VIVIAN PETERSEN

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

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

São Paulo
2012

VIVIAN PETERSEN

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

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

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Suesdek

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
2012

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

© reprodução total

Petersen, Vivian Aparecida Ramos.
Caracterização de três populações de *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) do eixo Rio de Janeiro São Paulo, utilizando marcadores genéticos e morfológicos / Vivian Aparecida Ramos Petersen. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Suesdek Rocha.

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

Versão do título para o inglês: Characterization of 3 populations of *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) of the Rio de Janeiro São Paulo, using genetic markers and morphological.

1. Morfometria 2. Aedes 3. Genética de populações 4. Culicidae 5. Marcador molecular 6. Diversidade genética I. Rocha, Prof. Dr. Lincoln Suesdek II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0184/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vivian Aparecida Ramos Petersen.

Título da Caracterização de três populações de *Aedes scapularis* (Rondani, 1848) do eixo Rio de Janeiro São Paulo, utilizando marcadores genéticos e morfológicos.

Orientador(a): Prof. Dr. Lincoln Suesdek Rocha.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 437/10 referente ao projeto intitulado: *"Investigação de polimorfismos de geometria alar e de genes mitocondriais em Aedes scapularis (Diptera;Culicidae)"* 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 envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 14 de dezembro de 2010.

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,

Maria Aparecida Petersen

e aos meus irmãos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lincoln Suesdek, pela confiança, ensinamentos, paciência, oportunidade e amizade.

Ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, onde realizei meu mestrado.

A Prof. Dr[a]. Maria Anice Sallum por ter cedido o laboratório de Biologia molecular para experimentos além de seus ensinamentos, sugestões que contribuíram pra este trabalho.

Agradeço ao apoio financeiro da agência Fapesp na realização deste projeto, 2010/14479-8.

Aos amigos do laboratório de parasitologia: Paloma, Edu, Camila, Stella, Carol, Fabio e Flávia. Obrigada pelos momentos de alegria, amizade e conselhos pessoais! Nunca vou esquecer essa fase da minha vida!

A Tatiane Porangaba e Maysa Motoki pela amizade e super ajuda com as técnicas de biologia molecular.

Obrigada ao Leo, Sandra, Bruna, Caio, Denise, pela amizade e momentos divertidos no Karaokê da Liberdade!

Ao Aristides Fernandes por auxilio nas identificações dos espécimes usadas nesse trabalho.

Aos meus pais pelo exemplo de vida, carinho, sempre acreditando em meus sonhos.

Aos meus irmãos: Thiago, futuro pesquisador de poraquês! Obrigada pela amizade e pelas discussões de testes estatísticos! Valeu Pedrão pelas brincadeiras que sempre me descontraíram!

A Leonardo Hiraoka pelo amor, carinho, companheirismo e paciência.

A Fernanda Almeida e Cristina Chagas pelo auxilio com minhas lâminas de morfometria.

“Nós pensávamos que tínhamos as respostas, mas eram as nossas perguntas que estavam erradas.”

U2

RESUMO

Petersen V. Caracterização de três populações de *Ochlerotatus scapularis* (Rondani, 1848) do eixo Rio de Janeiro-São Paulo, utilizando marcadores genéticos e morfológicos. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Amostras populacionais de *Oc. scapularis* foram coletadas nos municípios de Tremembé-SP (TRE), São Paulo-SP (SPA) e Itaboraí-RJ (ITA). Foram empregados como marcadores biológicos: o gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade-1 (COI), geometria alar e análise da genitália masculina. Tais marcadores são tradicionalmente reconhecidos pelo poder discriminante em estudos desta natureza. As populações ITA, TRE e SPA mostraram-se distintas quanto à forma alar, sugerindo baixo fluxo gênico entre elas. Foi verificado dimorfismo sexual em relação ao tamanho isométrico, à forma alar e ao grau de diferenciação populacional. A população de ITA apresentou menor tamanho dos centróides que as demais populações estudadas. Foi verificado amplo polimorfismo genético, tendo sido detectados 51 haplótipos de COI e apenas 11 compartilhados entre as populações ITA, TRE e SPA. Quando comparados com as populações de estudo anteriormente realizado por Devicari, 2010 encontramos um padrão parecido. Analisando conjuntamente os presentes dados com aqueles obtidos por Devicari, 2010, computamos 52 haplótipos sendo apenas alguns compartilhados. Os valores do índice de diferenciação genética Φ_{st} observados foram moderados somente entre SPA e ITA, nas demais populações estudas a diferenciação foi baixa, a diferenciação genética observada foi compatível com a hipótese de distanciamento geográfico das populações coletadas. Analisando cada marcador biológico, concluímos que as populações estudadas não se tratam de complexo de espécies. Ainda não descartamos a existência de complexo dentro de *Oc. scapularis*, porém, para definitiva resposta a essa questão serão necessários mais estudos envolvendo populações de outras regiões.

Palavras chave: *Ochlerotatus scapularis*. Morfometria geométrica alar. Citocromo Oxidase Subunidade I**.**

ABSTRACT

Petersen V. Characterization of three populations of *Ochlerotatus scapularis* (Rondani, 1848) of the Rio de Janeiro-Sao Paulo, using morphological and genetic markers. [Masters thesis [dissertation (Biology of Host-Pathogen Relationship)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Samples of *Oc. scapularis* were collected in the municipalities of Tremembé-SP (TRE), São Paulo-SP (SPA) and Itaboraí-RJ (ITA). We used the following biological markers: mitochondrial cytochrome oxidase subunit-1 gene (COI), wing geometry and shape of male genitalia. These markers are traditionally known by its discriminating power in studies of this nature. ITA, SPA TRE populations, showed distinct wing shape, suggesting low gene flow. We observed sexual dimorphism concerning the isometric size, wing shape and the degree of populational differentiation. ITA sample exhibited the lowest centroid sizes. We found high genetic polymorphism in all populational samples, being 51 COI haplotypes. Out of them, only 11 haplotypes were noted to be shared between at least two or three populations. When comparing our results with those of a previous survey conducted by Devicari (2010), we found a quite similar pattern of hign polymorfism. In total, both studies comprised 52 haplotypes. The Φ_{st} index of genetic differentiation values were considered “moderate” between ITA and SPA and “low” in the other comparisons. Present results are consistent with the hypothesis that populations are subjected to isolation by geographical distance. Analyzing together each biologcal marker, we conclude that populations studied do not consist a species complex. We do not rule out the possible occurence of a complex in *Oc. scapularis,* however, a definitive answer to this question will require further studies and sampling of populations from elsewhere.

Keywords: *Ochlerotatus scapularis*, Wing geometric morphometrics, Cytochrome Oxidase Subunidade I.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fêmea de *Oc. scapularis*.....17

Figura 2- Presença e ausência do processo retrodirigido do filamento do claspete da genitália masculina.....22

Figura 3- Locais de coleta 25

Figura 4- Parque ecológico do Tietê (SP) 25

Figura 5- Município de Itaboraí (RJ) 26

Figura 6- Município de Tremembé (SP) 26

Figura 7- Representação dos 18 pontos da asa no morfoespaço 28

Figura 8- Morfoespaço das variáveis canônicas de machos de *Oc. scapularis* 37

Figura 9- Morfoespaço das variáveis canônicas de fêmeas de *Oc. scapularis*.....38

Figura 10- Fenograma.....39

Figura 11- Tamanho de centróides de fêmeas e machos.....40

Figura 12. Representação das distâncias geográficas 41

Figura 13. Triângulo representando as disparidades métricas de machos e fêmeas 41

Figura 14- Rede de haplótipos para as amostras de *Oc. scapularis* 43

Figura 15- Rede de haplótipos das amostras de *Oc. scapularis* junto com populações de Devicari, 2010 44

Figura 16- Dendograma das distâncias genéticas.....45

Figura 17- Genitália de *Oc. scapularis* 50

Figura 18- Processo retrodirigido do filamento do gonocoxito.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados das coletas 33

Tabela 2- Dimorfismo sexual de tamanho alar.....35

Tabela 3- Valores de p (Mahalanobis) das disparidades métricas de fêmeas e machos.....35

Tabela 4- Valores das Distâncias de Procrustes das disparidades métricas de machos e fêmeas 35

Tabela 5- Valores de p (Distâncias de Procrustes) das disparidades métricas machos e fêmeas.....36

Tabela 6- Frequência de haplótipos nas três populações de *Oc. scapularis* estudadas.....46

Tabela 7- Haplótipos compartilhados entre as populações das localidades Tremembé, São Paulo, Itaboraí e Pariquera-Açu.....48

Tabela 8- Distâncias genéticas entre as populações TRE, ITA e SPA baseadas no polimorfismo do gene COI.....48

Tabela 9- Valores de divergência genética calculado por base do índice de Φ_{st}.....48

Tabela 10- Valores estimados de migração entre as três populações estudadas (Nm).....49

Tabela 11- Análises estatísticas para polimorfismo e teste de neutralidade do gene COI 49

Tabela 12- Características do processo retrodirigido da genitália masculina 51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 *Ochlerotatus scapularis* (Rondani, 1848) 15
1.2 Variabilidade e estruturação populacional em *Ochlerotatus scapularis*. 17
1.3 Métodos para estudo populacional 19
1.3.1 Marcadores mitocondriais citocromo oxidade (COI) 19
1.3.2 Morfometria alar 20
1.3.3 Estudo morfológico da genitália masculina 21
2 OBJETIVOS 23
3 MATERIAIS E MÈTODOS 24
3.1 Coletas do material 24
3.2 Estações de Coleta 24
3.2.1 São Paulo-SP 24
3.2.2 Itaboraí-RJ 24
3.2.3 Tremembé-SP 25
3.2.4 *Outros locais de coleta* 26
3.3 Análise morfométrica de asas 27
3.4 Análise do gene mitocondrial Citrocromo Oxidase (COI) 28
3.4.1 Extração de DNA 28
3.4.2 Amplificações do DNA mitocondrial 29
3.4.3 Eletroforese em gel de agarose 29
3.4.4 Purificação do produto de PCR 29
3.4.5 Sequenciamento 30
3.4.6 Cromatografia de gel filtração em colunas de Sephadex® G50 30
3.4.7 *Análise do gene COI* 32
4 RESULTADOS 33
4.1 Coleta de dado 33
4.2 Variabilidade alar 33
4.2.1 Variabilidade geográfica alar 33
4.2.2 Análise de tamanho alar 34
4.3 Análise genética: Citocromo Oxidase subunidade I 42
4.4 Análise das genitálias masculinas 50
5 DISCUSSÂO 52

5.1 Morfometria alar 52
5.2 Citocromo Oxidase Subunidade I 54
5.3 Estudo da genitália masculina 56
5.4 Comparação dos três marcadores utilizados no estudo 56
6 CONCLUSÕES 58
REFERÊNCIAS.....59

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Ochlerotatus scapularis* (Rondani, 1848)

O mosquito *Ochlerotatus scapularis* pertence à família Culicidae, formada por insetos holometabólicos da ordem Diptera, subordem Nematocera. Esta espécie é neotropical, estando distribuída amplamente pelo continente americano, apresentando maior frequência na porção sul-americana. O *Oc. scapularis* (Figura 1) desenvolve maior atividade hematófaga em período vespertino, sendo mais frequentes nas épocas de seca na região do sudeste brasileiro (Forattini et al., 1981).

As larvas se desenvolvem em coleções hídricas de caráter provisório ou permanente (Forattini et al., 1994) e já foram encontradas em recipientes artificiais (Forattini et al., 1997). Contudo isso mostra um início de adaptação às regiões urbanas e certa tendência à endofilia, principalmente próximo às moradias em ambiente rural e semi-rural (Forattini et al., 1995; Taipe–Lagos, Natal, 2003;) fazendo dessa espécie um potencial risco à saúde pública, já que esta é incriminada como vetora de diversos agente etiológicos de arboviroses (Forattini, 2002) e filarioses (Labarthe et al.,1998). Este mosquito tem competência vetora para vírus do Melão, Ilhéus e Encefalite Equina Venezuelana, além do vírus do Rocio (Arnell, 1976; Spence et al., 1962;) e suspeita-se que este veicule também a *Wuchereria bancrofti* (Forattini, 2002).

Acredita-se que este mosquito seja o provável responsável na veiculação das encefalites no vale do Ribeira do Iguape-SP, já que estudos comportamentais dessa espécie no local mostraram sua tendência à antropofilia (Forattini et al., 1995). Além disso, como se comprovou experimentalmente a sua competência à infecção do vírus Rocio, o seu hábito de circular entre áreas urbanas e silvestres, o faz de grande importância epidemiológica (Mitchell et al., 1986). Devido a estudos abrangentes de epidemiologia do vírus realizados por Iversson, 1977, acredita-se que nesta região já havia a presença do vírus em reservatórios animais (aves ou pequenos mamíferos) e que este teve o contato com o homem através de mosquitos, quando o homem invadiu o seu ambiente.

A partir de 1975, observou-se um aumento de casos dessa moléstia que atingiu 13 municípios do Vale do Ribeira. Esta condição teve continuidade nos anos seguintes, principalmente nos meses de alta pluviosidade, atingindo a condição

endêmica somente no ano de 1978 (Iversson, 1977, 1980). No ano 2000, Romano-Lieber & Iversson constataram ainda a presença do arbovírus na população de alguns bairros do vale do Ribeira em inquérito sorológico realizado no local.

O mosquito *Oc. scapularis* apresenta também a capacidade vetorial para o verme *Dirofilaria immitis*, parasita este que infecta cães em quase mundo todo (Guerrero et al., 1992a). Este mosquito já foi encontrado albergando larvas da filária *D. immitis* nos seus tubos digestivos, indicando sua possível ação vetora na baixada litorânea do Rio de Janeiro (Lourenço-de-Oliveira, Deane 1995). Acredita-se que este mosquito esteja envolvido na transmissão de *D. immitis* no estado do Rio Grande do Norte, no município de Mossoró, após levantamento faunístico de culicídeos (Lima, Ahid, 2004).

Pode-se dizer que o estudo de população de culicídeos em ambiente urbano, é um passo inicial importante à vigilância desta mesma população (Taipe-Lagos, Natal, 2003). O estudo populacional de vetores garante subsídios ao conhecimento das possíveis implicações epidemiológicas na interação mosquito/vírus/homem. Apesar de sua importância em saúde pública, esta espécie é pouco estudada quanto à sua estruturação populacional e ainda suspeita-se de constituir um complexo de espécies.

Figura 1- Fêmea de *Oc. scapularis.* A mancha prateada escutelar é uma característica bastante evidente neste mosquito, sendo comumente utilizada para diagnóstico da espécie.

Foto: Morais (2008) [1]

1.2 Variabilidade e estruturação populacional em *Ochlerotatus scapularis*

Acredita-se que este mosquito faça parte de um complexo de espécies, pois já foram observadas modificações na morfologia das áreas cobertas do escudo, no filamento apical do cláspete da genitália masculina, entre outras observações (Forattini, 2002). Arnell, 1976 também já havia detectado ampla variação morfológica entre indivíduos desta espécie, o que reforça a hipótese de um possível início de formação de um complexo de espécies. Complexo de espécies são de difícil diagnóstico sob o ponto de vista da taxonomia clássica, mas possuem diferenças

[1] Morais, S.A. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2008.

significativas para que sejam consideradas pertencentes a entidades biológicas (reprodutivas) distintas (Futuyma, 1997).

Recentemente, um trabalho de mestrado de nosso grupo (Devicari, 2010), utilizou-se de três populações, onde duas delas estão localizadas na área metropolitana de São Paulo distantes cerca de 20 km uma da outra e a terceira localizada a 200 km destas. Por meio da geometria alar e de um marcador genético (COI) foi possível verificar diferenças populacionais das três localidades. O marcador COI inclusive demonstrou variação intrapopulacional, isso evidencia que estes marcadores são sensíveis, mesmo em pequenas distâncias geográficas já é possível detectar variações nessa espécie.

Complexo de espécies são uma problemática à saúde pública, uma vez que capacidade vetora está relacionada a algumas espécies que podem ser semelhantes morfologicamente a outras que não transmitem agentes etiológicos de doenças. Então daí a importância na diferenciação correta das espécies, para a realização eficaz de campanhas de controle ao mosquito vetor (Garros et al.,2006). Um exemplo está nos mosquitos agrupados no complexo *Cx. coronator*, os adultos desse complexo são indistinguíveis pela morfologia externa, sendo somente diferenciados pelo ápice do gonocoxito e pela ornamentação cerdosa do lobo subapical do gonocoxito da genitália dos mosquitos adultos (Forattini, 2002). Além disso, comprovou-se em laboratório a capacidade vetora de indivíduos desse complexo para encefalite de Saint Louis, da Amazônia peruana e já se encontrou indivíduos naturalmente infectados com este vírus (Hammon, Reeves, 1943; Spence et al., 1957). Outro exemplo é do complexo *Anopheles gambie*, algumas espécies deste são incriminadas como vetoras de plasmódios na África. Outro exemplo seria ainda o do complexo *Culex pipiens*, espécies essas presentes nas zonas temperadas do hemisfério norte, e região neotropical (Forattini, 2002).

Ainda pode-se citar espécies do complexo: *Anopheles albitarsis*, *An. oswaldoi* e *An. triannulatus* (Revisão de Rosa-Freitas et al., 1998). Complexo de espécies frequentemente são decorrentes de processos de especiação recentes, ou então, de eventos de especiação em que a diferenciação biológica não se pronunciou nos aspectos morfológicos do táxon. Para o entendimento desses processos é fundamental a condução de estudos de caracterização populacional que correlacionem a variabilidade dos caracteres biológicos com informações biogeográficas.

Os padrões de diversos caracteres biológicos, quando analisados em conjunto permitem estimar o grau de similaridade entre populações, o grau de fluxo gênico entre elas e também concluir se há evidência de complexo de espécies. No contexto da entomologia médica, investigações sobre a estruturação populacional são primordiais para a elaboração ou aprimoramento das estratégias de controle vetorial.

1.3 Métodos para estudo populacional

Para os estudos investigativos de estruturação populacional, diversos marcadores biológicos têm sido empregados em entomologia médica. A combinação de dois ou mais marcadores biológicos nas investigações de estrutura populacional enriquecem as análises, permitem refletir sobre a história evolutiva dos organismos, além disso, dão mais verossimilhança às conclusões. Com destaque, pode-se citar marcadores como o gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e a geometria da forma alar e estudo morfológico de genitália como comentado a seguir.

1.3.1 Marcadores mitocondriais citocromo oxidade subunidade I (COI)

O DNA mitocondrial se apresenta em uma organização estrutural bastante simples em animais, contendo 37 genes e uma região não- codificadora que controla a replicação e transcrição do material genético da mitocôndria (Clary, Wolstnholme, 1985). O DNA mitocondrial raramente sofre recombinação e apresenta rápida taxa evolutiva (Matioli, 2000). Muitos estudos demonstraram que o DNA mitocondrial é útil em pesquisas de diversidade genética de várias espécies, inclusive mosquitos, assim como em estudos de filogenia e de fluxo genético (Avise, 1994; Kabhampati et al., 1991; Wilkerson et al., 2005). O gene mitocondrial COI está em centenas de cópias por células e têm baixa variação intra-especifica (Cywiska et al., 2006), sendo um marcador específico em nível populacional (Lunt et al., 1996).

Os estudos envolvendo o marcador COI vêm sendo cada vez mais utilizados em culicídeos. Em estudo realizado por Cywinska, 2006 na identificação de espécies de mosquito da família Culicidae no Canadá, o marcador COI mostrou todas as características para um marcador eficaz: É compartilhado por todas as espécies, é de fácil análise e é capaz de identificar os indivíduos em espécie. Em trabalho realizado com o gênero *Culex*, a análise do gene mitocondrial COI, juntamente com estudos

morfológicos revelou que podem existir complexos dentro das espécies *Cx. mollis*, *Cx. dolosus, Cx. imitator* (Demari, 2009). Lehr et al., 2005 em pesquisa realizada com espécies do complexo *Anopheles albitarsis*, discriminou pelo menos cinco espécies dentro desse complexo.

Estudos envolvendo o marcador COI vêm sendo cada vez mais empregados em pesquisas envolvendo filogenia e diagnóstico de espécies, principalmente para complexo de espécies. Em estudo recentemente realizado com três populações de *Oc. scapularis* foi possível diferenciá-las intra e interpopulacional por meio do marcador COI (Devicari, 2010).

1.3.2 Morfometria alar

Algumas espécies de insetos não são facilmente identificadas utilizando-se da taxonomia clássica, muitas destas são apenas identificadas por meio das formas imaturas e para algumas espécies as chaves são melhores descritas para um dos gêneros. Assim se faz necessário a busca de métodos alternativos que proporcionem a percepção destas variações como as técnicas de morfometria. Em particular, a morfometria geométrica permite um estudo estatístico multivariado das estruturas biológicas (Monteiro, 1999; Rohlf, 1993). A morfometria alar trata- se do estudo de um carácter com múltiplos estados.

Este método foi proposto por Bookstein na década de 1990, está cada vez mais aplicado em estudos populacionais de insetos, principalmente culicídeos. Os dados para os estudos morfométricos são extraídos a partir da distância de pontos de referência, formados pela justaposição de tecidos ou pontos extremos do corpo os chamados marcos anatômicos (Dujardin et al., 2008). São tomadas as coordenadas posicionais de cada marco anatômico em um plano cartesiano imaginário que abrange a asa do indivíduo estudado. Sobre as coordenadas posicionais destes marcos, é possível aplicar testes de estatística multivariada para verificação da variação da forma e do tamanho isométrico das asas.

Para a descrição da forma alar, em geral utiliza-se a sobreposição de Procrustes seguida de análise de componentes principais, na morfometria geométrica, descritores que definem a variação populacional de formatos desconsiderando-se o tamanho isométrico. Já para a descrição de tamanho alar, é muito útil o descritor de tamanho isométrico chamado “tamanho do centróide”, definido pela raiz quadrada da

soma dos quadrados das distâncias de cada marco anatômico ao centróide da configuração total (Reis, 1999; Rohlf et al., 2009).

Alguns estudos revelaram que pela morfologia alar é possível a distinção de espécies dentro de complexos, assim como é possível observar diferenças de indivíduos entre as diferentes populações da mesma espécie (Jirakanjanaki, Dujardin, 2005). Pela morfometria alar foi possível a distinção de cinco espécies de *Anopheles* do subgênero *Nyssorrhynchus*, considerados os principais vetores de plasmódios nos trópicos, em que as fêmeas adultas são morfologicamente indistinguíveis pela taxonomia clássica, onde a sua identificação é feita somente pela genitália do macho adulto e pela quetotaxia de larvas de quarto instar (Calle et al., 2002).

O estudo morfométrico se ocupa em verificar as variações morfométricas entre indivíduos, populações e espécies (Bookstein, 1997), sendo de grande importância aos estudos epidemiológicos de espécies de importância à saúde pública.

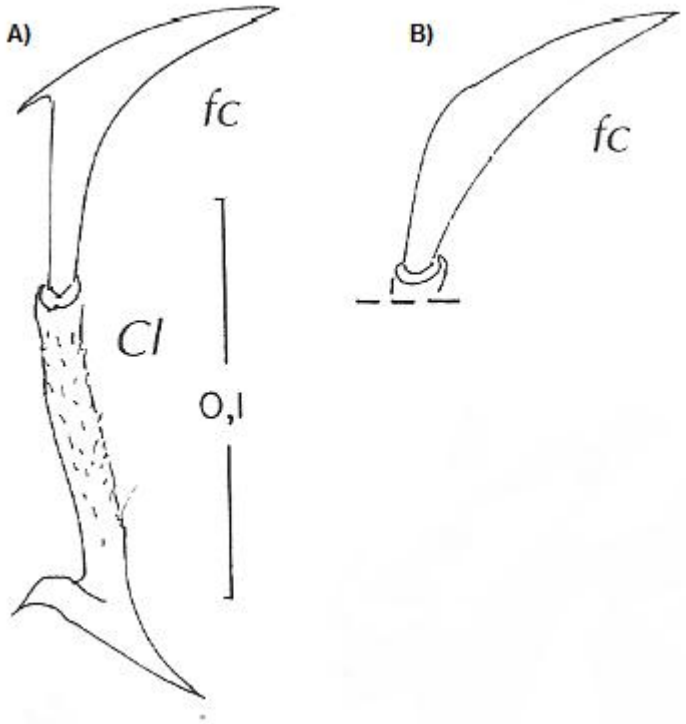
1.3.3 Estudo morfológico da genitália masculina

Este é um método clássico utilizado para a descrição morfológica da maioria das espécies de culicídeos. Esta estrutura ainda é muito usada para identificação de espécies através de chaves taxonômicas. Algumas espécies de culicídeos que fazem parte de complexo podem ser identificadas através da estrutura da genitália. Como exemplo disso, o *An. homunculus* e o *An. cruzii* são espécies morfologicamente muito parecidas na forma adulta, podendo somente ser identificados pela genitália do macho (Calado & Navarro-Silva, 2005).

O *Culex mollis* e o *Cx. bidens* podem ser separadas pela genitália masculina adulta, já por características externas no adulto existe a dificuldade na separação dessas espécies (Demari et al., 2011). Arnell (1976) estudou a morfologia das genitálias de *Oc. scapularis* e verificou a existência de diferenças entre indivíduos de diferentes populações desta espécie em relação ao processo retrodirigido do filamento do cláspete do gonocoxito (Figura 2). Isto como já mencionado sugere a existência de um possível complexo de espécies, dentro da espécie *Oc. scapularis*.

O estudo morfológico de estruturas da genitália de culicídeos é útil para a identificação de diversos táxons, sendo importante na separação de complexo de espécies.

Figura 2 – A) Presença do processo retrodirigido do filamento do claspete da genitália masculina (Reproduzido de Forattini, 2002) de *Oc. scapularis.* B) Ausência do processo retrodirigido.



2 OBJETIVOS

Estabelecemos uma comparação entre as populações de *Oc. scapularis* dos municípios: Tremembé (SP), São Paulo (SP) e Itaboraí (RJ), testando as duas hipóteses:

- existem diferenças genético-morfológicas entre essas três populações
- existe diferenciação biológica indicativa da ocorrência de complexo de espécies

Caracteres empregados nas comparações:

a) variabilidade (estado do caracter) da geometria alar

b) variabilidade do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI)

c) morfologia da genitália masculina

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coletas do material

Os mosquitos da espécie *Oc. scapularis* foram capturados em três áreas do Eixo Rio- São Paulo: Itaboraí (RJ), Tremembé (SP) e São Paulo (SP) (Figura 3). Já existiam previamente registros de encontro de *Oc. scapularis* nas três regiões de estudo.

Foram coletados mosquitos adultos machos e fêmeas com o auxílio de aspiradores entomológicos. As amostras foram individualizadas em microtubos de 1,5ml e armazenadas à temperatura de -80° C. Estes mosquitos foram acondicionados para a realização da técnica de extração de DNA e para a realização da técnica de morfometria alar. As amostras que excederam o número utilizado no estudo foram armazenadas em microtubos para consultas futuras.

3.2 Estações de Coleta

3.2.1 São Paulo-SP

(Figura 4): A coleta do material foi realizada dentro do Parque Ecológico do Tietê. Localizado na zona leste de São Paulo fazendo divisa com Guarulhos, o parque ocupa uma região de 12 milhões de m^2, região esta coberta por mata atlântica. O local recebe ampla visitação pública, cerca de 5.000 visitantes por mês.

3.2.2 Itaboraí-RJ

(Figura 5): Município localizado a 40 km da capital Rio de Janeiro, está entre a latitude 22° 44’ 51” Sul e longitude 42° 51’ 21” Oeste. A cidade é composta por regiões de pastagens, brejos, mata de encosta e mangues. A mata se encontra fragmentada pelo município.

3.2.3 Tremembé-SP

(Figura 6): Este município está localizado no Vale do Paraíba entre a latitude de 22º 57’ 12" e longitude 45º 32’ 28". A cidade de Tremembé está localizada a 133 km de São Paulo e 309 km do Rio de Janeiro, a rodovia Dutra. 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. A chácara apresenta fragmento bastante modificado de mata em meio ao ambiente urbano.

Figura 3 - Mapa indicando as áreas de coleta do estudo: São Paulo (SP), Tremembé (SP) e Itaboraí (RJ).

Figura 4 - Locais de coleta: Parque ecológico do Tietê (SP)

Figura 5 – Locais de coleta: Município de Itaboraí (RJ)

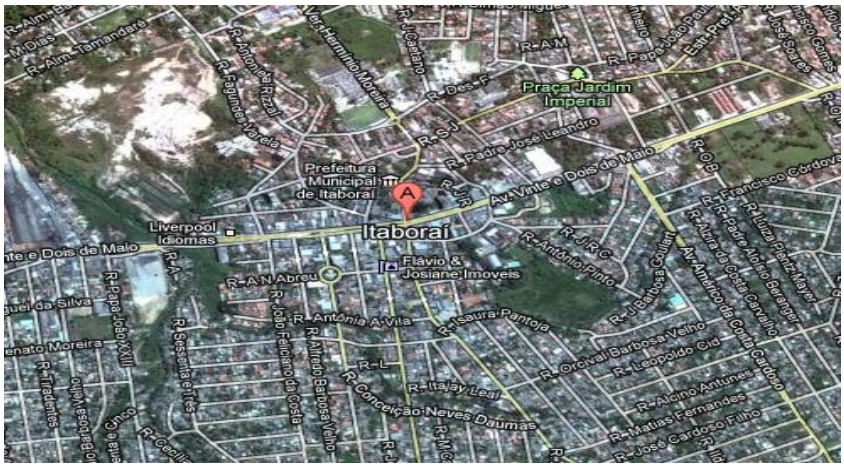


Figura 6 - Locais de coleta: Município de Tremembé (SP)

3.2.4 Outras populações incluídas neste estudo

Com o objetivo comparativo acrescentamos tanto nas análises moleculares como morfométricas as populações estudadas por Devicari, 2010. Essas populações foram coletadas em 2006, sendo provenientes das seguintes localidades: Município de Pariquera-Açu- SP, no bairro Butantã e no Parque ecológico do Tietê, ambos estão dentro do município de São Paulo. Essas populações foram representadas respectivamente pelas siglas: PAR, BUT e PET.

3.3 Análise morfométrica de asas

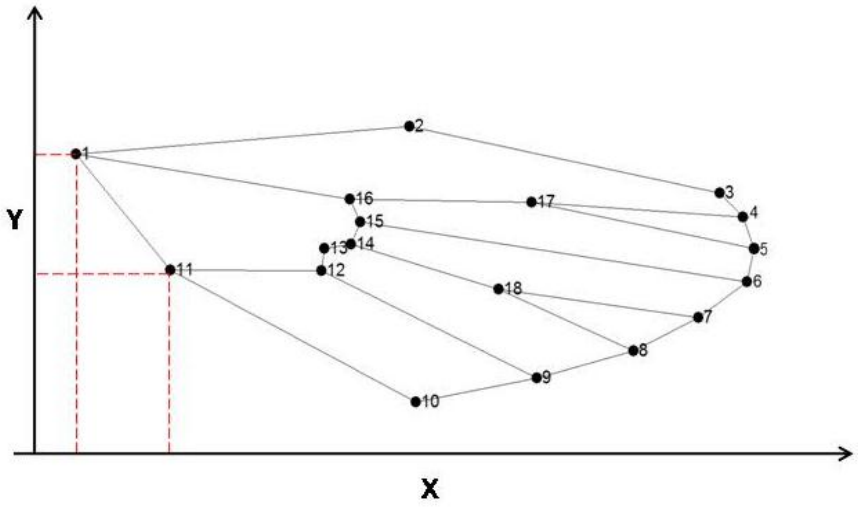
Para a avaliação das análises referentes aos dados de morfometria alar, somente fez-se o uso das asas direitas dos mosquitos. Os métodos de morfometria geométrica seguiram em linhas gerais os empregados por Morais et al. (2010), Vidal e Suesdek (2012) e as asas de machos e fêmeas, após remoção das escamas, foram montadas com bálsamo entre lâmina-lamínula para análise morfométrica. Imagens dessas asas foram capturadas através de câmera digital acoplada a um microscópio estereoscópico. Foram analisados ao menos 60 indivíduos (30 machos e 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 (Figura 7). Sobre esse dados foram computados os tamanhos de centróide e os “relative warps” que são os componentes principais de forma, com o auxílio dos programas de computador TpsUtil 1.29, TpsRelw 1.39 (QSC - James Rohlf) e MorphoJ 1.05a.

Essas variáveis morfométricas foram comparadas entre as amostras populacionais para avaliar a existência de variação populacional de forma/tamanho, dimorfismo sexual, bem como a disparidade métrica da forma alar. A disparidade métrica da forma alar é uma medida da variação da forma de uma amostra, baseada na distância euclidiana (Dujardin, 2008). Para a construção do fenograma de similaridade morfológica utilizamos uma população de *Aedes aegypti* coletada no município de São Paulo.

Testes estatísticos empregados foram ANOVA para tamanho do centróide e análise discriminante e disparidade métrica para forma. Verificamos também o índice de Q_{st}, este índice corresponde a diferenciação de traços quantitativos entre populações (Spitze, 1993).

Figura 7 - Representação dos 18 pontos da asa no morfoespaço. Cada ponto corresponde a uma coordenada cartesiana no eixo X e Y.



3.4 Análise do gene mitocondrial Citrocromo Oxidase Subunidade I (COI)

3.4.1 Extração de DNA

Com o auxílio de um pistilo autoclavado, cada mosquito foi macerado em tubo 1,5 ml contendo 300 μl de tampão de extração - TNES (10 mM Tris-HCL pH 7,5; 400 mM NaCl; 100 mM EDTA pH 8,0; 0,6% SDS). Foi adicionado 1μl de proteinase K (18,7 mg/ml) em cada tubo e incubado por cerca de 17 h a 56^0 C em banho seco com agitação (600 rpm por 15 seg a cada 10 min). Em seguida foi adicionado 85 μl de NaCl 5 M, em seguida homogeneizado e centrifugado a 1300 rpm por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o precipitado foi descartado. Foi adicionado 300 μl de etanol absoluto gelado (4^0 C) ao sobrenadante e homogeneizado por inversão. Em seguida foi incubado em gelo por 20 min e centrifugado a 13000 rpm por 10 min a 4^0 C. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 500 μl de etanol 70^0 C gelado (4^0 C), em seguida foi homogeneizado por inversão e então centrifugado a 13000 rpm por 10 min a 4^0 C. Foi descartado o sobrenadante e foi realizado a lavagem com etanol 70%, e o sobrenadante fói descartado. Em seguida foi Incubado por 5 min a 60^0 C em concentrador a vácuo para

completa evaporação do etanol. O precipitado foi ressuspendido com 100 μl de água ultra pura.

3.4.2 Amplificações do gene mitocondrial COI

A amplificação do gene COI do DNA mitocondrial foi realizada pelo método de PCR, para uma reação final de 25 μl: foi adicionado o tampão para PCR 1 X (Invitrogen), 0,75 μl de $MgCl_2$ (50 mM) (Invitrogen), 0,5 μl dNTP (10mM) (KapaBiosystems), 0,25 μl de cada primer (10 μM), 0,25 μl de Platinum ® *Taq* DNA Polymerase (5U/μl) (Invitrogen) e 1 μl do DNA extraído (1:20).

Os primers utilizados na amplificação do gene COI, são universais e foram publicados por Folmer et al. (1994), consistem nas sequências depositadas no GenBank: LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' para a fita *forward* e HC02198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' para a fita *reverse.* O ciclo de amplificação constituiu em: Temperatura inicial de 94 ºC por 3 min, seguidos de 40 ciclos 1 min de 94 ºC, 55 ºC por 1 min, 72 ºC por 1 min, com um ciclo de extensão final de 72 ºC por 7 min por 40 ciclos. A amplificação foi checada com eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al.(1989).

3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

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). Em cada poço do gel foram adicionados 2 μl do produto da PCR, 1 μl de 6X DNA Loading Dye (0,1 % bromofenol e 30 % glicerol) e 1 μl de Gel Red (Concentração de 1:5000). A visualização do gel e os dados para documentação foram efetuados no programa LabWorks do sistema de captura de imagens (Image Acquisition and Analysis Software) da UVP, Inc., CA, USA.

3.4.4 Purificação do produto de PCR

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 minutos a 37 ºC. Ao final deste período o material foi centrifugado a 13200 rpm, por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes por centrifugação a 13200 rpm por 10 minutos a 4 ºC, com etanol 80%. O etanol residual foi eliminado por evaporação, o DNA foi dissolvido em 25 μl de H_20 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).

3.4.5 Sequenciamento

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 (*foward* ou *reverse*), 0,25 μl de Big Dye, 10-50 ng de DNA e água ultra pura.

As condições para esta reação foram as seguintes: 96 ºC por 15 seg, 50 ºC por 15 seg e 60 ºC por 4 min, em 25 ciclos. Após o término da reação, os produtos de sequenciamento foram armazenados à –20ºC ou imediatamente submetidos à etapa de purificação efetuada por cromatografia de gel filtração em colunas de Sephadex ® G50.

3.4.6 Cromatografia de gel filtração em colunas de Sephadex® G50

As microcolunas de Sephadex® G50 (Medium size, GE-Healthcare-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) empregadas na purificação dos produtos pós-sequenciamento foram preparados no laboratório. Para isto, 1 g 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 minutos 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 à 60ºC e armazenados a -20 ºC por no máximo 7 dias ao abrigo da luz. As análises eletroforéticas foram realizadas no sequenciador ABI Prism 3130 pela empresa Genomic.

3.4.7 Análise do gene COI

As sequências de DNA obtidas foram editadas no software ChromasPro e logo após, analisadas pelo programa de Clustal X 1.8 (Thompson et al., 1997) onde foram alinhadas para as posteriores análises.

Para as análises referentes ao polimorfismo do gene COI, utilizamos o programa de DNasp 5.0, onde verificamos o número de haplótipos, frequência, a diversidade haplotípica bem como a diversidade nucleotídica.

Para a construção da rede de haplótipos utilizamos o modelo de median joining no software Network 4.6.1.0. Foram estudados 29 indivíduos da população TRE, 36 de ITA e 33 de SPA, utilizamos somente as sequências de COI que apresentaram acima de 600pb. Também foram geradas matrizes de distância genética para cada população através da distância de Kimura 2-Parâmetros (K2P) para comparação do gene COI entre as populações.

Dados referentes à diferenciação populacional quanto ao índice de diferenciação genética Φ_{st} foram computados através do programa Arlequin 3.5. O índice de Φ_{st} varia de 0 a 1, onde valores próximos a zero indicam baixa variação genética entre as populações e os valores moderados estão entre 0,05 e 0,15. Este programa também foi utilizado para os testes de neutralidade para verificação da expansão populacional. Para estimar a taxa de migração utilizamos o método indireto de Wright, 1951:

$$\mathbf{Nm} = \frac{1}{4}\left(1 - \frac{1}{\Phi_{st}}\right)$$

m= Taxa de migração

N= Tamanho populacional

Nm= Número de imigrantes/ geração

$\boldsymbol{\Phi_{st}}$ **=** Índice de diferenciação genética

4 RESULTADOS

4.1 Coleta de dados

No total foram coletados cerca de 830 indivíduos machos e fêmeas. Em todas as localidades de coletas foram encontrados maior número de fêmeas (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados de identificação, número de indivíduo coletados e suas datas de coleta das populações de *Oc. scapularis* coletadas em: São Paulo-SP, Tremembé-SP e Itaboraí-RJ.

Local de Coleta Espécimes	Sigla	N° de coleta	Data de coleta	Localidade geográfica
Tremembé	TRE	300(180♀ e 120♂)	10/11/2010	latitude 22º 57' 12" Sul longitude 45º 32' 28"Oeste
São Paulo	SPA	250(140♀ e 110♂)	20/04/2011	latitude 23º25" Sul longitude 46º 28" Oeste
Itaboraí	ITA	280(180♀ e100♂)	30/03/2011	latitude 22° 44' 51" Sul longitude 42° 51' 21" Oeste

4.2 Variabilidade

4.2.1 Variabilidade geográfica das asas

Analisamos a variação morfológica alar utilizando o método de morfometria geométrica alar (Fig. 8) e obtivemos os seguintes resultados descritos abaixo:

A análise discriminante do formato alar aplicada às três populações estudadas (TRE, SPA e ITA) apontou diferenciação entre estas, com alguma intersecção no morfoespaço das variáveis canônicas (Fig. 9 e 10). Considerando-se apenas os machos, as distâncias métricas de forma (Mahalanobis) foram correlatas às distâncias geográficas (Fig. 13 e 14). Os machos da população ITA foram mais distintos das

demais populações estudadas. Entre as fêmeas as distâncias geográficas e morfológicas (Mahalanobis) não são correlatas, pois entre elas, ITA está mais próxima de SPA do que de TRE (Fig.14B). Com o uso das Distâncias de Procrustes não foi observada correlação entre estas e as distâncias geográficas das populações estudadas (tabelas 4 e 5).

As Distâncias de Mahalanobis foram significativas (<0,0001) para todas as populações estudas. Já no caso de fêmeas as Distâncias de Procrustes entre TRE e ITA foram muito significativas, enquanto TRE em relação a SPA não foram significativas (Tabela 5). Os agrupamentos observados no fenograma foram correlatos com as distâncias geográficas e as populações foram agrupadas de acordo com o ano de coleta, pois a população de SPA não se agrupou a BUT e PET, apesar de estas fazerem parte do município de São Paulo (Fig. 11).

Neste estudo, o valor de Q_{st} para o caráter “tamanho dos centróides” foi 0,98 para fêmeas e 1,00 para machos. No que se refere à forma alar, o valor de Q_{st} foi de 0,43 para machos e 0,37 para as fêmeas.

4.2.2 Análise de tamanho alar

Avaliando-se os tamanhos dos centróides, foi possível observar dimorfismo sexual em relação ao tamanho dos indivíduos (Fig.12), pois as fêmeas apresentaram maior tamanho alar em relação aos machos estudados. Em relação ao tamanho isométrico a população do município de Itaboraí apresentou-se menor comparativamente a São Paulo-SP e Tremembé-SP. Os valores do tamanho dos centróides apresentaram distribuição normal. Não foi verificada diferença significativa no tamanho isométrico entre machos e fêmeas da população de Tremembé (Tabela 2). O tamanho médio dos centróides variou de 1,48 mm (ITA) a 2,68 mm (TRE) para machos e de 1,81 mm (ITA) á 2,81 mm (TRE) para as fêmeas. A avaliação do tamanho alar, embora de praxe em estudos morfométricos, não costuma ser informativa quanto à diferenciação populacional por tratar-se de caracteres que sofrem plasticidade influenciada por elementos ambientais.

Tabela 2 - Dimorfismo sexual do tamanho alar de fêmeas e machos de *Oc. scapularis* Resultado da aplicação do teste paramétrico-T e (*) Teste não paramétrico Mann-Whitney para as populações de TRE, SPA e ITA.

Comparação de tamanho alar	Valor de p
TRE F X TRE M	P>0.05
SPA F X SPA M	P<0.01
ITA F X ITA M	P<0.01

Tabela 3- Valores das disparidades métricas (Mahalanobis) da forma alar para as populações de *Oc. scapularis* de TRE, SPA e ITA para machos e fêmeas.

	Macho		**Fêmeas**	
	ITA	**SPA**	**ITA**	**SPA**
SPA	<0, 0001*		<0, 0001*	
TRE	<0, 0001*	<0, 0001*	<0, 0001*	<0, 0001*

** *Valores significativos

Tabela 4 - Valores das Distâncias de Procrustes das disparidades métricas da forma alar para as populações de *Oc. scapularis* de TRE, SPA e ITA de machos e fêmeas.

	Macho		**Fêmeas**	
	ITA	**SPA**	**ITA**	**SPA**
SPA	0, 0207		0, 0280	
TRE	0, 0214	0, 0136	0, 0443	0, 0210

Tabela 5 - Valores de p (Distâncias de Procrustes) das disparidades métricas da forma alar para as populações de *Oc. scapularis* de TRE, SPA e ITA de machos e fêmeas.

	Macho		**Fêmeas**	
	ITA	**SPA**	**ITA**	**SPA**
SPA	0, 004		0, 0181	
TRE	0, 003	0, 0359	0, 0001*	0, 0541

*Valores muito significativos

Figura 8 - Morfoespaço das variáveis canônicas a partir de dados referentes à forma alar de três populações de machos de *Oc. scapularis.*

Comparação Interpopulacional

Machos

ITA X SPA X TRE

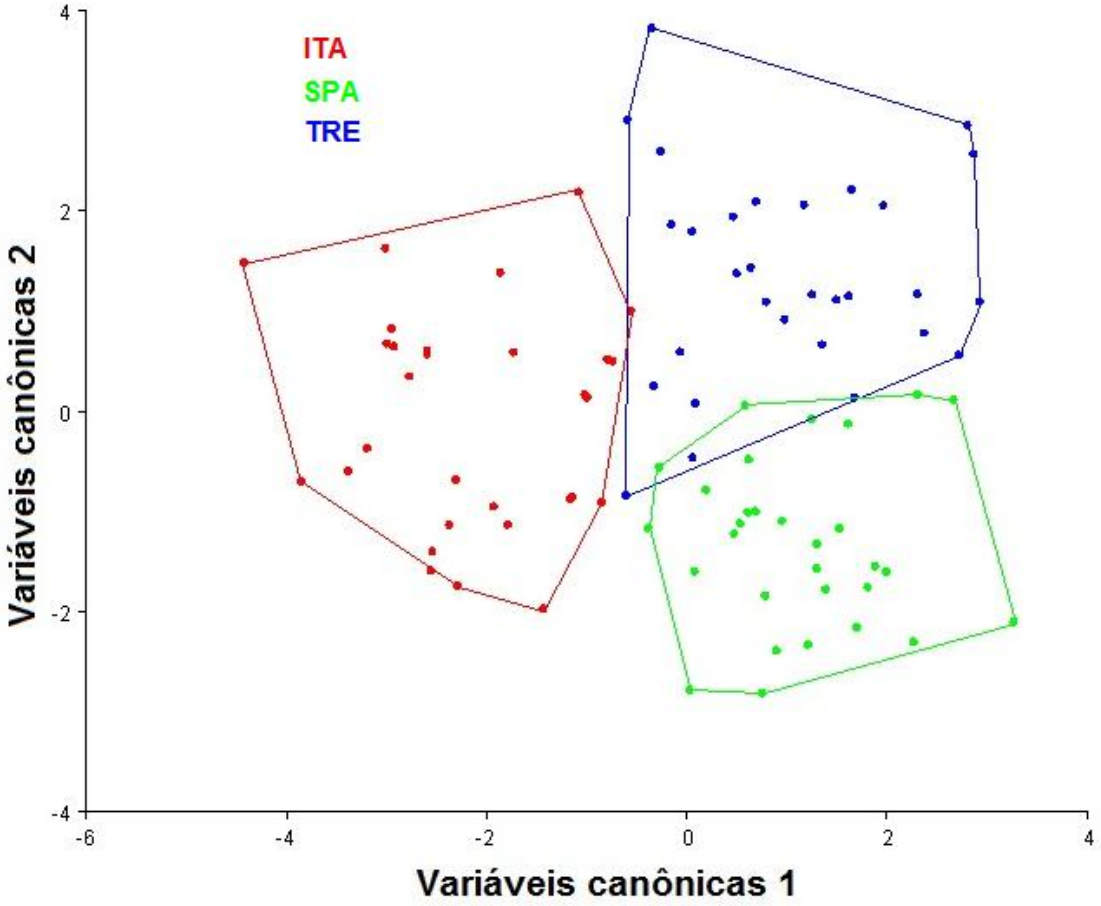


Figura 9 - Morfoespaço das variáveis canônicas a partir de dados referentes à forma alar de três populações de fêmeas de *Oc. scapularis.*

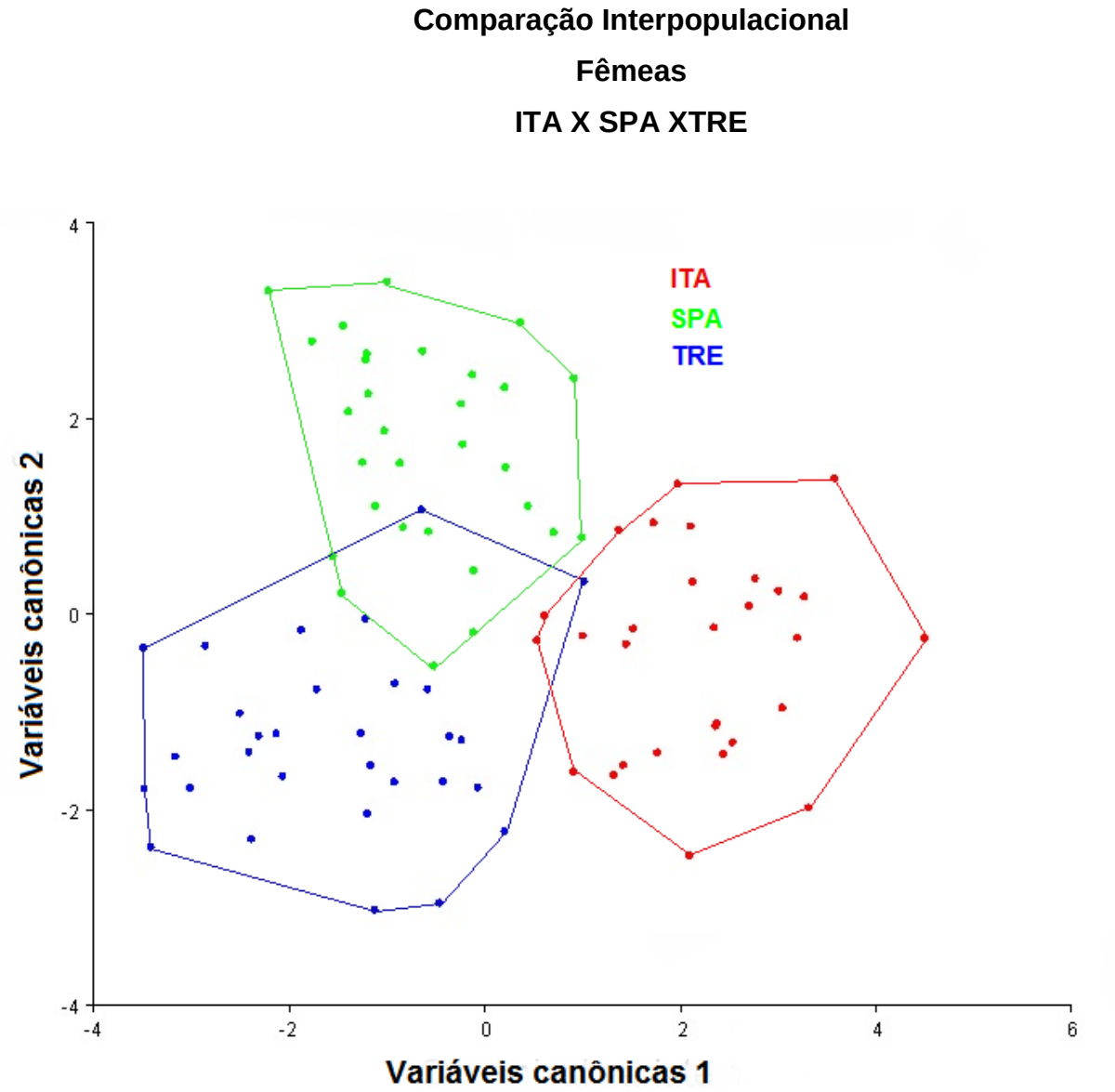
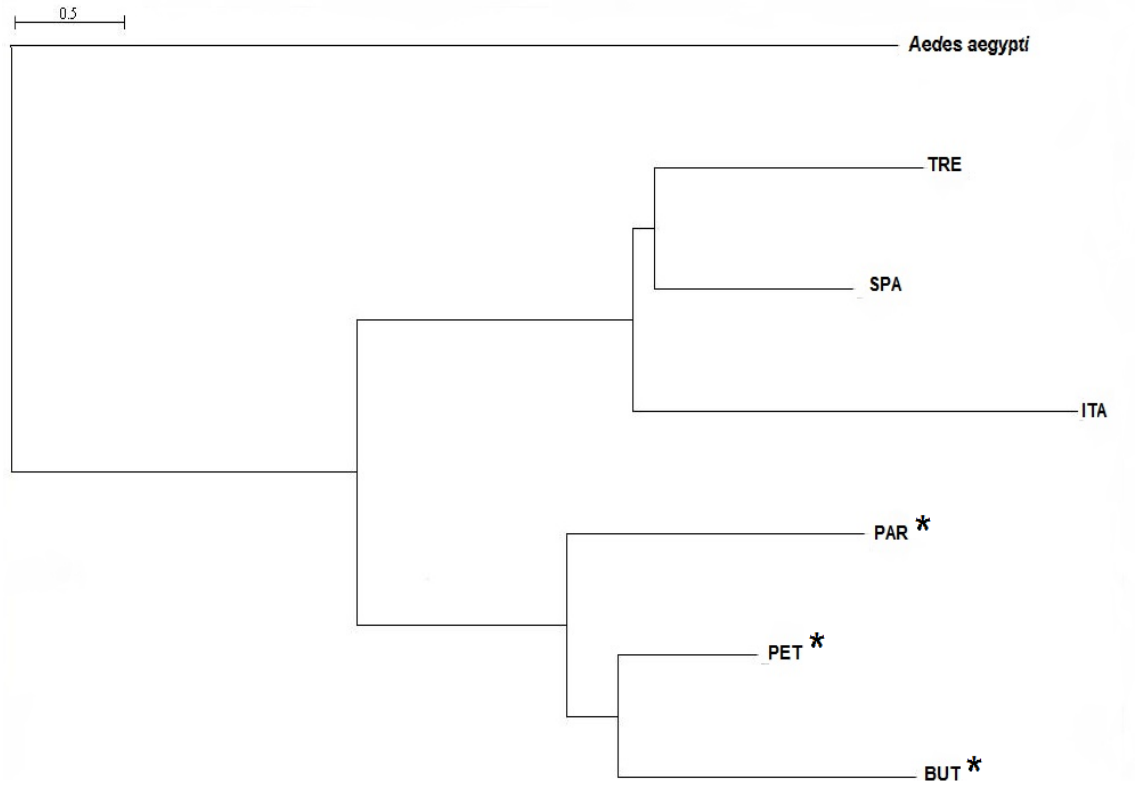


Figura 10 - Fenograma construído a partir de matriz de dissimilaridade com valores das Distâncias de Procrustes das populações de *Oc. scapularis* de: TRE, SPA, ITA, PAR, PET e BUT.



*Populações coletadas por Devicari, 2010.

Figura 11 - Tamanho dos centróides de fêmeas e machos das populações de *Oc. scapularis* de TRE, SPA e ITA.

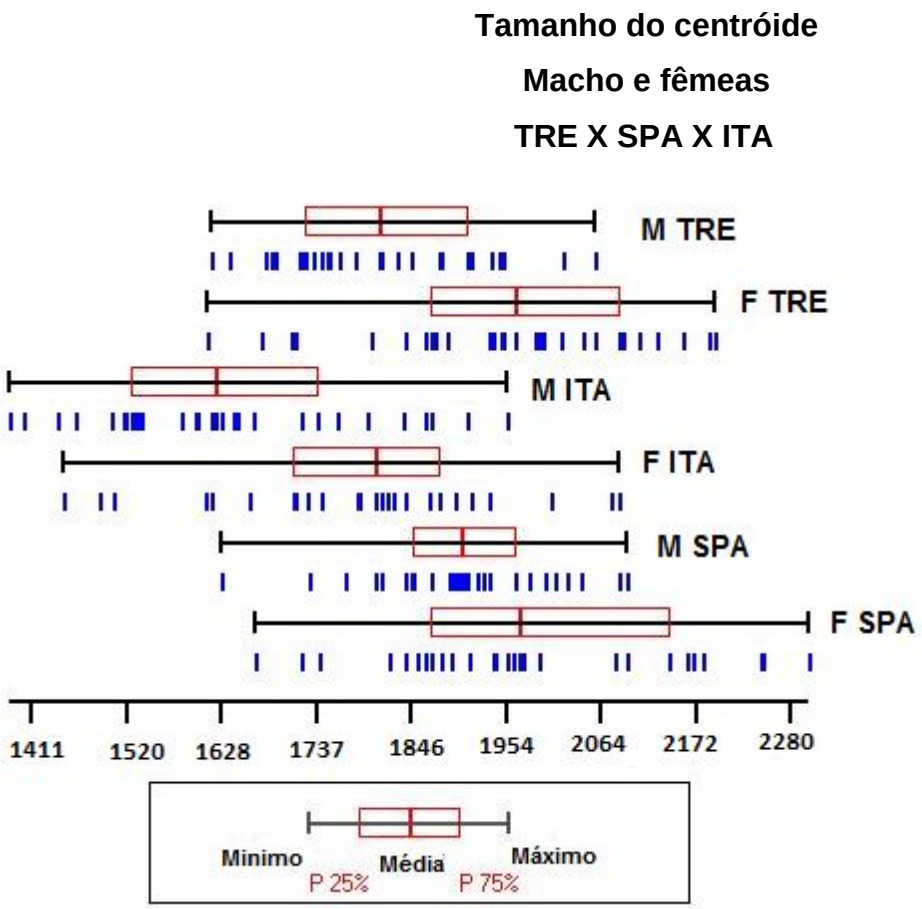


Figura 12 - Representação das distâncias geográficas lineares entre as três regiões de coleta de *Oc. scapularis*: Tremembé, São Paulo e Itaboraí.

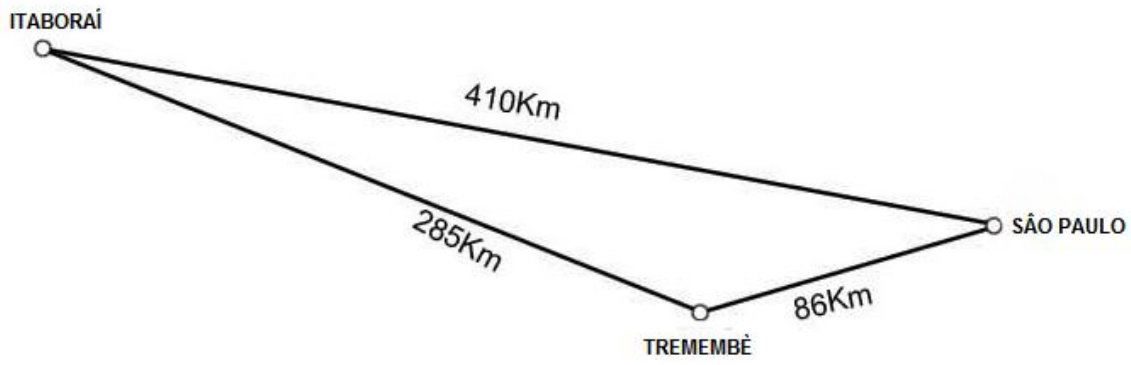
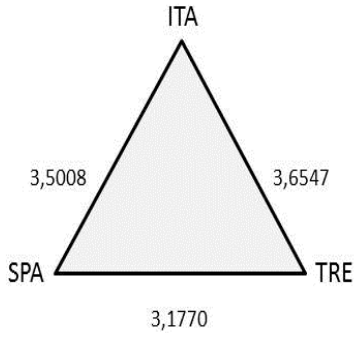
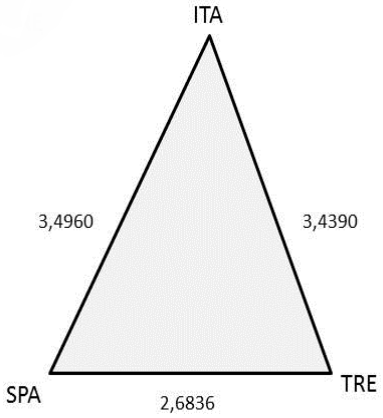


Figura 13 - Triângulo representando as Disparidades Métricas (Mahalanobis) da forma alar das populações de *Oc. scapularis* de TRE, SPA e ITA. **A)** Machos de *Oc. scapularis*. **B)** Fêmeas de *Oc. scapularis.*

A)



B)



4.3 Análise genética: Citocromo Oxidase subunidade I

Análises prévias indicaram um grande polimorfismo entre as três populações estudadas. Ao todo 98 indivíduos foram analisados e o fragmento do gene COI utilizado nas análises foi de cerca de 600pb. Foram identificados 51 haplótipos entre as três populações estudadas. A diversidade haplotípica encontrada foi alta, de h=0,953 com 42 sítios variáveis, apresentando no total de 43 mutações.

As distâncias genéticas foram calculadas com base da distância de Kimura 2-Parâmetros e os valores mais altos foram de 0,9% a 1% entre os haplótipos mais distantes. A divergência genética estimada a partir do polimorfismo do gene COI foram consideradas baixas entre todas as populações estudadas (Tabela 10), sendo menores que a divergência intraespecífica de 2% para DNA mitocondrial (Avise, 2004).

Foram observados alguns haplótipos compartilhados entre os indivíduos das populações de TRE, SPA e ITA. O H-3 foi o mais frequente, sendo compartilhado por 18 indivíduos das populações de TRE, SPA e ITA (Fig 15). O segundo haplótipo mais compartilhado foi o H-17, este também foi encontrado nas três populações acima mencionadas. A população de ITA apresentou 12 haplótipos únicos e 7 compartilhados, a população de TRE tem 17 haplótipos diagnósticos e 8 compartilhados, já a população de SPA apresentou 13 haplótipos únicos nesta população e 10 compartilhados com as demais estudadas (Tabela 6).

Verificamos as relações genéticas entre as populações deste estudo com as populações anteriormente estudadas por Devicari, 2010, então incluímos as populações de Pariquera-Açu (PAR), Parque ecológico do Tietê (PET) e Butantã (BUT). Observamos 52 haplótipos em 147 indivíduos, neste caso a diversidade haplotípica foi de h=0,916. Aqui o haplótipo mais frequente foi o H6, o mesmo haplótipo mais frequente na rede de haplótipos anteriormente citada. O H6 foi compartilhado por 33 indivíduos de: PAR, PET, BUT, TRE, SPA e ITA. Seguido pelo haplótipo H1, compartilhado por 22 indivíduos das 6 populações consideradas (Fig. 16 e Tabela 7).

Encontramos resultados negativos para os testes de neutralidade Tajima e Fu Fs (Tabela 11) para todas as populações estudadas e o valor mais alto encontrado de Φ_{st} foi entre SPA e ITA de 0,0545 (Tabela 9). O valores significantes de Φ_{st} foram encontrados apenas entre as populações de SPA e ITA. As maiores taxas de

migração estimadas foram entre SPA e TRE (Nm=48,1) como pode ser visto na tabela 10.

Figura 14 - Rede de haplótipos do gene COI para as amostras de *Oc. scapularis*. Cada cor representa uma das populações estudadas, o tamanho dos círculos é proporcional à frequência haplotípica. Aqui estudamos as populações coletadas para este projeto: TRE, SPA e ITA.

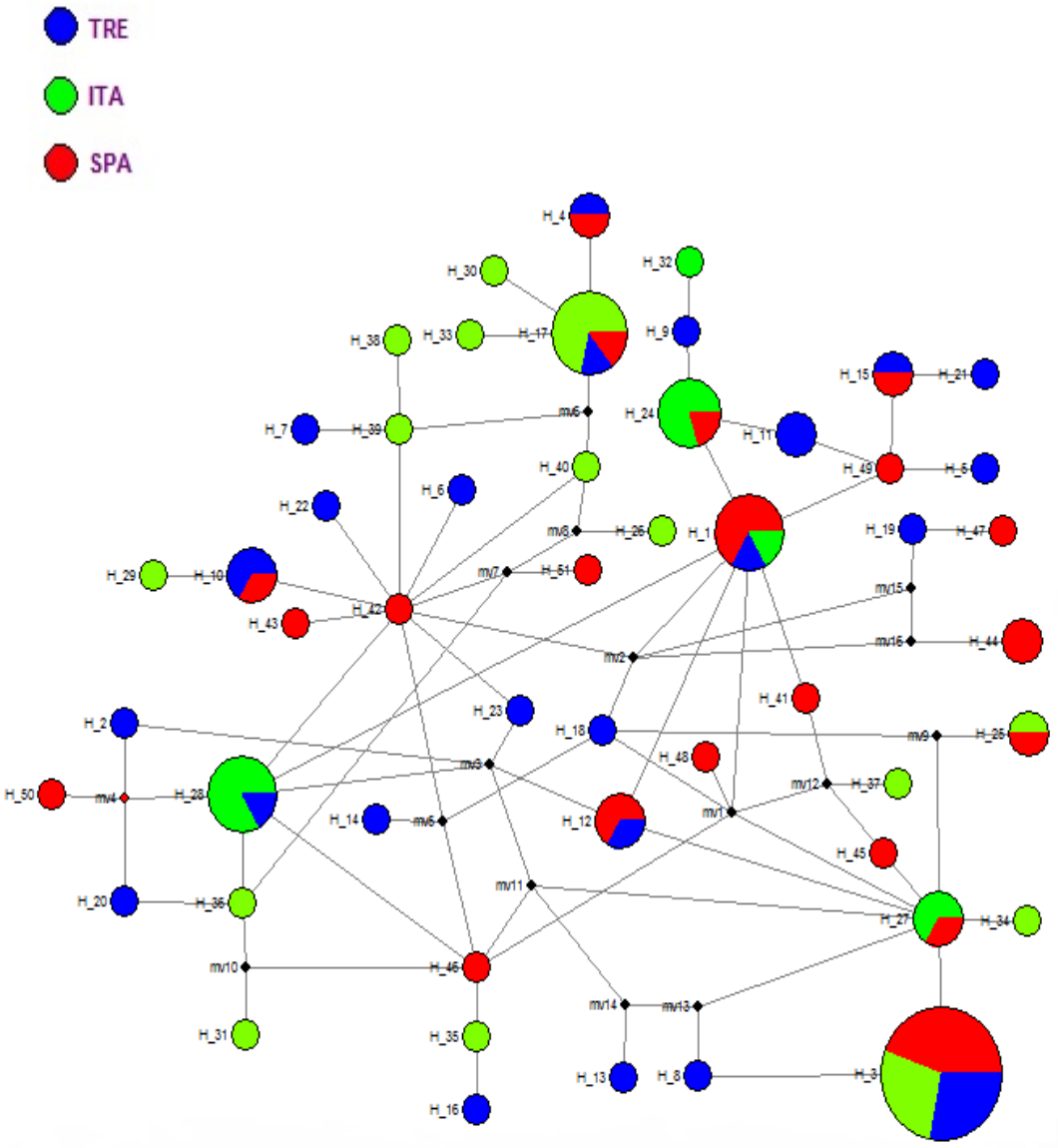


Figura 15 - Rede de haplótipos do gene COI das amostras de *Oc. scapularis*. Cada cor representa uma das populações estudadas, o tamanho dos círculos é proporcional à frequência haplotípica. Aqui foi realizada nova análise de rede de haplótipos incluindo as amostras PAR, PET e BUT coletadas por Devicari, 2010.

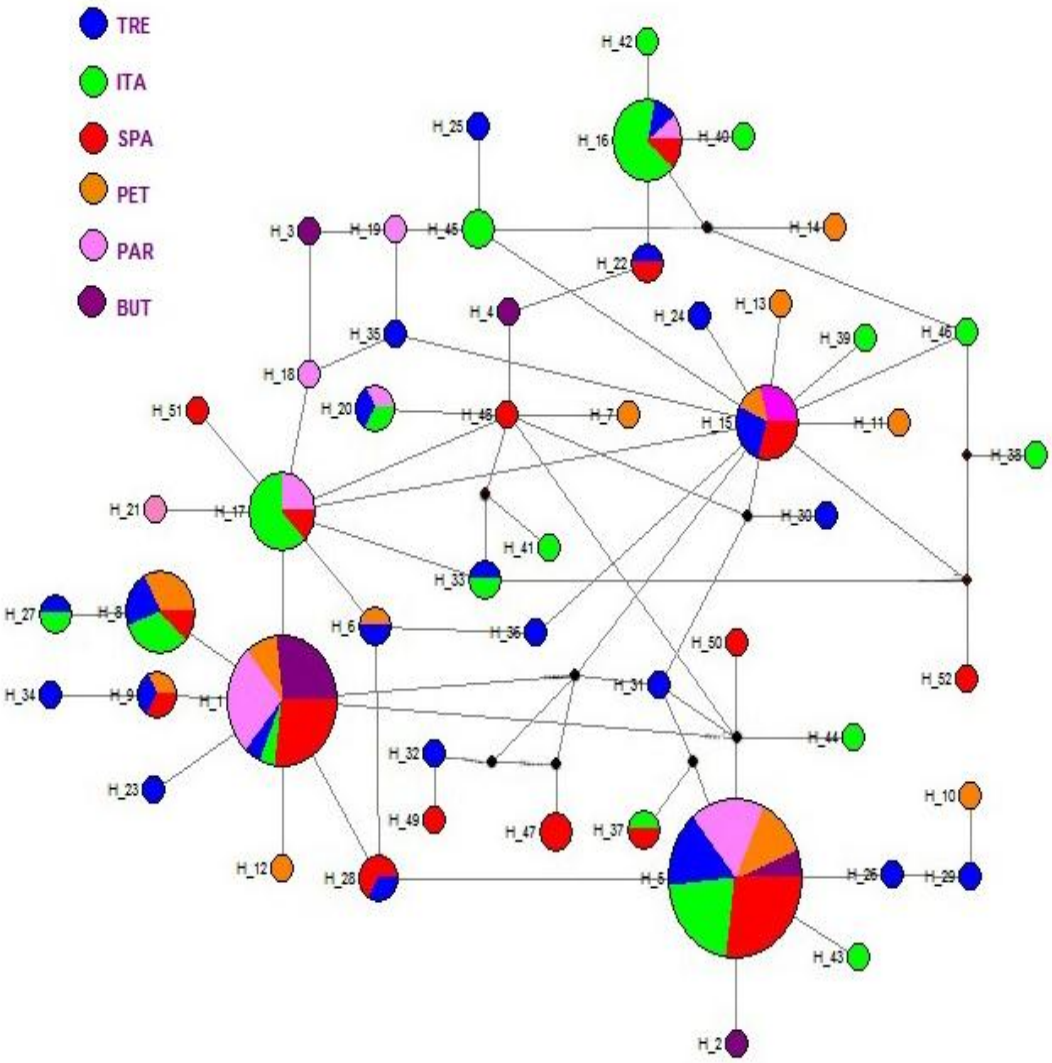


Figura 16 - Dendograma das distâncias genéticas entre os haplótipos de COI das populações de *Oc. scapularis* TRE, SPA e ITA construído pelo método de neighbor joining, utilizando os valores de K2P.

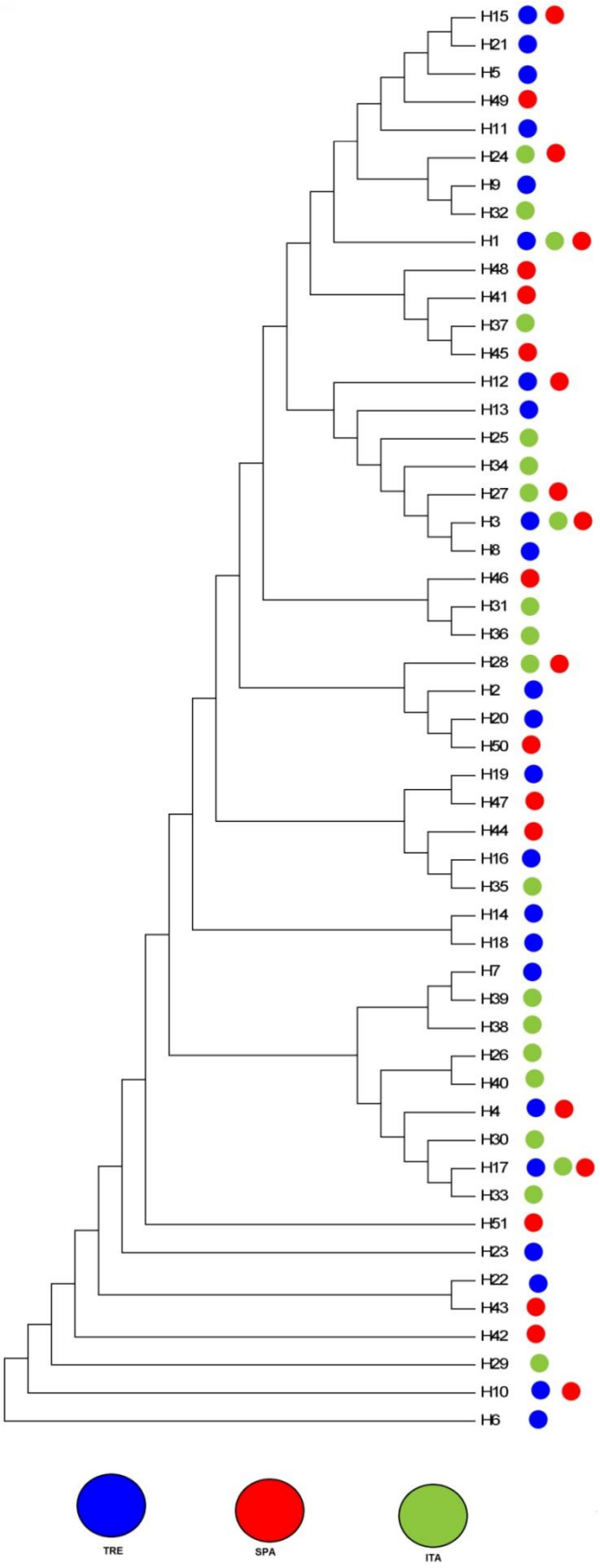


Tabela 6 - Frequência de haplótipos nas populações de TRE, SPA e ITA de *Oc. scapularis*.

(Continua)

Haplótipos	TRE	ITA	SPA	Total
H1	1	1	4	6
H2	1			1
H3	5	5	8	18
H4	1		1	2
H5	1			1
H6	1			1
H7	1			1
H8	1			1
H9	1			1
H10	2		1	3
H11	2			2
H12	1		2	3
H13	1			1
H14	1			1
H15	1		1	2
H16	1			1
H17	1	5	1	7
H18	1			1
H19	1			1
H20	1			1
H21	1			1
H22	1			1
H23	1			1
H24		4	1	5
H25		1	1	2
H26		1		1
H27		2	1	1

Tabela 6- Frequência de haplótipos nas três populações de *Oc. scapularis* estudadas.

(conclusão)

H28		5	1	6
H31		1		1
H32		1		1
H33		1		1
H34		1		1
H35		1		1
H36		1		1
H37		1		1
H38		1		1
H39		1		1
H40		1		1
H41			1	1
H42			1	1
H43			1	1
H44			2	2
H45			1	1
H46			1	1
H47			1	1
H48			1	1
H49			1	1
H50			1	1
H51			1	1
Total	29	38	34	105

Tabela 7 - Haplótipos compartilhados entre as populações de *Oc. scapularis* de TRE, SPA, ITA,PET, BUT, PAR.

Haplótipos	TRE	SPA	ITA	PET*	BUT*	PAR*
H1	1	6	1	2	6	6
H5	5	10	6	4	1	6
H8	2	1	4	2		
H15	2	3		1		1
H16	1	1	5			2
H17		1	5			2
H20	1		1			1
H27	1		1			
H28	1	2				
H33	1		1			
H37		1	1			
H45			2			1
H47		2				
Total	15	27	27	9	7	19

***Populações estudadas anteriormente por Devicari, 2010**

Tabela 8 - Distâncias genéticas (Distâncias de K2P) entre as populações de *Oc. scapularis* de TRE, ITA e SPA baseadas no polimorfismo do gene COI.

	TRE	**ITA**	**SPA**
ITA	**0, 010**		
SPA	**0, 009**	**0, 009**	

Tabela 9 - Valores de divergência genética entre as populações de *Oc. scapularis* de TRE, SPA e ITA calculado por base do índice de $\Phi_{st.}$

	TRE	**ITA**	**SPA**
ITA	**0, 02381**		
SPA	**0, 00517**	**0, 05458**	

Tabela 10 - Valores estimados de número de imigrantes entre as populações de *Oc. scapularis* de TRE, ITA e SPA (Nm).

	TRE	ITA
ITA	**10,2**	
SPA	**48,1**	**4,3**

Tabela 11 - Análises estatísticas para polimorfismo e teste de neutralidade do gene COI para as populações de *Oc. scapularis* de TRE, ITA e SPA.

	H	h (SD)	π (SD)	D_T	FS
TRE	23	0, 970	0, 0097	-1, 38614	-16, 80186
ITA	20	0, 941	0, 0087	-1, 04088	-9, 28031
SPA	22	0, 935	0, 0077	-1, 57577	-14, 86043

H= número de haplótipos, h (SD) = diversidade haplotípica, π (SD) = diversidade nucleotídica

D_T =Teste de Tajima FS=Teste de Fu e Li

4.4 Análise das genitálias masculinas

Foram analisadas genitálias de 10 indivíduos de cada população deste estudo. Não foram encontradas diferenças próprias de cada população, em relação ao processo retrodirigido do filamento do claspete do gonocoxito (Tabela 12). Foram observadas dentro e entre as três populações a presença do processo retrodirigido, a ausência e em alguns casos mais de um processo no filamento do claspete (Figura 18 e 19).

Figura 17 - Genitália de *Oc. scapularis*

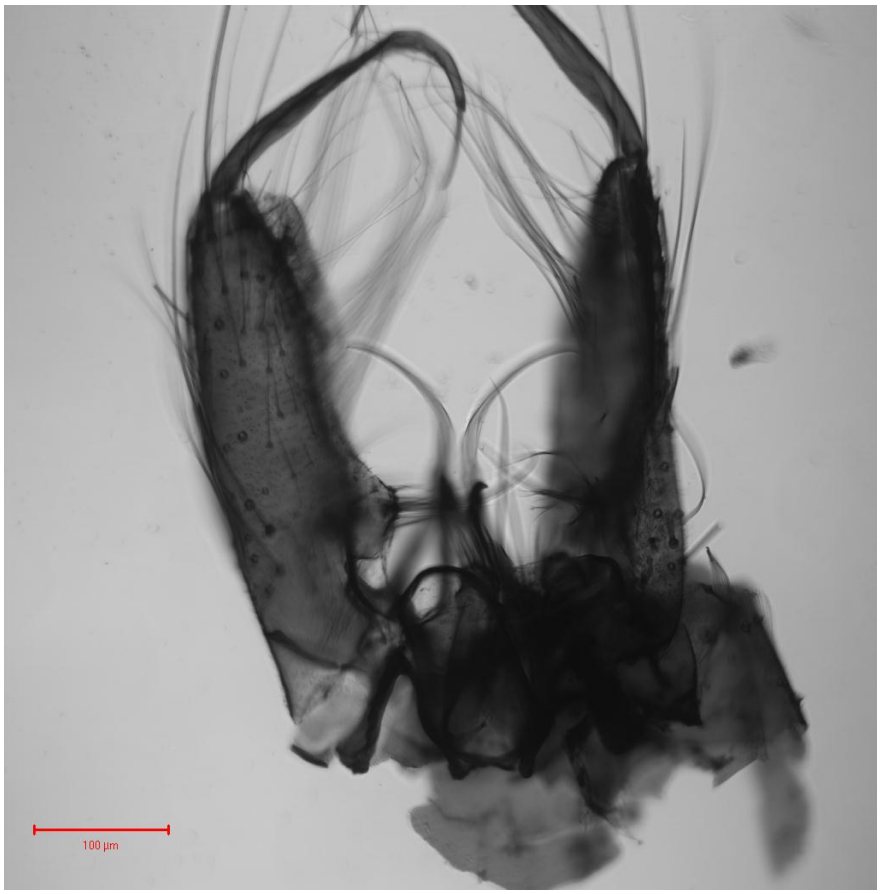


Figura 18 - Processo retrodirigido do filamento do gonocoxito do mosquito *Oc. scapularis*, foto retirada em microscópio confocal.

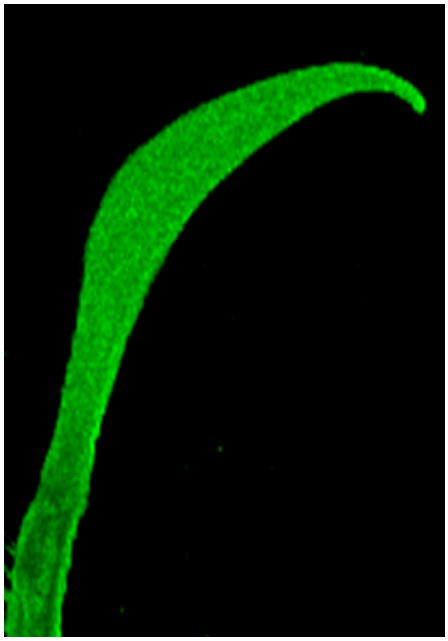


Tabela 12 - Características do processo retrodirigido do filamento do claspete da genitália masculina das populações de *Oc. scapularis* de TRE, SPA e ITA.

	TRE	SPA	ITA
C/ processo	5	2	5
S/ processo	4	7	3

5 Discussão:

5.1 Morfometria geométrica alar

Nosso principal objetivo com o uso da morfometria alar foi verificar se existem diferenças morfológicas entre as populações de TRE, ITA e SPA que indiquem a possibilidade de existência de complexo de espécies.

Verificamos diferenciação populacional nas amostras biológicas de Tremembé, São Paulo e Itaboraí, principalmente nos indivíduos machos enquanto que nas fêmeas uma pequena sobreposição foi observada. Este padrão foi verificado nas populações de *Oc. scapularis* estudados por Devicari, 2010 onde foi observada uma separação nos grupos de PAR, PET e BUT com alguma intersecção no morfoespaço das variáveis canônicas.

Foi observado ao menos entre os machos que parece haver correlação das distâncias fenéticas e distâncias geográficas. Nos machos a população de ITA se apresentou mais afastada das outras duas estudadas, isto pode ser devido ao fato de o município de Itaboraí ser mais distante dos outros locais de coleta, ou seja, isso está compatível com a hipótese de isolamento populacional por distância. Este município está cerca de 285 km de distância de Tremembé e 410 km de São Paulo. Embora a morfometria não tenha o poder de fornecer estimativas quantitativas de fluxo gênico, a divergência significava entre as populações sugere que o fluxo gênico é baixo entre elas.

A ligeira discrepância entre os resultados de fêmeas e de machos podem estar relacionadas com o dimorfismo sexual em mosquitos da família Culicidae. Aparentemente, fêmeas sofrem processos evolutivos ligeiramente diferentes dos machos, porém esta hipótese só poderá ser testada em estudos conduzidos sob uma perspectiva temporal.

O fenograma construído a partir da matriz de dissimilaridade permite-nos observar uma separação de grupo associada ao período de coleta das 6 populações estudadas. As populações de TRE, SPA e de ITA foram coletadas em datas próximas no ano de 2011, enquanto as populações de PAR, PET e BUT foram coletadas no ano de 2006. No fenograma as populações de TRE, SPA e ITA estão no mesmo grupo, enquanto PAR, PET e BUT estão em grupo separado. Diferenças relacionadas à morfologia alar associadas às variações temporais já foram observadas em outros

estudos. Esta variação pode estar associada ao deriva genética ao longo das diversas gerações entre os anos de 2006 a 2011 nas populações de *Oc. scapularis*. Assim como em estudo pioneiro (Jiranjanakit, et al 2008) utilizando 10 gerações de *Aedes aegypti* da mesma linhagem, verificou variação morfológica nas asas deste mosquito ao longo das gerações estudadas, uma das hipóteses propostas neste resultado foi a ocorrência de deriva genética. Peruzin, 2009 em estudo populacional com *Culex quinquefasciatus* do rio Pinheiros do município de São Paulo, observou variação temporal quanto à morfometria geométrica alar nas populações coletadas entre 2004 e 2008.

O Q_{st} encontrado foi de 0,43 para machos e 0,37 para fêmeas, esses resultados sugerem maior seleção natural para o caráter tamanho. É possível ainda que a plasticidade prevista para o tamanho (Dujardin, 2008) foi bem pronunciada em *Oc. scapularis*.

Quanto ao tamanho global da asa, foi verificado dimorfismo sexual, onde as fêmeas apresentaram menor tamanho alar em relação aos machos. Esses dados foram correlatos aos vários já descritos em estudos populacionais de culicídeos (Moratore, 2009; Vidal, 2010) corroborando a hipótese de atribuição às funções diferentes da asa ao sexo. Acredita-se que as asas das fêmeas estão associadas aos vôos precisos para melhor desenvolvimento das atividades de oviposição, hematofagia, assim como para sua dispersão, enquanto os machos podem utilizar as asas para a atividade de corte (Forattini, 2002). A população ITA apresentou o menor tamanho alar, isto pode ter ocorrido devido aos criadouros desta população apresentar um exacerbado número de larvas, observado durante coleta em campo, sugerindo déficit de recursos. Temperaturas mais altas geralmente resultam em indivíduos de menores tamanhos, estas variáveis são inversamente proporcionais (Dejardin & Maillot et al., 1947). O tamanho isométrico dos indivíduos é influenciado pela temperatura, quantidade de alimento e pela densidade larvária do criadouro (Jirakanjanakit, 2007; Clements 1992).

5.2 Citocromo Oxidase Subunidade I

Os dados gerados a partir das análises do gene Citocromo Oxidase Subunidade I, permite-nos concluir que existe riqueza haplotípica nas três populações estudadas. A detecção de número tão elevado de haplótipos não era esperada, pois em geral, culicídeos apresentam variabilidade muito menor no gene COI (Mousson *et al*., 2005). Moutinho *et al,* 2011, por exemplo, encontrou apenas 18 haplótipos em cerca de 3000 mosquitos *Anopheles darlingi*. A variabilidade haplotípica encontrada no presente estudo foi h=0,95 e observamos 42 sítios variáveis. Alguns haplótipos foram compartilhados, sendo o H3 o mais frequente e encontrado nas populações de TRE, SPA e ITA. No trabalho de Mestrado realizado por Devicari, 2010 foram encontrados também uma ampla diversidade haplótípica, cerca de 21 haplótipos em apenas 47 indivíduos nas populações do BUT, PAR e PET.

Devido à riqueza haplotípica, obtida neste e no outro estudo anteriormente realizado com populações de *Oc. scapularis*, pode-se hipotetizar que a Mata Atlântica é possivelmente o centro de origem deste culicídeo. Esta mata originalmente cobria quase todo o litoral brasileiro, se estendendo do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, hoje restando somente 8% da cobertura original e se apresenta em forma de mosaico (Fig 7). Contudo para esta conclusão é necessário à realização de mais estudos envolvendo outras áreas com maiores distâncias geográficas. A ampla diversidade haplotípica pode indicar também que estas populações não sofreram efeitos de um “Gargalo de Garrafa” recente. As análises prévias apontam que as populações estudadas apresentam uma separação antiga, pois alguns haplótipos foram compartilhados entre estas.

Os valores negativos para os testes de Tajima e Fu e Li para as três populações objetos deste estudo sugerem que estas estão em expansão e apresentam alto polimorfismo genético em baixa frequência. Um padrão semelhante a este foi observado num estudo de estrutura populacional do mosquito *An. lesteri* com o gene COII, neste estudo foram encontrados somente valores negativos aos testes de neutralidade, o autor sugeriu que a população estudada provavelmente estava em expansão (Yang et al., 2011).

O índice de Φ_{st} é utilizado para verificação da diferenciação genética entre as populações, é derivado de marcadores neutros e seus valores são interpretados da seguinte forma: Este valor varia de 0 a 1 e valores compreendidos entre 0,05 a 0,15

apontam uma diferenciação genética moderada entre as populações (Wright, 1976). No presente trabalho encontramos correlação entre as distâncias geográficas e valores de divergência genética. As populações de SPA e ITA apresentaram maior divergência genética (Φ_{st} = 0,0545) e são mais distantes das localidades estudadas. Já TRE e SPA que são as populações mais próximas geograficamente apresentaram os menores valores de Φ_{st} (0,00517). Índices moderados de Φ_{st} foram observados em populações de *Ae. aegypti* com valor de 0,0622, em estudos com populações do estado de São Paulo (Vidal, Suesdek, 2012). Encontramos valores significantes o índice de Φ_{st} somente entre as populações de SPA e ITA. Os valores de Φ_{st} encontrados não sugerem complexo de espécies dentro das populações de *Oc. scapularis*, pois o maior valor de Φ_{st} encontrado está entre o valor moderado. Em estudos com complexo de espécies *Anopheles dirus* observou-se uma divergência genética alta entre as populações da espécie A e B, o Φ_{st} encontrado foi de 0,7. Os resultados no presente trabalho para os valores de Φ_{st} foram coerentes com a diversidade haplotípica, contudo sabe-se que este indicador pode sofrer interferência para valores mais baixos em seu resultado quando existe amplo polimorfismo genético intrapopulacional (Holsinger et al., 2009).

A divergência da sequência de COI intraespecífica encontrada nas populações estudadas variou de 0,9 a 1%. Estudos com o gene COI estabeleceram que a diversidade intrapopulacional deste gene é em geral 1% não ultrapassando a divergência de 2% (Avise 2000, Hebert *et al.,* 2003). Em espécies com estado controverso de identificação geralmente apresentam o índice maior que 2%, como já foi visto por Demari, 2009 com populações de *Cx. dolosus, Cx. mollis* e *Cx. imitator.*

Observamos haplótipos compartilhados entre as três populações estudadas, este quadro poderia ser sustentado por possíveis migrações entre as três populações, uma vez que o número de imigrantes estimados nesse estudo apresenta valores mais altos entre TRE e SPA (Nm= 48,1), populações próximas geograficamente. Para estimar a taxa migratória se é baixa ou alta, deve-se levar em consideração o tamanho efetivo populacional, pois numa população composta por grande número de indivíduos a migração causará menos efeito no seu tamanho global (Holsinger et al., 2009). Considerando que este mosquito é de hábito rural e existe uma descontinuidade em relação a Mata Atlântica de São Paulo à Itaboraí, a migração se caso ocorre, possivelmente seria por interferência antrópica, como acontece com o transporte de formas imaturas de *Aedes aegypti* em recipientes artificiais pelo homem.

Outra possível explicação para este compartilhamento haplotípico nas três populações estudadas seria a retenção de polimorfismo ancestral.

5.3 Estudo da genitália masculina

Estudos envolvendo o uso de genitálias para caracterização e identificação de espécies de mosquitos são a base da taxonomia clássica. Estruturas associadas ao gonocoxito da genitália masculina são muito utilizadas para a realização deste processo. Contudo, no presente estudo observou-se a presença, ausência e até mesmo mais de um espículo no processo retrodirigido do gonocoxito intra e interespecificamente nas três populações estudadas neste trabalho. Portanto esta estrutura não é um indicativo de complexo de espécie em *Oc. scapularis* como havia sugerido Arnell em estudo populacional com esta espécie em 1975.

5.4 Comparação dos três marcadores utilizados no projeto

A técnica de morfometria alar apontou estruturação populacional entre as três populações estudadas, pois se mostraram separadas, mostrando somente uma pequena intersecção no morfoespaço nas fêmeas neste estudo. Já o Φ_{st} encontrado foi de baixo a moderado sugerindo baixa estruturação populacional, possivelmente por ainda ocorrer migração entre essas populações ou por retenção de polimorfismo ancestral. Os valores de Φ_{st} foram correlatos às distâncias geográficas e os valores de morfometria também apresentaram correlação com as distâncias geográficas para os machos. Esses resultados mais uma vez são compatíveis com a hipótese de isolamento populacional por distanciamento geográfico.

Estes dois marcadores biológicos mostraram conclusões diferentes quanto à estruturação populacional da espécie estudada. Estas diferenças entre os dois marcadores ocorreram uma vez que os genes apresentam taxas evolutivas diferenciadas.

O estudo de genitálias se mostrou controverso quanto à diferenciação populacional, já que não foram encontradas características próprias de cada população no processo retrodirigido da genitália deste mosquito. Portanto, o estudo do processo retrodirigido não é eficaz para o estudo populacional, como os outros dois métodos empregados neste estudo.

Então embora exista a estruturação populacional evidenciada pelo marcador morfológico, o conjunto dos dados não sugere existência de complexo de espécies dentro das populações de *Oc. scapularis* estudadas aqui. Pois analisando o marcador COI, verificamos que a divergência genética encontrada não passa de 2%, os valores de Φ_{st} indicaram baixa divergência genética, além disso, a morfometria mostrou alguma sobreposição populacional no morfoespaço.

Ainda não descartamos a hipótese de existência de complexo de espécies em *Oc. scapularis*, pois existem estudos que sustentam esta idéia. Foram encontradas populações de *Oc. scapularis* com hábitos diferenciados quanto ao período de hematofagia no Suriname e Guiana Francesa. Nestas regiões foram observadas populações desta espécie com pico hematofágico crepuscular das 12 às 16 horas, sem nenhum pico durante o anoitecer. Este comportamento é diferente das demais populações de *Oc. scapularis* encontradas no restante da América do Sul, onde o pico hematofágico ocorre no crepúsculo vespertino. No geral mudanças relacionadas ao período hematofágico podem levar ao isolamento reprodutivo e possivelmente a especiação.

Para uma melhor conclusão quanto à existência de complexo de espécies seria necessário a ampliação de área geográfica de estudo do *Ochlerotatus scapularis*, bem como empregar mais marcadores biológicos.

6 Conclusões

Com os resultados gerados neste trabalho somados aos obtidos nos estudos realizados por Devicari, 2010 ampliamos o conhecimento sobre a estrutura populacional e morfológica do mosquito *Oc. scapularis*. Como já mencionado este mosquito apresenta poucos estudos principalmente no que se refere à estruturação populacional, apesar de apresentar competência vetora a uma série de agentes etiológicos já citados neste estudo. Nossas principais conclusões foram:

- as populações de TRE, SPA e ITA podem ser separadas através da morfometria geométrica, pois ocorreu pouca sobreposição entre os grupos;

- existe correlação entre as distâncias alares e as geográficas nos machos do mosquito *Oc. scapularis;*

- as três populações apresentaram riqueza haplotípica e baixo fluxo gênico entre elas;

- os valores de Φ_{st} foram de baixos a moderados. Estes valores não sugerem um complexo de espécies em *Oc. scapularis;*

- o filamento apical do processo retrodirigido do gonocoxito não é um carácter indicativo de complexo de espécie em *Oc. scapularis* como Arnell, 1975 havia proposto;

- os resultados obtidos neste trabalho na morfometria geométrica, estudo da genitália e gene Citocromo Oxidase Subunidade I, permite-nos concluir que as populações da espécie *Oc. scapularis* estudadas neste projeto não se tratam de complexo de espécie. Para uma melhor conclusão a respeito da existência de complexo na espécie *Oc. scapularis* é necessário a ampliação das áreas de estudos deste mosquito.

REFERÊNCIAS*

Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXIII. A revision of the *scapularis* group of *Aedes* (*Ochlerotatus*). Contrib Amer Entomol Inst. 1976;13(3):1-144.

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

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 Oswaldo Cruz .2002;97(8):1191-5.

Clary DO, Wolstenholme DR. The ribosomal RNA genes of Drosophila mitochondrial DNA. Nucleic Acids Research. 1985;13(11):4029-45.

Clements AN. Development, nutrition and reproduction in: The biology of mosquitoes. London Cambridge University Press; 1992. 150-70 p.

Cywinska A, Hunter FF, Hebert PDM. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med Vet Ent. 2006;20(4):413-24.

Dejardin J, Maillot L: Biom´ etrie de la Glossine. Etude statistique dês mensurations de l'aile dans diverses communaut´es (*Glossinafuscipes quanzensis*, Pires). *Revue ElevM´ed. v´et Pays Trop* 1947,17:97–102.

Demari B. Estudos taxonômicos de espécies do gênero *Culex* (Diptera: Culicidae) da região neotropical utilizando a subunidade 1 do gene mitocondrial citocromo oxidase. Dissertação (Mestrado) São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2000.

Devicari M, Suesdek L. Caracterização populacional de *Aedes scapularis* (Diptera; Culicidae): aspectos moleculares, morfométricos e morfológicos. In: Congresso Brasileiro de Genética. 56. São Paulo, 2010

* De acordo com:
Internacional Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http: www.icmje.org

Dujardin JP, Beard CB, Ryckman R. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease Infect Genet Evol. 2006; 7(2):161-64

Dujardin, JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol. 2008; 8(6):875-90.

Forattini OP, Gomes AC, Santos JLF,Galati AEB, Rabello E.X,Natal D.Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae, em mata residual no Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil.Revista de Saúde Pública.1981;15(6):557-86.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: Breeding in empty condition of rice in fields South-Eastern Brazil. Rev Saúde Pública.1994;28(4):395-9.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 9 - Synanthropy and epidemiological role of *Aedes scapularis* in South-Eastern Brazil. Rev Saúde Pública. 1995;29(3)199-207.

Forattini OP, Kakitani I,Sallum M A M. Encontro de criadouros de *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) em recipientes artificiais. Rev Saúde Pública. 1997;31(5):519-22.

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

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

Guerrero J, Ducos H, Genchi C, Rojo F, Gomez-Bautista, M, Varela M.C, 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 92, 1992a. p. 31-37.

Hammon WM, Reeves WC. Laboratory transmission of St. Louis encephalitis virus by three genera of mosquitoes. J Exp Med. 1993a;78(4):241–53.

Hebert PDM, Ratnasingham S, Waard J. Barcoding animal life cytochrome c oxidase sub 1 divergences among closely related species, Royal Society. 2003;270:96-9.

Holsinger KE, Weir BS. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting $F_{ST.}$ Nature Reviews Genetics.1996;10:639-50.

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 Publica. 1977;11:375-88.

Iversson LB.1980. 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. 14(4):9-35.

Jirakanjanakit N, Dujardin JP. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. Trop Med Public Health. 2007;36(6):858-61.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin,JP. 2008.The geometry of the wing of Aedes (Stegomyia) aegypti in isofemale line through successive generations. Inf Gen Evol.2005;8(4):414-21

Jowett T.Preparation of Nucleic Acids. In: *Drosophila*, a practical approach. Roberts DB, editor. Oxford, U.K; 1986. 389 p.

Hillis DM, Dixon, MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. (The Quarterly). Rev Biol. 1991;66:441-53

Kabhampati S, Smith PT. PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragment. Insect Molecular Biology.1995;4(4):233-6.

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;95(4):425-32.

Lehr MA Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn JE. Cryptic species in the *Anopheles* (Nyssorhynchus) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between RAPD-PCR identification and analysis of mtDNA COI gene sequences. Ann Ent Soc Am. 2005;98(6):908-17.

Lima PM, Ahid SMM. Vetor natural da *Dirofilariose immitis* (nematoda) em Mossoró-RN. Caatinga. 2004;17(2):109-14.

Lourenço-de-Oliveira R, Deane LM. Presumed *Dirofilariose immitis* infections in Wild-Caught *Aedes taeniorhynchus* and *Aedes scapularis* in Rio de Janeiro, RJ. *Mem. Instituto Oswaldo* Cruz. 1995;90(4):387-8

Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewltt OM. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Molecular Biology.1996; 5(3):153–65.

Matioli SR. Biologia molecular e evolução. São Paulo: Holos Editora; 2006. 202 p.

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.

Morais SA, Moratore,C, Suesdek L, Marreli M T. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. Mem. Instituto Oswaldo Cruz. 2010;105(5):1-5.

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

Mousson L, Dauga C, Garrigues T, Schaffner F. Phylogeography of Aedes (Stegomyia) aegypti (L.) and Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. Genet. Res. 2005;86:1-11.

Moratore C. Padrões genéticos- morfológicos em populações de *Culex quinquefasciatus*. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Moutinho PR. Dinâmica e estrutura populacional do *Anopheles darlingi* em um assentamento rural na floresta amazônica, Acre, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estado de São Paulo; 2010.

Peruzin MCJ . Análises comparativas populacionais e Culex quinquefasciatus em dois locais do Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009

Rohlf FJ. Relative warp analysis and example of its application to mosquito wings. Contributions to morphometrics Monografias, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. 1993;135-59.

Romano-Lieber,NS, IverssonLB. Inquérito soroepidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. Rev Saúde Publica.2000;34(3):236-42.

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

Rohlf FJ. On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. Systematic Biology. 1998;47(1):147-58.

Spence L. Anderson CR, Aitke THG, Downs WZ. Bimiti Virus, a new Agent Isolated from Trinidadian Mosquitoes. Am J Trop Med Hyg. 1962;11(3):414-17.

Spitze K. Population structure in Daphnia obtusa: Quantitative genetic and allozymic variation genetics. Genetics. 1993;135:367.

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

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics Society of America. 1989;123:585-95.

Vidal PO, Suesdek L. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of Aedes aegypti. 2012;12(3):591-6

Wilkerson RC, Foster PG, Li C, Sallum MAM. Molecular phylogeny of the neotropical *Anopheles* (Nyssorhynchus) albitarsis species complex (Diptera: Culicidae). Ann Entomol Soc Am.2005;98(6):918–25.

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