengue_f_amarela/texto_dengue_pro3.htm. [25 mar 2009].

SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02_n03_dengue_brasil_si.pdf. [24 ago 2010].

Temu EA, Yan G. Microsatellite and mitochondrial genetic differentiation of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from Western Kenya, the great rift Valley, and Coastal Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(4):726-33.

Tsuda Y, Takagi M, Wang S, Wang Z, Tang L. Movement of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) released in a small isolated village on Hainan island, China. *J Med Entomol*. 2001;38:93-8.

Venkatesan M, Rasgon JL. Population genetic data suggest a role for mosquito-mediated dispersal of West Nile virus across the western United States. *Mol Ecol*. 2010;19(8):1573–84.

Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 1989;44(3):388–96.

Weir BS. *Genetic Data Analysis*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc; 1990. 377 p.

Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 1984;38(6):1358–70.

WHO- World Health Organization. Dengue. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/> [2010 jul 27].

Wilke ABB, Nimmo DD, John OS, Kojin BB, Capurro ML, Marrelli MT. Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. *AsPac J Mol Biol Biotechn*. 2009;17(3):65-74.

Wright S. Evolution and genetics of populations. Chicago: University of Chicago Press; 1978. 511 p.

Yakob L, Alphey L, Bonsall MB. *Aedes aegypti* control: the concomitant role of competition, space and transgenic technologies. Journal of Applied Ecology. 2008;45(4):1258-65.

Yebakima A, Marquine M, Rosine J, Yp-Tcha MM, Pasteur N. Evolution of resistance under insecticide selection pressure in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) from Martinique. J Med Entomol. 2004;41(4):718-25.