

VIVIAN APARECIDA RAMOS PETERSEN

**Polimorfismos em *Aedes scapularis*:
Caracterização genética
e morfológica de um dos vetores de filárias e arbovírus**

Tese apresentada ao Programa de Pós –Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

VIVIAN APARECIDA RAMOS PETERSEN

**Polimorfismos em *Aedes scapularis*:
Caracterização genética
e morfológica de um dos vetores de filárias e arbovírus**

Tese apresentada Programa de Pós-Graduação Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Suesdek Rocha

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD);

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Petersen, Vivian Aparecida Ramos
Polimorfismos em *Aedes scapularis*:
Caracterização genética e morfológica do vetor de
filárias e arbovírus / Vivian Aparecida Ramos
Petersen; orientador Lincoln Suesdek. -- São Paulo,
2017.
113 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. genética animal . 2. Culicidae. 3.
Mitochondrias. 4. Morfometria. 5. Polimorfismo. I.
Suesdek, Lincoln, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vivian Aparecida Ramos Petersen

Título da Tese: Polimorfismos em *Aedes scapularis*: Caracterização genética e morfológica do vetor de filárias e arbovírus

Orientador(a): Lincoln Suesdek

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

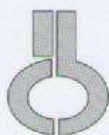
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 576/13 referente ao projeto intitulado: "*Investigação de complexo de espécie em *Ochlerotatus scapularis* (Rondani, 1848), utilizando os genes *COL*, *cpr* e morfometria geométrica de asa*" sob a responsabilidade de **Vivian Aparecida Ramos Petersen**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2013.

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

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

**Dedico este trabalho a meus pais, José
Urbano e
Maria Aparecida Petersen**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Lincoln Suesdek pela oportunidade, ensinamentos profissionalizantes e para a vida!

Aos meus amigos e companheiros do laboratório: Aurélio, Camila, Carol, Fábio, Fernanda, Flávia, Paloma e Stella. Obrigada a todos pelos bons momentos de amizade. Obrigada à todos pelo companheirismo durante meus 7 anos de Mosquito Lab.

Ao técnico Felipe Gomes pelo auxílio nas coletas de espécimes de mosquitos e a Fernanda Almeida por ter me auxiliado na montagem de asas.

Agradeço à Professora Maria Anice Sallum por ter cedido o uso do Laboratório de Biologia Molecular.

À técnica Tatiane Porangaba no auxílio das técnicas de biologia molecular

Ao técnico Aristides Fernandes por ter auxiliado na confirmação dos espécimes utilizados no projeto

À professora Roseli La Corte e à pesquisadora Letícia Marteis por terem dado suporte na coleta de mosquitos realizada em Poço Redondo-SE. Ao técnico James Cardozo por ter auxiliado na coleta realizada nesta cidade.

À professora Marinete Povia pelo suporte fornecido para coleta no Instituto Evandro Chagas em Ananindeua (PA). Ao técnico Raimundo Lacerda por ter auxiliado nesta coleta.

Ao professor Luís Marcelo Aranha por ter dado suporte em coleta realizada na cidade de Monte Negro- RO.

À pesquisadora Renata Cecília Amaro por ter auxiliado nas análises filogenéticas desta tese e ao Prof. Dr. João Marcelo Pereira Alves pelo auxílio nas dúvidas de montagem dos genes mitocondriais presentes nesta tese.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo auxílio financeiro, com o número de processo 140032/2013-4 que proporcionou o desenvolvimento do meu projeto de doutorado, denominado: **Polimorfismos em *Aedes scapularis*: Caracterização genética e morfológica do vetor de filárias e arbovírus.**

And, God, tell us the reason
Youth is wasted on the young
It's hunting season and the lambs are on the run
Searching for meaning
But are we all lost stars
Trying to light up the dark?

Who are we?
Just a speck of dust within the galaxy
Woe is me
If we're not careful turns into reality...

Gregg Alexander

Resumo

Petersen VAR. Polimorfismos em *Aedes scapularis*: Caracterização genética e morfológica de um dos vetores de filárias e arbovírus. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A presente tese compreende 2 capítulos, dedicados à investigação de complexo de espécie e polimorfismo em *Aedes scapularis*. Como complementação das atividades acadêmicas, apresento na sessão anexo desta tese, 3 artigos científicos de minha autoria acerca do tema “culicídeos”.

No Capítulo 1 realizamos análises de complexo de espécies e polimorfismo molecular em *Aedes scapularis*, com espécimes da Mata Atlântica, Caatinga e Mata Amazônica e utilizamos como marcadores biológicos: gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), DNA mitocondrial completo e Morfometria Geométrica alar (MG). Algumas amostras biológicas analisadas em trabalhos anteriores (de minha autoria ou alheios) tiveram de ser revisitadas nesta tese, porém em contexto mais abrangente. Encontramos um alto polimorfismo evidenciado por todos os marcadores populacionais nos mosquitos dos diferentes biomas estudados e diferentes níveis de estruturação populacional de acordo com o marcador empregado. Não foi possível observar estruturação populacional na análise do gene COI, uma leve estruturação populacional foi observada na MG da asa e uma alta estruturação populacional foi observada na análise filogenética dos genes mitocondriais codificadores de proteínas. Neste capítulo foi concluído que possivelmente *Aedes scapularis* não consiste de um complexo de espécies.

No Capítulo 2 foi desenvolvido um resumo técnico dos procedimentos utilizados na análise e montagem de 37 genes do DNA mitocondrial de indivíduos da espécie *Aedes scapularis* para estudo de investigação de complexo de espécie e polimorfismo neste mosquito realizado no Capítulo 1. Foi possível montar os genes mitocondriais de 19 indivíduos, utilizando os programas “Mimicking Intelligent Read Assembly” e algoritmo “Mitochondrial Baiting and Iterative Assembly”. Foram encontrados 6 mosquitos fêmeas na qual foi amplificado o seu DNA e do mamífero picado, contudo foi possível realizar “filtragem” do DNA do mosquito em relação ao do vertebrado .

Analisando a tese em conjunto, obtivemos duas conclusões principais: 1) a espécie *Aedes scapularis* é genética e morfológica polimórfica em todos os ambientes estudados, 2) Não encontramos evidência de complexo de espécies neste mosquito, e então acreditamos que a espécie *Aedes scapularis* é uma única entidade taxonômica.

Palavras-chave: *Aedes scapularis*. DNA mitocondrial completo. COI. Morfometria geométrica. Polimorfismo. Complexo de espécies.

Abstract

Petersen VAR. Polymorphisms in *Aedes scapularis*: Genetic and morphological characterization of one filaria and arbovirus vector. [Ph. D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

The present thesis comprises 2 chapters we dedicated to the investigation of species complex and polymorphism in *Aedes scapularis*. As a complement to the academic activities, I show in the attached section of this thesis, 3 scientific papers of my authorship on the theme "Culicidae".

In Chapter 1 we realized analysis of species complex and molecular polymorphism in *Aedes scapularis*, with specimens of the Atlantic Forest, Caatinga (Xerophytic sparse tropical scrub) and Amazonian Forest and using the biological markers: Cytochrome Oxidase Subunit I gene (*COI*), Whole mitochondrial DNA and Wing Geometric Morphometric (GM). Some biological samples analyzed in previous works (of mine or others) were reanalyzed in this thesis, but in a broader context. We found a high polymorphism evidenced in all the population markers in the mosquitoes of the different biomes studied and different levels of population structure according to marker used. It was not possible to observe population structure in the analysis of the *COI* gene, a weakly population structuring was observed in wing GM, and a high population structure was observed in the phylogenetic analysis of protein coding mitochondrial genes. In this chapter we concluded that probably does not occur species complex in *Aedes scapularis*.

In Chapter 2 a technical summary of the procedures were used in the analysis and assembly of 37 mitochondrial DNA genes of *Aedes scapularis* to study the species complex and polymorphism in this mosquito realized in Chapter 1. It was possible to assemble the mitochondrial genes from 19 individuals using the "Mimicking Intelligent Read Assembly" software and "Mitochondrial Baiting and Iterative Assembly" program. Were found 6 female mosquitoes in which their DNA and the mammalian DNA were amplified, however, it was possible to "filter" the mosquito DNA in relation to the vertebrate.

Analyzing the thesis, we obtained two main conclusions: 1) The *Aedes scapularis* species is genetically and morphologically polymorphic in all the studied environments. 2) We not found evidence of a species complex in this mosquito, then we believe that the species *Aedes scapularis*, It is a single taxonomic entity.

Keywords: Whole mitochondrial DNA. *COI*. Geometric morphometrics. Polymorphism. Species complex.

Lista de ilustrações

Figura 1 - <i>Aedes scapularis</i> fêmea	19
Figura 2 – Processo retrodirigido.....	21
Figura 3 - Mapa das amostras coletadas no Brasil: Ananindeua, Itaboraí, São Paulo, Pariquera-Açu e Tremembé	36
Figura 4 - Morfoespaço das variáveis canônicas a partir de dados referentes à forma alar das populações PET, ITA, TRE, PAR, BUT, PRE e ANA	40
Figura 5 - Neighbor joining das distâncias de Mahalanobis das sete populações de <i>Ae. scapularis</i>	42
Figura 6 - Análise de correlação entre as Distâncias de fenéticas	43
Figura 7 - Componentes principais e Diversidade morfológica alar das populações de <i>Ae. scapularis</i>	44
Figura 8 - Tamanho dos centróides das populações de <i>Ae. scapularis</i>	45
Figura 9 - Rede de haplótipos do gene Citocromo Oxidase Subunidade I das populações de <i>Ae. scapularis</i>	47
Figura 10 - Análise Bayesiana gerada por análise dos haplótipos de COI das populações de <i>Ae. scapularis</i>	48
Figura 11 - Estrutura dos 37 genes mitocondriais e região rica em A+T	49
Figura 12 - Diversidade nucleotídica dos 13 genes mitocondriais codificantes de proteínas	50
Figura 13 - Topologia bayesiana gerada de análise dos 13 CGPs.....	54
Figura 14 -Topologia bayesiana gerada de análise do gene <i>NAD5</i>	55
Figura 15 - Topologia bayesiana gerada de análise do gene <i>NAD6</i>	56
Figura 16 -Topologia bayesiana gerada de análise do gene <i>ATP6</i>	57
Figura 17 - Topologia bayesiana gerada de análise do gene <i>NAD1</i>	58
Figura 18 - Estrutura dos 37 genes mitocondriais de <i>Equus caballus</i> e <i>Homo sapiens</i>	83

Lista de tabelas

Tabela 1 - Dados acessados a respeito da frequência dos gêneros <i>Aedes Ochlerotatus</i> em sites de pesquisa acadêmica	18
Tabela 2 - Dados das amostras coletadas em diferentes cidades do Brasil	37
Tabela 3 - Valores das disparidades métricas (Mahalanobis) da forma alar para as populações de <i>Ae. scapularis</i>	41
Tabela 4 - Análises de polimorfismo e diversidade haplótípica do gene COI para as populações de <i>Ae. scapularis</i>	46
Tabela 5 - Análises de polimorfismo e diversidade haplótípica dos 13 GCPs do mosquito <i>Aedes scapularis</i>	51
Tabela 6 - Número de substituições sinônimas e não sinônimas e sua relação DnDs na espécie <i>Aedes scapularis</i>	52
Tabela 7 - Número de iterações utilizados por amostra para alcançar a extensão correspondente do contig	79
Tabela 8 - Posição de cada gene ao longo da extensão da mitocôndria.....	80

Listas de abreviações

ANA - População coletada em Ananindeua-PA

ATP6 - ATP sintetase F0 subunidade 8

ATP8 - ATP sintetase F0 subunidade 6

Contig - sequências contínuas de nucleotídeos

COB - Citocromo b

COI - Citocromo oxidase subunidade 1

COII - Citocromo oxidase subunidade 2

COIII - Citocromo oxidase subunidade 2

CPs - Componentes principais

GCPs - Genes codificadores de proteínas

ITA - População coletada em Itaboraí-RJ

MG - Morfometria geométrica

MIRA - Mimicking Intelligent Read Assembly

MITObim -Mitochondrial Baiting and Iterative Assembly

NAD1 - NADH desidrogenase subunidade 1

NAD2 - NADH desidrogenase subunidade 2

NAD3 - NADH desidrogenase subunidade 3

NAD4 - NADH desidrogenase subunidade 4

NAD4L - desidrogenase subunidade 4L

NAD5 - NADH desidrogenase subunidade 5

NAD6 - NADH desidrogenase subunidade 6

NGS - Next Gen Sequencing

PAR - População coletada na cidade de Pariqueira-Açu

PET - População coletada no Parque Ecológico do Tietê em São Paulo

PRE - População coletada em Poço Redondo-SE

TRE - População coletada em Tremembé-SP

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 Aspectos gerais da tese	17
1.2 Questão nomenclatural da espécie <i>Aedes scapularis</i> (<i>Ochlerotatus scapularis</i>)	17
1.3 <i>Aedes scapularis</i>	18
1.4 Importância do estudo de espécies polimórficas	19
1.5 Polimorfismo em <i>Aedes scapularis</i>	20
1.6 Adaptação do mosquito <i>Ae. scapularis</i> ao ambiente urbano	21
1.7 Morfometria Geométrica	22
1.8. DNA Mitocondrial	22
1.8 Trabalhos que nós desenvolvemos na investigação de complexo e polimorfismo em <i>Aedes scapularis</i>	23
1.8. DNA Mitocondrial	24
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
REFERÊNCIAS*	26
3 CAPÍTULO 1- POLIMORFISMOS EM AEDES SCAPULARIS: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DO VETOR DE FILÁRIAS E ARBOVÍRUS	29
3.1 Introdução	30
3.2 Materiais e métodos	30
3.2.1 Coletas dos espécimes	32
3.2.2 Análise morfométrica das asas	32
3.2.3 Extração de DNA genômico	33
3.2.4 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene Citocromo Oxidase Subunidade I	33
3.2.5 Amplificação e sequenciamento do DNA mitocondrial completo.....	34
3.2.6 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S	34
3.2.7 Análise estatística do gene COI	36
3.2.8 Montagem e anotações dos genes mitocondriais	38
3.2.9 Análise das seqüências de DNA mitocondrial completo.....	38
3.3 Resultados	39
3.3.1Morfometria geométrica.....	39
3.3.2 Análise do gene COI	45
3.3.3 Estrutura do DNA mitocondrial completo.....	48
3.4.Discussão	59
3.4.1 Geometria alar.....	59
3.4.2 Citocromo Oxidase Subunidade I.....	60
3.4.3 Caracterização e Polimorfismo.....	62
3.4.4 Dna mitocondrial completo- Investigação do complexo de espécies	63
3.4.5 Amplificação de dna ingurgitado pelo mosquito	64
3.4.6 COI, DNA Mitocondrial completo e Morfometria geométrica alar	65
3.5 Conclusão	67
3.6 Resumo	68

REFERÊNCIAS	69
4 CAPÍTULO 2- MONTAGEM DE GENOMA MITOCONDRIAL COMPLETO GERADO POR NEXT GEN SEQUENCING EM AEADES SCAPULARIS.	73
4.1 Introdução	74
4.2 Materiais e métodos	76
4.2.1 Métodos moleculares.....	76
4.2.2 Montagem e mapeamento dos genes mitocondriais.....	76
4.2.3 Filtragem das amostras de DNA de mosquito com DNA do hospedeiro... ..	78
4.3 Resultados e Discussão	82
4.4 Resumo	84
REFERÊNCIAS*	85
5 CONCLUSÕES GERAIS	87
APÊNDICE	88
A - Amostras trabalhadas nos capítulos 1 e 2	82
 ANEXOS	
A- High morphological and genetic variabilities of <i>Ochleerotatus scapularis</i>, a potential vector of filarias and arboviruses	95
B - Assessment of the correlation between wing size and body weight in captative <i>Culex quinquefasciatus</i>	105
C - Polymorphism in male genitalia of <i>Aedes (Ochlerotatus) scapularis</i> Rondani, 1848	110

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos gerais da tese

A presente tese está composta de 2 capítulos e foi desenvolvida dentro das normas descritas no Manual Vancouver (Parte IV), sugerido por este Programa de Pós-Graduação no item XII.2.2 presente no Novo Regulamento do Programa de Pós-Graduação para matriculados a partir de 12/04/2014.

1.2 Questão nomenclatural da espécie *Aedes scapularis* (*Ochlerotatus scapularis*)

Atualmente ocorre uma ampla instabilidade na taxonomia de culicídeos, pois novas ferramentas permitem novas perspectivas de estudo, o uso de técnicas tais como análises filogenéticas podem melhorar a tomada de decisões em classificações taxonômicas. Esta instabilidade taxonômica ocorre com vários culicídeos do gênero *Aedes* ou *Ochlerotatus* e a espécie objeto deste estudo, o mosquito *Aedes scapularis* também está em discussão em relação à classificação da sua nomenclatura. Anteriormente utilizávamos a nomenclatura *Ochlerotatus scapularis* segundo Reinert et al. (2008) para este mosquito, contudo passamos a utilizar gênero *Aedes* para a espécie *Aedes scapularis* de acordo com Wilkerson et al. (2015).

Reinert et al 2008 estudaram 297 caracteres morfológicos de mosquitos do subgênero *Ochlerotatus* pertencentes ao gênero *Aedes*, encontrados em: ovos, larvas de quarto instar, pupas e adultos. Foram reunidos os 297 caracteres morfológicos em análise de máxima parcimônia e foi observado que todos os mosquitos do subgênero *Ochlerotatus* eram pertencentes ao mesmo clado. Com base nos resultados obtidos, os autores propõem a elevação do subgênero *Ochlerotatus* para a categoria de gênero. Alguns anos após o estudo de Reinert et al. 2008, as análises filogenéticas estudadas por estes autores foram reavaliadas por Wilkerson et al. (2015) e foi visto que as relações filogenéticas foram fracamente suportadas, pois foi observado que os rankings taxonômicos falharam na prioridade e outros critérios úteis de nomeação dos táxons. No estudo de Reinert et al. (2008) também foram consideradas mais as características taxonômicas da genitália masculina e feminina dos gêneros considerados *Ochlerotatus* e *Aedes* do que as relações cladísticas. Adicionalmente a isso, é possível que o polimorfismo das estruturas interindividuais da mesma espécie seja comum, principalmente na genitália, assim, basear-se em apenas alguns caracteres morfológicos pode gerar dúvida. Então com base nestas observações, Wilkerson et al. (2015) propôs que o gênero *Ochlerotatus* retorne a classificação de subgênero. Levando em consideração os estudos realizados por este autor, acreditamos que faz sentido e é melhor manter este gênero como era antes do estudo de Reinert et al. (2008).

Além disso, buscamos artigos indexados que usam *Ochlerotatus* como gênero de *scapularis*, e o número de pesquisadores que utilizam *Ochlerotatus* em relação ao gênero *Aedes* é menor, como segue abaixo:

Tabela 1- Dados acessados a respeito da frequência dos gêneros *Aedes* e *Ochlerotatus* em sites de pesquisa acadêmica. Data de acesso: 2000 - 2016.

Base de consulta	Número de resultados	
	<i>Aedes scapularis</i>	<i>Ochlerotatus scapularis</i>
Web of Science	47	34
Google Scholar	394	215

1.3 *Aedes scapularis*

Aedes scapularis é um mosquito vetor de filárias e arbovírus com ampla distribuição na região Neotropical. As larvas de *Ae. scapularis* se desenvolvem em poças d'água naturais em ambiente silvestre, contudo atualmente este mosquito está em incipiente adaptação às regiões urbanas. As larvas do mosquito *Ae. scapularis* são cada vez mais observadas se desenvolvendo em regiões rurais, semi- rurais e urbanas em recipientes artificiais como em latas de tinta e caixas d'água (Forattini et al., 1978; Forattini et al., 1997; Silva, 2002). O fato de esta espécie adaptar-se ao ambiente urbano a faz um potencial risco à saúde pública, já que apresenta competência vetorial para agentes etiológicos de arboviroses (Forattini, 2002) e filarioses (Labarthe et al., 1998) como: vírus do Melao, vírus da Febre Amarela, Ilhéus e encefalite Equina Venezuelana, além do vírus do Rocio (Spence et al., 1962; Arnell, 1976) e suspeita-se que este veicule também o verme *Wuchereria bancrofti*, (Forattini, 2002). Dentre estes agentes etiológicos, destaca-se a sua capacidade vetorial para o vírus Rocio, este é um vírus de RNA da família Flaviviridae e causa sintomas parecidos com os provocados pelo vírus da dengue: dor de cabeça, febre, dores pelo corpo e pode ocasionar a morte do paciente. Acredita-se que o mosquito *Ae. scapularis* foi o mais provável vetor do vírus Rocio no Vale do Ribeira, pois esta espécie foi a mais frequente encontrada no local, com alta antropofilia e além disso esta espécie apresenta competência vetorial comprovada em laboratório (Mitchell et al., 1986) Observou-se a partir de 1975, um aumento de casos de pessoas infectadas com o vírus do Rocio, esta condição teve continuidade nos anos seguintes, principalmente nos meses de alta pluviosidade, atingindo 13 municípios do Vale do Ribeira até o ano de 1978 (Iversson, 1977, 1980). Após o ano de 1978 os casos diminuíram consideravelmente, mas no ano 2000, Romano-Lieber et al. (2000) constataram em inquérito sorológico, a presença do arbovírus na população de alguns bairros do Vale do Ribeira. Este mosquito também apresenta a capacidade vetorial para a filária *Dirofilaria immitis*, parasita de cães (Guerrero et al., 1992a) e possivelmente veicula as larvas desta filária na baixada litorânea do Rio de Janeiro (Lourenço-de-Oliveira et al., 1998).

Durante o ano 2000 foi realizado por Vasconcelos et al 2001, um estudo de vigilância epidemiológica do vírus da Febre Amarela nos estados brasileiros: Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, São Paulo e Tocantins. Neste estudo foi encontrado um "pool" de *Aedes scapularis* infectado naturalmente com vírus da Febre Amarela no estado da Bahia. Além

destes agentes etiológicos citados é possível que este mosquito apresente capacidade vetorial para alguns outros flavivírus como o da Dengue e Zika, pois este mosquito ocorre em regiões de epidemia destes vírus (Costa da Silva et al., 2017).

Esta espécie além de apresentar capacidade e competência na veiculação dos diferentes agentes etiológicos citados, hoje também se sabe que este mosquito é genético e morfologicamente polimórfico. As implicações desta característica são explanadas a seguir.

Figura 1- *Aedes scapularis* fêmea. Foto: Morais (2008)



1.4 Importâncias do estudo de espécies polimórficas

Espécies com alto polimorfismo podem apresentar plasticidade em adaptação para novos ambientes e suas novas condições. Um exemplo de como o alto polimorfismo genético e a microevolução podem atuar na adaptação de espécies aos centros urbanos está no mosquito *Aedes aegypti*. Aquele mosquito apresenta um alto polimorfismo genético em relação a outras espécies exóticas (115 alelos e $F_{st} = 0.0358$) e foi observado que sua frequência alélica foi variável ao longo de 14 meses estudados. Esta rápida microevolução pode envolver caracteres não neutros e afetar a suscetibilidade desses mosquitos aos inseticidas e repelentes químicos facilitando sua habitação em áreas urbanizadas (Louise et al., 2015).

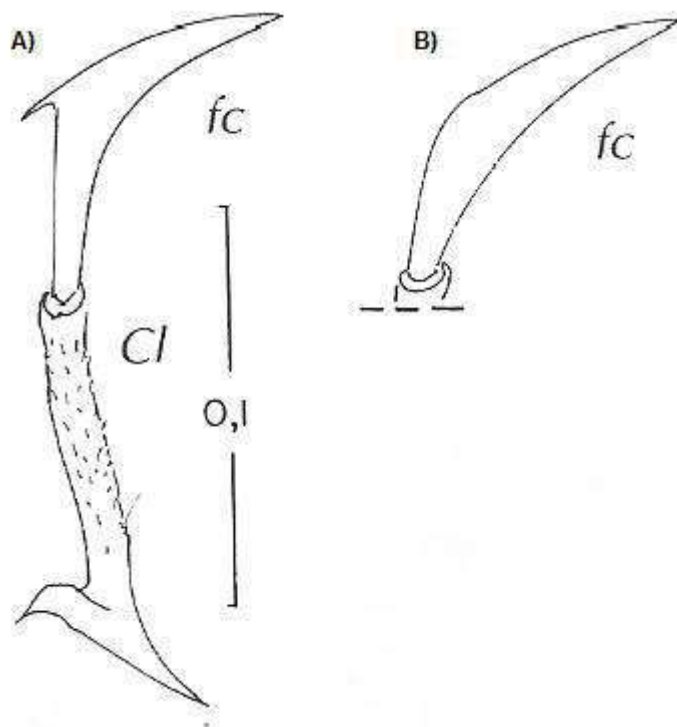
Espécies com potencial risco à adaptação e domiciliação devem ser pesquisadas, monitoradas e controladas para evitar a presença de mais um mosquito vetor urbanizado, como pode ser o caso do mosquito *Ae. scapularis*. Afinal este mosquito está atualmente em transição para o ambiente urbano e

este apresenta capacidade vetora, como já foi citado no item anterior (1.3), para várias arboviroses e filarioses.

1.5 Polimorfismo em *Aedes scapularis*

A espécie *Ae. scapularis* apresenta alto polimorfismo genético e morfológico. O primeiro trabalho voltado ao polimorfismo de *Ae. scapularis* foi desenvolvido por Arnell em estudo populacional deste mosquito realizado com em 1976, este autor encontrou diferenças no número de processos retrodirigidos (PRs) do filamento apical do gonocóxite (Figura 2) em um dos lados da genitália masculina (presença e ausência de PR) entre indivíduos de mesma população desta espécie e diferenças no tamanho da cobertura de escamas do escudo deste mosquito. Mais tarde, baseado nesses achados de Arnell, 1976, Forattini, 2002, sugeriu a hipótese de tal polimorfismo se tratar de complexo inicial de espécies em *Ae. scapularis*. Posteriormente, com base nos trabalhos de Arnell, 1976 e Forattini, 2002, foi desenvolvido durante trabalho de mestrado de Devicari, 2010 um estudo com populações do mosquito *Aedes scapularis*, na qual o objetivo era verificar a presença de complexo de espécie neste mosquito. Foram observadas neste estudo, variações interpopulacionais no formato alar e 21 haplótipos em apenas 48 indivíduos analisados. Equivalente polimorfismo genético e morfológico foi observado por Petersen, 2012, neste mosquito. Foram observados 46 haplótipos em apenas seis populações analisadas (TRE, ITA, PET, PAR e BUT) e ampla variação no formato alar nestas mesmas populações. No trabalho desenvolvido por Petersen et al. 2015 foi observado um alto polimorfismo e não foi encontrado indício de complexo de espécies nas populações analisadas. Para continuar a investigação da presença de complexo de espécies e polimorfismo, foram realizados 2 trabalhos narrados em 2 capítulos desta tese.

Figura 2: A) Processo retrodirigido do filamento do claspete da genitália masculina (Reproduzido de Forattini, 2002) de *Ac. scapularis*. B) Ausência do processo retrodirigido.



1.6 Adaptação do mosquito *Ae. scapularis* ao ambiente urbano

Espécies polimórficas podem apresentar plasticidade em adaptação para novos ambientes e podem passar a transmitir agentes etiológicos que antes não transmitiam. Atualmente o mosquito *Ae. scapularis* está em transição entre os ambientes silvestres, semi-silvestres ou rurais para as áreas urbanizadas como em locais intra e peri-domiciliares e parques, se reproduzindo em recipientes artificiais. Em estudo de levantamento de fauna culicidiana realizado no Parque Ecológico do Tietê e em sua área periurbana, a espécie *Aedes scapularis* foi a mais encontrada tanto na mata do parque quanto na região peridomiciliar aos arredores do parque (Taípe-Lagos et al; 2003). Durante um trabalho desenvolvido na cidade de São José do Rio Preto entre os anos de 2006 a 2007, a larva do mosquito *Aedes scapularis* foi a quarta espécie mais encontrada na região urbana do município (Dibo et al., 2011). Em pesquisa de vigilância entomológica com a finalidade de verificar a presença de vírus da Zika realizada em Aracaju no ano 2016, foram visitados 6 bairros e encontrados 2 exemplares intra-domiciliares de fêmeas de *Aedes scapularis* ingurgitadas com sangue humano em dois bairros urbanos (Costa-da-Silva et al., 2017). É importante estudar esta espécie que está se adaptando ao ambiente urbano, pois devido ao fato de ser bastante plástica a faz um potencial risco à saúde pública, como mencionado no item 1.3. Para a investigação de espécies de importância epidemiológica, usualmente utiliza-se uma combinação de marcadores biológicos genéticos e morfológicos. Entre os marcadores que podem ser empregados nestes estudos estão: Morfometria geométrica alar e os Genes Mitocondriais Codificadores de Proteínas.

1.7 Morfometria Geométrica

A técnica de morfometria geométrica alar foi proposta por Bookstein, 1997 e vem sendo cada vez mais empregada em estudos populacionais de mosquitos. A partir dos marcos anatômico da asa (localizados nas junções das nervuras alares) são tomadas as coordenadas posicionais e então é aplicada a sobreposição de procruste que corresponde a superposição das configurações dos marcos anatômicos. Após a sobreposição de procrustes é executada a estatística multivariada. Uma análise que pode ser empregada para a descrição da forma alar é a análise de componentes principais, esta é uma análise da matriz de covariância das amostras. Outra análise é a de Variáveis Canônicas que trata-se de uma análise discriminante que parte do princípio de grupos previamente identificados. Para a descrição do tamanho alar pode ser empregada a análise do tamanho dos centroides, este corresponde ao tamanho global da asa.

A técnica de morfometria geométrica alar pode ser utilizada como passo inicial para o estudo de complexo de espécies em mosquitos da Família Culicidae. Utilizando esta técnica foi possível distinguir 5 espécies pertencentes a um complexo no subgênero *Nyssorrhynchus*, na qual as fêmeas adultas deste subgênero são morfologicamente muito semelhantes (Calle et al., 2002). Estes mosquitos são considerados os principais vetores de plasmódios nos trópicos. Através da morfometria geométrica alar em estudo realizado por Lorenz et al. (2012), foi possível a discriminação de espécies pertencentes ao complexo de espécies crípticas: *Anopheles cruzii*, *An. bellator* e *An. homunculus*. Estas três espécies do gênero *Anopheles* são vetoras de plasmódio no Brasil. Estes mosquitos são morfologicamente muito semelhantes e podem ocorrer no mesmo habitat.

Além da discriminação de espécies a morfometria alar permite o estudo da caracterização intraespecífica do formato alar de mosquitos de diferentes populações, apresentando-se como um eficaz marcador de estruturação populacional. O conhecimento da estrutura populacional do mosquito vetor pode auxiliar em seu controle. Carvajal et al. (2016) em estudo com populações de *Ae. aegypti* em área metropolitana de Manila, verificaram estruturação populacional deste mosquito mesmo considerando populações de locais próximos. Krtinic et al. (2016) em estudo de variação fenotípica alar de populações de *Culex pipens* rurais e urbanos, encontrou estruturação populacional espacial.

Utilizando a morfometria geométrica é possível explorar as variações morfológicas alares entre as populações e espécies, na qual pode ser considerado um importante marcador biológico em estudos de estruturação e investigação de complexo de espécies.

1.8 DNA Mitocondrial

O DNA mitocondrial é circular e apresenta uma organização bastante simples, este é composto por 37 genes e uma região codificadora rica em A+T. Devido a algumas particularidades o DNA mitocondrial é muito empregado em estudos de estruturação populacional, pois os genes mitocondriais são

compartilhados por todas as espécies, raramente sofrem recombinação, apresentam altas taxas evolutivas e as suas taxas de substituições nucleotídicas são altas.

Até cerca de uma década atrás, somente parte do DNA mitocondrial era explorado em estudos populacionais. Poucos genes mitocondriais eram os mais empregados como marcadores biológicos devido ao seu polimorfismo, entre estes genes estavam: *COI*, *COII*, *NAD5* e *ND4* (Ashfaq et al., 2014; Zielk et al., 2015; Minard et al., 2017). O gene *COI* é um dos genes mais empregados em estudos populacionais e de variabilidade genética. Em estudo de estrutura populacional utilizando o gene *COI*, pode-se verificar as introduções populacionais de mosquitos vetores, estudo da filogenia das espécies de mosquitos, é possível estudar a dinâmica populacional e fluxo genético. Em estudo desenvolvido por Petersen et al. (2015), foi utilizado o gene *COI* para estudo de investigação de complexo de espécies em populações de *Ae. scapularis* e foi possível observar diferenças intra e inter populacionais neste gene em *Ae. scapularis* de cinco regiões de mata atlântica.

Atualmente, com o advento de novas tecnologias de sequenciamento genético, é mais fácil e rápido o sequenciamento de vários genes mitocondriais. A tecnologia de “Next-Generation Sequencing” (NGS) permite realizar de forma mais rápida e eficaz o sequenciamento dos 37 genes mitocondriais de forma mais barata e rápida que a método de Sanger. Utilizando dados mais robustos, como os 13 genes mitocondriais codificadores de proteínas é possível se obter informações mais completas para a resolução de filogenias, estudo de estrutura populacional e de variabilidade genética. Em estudo realizado com os 13 genes codificadores de proteínas foi possível verificar diferenças entre as espécies do complexo Coronator e foi possível observar que estas espécies são monofiléticas (Demari et al., 2015).

As diferenças genéticas populacionais que podem ser observadas no DNA mitocondrial, podem ser um indicativo ou um passo inicial para a investigação de complexo de espécies. Além disso, a investigação do polimorfismo nos mosquitos é importante principalmente se tratando de espécies vetoras de agentes etiológicos de doenças e que está em atual fase de adaptação ao ambiente urbano.

1.9 Trabalhos que nós desenvolvemos na investigação de complexo e polimorfismo em *Aedes scapularis*

No capítulo 1 foram conduzidas análises investigativas de complexo de espécies e polimorfismo morfológico e molecular em *Aedes scapularis*. O capítulo 1 foi uma continuação do estudo iniciado no mestrado de Petersen, 2012 e no mestrado Devicari, 2010 que deu origem a um artigo publicado no periódico científico *Parasites & Vectors*, neste trabalho presente no Anexo A (Petersen et al., 2015) desta tese. Neste trabalho foi observado um alto polimorfismo genético no mosquito *Ae. scapularis*, contudo não foram encontradas evidências de complexo de espécies, tanto nas análises de Morfometria geométrica (MG) da asa e no gene Citocromo Oxidase Subunidade I (*COI*). No capítulo 1 ampliamos as áreas de coleta do mosquito *Aedes scapularis*, que anteriormente foram apenas realizadas em Mata Atlântica. As amostras foram então coletadas em bioma de Caatinga (Poço

Redondo-SE) e em Região Amazônica (Ananindeua-PA). Além das áreas ampliadas foram amplificados 37 genes mitocondriais dos mosquitos deste estudo e empregados o gene *COI* e a técnica de MG como marcadores biológicos.

O Capítulo 2 consta de um resumo técnico dos procedimentos utilizados na análise e montagem de 37 genes do DNA mitocondrial de 19 indivíduos da espécie *Aedes scapularis* e de como foi realizada a “filtragem” do DNA de alguns mosquitos em relação ao DNA amplificado do animal picado. O procedimento de montagem foi realizado para o estudo de polimorfismo e investigação de espécies de complexo conduzido no capítulo 1.

1.10 Trabalhos complementares realizados – Anexos

Ao final desta tese são apresentados 3 publicações científicas (anexos 1-3) de minha autoria, que complementam minhas atividades acadêmicas acerca do tema “culicídeos”. No Anexo 1 consta de um artigo desenvolvido durante meu doutorado no ano de 2015, publicado na revista científica *Parasites & Vectors*. O artigo denominado “High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses” apresentou como objetivo a investigação de complexo de espécie e polimorfismo em *Aedes scapularis*.

No Anexo 2 está o artigo “Assessment of the correlation between wing size and body weight in captive *Culex quinquefasciatus*” que também foi feito durante meu doutorado e publicado no periódico científico *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* no ano de 2016. Este artigo versa sobre a investigação da correlação entre o tamanho da asa em relação ao peso seco de mosquitos adultos, para tal objetivo foi utilizado o mosquito *Culex quinquefasciatus* como modelo. O uso do valor do tamanho da asa no lugar do peso seco, como uma das formas para se avaliar o fitness do mosquito adulto pode facilitar na manutenção diária da colônia.

Para investigar a hipótese levantada a respeito da ocorrência de complexo de espécie em *Aedes scapularis*, devido ao polimorfismo do processo retrodirigido na genitália masculina encontrado por Arnell em 1976 foi desenvolvido durante o meu doutorado, um trabalho contido no Anexo 3 desta tese. Este trabalho foi submetido e aceito no periódico “*Bulletin Entomological Research*” e apresenta a seguinte denominação: Polymorphism in male genitalia of *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* Rondani, 1848.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar a possível existência de complexo de espécies em *Aedes scapularis* e seu polimorfismo genético e morfológico em diferentes populações coletadas nos municípios: Poço Redondo-SE, Ananindeua-PA, São Paulo-SP, Tremembé-SP, Itaboraí-RJ e Pariquera- Açu-SP.

2.2 Objetivos específicos:

- Montar o genoma mitocondrial da espécie *Aedes scapularis* com base em 37 genes que sequenciamos.
- Investigar se as amostras populacionais dos Biomas brasileiros de Caatinga e região de Mata Amazônica apresentam padrões de polimorfismo semelhantes às populações antes estudadas em biomas de Mata Atlântica;
- Caracterização populacional utilizando os marcadores biológicos: Morfometria Geométrica, gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I e DNA mitocondrial completo.
- Verificar se existem outras espécies sob o nome *Ae. scapularis* em outras regiões do Brasil.

REFERÊNCIAS*

Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIII. A revision of the *scapularis* group of *Aedes* (*Ochlerotatus*). Contrib. Amer. Entomol. Inst. 1976; 13: 1-144. [http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032011000200016]

Ashfaq M, Hebert PD, Mirza JH, Khan AM, Zafar Y, Mirza MS. Analyzing mosquito (Diptera: Culicidae) diversity in Pakistan by DNA barcoding. PLoS One. 2009; 9: 1-12. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097268]

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

Calle D, Quiñones ML, Erazo H, Jaramillo N. Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. Mem Inst Osw Cruz. 2002; 97: 1191-5. [http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000800021].

Carvajal TM, Hernandez LFT, Ho HT, Cuenca MG, Orantia BMC, Estrada CR, Watanabe K. Spatial analysis of wing geometry in dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), populations in Metropolitan Manila, Philippines. J Vec Borne Dis. 2016; 53: 127-135. [10.1371/journal.pntd.0003027].

Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Petersen V, Viana AF, Cunha MP, Wiley M, Ladner J, Prieto K, Palacios G, Costa D, Suesdek L, Zanotto PMA, Capurro ML. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11: 1-1. [https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005630]

Demari-Silva B, Suesdek L, Sallum MAM, Marrelli MT. Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. P&V. 2014; 7: 174-83. [DOI: 10.1186/1756-3305-7-174]

Devicari M. caracterização populacional de *Aedes scapularis* (Diptera; Culicidae): aspectos moleculares e morfológicos. 2010. 65p

Dibo, MR, Menezes, RMTD, Ghirardelli, CP, Mendonça, AL, Chiaravalloti-Neto, F. Presença de culicídeos em município de porte médio do Estado de São Paulo e risco de ocorrência de febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. Rev Soc Bras Med Trop. 2011; 4: 496-503. [http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011000400019].

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Forattini, OP, Gomes A.C, Galati, EAB Rabello, EX Iversson, LB. Estudos ecológicos sobre mosquitos Culicidae no Sistema da Serra do Mar, Brasil: 2 - Observações no ambiente domiciliar. Rev Saúde Pública. 1978; 12: 476–96. [<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101978000400008>]

Forattini OP: Culicidologia Médica: Identificação, biologia, epidemiologia. Vol 3. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2002; 549p.

Guerrero J, Ducos H, Genchi C, Rojo F, Gomez-Bautista M, Varela MC, Labarthe N, Bordin E, Gonzales G, Mancebo O, Patino F, Uribe LF, Samano R. Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from Southern Europe and Latin America. In Proceedings of the Heartworm Symposium. 1992; 92: 31-7. [[10.1186/s13071-014-0493-7](http://dx.doi.org/10.1186/s13071-014-0493-7)]

Iversson LB. Epidemia de encefalite por arbovírus na região sul do Estado de São Paulo, Brasil, em 1975 e 1976. Aspectos da distribuição cronológica e geográfica dos casos. Rev Saúde Pública. 1997; 11: 375-88. [<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101977000300009>]

Iversson LB. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovírus na Região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. Rev Saúde Pública. 1980; 14:9-35. [<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101980000100002>]

Labarthe N, Serrão LM, Melo YF, Oliveira SJ, Oliveira RLO. Potential Vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, Oceanic Region of Niterói Municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Instituto Oswaldo Cruz. 1998; 4:425-32. [<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000400001>]

Krtinić B, Francuski L, Ludoški J, Milankov V. Integrative approach revealed contrasting pattern of spatial structuring within urban and rural biotypes of *Culex pipiens*. J Appl Ent. 2016; 140: 757-74. [[10.1111/jen.12307](http://dx.doi.org/10.1111/jen.12307)]

Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. P&V. 2012; 5: 257-264.

Louise C, Vidal PO, Suesdek L. Microevolution of *Aedes aegypti*. PloS one, 2015; 10:1-16. [<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137851>]

Lorenz C, Suesdek L. Evaluation of chemical preparation on insect wing shape for geometric morphometrics. Am J Trop Med Hyg. 2013; 89:928–31. [[10.4269/ajtmh.13-0359](http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.13-0359)]

Lourenço-de-Oliveira R, Deane LM. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro,

Brazil. Memórias Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90: 387–88. [10.1590/S0074-02761995000300013]

Minard G, Tran FH., Melaun, C., Klimpel, S., Koch, L. K., Kim, K. L. H., ... & Moro, C. V. (2017). Identification of sympatric cryptic species of *Aedes albopictus* subgroup in Vietnam: new perspectives in phyllosymbiosis of insect vector. 2017. P & V; 10: 276. [10.1186/s13071-017-2202-9]

Mitchell CJ, Forattini OP, Miller BR. Vector competence experiments with rocio virus and tree mosquito species from the epidemiologic zones in Brazil. Rev Saúde Pública. 1986; 20:171-27. [http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101986000300001]

Petersen V. Caracterização de três populações de *Ochlerotatus scapularis* (Rondani, 1848) do eixo Rio de Janeiro-São Paulo, utilizando marcadores genéticos e morfológicos. 2012. 63p.

Petersen V, Devicadi M, Suesdek, R. High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses. P&V 2015; 8: 128-37. [10.1186/s13071-015-0740-6]

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of *Ochlerotatus* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. Zool J Linnean Soc. 2008; 153: 29-114. [10.1111/j.1096-3642.2008.00382.x]

Silva AM, Menezes RMT. Occurrence of *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) in artificial breeding area of Southern Brazil. Rev Saúde Pública. 1996; 30: 103–04. [http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101996000100014]

Spence L, Anderson CR, Aitken THG, Downs WG. Melao Virus, a New Agent Isolated from Trinidadian Mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 1992; 11: 687–90. [https://doi.org/10.4269/ajtmh.1962.11.687]

Taípe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. Rev Saude Pub. 2003; 37: 275-9. [http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102003000300002]

Wilkerson RC, Linton YM, Fonseca DM, Schultz TR, Price DC, Strickman DA Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. PLoS One. 2015; 10: 1-26. [http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0133602]

Zielke DE, Ibáñez-Justicia A, Kalan K, Merdić E, Kampen H, Werner D. Recently discovered *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) populations in The Netherlands and northern Germany resulted from a new introduction event and from a split from an existing population. P&V. 2015; 8: 1-9.[10.1186/s13071-015-0648-1]

3 CAPÍTULO 1- POLIMORFISMOS EM *Aedes scapularis*: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA DO VETOR DE FILÁRIAS E ARBOVÍRUS

Neste trabalho foi dada continuidade à investigação de complexo de espécies e ao estudo de polimorfismo em *Aedes scapularis*, iniciados por Petersen, 2012. Para realizar tal objetivo, foram estudados espécimes das regiões da Caatinga, Mata Amazônica e Mata Atlântica. Foram utilizados como marcadores biológicos: o DNA mitocondrial completo de 18 indivíduos, o gene mitocondrial isolado Citocromo Oxidase Subunidade I e Morfometria geométrica alar. Neste estudo, foram analisadas as populações coletadas no norte brasileiro durante o doutorado de Petersen 2017, nas cidades de Poço Redondo-SE (Caatinga), Ananindeua-PA (região de Mata Amazônica), como também foram reanalisados em novo contexto indivíduos de regiões de Mata Atlântica anteriormente coletados durante o mestrado de Petersen 2012 e no mestrado de Devicari, 2010 (mais detalhes olhar Apêndice 1) em: Tremembé-SP (população TRE), São Paulo-SP (populações BUT e PET), Pariquera- Açu (População PAR), Itaboraí-RJ (ITA-RJ).

Polimorfismos em *Aedes scapularis*: Caracterização genética e morfológica do vetor de filárias e arbovírus

Vivian Petersen^{1,2} (vivianpetersen@usp.br), Lincoln Suesdek^{1,2,3} (lincoln.suesdek@butantan.gov.br).

1. Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan. Av. Vital Brazil - 1500, São Paulo, SP, Brazil - 05503-000.

2. Programa de Pós-Graduação Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes - 2415, São Paulo, SP, Brasil - 05508-900.

3. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar - 470, São Paulo, SP, Brasil - 05403-000.

3.1 Introdução

O mosquito *Aedes scapularis* é amplamente distribuído pelas regiões das Américas, principalmente na América do Sul. Esta espécie apresenta capacidade vetora para uma série de agentes etiológicos de arboviroses e filarioses como: vírus do Melao, Ilhéus, encefalite Equina Venezuelana, vírus Rocio e da Febre Amarela. Este mosquito foi o provável vetor principal do vírus Rocio durante a década de 1970 no vale do Ribeira, vírus este causador de encefalite que levou muitas pessoas a morte e deixou muitos pacientes sequelados. Durante o ano 2000 foi realizado por Vasconcelos et al. (2001), um estudo de vigilância epidemiológica do vírus da Febre Amarela nos estados brasileiros: Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, São Paulo e Tocantins. Naquele estudo foi encontrado um “pool” de *Aedes scapularis* infectado naturalmente com vírus da Febre Amarela no Estado da Bahia.

A espécie *Aedes scapularis* é genética e morfológicamente polimórfica (Petersen et al., 2015), e em princípio, espécies polimórficas podem se adaptar mais facilmente a novos ambientes. Este fato está ocorrendo com esse culicídeo, pois esta espécie era considerada rural e silvestre, contudo atualmente está em transição destes ambientes para os urbanos, no interior das casas e em parques de grandes regiões metropolitanas (Taípe-Lagos e Natal; 2003; Dibo et al., 2011). Esta transição para o ambiente urbano pode ser um problema a saúde pública, pois esta espécie pode passar a vetorizar agentes etiológicos de arboviroses e filarioses nas cidades. Além disso, existe a possibilidade teórica de este mosquito ser ou vir a ser vetor secundário do vírus Zika, já que *Ae. scapularis* está cada vez mais presente em regiões urbanas com epidemia da febre do Zika e o vírus causador desta doença é filogeneticamente próximo ao vírus Rocio (Hayes, 2009; Ashraf et al., 2015). Além de esta espécie apresentar capacidade vetora para vários agentes etiológicos e estar cada vez mais presente em ambiente urbano, outro fator que reforça a necessidade de investigação do mosquito *Aedes scapularis* é o alto polimorfismo desta espécie e a hipótese de este táxon ser um complexo de

espécies como foi indagado em outros estudos (Forattini, 2002, Petersen et al., 2015), ainda não foi descartada.

Para proceder estudo de estruturação populacional e investigação de complexo de espécies em mosquitos podem ser empregados marcadores morfológicos e genéticos. Um dos marcadores moleculares mais utilizados atualmente em estudos de investigação de complexo são os genes mitocondriais, já em estudos morfológicos a Morfometria geométrica (MG) alar está cada dia mais empregada, devido a sua eficácia e baixo custo. Atualmente devido ao barateamento, aumento de acessibilidade e robustez dos dados gerados, o estudo do DNA mitocondrial completo está cada vez mais comum. O DNA mitocondrial é muito empregado em estudos de diversidade genética, estruturação populacional, investigação de complexo de espécies e estudos filogenéticos em mosquitos. Este é um marcador muito utilizado nestes estudos, pois apresenta características como: rápida evolução, riqueza de informações e falta de recombinação, é de herança exclusivamente materna (Harrison, 1989; Avise, 2004). A MG é uma técnica que utiliza de marcos anatômicos para a tomada de coordenadas posicionais e através de testes de estatística multivariada podem ser avaliadas comparativamente as variações da forma e do tamanho isométrico das asas.

Com base nos resultados obtidos em estudos populacionais anteriores em *Aedes scapularis*, nos quais foi descoberto o alto polimorfismo neste mosquito e como ainda existem suspeitas da presença de complexo de espécies, propomos então no presente estudo, continuar o que foi iniciado no mestrado de Petersen, 2012, ou seja, a investigação de polimorfismo e complexo de espécies no mosquito *Aedes scapularis*. No presente trabalho então levantamos as seguintes perguntas: A espécie *Aedes scapularis* é igualmente polimórfica em outros biomas diferentes da Mata Atlântica? Outros biomas podem albergar outras espécies sob o suposto complexo *Aedes scapularis*? Para responder essas perguntas foram empregados os seguintes marcadores: gene mitocondrial *COI*, DNA mitocondrial completo e a MG. Além destes marcadores moleculares e morfológicos, também ampliamos os locais de estudo para bioma de Caatinga e de área de Mata Amazônica, tais locais foram escolhidos não apenas pela relevância epidemiológica, mas também porque são representativos de biomas diferentes (Amazônia e Caatinga) daquele já amostrados por trabalhos anteriores (Petersen et al., 2015; Devicari 2010) (Mata Atlântica) (Anexo A e C). Ampliando a área de coleta e utilizando novos marcadores moleculares pretendemos responder às novas perguntas levantadas a respeito da espécie *Aedes scapularis*.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Coletas dos espécimes

Neste trabalho, foram coletados mosquitos adultos fêmeas com o auxílio de aspiradores entomológicos. Estes mosquitos após sua coleta foram eutanasiados em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, após este processo foi retirada a asas dos indivíduos coletados para a realização da técnica de morfometria geométrica alar. Depois da retirada das asas, os mesmos indivíduos foram mantidos em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração de DNA para a amplificação dos genes mitocondriais. Os locais de coleta foram: Ananindeua-PA (ANA), Poço Redondo-SE (PRE) e São Paulo-SP no horto do Instituto Butantan (BUT) (Figura 1 e Tabela 1). Juntamente a estes indivíduos coletados durante o doutorado de Petersen 2017, foram analisados indivíduos anteriormente coletados durante o mestrado de Petersen 2012 ou do mestrado de Devicari, 2010 nas cidades (mais detalhes no Apêndice 1): Tremembé-SP (população TRE), Itaboraí-RJ (população ITA), São Paulo (populações BUT e PET) e Parquera- Açu (população PAR).

3.2.2 Análise morfométrica das asas

Para a avaliação das análises referentes aos dados de Morfometria alar, usamos as asas direitas dos mosquitos. Os métodos de morfometria geométrica seguiram de forma semelhante aos empregados por Vidal et al. (2012) e Petersen V, 2015. As asas após remoção das escamas foram montadas com bálsamo do Canadá entre lâmina-lamínula para análise morfométrica. Imagens dessas asas foram capturadas através de câmera digital acoplada a um microscópio estereoscópico Leica S6. Foram analisadas ao menos 30 fêmeas de cada população a ser comparada. Sobre essas imagens, e com o auxílio do "software" TpsDig V.1.40 (QSC - James Rohlf), foram tomadas as coordenadas posicionais de cada um dos 18 pontos anatômicos sobre um plano cartesiano. Sobre esse dados foram computados os tamanhos dos centróides e os "relative warps" que são os componentes principais de forma, com o auxílio dos programas de computador TpsUtil 1.29, TpsRelw 1.39 (James Rohlf) e Statistica 11 (StatSoft). Os testes estatísticos empregados foram ANOVA para tamanho e análise discriminante e disparidade métrica para forma. Para a montagem do fenograma de similaridade morfológica utilizamos como grupo externo, uma população de *Aedes aegypti* coletada no município de São Paulo.

A diversidade morfológica foi estimada utilizando a "quantidade de dispersão" dos indivíduos no morfoespaço das CPs. Essa dispersão foi calculada de forma semelhante à Petersen et al. (2015): pontos no morfoespaço de CPs (cada um correspondendo a um único mosquito) foram digitalizadas utilizando software TpsDig (como realizado para as asas), a fim de registrar as suas coordenadas de posição em um plano cartesiano imaginário. O tamanho do centróide de um conjunto de indivíduos (a população) foi calculado usando software TpsRelW. Tal tamanho do centróide foi então considerado como um indicador da diversidade morfológica (DM) de uma população. Para a realização das análises de formato e tamanho alar foram

utilizadas populações coletadas em Tremembé (TRE), Itaboraí (ITA), São Paulo com duas populações (BUT e PET) e em Pariquera-Açu, estas populações foram anteriormente trabalhadas no mestrado de Petersen 2012 e no mestrado de Devicari, 2010 (para mais detalhes olhar apêndice 1).

3.2.3 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de cada indivíduo utilizando o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, California, USA), seguindo o protocolo do produto. Foram extraídos o DNA de indivíduos das populações ANA, PRE, BUT e ITA para as análises de DNA mitocondrial completo (19 indivíduos), amplificação de uma região do gene 16S com cerca de 500 pb (19 indivíduos) e amplificação do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (*COI*) (42 indivíduos), mais detalhes na Tabela 1- Os genes *COI* e região do gene 16S foram amplificados por Sanger separadamente do DNA mitocondrial completo amplificado em “Long- Range PCR”. O gene *COI* foi amplificado separadamente por Sanger para a obtenção de maior número de indivíduos com este gene amplificado, para as análises de estruturação populacional. Uma região de cerca de 500 pb do gene 16S foi amplificada separadamente para completar este gene também amplificado por “Long- Range PCR”, porém com uma região incompleta, pois para a amplificação dos genes mitocondriais totais em “Long- Range PCR” são utilizados primers palindrômicos que se iniciam no gene 16 S. Foram amplificados o DNA mitocondrial total de 19 indivíduos para chegar a suficiência amostral a fim de ser respondida a hipótese de ocorrência de complexo de espécies em *Aedes scapularis*.

3.2.4 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene Citocromo Oxidase Subunidade I

Os primers utilizados na amplificação do gene codificante para a enzima Citocromo Oxidase Subunidade I, são universais (LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' para a fita *forward* e HC02198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3' para a fita *reverse*) e foram publicados por Folmer et al. (1994) e empregados em Petersen et al. (2015). As reações de PCR para *COI* foram realizadas segundo as linhas gerais de Sambrook & Russell 2006. Foi utilizada uma reação contendo volume final de 25 µl: foi adicionado o tampão para PCR 10 X (Invitrogen), 3 mM de MgCl₂ (25 mM) (Invitrogen), 0,4 mM dNTP (25 mM) (KapaBiosystems), 10 pmol de cada primer, 0,5 U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl) (Invitrogen) e 1 a 2 µl de amostra do DNA extraído (cerca de 1/20 µl do total extraído de um único espécime).

O ciclo de amplificação constituiu em: Temperatura inicial de 94 °C por 3 min, seguidos de 40 ciclos 1 min de 94 °C, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, com um ciclo de extensão final de 72 °C por 7 min por 40 ciclos. A amplificação foi checada por meio de eletroforese de gel agarose 1%. O produto da pcr foi purificado, utilizando o kit de purificação DNA PureLink® PCR Purification kit (Invitrogen, California, USA). A reação de sequenciamento foi utilizado 2 µl de BigDye, 1 µl de tampão 5X, 5 µM de primer e 40 ng de produto de PCR

purificado. A reação de sequenciamento ocorreu da seguinte forma: 96 °C por 1 min, 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 min.

O sequenciamento para os genes *COI* foi realizado em sequenciador automático ABI 3730, segundo protocolo padronizado pelo “Centro Genoma Humano da Universidade de São Paulo”.

3.2.5 Amplificação e sequenciamento do DNA mitocondrial completo

Para uma reação final de 50 µL (Oliveira et al., 2016) de “Long- Range PCR” adicionou-se 25 µl de GoTaq Long PCR Master Mix 2 x, 1,5 µM de cada primer (HPK16Saa e HPK16Sbb), 1-2 µl de DNA extraído e 50 µl de água Milli-Q®. Foram utilizados os seguintes primers degenerados e palindrômicos, com as sequências: HPK16Saa 5' ATG CTA CCT TTG CAC RGT CAA GAT ACY GCG GC 3' (Primer Forward) e HPK16Sbb 5' CTT ATC GAY AAA AAA GWT TGC GAC CTC GAT GTT G 3' (Primer Reverse), estes primers foram desenvolvidos por Hwang et al. (2001). Para a amplificação do DNA foram utilizadas as seguintes condições: 94 °C por 2 min, 94 °C por 15 seg, 65 °C por 15 min em 10 ciclos, 94 °C por 15 seg, 65 °C por 15 min, 65 °C por 10 seg em 20 ciclos e 72 °C por 10 min.

As próximas etapas para a extensão e sequenciamento, foram realizadas pela empresa “Genotyping” Botucatu, São Paulo que foi contratada especificamente para tal. Nesta empresa foram realizadas as seguintes atividades: **a) Quantificação do DNA total:** nesta etapa foi utilizado o kit “Qubit® dsDNA BR Assay Kit em equipamento Qubit 2.0 Fluorometer; **b) Tagmentação;** **c) Amplificação da PCR:** Nesta etapa foi realizada a seguinte ciclagem para termociclador: o estágio 1 foi de 72 °C por 3min, nos estágios a seguir foram realizados 12 ciclos. O estágio 2 foi de 95 °C por 30 s, estágio 3 foi de 95 °C por 10 s, estágio 4 foi de 55 °C por 30 s e o estágio 5 foi de 72 °C por 30 s. O estágio 6 foi de 72 °C por 5 min, no estágio 7 foi 10 °C. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems); **d) Quantificação do DNA por PCR Real Time:** o reagente utilizado foi KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit-Illumina/Universal); **e) Aplicação da biblioteca de amostra no MiSeq.** A cobertura da leitura das amostras variou de 30,4 a 71,8 hits.

3.2.6 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S

Os primers utilizados na amplificação do gene 16s foram (Kambhampati et al., 1995): 16SB: 5'-CCGGTT GAACTCAGATCA-3' para a fita *forward* e 16SA: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' para a fita *reverse*. Para a amplificação do gene 16S do DNA mitocondrial foi utilizado uma reação final de 25 µl: foi adicionado o tampão para PCR 1X (Invitrogen), 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen), 0,5 µl dNTP (10 mM) (KapaBiosystems), 0,25 µl de cada primer (10 µM), 0,125 µl de Platinum® Taq DNA Polymerase (5U /µl) (Invitrogen) e 1 µl do DNA extraído (1:20). O ciclo de amplificação constituiu em: Temperatura inicial de 95 °C por 3 min, seguidos de 10 ciclos 30 s de 94 °C, 40 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, seguido de mais 24 ciclos de 95 °C por 30

s, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, mais 72 °C por 7 min. A amplificação foi checada com eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989).

Uma alíquota de cada material amplificado foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE (0,04 M Tris; 0,05 M acetato de sódio; 0,01 M EDTA pH 8,0). A visualização do gel e dos dados para documentação foram efetuados no programa LabWorks do sistema de captura de imagens (Image Acquisition and Analysis Software) da UVP, Inc., CA, USA.

O excesso de iniciadores, dNTP e os sais presentes nos produtos da PCR foram eliminados por precipitação com soluções de PEG/NaCl (20% polietilenoglicol 8000 (PEG)/ 2,5 M NaCl). Para isso foi adicionado aos tubos contendo os produtos amplificados volume igual de solução de PEG/ NaCl, permanecendo a mistura em incubação por 15 min a 37 °C. Ao final deste período o material foi centrifugado a 13200 rpm, por 15 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes por centrifugação a 13200 rpm por 10 min a 4 °C, com etanol 80%. O etanol residual foi eliminado por evaporação, o DNA foi dissolvido em 20 µl de H₂O deionizada livre de nucleases e em seguida quantificado por análise eletroforética em gel de agarose 1,5%. Foi utilizado como referência, o marcador “Low mass DNA™ Ladder” (Invitrogen).

As sequências nucleotídicas de cada região de estudo foram determinadas diretamente dos produtos amplificados, após purificação com solução de PEG/NaCl, empregou-se os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR. Para uma reação final de 10 µl adicionou-se: 2 µl de tampão 5 X Sequencing, 3,6 pmol do primer (*forward* ou *reverse*), 0,25-0,5 µl de Big Dye, 10-50 ng de DNA e água ultra pura.

As condições para esta reação foram as seguintes: 96 °C por 15 seg, 50 °C por 15 seg e 60 °C por 4 min, em 25 ciclos. Após o término da reação, os produtos de sequenciamento foram armazenados a -20 °C ou imediatamente submetidos à etapa de purificação efetuada por cromatografia de gel filtração em colunas de Sephadex® G50. As micro-colunas de Sephadex® G50 (Medium size, GE-Healthcare-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) empregadas na purificação dos produtos pós-sequenciamento foram preparados no laboratório. Para isto, 1g de Sephadex G-50 foi hidratada com 15 ml de água deionizada e mantida em repouso por 4 horas. Após este período o sobrenadante foi removido, adicionou-se novamente 15 ml de água deionizada, permanecendo a resina em repouso por no mínimo 4 horas. Cerca de 700 µl de resina hidratada foram transferidas para microcolunas apoiadas em tubos de 1,5 ml. A água intersticial foi eliminada por centrifugação por 2 min a 3000 rpm e à temperatura ambiente. Em seguida, as reações de sequenciamento foram aplicadas no topo das colunas e foram centrifugadas à temperatura ambiente por 2 min a 3000 rpm. Em seguida, os produtos foram secos em concentrador a vácuo por 5 min a 60 °C e armazenados a -20 °C por no máximo 7 dias ao abrigo da luz. As análises eletroforéticas foram realizadas no sequenciador ABI Prism 3130 pela empresa Genomic, São Paulo-SP.

3.2.7 Análise estatística do gene COI

As sequências do gene COI foram alinhadas mediante uso do software ChromasPro 2.4. O número de haplótipos e sua diversidade foram estimados através do software DNAsp 5.0. Foram construídas redes de haplótipos para COI utilizando o modelo de parcimônia no software TCS 1.21. Para as análises do gene COI foram utilizadas também as amostras anteriormente coletadas em Tremembé (TRE), Itaboraí (ITA), São Paulo com duas populações (BUT) e (PET) e Pariquera-Açu (PAR), estas amostras foram anteriormente trabalhadas no meu mestrado ou no da Devicari M e estão depositadas no GenBank com número de acesso Genbank PopSet KM115416.1-KM115467.1 (Figura 1 e tabela 1).

Figura 1- Mapa das amostras coletadas no Brasil: Ananindeua, Itaboraí, São Paulo, Pariquera-Açu e Tremembé.

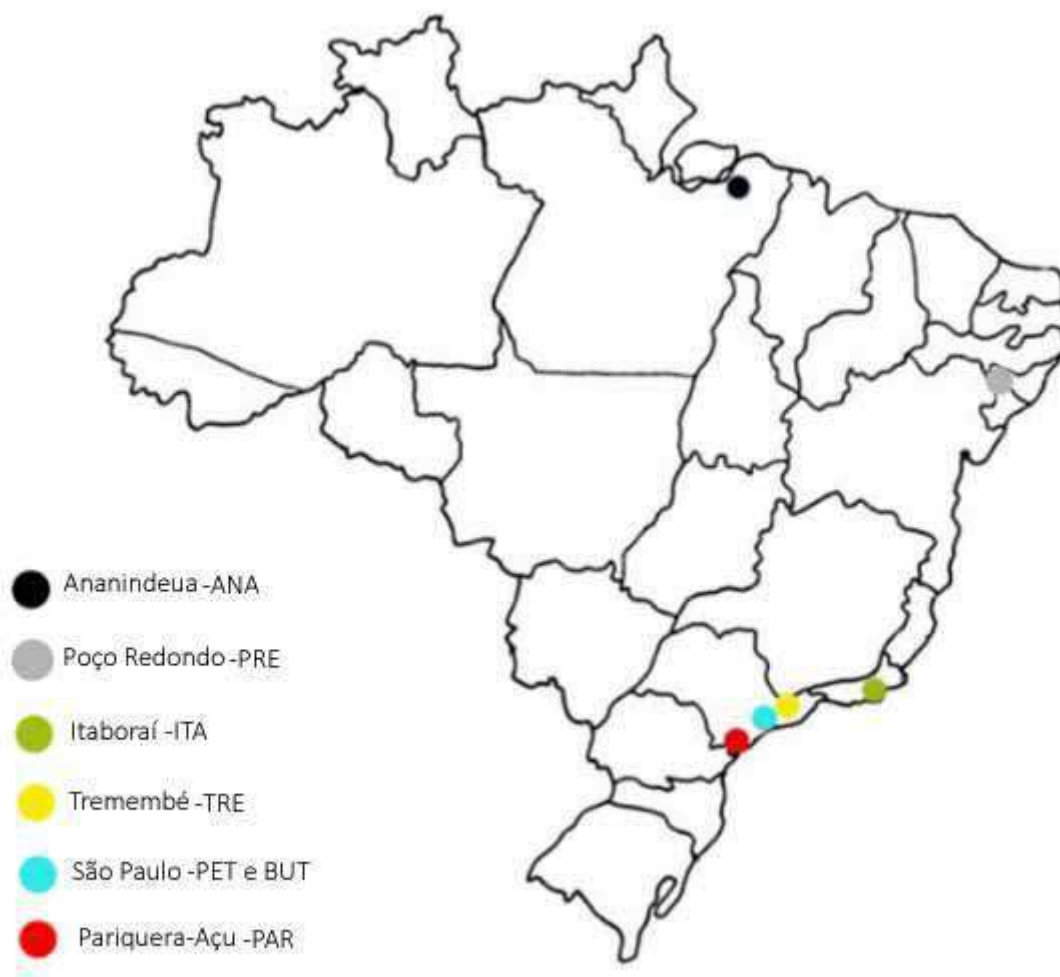


Tabela 1- Dados das amostras coletadas em diferentes cidades do Brasil: São Paulo, Itaboraí, Pariquera-Açu, Poço Redondo e Tremembé. *Amostras coletadas durante o mestrado de Devicari, 2010 ou Petersen 2012 (mais detalhes no Apêndice 1)

Identificação da Amostra	Município	Localidade	Número das amostras (COI)	Número das amostras (morfometria)	Número das amostras mtDNA completo	Coordenadas geográficas
ANA*	Ananindeua	Parque do Instituto Evandro Chagas	14	33	04	1 ^o 21'59"S 48 ^o 22'20"O
BUT*	São Paulo	Horto do Instituto Butantan	10	39	06	23°32'44" S 46°43'39" O
PET*	São Paulo	Parque Ecológico do Tietê	34	29	-	23° 29'15"S 46° 31'90"O
ITA*	Itaboraí	Pasto	36	30	05	22°44'51" S 42° 51' 21"O
PAR*	Pariquera-Açu	Fazenda Experimental	21	25	-	24°42' 37"S 47°53' 2"O
PRE*	Poço Redondo	Grotão do angico	18	28	04	64 ^o 44"67'S 89 ^o 33" 45'O
TRE*	Tremembé	Periferia da Cidade	29	30	-	22°57'12" S 45°32'28" O

3.2.8 Montagem e anotação dos genes mitocondriais

As sequências de DNA mitocondrial foram montadas utilizando o software Mira 4 e MITObim Assembly (mais detalhes no Capítulo 2). Para conferir a qualidade das sequências montadas, estas foram visualizadas no software Tablet. Os genes mitocondriais foram anotados em software online MITOs Web Service. Os genes codificadores de proteínas (GCPs) foram verificados nos softwares Wise2 e ExpASy.

Para realizar a estimativa do tamanho total dos genes mitocondriais codificadores de proteínas, para os genes que não foram montadas as regiões de codificação do aminoácido inicial e aminoácido de finalização, foi realizado uma comparação do gene incompletos do mosquito *Aedes scapularis* com os GCPs de mosquitos similares a estes previamente montados e depositados no Genbank. Para realizar esta comparação dos GCPs incompletos de *Aedes scapularis*, a fim de se estimar seu tamanho total, os GCPs incompletos deste mosquito foram alinhados com os GCPs completos das espécies: *Aedes aegypti* (EU352212.1), *Aedes vigilax* (KP995260.1), *Aedes albopictus* (AY072044.1) e *Haemagogus janthinomys* (KT372555.1).

3.2.9 Análise das sequências de DNA mitocondrial completo

Para o alinhamento das sequências de DNA mitocondrial, foi utilizado o software e avaliação da composição nucleotídica e de aminoácidos MEGA 7 (Tamura et al., 2013). Para traduzir as sequências GCPs em sequências de aminoácidos foi utilizado o software online ExpASy. A riqueza nucleotídica (p) e haplotípica foram estimadas no software DNAsp 5 (Librado, Rozas, 2009). Para estimar o melhor modelo de substituição nucleotídica para cada gene, foi utilizado o software JModeltest 2.1.1 utilizando o “Critério de Informação Akaike” para a construção da árvore filogenética com todos os GCPs foi utilizado o método Bayesiano no software Mr Bayes 3.2.6 e o grupo de dados foi particionado por genes de acordo com sua proteína codificante, sendo realizada uma corrida de 10.000.00 de gerações. Como grupo externo para a construção desta árvore filogenética dos GCPs, foram utilizados os genes dos mosquitos depositados no GenBank: *Culex quinquefasciatus* (GU188856.2), *Haemagogus janthinomys* (KT372555.1), *Aedes albopictus* (KR068634.1), *Aedes aegypti* (EU352212.1) e *Aedes vigilax* (KP995260.1). Também foram selecionados alguns genes para a montagem de “genes tree” baseado em: número de haplótipos, riqueza haplotípica e as mutações não sinônimas. Os valores abaixo de 50 de probabilidade posterior não foram amostrados nas arvores filogenéticas dos GCPs e das “genes tree” construídas pelo método Bayesiano.

Para calcular a razão de substituições sinônimas e não sinônimas dos genes codificantes de proteínas, foi utilizado o software calculador KaKs (modificado por Yang-Nielsen). Foi considerado para a estimativa de genes sob seleção negativa (seleção purificadora) a razão $dN/dS < 1$, para a para a estimativa de seleção positiva foi considerada a razão $dN/dS > 1$ (seleção adaptativa) e para as mutações neutras foi considerada a razão $dN/dS = 1$.

3.3 Resultados

3.3.1 Morfometria geométrica

A análise interpopulacional de variáveis canônicas derivado do método de morfometria geométrica alar das populações de ANA, PRE, PAR, ITA, TRE, PET e BUT revelou uma baixa estruturação populacional, pois existe intersecção entre as sete amostras estudadas. Apesar da aparente baixa estruturação populacional no morfoespaço (Figura 2), é possível melhor observá-la através dos valores das distâncias de Mahalanobis, onde estas distâncias foram significativas entre as sete populações deste estudo. As maiores distâncias morfológicas, ocorreram entre as populações de ITA e BUT (5,6241) e as menores entre PRE e PET (2,1225). Observando o fenograma construído pelo método de Neighbor Joining (Figura 3), baseado nas distâncias de Mahalanobis para verificar as similaridades morfológicas inter-populacionais analisadas, não foi possível verificar agrupamento das populações de acordo com sua localidade geográfica. Para testar a presença de correlação entre as variáveis localidade geográfica e distância fenética (distância de Mahalanobis) foi realizada uma análise de regressão entre essas variáveis, mas a correlação encontrada (Figura 4) não foi estatisticamente significativa, apresentando valor de $p = 0,5$.

Figura 2- Morfoespaço das variáveis canônicas a partir de dados referentes à forma alar das populações do Parque Ecológico do Tietê (PET), Itaboraí (ITA), Tremembé (TRE), Pariquera-Açu (PAR), Butantan (BUT), Poço Redondo (PRE) e Ananindeua (ANA) de fêmeas de *Ae. scapularis*.

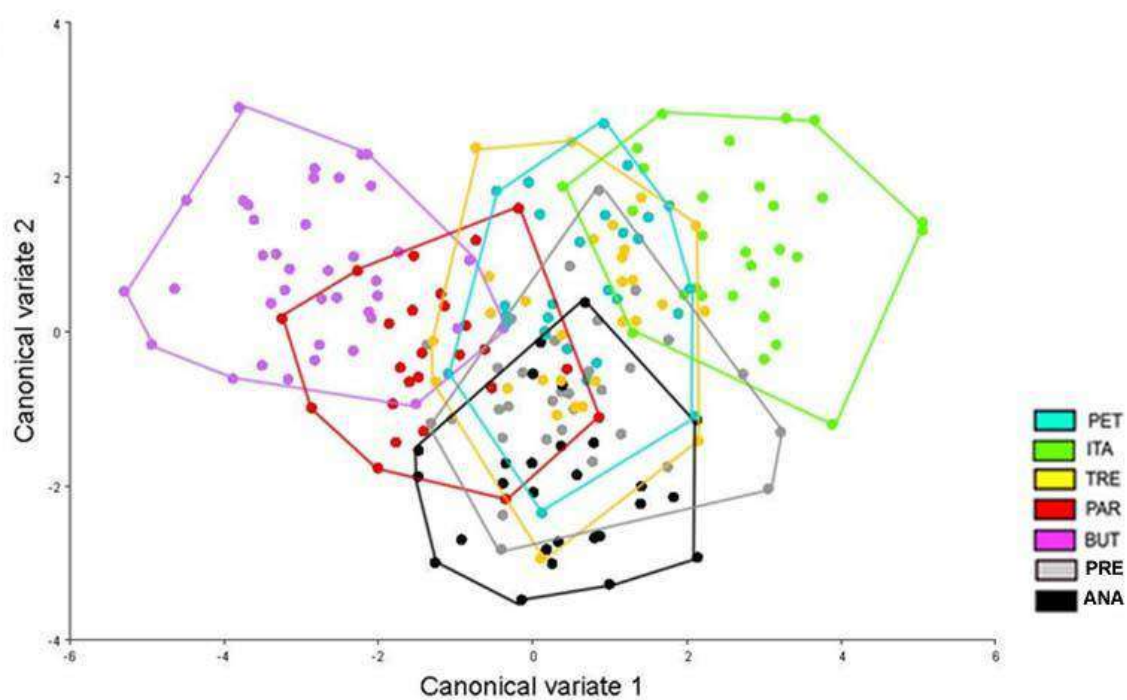


Tabela 2- Valores das distâncias métricas (Mahalanobis) da forma alar para as populações de *Ae. scapularis* do Parque Ecológico do Tietê (PET), Itaboraí (ITA), Tremembé (TRE), Pariquera-Açu (PAR), Butantan (BUT), Poço Redondo (PRE) e Ananindeua (ANA) de fêmeas de *Ae. scapularis*.

	BUT	ANA	ITA	PAR	PET	TRE
ANA	4,3157					
ITA	5,6241	4,0802				
PAR	3,3832	3,7395	4,8549			
PET	4,0547	3,5945	3,2925	3,1838		
TRE	4,0346	2,9902	3,3532	3,5250	2,4949	
PRE	4,1422	2,8460	3,6830	3,1424	2,1225	2,934

Figura 3- Fenograma construído com o método Neighbor joining a partir das distâncias de Mahalanobis das sete populações de *Ae. scapularis*: Parque Ecológico do Tietê (PET), Itaboraí (ITA), Tremembé (TRE), Pariquera-Açu (PAR), Butantan (BUT), Poço Redondo (PRE) e Ananindeua (ANA)

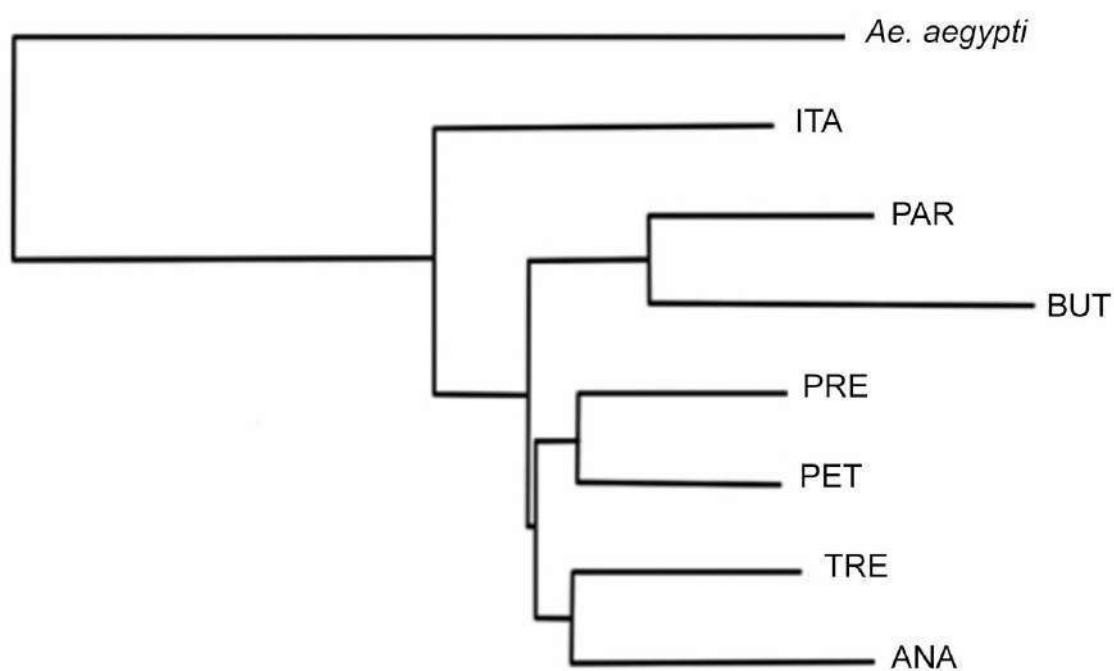
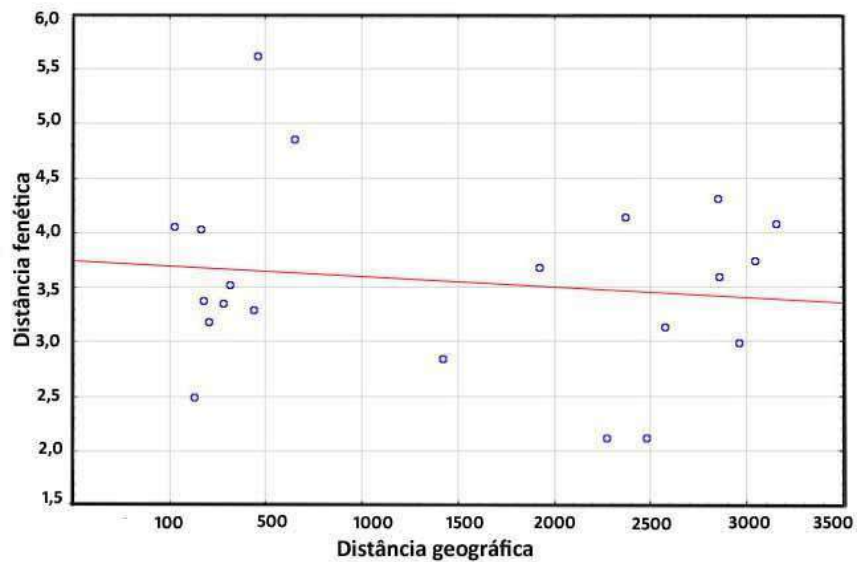
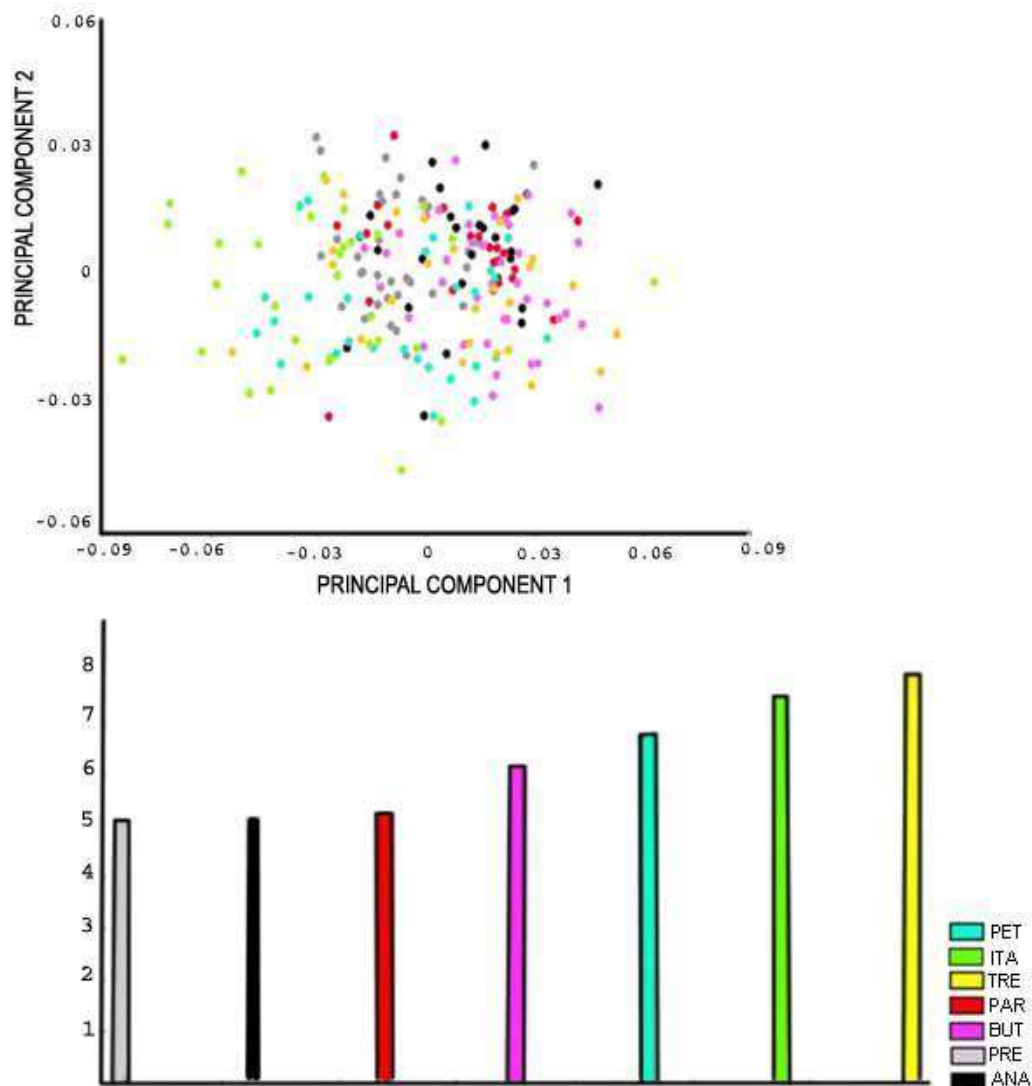


Figura 4- Análise de correlação entre as Distâncias fenéticas (distância de Mahalanobis) geradas por análise de variáveis canônicas da morfometria alar e distâncias geográficas



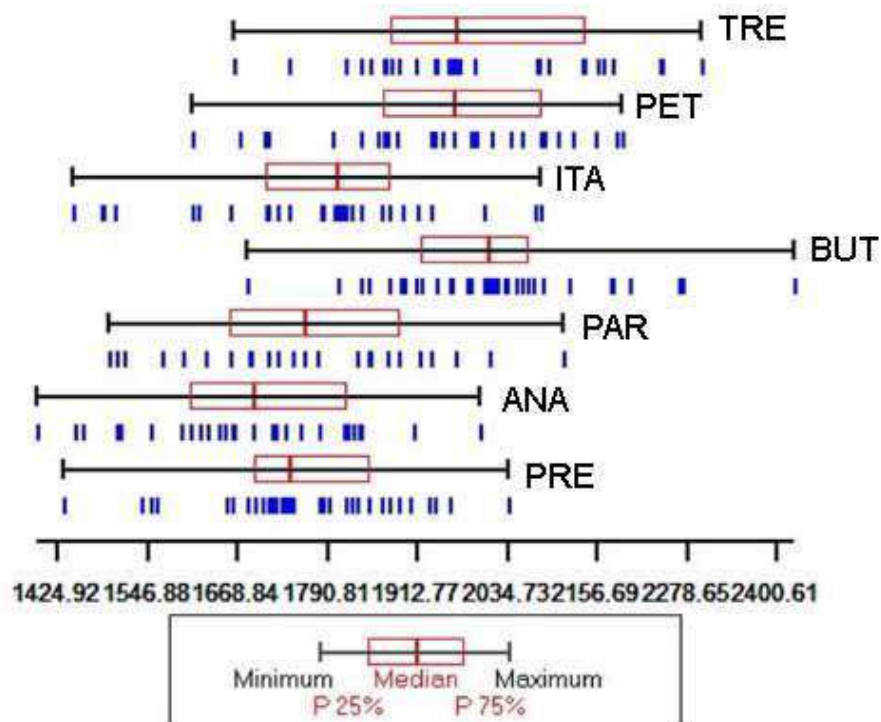
O Q_{st} global (índice de diferenciação morfológica intra-populacional) calculado foi alto, apresentado o valor de 0,53. Na análise interpopulacional de diversidade morfológica (DM) a população com maior DM foi a de TRE e as menores DMs foram vistas nas populações de ANA e PRE (Figura 5).

Figura 5- A) Componentes principais das sete populações de *Ae. scapularis* estudadas: do Parque Ecológico do Tietê (PET), Itaboraí (ITA), Tremembé (TRE), Pariquera-Açu (PAR), Butantan (BUT), Poço Redondo (PRE) e Ananindeua (ANA) B) Diversidade morfológica alar das populações de *Ae. scapularis*.



Com relação ao tamanho global da asa, verificamos que as populações dos locais de maior temperatura ambiente, foram as com presença de menores indivíduos: ITA, ANA e PRE (Figura 6).

Figura 6- Tamanhos dos centróides das populações de *Ae. scapularis*: BUT (Butantan), ITA (Itaborai), TRE (Tremembé), PAR (Pariquera-Açu), PRE (Poço Redondo) e ANA (Ananindeua)



3.3.2 Análises do gene mitocondrial COI

Foram analisados o gene *COI* do total de 162 indivíduos das populações de BUT (Butantan), ITA (Itaborai), TRE (Tremembé), PAR (Pariquera-Açu), PRE (Poço Redondo) e ANA (Ananindeua) (Tabela 1). Foram amplificados cerca de 600 pb deste gene e encontrados 68 haplótipos, deste total de haplótipos apenas 19 eram compartilhados entre pelo menos 2 indivíduos das populações analisadas. A diversidade haplotípica total foi de 0,98, a população mais polimórfica considerando o gene *COI*, foi a TRE (Tabela 3) e as populações menos polimórficas foram as de BUT e PAR. Não foi possível encontrar estruturação populacional, nem evidência de complexo de espécies, utilizando este gene, pois na análise da rede de haplótipos (Figura 7) e na análise filogenética bayesiana (Figura 8) dos haplótipos não ocorreu formação de “cluster” entre nenhuma das sete populações estudadas de *Aedes scapularis*.

Tabela 3- Análises de polimorfismo e diversidade haplotípica do gene *COI* para as populações de *Ae. scapularis*: BUT (Butantan), ITA (Itaborai), TRE (Tremembé), PAR (Pariquera-Açu), PRE (Poço Redondo) e ANA (Ananindeua). N= número de haplótipos, H (SD)= Diversidade haplotípica.

	N	Haplotipos únicos	H	H(SD)
PET	34	5	16	0,8841
ITA	36	8	18	0,9238
TER	29	12	23	0,9704
PAR	21	3	9	0,8476
BUT	10	3	5	0,6667
PRE	18	12	18	0,9940
ANA	14	8	14	1,0000

Figura 7- Rede de haplótipos do gene Citocromo Oxidase Subunidade I das populações de *Ae. scapularis*: BUT (Butantan), ITA (Itaborai), TRE (Tremembé), PAR (Pariquera-Açu), PRE (Poço Redondo) e ANA (Ananindeua)

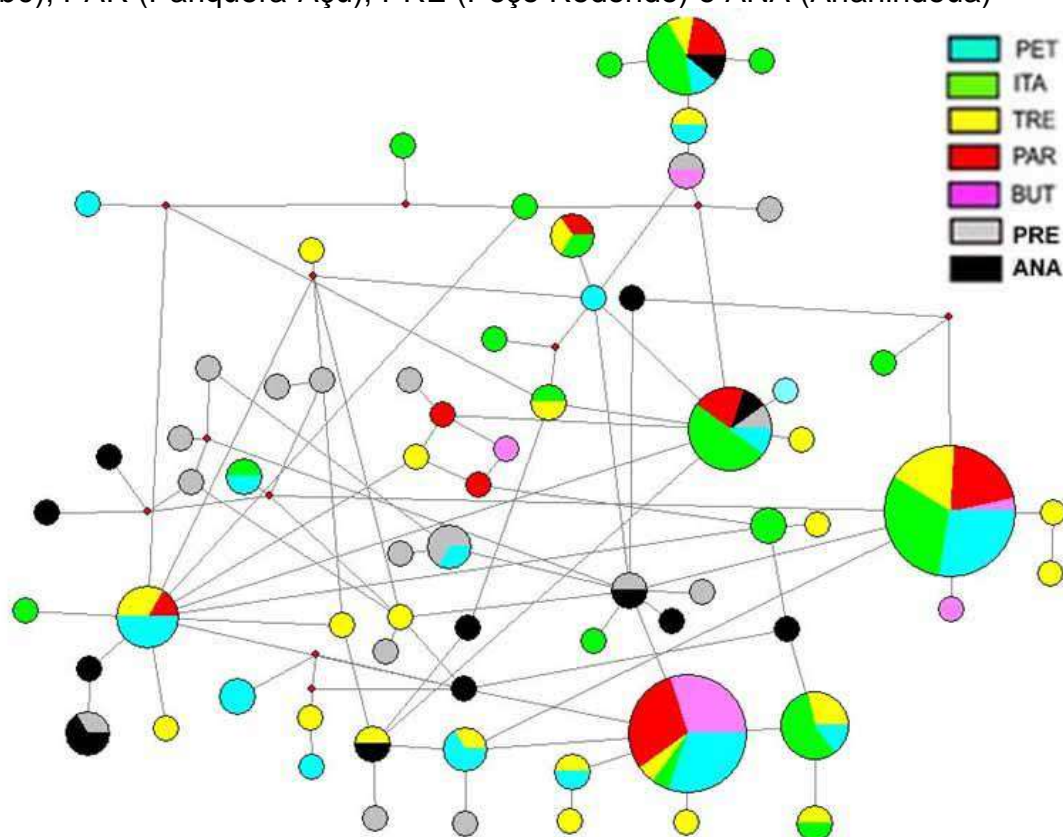
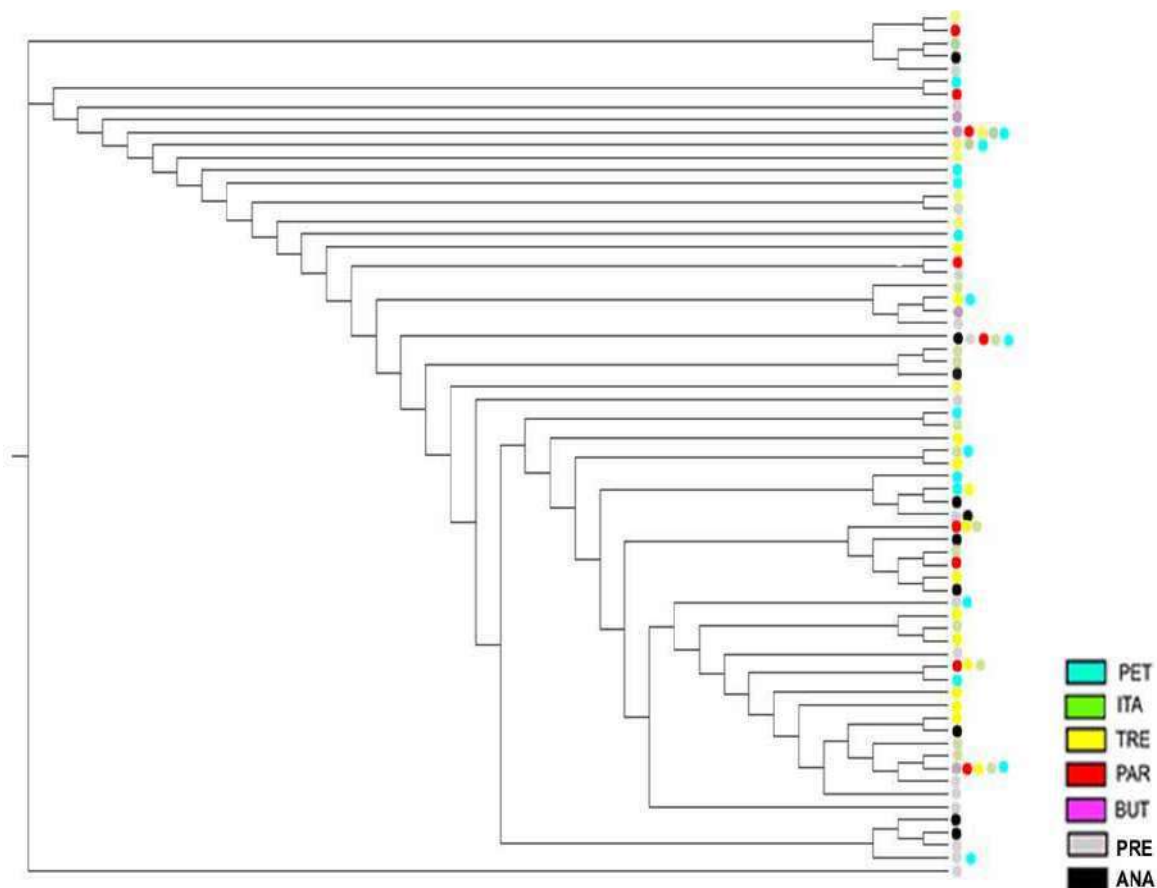


Figura 8- Topologia Bayesiana gerada da análise de distância genética dos haplótipos de *COI* das populações de *Ae. scapularis*: BUT (Butantan), ITA (Itaborai), TRE (Tremembé), PAR (Pariquera-Açu), PRE (Poço Redondo) e ANA (Ananindeua)

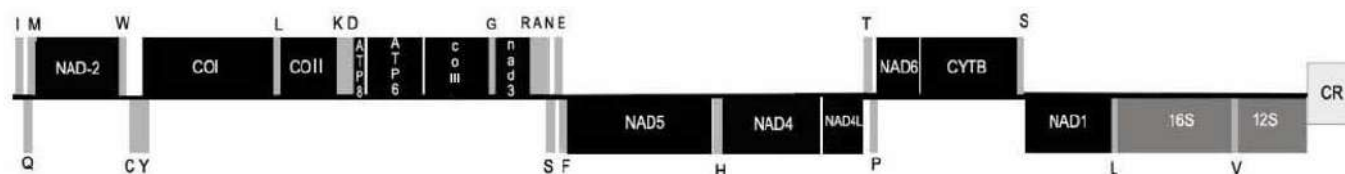


3.3.3 Estrutura do DNA mitocondrial completo

Foram extraídos e montados o DNA mitocondrial de 19 indivíduos, porém consideramos 18 indivíduos para as análises, pois um dos espécimes apresentou montagem incompleta dos genes mitocondriais.

O DNA do mosquito *Aedes scapularis* consiste de uma molécula em formato circular com extensão estimada de 15.560 kb, valor próximo aos de outros mosquitos da família Culicidae. Assim como ocorre com outras espécies da família Culicidae os 37 genes mitocondriais do mosquito *Aedes scapularis* estão classificados da seguinte forma (Figura 9): 13 genes codificantes de proteínas, 22 tRNAs, 2 genes rRNAs e uma região rica em bases A+T. A composição total de nucleotídeos da molécula de DNA mitocondrial completa foi a seguinte: T=39,8%, C=11,8%, A=37,8% e G= 10,6%.

Figura 9- Estrutura dos 37 genes mitocondriais e região rica em A+T



A extensão dos 13 genes codificadores de proteínas mitocondriais foi de 11.212 pb e a composição de AT% nesta região foi de 75.5%. Não foram montadas as regiões iniciais dos genes *NAD2*, *COB*, *COI*, *NAD5*, *NAD3* e *NAD1*. A cadeia H codifica os genes *NAD2*, *COI*, *COII*, *ATP8*, *ATP6*, *COIII*, *NAD3*, *NAD6* e *COB* e a cadeia L codifica os genes *NAD5*, *NAD4*, *NAD4L* e *NAD1* genes.

A região composta por RNAs apresentou a extensão de 1.435 pb apresentando a região de AT com composição de 79.2%. A Região ribossomal apresentou tamanho de 2.126 pb e foi encontrada uma grande a região não codificadora rica em AT que apresentou o tamanho de 780 pb com total de composição AT de 81,7%. A composição de AT total encontrado na espécie *Aedes scapularis* foi de 77.6%.

A diversidade haplotípica foi alta nos genes *COB*, *COI*, *NAD1* e *NAD4*, apresentando o valor de SD = 1,00. Os valores de número de haplótipos, haplótipos únicos e diversidade haplotípica variaram nas análises de *COI* isolado e *COI* amplificado junto aos genes mitocondriais totais, pois tanto os valores de indivíduos e populações variaram. Para as análises de *COI* isolado (Tabela 3) foram considerados 162 indivíduos das populações ITA, TRE, PAR, PET e BUT, já nas análises considerando o gene *COI* amplificado junto aos genes mitocondriais totais (tabela 4), foram considerados 18 indivíduos das populações de ANA, PRE, ITA e BUT.

A diversidade nucleotídica em *Ae. scapularis* variou de 0,00424 a 0,01582, foram considerados para esta análise o número de 7 indivíduos para cada gene das populações: ITA, ANA, BUT e PRE. Os genes que apresentaram os maiores valores de diversidade foram o *NAD4* e *NAD5* e a menor diversidade foi encontrada no gene *NAD1* (Figura 10). Os valores de DnDs variaram de 0 a 0,01, nos 13 GCPs portando não encontramos evidências de pressão seletiva negativa.

Os genes rRNAs foram observados 14 substituições nucleotídicas considerando os genes 12s e 16s e nos tRNAs foram encontradas apenas 16 substituições em seus 22 genes.

Figura 10- a) Diversidade nucleotídica dos 13 genes mitocondriais codificantes de proteínas. b) Tamanho relativo do fragmento do gene analisado

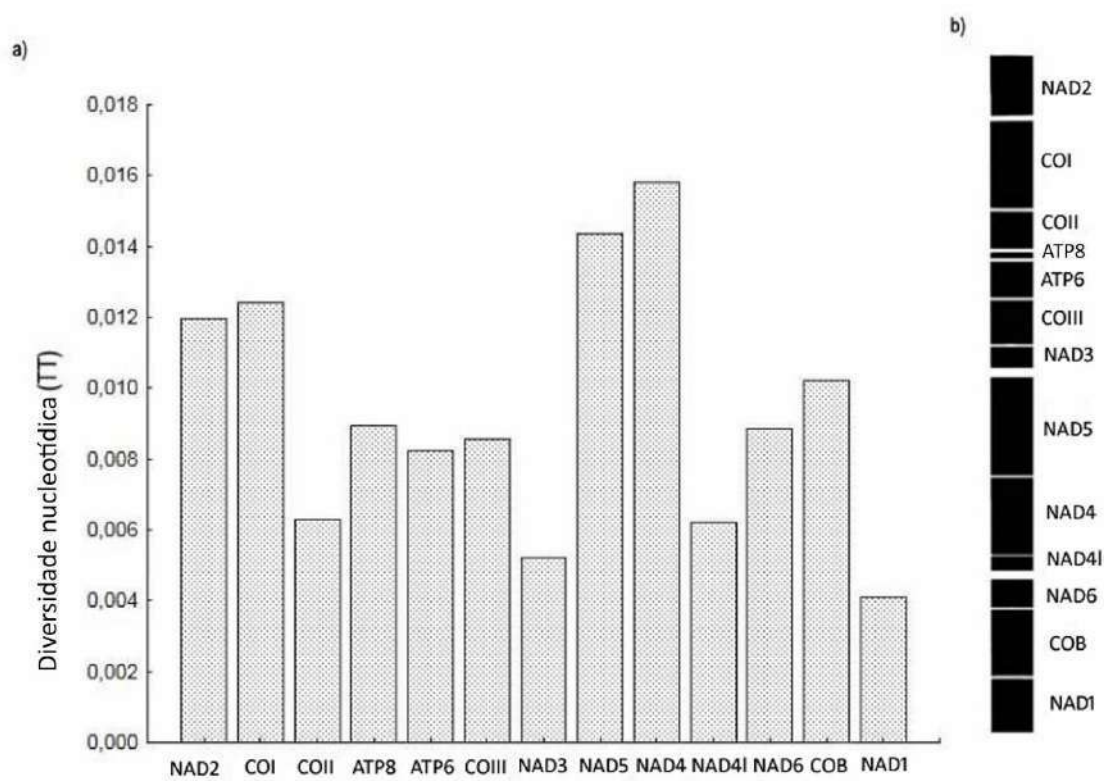


Tabela 4- Análises de polimorfismo e diversidade haplotípica dos 13 GCPs do mosquito *Aedes scapularis*. N=número, H= número de haplótipos, H(SD)= diversidade haplotípica.

	N	Haplotipos únicos	H	H(SD)
<i>ATP6</i>	15	9	12	0,9714
<i>ATP8</i>	10	3	4	0,4909
<i>COB</i>	11	11	11	1,0000
<i>COI</i>	9	9	9	1,0000
<i>COII</i>	13	5	7	0,7949
<i>COIII</i>	15	3	7	0,8667
<i>NAD1</i>	7	7	7	1,0000
<i>NAD2</i>	8	6	7	0,9643
<i>NAD3</i>	13	4	7	0,8681
<i>NAD4</i>	11	11	11	1,00
<i>NADI</i>	9	2	4	0,5256
<i>NAD5</i>	13	1	12	0,9872
<i>NAD6</i>	9	4	5	0,4500

Tabela 5- Número de substituições sinônimas e não sinônimas e sua relação Dn/Ds na espécie *Aedes scapularis*.

	Substituições sinônimas	Substituições não sinônimas	Dn/Ds
<i>ATP8</i>	18	3	0,023
<i>ATP6</i>	4	1	0,041
<i>COB</i>	14	1	0,04
<i>COI</i>	14	1	0,013
<i>COII</i>	14	3	0,029
<i>COIII</i>	21	0	0,18
<i>NAD1</i>	0	3	0
<i>NAD2</i>	16	0	0
<i>NAD3</i>	5	0	0
<i>NAD4</i>	53	3	0,01
<i>NAD4I</i>	0	1	0
<i>NAD5</i>	44	3	0
<i>NAD6</i>	7	4	0,38

O melhor modelo de análise filogenética foi selecionado por “Akaike Information Criterion” fornecido pelo JModeltest. Na filogenia bayesiana dos 13 genes codificadores de proteínas, foi possível observar que o clado formado por indivíduos da espécie *Aedes scapularis* foi fortemente suportado (bootstrap 100) em relação às outras espécies de culicídeos (Figura 11). Também pode ser observada nesta filogenia a ocorrência de uma alta estruturação populacional em ITA, PRE e ANA, contudo na população BUT, um dos indivíduos foi mais aparentado às demais populações analisadas e o outro se mostrou mais basal. Em outras palavras, a estruturação populacional evidenciada pela filogenia baseada nos genes foi correlata à origem geográfica das amostras, com exceção do indivíduo BUT7 (Figura 11). Os genes *ATP6*, *NAD1*, *NAD5* e *NAD6* apresentaram ou altos números de haplótipos ou alta diversidade haplotípica (Tabela 4) ou altos números de substituições não sinônimas (Tabela 5), por esta razão foram selecionados para a construção das “genes tree” isoladamente. Em todas as quatro árvores montadas individualmente com estes genes, ocorreu a formação de clado de populações de *Aedes scapularis* com valor de 100% de probabilidade posterior em relação às outras espécies de culicídeos (Figuras 12, 13, 14 e 15): *Aedes vigilax*, *Haemagagus janthinomys*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*.

Diferentemente do que ocorreu na filogenia conjunta dos 13 genes (Figura 11), as filogenias isoladas para cada gene não mostraram agrupamento correlato à origem geográfica das amostras populacionais.

Incidentalmente, ocorreu também amplificação de DNA de mamíferos, presumivelmente picados pelas fêmeas de *Ae. scapularis* (6 delas). Contudo foi possível realizar a filtragem das sequências de DNA dos mosquitos em relação ao DNA do hospedeiro (mais detalhes olhar Capítulo 2). O DNA dos mamíferos amplificados eram de *Equus caballus* e *Homo sapiens*, a similaridade dos genes montados de ambas as espécies foram confirmados no software online Blast N.

Figura 11- Topologia bayesiana gerada de análise dos 13 CGPs nas espécies *Aedes scapularis*, *Ae. vigilax*, *Ha. janthinomys*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus*. O comprimento 0,02 na figura corresponde a medida de distância.

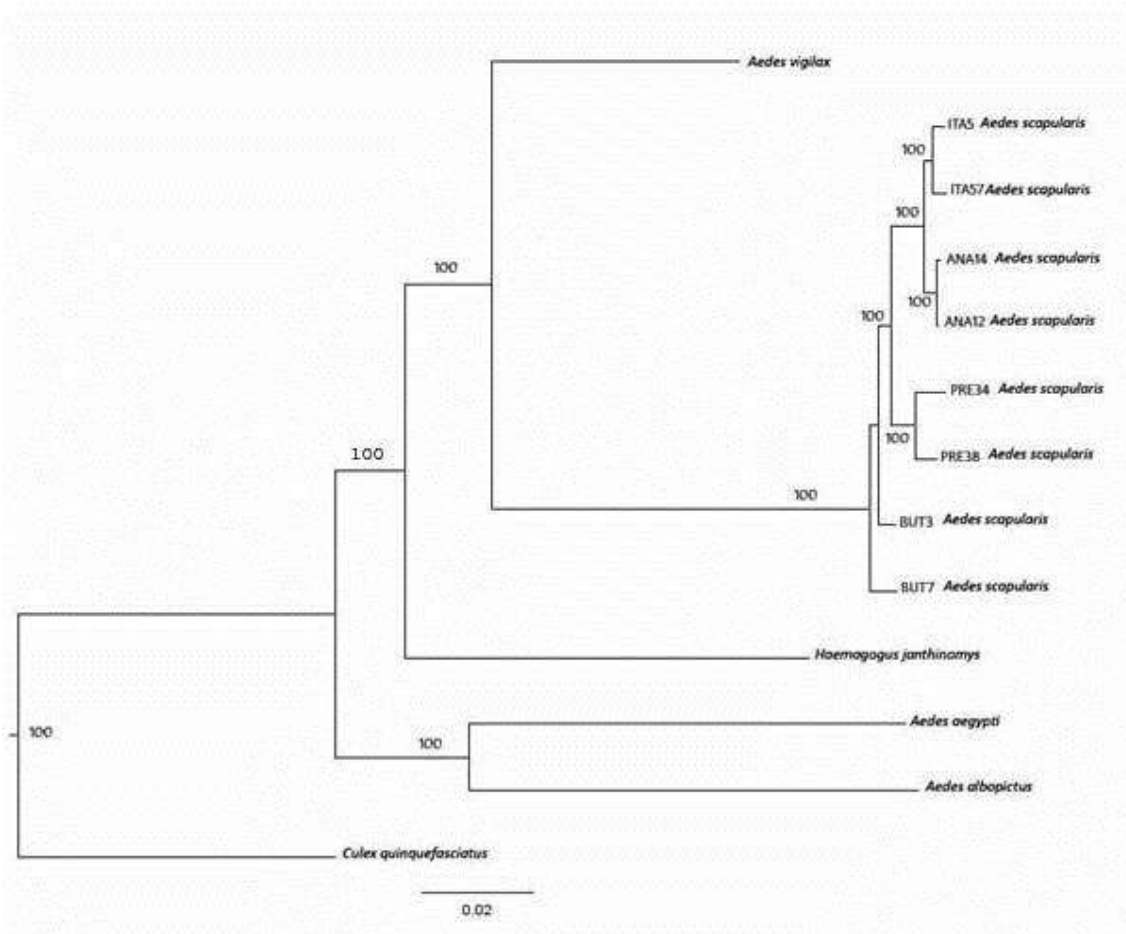


Figura 12- Topologia bayesiana gerada de análise do gene *NAD5* nas espécies *Aedes scapularis*, *Ae. vigilax*, *Ha. janthinomys*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus*. O comprimento 0,02 na figura corresponde a medida de distância.

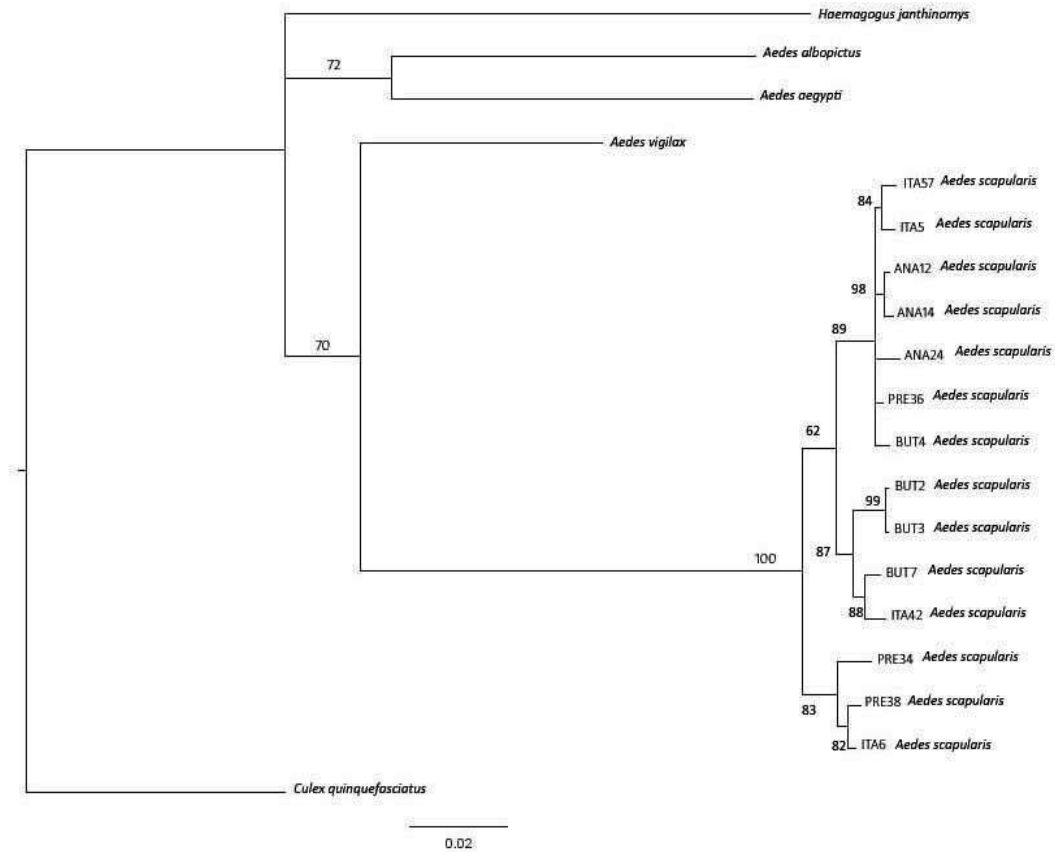


Figura 13- Topologia bayesiana gerada de análise do gene *NAD6* nas espécies *Aedes scapularis*, *Ae. vigilax*, *Ha. janthinoms*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus*. O comprimento 0,03 na figura corresponde a medida de distância.

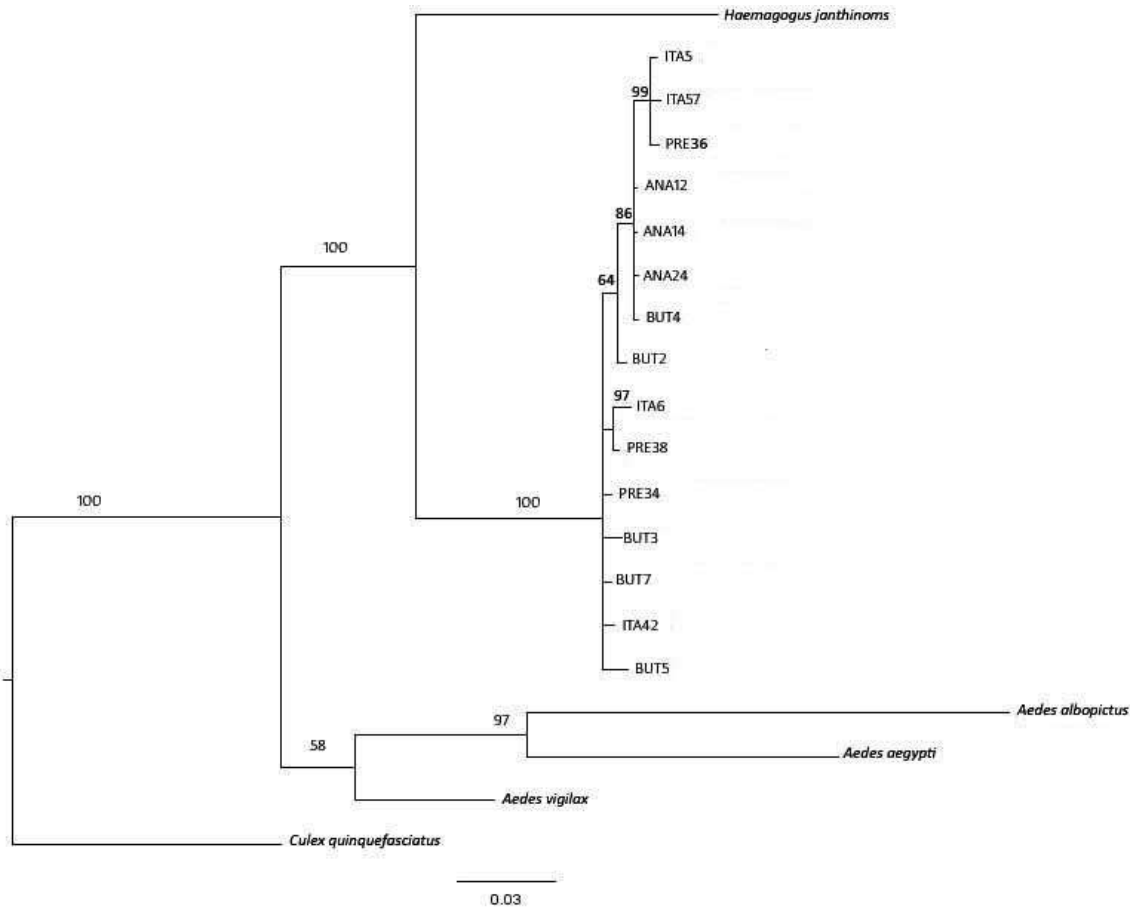


Figura 14- Topologia bayesiana gerada de análise do gene *ATP6* nas espécies *Aedes scapularis*, *Ae. vigilax*, *Ha. janthinomys*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus*. O comprimento 0,02 na figura corresponde a medida de distância.

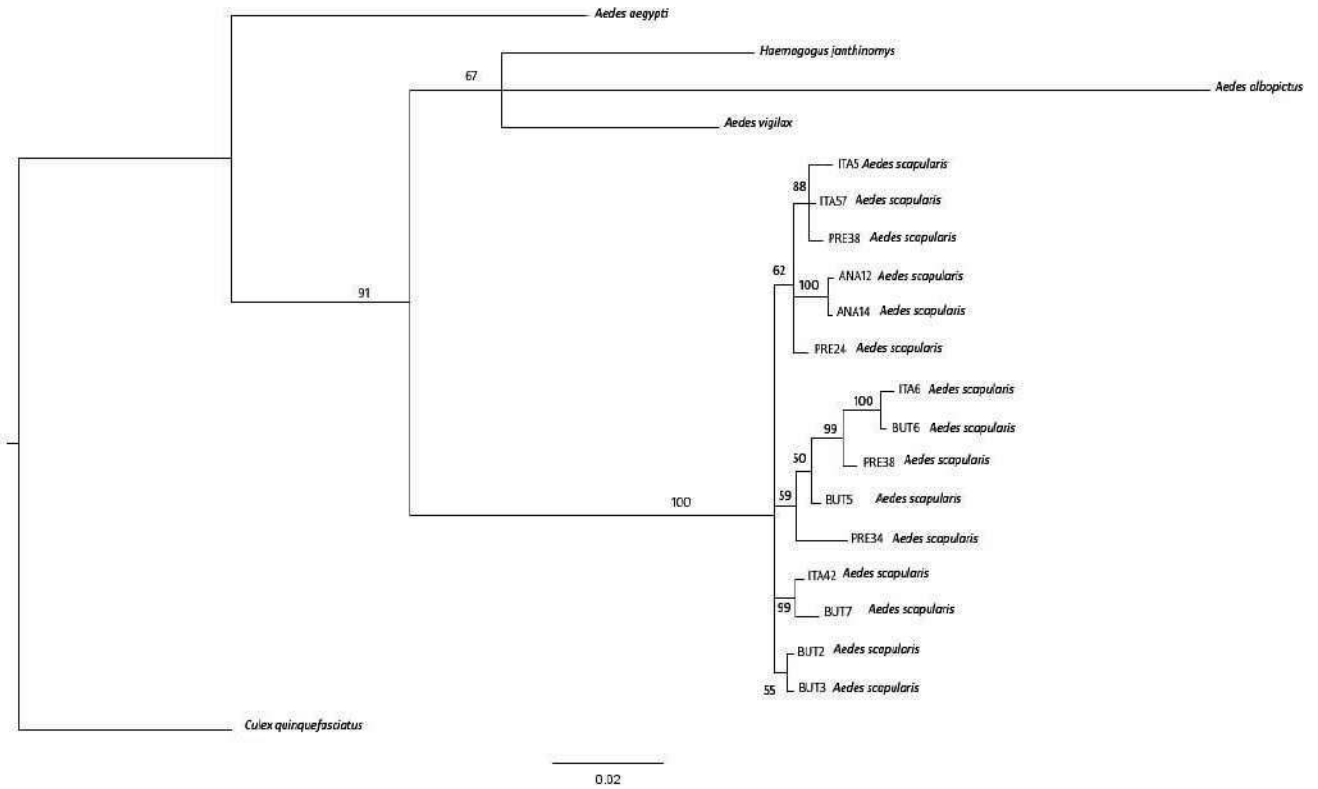
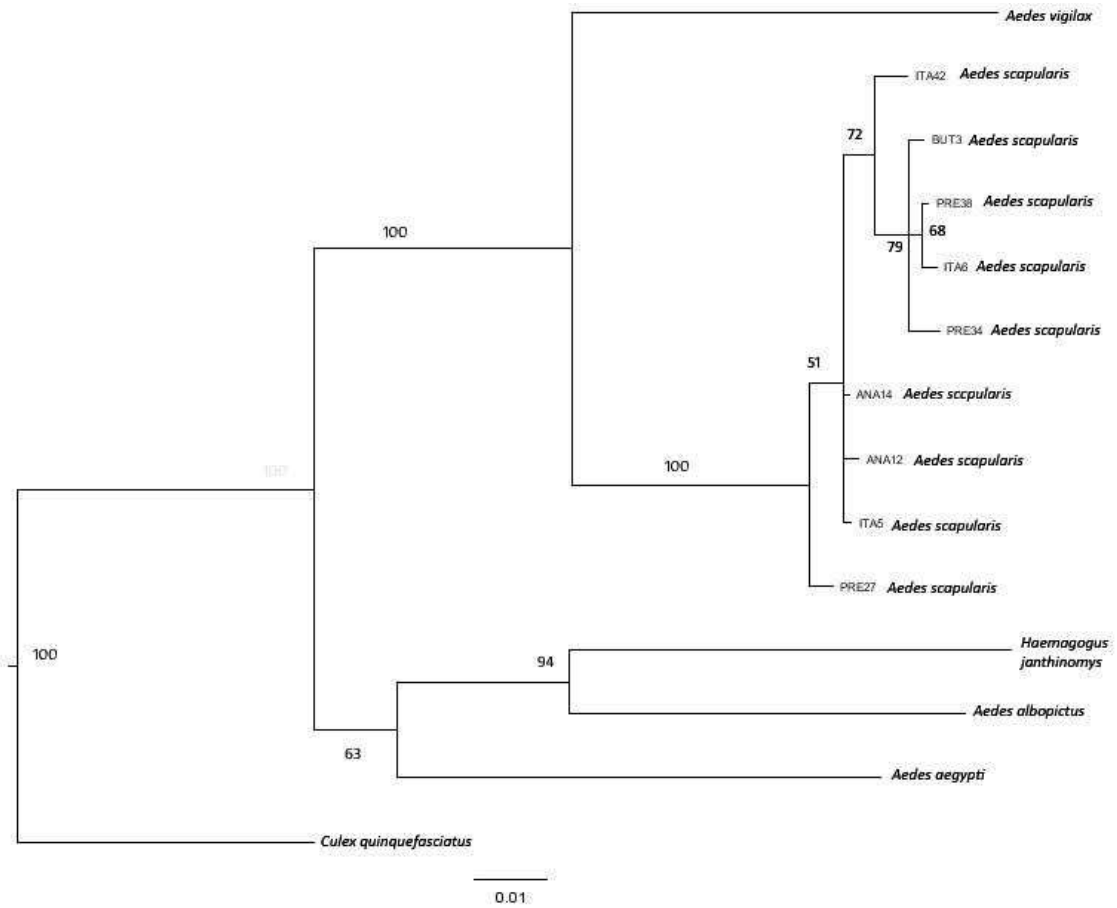


Figura 15- Topologia bayesiana gerada de análise do gene *NAD1* nas espécies *Aedes scapularis*, *Ae. vigilax*, *Ha. janthinomys*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus*. O comprimento 0,01 na figura corresponde a medida de distância.



3.4 Discussão

3.4.1 Geometria alar

Encontramos baixa estruturação populacional entre as sete populações analisadas: ANA BUT (Butantan), ITA (Itaborai), TRE (Tremembé), PAR (Pariquera-Açu), PRE (Poço Redondo) e ANA (Ananindeua), pois existem intersecções morfológicas entre todas estas populações analisadas. A presença de intersecções nos grupos populacionais no morfoespaço das variáveis canônicas também demonstra que possivelmente esta espécie não se trata de um complexo de espécies, ao menos no que concerne a estes marcadores biológicos. Indivíduos de espécies diferentes, mesmo que filogeneticamente próximas, formam cluster com pouca ou nenhuma intersecção no morfoespaço, como foi observado por Lorenz et al. 2015 em estudo com populações de mosquitos morfológicamente semelhantes das espécies *Anopheles bellator*, *Anopheles homunculus* e *Anopheles cruzii*. Apesar das intersecções entre as populações estudadas aqui, algumas populações foram mais distantes que outras no morfoespaço das variáveis canônicas e considerando as distâncias de Mahalanobis. As maiores distâncias morfológicas quanto à asa foram observadas entre as populações de ITA e BUT, sugerindo também ausência de correlação entre distância genética e geográfica, o que pode ser melhor visualizado no dendograma construído a partir das distâncias de Mahalanobis (Figura 4). Podemos observar no cladograma construído pelo método de neighbour joining que as populações BUT e PET, ambas do município de São Paulo com apenas 40 km de distância geográfica entre duas, estão separadas neste gráfico, enquanto que populações distantes como PET e PRE estão no mesmo ramo. A ausência de correlação entre distância geográfica e distância morfológica da asa foi comprovada por teste de regressão realizado entre essas duas variáveis. Resultados semelhantes a esta ausência de correlação entre morfologia da asa e distância geográfica, foram observados em populações de Mata Atlântica estudadas por Petersen et al. (2015), Motoki et al. (2012) também não observou correlação entre essas duas variáveis em populações de *Anopheles darlingi* de cinco ecorregiões brasileiras. O mesmo foi observado por Vidal et al. (2012) em trabalho com populações de *Aedes aegypti* no estado de São Paulo.

Também não foi observada associação entre similaridade morfológica das populações analisadas, considerando os biomas estudados, pois, por exemplo, a TRE coletada em área de Mata Atlântica degradada é mais semelhante em relação a morfologia da asa à ANA que é de ambiente de Mata Amazônica e está a por volta de 3.000 km de distância de TRE. Esta falta de correspondência entre fenótipo e distância geográfica entre as populações pode ter decorrido de convergência evolutiva. Outro fenômeno que explicaria a semelhança da forma alar entre populações separadas por centenas de quilômetros pode ser a retenção ancestral da forma alar (Donnelly et al., 2002). Contudo não descartamos a possibilidade desta equivalência entre as formas alares entre populações distantes ser ocasionada por uma coincidência evolutiva, provavelmente devido a essas populações passarem por pressões ambientais semelhantes, mesmo aquelas de biomas com condições ambientais extremas como a população da Caatinga PRE.

Com relação à diversidade morfológica estudada entre as sete amostras de *Ae. scapularis*, as populações que apresentaram os menores tamanhos globais das asas, foram as populações ANA (Ananindeua-PA) e PRE (Poço Redondo-SE) (Figura 5). Possivelmente a baixa variabilidade morfológica de ANA e PRE não está ligada a efeitos de “bottleneck”, pois estas populações são geneticamente diversas de acordo com nossos resultados dos genes mitocondriais.

Os resultados de tamanho global alar foram consistentes com outros já observado em estudos com esta variável (Aytekin et al., 2008; Phasomkusolsil et al., 2011; Charlwood et al., 2012) em culicídeos, na qual o tamanho dos indivíduos é inversamente proporcional à temperatura dos locais que habitam. No estudo realizado por Charlwood et al. (2012) a temperatura explicou metade das variações observadas no tamanho alar nas populações de *Anopheles funestus* coletados em Moçambique.

A morfometria alar discrimina variações interespecíficas no formato alar de espécies e populações de culicídeos, contudo quando se avalia a presença de espécies de complexo, esta análise deve ser combinada com mais marcadores biológicos, sobretudo os marcadores moleculares como foi realizado no presente estudo. Uma abordagem parecida com o presente estudo foi realizado por Gómez et al. (2013), estes autores utilizaram a técnica de MG e o gene *COI* para avaliarem os membros do complexo *Albitarsis*, estes autores não encontraram evidências da existência de mais de uma espécie deste complexo nas populações analisadas.

O alto polimorfismo morfológico encontrado em *Ae. scapularis* chamou a atenção de Forattini, 2002, para a possível existência de complexo de espécie, contudo podemos verificar através dos dados do presente estudo que este polimorfismo é uma característica generalizada da espécie. Esta alta variabilidade que também se pronuncia em marcadores genéticos, pode auxiliar na adaptabilidade do mosquito a novos ambientes na região urbana. As semelhanças interpopulacionais concernentes ao formato das asas pela análise de Variáveis Canônicas e pelo método de Neighbour Joining nas sete populações de *Ae. scapularis* indicam que as populações do presente estudo não constituem um complexo de espécies.

3.4.2 Citocromo Oxidase Subunidade I

Encontramos um grande polimorfismo no gene *COI*, pois foram observados 68 haplótipos em 162 indivíduos analisados. A árvore de haplótipos construída com gene *COI*, não acusou cluster de indivíduos das mesmas populações analisadas, indicando baixa estruturação populacional. Semelhante resultado já foi observado em outra espécie de culicídeo Neotropical, pois Lorenz et al. (2014) estudando duas populações de *Anopheles cruzii* coletadas em região de planície e em região com maior altitude também encontrou um grande número de haplótipos: 68 haplótipos em apenas 96 indivíduos analisados. Apesar do alto polimorfismo encontrado nestas populações de *Anopheles*, diferentemente das sete populações de *Ae. scapularis*, em que não foi encontrada estruturação populacional, nas populações de *An. cruzii* foi observado estruturação populacional dos mosquitos coletados na planície em relação ao mosquitos coletados nas

regiões mais altas. Apesar do alto polimorfismo haplotípico observado nas populações de *Aedes scapularis* e em *Anopheles cruzii* (Lorenz et al., 2014) este polimorfismo não é muito comum em mosquitos da família Culicidae, tanto em outras espécies silvestres e principalmente considerando espécies urbanas exóticas. Kang et al. (2012), observou apenas 59 haplótipos em 305 indivíduos da espécie *Anopheles sinensis*, coletados em 20 localidades. Gutiérrez et al 2010 também encontrou um baixo número de haplótipos em populações de *Anopheles darling* em cinco localizações da Colômbia: 12 haplótipos em 88 indivíduos. Em trabalho realizado por Paupy et al. (2012) foi encontrado apenas 8 haplótipos em 127 indivíduos da espécie *Aedes aegypti* coletados em diferentes áreas metropolitanas da Bolívia. Encontramos um alto número de haplótipos no mosquito *Ae. scapularis*, apesar deste mosquito ser infectado naturalmente pela bactéria *Wolbachia*, e esta bactéria geralmente diminui o número de haplótipos em seus hospedeiros, como foi documentado por Moraes et al., 2015 em estudo com mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus*.

Assim como a rede haplótipos do gene *COI* a análise filogenética Bayesiana também não evidenciou nenhum agrupamento entre as populações analisadas. Portanto não foram encontradas evidências da existência de complexo de espécies em *Aedes scapularis* utilizando este marcador. Diferentemente dos nossos resultados, Lehr et al. (2005) em estudo de investigação de complexo de espécies utilizando o gene mitocondrial *COI*, conseguiram identificar quatro espécies dentro do complexo *Albitarsis*: *An. albitarsis* s.s., *An. albitarsis* B, *An. marajoara*, e espécie E. Scarpassa & Conn 2006, em estudo com populações de *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* encontraram 25 haplótipos no gene *COI* e nenhum compartilhado entre as populações estudadas. Estes autores observaram quatro subgrupos nesta espécie, as quais suspeitaram pertencer às espécies *An. oswaldoi* s. , *An. konderi* e os outros dois subgrupos às linhagens ou espécies dentro do Complexo *Oswaldoi*.

Apesar de o marcador molecular *COI* não apontar a existência de espécies de complexo em *Aedes scapularis*, este marcador mais uma vez evidenciou alto polimorfismo. Os resultados encontrados nas análises realizadas com o marcador molecular *COI* corroboram os resultados encontrados em Petersen et al. (2015), sendo que apesar da ampliação das áreas de coleta no presente trabalho em relação às realizadas no artigo Petersen et al. (2015), para biomas antes não explorados, foi encontrado nas populações das áreas ampliadas alto polimorfismo e riqueza haplotípica como ocorreu com as populações coletadas em Mata Atlântica (PET, PAR, BUT, ITA e TRE) (Petersen et al., 2015). Nas populações de ANA (região de Mata Amazônica) e PRE (Caatinga) foram encontrados valores de diversidade haplotípica de 0,99 e 1,00 respectivamente, valores semelhantes aos encontrados nas populações coletadas em regiões de Mata Atlântica onde os valores mais altos variaram de 0,84 a 0,97. Este polimorfismo encontrado em diferentes regiões brasileiras nos três diferentes biomas (Mata atlântica, Caatinga e região Amazônica) pode ser devido ao fato de a espécie *Aedes scapularis* estar próxima ao seu centro de origem evolutiva na América do Sul. Os centros de origem são locais na qual a espécie se originou para sua posterior dispersão, nestes locais as espécies apresentam alta diversidade genética. De acordo com Briggs, 1981, os centros de origem “atuam como

centros de radiação evolutiva” e fornecem espécies para outras áreas que são menos eficazes no sentido evolutivo”. A espécie *Aedes scapularis* apresenta distribuição pelas Américas do Sul, Norte e Central, então possivelmente seu centro de origem é no Brasil ou em região próxima ao País, pois mesmo nas regiões de escassez de chuva e com altas temperaturas como a Caatinga, a população PRE deste local apresentou alto valor polimórfico. Provavelmente esta população de mosquitos (PRE) que habita a Caatinga, ambiente este de condições extremas são bastante plásticos para se adaptarem a essas condições ambientais. Outra interpretação que este alto polimorfismo sugere é de que apesar de *Aedes scapularis* ser de habitat de mata fragmentada que sofreu ação antrópica ou de ambientes com altas temperaturas e escassez de chuva, aparentemente este mosquito não sofreu o efeito “bottleneck” recente.

O marcador genético *COI* não evidenciou presença de complexo de espécies, porém através dos resultados obtidos utilizando este marcador foi possível observar que a espécie *Aedes scapularis* é igualmente polimórfica em ambientes de Mata Atlântica e em biomas de Caatinga e área Amazônica.

3.4.3 Caracterização e Polimorfismo

A estrutura do DNA mitocondrial do mosquito *Aedes scapularis* é semelhante a de outros culicídeos, apresentando ordenação semelhante dos 37 genes mitocondriais com os genes estruturados em: 13 genes codificantes de proteínas, 22 tRNAs, 2 genes rRNAs e uma região controladora rica em AT (Hardy et al., 2014; Hardy et al., 2016; Oliveira et al., 2016). A espécie de culicídeo mais próxima na composição e estrutura dos 37 genes foi o *Aedes vigilax*. O comprimento do DNA mitocondrial completo de *Ae. scapularis* (15.560 pb) é semelhante ao de outros mosquitos da família Culicidae como ocorre com as espécies: *Culex tritaeniorhynchus* com 15.123 pb, *Cx. coronator* com 15.573 pb, *Cx. usquatus* com 15.573 pb e *Aedes vigilax* com 15.877 pb.

No presente estudo como já mencionado no item 3.4.2, o gene *COI* foi bastante polimórfico, na qual foi observado 68 haplótipos em 162 indivíduos, contudo este gene não apresentou a maior diversidade nucleotídica dos 13 GCPs. Os genes com maiores diversidades nucleotídicas foram o *NAD4* e *NAD5*. Em estudo realizado por Demari et al., 2016, o gene *NAD5* também apresentou alto valor de diversidade nucleotídica, neste trabalho foi empregado o DNA mitocondrial completo, para a caracterização de espécies do complexo *Coronator*. Essa alta variabilidade encontrada nos genes mitocondriais possivelmente ocorre em outros genes relacionados à adaptação do mosquito *Ae. scapularis* aos ambientes urbanos, que podem influenciar na antropofilia, oviposição em recipientes artificiais ou duração do repasto sanguíneo (Conn et al. 2015).

Os valores de DnDs variaram de 0 a 0,001, portanto não encontramos indícios de seleção positiva atuando sobre os 13 GCPs deste mosquito, resultado este semelhante ao encontrado em espécies do complexo *Kerteszia* por Oliveira et al. (2016). Quando ocorre atuação de pressão seletiva negativa como foi encontrado nos 13 genes é comum a presença de alto número de frequência haplotípica baixa (Vadivalagan et al., 2016). Encontramos os genes *ATP6*, *COII*, *NAD1*, *NAD4*, *NAD5* e *NAD6* com os maiores números de mutações não sinônimas. Os genes *ATP6* e *NAD5* foram sugeridos por Demari

et al. (2015), como bons marcadores genéticos devido suas elevadas proporções de variações não sinônimas.

Semelhantemente a outros trabalhos desenvolvidos sobre caracterização do DNA mitocondrial completo em culicídeos (Demari et al., 2015; Hardy et al., 2016), os genes rRNAs e tRNAs de *Ae. scapularis*, foram mais conservados que os GCPs, por esta razão estes genes não foram considerados nas análises filogenéticas do presente estudo.

O alto polimorfismo encontrado nos GCPs em *Aedes scapularis*, mais uma vez corrobora com a hipótese de que o Brasil é o centro de origem da espécie *Aedes scapularis* ou que estamos próximos ao centro de sua origem ou de diversidade genética. Geralmente espécies mais antigas, ou seja, as populações situadas em seu centro de origem ou de diversidade são mais polimórficas que as populações mais recentemente introduzidas (Kambhampati et al., 1991; Grunwald & Flier, 2005; Lorenz et al., 2015).

3.4.4 DNA mitocondrial completo- Investigação de possível complexo de espécies

Diferentemente da ausência de estruturação populacional observada na análise isolada do gene *COI*, na análise filogenética bayesiana dos 13 GCPs, foi possível observar formação de cluster entre as populações de *Aedes scapularis* analisadas (Figura 11). Ocorreu estruturação populacional alta com 100% de probabilidade posterior entre as populações de *Ae. scapularis* ITA, PRE e ANA indicando que há similaridade correlata à origem geográfica, a exceção foi a população BUT, na qual um dos indivíduos foi mais aparentado às demais populações deste mosquito e o outro indivíduo se mostrou mais basal. Apesar de um dos indivíduos ser mais diferenciado em relação às populações analisadas, o clado com as populações de *Aedes scapularis* foi fortemente suportado por 100% de probabilidade de ocorrência, indicando que os indivíduos analisados provavelmente pertencem à mesma espécie nominal *Aedes scapularis*. Todas as espécies analisadas (*Aedes scapularis*, *Ae. vigilax*, *Ha. janthinomya*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus*) na filogenia bayesiana dos 13 GCPs, apresentaram distâncias genéticas altas com 100% de probabilidade de ocorrência. As análises filogenéticas bayesianas dos genes *ATP6*, *NAD1*, *ND5* e *NAD6* não indicaram a mesma estruturação populacional observada na filogenia com os 13 GCPs, pois os valores de suporte interno nas análises isoladas desses quatro genes variaram de 100% a valores menores de 50%. Este resultado demonstra que para a espécie *Aedes scapularis* a utilização de vários genes é melhor para o estudo de estruturação populacional, possivelmente devido ao alto polimorfismo intraespecífico que ocorre nesta espécie.

A análise filogenética bayesiana dos 13 GCPs se mostra eficaz na ramificação de espécies morfologicamente similares consideradas de complexo. Demari et al. (2015) observaram suportes com valores de 100% de probabilidade posterior entre os clados das espécies do complexo *Coronator* analisadas: *Cx. coronator*, *Cx. usquatus*, *Cx. usquatissimus*, and *Cx. camposi*. A análise de mitogenoma é uma ferramenta importante na resolução de filogenia de algumas espécies, não resolvidas utilizando um ou poucos marcadores genéticos de origem nuclear ou mitocondrial. Williams et al. (2014)

demonstraram que foi possível resolver as relações filogenéticas dentro do filo Gastropoda utilizando as análises de Máxima verossimilhança e probabilidade bayesiana dos genes mitocondriais. Segundo pôde ser observado na filogenia, a espécie-irmã de *Aedes scapularis* é o mosquito *Aedes vigilax*, enquanto que a espécie *Culex quinquefasciatus* foi a mais distante entre as espécies analisadas. As populações de *Aedes scapularis* estão filogeneticamente próximas à espécie *Haemagogus janthinomys*, resultado este semelhante ao encontrado por Harbach, 2009, que considerou em seu estudo o mosquito *Aedes scapularis* como pertencente ao gênero *Ochlerotatus*, este resultado pode levantar uma discussão taxonômica a respeito deste mosquito. Porém este não é o propósito do presente estudo que tem como foco investigar a presença de complexo de espécies e polimorfismo em *Aedes scapularis*, consideramos à classificação taxonômica proposta por Wikerson et al. (2015) devido à robustez deste trabalho que reavaliou os estudos de Reinert et al. (2008) e propôs à redução do gênero *Ochlerotatus* à subgênero .

Apesar da alta estruturação populacional que pôde ser observada na árvore filogenética de GCPs, esta árvore corrobora o dendograma fenético das asas construído com distâncias de Mahalanobis no sentido de que não ocorre relação entre bioma ou localidade geográfica com a proximidade genética das populações analisadas. Possivelmente entre as populações de biomas diferentes, mas geneticamente parecidas, como por exemplo, ITA (Itaboraí) e ANA (Ananindeua), onde a primeira é de ambiente de Mata Atlântica e a segunda de ambiente de Mata Amazônica, a similaridade genética observada, pode estar relacionada com o padrão de imigração, ocorrência de retenção ancestral ou coincidência evolutiva.

Em todas as análises filogenéticas construídas pelo método Bayesiano dos 13 CPGs e dos genes *NAD1*, *NAD5*, *NAD6* e *ATP6* pôde ser observada que as distâncias genéticas entre os indivíduos das populações do clado *Aedes scapularis* é pequena em relação às distâncias genéticas das espécies *Ae. vigilax*, *Ha. janthinomys*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* consideradas nas análises filogenéticas. Este fato também corrobora a hipótese de que possivelmente não ocorre complexo de espécies em *Aedes scapularis*.

Baseado nos resultados das relações filogenéticas das populações de *Aedes scapularis* de diferentes biomas analisados em relação às outras espécies de culicídeos, e na interpretação conjunta de todos os dados dos genes mitocondriais e das asas até o momento, este mosquito aparenta ser um único táxon.

3.4.5 Amplificação de DNA ingurgitado pelo mosquito

Ocorreu a amplificação do DNA do mamífero picado pelo mosquito em 6 fêmeas de *Aedes scapularis*. Destes, 5 mosquitos estavam ingurgitados com sangue de *Homo sapiens* e um indivíduo estava ingurgitado com sangue de *Equus caballus*. Acreditamos que o sangue do mamífero amplificado não se trata de uma contaminação externa (com DNA da própria pessoa que manipula as amostras), já que não foi somente DNA humano amplificado, mas também DNA de cavalo nas populações de ITA. A população ITA foi coletada em região de pasto no interior da cidade Itaboraí-RJ, neste local havia a presença de

cavalos, onde este provavelmente foi a fonte de alimento dos mosquitos *Ae. scapularis*. Além disso, outro fator que reforça o descarte de possibilidade de contaminação externa é que não foram encontrados indícios de DNA de mamífero no DNA de mosquito machos amplificados. Foi possível separar o DNA do animal possivelmente picado em relação ao DNA do mosquito. Até então não havia registros na literatura relatando a amplificação de DNA do mamífero picado presente no sangue ingurgitado pelo mosquito durante seu repasto sanguíneo. Essa amplificação inespecífica provavelmente ocorreu devido à região em que os dois primers HPK16Saa e HPK16Sbb (Hwang et al., 2001) foram desenhados (Mais detalhes Capítulo 2).

3.4.6 COI, DNA Mitocondrial completo e Morfometria geométrica alar

Os diferentes marcadores populacionais utilizados neste estudo indicaram diferentes níveis de estruturação populacional. O marcador genético COI, não revelou nenhuma estruturação populacional, com a Morfometria geométrica alar foi possível observar uma leve estruturação populacional e já com análise filogenética bayesiana dos 13 GCPs ocorreu uma alta estruturação populacional em três populações estudadas. Apesar destas diferenças relacionadas ao grau de especificidade ou estabilidade evolutiva destes marcadores populacionais utilizados no presente estudo, estes três marcadores mostraram um alto polimorfismo na espécie *Aedes scapularis*. Estas diferentes respostas dos marcadores genéticos e morfológicos que ocorreu neste estudo é comum, pois as razões evolutivas entre os marcadores podem ser diferentes. A morfometria geométrica alar é sensível a processos microevolutivos, podendo ser considerado como um marcador preliminar de estrutura populacional, sendo frequentemente utilizada em estudos de caracterização populacional (Louise et al. 2015, Petersen et al. 2015) . Os 13 GCPs foram eficazes em evidenciar a estruturação populacional do mosquito *Ae. scapularis*, possivelmente devido a sua riqueza de informações. Considerando estas características dos marcadores biológicos, recomenda-se a combinação de marcadores para a investigação de espécies de complexo e estudos de estruturação populacional.

O alto polimorfismo era esperado nas populações da Mata Atlântica, mesmo fragmentadas, pois este é o habitat natural deste mosquito, contudo foi verificado polimorfismo alto em populações de área de Mata Amazônica e de Caatinga. Estes achados a respeito do polimorfismo presente em todos os biomas estudados (Mata atlântica, Caatinga e Mata Amazônica) observado nas análises dos marcadores de Morfometria geométrica, COI e CPGs corroboram a hipótese de que o Brasil é o centro de origem dessa espécie ou que estamos próximos ao centro de origem. O alto polimorfismo característico da espécie *Aedes scapularis* possivelmente confere a este mosquito plasticidade para se desenvolver em ambientes com condições ambientais extremas como no bioma de Caatinga. Além disso, possivelmente sua plasticidade está auxiliando em sua adaptação do ambiente silvestre ou rural para o ambiente urbano. No ambiente urbano esse mosquito em contato com o vírus podem transmitir as arboviroses que circulam neste ambiente, caso apresente capacidade e competência vetorial. Uma vez que este mosquito já transmite algumas arboviroses entre estas alguns Flavivírus e atualmente fêmeas ingurgitadas de

Ae. scapularis já foram encontradas no interior de casas em regiões do Brasil com epidemia de vírus Zika (Costa da Silva et al., 2017).

Os marcadores populacionais utilizados neste estudo não sugeriram ou evidenciaram a presença de espécie de complexo em *Aedes scapularis* nos biomas de Mata Atlântica, Caatinga e Mata Amazônica. A maior evidência de que não ocorre complexo de espécies em *Aedes scapularis* neste estudo pôde ser observada nos robustos resultados decorrentes das análises realizadas com os GCPs mitocôndrias, pois os clados apresentaram altos valores de suporte para as populações deste mosquito em relação aos outros culicídeos: *Aedes vigilax*, *Haemagogus janthinomys*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*. Ademais, as distâncias genéticas e fenéticas observadas entre as populações não têm magnitude suficiente para nos fazer crer que há mais espécies sob o nome *Aedes scapularis*.

3.5 Conclusão

Encontramos um alto polimorfismo genético e morfológico em todas as populações dos biomas de Mata Atlântica, Caatinga e Mata Amazônica. Os marcadores genéticos e morfológicos empregados neste estudo não evidenciaram a presença de complexo de espécies neste mosquito.

A espécie *Aedes scapularis* ainda é bastante negligenciada apesar do risco que esta pode apresentar à saúde pública, pois esta espécie apresenta capacidade vetorial para algumas arboviroses e está em adaptação aos ambientes urbanos. Considerando estes fatos acreditamos que futuras investigações devem ser feitas nesta espécie a respeito de sua possível capacidade ou competência vetorial para as arboviroses emergentes.

3.6 RESUMO

A espécie *Aedes scapularis* é distribuída por toda região das Américas, principalmente na América do Sul. Este mosquito está em processo de transição dos ambientes silvestres e rurais para os urbanos, fato este preocupante devido à sua capacidade e competência vetorial para vários agentes etiológicos de arboviroses e filarioses. Estudos anteriores voltados ao *Ae. scapularis* investigaram a presença de complexo de espécies neste mosquito na Mata Atlântica, onde foi observado um alto polimorfismo genético e morfológico nesta espécie. Não foi encontrado indício de complexo taxonômico, contudo essa hipótese não foi descartada. Propusemos então continuar no presente estudo a investigação de complexo, polimorfismo e caracterização populacional neste mosquito, na qual pretendemos responder às seguintes questões: A espécie *Aedes scapularis* é igualmente polimórfica em outros biomas diferentes da Mata Atlântica? Em outros biomas o mosquito *Aedes scapularis* pode se apresentar como complexo de espécies?

Para cumprir com nosso objetivo empregamos os seguintes marcadores biológicos: Morfometria geométrica (MG) alar, gene Citocromo Oxidase Subunidade I (*COI*) e análise do DNA mitocondrial completo. Além disso, ampliamos as regiões de coleta (em meu mestrado apenas coletada em Mata Atlântica) para novos biomas: Caatinga e Mata Amazônica. As amostras populacionais analisadas foram: ANA (Ananindeua-PA), PRE (Poço Redondo-PRE), TRE (Tremembé-SP), BUT e PET (São Paulo-SP), PAR (Pariquera-Açu) e ITA (Itaboraí-RJ).

Encontramos diferentes níveis de estruturação populacional de acordo com o marcador biológico analisado: A estruturação populacional foi ausente na análise do gene *COI*, foi baixa quando consideramos a MG da asa e alta na análise filogenética bayesiana dos genes mitocondriais codificadores de proteínas (GCPs). Encontramos mais uma vez um alto polimorfismo em todos os marcadores empregados. Mais especificamente, as análises de variáveis canônicas das distâncias de Mahalanobis demonstraram intersecções entre todas as populações analisadas, demonstrando uma leve estruturação populacional. A rede de haplótipos do gene *COI* e sua análise filogenética bayesiana não evidenciaram presença de complexo de espécies em *Ae. scapularis*. Na análise filogenética bayesiana dos 13 GCPs formou-se um clado com populações de *Ae. scapularis* com 100% de probabilidade posterior de ocorrência.

Não encontramos evidências de complexo de espécies nas análises dos marcadores MG, *COI* e DNA mitocondrial completo. Concluímos então que a espécie *Ae. scapularis* é genética e morfológicamente polimórfica, mas provavelmente esta espécie se trata de um táxon nominal único .

REFERÊNCIAS*

Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIII - A revision of the Scapularis group of *Aedes* (*Ochlerotatus*). Contrib American Ent Inst. 1976; 13: 1-144 [<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032011000200016>]

Ashraf U, Ye J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S. Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses*. 2006; 7: 219-38 [[10.3390/v7010219](https://doi.org/10.3390/v7010219)]

Avise JC. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman and Hall; 2004. 684 p.

Aytekin S, Aytekin AM, Alten B. Effect of different larval rearing temperatures on the productivity (R₀) and morphology of the malaria vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) using geometric morphometrics. *J Vector Ecol J Soc Vector Ecol*. 2009; 34:32–42 [[10.1111/j.1948-7134.2009.00005.x](https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2009.00005.x)]

Bergmann C, Verhältnisse U, Warmeökonomie T, Grosse Z. Göttingen: Studien; 1848. 595 p.

Briggs, J. C. Do centers of origin have a center?. *Paleobiol*.1981; 7: 305-307.

Charlwood S, Bragança M. The Effect of Ambient Temperature on the Size of *Anopheles funestus* From Southern Mozambique. *J Medical Ent*. 2012; 5:1154-158 [[10.1186/1475-2875-2-2](https://doi.org/10.1186/1475-2875-2-2)]

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Petersen V, Viana AF, Cunha MP, Wiley M, Ladner J, Prieto K, Palacios G, Costa D, Suesdek L, Zanotto PMA, Capurro ML. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. *PLoS Neglec Trop Dis*. 2017; 11: 1-1. [<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005630>]

Demari-Silva B, Foster PG, Oliveira TM P, Bergo E S, Sanabani SS, Pessôa R, Sallum MAM. Mitochondrial genomes and comparative analyses of *Culex camposi*, *Culex coronator*, *Culex usquatus* and *Culex usquatissimus* (Diptera:Culicidae), members of the coronator group. *BMC Genomics*. 2015; 16: 831-42 [[10.1186/s12864-015-1951-0](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1951-0)]

Dibo MR, Menezes RMTD, Ghirardelli CP, Mendonça AL, Chiaravalloti-Neto, F. Presença de culicídeos em município de porte médio do Estado de São Paulo e

risco de ocorrência de febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 4:496-03 [http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011000400019]

Donnelly MJ, Simard F, Lehmann T. Evolutionary studies of malaria vectors. *Trends paras.* 2002; 18: 75-80 [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02198-5]

Gómez G, Jaramillo L, Correa M M. Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the *Albitarsis* Complex from Colombia. *Mol ecol resources.* 2013; 13: 1082-1092. [10.1111/1755-0998.12126]

Gutiérrez LA, Gómez GF, González JJ, Castro MI, Luckhart S, Conn JE. Microgeographic genetic variation of the malaria vector *Anopheles darlingi* root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83:38–47

Hardy CM, Court LN, Morgan MJ. The complete mitochondrial DNA genome of *Aedes vigilax* (Diptera: Culicidae). *Mit DNA Part A.* 2016; 27: 2552-553 [http://dx.doi.org/10.3109/19401736.2015.1038800]

Hardy CM, Court LN, Morgan M J, Webb CE. The complete mitochondrial DNA genomes for two lineages of *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae). *Mitochondrial DNA Part A.* 2016; 27: 2024-25 [http://dx.doi.org/10.3109/19401736.2014.974171]

Harrison RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol & Evol.* 1989; 4: 6-11 [https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90006-2]

Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:1347-50 [10.3201/eid1509.090442]

Hwang UW, Park CJ, Young T S, Kim W. One-step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. *Mol Phylogenet Evol.* 2001; 19: 345–52 [https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0940]

Foratinni OP: *Culicidologia Médica: Identificação, biologia, epidemiologia.* Vol 3. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2002; 549p.

Kambhampati S, Rai KS. Mitochondrial DNA variation within and among populations of the mosquito *Aedes albopictus*. *Genome.* 1991; 34:288–92 [doi: 10.1139/g91-046]

Kambhampati S, Smith PT. PCR primers for amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Mol Biol.* 1995; 4:233–6.[10.1111/j.1365-2583.1995.tb00028.x].

Librado P, Rozas J. DNASPv5: a software for comprehensive analysis of DNA. *Bioinformatics*. 2009; 25:1451–2. [10.1093/bioinformatics/btp187]

Lehr MA., Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn JE. Cryptic species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. *Annals Entom Soc Am*. 2015; 98: 908-17. [https://doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0908:CSITAN]2.0.CO;2]

Lorenz C, Patané JSL, Suesdek L. Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*. *Infection, Gen Evol*. 2015; 35:144–52 [10.1016/j.meegid.2015.08.011]

Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *P & V*. 2014; 7: 581-93 [10.1186/s13071-014-0581-8]

Morais SA, de Almeida F, Suesdek L, Marrelli MT. Low genetic diversity in Wolbachia-Infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. *Rev Inst Med Trop*. 2012; 54:325–9.

Motoki MT, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MAM. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infection, Gen and Evol*. 2012; 12: 1246-252 [10.1016/j.meegid.2012.04.002]

Oliveira TMP, Foster PG, Bergo ES, Nagaki S S, Sanabani SS, Marinotti O, Sallum MAM. Mitochondrial Genomes of *Anopheles* (*Kerteszia*) (Diptera: Culicidae) From the Atlantic Forest, Brazil. *J med ent*. 2016; 53:790-97 [10.1093/jme/tjw001]

Paupy C, LeGoff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Simon Z, Fontenille D. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12: 1260-269 [10.1016/j.meegid.2012.04.012]

Petersen V, Virginio F, Suesdek, L. Polymorphism in male genitalia of *Aedes* (*Ochlerotatus*) *scapularis* Rondani, 1848. 2017; *Bulletin of Entomological Research*, 1-4 [DOI: https://doi.org/10.1017/S0007485317000359].

Petersen V, Devicari M, Suesdek L. High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses. *P&V*. 2015; 8:1-9 [10.1186/s13071-015-0740-6]

Phasomkusolsil S, Lerdthusnee K, Khuntirat B, Kongtak W, Pantuwatana K, Murphy JR. Effect of temperature on laboratory reared *Anopheles dirus* Peyton and Harrison and *Anopheles sawadwongporni* Rattanarithikul and Green. *Southeast Asian. J Trop Med Public Health*. 2011; 1:63-70.

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of *Ochlerotatus* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. *Zool J Linnean Society*. 2008; 153: 129-14 [10.1186/1471-2148-9-298]

Scarpassa, VM, Conn JE. Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi* sensu lato (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the COI gene from mitochondrial DNA. *Genet Mol Res*. 2006; 5: 493-02. [10.1186/1471-2148-9-298]

Taípe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. *Ver Saúde Pública*. 2003; 3:275-79 [<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102003000300002>]

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Phylogenet Evol*. 2013; 30:2725–9 [10.1093/molbev/mst197]

Vadivalagan C, Karthika P, Murugan K, Panneerselvam C, Paulpandi M, Madhiyazhagan P, Paramasivan R. Genetic deviation in geographically close populations of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of environmental barriers in South India. *Paras research*. 2016; 115: 1149-160 [10.1007/s00436-015-4847-7]

Vasconcelos PFC, Costa ZG, Travassos da Rosa ES, Luna E . An epidemic of jungle Yellow fever in Brazil, 2000. Implications of climatic alterations in disease spread. *J Med Virol* 2001; 65: 598-04 [10.1002/jmv.2078]

Vidal PO, Carvalho E, Suesdek L. Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. *Mem Inst Osw Cruz*. 2012; 07:1030–34 [<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000800011>]

Williams ST, Foster PG, Littlewood, DTJ. The complete mitochondrial genome of a turbinid vetigastropod from MiSeq Illumina sequencing of genomic DNA and steps towards a resolved gastropod phylogeny. *Gene*. 2014; 533: 38-47 [<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.005>]

Wilkerson RC, Linton Y M, Fonseca, DM, Schultz TR, Price DC, Strickman DA. Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PLoS One*. 2015 10:1-26 [<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0133602>]

CAPÍTULO 2 - MONTAGEM DE GENOMA MITOCONDRIAL COMPLETO GERADO POR NEXT GEN SEQUENCING EM *Aedes scapularis*.

Este capítulo teve como objetivo demonstrar como foram montados 37 genes mitocondriais sequenciados em Next Gen Sequencing (NGS) de 18 indivíduos da espécie *Aedes scapularis*. Para alcançar tal objetivo foram utilizados os softwares “Mimicking Intelligent Read Assembly” (MIRA) e algoritmo de “Mitochondrial Baiting and Iterative Assembly” (MITObim) que permitem a montagem e mapeamento dos genes mitocondriais;

Montagem de genoma mitocondrial completo gerado por Next GenSequencing em *Aedes scapularis*.

Vivian Petersen¹ (vivianpetersen@usp.br), Lincoln Suesdek^{1,3} (lincoln.suesdek@butantan.gov.br).

1. Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan. Av. Vital Brazil - 1500, São Paulo, SP, Brazil - 05503-000.

2. Programa de Pós-Graduação Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes - 2415, São Paulo, SP, Brasil - 05508-900.

3. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar - 470, São Paulo, SP, Brasil - 05403-000.

4.1 Introdução

O DNA mitocondrial animal extracromossômico é relativamente pequeno, apresentando cerca de 15.000 kb de tamanho e sua estrutura está organizada em 37 genes: 2 genes para rRNAs, 13 para proteínas, 22 para tRNAs e uma região não-codificadora que controla a replicação e transcrição do material genético da mitocôndria (Boore, 1999). Devido à rápida evolução, riqueza de informações e falta de recombinação, o DNA mitocondrial é muito utilizado em estudos de diversidade genética inclusive para investigação populacional e filogenética de várias espécies, mostrando-se uma poderosa ferramenta para a inferência de relações ancestrais (Demari-Silva et al., 2015; Lemos et al., 2015; Zhang et al., 2016). O filo Arthropoda é muito investigado em relação ao seu DNA mitocondrial, dentro da família Culicidae foram realizados estudos utilizando este conjunto de genes para a compreensão da estrutura populacional, pesquisa de espécies de complexo e em estudos filogenéticos (Behura et al., 2011; Hua et al., 2016). Com o desenvolvimento da tecnologia de Next-Generation Sequencing (NGS) para plataformas como Ion torrent, Illumina e Solid, o sequenciamento dos 37 genes pode ser realizado de forma rápida e eficaz e para seu “assembly” foram desenvolvidas ferramentas como “Mimicking Intelligent Read Assembly” (MIRA) e algoritmo “Mitochondrial Baiting and Iterative Assembly” (MITObim). Estes softwares permitem a montagem e o mapeamento de reads obtidos por NGS em sequências contínuas chamadas de “contigs”. Utilizando estes algoritmos é possível realizar montagens e mapeamento de sequências alvos completas do DNA mitocondrial *de novo* ou utilizar sequências referências previamente montadas como auxílio para montagem do contig estendido.

O sequenciamento do DNA mitocondrial completo por indivíduo vem se tornado mais comum, pois devido à quantidade elevada de dados gerados, consegue responder melhor a algumas hipóteses biológicas em relação à utilização de apenas um ou alguns marcadores mitocondriais como: *COI*, *ND4*, *COII*. Uma vez que o DNA mitocondrial completo vem se tornando cada vez mais comum em estudos envolvendo mosquitos, propomos neste trabalho um resumo técnico sobre o procedimento de montagem e mapeamento dos 37 genes mitocondriais sequenciados do mosquito *Aedes scapularis*, e como pode ser realizada a “filtragem” do DNA do mosquito infectado com o DNA do

“hospedeiro” sequenciado por NGS, pois encontramos junto ao DNA de mosquitos fêmeas o DNA de mamíferos, no qual acreditamos que estava no sangue do abdome do mosquito.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Métodos moleculares

Foram coletados 19 indivíduos a fim de aumentar as chances de representabilidade da espécie *Aedes scapularis* em 4 diferentes municípios do Brasil: Ananindeua-PA, Itaboraí-RJ, São Paulo-SP e Poço-Redondo-SE. Foram extraídos o DNA desses 19 mosquitos utilizando o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, California, USA), seguindo o protocolo do produto. Em seguida foi realizada a primeira extensão do DNA pela técnica de PCR longo segundo Oliveira et al. (2015), utilizando os primers degenerados e palindrômicos: HPK16Saa 5' ATG CTA CCT TTG CAC RGT CAA GAT ACY GCG GC 3 e HPK16Sbb 5' CTT ATC GAY AAA AAA GWT TGC GAC CTC GAT GTT G 3' (Hwang et al., 2001). Após esta primeira extensão foi feita a quantificação do DNA total utilizando o kit "Qubit® dsDNABR Assay Kit, logo depois ocorreu a etapa de Tagmentação e segunda amplificação da PCR. Em seguida foi realizada a Quantificação do DNA por PCR Real Time: o reagente utilizado foi KAPA-KK482 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal) e Aplicação da biblioteca da amostra no MiSeq.

4.2.2 Montagem e mapeamento dos genes mitocondriais

As montagens e mapeamento dos 37 genes mitocondriais dos 19 indivíduos da espécie *Aedes scapularis* foram realizadas em softwares que utilizam o sistema operacional Linux. A primeira etapa foi de visualizar e analisar a qualidade das amostras de DNA mitocondriais sequenciadas (arquivos Fastq) no software de interface gráfica Table (Milne et al., 2010). Após a verificação da qualidade das amostras foi iniciada a montagem e mapeamento dos "reads" em contigs em torno de 15.000 kb, que corresponde ao número aproximado do DNA mitocondrial completo em mosquitos (Demari et al., 2015; Hardy et al., 2015), para tal finalidade foram utilizados os softwares "Mira Assembly 4" e MITObim 1.8. Para a extensão "de novo" do DNA mitocondrial foram utilizados os seguintes parâmetros no programa Mira Assembly, antes editados no software de texto "GNU Emacs" (Stallman, 2007):

```
PROJECT = NAME OF PROJECT
```

```
JOB = GENOME, ACCURATE
```

```
READGROUP = TEST_1
```

```
AUTOPAIRING
```

```
DATA = 178-14_S2_L001_R1_001.FASTQ 178-14_S2_L001_R2_001.FASTQ
```

```
*
```

```
TECHNOLOGY = SOLEXA
```

```
PARAMETERS = -NW:CMRNL=WARN -NW:CAC=NO
```

* Dado a ser analisado em formato fastq: arquivo R1 e R2. Foi utilizado como exemplo o indivíduo 178-14 da população de Belém, cujo os arquivos apresentam os seguintes rótulos R1= 178-14_S2_L001_R1_001 e R2= 178-14_S2_L001_R2_001

Após a edição destes parâmetros foi realizado o seguinte comando no programa MIRA Assembly:

MIRA MANIFEST

Após a execução deste comando, foi verificado se o contig estendido apresentou o comprimento de 15.000 kb. Caso a extensão do DNA não tenha alcançado o comprimento 15.000 kb, foi utilizado o seguinte comando para a redução dos reads e assim facilitar a extensão da montagem do contig:

```
sed -N '1,40000P' 178-14_S2_L001_R1_001.FASTQ >  
FEW_READS_R1.FASTQ
```

```
sed -N '1,40000P' 178-14_S2_L001_R1_001.FASTQ >  
FEW_READS_R2.FASTQ
```

Observação: 1,40000p- corresponde ao número de reads a serem analisados

Em seguida, foi utilizado mais uma vez o seguinte comando:

MIRA MANIFEST

Para a junção dos arquivos de Fastq R1 e R2 para a etapa posterior da montagem foi executado o comando seguinte:

```
CAT 178-14_S2_L001_R1_001.FASTQ 178-14_S2_L001_R2_001.FASTQ >  
FEWER_READS_JUNTO.FASTQ
```

Logo após este comando os seguintes parâmetros foram editados no GNU Emacs e então executados no Mira Assembly 4:

```
PROJECT = INITIAL-MAPPING-TESTPOOL-SALPINUS-MT
```

```
JOB=GENOME,MAPPING,ACCURATE
```

```
PARAMETERS = -NW:MRNL=0 -AS:NOP=1 SOLEXA_SETTINGS -  
CO:MSR=NO
```

```
READGROUP  
IS_REFERENCE  
DATA = CONTIG.FASTA  
STRAIN = NOME
```

```
READGROUP = READS  
DATA = FEW_READS_R1.FASTQ FEW_READS_R2.FASTQ  
TECHNOLOGY = SOLEXA  
STRAIN = TESTPOOL
```

e então foi executado: [MIRA MANIFEST.CONF](#)

No campo “data” dos parâmetros, foi utilizado um contig previamente montado como molde de referência para extensão da montagem e mapeamento dos genes mitocondriais. O contig de referência pode ser o maior contig montado da própria amostra previamente estendido no programa Mira Assembly ou pode ser utilizada uma sequência de DNA mitocondrial completa de mosquito depositada no GenBank. No presente estudo foram utilizadas como referência para a montagem das 19 amostras de DNA mitocondrial de *Aedes scapularis*, 4 sequências previamente montadas de DNA mitocondrial completo de culicídeos, depositados no GenBank. Foram selecionadas as amostras a seguir como referência, por pertencerem ao gênero *Aedes* e apresentarem proximidade filogenética com a espécie *Aedes scapularis*: *Aedes vigilax* (KP995260.1), *Aedes albopictus* (AY072044.1), *Aedes aegypti* (EU352212.1) e *Aedes notoscriptus* (KM676218.1). E em seguida foram executados os seguintes comandos no software MITObim:

```
MITOBIM_1.8.PL -START 1 -END 10 -SAMPLE TESTPOOL -REF INITIAL-
MAPPING-TESTPOOL-SALPINUS-MT -READPOOL
FEWER_READS_JUNTO.FASTQ -MAF INITIAL-MAPPING-TESTPOOL-
SALPINUS-MT_ASSEMBLY/INITIAL-MAPPING-TESTPOOL-SALPINUS-
MT_D_RESULTS/INITIAL-MAPPING-TESTPOOL-SALPINUS-MT_OUT.MAF
```

Após a o uso deste comando, o software MITObim irá ampliar o contig anteriormente montado no software Mira 4 Assembly, através de algumas iterações (Tabela 1). Após a conclusão da montagem dos contigs, os 37 genes mitocondriais foram anotados automaticamente no software MITOS Web Server (Bernt et al., 2013).

Todos os 37 genes montados foram verificados no “Blastn”, aplicativo online vinculado ao GenBank onde foram observadas as taxas de identidade destes genes com os de outras espécies de mosquitos da família Culicidae depositados no GenBank.

4.2.3 Filtragem das amostras de DNA de mosquito com DNA do hospedeiro

Para separar o DNA mitocondrial do mosquito do DNA mitocondrial do mamífero picado, foram realizados os mesmos procedimentos para a montagem dos 37 genes mitocondriais e foram utilizados os mesmos 4 moldes de referência empregados para a montagem e mapeamento dos demais mosquitos não-infectados como descrito no item 2.2. Para a montagem do DNA mitocondrial de *Homo sapiens* (Figura 1) separando-o do DNA mitocondrial do mosquito foram realizados os mesmo procedimentos do item 2.2, contudo foi utilizado como molde de referência para a montagem dos genes o contig de *homo sapiens* depositado no GenBank com número de acesso KX953877.1. O mesmo foi feito para a montagem do DNA mitocondrial de *Equus caballus* (Figura 2) presente em uma amostra de DNA mitocondrial de *Aedes scapularis*, contudo foi utilizado o contig com número de acesso JQ340140.1 no GenBank, como molde para a montagem dos genes mitocondriais

Tabela 1- Número de iterações utilizadas por amostra para alcançar a extensão correspondente do contig.* Mosquitos em que ocorreu a amplificação do DNA do mamífero picado.

ID of sample	Local da coleta	Iterations	Comprimento
103-42	Itaboraí-RJ	4	11.219
103-5	Itaboraí-RJ	4	13.488
103-57	Itaboraí-RJ	9	14.147
103-6*	Itaboraí-RJ	1	10.738
103-7*	Itaboraí-RJ	1	4.827
178-12	Ananindeua-PA	4	14.285
178-25	Ananindeua-PA	10	8.224
178-14	Ananindeua-PA	4	13.794
178-24*	Ananindeua-PA	1	11.063
182-27*	Poço-Redondo-SE	1	5.877
182-34	Poço-Redondo-SE	3	14.039
182-36	Poço-Redondo-SE	3	11.358
182-38	Poço-Redondo-SE	1	14.224
BUT-2	São Paulo-SP	16	13.987
BUT-3	São Paulo-SP	6	14.582
BUT-4*	São Paulo-SP	1	12.944
BUT-5	São Paulo-SP	1	12.630
BUT-6	São Paulo-SP	1	9.454
BUT-7*	São Paulo-SP	1	14.135

Tabela 2- Posição de cada gene ao longo da extensão da mitocôndria e comprimento de cada gene de *Aedes scapularis*.

Nome	Comprimento
Lisidina sintase	69
tRNA-Gln ligase	69
tRNA-Met	69
NADH desidrogenase subunidade 2	987
tRNA-Trp ligase	69
Cisteína-tRNA ligase tRNA-Cys	67
tirosina—tRNA ligase	66
Citocromo oxidase subunidade 1	1509
Leucina—tRNA ligase	67
Citocromo oxidase subunidade 2	675
tRNA-Lys	71
tRNA-Asp	70
ATP sintetase F0 subunidade 8	159
ATP sintetase F0 subunidade 6	786
Citocromo oxidase subunidade 3	340
Glicina—tRNA ligase	67
NADH desidrogenase subunidade 3	339

Tabela continuada

Arginina—tRNA ligase	64
Alanina—tRNA ligase	67
Aspartato—tRNA(Asn) ligase	69
Serina—tRNA ligase	67
Glutamina-tRNA reductase	66
Fenilalanina—tRNA ligase	67
NADH desidrogenase subunidade 5	1686
Histidina—tRNA ligase	66
NADH desidrogenase subunidade 4	1335
NADH desidrogenase subunidade 4L	267
Treonina—tRNA ligase	66
Prolina—tRNA ligase	67
NADH desidrogenase subunidade 6	504
Citocromo b	1108
Serine—tRNA ligase	66
NADH desidrogenase subunidade 1	909
tRNA-Leu	68
Subunidade ribossomal larga- RNA	1363
Valina—tRNA ligase	72
Subunidade ribossomal pequena- RNA	792

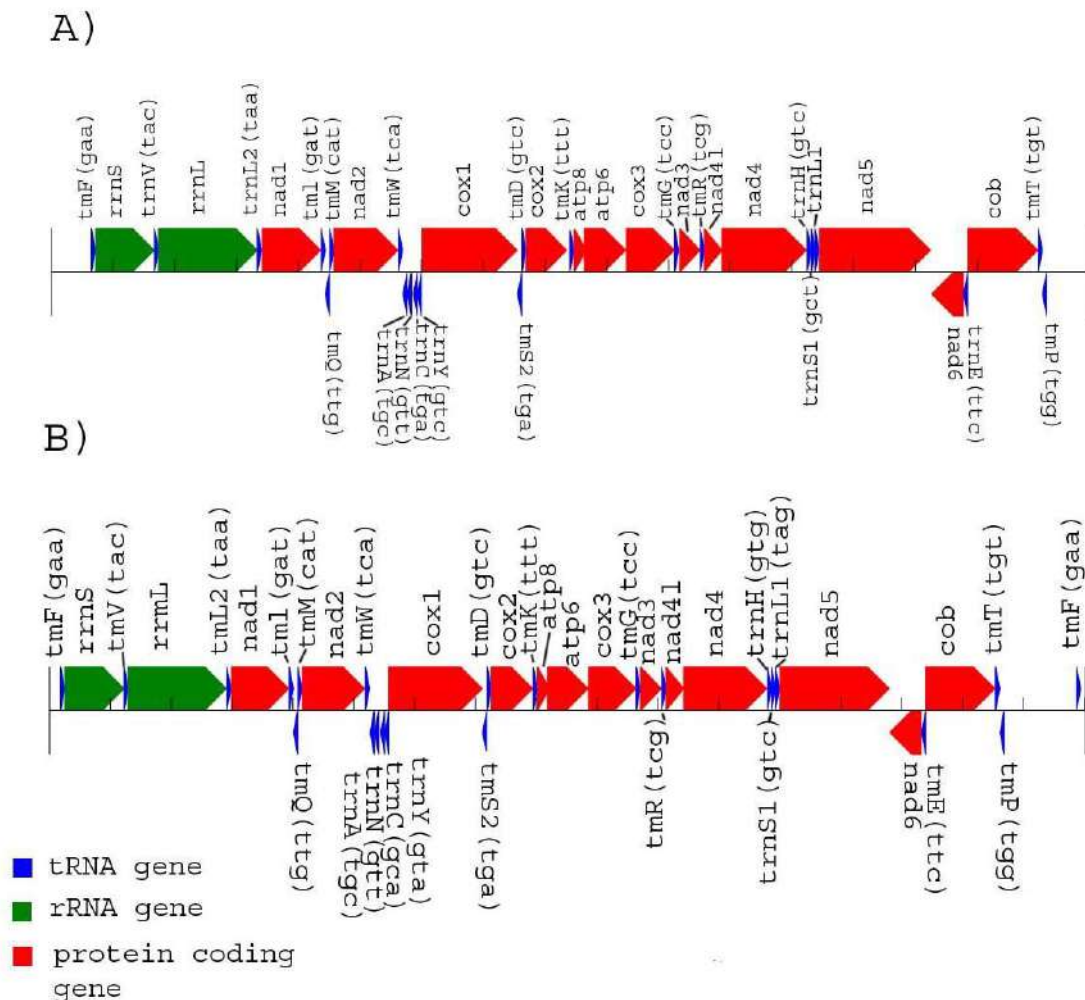
4.3 Resultados e Discussão

Foi possível montar genoma útil para reconstruções filogenéticas que propiciaram o estudo de complexo de espécies em *Aedes scapularis* (Capítulo 1). A construção dos genes mitocondriais servirá como base para novos estudos envolvendo genética de culicídeos. Foi realizada a montagem dos genes mitocondriais de 19 mosquitos da espécie *Aedes scapularis* analisados (Tabela 2), utilizando DNA de referência de quatro espécies do gênero *Aedes* previamente sequenciadas e depositadas no GenBank. Foi utilizado um número grande de indivíduos para aumentar a representatividade para o estudo de estruturação, caracterização populacional e investigação de complexo de espécies. Foi possível amplificar mais de 10.000 kb em 15 indivíduos do total analisado, contudo não foi possível realizar a montagem completa de todos 37 genes de todos os indivíduos analisados, contudo os softwares de mapeamento MIRA 4 e MITObim mostraram-se ferramentas eficazes para o desempenho desta tarefa. Devido a esta eficácia estes softwares são os mais utilizados atualmente em estudo de DNA completo para a montagem e mapeamento dos genes mitocondriais na família Culicidae (Demari et al., 2015; Lemos et al., 2015; Chu et al., 2016).

Do total de indivíduos analisados foram encontrados 6 indivíduos “infectados” com DNA presente no sangue ingurgitado de seu organismo parasitado. Destes 5 mosquitos estavam ingurgitados com sangue de *Homo sapiens* e um indivíduo estava ingurgitado com sangue de *Equus caballus*. Foi possível separar o DNA do hospedeiro do mosquito em relação ao DNA do mosquito, utilizando o software MITObim e tendo como referência sequências de DNA de outras espécies de mosquito depositados no GenBank. Foram montados os 37 genes mitocondriais de *Homo sapiens* e *Equus caballus* (Figura 1) “filtrados” dos 6 mosquitos ingurgitados.

Até então não havia registros na literatura relatando a amplificação de DNA do hospedeiro do mosquito presente no sangue ingurgitado pelo mesmo, utilizando os primers HPK16Saa e HPK16Sbb. Estes dois primers são universais para artrópodes, degenerados e palindrômicos (Hwang et al., 2000) e foram desenhados no gene 16S. Apesar de o gene 16S ser conservado em artrópodes (Boore et al., 1999), acreditamos que provavelmente a região onde os primers foram desenhados permitiu a amplificação dos genes mitocondriais das espécies *Homo sapiens* e *Equus caballus*. Hahn et al. (2013) demonstrou que é possível separar o DNA do ectoparasita do gênero *Gyrodactylus* presente na pele do peixe, do DNA do peixe amplificado. Aquele autor trabalhou com espécies do peixe teleósteo *Thymallus thymallus* e a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* e para separar o DNA do peixe do seu ectoparasita foi utilizado o software MITObim. Como molde de referência para o mapeamento do contig foi utilizado o genoma de quatro salmonídeos: salmão atlântico (*Salmo Salar*), do ártico (*Salvelinus alpinus*), o europeu (*T. thymallus*) e da truta arco-íris (*O. mykiss*).

Figura 1- A) Estrutura dos 37 genes mitocondriais de *Equus caballus*, separados do DNA mitocondrial de *Aedes scapularis*. B) Estrutura dos 37 genes mitocondriais de *Homo sapiens*, separados do DNA mitocondrial de *Aedes scapularis*.



A técnica de Next Gen Sequencing aumenta a velocidade e produção de grande volume de material de forma barata, rotineira, facilitando os estudos com DNA mitocondrial completo de diversas espécies. Atualmente já foram sequenciados os genomas mitocondriais completos de várias espécies de mosquito de importância médica como: *Aedes aegypti* (Behura et al., 2011), *Aedes vigilax* (Hardy et al., 2016), *Anopheles gambiae* (Beard et al., 1993), *Anopheles bellator*, *Anopheles homunculus* (Oliveira et al., 2016), entre outros mosquitos. O aumento do número de dados gerados sobre estes mosquitos vetores, em estudos de caracterização genética e populacional, filogenia e de complexo de espécies pode auxiliar na vigilância e controle destes mosquitos evitando assim a propagação das doenças transmitidas pelos mesmos.

4.4 RESUMO

A técnica de sequenciamento Next Gen Sequencing (NGS) facilita e barateia o desenvolvimento de estudos com genomas mitocondriais completos. Aliado a isso, foram desenvolvidos softwares “Mimicking Intelligent Read Assembly” (MIRA) e algoritmo de “Mitochondrial Baiting and Iterative Assembly” (MITObim) que permitem a montagem e mapeamento dos 37 genes mitocondriais de maneira eficaz e não exigem conhecimentos avançados na área de bioinformática. Devido à rápida evolução e riqueza de informações, o DNA mitocondrial é muito utilizado em estudos de investigação populacional e filogenética de várias espécies incluindo a família Culicidae. Devido à facilidade e aumento atual do desenvolvimento de estudos com DNA mitocondrial completo na área da Culicidologia, propomos neste trabalho demonstrar como pode ser feita a montagem e mapeamento de genes mitocondriais sequenciados por NGS e como é realizada a filtragem dos genes de mosquitos infectados com DNA do hospedeiro. Foram montados os genes mitocondriais de 19 indivíduos da espécie *Aedes scapularis*, para estudo de investigação de complexo de espécies e polimorfismo molecular deste mosquito. Em meio aos indivíduos analisados, foi amplificado em 6 mosquitos o DNA do hospedeiro picado, sendo foi possível separar o DNA mitocondrial do mosquito, do DNA mitocondrial amplificado do hospedeiro (*Homo sapiens* e *Equus caballus*) utilizando o software MITObim. Os estudos com DNA mitocondrial completo vêm aumentando na família Culicidae, e esta genotipagem auxilia no conhecimento sobre estrutura populacional, diversidade populacional, dispersão da espécie e pode indiretamente melhorar a vigilância epidemiológica de espécies vetoras.

REFERÊNCIAS*

Beard CB, Hamm D, Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Ins mol bio*. 1993; 2: 103-24 [10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x]

Behura SK, Lobo NF, Haas B, Lovin DD, Shumway MF, Puiu D, Severson DW. Complete sequences of mitochondria genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. *Ins bio mol biol*. 2011; 41: 770-77 [10.1016/j.ibmb.2011.05.006]

Bernt MA, Donath F, Juhling F, Externbrink C, Florentz G, Fritzsche J, Putz M, Middendorf. MITOS: improved de novo Metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol Phy Evol*. 2013; 69: 313–19 [10.1016/j.ympev.2012.08.023]

Boore JL . Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*.1999; 27: 1767–80. [https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767]

Chu H, Wu, Z Zhang, H Li C, Wang G, Zhou M, Zhao T. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) in China. *Mit DNA Part B*.2016; 1: 365-66 [http://dx.doi.org/10.1080/23802359.2016.1168719]

Hua YQ, Yan ZT, Fu WB, He QY, Zhou Y, Chen B. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome in *Anopheles culicifacies* species B (Diptera: Culicidae). *Mit DNA Part A*. 2016; 27: 2909-910 [10.3109/19401736.2015.1060434]

Demari-Silva B, Foster PG, Oliveira TMP, Bergo ES, Sanabani, SS, Pessôa R, Sallum M A M. Mitochondrial genomes and comparative analyses of *Culex camposi*, *Culex coronator*, *Culex usquatus* and *Culex usquatissimus* (Diptera:Culicidae), members of the coronator group. *BMC Gen*. 2015; 16: 831-43 [10.1186/s12864-015-1951-0]

Hahn C, Bachmann L, Chevreux B. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads—a baiting and iterative mapping approach. *Nucl acid reser*. 2013; 41:1-9 [https://doi.org/10.1093/nar/gkt371]

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Hardy CM, Court L N, Morgan MJ. The complete mitochondrial DNA genome of *Aedes vigilax* (Diptera: Culicidae). *Mit DNA Part A*. 2016; 27: 2552-55 [10.3109/19401736.2015.1038800]

Hwang UW, Park CJ, Yong TS, Kim W. One-step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. *Mol phyl evol*. 2001; 19: 345-52 [10.1006/mpev.2001.0940]

Lemos PDS, Monteiro HADO, Castro FC, Lima CPSD, Silva DEAD, Vasconcelos JMD, Nunes MRT. Characterization of mitochondrial genome of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae). *Mit DNA*. 2015; 28:50-1 [10.3109/19401736.2015.1110793]

Milne I, Bayer M, Cardle L. Tablet—next generation sequence assembly visualization. *Bioin*. 2010; 26: 401–2 [https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp666]

Oliveira TMP, Foster PG, Bergo ES, Nagaki SS, Sanabani SS, Marinotti O, Sallum MA.M. Mitochondrial Genomes of *Anopheles* (Kerteszia)(Diptera: Culicidae) From the Atlantic Forest, Brazil. *J Med ent*. 2016; 53:790-97 [10.1093/jme/tjw001]

Stallman RM. *Gnu Emacs Manual: For Version 22*. 2002. Free Software Foundation.

Zhang H, Xing D, Wang G, Li C, Zhao T. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in China. *Mit DNA Part A*. 2016; 27: 2787-788 [10.3109/19401736.2015.1053067]

5 CONCLUSÕES GERAIS

A espécie *Aedes scapularis* é genética e morfológicamente muito polimórfica. Seu alto polimorfismo foi constatado nos diferentes marcadores biológicos empregados na presente tese: Morfometria geométrica alar, gene Citocromo Oxidase Subunidade I e DNA Mitocondrial Completo. Estes diferentes marcadores apresentaram vários níveis de sensibilidade em relação à estruturação populacional, variando de ausência de estruturação com o gene *COI* até detecção de alta estruturação populacional revelada pela análise de filogenia bayesiana dos 13 GCPs. Os resultados obtidos das análises individuais e conjunta de todos os marcadores utilizados nos capítulos trabalhados nesta tese, não confirmaram a suspeita de a presença de complexo de espécies em *Aedes scapularis*. Concluímos então que o mosquito *Ae. scapularis* é uma espécie que provavelmente compreende uma única entidade taxonômica.

APÊNDICE 1

1.2 Amostras trabalhadas nos capítulos 1 e 2

Para o desenvolvimento dos capítulos 1 e 2 foram coletadas amostras populacionais de *Aedes scapularis* em biomas de Mata Atlântica, Caatinga e Região Amazônica. Estas amostras foram coletadas por Petersen V ou Devicari M entre os anos de 2009 a 2014 (tabela 1):

1.2.1 ANA (Capítulo 1 e 2)-Ananindeua-PA

Amostra coletadas durante o doutorado de Petersen V no horto do Instituto Evandro Chagas da cidade de Ananindeua-PA. A cidade de Ananindeua está a cerca de 19 km da capital Belém-PA. Este município é de clima equatorial, tipicamente úmido apresentando regiões de mata secundária em vários estágios, devido ao desmatamento para a plantação de espécies alimentícias (site da prefeitura <http://www.ananindeua.pa.gov.br/#default.index.inicial>)

Figura 1- Visão aérea do Instituto Evandro Chagas. O instituto é cercado por grande área de mata de secundária. Fonte: www.google.com



1.2.2 BUT-1 (Capítulo 1 e 2) e BUT-2 (Capítulo 2) -Instituto Butantan

A amostra BUT-1 foi coletada durante o mestrado de Devicari, M e a amostra BUT-2 foram coletadas durante o doutorado de Petersen V no Horto Oswaldo Cruz no Instituto Butantan em São Paulo. O horto do Instituto Butantan, está inserido em meio ambiente urbano, então a importância de incluir amostras deste local no estudo, pois podem auxiliar no entendimento do processo de domiciliação desta espécie. Este bosque apresenta espécies de culicídeos de vários gêneros: *Aedes*, *Culex*, *Haemagogus*, *Psorophora* e *Toxorhynchites* (Comunicação pessoal com Virginio, F e Lorenz, C).

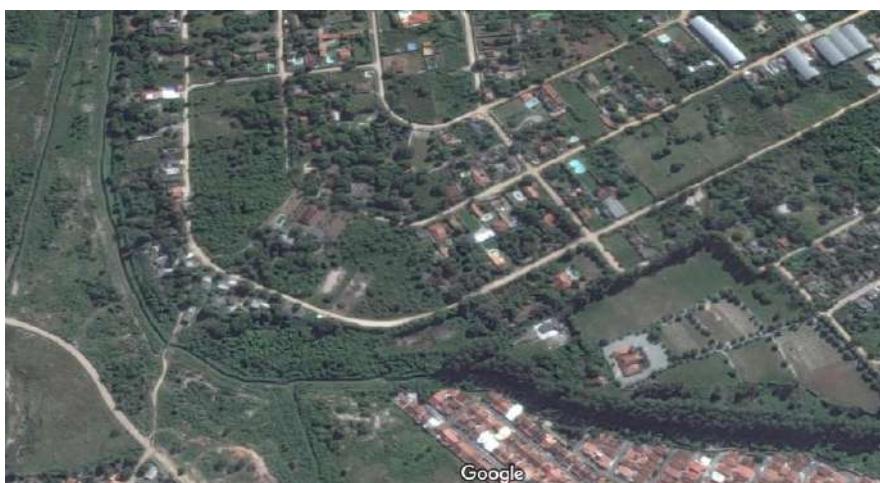
Figura 3- Mata do horto inserido no Instituto Butantan-SP
Fonte: www.google.com.



1.2.3 ITA (Capítulo 1 e 2)- Itaboraí-RJ

Amostra coletada durante o mestrado de Petersen, V (Petersen, 2012) no município de Itaboraí-RJ localizado a 40 km da capital Rio de Janeiro, esta cidade é composta por regiões de pastagens, brejos, mata de encosta e mangues. A mata se encontra fragmentada pelo município.

Figura 3- Município de Itaboraí- RJ. Este município apresenta várias regiões com pasto. Fonte: www.google.com.



1.2.4 PAR (Capítulo 2)- Pariquera- Açu

Esta amostra foi coletada durante o mestrado de Devicari, M (Devicari 2010) no município de Pariquera-Açu (SP), muitos estudos já foram realizados com os culicídeos nesta região. Este município foi afetado pela epidemia do

vírus Rocio na década de 1970. Nesta época o *Ae. scapularis* foi apontado como possível vetor do vírus nesta localidade e em todo Vale do Ribeira.

Figura 4- Município de Itaboraí. Esta cidade está dentro do Vale do Ribeira

Fonte: www.google.com.



1.2.5 PET-1 (Capítulo 2) - Parque ecológico do Tietê

As coletas neste local foram realizadas durante o doutorado de Petersen V. Localizado na zona leste da cidade de São Paulo fazendo divisa com Guarulhos, o parque ocupa uma região de 12 milhões de m², região está coberta por mata atlântica. O local recebe ampla visitação pública, cerca de 5.000 visitantes por mês.

Este parque apresenta área de visitação pública e um centro de recepção de animais silvestres "C.R.A.S" que abriga cerca de 2.000 espécies. Entre estas espécies está a presença de araras, pássaros pretos, tucanos, papagaios, canários da terra, periquitos e coleirinhas, lagartos, jabutis, saguis, macacos-prego, quatis, antas, catetos e gambás (site do C.R.A.S). Algumas destas espécies podem ser reservatórios de arbovírus.

Figura 5- Parque ecológico do Tietê. Dentro do parque podem ser observadas a presença de vários fragmentos de mata. Fonte: www.google.com.



1.2.6 PRE (Capítulo 1 e 2)- Município de Poço redondo- SE

Amostra coletada durante doutorado de Petersen, V na “Grotta do Angico”, região localizada no município de Poço Redondo-SE, próximo ao Rio São Francisco. Esta localidade apresenta bioma de caatinga, onde ocorre a presença de vegetação seca e arbustiva, apresenta alta temperatura, chuvas escassas e irregulares ao longo do ano (fonte). Atualmente ainda existem poucos trabalhos desenvolvidos na caatinga relacionados aos culicídeos, portanto, ainda não se sabe se as espécies deste ambiente de grande pressão apresentam alto polimorfismo.

Figura 6 - Margem do Rio São Francisco na Grotta do Angico- Poço Redondo-SE. Fonte: www.google.com



1.2.7 TRE (Capítulo 2)- Município de Tremembé

Esta amostra foi coletada durante o mestrado de Petersen, V no município de Tremembé-SP, cidade do Vale do Paraíba, localizada a 133 km de São Paulo e 309 km do Rio de Janeiro. O município está cercado por morros, composto por várzeas e mata tipicamente secundária. O local escolhido para coleta dentro do município foi a chácara “Santa Madalena”, por apresentar abundância da espécie estudada. O local apresenta fragmento bastante modificado de mata em meio ao ambiente urbano.

Figura 8- Vista aérea do município de Tremembé. A cidade apresenta vários fragmento de mata secundária ao seu redor. Fonte: www.google.com.



Tabela 1- Dados das amostras já coletadas de *Ae. scapularis*, em seis localidades brasileiras. M.G= Morfometria geométrica; COI= Gene Citocromo Oxidase Subunidade I e DNA mitocondrial completo.*Amostras trabalhadas por Devicari, M durante o desenvolvimento de seu mestrado. + Amostras trabalhadas por Petersen V durante o desenvolvimento do mestrado.

ID	Município	Coletor	Número de amostras COI	Número de amostras MG	Número de amostras mtDNA completo	Data da coleta	Cordenadas geográficas
BUT *	São Paulo-SP	Devicari, M	10	39	-	Fev/2009	23 ⁰ 32" 45" S 46 ⁰ 43" 39" O
BUT +		Petersen, V	-	-	06	Set/2015	
PET +		Petersen, V	34	29	-	Abr/2011	23 ⁰ 29" 15" S 46 ⁰ 32" 90" O
ITA ⁺	Itaboraí-RJ	Petersen, V	36	30	05	Mar/2011	22 ⁰ 44" 51" S 42 ⁰ 51" 21" O
PAR*	Pariquera-SP	Devicari, M	21	25	-	Dez/2007 Mar/2008 Mai/2009	24 ⁰ 42" 37" S 47 ⁰ 53" 2" O
TRE ⁺	Tremembé-SP	Petersen, V	29	30	-	Nov/2010	22 ⁰ 57" 12" S 45 ⁰ 3" 28" O
ANA ⁺ (doutorado)	Ananindeua-PA	Petersen, V	14	33	04	Ago/2014	1 ⁰ 21' 59" S 48 ⁰ 22' 20" O
PRE ⁺ (doutorado)	Poço Redondo-SE	Petersen, V	18	28	04	Mai/2014	64 ⁰ 44" 67" S 89 ⁰ 33" 45" O

ANEXO A- High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of Filarias and arboviruses.

Este artigo foi desenvolvido durante meu doutorado no ano de 2015 e publicado na revista científica *Parasites & Vectors*. O artigo apresentou como objetivo a investigação de complexo de espécie e polimorfismo em *Aedes scapularis*. Este artigo foi elaborado com base nos resultados desenvolvidos por mim e pela Devicari M (Mais detalhes olhar Apêndice 1). As populações analisadas neste artigo (ITA, TRE, PAR, BUT e PET) foram reanalisadas durante meu doutorado juntamente as novas populações coletadas em Ananindeua- PA e Poço Redondo-SE.

RESEARCH

Open Access

High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses

Vivian Petersen^{1,2*}, Mariana Devicari^{1,2} and Lincoln Suesdek^{1,2,3}

Abstract

Background: *Ochlerotatus scapularis* is a potential vector of filarias and arboviruses in the Neotropics. This species was once typically associated with sylvatic environments; however, cases of synanthropy and urbanization of this species have been increasingly reported in southeast Brazil. Despite the medical relevance of *Oc. scapularis*, its populational variability is not yet known. To our knowledge, this is the first report describing the morphological and genetic variabilities of this species.

Methods: Population samples were characterized using the cytochrome oxidase subunit I (COI) mitochondrial gene and wing geometrics. Adult mosquitoes were collected from five sampling sites from remnants of the Atlantic forest embedded in the urban or rural areas of southeast Brazil.

Results: In the 130 individuals analyzed, 46 COI haplotypes were detected. Haplotype diversity was high and ranged from 0.66 to 0.97. Six haplotypes were present in 61% of the individuals, whereas the remaining haplotypes were less frequent (39%). Wing shape was also highly polymorphic. Differentiation of populations across sampling sites according to genetic distances ($F_{ST} = -0.009$ to 0.060) and morphological distances ($Q_{ST} = 0.47$) indicated that populations were not identical. No correlations were noted for phenetic and genetic diversities ($p = 0.19$) or for genetic or phenetic distances with geographical distances ($p = 0.2$ and $p = 0.18$, respectively).

Conclusions: Our study results suggest that *Oc. scapularis* has a rich genetic patrimony, even though its habitat is fragmented. Implications of such genetic richness with respect to vectorial competence, plasticity, and ability to exploit urbanized areas need to be further investigated.

Keywords: Plasticity, Population structure, Haplotype diversity, Morphological diversity

Background

Ochlerotatus scapularis (Rondani 1848) is a Neotropical culicid widely distributed in the southeastern region of Brazil [1]. This mosquito species is frequently found in remnants of the Atlantic Forest biome embedded in large rural or urban locations [2].

Nonetheless, in southeast Brazil, this species has been reported to occur in sylvan rural and urban ecotones [3,4] that are inhabited by millions of people. Remarkably, *Oc. scapularis* can be synanthropic and enter human dwellings [5], and has been increasingly reported to

inhabit urban parks. Although the larvae of *Oc. scapularis* preferentially develop in natural temporary pools of water in the soil, they might also exploit permanent natural or artificial water containers [6].

The concurrence of insects and humans in this case is particularly problematic, because this mosquito has vectorial competence for several human and animal pathogens such as Rocio virus [7]. *Oc. scapularis* was possibly involved in the transmission of Rocio encephalitis virus in the State of São Paulo (southeast Brazil). This human encephalitis epidemic [8] occurred between 1974 and 1978 in 20 municipalities of São Paulo, in which more than 1,000 people were infected, hundreds of deaths occurred, and an estimated 200 sequelae cases were reported.

* Correspondence: var_petersen@hotmail.com

¹Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

²Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro-Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



Outside southeast Brazil, this mosquito might also be a vector of the worms *Dirofilaria immitis* [9] and *Wuchereria bancrofti* [10], and the viruses Venezuelan Equine Encephalitis [11], Ilheus [12], and Melao [13]. The epidemiological importance of this mosquito vector is reinforced by its gonotrophic discordance: as females might need more than one blood repast during a single gonotrophic cycle, this increases their contact with possible hosts [14].

Heretofore, some key investigations such as biological variability of *Oc. scapularis* had not yet been performed. Even the remarkable population polymorphisms regarding chaetotaxy and genitalia, which were empirically reported by Arnell [15] and Forattini [1], have not been quantitatively investigated.

To better understand the biology of *Oc. scapularis*, we, for the first time, investigated the populational variability of this species. We then compared population samples collected from some southeast Brazil municipalities with epidemiologically relevant conditions by using largely used genetic (mitochondrial COI gene) and morphological (wing geometry) markers.

Methods

Collection of mosquitoes

Sampling sites were located adjacent to the remnants of the southeastern Brazilian Atlantic Forest. Between 2007

and 2011, adult mosquitoes were collected using a portable insect aspirator from five locations (map with geographic coordinates shown in Figure 1): Parque Ecológico do Tietê (PET), Butantan neighborhood (BUT), Tremembé (TRE), Itaboraí (ITA), and Pariquera-Açu (PAR). The epidemiological relevance of the sampling locations is that some sites are urban parks located in areas inhabited by several millions of people, such as PET and BUT in São Paulo city (State of São Paulo). PAR was affected by the Rocio outbreak in 1974; it is a small urban locality surrounded by rural areas with buffalo ranches and rice paddies. TRE and ITA are located near rural areas inhabited by several thousands of people.

Owners of private properties and administrators of public parks authorized the mosquito collection. More collection details are shown in Table 1. Mosquitoes were identified down to the species level using taxonomic keys for female adult mosquitoes [1], and were individually placed in 1.5 ml microtubes with silica gel beads at room temperature until DNA and wing extraction.

DNA amplification and sequencing

A partial fragment of the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I (COI) of the five populations was comparatively analyzed. Extraction of DNA was performed according to the Vidal & Suesdek [16]. The COI gene was chosen because it is a sensitive indicator of spatial genetic

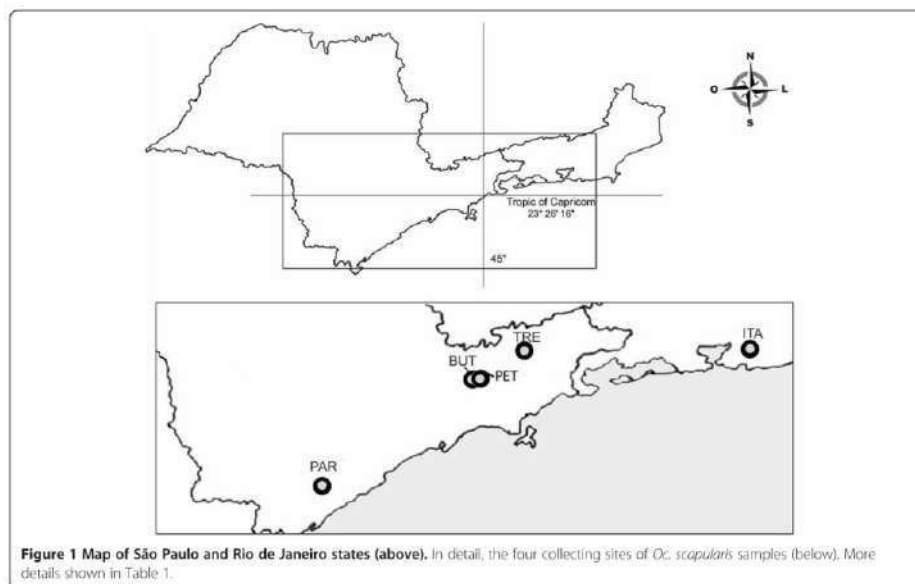


Figure 1 Map of São Paulo and Rio de Janeiro states (above). In detail, the four collecting sites of *Oc. scapularis* samples (below). More details shown in Table 1.

Table 1 Data of five samples *Oc. scapularis* collected in Brazil

Sample ID	Municipality	Locality	Number of samples (COI)	Number of samples (morphometrics)	Data	Geographic coordinates
PET	São Paulo	Parque Ecológico do Tietê	34	29	April/2011	23° 29' 15" S 46° 31' 90" W
BUT	São Paulo	Horto Instituto Butantan	10	39	February/2009	23° 32' 44" S 46° 43' 39" W
ITA	Itaboraí	Pasture	36	30	March/2011	22° 44' 51" S 42° 51' 21" W
TRE	Tremembé	Fazenda Santa Cecília	29	30	November/2010	22° 57' 12" S 45° 32' 28" W
PAR	Paríquera-Açu	Fazenda experimental	21	25	December/2007, March 2008, May 2009	24° 42' 37" S 47° 53' 2" W

structure [17,18] and has been successfully used to study intraspecific genetic variation in insects [19–21]. Sample sizes in this analysis were as follows (Table 1): PET, ITA, TRE, PAR, and BUT. The COI gene was amplified using polymerase chain reaction (PCR) [22].

PCR amplicons of COI were electrophoresed in 1.0% agarose gel in TAE buffer (0.04 Tris buffer, 0.05 M sodium acetate, 0.01 M EDTA pH 8.0 (TAE). We used 2 μ l of the PCR amplified, add 1 μ l of 6 \times DNA Loading Dye (0.1% bromophenol and 30% glycerol) and 1 μ l gel red. The primers 5'-LCO1490 GGTCACA AATCATAAAGATATTGG-3' and HC02198 5'-TAAA CTTCAAGGGTGACCAAAAAATCA-3' were used for sequencing. For the final reaction 10 μ l were added: 2 μ l of 5 \times sequencing buffer, 3.6 pmol of primer (Forward or reverse), 0.25 of the Big Dye, 10–50 ng of DNA and ultrapure water. Reaction conditions were as follows: 96°C (15 s), 50°C (15 s) and 60°C (4 min) for 25 cycles [23]. For the sake of accuracy, amplicons of each individual were sequenced twice and high fidelity Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase was used.

In order to quantify genetic polymorphism and compare across populations, the COI gene sequences were aligned in ChromasPro 2.4 [24]. Next, the number of haplotypes (H), haplotype diversity (h), and nucleotide diversity (π) were estimated using software DNAsp 5.0 [25]. The neutrality tests Tajima's and Fu's F_s were performed using Arlequin 3.11 [26] for testing whether the mutations were neutral. Fu's F_s test is very sensitive to population expansion. The genetic differentiation index (F_{st}) test for short divergence time was performed using Arlequin 3.11 software. The genetic distance among populations of *Oc. scapularis* was calculated using the Kimura 2-parameter (K2P) by using software Mega version 5.1 [27]. A haplotype network of COI sequences was constructed using a parsimony framework by using TCS 1.21 software [28], and the network was edited using the Image program. The cladogram of haplotypes was

constructed using Mr Bayes software with 10,000,000 generations.

Morphometric analyses of the wing

Wings are good biological markers owing to its bidimensionality and heritability [29]. Geometric morphometrics was chosen to describe the wings of *Oc. scapularis* because it is a sensitive and cheap technique, which has been increasingly used to describe inter and intraspecific variability [16,29–32].

The geometry of (right) wings of females from the five populations was comparatively analyzed. Samples sizes were PET, ITA, TRE, PAR, and BUT (Table 1). Geometric morphometrics reported by Vidal & Suesdek [18] were used. Images of the wings were captured using a Leica 320 digital camera coupled with a Leica S6 stereoscope. We digitized 18 landmarks using TpsDig V.1.40. Procrustes superimposition of raw positional coordinates and shape coordinates (to assess the wing shape) was calculated using computer programs TpsUtil 1.29 and TpsRelw 1.39 [33]. The principal components (PCs) of shape coordinates and discriminant analyses of the samples based on PCs were calculated using MorphoJ 1.05 software [34] for evaluating the populational degree of similarity among the five populations studied.

Morphological diversity was estimated using the "amount of dispersion" of individuals in the morphospace of PCs. Such dispersion was calculated as follows: plots in the morphospace of PCs (each corresponding to a single mosquito) were digitized using TpsDig software (as performed for wings) in order to register their positional coordinates in an imaginary Cartesian plane. The centroid size of a set of individuals (a population) was calculated using TpsRelW software. Such centroid size was then considered as an indicator of the morphological diversity of a population. Theoretically, the amount of dispersion of individuals (of a single set) in the morphospace of PCs is proportional to the morphological variability

of that set (see Additional file 1: Figure S1 for more details).

After the allometric effect on wing shape was estimated and removed, wings were compared among populational samples by using discriminant analysis [35]. Mahalanobis distances (p-value from non-parametrical tests with 10,000 permutation rounds) were used to construct phenetic trees by using the algorithm Neighbor-Joining (PAUP [36] and COV softwares [37]). The correlation between geographic and phenetic distances was also statistically tested using Pearson's correlation in Statistica 7 [38].

Wing images of other species (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles cruzii*, *Anopheles homunculus*, *Culex nigripalpus*, and *Culex quinquefasciatus*) were also included in one of the comparative morphometric analyses. Those species were collected with a similar procedure of *Oc. scapularis* in locations mentioned in the Additional file 2: Table S1.

Results

Genetic analyses

We obtained a 448-bp fragment that is located in the barcode region of the COI gene and is also known to be highly variable and indicative of populational genetic polymorphisms [39,40]. In the 130 analyzed individuals, 46 COI haplotypes (GenBank accession number KM115416-61) were identified; 38 sites in the 448-bp fragment were variable. The statistical analysis of the genetic parameters is summarized in Table 2. The overall haplotype diversity was high (0.91), whereas the genetic pairwise distances among populations (Kimura 2-parameter) were low, ranging from 0.0054 to 0.0091 (Table 3).

The similarities among haplotypes were depicted in a network (Figure 2). Two haplotypes (H1 and H5), which were the most frequent, were shared by all population samples and were present in 37% of the individuals, whereas the other moderately frequent haplotypes (H6, H7, H9 and H20) were shared by 3–4 populations and were present in 23% of the individuals. The remaining 40

Table 2 Summary statistics for polymorphisms of five *Oc. scapularis* populations

	N	Unique haplotypes	H	h (SD)	π (SD)	DT	FS
PET	34	5	16	0.8841	0.007182	-1.26855	-6.62988*
ITA	36	8	18	0.9238	0.008977	-0.92875	-6.92782*
TRE	29	12	23	0.9704	0.008856	-1.24190	-19.15227*
PAR	21	3	9	0.8476	0.006392	-0.52875	-0.62766
BUT	10	3	5	0.6667	0.004395	-0.85010	-0.97655

N= Number of sequences used; H= Number of haplotypes; h (SD) = Haplotype diversity; π (SD)= Nucleotide diversity; DT = Tajima's D test; FS = Fu's Fs test statistic; * significant values at $p < 0.05$.

Table 3 K2P Genetic distance between five *Oc. scapularis* populations

	PET	ITA	TRE	PAR
ITA	0.0086	-		
TRE	0.0081	0.0091	-	
PAR	0.0067	0.0079	0.0075	-
BUT	0.0069	0.0074	0.0069	0.0054

haplotypes appeared in low frequencies and were mostly exclusive to one population (1–3 individuals each).

F_{st} scores ranged from -0.009 to 0.060 and were consistent with a weak or no population structure (Table 4), and the highest estimated divergence (between ITA and BUT) was only moderate. Some F_{st} scores, although negative, were not significantly different from zero.

Morphometric analyses

Discriminant analysis of the shape PCs, represented by canonical variables, revealed a complete discrimination between ITA and BUT populations and slight differences among the other populations: polygons (populations) in the morphospace overlapped partly (Figure 3). Although the slight populational differentiation noted, Mahalanobis distances were statistically significant (nonparametric $p < 0.0001$) for all pairwise comparisons, which is ordinarily indicative of a population structure. The Q_{st} estimator of phenetic populational differentiation scored 0.47, a value as high as to corroborate the presence of population structure [29].

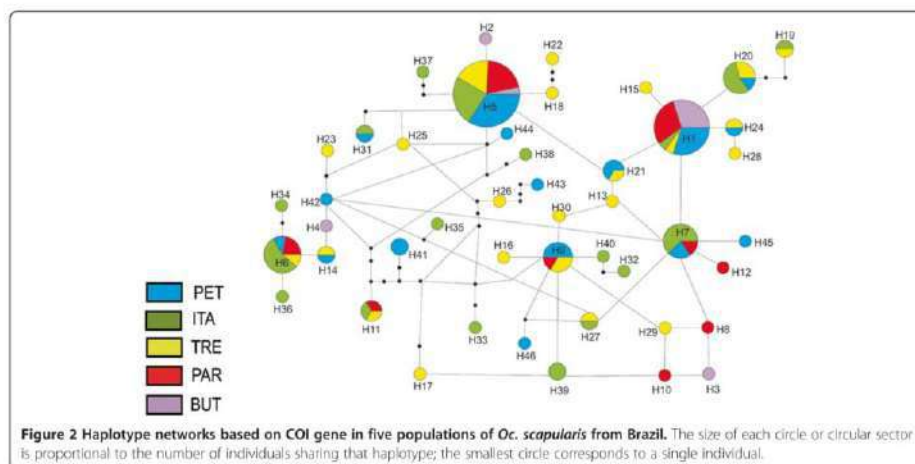
The phenogram of Mahalanobis distances determined on the basis of wing shape (Figure 4) and results of correlation analysis did not reveal any significant correlation between phenetic and geographic distances ($r = 0.46$, $p = 0.18$).

Figure 5 shows that morphological diversity (estimated using the size of the spread of individuals in the morphospace of PCs) was variable, but its scores varied less than those of genetic diversity (estimated using haplotype diversity). No significant correlation was found between these 2 diversity estimators ($r = 0.69$, $p = 0.19$). Morphological diversity of *Oc. scapularis* was also high when compared to those of 6 other culicid species (Figure 6).

Discussion

Variability

A high haplotype diversity (mean = 0.91) was noted in the five populations. Such high polymorphism might indicate that these populations have not been recently affected by a bottleneck, despite the dramatic fragmentation of the Atlantic Forest during the past 300 years [41]. Similarly, the negative values of Tajima's and Fu's F_s for all populations suggest that these populations might be expanding or have a selective sweep of their COI gene [42,43]. Similar patterns and interpretations were reported in a population study of



the culicid *Anopheles lesteri*, which was determined using COI gene polymorphism [44]. These authors obtained only negative values in neutrality tests and suggested that the populations under study were most likely undergoing expansion.

Oc. scapularis is naturally infected with *Wolbachia* (Noguera & Suesdek, unpublished data), and the presence of this endosymbiotic bacterium could decrease the number of haplotypes, as documented by Morais et al. [45] in *Culex quinquefasciatus*. However, the COI gene in *Oc. scapularis* still displays a high rate of polymorphism. Another Neotropical species with high genetic polymorphism is *An. cruzii* Dyar & Knab, which presented 60 haplotypes in 96 individuals, with a haplotypic diversity = 0.98 [46]. Nevertheless, large haplotype diversity is not commonly reported in Culicidae. For example, only 12 COI haplotypes were found in 88 individuals of *An. darlingi* Root (a predominant species in South America), from five locations in Colombia [47]. Another example is *Ae. albopictus* (Skuse), a species evolutionarily close to *Oc. scapularis*, which has only 16 haplotypes from 377 specimens [48]. Thus, *Oc. scapularis* appears to be a

highly genetically diverse species. We find it improbable that such discrepancy is because of experimental errors or sampling biases because amplifications/sequencing were replicated and the high genetic diversity is consistent with the high morphological diversity observed.

In addition, the morphological diversity of *Oc. scapularis* was high in all populations. Even other Neotropical sylvatic species (*An. homunculus*, *An. cruzii*, *Cx. nigripalpus*, and *Ae. albopictus*) showed lesser diversity than *Oc. scapularis*.

The removal of both isometric and allometric effects of size permitted us to assess the wing geometry almost purely based on its shape. Considering that wing shape of culicids is mainly determined by quantitative polygenic heritage [29] and was highly variable in *Oc. scapularis*, we believe that wing shape may be a morphological indicator of genetic variability. A similar interpretation was given in studies of *Culex coronator* Dyar & Knab [30].

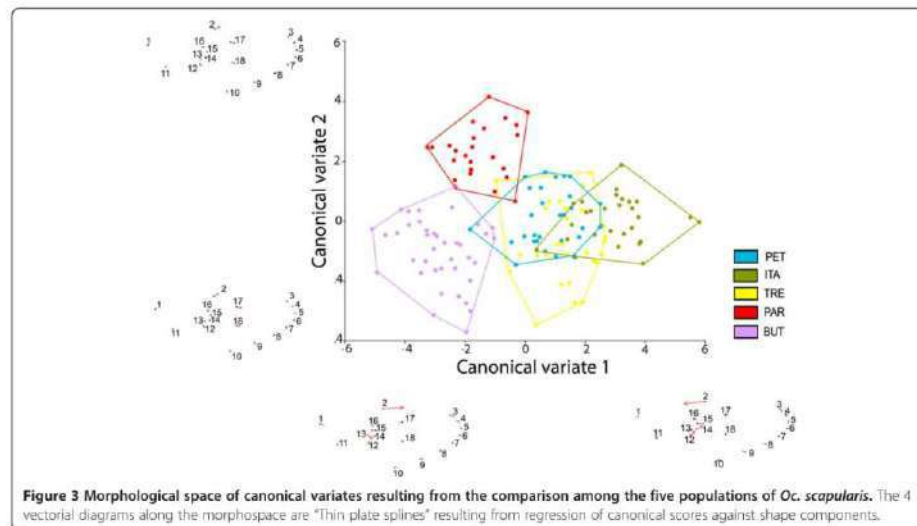
Population structure

Bayesian phylogenetic inference derived using COI data (data not shown) failed to show reliable clusters of populations, and thus, do not suggest the presence of a population structure. Although the interpretations of the phylogenetic relationships among haplotypes cannot yet be inferred, the major haplotypes H1 and H5 seem to be closer to a common ancestor. All or most of the populations shared H1 and H5, and the interpopulation differentiation was low. In fact, all F_{st} scores were below 0.07, and gene flow was estimated to be significant. The absence of correlation between genetic and geographical ($p=0.2$) distances is also consistent with a weak population structure.

Table 4 Pairwise F_{st} estimates between five *Oc. scapularis* populations

	PET	ITA	TRE	PAR
ITA	0.04433	-		
TRE	-0.00946	0.00328	-	
PAR	-0.02371	0.01580	-0.01997	-
BUT	-0.01310	0.06021*	0.01052	-0.02957

*Indicates moderate structure (P value significant at <0.05).

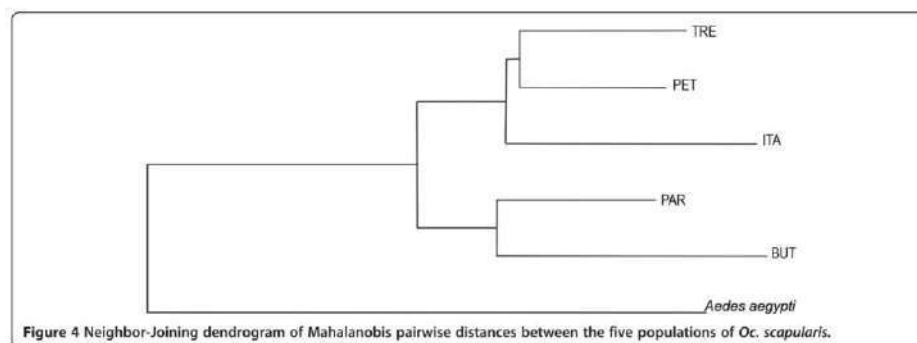


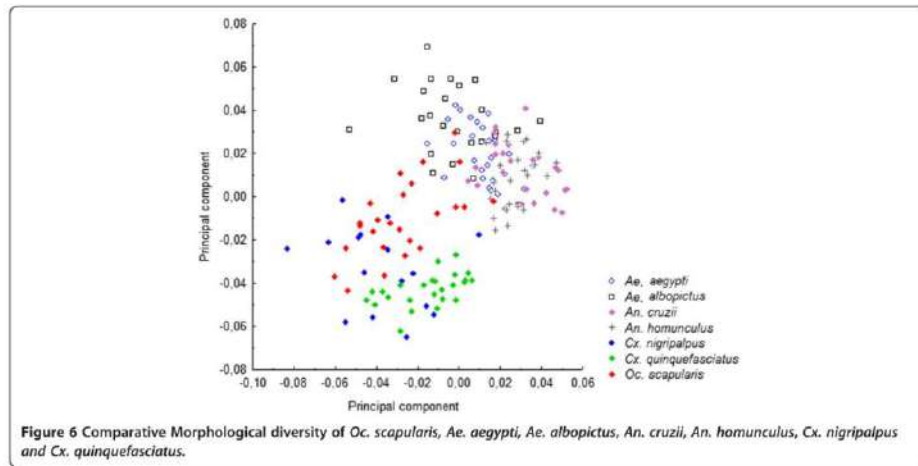
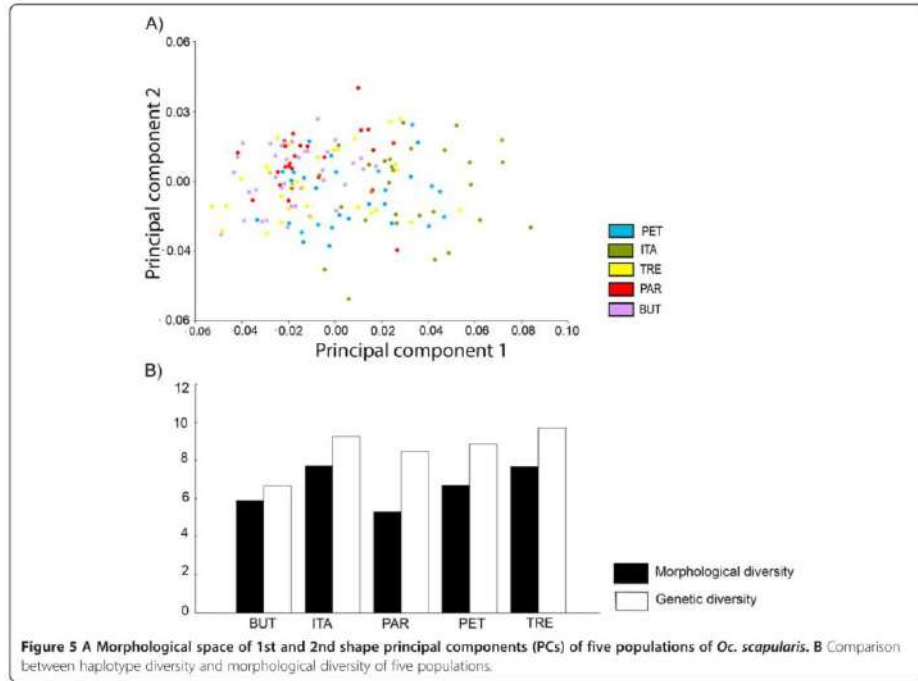
As H1 and H5 were the only haplotypes shared by all populations, they might be considered as the remnants of an ancestral polymorphism. This might be an alternative explanation to interpopulation migration, as revealed in studies of the retention of mitochondrial haplotypes in *Anopheles arabiensis* Patton and *Anopheles gambiae* Giles [49].

Remarkably, suitable habitats for *Oc. scapularis* (rural areas, forest borders, and parks) are discontinuous across southeast Brazil. Even in the populational sample obtained from BUT, where collections were made from the smallest forest remnant (~40,000 m²) surrounded by densely urbanized neighborhood, high genetic and phenetic diversities were noted. The observed pattern

of population similarity could be explained by the retention of ancestral polymorphisms or current passive migration, or might merely be a result of the colonization history. Among Culicidae, another species that has maintained interpopulation similarity despite wide geographical distribution and habitat discontinuity, is the malaria vector *An. darlingi* [50].

Wing shape characteristics provided some evidence of an incipient population structure, coherently supported by canonical variates morphospace, Mahalanobis distances, and Qst. The different Mahalanobis distance scores can be interpreted as different degrees of structuration, but the underlying factors to this heterogeneity are still unknown. The phenogram of morphological distances showed that





there was no correlation between phenetic and geographic distances. For instance, ITA and PET clustered together despite being the farthest localities. As this analysis is not phylogenetic we could not study in detail the evolutionary relationships between groups, but we can assume that the evolution of wing shape did not follow an isolation by distance pattern.

Markers combined

Results from the analyses of wing shape and COI variability were consistent but not identical. While both markers indicated slight populational differentiation, divergence derived from wing shape was more conspicuous. In fact, no statistical correlation was noted between the phenetic and genetic distances ($r = 0.69$, $p = 0.19$). Apparently, wing shape is less evolutionarily stable than the COI gene, as previously hypothesized by other authors [50]. Despite the suspected congruence between genetics and phenetics, the current results reinforce the idea that wing geometry bears informative biological markers that are sensitive to microevolutionary processes and can be considered as preliminary indicators of population structure. Other authors also share this point of view [16,50,51].

Accordingly, wings and COI revealed high morphogenetic variability (both intra and interpopulational). This was unexpected because the Atlantic Forest, the original habitat of this species, has been highly degraded in the past three centuries. This finding led us to pose a new hypothesis: Such biological richness might contribute to plasticity or a broad adaptation capacity of this species. This conjecture is in accordance with the findings from previous studies on *Oc. scapularis*, suggesting that they have vectorial competence [8,11], ability to breed in artificial containers [6], tendency to occur in urban locations (PET and BUT samples), and the potential to exhibit endophily and synanthropy when present in rural or semi-rural environments [48]. Further investigations are necessary to confirm our proposed hypothesis.

Conclusion

We found many morphogenetic polymorphisms in the studied populations of *Oc. scapularis*, despite the species being from a fragmented habitat. Wing shape denoted incipient population structure and showed that this species is morphologically more diverse than other sylvatic Neotropical culicids. Unfortunately, studies on *Oc. scapularis* are still rare despite its possible epidemiological relevance. Future investigations need to be performed to better understand the structure and dynamics of the biological variability of this species as well as the possible implications of this variability on the plasticity, synanthropy, and vectorial capacity of this species.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Morphological diversity estimated using the "amount of dispersion" of individuals in the morphospace of PCs. Each plots in the morphospace of PCs corresponding to a single mosquito were digitized using TpsDig software in order to register their positional coordinates in an imaginary Cartesian plane. The centroid size of a set of individuals (a population) was calculated using TpsReW software. Such centroid size was then considered as an indicator of the morphological diversity of a population. Theoretically, the amount of dispersion of individuals (of a single set) in the morphospace of PCs is proportional to the morphological variability of that set. Subgraphs upper left of total PCs graph represents dispersion points of PAR population; Subgraphs upper right of total PCs graph represents dispersion point of ITA populations; Subgraphs lower left of total PCs graph represents dispersion points of BUT populations; Subgraphs lower of total PCs graph represents dispersion points of PET populations; Subgraphs lower right of total PCs graph represents dispersion points of PET populations; Subgraphs lower right of total PCs graph represents dispersion points of TRE populations.

Additional file 2: Table S1. Data of samples of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles cruzi*, *Anopheles homunculus*, *Anopheles strudel*, *Anopheles nigripalpus*, and *Culex quinquefasciatus* collected in Brazil.

Abbreviations

BUT: Butantan; COI: Cytochrome oxidase subunit I; DT: Tajima's D test; FS: Fu's Fs test; F_{ST} : The genetic differentiation index; H: Number of haplotypes; Hd: Haplotype diversity; ITA: Itaboraí; PAR: Pariqueira-Açu; PET: Parque ecológico do Tietê; Q_{ST} : Quantitative trait differentiation index; TRE: Tremembé; n: Nucleotide diversity.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LS designed the study. VP and MD performed collections and analysed the data. LS and VP drafted and edited the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grants #136597/2009-2), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES grants #23038/05274/2011-24 and #1275/2011) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants #2006/02622-5 and 2010/14479-8). We thank Prof. Dr. Maria Anice Sallum for permitting VP and MD to use her laboratory for the development of molecular biology techniques.

Author details

¹Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. ²Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro-Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ³Programa de Pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Received: 15 July 2014 Accepted: 13 February 2015

Published online: 26 February 2015

References

- Forattini OP. *Culicidologia Médica: Identificação*. Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo Press; 2002.
- Forattini OP, Kakitani J, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 9- Synanthropy and epidemiological vector role of *Aedes scapularis* in South-Eastern Brazil. *Rev. Saude Publica*. 1995;29:199–207.
- Dorvilé LFM. Mosquitoes as bioindicators of forest degradation in southeastern Brazil, a statistical evaluation of published data in the literature. *Stud Neotropical Fauna Environ*. 1996;31:68–78.
- Silva AM, Menezes RMT. Occurrence of *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) in artificial breeding area of Southern Brazil. *Rev. Saude Publica*. 1996;30:103–4.

5. Klein TA, Lima JB, Tang AT. Seasonal distribution and diel biting patterns of culicine mosquitoes in Costa Marques, Rondônia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:141–8.
6. Forattini OP, Kakitani I, Sallum MAM. Breeding places of *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) in artificial containers. *Rev Saude Publica*. 1997;31:519–22.
7. Mitchell CJ, Forattini OP. Experimental transmission of Rio de Janeiro encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. *J Med Entomol*. 1984;21:34–7.
8. Vesson LB. Aspects of the encephalitis epidemic caused by arbovirus in the Ribeira Valley, S. Paulo, Brazil, during 1975–1978. *Rev Saude Publica*. 1980;14:9–35.
9. Lourenço-de-Oliveira R, Deane LM, Lourenço-de-Oliveira R, Deane LM. Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90:387–8.
10. 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 extradomiciliar por um novo vetor, *Aedes scapularis*. *Ver Bras Malarial Doencas Trop*. 1995;7:51–70.
11. Michel CJ, Monath TP, Sabatini MS, Cropp CB, Daffner JF, Galiker CH, et al. Arbovirus investigations in Argentina, 1977–1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;34:945–55.
12. Pavoldi-Corriêa A, Kenney JL, Couto-Lima D, Campos ZMS, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, et al. Ilheus virus isolation in the Pantanal, west-central Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:1–8.
13. Spence L, Anderson CR, Aitken THG, Downs WG. Melao virus, a new agent isolated from Trinidadian mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 1962;11:687–90.
14. de Deus JT, Kakitani I. Paridade de *Chlorotatus scapularis* em condições de laboratório e campo. *Rev Saude Publica*. 2006;40:505–12.
15. Amell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIII. A revision of the *scapularis* group of *Aedes* (*Dohertyella*). *Contrib Amer Entomol Inst*. 1976;13:1–44.
16. Vidal PO, Suesdek L. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. *Infect Genet Evol*. 2012;12:591–6.
17. Kamgang B, Brengues C, Fontenille D, Njikou F, Simard F, Paupy C. Genetic structure of the tiger mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). *PLoS One*. 2011;6:1–13.
18. Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja Simon Z, et al. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infect Genet Evol*. 2012;12:1260–9.
19. Demari-Silva B, Vesgueiro FT, Sallum MAM, Marrelli MT. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. *J Med Entomol*. 2011;48:272–9.
20. Rosero DA, Jaramillo LM, Gutiérrez LA, Conn JE, Corriêa MM. Genetic diversity of *Anopheles triannulatus* s.l. (Diptera: Culicidae) from northwestern and southeastern Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87:910–20.
21. Endersby NM, White VL, Chan J, Hurst T, Rasić G, Miller A, et al. Evidence of cryptic genetic lineages within *Aedes notoscriptus* (Skuse). *Infect Genet Evol*. 2013;18:191–201.
22. Pedro PM, Uezu A, Sallum MAM. Concordant phylogeographies of 2 malaria vectors attest to common spatial and demographic histories. *J Hered*. 2010;101:618–27.
23. 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;3:294–9.
24. Technesium Pty Ltd. [http://www.technesium.com.au/chromas_lite.html].
25. Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP. DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003;19:2496–7.
26. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2007;1:47–50.
27. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28:2731–9.
28. Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol*. 2000;9:1657–9.
29. Dujardin J-P. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol*. 2008;8:875–90.
30. Demari-Silva B, Suesdek L, Sallum MAM, Marrelli MT. Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. *Parasit Vectors*. 2014;7:174–83.
31. Aytekin S, Aytekin AM, Alten B. Effect of different larval rearing temperatures on the productivity (Ro) and morphology of the malaria vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) using geometric morphometrics. *J Soc Vector Ecol*. 2009;34:32–42.
32. Henry A, Thongsripong P, Fonseca-Gonzalez I, Jaramillo-Garcia N, Dujardin JP. Wing shape of dengue vectors from around the world. *Infect Genet Evol*. 2010;10:207–14.
33. Digitize Landmarks and Outline. [http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html].
34. Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour*. 2011;11:353–7.
35. Dujardin JP. Permutations and discriminant analyses (PAD) [impl.rtd.fr/morphometrics].
36. Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4 [http://www.sinauer.com/paup-phylogenetic-analysis-using-parsimony-and-other-methods-4-0-beta.html].
37. Dujardin JP. COO, MCO, and COV for Windows [http://mome.dic.com/the-dic-package].
38. StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 7. [http://www.statsoft.com].
39. Engdahl C, Larsson P, Näslund J, Bravo M, Evander M, Ljungström JO, et al. Identification of Swedish mosquitoes based on molecular barcoding of the COI gene and SNP analysis. *Mol Ecol Resour*. 2014;14:478–88.
40. McKeon SN, Lehr MA, Wilkerson RC, Ruiz JF, Sallum MA, Lima JB, et al. Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. *Malar J*. 2010;9:271–84.
41. Dean W. História e a devastação da Mata Atlântica brasileira. São Paulo: Companhia das Letras; 1996.
42. Werblow A, Kimpel S, Bolius S, Dorresteijn AWC, Sauer J, Melau C. Population structure and distribution patterns of the sibling mosquito species *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Diptera: Culicidae) reveal different evolutionary paths. *PLoS One*. 2014;9:1–14.
43. Ambrose L, Rignos C, Cooper RD, Leow KS, Ong W, Beebe NW. Population structure, mitochondrial polyphyly and the repeated loss of human biting ability in anopheline mosquitoes from the southwest Pacific. *Mol Ecol*. 2012;21:4327–43.
44. Yang M, Ma Y, Wu J. Mitochondrial genetic differentiation across populations of the malaria vector *Anopheles lesseni* from China (Diptera: Culicidae). *Malar J*. 2011;10:216–3.
45. Morais SA, de Almeida F, Suesdek L, Marrelli MT. Low genetic diversity in Wolbachia-infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. *Rev Inst Med Trop*. 2012;54:325–9.
46. Lorenz C, Marques TC, Sallum MA, Suesdek L. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii*. *Parasit Vectors*. 2014;7:581.
47. Gutiérrez LA, Gómez GF, González JJ, Castro M, Luckhart S, Conn JE, et al. Microgeographic genetic variation of the malaria vector *Anopheles darlingi* root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83:38–47.
48. Beebe NW, Ambrose L, Hill LA, Davis JB, Haegood G, Cooper RD, et al. Tracing the tiger: population genetics provides valuable insights into the *Aedes (Stegomyia) albopictus* invasion of the Australasian region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:1–12.
49. Dorinelly M, Pinto J, Girod R, Besansky NJ, Lehmann T. Revisiting the role of introgression vs shared ancestral polymorphisms as key processes shaping genetic diversity in the recently separated sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Heredity*. 2004;92:61–8.
50. Motoki MT, Suesdek L, Berço ES, Sallum MAM. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infect Genet Evol*. 2012;12:1245–52.
51. Vidal PO, Carvalho E, Suesdek L. Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. *Memórias Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:1030–4.

ANEXO B- Assessment of the correlation between wing size and body weight in captive *Culex quinquefasciatus*

Este artigo que foi desenvolvido durante meu doutorado e publicado no periódico científico Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical no ano de 2016. Este artigo versa sobre a investigação da correlação entre o tamanho da asa em relação ao peso seco de mosquitos adultos, para tal objetivo foi utilizado o mosquito *Culex quinquefasciatus* como modelo. O uso do valor do tamanho da asa no lugar do peso seco, como uma das formas para se avaliar o fitness do mosquito adulto pode facilitar na manutenção diária da colônia



Short Communication

Assessment of the correlation between wing size and body weight in captive *Culex quinquefasciatus*

Vivian Petersen^{[1],[2]}, Marco Jacometto Marchi^[3], Delsio Natal^[3], Mauro Toledo Marrelli^[3],
Admilson Clayton Barbosa^[4] and Lincoln Suesdek^{[1],[5]}

[1]. Departamento de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil. [3]. Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil. [4]. Empresa Metropolitana de Águas e Energia, São Paulo, São Paulo, Brasil. [5]. Programa em Pós-Graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.

Abstract

Introduction: Mass production of mosquitoes under laboratory conditions allows implementing methods to control vector mosquitoes. Colony development depends on mosquito size and weight. Body size can be estimated from its correlation with wing size, whereas weight is more difficult to determine. Our goal was to test whether wing size can predict the weight. **Methods:** We compared dry weight and wing centroid size of *Culex quinquefasciatus* reared at different temperatures and four diets. **Results:** Weight and wing size were strongly correlated. The diets did not influence wing size. **Conclusions:** Wing centroid size is a good predictor of *Cx. quinquefasciatus* body weight.

Keywords: Dry weight. Wing geometric morphometrics. Body size.

Culex quinquefasciatus Say is a vector of etiological agents of filariasis and encephalitis such as West Nile virus disease⁽¹⁾ and lymphatic filariasis⁽²⁾. It is widely accepted that the spread of these diseases can be prevented by the use of mass-produced, genetically engineered mosquitoes to control the mosquito vector^(3,4).

The production and maintenance of mosquito colonies requires knowledge of the factors that contribute to and influence mosquito fitness. One of the important factors to ensure satisfactory mass production is adequate feeding of the mosquitoes⁽⁵⁾. The fitness and health of colonized mosquitoes can be indirectly evaluated by measuring their body size and weight⁽⁶⁾. The possibility that body size and weight may be associated with the number of gametes produced, flight capacity, parity, and reproductive success has been extensively discussed^{(5),(6)}.

Although an important piece of data, mosquito weight – with the exception of dry weight – can easily be measured incorrectly⁽⁷⁾. Drying a mosquito, however, takes a long time [between 24 and 48h according to Dominic et al.⁽⁷⁾] and requires an expensive analytical balance, making the procedure too costly and laborious for regular use.

Unlike body weight, insect body size can easily be estimated from wing size because of the correlation between these two variables in some mosquito species⁽⁸⁾. With the aim to identify a morphometric predictor of body weight, we tested the correlation between wing centroid size and dry body weight in *Cx. quinquefasciatus*, maintained on four types of food source at two different temperatures.

Culex quinquefasciatus colony was reared from samples collected along the banks of the Pinheiros River, São Paulo, Brazil. We used four plastic trays (24.5 × 14.5 × 6.0cm) for males and four identical trays for females. Each tray contained 500mL of water and 100 first instar larvae, which were separated with the aid of a pipette and a stereoscopic microscope (Motic® SMZ-168, Hong Kong, China). The larvae were reared in two groups at two different temperatures. The *hot* group was kept at 27 ± 2°C and the *cold* group at 20 ± 2°C. Both groups were fed for 10 consecutive days with 20mg of feed per day in each container. The following diets were used: Super Red® fish feed (FF) (Haifeng Feeds Co., Ltd., Nantou, Taiwan), Dog Chow® dog food (DF) (Purina, St. Louis, MI, USA), a 50:50 mix of fish feed and dog food (FDF), and a mix of these feeds with Ninho® powdered milk (FDF-PM) (Nestlé, Vevey, Switzerland). Within each group there were eight subgroups (four male subgroups and four female subgroups), and the larvae in each of the four subgroups for a given gender and temperature were fed a different diet. During the pupal stage, the pupae were individually separated, and after the adults had emerged, these

Corresponding author: Dra. Vivian Petersen.

e-mail: var_petersen@hotmail.com

Received 30 March 2016

Accepted 24 June 2016

were killed by freezing (-20°C). The frozen adults were then placed in an oven at 60°C for 48h, and their dry weights were individually measured three times using an analytical balance (MC1-RC210-P Analytical Balance, Sartorius AG, Göttingen, Germany). The mosquitoes were placed individually in 2mL Eppendorf tubes (Hamburg, Germany) for the morphometric analysis and stored for later use. The samples are listed in Table 1.

The wings of the male and female mosquitoes were mounted and analyzed according to a procedure described previously⁽⁹⁾. The Kolmogorov-Smirnov normality test was used to verify the Gaussian distribution of the data, and Tukey's test was performed to test the statistical significance between the treatment means, both tests were performed using GraphPad InStat version 3.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The correlations between biometric variables (weight and centroid size) were assessed by the Pearson correlation test.

A total of 351 individuals were analyzed, consisting of 94 females and 118 males from the *hot* group and 70 females and 69 males from the *cold* group. The dry weight and wing size of the mosquitoes in both groups combined ranged from 0.19mg to 1.13mg and 1.2mm to 2.7mm, respectively.

We observed a highly significant positive correlation ($p=0.001$) between weight and wing size for males and females in the *cold* group ($r=0.75$ for both) and for males and females in the *hot* group ($r=0.68$ and 0.59 , respectively), as shown in Figure 1.

The results of the correlation analysis between wing size and body weight in each of the four food-source subgroups (supplementary graph 1) were consistent with those obtained when the mosquitoes fed on the different food sources were combined (positive correlation between wing size and body weight, $p < 0.001$). The exception was females from the *hot* group fed on FF, for which there was no statistically significant correlation between wing size and body weight ($p = 0.109$).

No statistically significant differences ($p \geq 0.05$) in wing size were observed between the mosquitoes in each of the four food-source subgroups (either grown at 20°C or 27°C), as shown in Figure 2.

Wing size can be used to estimate *Cx. quinquefasciatus* body weight. Wing morphometrics therefore eliminates the need to

weigh mosquitoes individually, saving time and money and potentially even making precision weighing scales unnecessary.

Unlike our findings, previous studies have shown that the correlation between body weight and wing length in culicids was non-linear^{(5) (10)}. Jirakanjanakit et al.⁽¹¹⁾ showed that wing length (unidimensional variable) and wing centroid size (multidimensional variable) correlate in *Aedes aegypti*. Despite this correlation, we believe that wing centroid size is more likely to linearly correlate with body weight owing to the multidimensional nature of these latter variables. It is coherent with our observation in *Cx. quinquefasciatus*.

As mentioned previously, size and body weight are important biological variables for mass production of insects because they are probably linked to fitness. Although this causal relationship is not well understood, its importance is undeniable, as large female mosquitoes, for example, have high fecundities compared to smaller mosquitoes⁽¹²⁾. Furthermore, larger and consequently heavier mosquitoes can fly higher and distribute more eggs⁽⁶⁾. They also have greater longevity and are more likely to spread the etiologic agents of parasitic infections⁽¹³⁾. However, the relationship between mosquito size, body weight, and fitness remains the subject of controversy. A study on *Aedes* and *P. sorophora* failed to find an association between body size and increased reproductive capacity⁽¹⁴⁾, whereas a correlation between wing length and adult dry weight was quadratic in some Culicidae⁽¹⁰⁾.

The positive correlation in the present study between wing size and body weight for two distinct temperatures and four nutritionally distinct diets indicates that these biological traits are closely related and that this correlation is reproducible. Although colonization methods vary substantially between laboratories and *mosquito factories*, our findings suggest that body weight can be predicted from wing-size data independently of the conditions under which a colony is reared.

The different food sources (FF, DF, FDF, and FDF+PM) used in this study did not influence wing size (or body weight), although the diets were not nutritionally equivalent. This is in contrast to the results reported by Damiens et al.⁽¹⁵⁾. We believe that the nutritional variations in this study did not have a significant influence on global size because the feeds used supplied the basic needs of the mosquitoes. It is thus

TABLE 1
Number of individuals in the *hot** and *cold** groups according to the type of food tested.

Type of food	Female hot group	Female cold group	Male hot group	Male cold group
FF	19	20	32	15
DF	25	17	18	16
FDF	27	17	40	19
FDF+PM	23	16	28	19
Total	94	70	118	69

FF: fish feed, DF: dog food, FDF: a mixture of FF and DF, FDF+PM: a mixture of FF and DF with powdered milk. **Hot* and *cold* groups were reared at 27 °C and 20 °C, respectively.

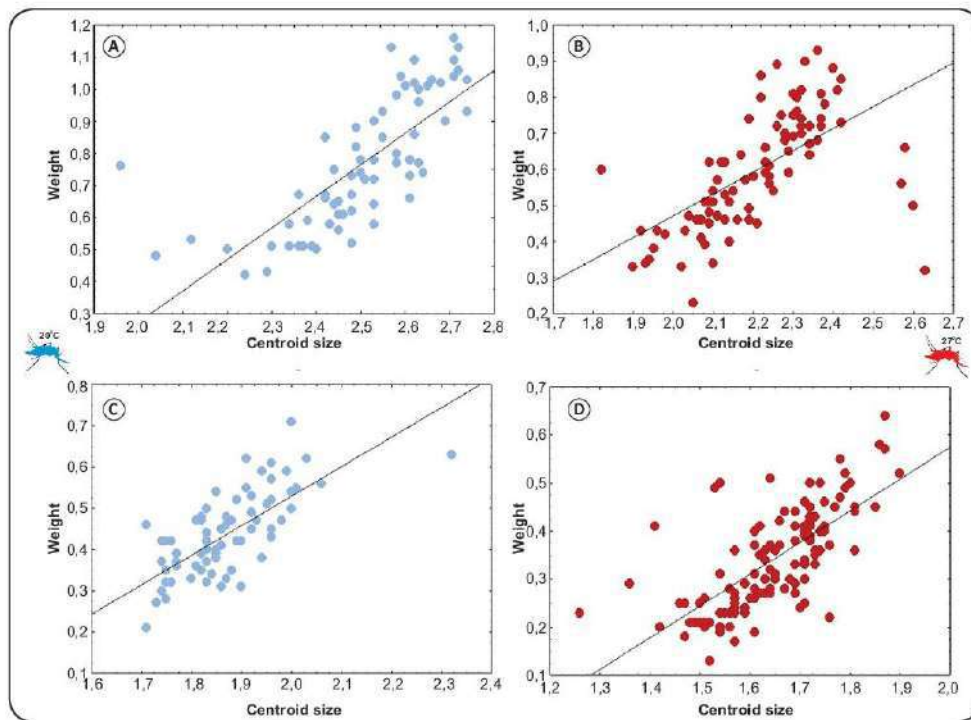


FIGURE 1. Correlation between dry weight and wing length in *Culex quinquefasciatus* males maintained at (A) 20°C and (B) 27°C. Correlation between dry weight and wing length in *Culex quinquefasciatus* females maintained at (C) 20°C and (D) 27°C. Each dot corresponds to an individual. $P < 0.001$.

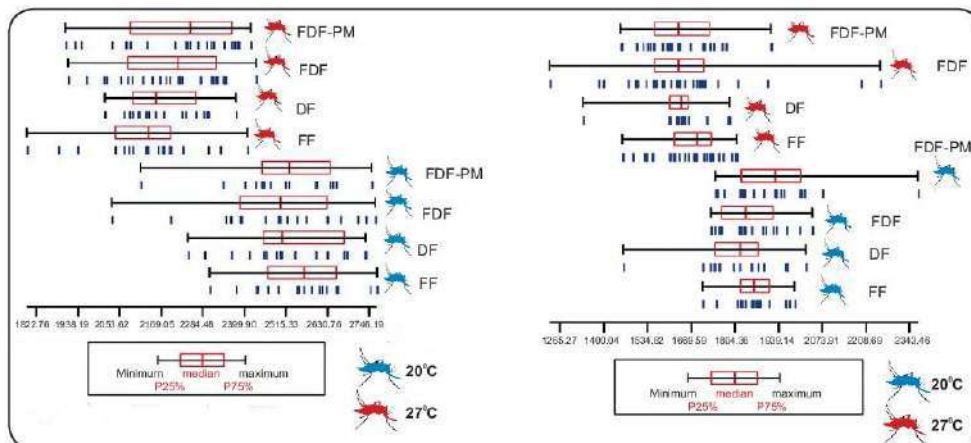


FIGURE 2. Centroid size of *Culex quinquefasciatus* females and males bred and kept at 27°C and 20°C. Four types of diet were used: 1. fish feed (FF); 2. dog food (DF); 3. a mixture of FF and DF (FDF); and 4. a mixture of FF and DF plus powdered milk (FDF-PM).

reasonable to suppose that the choice of one particular diet from the four tested is not a limiting factor in the control of *Cx. quinquefasciatus* body size.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Financial Support

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant nos. 132894/2012-2 and 140032/2013-4; grant nos. 311805/2014-0 (Suesdek L) and Empresa Metropolitana de Águas e Energia (EMAE); Convênio de Cooperação Técnico-científica grant no. P&D ANEEL 0393-003/2010).

REFERENCES

- Kilpatrick AM. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science* 2011; 334:323-327.
- Fontes G, Leite AB, de Lima ARV, Freitas H, Ehrenberg JP, Rocha EMM. Lymphatic filariasis in Brazil: epidemiological situation and outlook for elimination. *Parasit Vectors* 2012; 5:272-283.
- Koella JC, Lyimo EO. Variability in the relationship between weight and wing length of *Anopheles gambiae*. *J Med Entomol* 1996; 33:261-264.
- Puggioli A, Balestrino F, Damiens D, Lees RS, Soliban SM, Madakacherry O, et al. Efficiency of three diets for larval development in mass rearing *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Med Vet Entomol* 2013; 50:819-825.
- Nasci RS. Relationship between adult mosquito (Diptera: Culicidae) body size and parity in field populations. *Environ Entomol* 1986; 15:874-876.
- Honek A. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. *Oikos* 1993; 66:483-492.
- Dominic Amalraj A, Sivagnaname N, Das PK. Effect of food on immature development, consumption rate, and relative of *Toxorhynchites splendens* (Diptera: Culicidae), a predator of container breeding mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:893-902.
- Morales Vargas RE, Ya-Umphun P, Phumala-Morales N, Komalamisra N, Dujardin JP. Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. *Infect Genet Evol* 2010; 10:580-585.
- Petersen V, Devicari M, Suesdek L. High morphological and genetic variabilities of *Cochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses. *Parasit Vectors* 2015; 8:128-137.
- Siegel JP, Novak RJ, Lampman RL, Steinly BA. Statistical appraisal of the weight-wing length relationship of mosquitoes. *J Med Entomol* 1992; 29:711-714.
- Jirakajjanakit N, Leemingsavut S, Thongrungrat S, Apisathnasorn, C, Singhanayom S, Bellec C, et al. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 12:1354-1360.
- McCann S, Day JF, Allan S, Lord CC. Age modifies the effect of body size on fecundity in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol* 2009; 34:174-181.
- Ameneshewa B, Service MW. The relationship between female body size and survival rate of the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Ethiopia. *Med Vet Entomol* 1996; 10:170-172.
- Maciá A. Variación intraespecífica del tamaño de adultos de Culicidae (Diptera) en el área platense, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Entomol Chilena* 1996; 20:63-70.
- Damiens D, Benedict MQ, Wille M, Gilles JRL. An inexpensive and effective larval diet for *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae): eat like a horse, a bird, or a fish? *J Med Entomol* 2012; 49:1001-1011.

ANEXO C- Polymorphism in male genitalia of *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* Rondani, 1848.

Este artigo foi desenvolvido para investigar a hipótese levantada a respeito da ocorrência de complexo de espécie em *Aedes scapularis*, devido ao polimorfismo do processo retrodirigido na genitália masculina encontrado por Arnell em 1976. Este artigo foi publicado recentemente pelo periódico científico "Bulletin Entomological Research".



Polymorphism in male genitalia of *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* Rondani, 1848

V. Petersen^{1,2*†}, F. Virginio^{1,2†} and L. Suesdek^{1,3}

¹Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil – 1500, São Paulo, SP 05503-000, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes – 2415, São Paulo, SP 05508-900, Brasil; ³Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar – 470, São Paulo, SP 05403-000, Brasil

Abstract

Morphology of male genitalia of culicids is generally species-specific and often used as a taxonomic marker. However, some characters of the male genitalia vary intraspecifically and are not taxonomically diagnostic. This might be the case of *Aedes scapularis*, a Neotropical culicid with vector competence for arboviruses and filarial worms. Males of this species may or not present a retrorse process (RP) in the genitalic claspette filaments, which led authors to suspect that this variance might be indicative of population divergence or incipient speciation process. This suspicion has not been investigated hitherto and it is not known if there are variable patterns of RPs. We hypothesized that the presence of the RP varies intraspecifically in *Ae. scapularis* and then we statistically evaluated the variability of this character in a single population. To this study the genitalia of 73 males of *Ae. scapularis* were prepared, and their RPs were meristically quantified and categorized according to the phenotypes observed. We noted that the presence of RPs is a polymorphic character because it varied inter and intra-individually. The presence of a single RP on each claspette filament was the predominant pattern (77%), but absent or multiple RPs in each filament were also found either in bilateral symmetry or asymmetry. Thus, we conclude that the presence of RPs owing to its high variability is not indicative of populational divergence or diagnostic of species complex within *Ae. scapularis*.

Keywords: morphology, taxonomy, retrorse process, claspette filament

(Accepted 21 March 2017)

Introduction

Male genitalia have many morphological characters that are generally species-specific and therefore useful for species identification of mosquitoes (Eberhard, 1985; Huber, 1995, 2004; Song & Weizel, 2008). Male genitalia characters have also been used to diagnose species, such as *Anopheles (Nyssorhynchus) albertoi* Unti, 1941 and *Anopheles*

(Nyssorhynchus) arthuri Unti, 1941, and in the *Anopheles strodei* complex Faran 1980 (Sallum *et al.*, 2010). However, some authors have reported intraspecific variation of male genitalia characters in culicids, which leads us to believe that not all features of the genitalia are taxonomically diagnostic. Examples of this are showed in *Anopheles* (Hribar, 1994; Motoki *et al.*, 2009) and *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* Rondani, 1848 (Petersen, 2012).

Aedes scapularis is a species with vector competence for arboviruses and filarial worms (Lourenço-de-Oliveira & Deane, 1995; Rachou *et al.*, 1995; Vasconcelos *et al.*, 2001; Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2013), which belongs to the 'Scapularis group', a set of morphologically-related species such as *Aedes rhyacophilus* Costa Lima 1933 and *Aedes serratus* Theobald 1901 (Arnell, 1976; Sallum *et al.*, 1988). Arnell (1976)

*Author for correspondence

Phone/Fax: +55 11 2627-9785

E-mail: vivianpetersen@usp.br

†These authors contributed equally to this work.

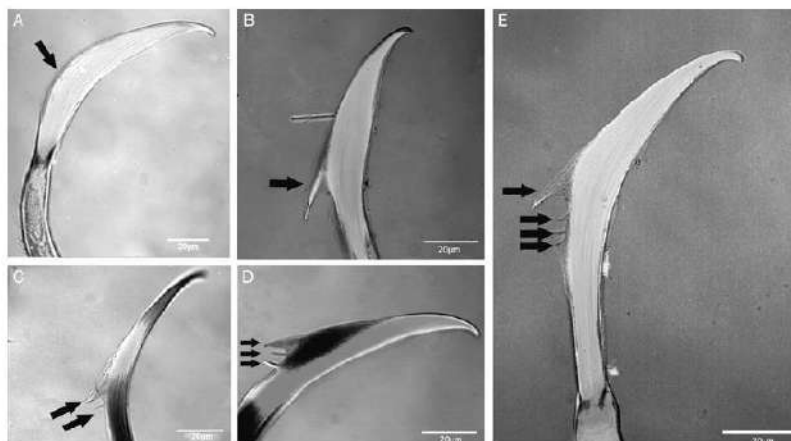


Fig. 1. Polymorphism in the number of RPs on the claspette filaments of the male genitalia of *Aedes scapularis*. (A) Absence of RP; (B) presence of one RP; (C) presence of two RPs; (D) presence of three RPs; (E) presence of four RPs.

reported that the claspette filament of male genitalia of *Ae. scapularis* might or not bear a retrore process (RP), and put in doubt the diagnostic power of genitalic characters for the group. Conversely, Forattini (2002) considered that this morphological variation could be one of the indicatives of the existence of a complex of species and suggested that this possibility should be investigated.

The possible meaning of the variability of genitalia has not been further investigated until now, but our recently published morphogenetic findings support the idea that *Ae. scapularis* is a highly polymorphic species (Petersen *et al.*, 2015). In light of this, we hypothesized that the presence of RPs varies intraspecifically in *Ae. scapularis*. We then statistically investigated the variability of the presence of RPs in a single population of this species.

Material and methods

Collection of specimens

Adult mosquitoes were collected using an aspirator (Consoli & Oliveira, 1994) between 2013 and 2014 in the Parque Ecológico do Tietê (PET), located in the metropolitan area of Sao Paulo, Brazil (23 29'15"S, 46 31'90"W). This sampling site was selected because the first author had observed polymorphism of the male genitalia in some specimens of *Ae. scapularis*. The park has reforested areas and native species of the Atlantic Forest, and receives about 70,000 visitors monthly.

Sample preparation

Seventy-three males were identified at the species (Arnell, 1976; Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002), stored in silica gel and then dissected. The genitalia were detached from the abdominal segment VII and stained according to Lorenz & Suesdek (2013). This structure is rich in chitin, which is

auto-fluorescent, thus each of them was evaluated using a laser-scanning microscope with differential interference contrast (Zeiss LSM 510 meta confocal system) and three-dimensional (3D) projection from a Z-section to assist in the analysis of RPs. A 488-nm laser was used for excitation and a LP 505-nm filter for emission. The images were photographed at 40 \times magnification and stored in the mosquito morphology database 'WingBank' (<http://www.wingbank.com.br>).

Analysis

The right and left (R-L) claspette filaments of the genitalia were analysed, and the number of RPs on each was scored separately. The RPs were scored by two of the authors (VP and FV, independently) and the scores compared; any discrepancies were resolved by re-examining the specimens involved.

We evaluated the polymorphism of two characters: the number of RPs per claspette filament and the bilateral asymmetry of genitalia according to the number of RPs. Asymmetry scores were calculated as the differences between the number of RPs on R-L sides, and asymmetry was expressed by the modules, |R-L|, of the scores for each trait (Palmer & Strobeck, 2003; Souza *et al.*, 2007). Individuals with equal numbers of RPs on R-L sides of genitalia were considered symmetrical. Individuals with unequal numbers of RPs on R/L sides were considered asymmetrical. The Shapiro & Wilk's (1965) normality test was employed to evaluate the type of asymmetry. The distribution of the sample was evaluated according to the kurtosis and skewness values.

Results and discussion

We observed both inter- and intra-individual polymorphism of RPs among the specimens analysed. Moreover, we found both the absence and presence of RPs in symmetric and asymmetric conditions. Considering that RP presence varied in such a fashion in a single population, we conclude that

Polymorphism in male genitalia of *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* Rondani, 1848

3

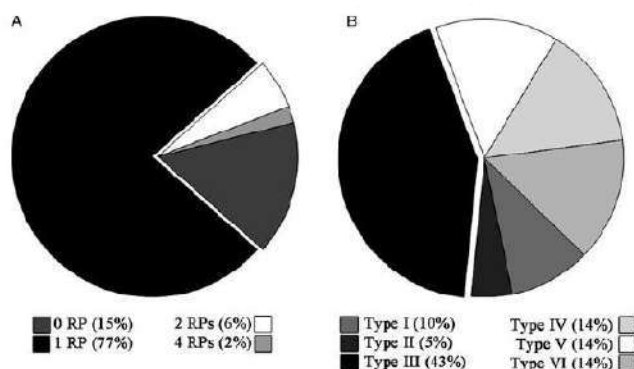


Fig. 2. Quantitative and qualitative graphical representation of percentage of males with the same number of RPs on both claspettes. (A) and those with different numbers of RPs on the left and right claspettes (B). Type I: 0 and one RP. Type II: 0 and two RPs. Type III: one and two RPs. Type IV: one and three RPs. Type V: two and three RPs. Type VI: two and four RPs.

this trait is not taxonomically informative. Based on our results and the literature (Arnell, 1976; Forattini, 2002), we consider that this character cannot be used as diagnostic for species.

The amount of RPs of most individuals was symmetrical (71%), and among them we found the following phenotypes (fig. 1): 0 (absence of RP), 1, 2 and 4 RPs. The presence of a single RP on each claspette (77%) was the predominant condition. The absence of a RP was the second most common condition, representing 15% of the individuals, followed by two RPs (6%) and four RPs (2%). Among the asymmetric genitalia (29%), there were six different phenotypes, as follows: I (0 and one RP), II (0 and two RPs), III (one and two RPs), IV (one and three RPs), V (two and three RPs) and VI (two and four RPs). This classification does not consider whether the RPs were found on the R/L claspette filament.

The most common phenotype was type III (43%) and the least common was type II (5%) (fig. 2). The presence of more than one RP an individual, as well as the different number of RPs on the R-L claspettes of genitalia suggests that the variability of this structure is high.

In addition, the Shapiro-Wilk test ($W = 0.73$, $P = 0.00001$) rejected the null hypothesis, which considers that the data comes from a population with a normal distribution. The kurtosis observed was the leptokurtic type, and the distribution was negatively skewed ($S = -0.37$). The fluctuating asymmetry (FA) was characterized by a combination of different averages and variances of the distribution between the characteristics present on R-L claspettes (VanValen, 1962).

This kind of asymmetry in insects may be a result of environmental disturbances, such as pollution and/or climatic conditions, or genetic stress due to inbreeding, which may increase the phenotypic and genotypic variations of a population (Float & Fox, 2000; Mpho *et al.*, 2002). This effect has been seen in the number of sternopleural and outer orbital bristles of *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Woods *et al.*, 1999), and in the number of frontal bristles and postocular setae (R-L sides) of *Anastrepha fraterculus* complex Wiedemann, 1830 (Souza *et al.*, 2007). According to the results obtained by our team (Moratore, 2009; Peruzin, 2009) in a *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 population also collected in PET, in which

wing shape asymmetry was observed (bilateral asymmetry), it is possible that artificial environmental factors probably contributed to FA expression. This asymmetry may also be endogenous due an 'epigenetic control' in gene expression of RP development, interfering in gene effectiveness. Although we detected RP asymmetry, an explanation for the observed patterns is yet to be elucidated.

Conclusion

We concluded that the variable presence of the RPs on the genitalic claspette filament is not indicative of populational divergence or diagnostic of cryptic species within *Ae. scapularis*. Moreover, we found both inter- and intra-individual polymorphism and bilateral fluctuant asymmetry of RPs confirming that this is a labile character.

Acknowledgements

We would like to thank Aristides Fernandes for taxonomic identification of the specimens, Fernanda Silva Almeida for mounting genitalia slides and Henrique Krambeck Rofatto for operating the CLS microscope (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP grant # 00/11624-5). Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Grants # 140032/2013-4 and #311805/2014-0), and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES Grant # 23038.005274/2011-24 and 1275/2011).

References

- Arnell, J.H. (1976) Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIII - a revision of the Scapularis group of *Aedes* (*Ochlerotatus*). *Contribution of American Entomological Institute* 13, 1-144.
- Consoli, R.A.G.B. & Oliveira, R.L. (1994) *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro, Fiocruz, 228 pp.
- Eberhard, W.G. (1985) *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Cambridge, MA, Harvard University Press, 244 pp.

- Float, K.D. & Fox, A.S. (2000) Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality. *Ecological Applications* **10**, 1541–1550.
- Forattini, O.P. (2002) *Culicidologia médica 2*. São Paulo, University of São Paulo, Edusp, 860 pp.
- Hribar, L.J. (1994) Geographic variation of male genitalia of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *American Mosquito Control Association* **26**, 132–144.
- Huber, B.A. (1995) Genital morphology and copulatory mechanics in *Anypaena accentuata* (Anyphaenidae) and *Clubiona pallidula* (Clubionidae: Araneae). *Journal of Zoology* **235**, 689–702.
- Huber, B.A. (2004) Evidence for functional segregation in the directionally asymmetric male genitalia of the spider *Melagobia mariguitarensis* (González-Sponga) (Phocidae: Araneae). *Journal of Zoology* **262**, 317–326.
- Lorenz, C. & Suesdek, L. (2013) Evaluation of chemical preparation on insect wing shape for geometric morphometrics. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **89**, 928–931.
- Lourenço-de-Oliveira, R. & Deane, L.M. (1995) Presumed *Dirofilaria immitis* infections in wild-caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**, 387–388.
- Moratore, C. (2009) Genetic and morphological patterns in populations of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Dissertation of Master degree in Science, University of São Paulo, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo, Brazil.
- Motoki, M.T., Santos, C.L.S.D. & Sallum, M.A.M. (2009) Intra-specific variation on the aedeagus of *Anopheles oswaldoi* (Peryassu) (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* **38**, 144–148.
- Mpho, M., Callaghan, A. & Holloway, G.J. (2002) Temperature and genotypic effects on life history and fluctuating asymmetry in a field strain of *Culex pipiens*. *Heredity* **88**, 307–312.
- Palmer, A.R. & Strobeck, C. (2003) Fluctuating asymmetry revisited. 279–319 pp. in Polak, M. (Ed.) *Developmental Instability (DI): Causes and Consequences*. New York, Oxford Univ. Press.
- Pauvolid-Corrêa, A., Kenney, J.L., Couto-Lima, D., Campos, Z. M., Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M., Brault, A.C. & Komar, N. (2013) Ilheus virus isolation in the Pantanal, west-central Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**, 1–8.
- Peruzin, M.C. (2009) Comparative population analyses of *Culex quinquefasciatus* of two sites of São Paulo State. Dissertation of Master degree in Science, University of São Paulo, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo, Brazil.
- Petersen, V. (2012) Characterization of three populations of *Ochlerotatus scapularis* (Rondani, 1848) of the Rio de Janeiro-São Paulo, using morphological and genetic markers. Dissertation of Master degree in Science, University of São Paulo, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo, Brazil.
- Petersen, V., Devicari, M. & Suesdek, L. (2015) High morphological and genetic variabilities of *Aedes scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses. *Parasites & Vectors* **8**, 128.
- Rachou, R.G., Lima, M.M., Neto, J.A.F. & Martins, C.M. (1995) 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*. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* **7**, 51–70.
- Sallum, M.A.M., Uramoto, K. & Forattini, O.P. (1988) Redescription, and resurrection from synonymy, of *Aedes* (*Ochlerotatus*) *rhyaophilus* Costa Lima, 1933. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **83**, 67–77.
- Sallum, M.A.M., Foster, P.G., Santos, C.L.S.D., Flores, D.C., Motoki, M.T. & Berço, E.S. (2010) Resurrection of two species from synonymy of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *strudei* Root, and characterization of a distinct morphological form from the Strodei Complex (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **47**, 504–526.
- Shapiro, S.S. & Wilk, M.B. (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika Trust Stable* **52**, 591–611 pp. Available online at <http://www.jstor.org/stable/2333709>.
- Song, H. & Wenzel, J.W. (2008) Mosaic pattern of genital divergence in three populations of *Schistocerca lineata* Scudder, 1899 (Orthoptera: Acrididae: Cyrtacanthacridinae). *Biology Journal Linnean Society* **94**, 289–301.
- Souza, J.M.G.A., Gouveia, M., Perondini, A.L.P. & Selivon, D. (2007) Asymmetry frontal bristles and postocular setae in species and hybrids of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Genetics and Molecular Biology* **30**, 145–151.
- VanValen, L. (1962) A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* **16**, 125–142.
- Vasconcelos, P.F.C., Costa, Z.G., Travassos da Rosa, E.S., Luna, E., Rodrigues, S.G., Barros, V.L.R.S., Dias, J.P., Monteiro, H.A.O., Oliva, O.F.P., Vasconcelos, H.B., Oliveira, R.C., Sousa, M.R.S., Barbosa Da Silva, J., Cruz, A.C.R., Martins, E.C. & Travassos Da Rosa, J.F.S. (2001) Epidemic of Jungle Yellow Fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. *Journal of Medical Virology* **65**, 598–604.
- Woods, R.E., Sgro, C.M., Hercus, M.J. & Hoffmann, A.A. (1999) The association between fluctuating asymmetry, trait variability, trait heritability, and stress: a multiply replicated experiment on combined stresses in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **53**, 493–505.