Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Análise da estrutura populacional de mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em diferentes estratos urbanos na cidade de São Paulo, utilizando morfometria geométrica alar e marcadores microssatélites

Ramon Wilk da Silva

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

São Paulo

2017

Resumo

Análise da estrutura populacional de mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em diferentes estratos urbanos na cidade de São Paulo, utilizando morfometria geométrica alar e marcadores microssatélites.

O mosquito *Aedes aegypti* é reconhecido como o principal vetor do vírus da Dengue, além de transmitir outros arbovírus de importância médica, como os causadores da Febre Amarela urbana, Chikungunya e Zika. Este vetor tem sua ecologia intimamente associada ao homem, e sua dinâmica populacional é fortemente relacionada aos processos decorrente da urbanização. Assim como outras metrópoles, a cidade de São Paulo apresenta um quadro de elevada densidade populacional e urbanização não planejada, o que contribui para a proliferação do *Ae. aegypti* e, conseqüentemente, o aumento no número de casos de Dengue. Embora, vacinas como a da Febre Amarela e Dengue já tenham sido desenvolvidas, o controle do vetor ainda permanece como a principal estratégia para a ruptura dos padrões epidemiológicos das arboviroses causadas por seus patógenos. Nesse sentido, um melhor entendimento da estrutura das populações do *Ae. aegypti*, bem como seus processos envolvidos, podem gerar informações extremamente úteis para o desenvolvimento e implementação de programas de controle. Visando elucidar o padrão de estruturação do *Ae. aegypti*, o presente estudo utilizou-se da morfometria geométrica alar e de marcadores microssatélites, para investigação de 11 populações coletadas em áreas com diferentes graus de urbanização, no município de São Paulo. Nossos resultados sugerem um padrão de estruturação de acordo com o gradiente de urbanização no qual os espécimes foram coletados. A morfometria geométrica alar exibiu uma tendência de segregação das populações nas Análises de Variáveis Canônicas e *Neighbor-Joining*, com estas sendo agrupadas tanto na forma de seus estratos urbanos, como por seus respectivos locais de coleta, com as distâncias de Mahalanobis apresentando significância estatística em 54 dos 55 testes conduzidos. Enquanto que, os microssatélites indicaram uma baixa estruturação genética ($F_{st} = 0,057$), com 93% de seus valores apresentando significância estatística. Contudo, em conformidade com o gradiente de urbanização dos estratos, com moderado fluxo gênico, déficit de heterozigosidade e indícios de expansão populacional. A intensificação dos processos decorrentes da urbanização tem como consequência a diminuição dos espaços verdes encontrados nas cidades, com sua redução impactando diretamente na proliferação do *Ae. aegypti*. Hipótese, corroborada pela sua expansão populacional, exibida, principalmente, nos ambientes mais antropizados. A estruturação observada nas populações de *Ae. aegypti* no presente estudo indica que os processos de urbanização desempenham um importante papel na sua conformação, e fatores como o moderado fluxo gênico e déficit de heterozigosidade podem estar refletindo nos seus padrões epidemiológicos.

Descritores: Morfometria geométrica. Marcador molecular. *Aedes aegypti*. Genética de populações. Urbanização.

Abstract

Analysis of the population structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes in different urban strata in the city of São Paulo, using wing geometric morphometry and microsatellite markers.

Aedes aegypti is recognized as the main vector of Dengue, in addition to transmit other arboviruses of medical importance, as the agents of Yellow Fever, Chikungunya and Zika. This vector has its ecology closely associated with man, and its population dynamics is strongly related to the processes arising from urbanization. Like other cities, the city of São Paulo exhibit high population density and unplanned urbanization, which contributes to the proliferation of *Ae. aegypti* mosquitoes and consequently the increase in the number of cases of dengue fever. Although vaccines such as Yellow Fever and Dengue have already been developed, vector control remains the main strategy for the disruption of epidemiological patterns of arboviral diseases caused by their pathogens. In this sense, a better understanding of the population structure of *Ae. aegypti*, as well as their processes involved, can generate extremely useful information for the development and implementation of control programs. In order to elucidate the structuring pattern of *Ae. aegypti* this study utilized wing geometric morphometric and microsatellite markers, for investigation of 11 populations collected in areas with different degrees of urbanization, located in the municipality of São Paulo. Our results suggest a pattern of structuring according to the urbanization gradient in which the specimens were collected. The wing geometric morphometry showed a tendency of segregation of the populations in the Analysis of Canonical Variables and Neighbor-Joining, both for the populations grouped in the form of their urban strata as per their respective collection locations, with the distance of Mahalanobis presenting statistical significance in 54 of the 55 tests conducted. Nevertheless, microsatellites indicated a low genetic structure ($F_{st} = 0.057$), with 93% of their statistically significant values. However, in accordance with the gradient of urbanization of the strata, with moderate gene flow, heterozygosity deficit and evidence of population expansion. The intensification of the processes resulting from urbanization has the consequence of reducing the green spaces found in the cities, with their reduction impacting directly on the proliferation of *Ae. aegypti*. Hypothesis, corroborated by its population expansion, displayed mainly in anthropic environments. The structure observed in populations of *Ae. aegypti* in this study indicates that the urbanization processes play an important role in their conformation, and factors such as moderate gene flow and deficit of heterozygosity can be reflected in their epidemiological patterns.

Descriptors: Geometric morphometrics. Molecular marker. *Aedes aegypti*. Population genetics. Urbanization

1. Introdução

A Família Culicidae compreende atualmente um total de 3554 espécies reconhecidas, com distribuição nos mais variados tipos de habitats e ecossistemas do mundo ¹. Entre os seus gêneros, estão presentes os três principais de importância médica (*Anopheles*, *Aedes* e *Culex*), os quais desempenham papel na veiculação de patógenos, causando doenças, como a Malária, Febre Amarela, Dengue, Febre do Nilo Ocidental, entre outras ^{2,3}. Dentre o gênero *Aedes*, destaca-se o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), principal vetor responsável pelas transmissões dos vírus da Febre Amarela urbana, Dengue, Chikungunya e Zika ⁴⁻¹⁰.

1.1. *Aedes aegypti*

O mosquito *Ae. aegypti* foi descrito originalmente no Egito. Acredita-se que sua origem mais provável seja o continente africano, com sua forma ancestral tendo vivido na África subsaariana, onde utilizava ocos de árvores como criadouros, fazendo repasto sanguíneo em outros animais que não o homem ¹¹. Sua origem é sustentada com base em evidências genéticas, sugerindo uma colonização da África para o Novo mundo e deste para a Ásia/Austrália ^{12,13}. De acordo com Mattingly ¹⁴, a espécie é dividida em duas subespécies, sendo uma forma silvestre (*Aedes aegypti formosus*) e outra domiciliada (*Ae. aegypti aegypti*). A primeira, presumidamente a forma ancestral, tem como características a coloração mais escura, a zoofilia e o desenvolvimento em criadouros localizados nas florestas, como ocos de árvores, estando confinada à África. Já a forma domiciliada exibe padrão de coloração mais claro, preferencialmente antropofílica, com criadouros

associados a habitações humanas e distribuição dentro e fora do continente africano, nas regiões tropicais e subtropicais. Posteriormente, estas descrições foram confirmadas por Brown et al.¹⁵ que, empregando marcadores moleculares microssatélites encontraram dois grupos genéticos distintos, embora demonstrando uma maior variação ecológica que a apresentada anteriormente.

A forma domiciliada do *Ae. aegypti* tem distribuição cosmopolita, com ocorrência principalmente nos centros urbanos, onde sua frequência e densidade populacional estão associadas à presença humana^{16,17}. As fêmeas desta espécie alimentam-se quase que exclusivamente por repastos sanguíneos em humanos, de onde obtém a fonte de proteínas necessárias para a maturação de seus ovos, repousando em seguida no interior das habitações^{18,19}. Os picos de hematofagia ocorrem ao amanhecer e à tarde, antes do crepúsculo vespertino, mas, por vezes as fêmeas desta espécie, podem picar o homem e outros animais domésticos a qualquer hora do dia, enquanto que os machos alimentam-se de carboidratos, usualmente provenientes de néctares de flores e frutos^{2,20}.

1.2. O papel do *Ae. aegypti* como vetor

As fêmeas do *Ae. aegypti* podem apresentar comportamento de múltiplos repastos durante um único ciclo gonotrófico, com o objetivo do aumento de fecundidade²¹. Dessa forma, seu comportamento intermitente durante o repasto aumenta o contato vetor-hospedeiro, contribuindo significativamente para a transmissão de patógenos, para o caso de fêmeas

mais velhas infectadas, explicando assim seu sucesso na veiculação de seus patógenos ²².

O mosquito *Ae. aegypti* anteriormente era reconhecido como “mosquito da Febre Amarela”, arbovirose causada por um vírus do gênero *Flavivirus* (Família Flaviviridae). Este vírus circula na natureza entre símios, sendo transmitido principalmente por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Existem dois ciclos distintos de transmissão, um silvestre e outro urbano, no primeiro o homem é atingido esporadicamente por fêmeas de mosquitos silvestres infectadas, enquanto que no segundo ocorre transmissão inter-humana, causada principalmente pela picada de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas ²³. A Febre Amarela urbana foi uma das principais ameaças à saúde humana entre o século XVIII e começo do século XX, e o seu declínio só foi possível graças à contribuição do médico cubano Carlos Finlay, que em 1881 identificou o seu ciclo de transmissão por meio do mosquito da espécie *Ae. aegypti*, permitindo esforços para controle e redução das populações do vetor, além do desenvolvimento e emprego de uma vacina com o vírus atenuado, possibilitando a diminuição de sua carga. No Brasil, a última ocorrência de Febre Amarela urbana foi registrada em 1942, no estado do Acre ^{7,23–25}. O número de casos de Febre Amarela silvestre também declinou significativamente nas últimas décadas, com surtos cada vez menores, entretanto, ainda observa-se registros, como os ocorridos no Brasil e Peru, no ano de 2015 ²⁶. Recentemente o Brasil vivencia um surto de Febre Amarela silvestre na região sudeste do país, na qual até fevereiro deste ano foram notificados ao ministério de saúde 1060 casos suspeitos, do total, 215 foram confirmados e 80 descartados, e o restante permanece em investigação ²⁷.

Atualmente, o *Ae. aegypti* é reconhecido como o principal vetor da Dengue, considerada a arbovirose mais comum em todo o mundo, com cerca de 3,9 bilhões de pessoas expostas ao risco de infecção e estimativa de 390 milhões casos anuais, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais ^{4,28,29}. Seu vírus pertence ao gênero *Flavivirus* da Família Flaviviridae, possuindo 4 sorotipos distintos (DENV 1-4) ^{28,30}. Em 2014, foi descrito na Malásia o sorotipo 5, um vírus silvestre que apresenta proximidade ao sorotipo 4, entretanto com implicações à saúde pública ainda incertas ¹¹.

Anteriormente à segunda guerra mundial, a distribuição da Dengue ocorria principalmente nos trópicos. Nestes locais, o transporte do mosquito e o vírus entre as regiões dependiam primariamente de embarcações e, conseqüentemente, as epidemias ocorriam de forma esporádica. Entretanto, nos últimos anos, eventos como o crescimento urbano e globalização, têm feito os países em desenvolvimento vivenciarem a expansão geográfica e aumento da incidência de epidemias ³¹. Nas Américas, a dengue foi efetivamente controlada até a década de 70, como resultado de um programa de erradicação do *Ae. aegypti*, conduzido pela Organização Pan-americana de Saúde, objetivando o combate de larvas e adultos por meio da utilização de Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT). Contudo, devido à falta de prioridades na utilização de recursos, o sucesso do programa foi comprometido, contribuindo para a reinfestação da espécie nas décadas seguintes em todos os países onde anteriormente se havia declarado sua eliminação ³². No Brasil, as primeiras epidemias de Dengue foram registradas em 1981 e 1982, em Roraima, e posteriormente em 1986, no Rio de Janeiro e na região nordeste. Desde então,

o mosquito *Ae. aegypti* vem ampliando sua distribuição no país e causando sucessivas epidemias ³³.

A espécie ainda é incriminada na transmissão de outros dois arbovírus de importância médica, como o Chikungunya e o Zika ³⁴. A Febre Chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus de mesmo nome (CHIKV), gênero *Alphavirus* (Família Togaviridae). O vírus circulava anteriormente nas florestas subsaarianas e seu ciclo envolvia primatas não humanos e mosquitos silvestres. Ao que se indica, o estabelecimento do ciclo de transmissão urbano ocorreu através de múltiplas ocasiões da circulação de cepas circulando na parte oriental da África, com o vírus sendo isolado pela primeira vez na Tanzânia, depois do surto de 1952. A arbovirose causa febre aguda e severa artralgia (dor nas articulações), característica que deu origem ao seu nome Chikungunya, palavra que significa “postura curvada” no dialeto Makonde. Sua transmissão urbana envolve os mosquitos *Ae. aegypti* e *Aedes albopictus* e os padrões de transmissão provavelmente são similares aos da Dengue ³⁵.

O vírus Zika pertence ao gênero *Flavivirus* (Família Flaviviridae), sendo transmitido primariamente pelo *Ae. aegypti*. O vírus foi identificado pela primeira vez em 1947, sendo isolado a partir de um macaco Rhesus, colocado de sentinela por cientistas britânicos que trabalhavam na pesquisa da Febre Amarela, em um laboratório localizado na floresta de Ziika, em Uganda e, posteriormente, isolado a partir de uma população de mosquitos da mesma localização ³⁶. A primeira infecção humana foi descrita na Nigéria em 1954 e, nos 50 anos que se seguiram, apenas 12 casos foram confirmados ³⁷. O primeiro surto da arbovirose ocorreu em 2007, na pequena ilha de Yap, localizada entre as Filipinas e Papua Nova Guiné, atingindo ¾ da população,

sendo seguido pelo surto de 2013 na Polinésia Francesa ^{38,39}. O vírus, desde então, ficou confinado na faixa estreita equatorial da África e Ásia até 2014, quando se espalhou no sentido leste, na direção da Oceania. Seguido da América do Sul, infectando milhões de pessoas no Brasil, Colômbia, Venezuela e mais de 25 países Sul-Americanos ³⁶.

1.3. A influência da urbanização na dinâmica populacional do *Ae. aegypti*

Nas últimas décadas, as cidades têm vivenciado a reemergência de várias doenças infecciosas, principalmente em decorrência de fatores presentes nestes locais, como o crescimento populacional sem precedentes, a urbanização não planejada e o movimento de pessoas ³¹. Outra característica decorrente da urbanização e expansão das cidades é a domiciliação de insetos, onde alguns, por meio da sua ótima capacidade de adaptação e dispersão em ambientes modificados pelo homem, tornam-se pragas devido ao desconforto das picadas e transmissão de patógenos ⁴⁰. Um bom exemplo de tal adaptação encontra-se no mosquito da espécie *Ae. aegypti*, no qual sua dinâmica populacional é afetada não somente por fatores abióticos, como regimes de chuvas e temperaturas, mas também por fatores sócio-ambientais, a exemplo da densidade humana ^{2,41,42}. Dentre as várias contribuições presentes nos ambientes urbanos, para a abundância do *Ae. aegypti*, podemos destacar o aumento dos criadouros artificiais e dispersão passiva. Ambos, sofrendo enorme influência em decorrência da elevada densidade populacional presente nestes locais, bem como suas atividades humanas ⁴²⁻⁴⁵. Aparentemente, o movimento de pessoas e o comércio entre as regiões que

compõem os grandes centros urbanos são umas das principais causas da dispersão passiva do vetor, ao que indica, sendo potencializada pela tolerância a dessecação de seus ovos, por vários meses ^{2,46}. Consequentemente, a proliferação do *Ae. aegypti* aumenta o contato entre vetor-hospedeiro, contribuindo para o risco de transmissão de patógenos ⁴⁷.

1.4. Ambiente urbano

A Revolução Industrial do século XVIII proporcionou o surgimento de grandes cidades, com potenciais para o desenvolvimento individual e comunitário. Residir nestes locais pode significar vantagens, como acesso a uma melhor educação, maiores salários, além de um melhor acesso à programas de saúde e serviços sociais ⁴⁸. Paradoxalmente, o ambiente urbano expõe a saúde de seus habitantes a inúmeros fatores de risco, como a poluição e ruídos, em função do aumento do tráfego de veículos motorizados, além do estresse associado à pobreza e ao desemprego ⁴⁹.

Do ponto de vista físico, o ambiente urbano pode ser classificado em: 1) Sistema de espaços com construções, 2) Sistema de espaços livres de construção e 3) Sistema de espaços de integração viária. O primeiro é constituído por locais que apresentam habitações, indústrias, comércios, hospitais, escolas, entre outros. O segundo é representando por espaços livres de construção, como praças, parques, e águas superficiais, enquanto que o terceiro é caracterizado por rodovias e ferrovias ⁵⁰. Ainda de acordo com esta abordagem, sistemas de espaços livres são entendidos como locais destinados ao atendimento da demanda das populações que vivem nas cidades, como a

recreação e o lazer, podendo ser privados ou públicos, além de desempenhar funções estética, e ecológico-ambiental ⁵¹.

Parques Urbanos são partes integrantes do sistema de espaços livres de construção, sua origem ocorreu na Europa do século XIX, por meio de um movimento que visava atender as demandas sociais, como o lazer e o ócio nas cidades na era industrial, contrapondo-se as edificações do ambiente urbano. Paralelamente, os parques urbanos no Brasil surgem como uma figura complementar ao cenário das elites emergentes, que buscavam adequar seus padrões paisagísticos aos das cidades européias ⁵². Atualmente, a criação e manutenção de parques urbanos visam demandas, como espaços de lazer, promoção de saúde e qualidade de vida, além da preservação da biodiversidade ⁵³. Dessa forma, seu movimento atual surge como investimentos na melhoria da qualidade de vida das pessoas, trazendo uma alternativa de redução para o estresse encontrado nos grandes centros urbanos, além de refletir na melhoria da qualidade estética, funcional e ambiental da cidade ^{54,55}.

Ainda sob o contexto do sistema de espaços livres de construção, áreas verdes apresentam a mesma funcionalidade dos parques urbanos, embora apresentando extensões menores que estes, na maioria das vezes, além de proporcionar a prática de atividades físicas e lazer ⁵⁵. Locais como parques e áreas verdes podem preservar resquícios da vegetação original e servir como refúgio para aves e mamíferos, mas, por vezes, também podem permitir a manutenção de populações de culicídeos que infestam áreas densamente habitadas. Um exemplo que podemos citar é o *Ae. aegypti*, que frequentemente utiliza estes locais, quando a disponibilidade de criadouros artificiais é reduzida em áreas onde ocorrem programas de controle ⁵⁶⁻⁵⁸.

No contexto exposto acima, dentre os vários espaços que compõem os grandes centros urbanos, parques e áreas verdes deveriam receber igual atenção, a exemplo dos demais locais que já se encontram assistidos durante programas de controle. Ainda que a abundância registrada de *Ae. aegypti* nestes ambientes seja relativamente baixa em comparação com outras espécies de culicídeos ^{58,59}, sua presença e a grande circulação de pessoas podem implicar na manutenção e transmissão dos patógenos que alberga.

1.5. Morfometria Geométrica alar

O campo da morfometria tem como base a metodologia para descrição e análise estatística da variação da forma entre amostras de organismos, de modo a verificar sua mudança em decorrência de crescimento, tratamento experimental ou evolução, sendo seu emprego necessário quando há necessidade de descrever e comparar diferentes organismos ou mesmo suas estruturas ⁶⁰.

A morfometria geométrica pode ser definida como um conjunto de métodos de aquisição, processamento e análise de variáveis, de maneira a preservar toda a informação geométrica contida nos dados originais ⁶¹. Diferentemente da morfometria tradicional, que utiliza medidas lineares, como comprimento, largura, ângulos e razões (proporções), tomadas a partir de estruturas ou partes de organismos. Na morfometria geométrica, os dados utilizados se baseiam no emprego de coordenadas cartesianas, denominadas *Landmarks* (marcos anatômicos). Sua vantagem em relação ao método tradicional é a possibilidade de capturar de maneira mais eficiente a informação relacionada à forma do organismo em questão, além de apresentar maior

robustez estatística ⁶⁰. Desse modo, a morfometria geométrica apresenta alto poder de resolução, permitindo a comparação de padrões corporais, levando em consideração, simultaneamente, várias características de uma mesma estrutura, sendo ainda possível a análise, quantificação e a visualização de forma gráfica e clara destas diferenças ^{62,63}.

Em função das características listadas anteriormente, a morfometria geométrica tem sido utilizada como ferramenta para a identificação e descrição de novas espécies, bem como espécies crípticas ^{64,65}. O método também tem sido empregado com sucesso no estudo de vetores de importância médica, como no trabalho de Schachter-Broide et al. ⁶⁶ com populações de *Triatoma infestans* que identificaram variação no tamanho das asas entre espécimes de triatomíneos coletados em domicílios e peridomicílios. Analisando a morfometria geométrica alar de culicídeos, Moraes et al. ^{67,68} mostraram simpatria entre as espécies *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens*, com formação de híbridos, em localidades do extremo sul do Brasil. Demari-Silva et al. ⁶⁹ encontraram dissimilaridades morfológicas na forma e no tamanho alar de espécies pertencentes ao complexo *Culex coronator* de populações do sul e sudeste do Brasil. Enquanto que, Moratore ⁶³ observou dissimilaridades em populações de *Cx. quinquefasciatus*, em duas áreas localizadas no Estado de São Paulo, Brasil. Christe et al. ⁷⁰ avaliaram o dimorfismo sexual alar em populações de *Aedes fluviatilis* na cidade de São Paulo demonstrando dissimilaridade entre os gêneros. No caso particular do emprego da técnica para estudos populacionais de *Ae. aegypti*, Jirakanjanakit et al. ^{71,72} conduzindo experimento de laboratório, a partir de sucessivas gerações, observaram variação no formato alar e tamanho dos espécimes, e atribuíram a

dissimilaridade observadas na forma da asa de suas amostras a um possível efeito de deriva genética. Já Henry et al. ⁷³ estudando populações de campo ao redor do mundo, observaram uniformidade no formato alar e tamanho em suas amostras. Vidal & Suesdek ⁷⁴ encontram resultados similares em estudo com populações da região metropolitana de cidade de São Paulo. Entretanto, em estudo recente, Carvajal et al. ⁷⁵ encontraram dissimilaridade em populações da região metropolitana de Manila, Filipinas, levantando como hipótese a heterogeneidade dos ambientes influenciando o padrão encontrado.

1.6. Microssatélites

Microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) são unidades de pequenas sequências nucleotídicas (compostas de 1-6 pares de bases) repetidas em *tandem*, encontrados abundantemente em procariotos e eucariotos. Eles estão presentes em ambas as regiões codificantes e não codificantes do genoma, sendo menos abundantes nesta primeira ⁷⁶⁻⁷⁸. Seu emprego como marcadores moleculares vem tornando-se popular, a partir do início do século XXI, pois tem demonstrado ser uma ferramenta extremamente útil em muitos campos da genética, tais como em estudos de genética de populações ⁷⁹. De herança mendeliana, os marcadores microssatélites apresentam elevado polimorfismo, com suas taxa de mutação variando de 10^{-6} a 10^{-2} , por *locus* por geração, possuindo ainda alta reprodutibilidade por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ⁸⁰⁻⁸².

Dois modelos são utilizados para explicar sua formação e polimorfismo:

a) deslizamento da DNA polimerase durante o processo de duplicação do DNA, com a dissociação transitória de sua cadeia e posterior realinhamento incorreto

da fita complementar a molde; b) recombinação desigual durante a fase meiótica entre cromossomos homólogos ^{78,83,84}. Fragmentos longos são mais instáveis, com expansões ocorrendo mais facilmente em número de unidades de repetições pequenos, ao passo que contrações ocorrem quando o número de unidades são maiores ⁸⁵. Embora a técnica apresente vantagens, como elevado grau de polimorfismo e fácil reprodução por meio de PCR, ela possui, como uma de suas limitações, a presença de alelos nulos, que são decorrentes de mutações pontuais em suas regiões flanqueadoras, impedindo dessa forma, sua amplificação na PCR e, conseqüentemente, levando à superestimação de indivíduos homozigotos ⁸⁶. Devido às características descritas anteriormente, marcadores microssatélites são utilizados largamente para caracterização e estruturação populacional, gerando conhecimento na genética de populações de vetores de importância médica, a exemplo dos trabalhos de Kothera et al. ⁸⁷ com populações do complexo *Cx. pipens*; Wilke et al. ⁸⁸ com *Cx. quinquefasciatus*, Angêlla et al. ⁸⁹ com *Anopheles darlingi* e Belisário et al. ⁹⁰ com *Triatoma sordida*.

No caso particular do *Ae. aegypti*, o método tem sido empregado com sucesso tanto em escala macro, quanto microrregional. Monteiro et al. ⁹¹ observaram formação de dois grupos genéticos distintos em populações provenientes de diversos pontos do continente Americano. Similarmente, Paupy et al. ⁹² revelaram significativa estrutura gênica na Bolívia, também sugerindo duas linhagens genéticas. Rasheed et al. ⁹³ demonstraram significativa diferenciação genética entre populações do Paquistão. Endersby et al. ⁹⁴ identificaram estruturação em populações da Austrália e do Vietnã, com separação entre localidades costeiras e interioranas na Austrália. Já Huber et

al.⁹⁵ detectaram similaridade entre populações separadas por centenas de quilômetros (km) em duas localidades do Vietnã. Em estudos realizados em menor escala geográfica, Vidal & Suesdek⁷⁴ encontraram diferenças entre populações da cidade de São Paulo, em distâncias não superiores a 50 km, sugerindo presença de baixo fluxo gênico. Olanratmanee et al.⁹⁶, em estudo realizado na Tailândia, observaram estruturação em suas populações num raio de 10 quilômetros, enquanto que Paupy et al.⁹⁷ encontraram diferenciação entre as populações de localidades ao norte de Camarões, em distâncias a partir de 2 km.

1.7. Justificativa

O *Ae. aegypti* está intimamente associado à espécie humana, revelando sua ótima capacidade de adaptação às alterações provocadas pelo homem no ambiente, como os processos de urbanização, que refletem diretamente na dinâmica populacional do vetor, permitindo a elevação de sua abundância⁴². A cidade de São Paulo, maior da América do Sul, apresenta uma elevada população humana, quadro que pressiona cada vez mais seus espaços verdes, causando sua diminuição. Em contrapartida, favorecendo a proliferação dos mosquitos *Ae. aegypti* e, conseqüentemente, o aumento da transmissão de seus patógenos. Embora, vacinas como a da Febre Amarela e Dengue já tenham sido desenvolvidas, esta última mais recentemente e, ainda não empregada em larga escala^{7,98}, para as demais arboviroses veiculadas por este vetor não existem tratamentos profiláticos disponíveis⁹⁹. De modo que, o controle das populações do *Ae. aegypti* ainda permanece como a principal

estratégica para a ruptura dos padrões epidemiológicos das arboviroses causadas por seus patógenos ¹⁰⁰.

Estruturação populacional, geralmente é um resultado de combinações decorrentes de processos históricos e contemporâneos envolvendo determinada espécie, como a sua capacidade de dispersão, padrões de cópula, barreiras físicas e ambientais, além de padrões demográficos. De modo que, determinar os diferentes papéis destes processos na estrutura de populações torna-se extremamente útil no controle de vetores de importância médica ¹⁰¹. Um bom exemplo é a propagação da resistência a inseticidas, em decorrência do fluxo gênico entre as populações. Portanto, um melhor conhecimento da estrutura populacional do *Ae. aegypti* é crucial para auxílio e desenvolvimento de novas estratégias de combate ao vetor, no qual seu entendimento, bem como os padrões microevolutivos e epidemiológicos, podem trazer informações relevantes para a tomada de decisões durante campanhas de controle. Desse modo, o presente estudo aplica dois marcadores utilizados em estudos de genética de populações, - morfometria geométrica alar e microssatélites -, com o objetivo de revelar a estruturação genética de populações de *Ae. aegypti* a partir de diferentes estratos urbanos do município de São Paulo.

6. Conclusões

- O estudo demonstrou um padrão de estruturação das populações da espécie *Ae. aegypti* de acordo com o gradiente de urbanização em que foram coletados.
- A morfometria geométrica alar exibiu uma maior similaridade das populações em correspondência com seus estratos de coleta, sendo ainda possível observar distintas variações intra-estrato.
- Os marcadores microssatélites apresentaram uma baixa estruturação genética, porém, em concordância com gradiente de urbanização dos ambientes coletados.
- Evidências indicam que as populações de *Ae. aegypti* sofreram, ou sofrem, um processo de expansão populacional de acordo com o gradiente de urbanização dos ambientes amostrados, com sua estruturação podendo refletir a heterogeneidade ambiental de cada estrato urbano.

7. Referências

1. Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory [Internet]. Valid Species List; 2016 [Acesso em 15 jan 2017]. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list#>.
2. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Cadernos de Saúde Pública. Editora FIOCRUZ; 1994.
3. Gubler DJ. The Global Emergence / Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. Arch Med Res. 2002;33(4):330–342.
4. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013; 496(7446):504–507.
5. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. Lancet Infect Dis. 2007;7(5):319–27.
6. Hayes EB. Zika virus outside Africa. Emerg Infect Dis. 2009;15(9):1347–1350.
7. Frierson JG. The yellow fever vaccine: A history. Yale J Biol Med. 2010;83(2):77–85.
8. Staples JE, Breiman RF, Powers AM. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. Clin Infect Dis. 2009;49(6):942–948.
9. Malone RW, Homan J, Callahan MV, Glasspool-Malone J, Damodaran L, Schneider ADB. Zika Virus: Medical Countermeasure Development Challenges. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):e0004530.
10. Wilkerson RC, Linton YM, Fonseca DM, Schultz TR, Price DC, Strickman DA. Making mosquito taxonomy useful: A stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. PLoS One. 2015;10(7):1–26.
11. Gubler DJ, Ooi EE, Vasudevan S FJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. 2th ed. [Internet]. London: CABI; 2014 [Acesso em 11 nov 2016]. Disponível em: https://play.google.com/books/reader?id=TI_YBAAAQBAJ&printsec=frontcover&output=reader&hl=pt_BR&pg=GBS.PR4.
12. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:11–17.
13. Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, et al. Human Impacts Have Shaped Historical and Recent Evolution in *Aedes aegypti*, The Dengue and Yellow Fever Mosquito. Evolution.

2014;68(2): 514–525.

14. Mattingly PF. Taxonomy of *Aedes aegypti* and Related Species. Bull World Health Organ. 1967;36(4):552–554.
15. Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, et al. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. Proc Biol Sci. 2011;278:2446–2454.
16. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. Elife. 2015;4:1–18.
17. Rodrigues MDM, Rita G, Monteiro A, Leandro L, Serpa N, Arduino MDB, et al. Density of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and its association with number of residents and meteorological variables in the home environment of dengue endemic area, São Paulo, Brazil. Parasites & Vectors. 2015;8(4):1–9.
18. Liebman KA, Stoddard ST, Reiner RC, Perkins TA, Astete H, Sihuincha M, et al. Determinants of Heterogeneous Blood Feeding Patterns by *Aedes aegypti* in Iquitos, Peru. Plos Negl Trop Dis. 2014;8(2):e2702.
19. Clements AN. The biology of mosquitoes: Development, nutrition and reproduction. 2thed. London: CABI; 1992.
20. Lima-Camara TN, Bruno R V., Luz PM, Castro MG, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MHF, et al. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. PLoS One. 2011;6(3):1–5.
21. Farjana T, Tuno N. Multiple Blood Feeding and Host-Seeking Behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of medical entomology. 2013;50(4):838–846.
22. Scott TW, Takken W. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. Trends Parasitol. 2012;28(3):114–121.
23. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. J Clin Virol. 2015;64:160–173.
24. Finlay C. The Mosquito Hypothetically Considered as an Agent in the Transmission of “Yellow Fever Poison.” Yale J Biol Med. 1937;9(6):589.
25. MS. Ministério da Saúde [Internet]. Febre Amarela: Histórico; 2016 [Acesso em 05 mar 2017]. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/historico.php>.
26. WHO. World Health Organization [Internet]. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire; 2016 [Acesso em 20 jan 2017]. Disponível em: <http://www.wh.int/wer/2016/wer9132.pdf>.

27. MS. Ministério da Saude [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública Sobre Febre Amarela: Monitoramento dos Casos e Óbitos de Febre Amarela no Brasil; 2017 [Acesso em 05 mar 2017]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/14/COES-FEBRE-AMARELA-INFORME13-Atualizacao-em-09fev2017-as-13horas.pdf>.
28. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *Plos Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1760.
29. WHO. World Health Organization [Internet]. Dengue and severe dengue; 2016 [Acesso em 20 nov 2016]. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
30. Chepkorir E, Lutomiah J, Mutisya J, Mulwa F, Limbaso K, Orindi B, et al. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Kilifi and Nairobi for dengue 2 virus and the influence of temperature. *Parasites & Vectors*. 2014;7(1):435.
31. Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health*. 2011;39(4):3–11.
32. Gubler D. The emergence of epidemic dengue fever and dengue hemorrhagic fever in the Americas : a case of failed public health policy. *Revista Panamerica de Salud Pública*. 2005;17(4):221–224.
33. MS. Ministério da Saúde [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde; 2010 [Acesso em 8 Ago 2016]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_webatual.pdf.
34. Fernandez-Salas I, Días-González EE, López-Gatell H, Alpuche-Aranda C. Chikungunya and zika virus dissemination in the Americas : different arboviruses reflecting the same spreading routes and poor vector-control policies. *Current opinion in infectious diseases*. 2016;29(5):467–475.
35. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *N Engl J Med*. 2015;372(13):1231–1239.
36. Chang C, Ortiz K, Ansari , Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J Autoimmun*. 2016;68:1–13.
37. Macnamara FN. “Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria.” *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1954;48(2):139–145.
38. Duffy M. Chen T. Hancock T. Powers A. Kool J. Lanciotti R. Pretrick M. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*. 2009;2009(360):2536–2543.
39. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet H. Zika

- Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1085–1086.
40. Taípe-Lagos CB, Natal D. Culicidae mosquito abundance in a preserved metropolitan area and its epidemiological implications. *Rev Saude Pública.* 2003;37(3):275–279.
 41. Forattini OP. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia e Epidemiologia.* 2. ed. São Paulo: EdUSP; 2002.
 42. Higa Y. Dengue Vectors and their Spatial Distribution. *Trop Med Health.* 2011;39(4):17–27.
 43. Cardo MV, Rosín P, Carbajo AE, Vezzani D. Artificial container mosquitoes and first record of *Aedes aegypti* in the islands of the Paraná Lower Delta, Argentina. *J Asia Pac Entomol.* 2015;18(4):727–733.
 44. Dhar-chowdhury P, Haque CE, Lindsay R, Hossain S. Socioeconomic and Ecological Factors Influencing *Aedes aegypti* Prevalence, Abundance, and Distribution in Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(6):1223–1233.
 45. Townroe S, Callaghan A. British container breeding mosquitoes: The impact of urbanisation and climate change on community composition and phenology. *PLoS One.* 2014;9(4):e95325.
 46. Díaz-nieto LM, Chiappero MB, Astarloa CD. Genetic Evidence of Expansion by Passive Transport of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in Eastern Argentina. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):10–15.
 47. Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM. “Bird Biting” Mosquitoes and human Disease: A Review of the Role of *Culex Pipiens* Complex Mosquitoes in epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2011;11(7):1577–1585.
 48. Neiderud C. How urbanization affects the epidemiology of emerging infectious diseases. *Infect Ecol Epidemiol.* 2015;5:1–9.
 49. Moore, M, Gould P, Keary B. Global urbanization and impact on health. *Int J Hyg Environ Health.* 2003;206(5):269–278.
 50. Cavalheiro F, Nucci JC, Guzzo P, Rocha YT. Proposição de Terminologia para o Verde Urbano. *Bol Inf da Soc Bras Arborização Urbana.* 1999;7(3).
 51. Londe PR. A influência das áreas verdes na qualidade de vida urbana. *Hygeia Rev Bras Geogr Médica e da Saúde.* 2014;10(18):264–272.
 52. Limnios G, Furlan S. Parques Urbanos no Município de São Paulo – SP (Brasil): Espacialização e Demanda Social. *Rev Labverde.* 2013;6:173–189.
 53. Laura S, Cardoso C, Maria A, Vasconcellos DA. Gestão ambiental de

- parques urbanos : o caso do Parque Ecológico do Município de Belém
Gunnar Vingren. Revista Brasileira de Gestão Urbana. 2015;7(1):74–90.
54. SVMA. Secretaria Municipal do Verde e Meio Ambiente. Guia dos Parques Municipais de São Paulo. 2. ed. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e Meio Ambiente; 2010.
 55. MMA. Ministério do Meio Ambiente [Internet]. Resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA); 2016 [Acesso em 8 Ago 2016]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/areas-verdes-urbanas/parques-e-%25C3%25A1reas-verdes>.
 56. Lourenço-de-Oliveira R, Castro MG, Braks MH, Lounibos LP. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. J Vector Ecol. 2004;29:94–100.
 57. de Carvalho GC, Malafronte RDS, Miti Izumisawa C, Souza Teixeira R, Natal L, Marrelli MT. Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in São Paulo, Brazil. J Vector Ecol. 2014;39(1):146–52.
 58. Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Junior W, Urbinatti PR, Natal D, Carvalho GC, Paula MB, et al. Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques da cidade de São Paulo I. Biota Neotrop. 2013;13(1):317–321.
 59. Paula MB de, Fernandes A, Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Júnior W, Christe R, Stroebel RC, et al. Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna in parks in greater São Paulo, Brazil. Biota Neotrop. 2015;15(3):1–9.
 60. Rohlf JF, Marcus LF. “A revolution morphometrics.” Trends Ecol Evol. 1993;8:129–132.
 61. Slice DE. Geometric Morphometrics. Annu Rev Anthr. 2007;36:261–281.
 62. Moraes D. A morfometria geométrica e a “Revolução na morfometria” localizando e visualizando mudanças nas formas dos organismos. Rev Divul Cient Estud Biol. 2003;3:1–5.
 63. Moratore C. Padrões genéticos-morfológicos em populações de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) [Mestrado] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP; 2009.
 64. Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol. 2008;8(6):875–890.
 65. Wilke ABB, Christe RDO, Multini LC, Vidal O, Wilk-da-silva R, et al. Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. Plos One. 2016;11(8):1–12.
 66. Schachter-broide J, Dujardin J, Kitron U, Gürtler E. Spatial Structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) Populations from Northwestern Argentina Using Wing Geometric Morphometry. J Med

Entomol. 2004;41(4):643–649.

67. Morais SA, Almeida FD, Suesdek L. Low Genetic Diversity in Wolbachia-Infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Rev Inst Med Trop.* 2012;54(6):325–329.
68. Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(5):672–676.
69. Demari-Silva B, Suesdek L, Sallum MAM, Marrelli MT. Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. *Parasites & Vectors.* 2014;7(1):174.
70. Christe RdeO, Wilke ABB, Vidal PO, Marrelli MT. Wing sexual dimorphism in *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Infect Genet Evol.* 2016;45:434–436.
71. Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Infect Genet Evol.* 2008;8:414–421.
72. Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrungrat S, Apiwathnasorn C, Singhanityom S, Bellec C. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Trop Med Int Heal.* 2007;12(11):1354–1360.
73. Henry A, Thongsripong P, Fonseca-Gonzalez I, Jaramillo-Ocampo N, Dujardin J-P. Wing shape of dengue vectors from around the world. *Infect Genet Evol.* 2010;10(2):207–214.
74. Vidal PO, Suesdek L. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. *Infect Genet Evol.* 2012;12(3):591–596.
75. Carvajal TM, Hernandez LFT, Ho HT, Cuenca MG, Orantia MC, Estrada CR, et al. Spatial analysis of wing geometry in dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), populations in Metropolitan Manila, Philippines. *J Vector Borne Dis.* 2016;3(2):127–135.
76. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation : a review. *Mol Ecol.* 2002;11(1):1–16.
77. Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Lúcia M, Vieira C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol.* 2006;29(2):294–307.
78. Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 2000;10(7):967–981.
79. Bhargava A, Fuentes FF. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Mol Biotechnol.* 2009;44(3):250–266.

80. Ravel S, Herve JP, Diarrassouba S, Kone A, Cuny G. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouake. *Acta Trop*. 2002;82(1):39–49.
81. Edillo FE, Tripet F, McAbee RD, Foppa IM, Lanzaro GC, Cornella J, et al. A set of broadly applicable microsatellite markers for analyzing the structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) populations. *J Med Entomol*. 2007;44(1):145–149.
82. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Mol Ecol*. 2002;11(12):2453–2465.
83. Schlotterer C. Slippage synthesis of simple DNA. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(2):211–215.
84. Hartig S, Kool ET. Efficient isothermal expansion of human telomeric and minisatellite repeats by *Thermococcus litoralis* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(15):4922–4927.
85. Lai Y, Sun F. The Relationship Between Microsatellite Slippage Mutation Rate and the Number of Repeat Units. *Mol Biol Evol*. 2003;20(12):2123–2131.
86. Chapuis M, Estoup A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Mol Biol Evol*. 2004;24(3):621–631.
87. Kothera L, Nelms BM, Reisen WK, Savage HM. Population genetic and admixture analyses of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) populations in California, United States. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89:1154–1167.
88. Wilke ABB, Vidal PO, Suesdek L, Marrelli MT. Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*. 2014;7(1):468.
89. Angêlla AF, Salgueiro P, Gil LHS, Vicente JL, Pinto J, Ribolla PEM. Seasonal genetic partitioning in the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Malar J*. 2014;13(1):1–10.
90. Belisário CJ, Caldas G, Pessoa DA, Fernandes P, Dias LS, Cristine A, et al. Markers for the population genetics studies of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasites & Vectors*. 2015;8(1):15–17.
91. Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):1–10.
92. Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja Simon Z, et al. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infect Genet Evol*.

2012;12(6):1260–1269.

93. Rasheed SB, Boots M, Frantz AC, Butlin RK. Population structure of the mosquito *Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*) in Pakistan. *Med Vet Entomol.* 2013;27(4):430–440.
94. Endersby NM, Hoffmann AA, White VL, Lowenstein S, Ritchie S, Johnson PH, Rapley LP, Ryan PA, Nam VS, Yen NT, Kittiyapong P, Weeks AR. Genetic Structure of *Aedes aegypti* in Australia and Vietnam Revealed by Microsatellite and Exon Primed Intron Crossing Markers Suggests Feasibility of Local Control Options. *J Med Entomol.* 2009;46(5):1074–1083.
95. Huber K, Loan LLE, Chantha N, Failloux AB. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. *Acta Trop.* 2004;90(1):23–29.
96. Olanratmanee P, Kittiyapong P, Chansang C, Hoffmann AA, Weeks AR, Endersby NM. Population Genetic Structure of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) at a Micro-Spatial Scale in Thailand: Implications for a Dengue Suppression Strategy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e1913.
97. Paupy C, Brengues C, Kamgang B, Hervé JP, Fontenille D, Simard F. Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. *J Med Entomol.* 2008;45(3):391–400.
98. Vannice KS, Durbin A, Hombach J. Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. *Vaccine.* 2016;34(26):2934–2938.
99. WHO. World Health Organization [Internet]. Immunization, Vaccines and Biologicals; 2016 [Acesso em 05 jan 2017]. Disponível em: http://www.who.int/immunization/research/development/dengue_vaccines/en/.
100. Araújo HRC, Carvalho DO, Ioshino RS, Costa-Da-Silva AL, Capurro ML. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. *Insects.* 2002;6(2):576–594.
101. Hlaing T, Tun-lin W, Somboon P, Socheat D, Setha T, Min S, et al. Spatial genetic structure of *Aedes aegypti* mosquitoes in mainland Southeast Asia. *Evolutionary applications.* 2010;3(4):319–339.
102. Natal D, Marucci D. Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. *Rev Saude Pública.* 1984;18(5):418–420.
103. SEF. Superintendência do Espaço Físico [Internet]. Área edificada e territorial por Campus; 2014 [Acesso em 20 dez 2016]. Disponível em: <http://www.sef.usp.br/documentos/diversos/>.
104. Vilela S, Lajolo F, Agnelli GP V, Cabral NAJ, Cabral NAJ, Klimas A, et al.

A Recuperação do Crusp. São Paulo: Coordenadoria do espaço físico - COESF; 2009.

105. STM. Secretaria dos Transportes Metropolitanos [Internet]. Entrada de Passageiros por Estação/média dos dias úteis - 2015 (em milhares); 2016 [Acesso em 8 Dez 2016]. Disponível em: <http://www.metro.sp.gov.br/metro/numeros-pesquisa/demanda.aspx>.
106. FSP. Faculdade de Saúde Pública [Internet]. Histórico; 2016 [Acesso em 11 Out 2016]. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/site/paginas/mostrar/128>.
107. AAAOC. Associação Atlética Acadêmica Oswaldo Cruz [Internet]. História; 2016 [Acesso em 11 Out 2016]. Disponível em: <http://www.aaaoc.com.br/historia-da-aaaoc/>.
108. Rohlf FJ. tpsDig. V1.4. New York: Ecology & Evolution, Stony Brook University; 2004.
109. Klingenberg CP. MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour*. 2011;11(2):353–357.
110. Slotman MA, Kelly NB, Harrington LC, Kitthawee S, Jones JW, Scott TW, et al. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. *Mol Ecol Notes*. 2007;7(91):168–171.
111. Chambers EW, Meece JK, McGowan JA, Lovin DD, Hemme RR, Chadee DD, et al. Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Hered*. 2007;98(3):202–210.
112. Rousset F. GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 2008;8(1).
113. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005;1:47–50.
114. Evanno JG, Regnaut S. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14(8):2611–2620.
115. StatSoft. STATISTICA (data analysis software system), version 7, 2004.
116. Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 1996;144(4):2001–2014.
117. Conn JE, Vineis JH, Bollback JP, Onyabe DY, Wilkerson RC, PÓVOA M, et al. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. *Am J Trop Med*

- Hyg. 2006;74(5):798–806.
118. Vidal PO, Carvalho E, Suesdek L. Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(8):1030–1034.
 119. Ridley M. Evolução. 3. ed. Artmed Editora, 2009.
 120. Wright S. The genetical structure of populations. Ann Eugen. 1949;15:323–354.
 121. Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. Phylogenetic Analysis Models and Estimation Procedures. Am J Hum Genet. 1967;19:233–257.
 122. Lambrechts L, Paaijmans KP, Fansiri T, Carrington LB, Kramer LD, Thomas MB, et al. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. Proc Natl Acad Sci. 2011;108(18):1–6.
 123. Araujo RV, Albertini MR, Costa-da-Silva AL, Suesdek L, Franceschi NCS, Bastos NM, et al. São Paulo urban heat islands have a higher incidence of dengue than other urban areas. Brazilian J Infect Dis. 2015;19:146–155.
 124. CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica [Internet]. Distribuição dos casos confirmados de dengue no Estado de SP, autóctones segundo o município de residência e importados (outros municípios e outros Estados); 2016 [Acesso em 20 nov 2016]. Disponível em: <http://portal.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/dengue/dados-estatisticos>.
 125. Yang GJ, Brook BW, Whelan PI, Cleland S, Bradshaw C. Endogenous and exogenous factors controlling temporal abundance patterns of tropical mosquitoes. Ecol Appl. 2008;18(8):2028–2040.
 126. Rosenthal JK, Sclar ED, Kinney PL, Knowlton K, Crauderueff R, Brandt-Rauf PW. Links between the built environment, climate and population health: Interdisciplinary environmental change research in New York City. Ann Acad Med Singapore. 2007;36(10):834–846.
 127. Beserra EB, Fernandes CRM, Silva SADO, Silva LA, Santos JW. Efeitos da temperatura no ciclo de vida, exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Iheringia Série Zoológica. 2009;99:142–148.
 128. Watts D, Burke D, Harrison B, Whitmire R, Nisalak A. Effect of Temperature on the Vector Efficiency of *Aedes aegypti* for Dengue 2 Virus. Am J Trop Med Hyg. 1987;36(1):143–152.
 129. Cristina D, Navarro A. Evaluation of the temperature influence on the development of *Aedes albopictus*. Rev Saúde Pública. 2002;36(2):173–179.

130. Mckinney ML. Urbanization, Biodiversity, and Conservation. *Bioscience*. 2002;52(10):883-890.
131. Louise C, Vidal PO, Suesdek L. Microevolution of *Aedes aegypti*. *PLoS One*. 2015;10(9):1–16.
132. Gaspe MS, Schachter-Broide J, Gurevitz JM, Kitron U, Gürtler RE, Dujardin JP. Microgeographic spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations using wing geometric morphometry in the Argentine Chaco. *J Med Entomol*. 2012;49(3):504–14.
133. Multini LC, Wilke ABB, Suesdek L, Marrelli MT. Population Genetic Structure of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*. 2016;11(9):e0162328.
134. Donnelly MJ, Licht MC, Lehmann T. Evidence for Recent Population Expansion in the Evolutionary History of the Malaria Vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Mol Biol Evol*. 2001;18(7):1353–1364.
135. Michel AP. Divergence With Gene Flow in *Anopheles funestus* From the Sudan Savanna of Burkina Faso, West Africa. *Genetics*. 2006;173(3):1389–1395.
136. Mirabello L, Conn JE. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in central and South America. *Heredity*. 2006;96(4):311-321.
137. da Costa-Ribeiro MCV, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux AB. Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in southeastern and southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77(7):303–309.
138. Maciel-de-freitas R, Codeço CT, Lourenço-de-oliveira R. Daily Survival Rates and Dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(4):659–665.
139. Maciel-de-Freitas R, Lourenço-de-Oliveira R. Presumed unconstrained dispersal of *Aedes aegypti* in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev saúde pública*. 2009;43(1):8–12.
140. Sayson SL, Gloria-Soria A, Powell JR, Edillo FE. Seasonal Genetic Changes of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations in Selected Sites of Cebu City, Philippines. *J Med Entomol*. 2015;52:638–646.
141. Moura AJF, Santos MAVM, Oliveira CMF, Ghedes DRD, Carvalho-Leandro D; Brito MLC, Rocha HDR, Gómez LF AC. Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. *Parasites & Vectors*. 2015;8(114):1–9.