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

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.

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.

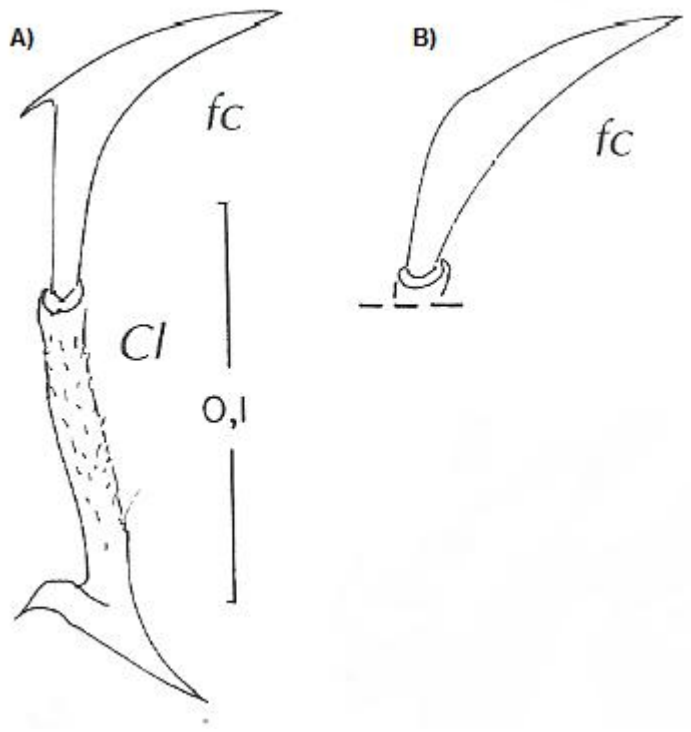
1.3.3 Estudo morfológico da genitália masculina

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.



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