Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Laura Cristina Multini

**Caracterização genética de populações de *Aedes fluviatilis* de parques
municipais em São Paulo, utilizando marcadores microssatélites**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças tropicais e
Saúde Internacional.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

São Paulo

2016

FOLHA DE ROSTO

Laura Cristina Multini

Caracterização genética de populações de *Aedes fluviatilis* de parques municipais em São Paulo, utilizando marcadores microsatélites.

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças tropicais e Saúde Internacional.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

São Paulo

2016

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Multini, Laura Cristina

Caracterização genética de populações de *Aedes fluviatilis* de parques municipais em São Paulo, utilizando marcadores microssatélites / Laura Cristina Multini. – São Paulo, 2016.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Mauro Toledo Marrelli

Descritores: 1. MARCADOR MOLECULAR. 2. AEDES. 3. GENÉTICA DE POPULAÇÕES. 4. URBANIZAÇÃO

USP/IMTSP/BIB-07/2015.

A minha mãe por todo seu amor.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento desse projeto (2013/22347-2).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli, pela confiança na realização deste trabalho e por toda ajuda e apoio ao longo desses quase quatro anos de convivência.

Ao meu co-orientador e companheiro, Dr. André Barretto Bruno Wilke, por toda dedicação, confiança, incentivo, amor e, principalmente, pela grande ajuda e apoio ao longo desses dois anos, pois foi muito importante para a conclusão deste trabalho.

Aos queridos colegas de laboratório, Antônio Medeiros-Sousa, Gabriela Carvalho, Ramon Wilk, Rafael Christe, Walter Ceretti, Aristides Fernandes, pelos momentos de descontração e por toda ajuda.

Aos meus queridos amigos, Lucélia, Bárbara, Mailson, Thayane, Wellington, Fernando, Ariane e Bruna, pela amizade e por todos os nossos momentos de descontração e alegria, e por sempre me entenderem e me apoiarem.

Aos Drs. André Luis da Costa da Silva, Fábio de Almeida e Dra. Karin Kirchgatter pela ajuda e boas ideias na qualificação deste trabalho.

Aos meus pais, Ademir e Verônica e a minha irmã Ana Rúbia, por todo amor e incentivo.

RESUMO

Multini LC. Caracterização de populações de *Aedes fluviatilis* de parques municipais em São Paulo, utilizando marcadores microsatélites (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Parques localizados em grandes cidades possuem potencial para manter o ciclo biológico de insetos vetores de patógenos que causam doenças. Este é o caso do *Aedes fluviatilis*, uma espécie de mosquito antropofílica, abundantemente encontrada na cidade de São Paulo, porém que possui sua biologia, potencial epidemiológico e características genéticas pouco conhecidas. Visando o melhor conhecimento sobre a estrutura populacional dessa espécie foram selecionados oito *loci* microsatélites, marcadores utilizados em estudos de genética de populações, para caracterizar as populações de *Ae. fluviatilis*.

Objetivos: (1) Testar parâmetros de funcionalidade de marcadores microsatélites em *Ae. fluviatilis*, previamente utilizados com sucesso em outras espécies de culicídeos (2) Avaliar a variabilidade genética e o fluxo gênico entre populações do mosquito *Ae. fluviatilis*, no município de São Paulo. **Material e Métodos:** Foram testados 40 pares de *primers* de microsatélites em mosquitos *Ae. fluviatilis*. Os *primers* funcionais foram utilizados para elucidar a estruturação das populações dessa espécie coletadas em nove parques urbanos da cidade de São Paulo.

Resultados: Dos *primers* testados, oito foram funcionais e amplificaram de forma consistente em todas as nove populações de *Ae. fluviatilis*. Os resultados encontrados sugerem que essa espécie possui baixa estruturação genética, alto fluxo gênico, déficit de heterozigosidade e sofreram um processo de expansão populacional. **Discussão:** Processos de urbanização, juntamente com mudanças climáticas, beneficiam e tendem a aumentar a abundância de espécies antropofílicas e adaptadas ao meio antrópico, como é o caso de *Ae. fluviatilis*, a

expansão populacional dessa espécie, juntamente com o alto fluxo gênico e baixa estruturação genética, apresentam um panorama de alta adaptabilidade e sobrevivência deste culicídeo. **Conclusões:** Evidências, como o alto fluxo gênico, baixa estruturação populacional e déficit de heterozigosidade, indicam que as populações de *Ae. fluviatilis* estão em expansão populacional e que esse evento esteja ocorrendo junto com a expansão da área urbana de São Paulo.

Descritores: Marcador molecular. *Aedes*. Genética de Populações. Urbanização.

ABSTRACT

Multini LC. Genetic Characterization of *Aedes fluviatilis* populations from municipal parks in São Paulo, using microsatellite markers (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

Introduction: Urban Parks have the potential to harbor and maintain the life cycle of several mosquito species such as *Aedes fluviatilis*, an anthropophilic mosquito very abundant in the city of São Paulo. However its biology, epidemiological potential and genetic characteristics are poorly known. Aiming at better understanding of the population structure of this species, there were selected eight microsatellite loci, previously used in *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Aedes caspius* population genetic studies to genetically characterize *Ae. fluviatilis* populations. **Objectives:** (1) Test microsatellite markers functionality parameters in *Ae. fluviatilis*, previously used successfully in other *Aedes* species (2) To evaluate the genetic variability and gene flow between populations of *Ae. fluviatilis* mosquito in São Paulo. **Materials and Methods:** There were tested 40 pairs of microsatellite loci in *Ae. fluviatilis* samples. The functional primers were used to elucidate the populations structure of this species collected in nine urban parks located in the city of São Paulo. **Results:** From the tested primers, eight were functional and amplified consistently in all nine populations of *Ae. fluviatilis*. The results suggest that this species has low genetic structure, high gene flow, heterozygosity deficit and are expanding its population size. **Discussion:** Urbanization processes, along with climate change benefits and tends to increase the abundance of anthropophilic and well adapted to human environment mosquito species, such as *Ae. fluviatilis*. The population expansion of this species, along with the high gene flow and low genetic structure, present a panorama of high adaptability and survival of this Culicidae in urban areas. **Conclusions:** Evidence, as the high gene flow, low population structure and high

deficit of heterozygosity, indicate that *Ae. fluviatilis* population are in expansion and that this event is taking place along with the expansion of the urban area of São Paulo.

Descriptors: Molecular marker. *Aedes*. Genetics of populations. Urbanization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Parques públicos e áreas de proteção situadas na cidade de São Paulo indicando a localização dos nove parques utilizados no estudo.....	34
Figura 2 - Gel de agarose 1%, no qual é possível observar os fragmentos amplificados referentes ao <i>primer</i> Albtri33 com aproximadamente 150 pares de bases, para as populações: Burle Marx (1), Ibirapuera (2), Piquerí(3), Previdência (4), Santo Dias (5), Shangrilá (6), Alfredo Volpi (7), Chico Mendes (8), Carmo (9) e controle negativo (C-). PM=Peso Molecular de 100 pb.....	36
Figura 3 - Árvore de <i>Neighbour-Joining</i> (NJ) construída a partir dos valores de distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards, com valores de <i>bootstrap</i> (10.000 iterações).....	51
Figura 4 - Correlação linear entre distância genética (F_{st} ($1-F_{st}$)) e distância geográfica (Km) entre as populações ($r=-0,2421$; $r^2=0,058614$; $P=0,15485$).....	52
Figura 5 - Gráfico do ΔK , no qual é possível observar o valor de $k=2$ como melhor número de grupos genéticos para explicar dados.	54
Figura 6 - Análise Bayesiana de <i>cluster multi-locus</i> de genótipos microssatélites , mostrando as configurações $k=2$ (A), $k=4$ (B) e $k=9$ (C). Cada um dos 270 indivíduos é representado por uma linha vertical, fracionada em segmentos de cores que representam a probabilidade dos indivíduos em pertencer a algum dos <i>clusters</i> genéticos.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Populações, coordenadas dos parques, número total de mosquitos e de <i>Ae. fluviatilis</i> coletados, e número de fêmeas de <i>Ae. fluviatilis</i> utilizadas no estudo.....	33
Tabela 2 - <i>Loci</i> microssatélites testados em <i>Aedes fluviatilis</i> , motivos de repetição e referência bibliográfica.....	40
Tabela 3 - <i>Loci</i> microssatélites amplificados em <i>Ae. fluviatilis</i> , espécies, temperatura de anelamento, tamanho de seus alelos e referência bibliográfica.....	43
Tabela 4 - Heterozigosidade Observada (H_o), Heterozigosidade Esperada (H_e), Coeficiente de Endogamia (F_{is}) e desvios de Hardy-Weinberg observados para cada população nos oito <i>loci</i> testados. Em negrito, valores de P estatisticamente significantes, após correção de Bonferroni.....	45
Tabela 5 - Probabilidade de alelos nulos por <i>locus</i> por população de <i>Ae. fluviatilis</i>	48
Tabela 6 - Valores de Heterogeneidade genética (F_{st}) na diagonal de baixo (valores significantes em negrito). Valores de Heterogeneidade genética (F_{st}), após correção considerando os alelos nulos, na diagonal de cima (com 95% de intervalo de confiança).....	49
Tabela 7 - Matriz de distância genética Cavalli-Sforza e Edwards, na diagonal de baixo: valores considerando os alelos nulos com 95% de intervalo de confiança. Valores da distância geográfica (Km) entre as populações, na diagonal de cima.....	50
Tabela 8 - Análises de Correlações Lineares entre distância genética (F_{st} ($1-F_{st}$)) e variáveis ambientais. Em negrito, valor de P significativo.....	53
Tabela 9 - Número de <i>loci</i> exibindo excesso de heterozigosidade (H_e) e heterozigosidade esperada pelo número de alelos observados (H_{eq}) sob o modelo SMM. Em negrito, valores de P significantes para déficit de heterozigosidade.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

DEN-1	Vírus Dengue Cepa 1
DEN-2	Vírus Dengue Cepa 2
DEN-3	Vírus Dengue Cepa 3
DEN-4	Vírus Dengue Cepa 4
WNV	West Nile Virus
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
MIP	Manejo Integrado de Pragas
SIT	Técnica do Inseto Estéril
COI	Citocromo Subunidade I
ITS2	Segundo Espaçador Interno Transcrito
mtCytB	Citocromo B
DNA	Ácido Dexossirribonucleico
F_{is}	Coeficiente de Endogamia
F_{st}	Índice de Heterogeneidade Genética
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
H_o	Heterozigosidade Observada
H_e	Heterozigosidade Esperada
LD	Desequilíbrio de Ligação
NJ	<i>Neighbour-Joining</i>
SMM	<i>Stepwise Mutation Model</i>
EUA	Estados Unidos da América
RVFV	<i>Rift Valley Fever</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Família Culicidae.....	14
1.2	Parques urbanos.....	18
1.3	Gênero <i>Aedes</i>	21
1.4	<i>Aedes fluviatilis</i>	22
1.5	Urbanização e culicídeos.....	23
1.6	Genética de populações.....	24
	JUSTIFICATIVA.....	28
	OBJETIVOS.....	29
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1	Populações de <i>Aedes fluviatilis</i> e Área de estudo.....	30
2.1.1	Burle Marx.....	30
2.1.2	Ibirapuera.....	30
2.1.3	Piquerí.....	31
2.1.4	Providência.....	31
2.1.5	Santo Dias.....	31
2.1.6	Shangrilá.....	32
2.1.7	Alfredo Volpi.....	32
2.1.8	Chico Mendes.....	32
2.1.9	Parque do Carmo.....	33
2.2	Métodos de Coletas.....	34
2.3	Identificação dos espécimes.....	35
2.4	Extração de DNA.....	35
2.5	Sequenciamento ABI.....	36
2.6	Análise dos fragmentos obtidos e análise estatística.....	37
3	RESULTADOS.....	39
4	DISCUSSÃO.....	58
5	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família Culicidae

Os mosquitos que integram a família Culicidae, pertencem à Ordem Diptera e são conhecidos por ser um grupo abundante, composto por 3.546 espécies descritas presentes em todas as regiões do Mundo, exceto àquelas que são congeladas o ano inteiro.¹ O desenvolvimento dos mosquitos compreende as fases de ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto, sendo a forma adulta alada, com pernas e antenas longas, e as formas imaturas são aquáticas. Os mosquitos se alimentam de seiva e as fêmeas também fazem repasto sanguíneo para a maturação dos ovos, e por esse motivo são responsáveis pela transmissão de patógenos para humanos e animais.^{2,3}

Existem três grandes gêneros de importância epidemiológica responsáveis pela transmissão de patógenos: *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*. As espécies pertencentes a esses gêneros transmitem os patógenos que causam Dengue, Encefalite do Nilo Ocidental e Malária, respectivamente. Juntas essas doenças abrangem mais de três bilhões de pessoas que vivem em áreas de risco, e somadas causam mais de três milhões de mortes ao ano.⁴⁻⁶

A dengue severa ou dengue hemorrágica foi descoberta durante os anos de 1950 em uma epidemia nas Filipinas e Tailândia, mas, atualmente, a dengue hemorrágica está presente na maioria dos países Asiáticos e Latino-Americanos.⁷ Existem quatro diferentes sorotipos de vírus que causam dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), após a infecção por um dos sorotipos, o indivíduo fica imune a ele por um longo período, porém se for infectado novamente por outro sorotipo, o risco de desenvolver dengue hemorrágica aumenta.^{6,8}

Na América Latina a dengue é transmitida, principalmente, pelas fêmeas da espécie *Aedes aegypti* e, secundariamente, pelo *Aedes albopictus*.^{9,10} O mosquito,

quando infectado, incuba o vírus dengue por volta de 4 a 10 dias e uma vez infectado é capaz de transmitir o vírus pelo resto de sua vida. Humanos que carregam o vírus podem servir como reservatório e infectar mosquitos não saudáveis formando um ciclo enzoótico da doença, uma vez que humanos infectados com o vírus dengue podem continuar infectivos por até 12 dias após a aparição dos sintomas. Os sintomas, geralmente, duram de 2 a 7 dias, depois de um período de 4 a 10 dias de incubação.^{6,11} O aumento de risco de transmissão de dengue apresenta correlações com pluviosidade, altas temperaturas e rápida urbanização sem planejamento, características que beneficiam os mosquitos *Ae. aegypti*, pois são adaptados ao ambiente antrópico, no qual suas formas imaturas são capazes de sobreviver em criadouros artificiais. As fêmeas tem a maior atividade durante o dia e tendem a fazer repasto sanguíneo no período da manhã ou à tarde antes do crepúsculo, comportamento que expõe os humanos, pois não fazem uso de inseticidas durante esse período do dia.^{6,9,10} Além do vírus da dengue, o *Ae. aegypti* pode transmitir outros flavivirus de importância médica, como o vírus causador da febre amarela, da febre chikungunya e da doença zika.¹²⁻¹⁴

O Vírus do Nilo Ocidental, ou West Nile Vírus (WNV), é um flavivirus que causa encefalite em aves, humanos e equinos e é transmitido por mosquitos vetores do gênero *Culex*. Esse vírus pode ser encontrado na África, Ásia, Europa, Austrália e foi responsável por diversas epidemias ao redor do globo, como por exemplo, na Romênia, Rússia e em Israel.¹⁵ As aves agem como reservatórios naturais desse vírus, que mantém um ciclo zoonótico mosquito-ave-mosquito na natureza.¹⁶ Em 1999 esse vírus foi, pela primeira vez, isolado na América do Norte em uma epidemia de meningoencefalite na cidade de Nova Iorque e nos dias atuais é a principal doença transmitida por mosquitos no continente norte-americano.^{17,18} A maioria dos casos humanos de WNV, compreendendo cerca de 80% do total de

casos, são subclínicos e sua prevenção depende de um controle organizado e continuado dos vetores e educação pública.¹⁹

A malária é uma doença parasitária causada pelos protozoários do gênero *Plasmodium*, esses parasitas são transmitidos para o ser humano, obrigatoriamente, pela picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Aproximadamente, três bilhões de pessoas estão em risco de desenvolver malária ao redor do Mundo, com cerca de 300 a 500 milhões de casos e 1,5 milhões de mortes ocorrem todos os anos.^{4,20,21} No Brasil, a região amazônica concentra 99% dos casos de malária humana, com aproximadamente 178 mil casos notificados em 2013, acarretando 41 mortes.⁴ Nessa região, a principal espécie responsável pela transmissão de plasmódios aos seres humanos é o mosquito *Anopheles darlingi*.²² Fora da região amazônica, a transmissão de malária ocorre principalmente em regiões de Mata Atlântica, devido à alta presença de bromélias, as quais, suas axilas retêm água das chuvas que servem como criadouro para as formas imaturas da espécie de mosquitos *Anopheles cruzii*, vetor primário da malária nessas regiões.^{3,5,23,24} Devido ao panorama atual de doenças e a dificuldade de tratamento das mesmas, a melhor forma de combatê-las é controlando os mosquitos vetores.

O controle de mosquitos vetores de doenças é de grande interesse em países em desenvolvimento, como o Brasil, devido à falta de consciência por parte da população e órgãos públicos, por razões socioeconômicas como a falta de saneamento básico, por exemplo, e pelo desenvolvimento de resistência dos mosquitos aos inseticidas.^{25,26} O controle químico era a principal técnica utilizada no Brasil no passado, como por exemplo, o uso indiscriminado de DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) como forma primária de controle. Porém esse inseticida foi proibido por apresentar alta toxicidade até mesmo para os humanos.^{25,27,28}

Devido à alta flexibilidade genética de mosquitos vetores, as técnicas de controle baseadas em inseticidas tornaram-se ineficazes devido ao rápido aumento

de resistência aos inseticidas entre as populações de mosquitos alvos.²⁷ O aumento na movimentação de pessoas entre áreas endêmicas e não endêmicas de doenças e o financiamento limitado de infraestrutura para saúde pública em países em desenvolvimento contribuem para que ocorram surtos e epidemias.²⁹⁻³¹ Baseado nesses fatores, a Organização Mundial da Saúde tem adotado, desde a última década, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) para o controle de todos os vetores de doenças do Mundo.^{32,33} O MIP consiste, principalmente, em ordenamento ambiental, conscientização da população e controle biológico de vetores. A utilização de inseticidas químicos deve ser somente em casos de epidemia. Um dos objetivos do MIP é controlar a população de mosquitos vetores com eficácia e preservar o meio ambiente de contaminações.³⁴

O melhor conhecimento sobre a biologia e fisiologia dos mosquitos vetores irão inevitavelmente estimular novas abordagens para o controle de mosquitos.³⁵⁻³⁸ Como é o caso de algumas técnicas revolucionárias que não são baseadas no controle químico, mas que podem ser empregadas no controle de mosquitos vetores, como a Técnica do Inseto Estéril, ou *Sterile Insect Technique* (SIT), que consiste na liberação de insetos estéreis para redução de uma população alvo, baseando-se na criação em massa, esterilização de machos mediante radiação e posterior liberação em uma área alvo. O cruzamento de machos estéreis com fêmeas selvagens não resultará em prole viável e em consequência disso, a população diminuirá.³⁹⁻⁴¹ Outra técnica conhecida é a do mosquito geneticamente modificado, ou mosquito transgênico, que consiste em torná-lo resistente a patógenos, ou causar sua morte em um período específico de seu ciclo de vida.^{40,42-44} A infecção de mosquitos machos por bactérias do gênero *Wolbachia* é outra forma de controle que pode reduzir o tempo de vida do mosquito infectado ou em outros casos causar incompatibilidade citoplasmática, que leva à morte

embrionária precoce da prole de fêmeas selvagens que acasalam com machos infectados.⁴⁵

1. 2 Parques Urbanos

Os parques urbanos surgiram na Inglaterra, no final do século XVIII e no século seguinte começaram também a surgir em Paris e nos Estados Unidos. Os parques surgiram com a necessidade de lazer e recreação, além da criação de espaços que fugissem da estrutura urbana, com funções de “pulmões verdes” que representam locais com ar puro.⁴⁶

No Brasil, os parques urbanos surgiram no século XIX e diferentemente dos parques europeus e norte-americanos, não visavam atender a necessidade de toda população, mas sim para atender às necessidades das elites emergentes que controlavam o país e buscavam referências urbanas compatíveis aos modelos internacionais. A partir do final do século XVIII, os jardins botânicos brasileiros funcionavam como centros da flora tropical visando um intercâmbio de plantas úteis à economia portuguesa. Porém, ao decorrer do século XIX o interesse pela pesquisa diminuiu e esses centros foram transformados em parques urbanos, como por exemplo, o Jardim Botânico do Rio de Janeiro e o Jardim da Luz em São Paulo. Apesar de serem espaços públicos, esses parques eram pontos de encontro dos nobres e a maior parte da população não tinha acesso a esses espaços.^{47,48}

No começo do século XIX, na cidade de São Paulo havia aproximadamente 20 mil habitantes e apesar de na Europa a revolução industrial estar em seu auge, no Brasil pouco estava acontecendo em termos de transformações de paisagem urbana das cidades. Somente a partir do começo do século XX, um rápido crescimento da área urbana de São Paulo foi iniciado, porém não foi acompanhado por um plano de áreas verdes que atendessem a população.^{48,49}

O surgimento dos parques urbanos em São Paulo pode ser classificado em três movimentos. O primeiro, entre o final do século XIX e início do século XX, marcado pelo aumento da economia cafeeira e pela transformação do antigo comércio da cidade. Nesse momento, os parques europeus serviam de inspiração para criação de locais de cultura e ponto de encontro para a alta sociedade paulistana. Os parques surgidos nessa época foram o Jardim da Luz, Buenos Aires, Tenente Siqueira Campos (Trianon), sendo o Ibirapuera o último parque criado nessa perspectiva.^{48,50}

O segundo movimento, foi detectado quando a cidade já havia alterado significativamente seu espaço e se transformava numa metrópole, nesse momento os parques foram criados a partir de remanescentes de grandes fazendas, chácaras e propriedades da elite paulistana, como por exemplo, os parques do Carmo e Piquerí.⁵⁰ Por fim, o terceiro movimento, que vem desde 1970 até os dias atuais, traz a real necessidade de proporcionar a criação de novas áreas, principalmente, nas periferias da cidade que continua a crescer e possui altas taxas demográficas. Neste momento, é possível detectar a criação de parques pequenos em extensão, porém necessários para melhorar a qualidade de vida dos paulistanos. O poder público investe na criação dos Parques Lineares, que são locais para uso recreativo, produzem a valorização das terras do seu entorno, melhoram a qualidade de vida da população e evitam problemas com o escoamento da água em épocas de chuvas.^{46,48,50}

A cidade de São Paulo, atualmente, tem uma população estimada em 11,9 milhões de habitantes.⁵¹ Com elevada urbanização, muitas vezes de forma desordenada, a cidade sofre um grande estresse ambiental que influencia na domiciliação de insetos e os caracterizam como pragas que se adaptam ao ambiente modificado pelo homem, podendo causar incômodo e em alguns casos

transmitindo doenças à população.⁵²⁻⁵⁴ Trabalhos realizados na região metropolitana de São Paulo sugerem uma elevada abundância de mosquitos com importância epidemiológica em áreas periféricas^{52,55,56} e em parques urbanos da cidade.⁵⁷⁻⁵⁹

Em São Paulo há necessidade de manutenção das áreas verdes, destinadas a amenizar o clima urbano e servir como opção de lazer à população, essas áreas preservam resquícios da vegetação original, comportam bosques, lagos e jardins que servem de abrigo para aves e mamíferos silvestres. Essas áreas verdes são representadas pelos parques da cidade, e formam “ilhas verdes” incrustadas na malha urbana. Essas áreas possuem condições propícias para o desenvolvimento de certas espécies de mosquitos e em alguns casos, abrigar espécies exóticas e autóctones de mosquitos adaptadas ao ambiente urbano, no qual atingem elevada abundância, como exemplo, as espécies *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus*, *Ae. scapularis* e *Ae. fluviatilis*.⁵⁷

Devido às intervenções humanas nos ambientes naturais há mudanças nas atividades dos culicídeos, gerando um crescente risco de contato do homem com agentes patogênicos que provém desses meios.⁵³ As doenças causadas por Arbovírus estão entre os agravos que mais ameaçam a população em áreas urbanas, como ocorreu com a febre amarela e ocorre atualmente com a dengue.^{10,12,60} O Arbovírus Ilhéus, por exemplo, foi isolado no Parque Ecológico do Tietê, um ambiente que possui uma grande fauna de culicídeos e de animais vertebrados de várias regiões do Brasil, tornando esse ambiente propício para introdução e manutenção de arbovírus em uma área localizada dentro do ecossistema urbano de São Paulo.⁶¹

A cidade de São Paulo se encontra inserida na região da Mata Atlântica brasileira, um bioma caracterizado pela alta diversidade de espécies e alto grau de endemismo. A Mata Atlântica é considerada um dos 34 “hotspots” de biodiversidade

do planeta, regiões que por sua importância ecológica devem ser investigadas, esta região tem o ecossistema mais devastado e ameaçado do planeta.^{62,63}

Apesar dos muitos estudos com espécies exóticas de mosquitos de interesse epidemiológico adaptadas ao ambiente urbano, há poucos estudos biológicos e de infectividade com as espécies autóctones desses ambientes, provavelmente, por elas não serem implicadas na transmissão de patógenos ao homem. Devido à ação antrópica e à sua plasticidade genética, essas espécies continuam se adaptando progressivamente aos ambientes com alterações nos fatores microclimáticos e ecológicos, e existe a possibilidade de que suas populações, abrigadas nas áreas verdes remanescentes, passem a se comportar de maneira domiciliada, mudando seu potencial epidemiológico.⁶⁴⁻⁶⁶

1.3 Gênero *Aedes*

Dentro do gênero *Aedes* Meigen, 1818, estão dois subgêneros de maior importância epidemiológica do Brasil, são eles: *Stegomyia* e *Ochlerotatus*. Fazem parte do subgênero *Stegomyia* duas principais espécies, *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus*, transmissoras de dengue e outras arboviroses, como dengue hemorrágica, febre chikungunya e o vírus zika.^{7,13,14}

O subgênero *Ochlerotatus* é o que possui maior número de espécies no Brasil e em outros países neotropicais, as suas fêmeas, geralmente, são vorazes e costumam fazer repasto sanguíneo durante todo o dia e parte das espécies possuem ovos resistentes à dessecação, seus criadouros são geralmente no solo e algumas espécies são capazes de utilizar criadouros artificiais.^{2,3} Neste subgênero, a principal espécie transmissora de patógenos é o *Ae. scapularis*, ele pode transmitir o vírus da encefalite Rocio e já foi encontrado infectado por outras espécies de arbovírus.⁶⁷⁻⁶⁹ Outra espécie desse subgênero envolvida na transmissão de patógenos é o *Ae. taeniorhynchus*, que também foi encontrado

albergando diversos arbovírus que causam encefalites.² Além destas espécies citadas acima, pertence a este subgênero a espécie *Ae. fluviatilis*, um mosquito menos estudado, mas que tem se mostrado importante, pois tem sido encontrado em contato próximo com seres humanos vivendo em grandes centros urbanos com elevada abundância.⁵⁷

1.4 *Aedes fluviatilis*

O *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904)⁷⁰, possui distribuição neotropical, podendo ser encontrado nas Américas Central e do Sul.^{3,71} São mosquitos que vivem em locais silvestres, semissilvestres, suburbanos e urbanos. No ambiente silvestre, cria-se em coleções líquidas acumuladas em escavações de rochas e ocos de árvores, enquanto que no ambiente urbano seus criadouros estão associados à atividade humana, utilizando criadouros artificiais^{2,3}, suas formas imaturas são frequentemente encontradas associadas a outras espécies com relevância epidemiológica.² As fêmeas são altamente antropofílicas e foram observadas ingerindo sangue mesmo enquanto ocorria o desenvolvimento de seus ovos.⁷² Sua maior atividade é durante o dia, mas também fazem repasto sanguíneo à noite. Seus ovos não são resistentes à dessecação por muitos dias, podendo resistir por até 30 dias em condições laboratoriais.^{2,73,74}

Essa espécie não foi implicada na transmissão de doenças em condições naturais, porém é considerada como um vetor potencial do Vírus da Febre Amarela.⁷⁵ Em laboratório, infecta-se experimentalmente com *Plasmodium gallinaceum* e *Dirofilaria immitis*.⁷⁶⁻⁷⁸ Porém, todos os estudos de infectividade realizados com essa espécie são antigos e mais estudos são necessários. *Ae. fluviatilis* é naturalmente infectado com uma cepa da bactéria *Wolbachia* (wFlu), que nesse mosquito causa incompatibilidade citoplasmática incompleta e que não tem efeitos na infecção por *Plasmodium gallinaceum*.^{79,80}

1.5 Urbanização e culicídeos

O sucesso de algumas espécies de mosquitos em habitarem ambientes urbanos e o consequente aumento em sua abundância pode ser creditado a dois fatores: criadouros disponíveis e fontes para o repasto sanguíneo.⁸¹ Esses fatores em conjunto a outros aspectos ecológicos fazem de algumas espécies de mosquitos, como por exemplo, o *Ae. aegypti*, ótimos vetores de patógenos.³⁰ Entretanto, variações ambientais, como limitação de comida ou mudanças climáticas podem impactar e regular o tamanho de populações de mosquitos. Dois elementos são necessários para explicar a dinâmica de populações: 1) Variáveis exógenas (por exemplo: temperatura ou pluviosidade); 2) Variáveis endógenas (por exemplo: tamanho da população).⁸²

As variáveis exógenas possuem um papel principal na dinâmica populacional de mosquitos urbanos. As alterações nos ambientes feitos pelo homem podem expandir os habitats de espécies adaptadas a esse ambiente e com isso, aumentar sua abundância e diminuir a riqueza de espécies que não se adaptam ao ambiente urbano, causando um grande impacto na ecologia dos vetores e na transmissão de doenças causadas pelos patógenos transmitidos por mosquitos. Existe uma correlação significativa entre condições climáticas e o aumento na incidência de doenças infecciosas, demonstrada por vários estudos que correlacionam variáveis exógenas e sua influência na dinâmica populacional de mosquitos *Ae. aegypti* com epidemias de dengue e febre amarela.⁸³⁻⁸⁵ Em países em desenvolvimento, o processo de urbanização, geralmente, é conduzido sem planejamento, o que leva ao aumento de criadouros disponíveis para mosquitos vetores e consequentemente ao aumento de sua abundância, fato que pode elevar o risco de transmissão de doenças e causar epidemias.^{82,86,87}

1.6 Genética de Populações

Devido às mudanças nas políticas de saúde pública, demográficas, sociais, genéticas e a resistência aos inseticidas, mosquitos vetores de doenças infecciosas estão expandindo seu território radicalmente, acarretando introdução de espécies de mosquitos em novas áreas, muitas vezes causando epidemias. Entretanto, estratégias de prevenção podem reverter esta tendência, como o conhecimento da estrutura genética das populações dos mosquitos vetores com o intuito de se elaborar formas mais efetivas e específicas de controle.^{88,89}

Marcadores moleculares, como Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), Segundo Espaçador Transcrito Interno (ITS2), Citocromo B (mtCytB) e microssatélites são comumente utilizados em estudos filogenéticos e de genética de populações de vários grupos de insetos com importância epidemiológica.⁹⁰⁻⁹⁴

Esses marcadores são neutros e flanqueiam regiões conservadas do genoma amplificando regiões polimórficas. Portanto, acredita-se que não estão sujeitos a pressões seletivas, o que os torna úteis para classificação taxonômica e identificação de espécies crípticas, bem como a análise da estrutura populacional.^{95,96} Diversos estudos demonstraram a capacidade de marcadores moleculares como o COI e o ITS2 como ferramentas confiáveis para identificação de espécies de mosquitos.^{90,91,93,97}

Marcadores microssatélites podem ser utilizados para analisar a estrutura genética de populações de mosquitos, elucidando a distribuição de doenças transmitidas por vetores e auxiliando na elaboração de intervenções epidemiológicas.⁹⁸ Microssatélites ou Repetições de sequência simples são regiões compostas por 1 a 6 pares de bases repetidos em tandem, encontradas em todos os organismos procariontes e eucariontes. Estão presentes tanto em regiões

codificantes ou não codificantes de DNA e são caracterizados por alto grau de polimorfismo. Por conta de sua alta variabilidade, torna-se um ótimo marcador molecular. Por esse motivo, marcadores microssatélites têm provado ser uma ferramenta valiosa para estudos de genética de populações de diversos organismos.^{94,99–102}

Microssatélites são marcadores considerados instáveis e existem dois modelos para explicar sua formação: o deslizamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA, que envolve a dissociação transitória das cadeias de DNA em replicação, seguido por reassociação desalinhada; e a recombinação desigual, que ocorre durante a divisão meiótica e é causada pelo mau alinhamento entre os cromossomos homólogos.¹⁰³ Esses marcadores são muito utilizados para observar a distância genética entre populações em escala geográfica e evolucionária.⁹⁹ Os microssatélites possuem, em particular, alta taxa de mutação se comparado com o resto do genoma, podendo variar de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por *locus* por geração.¹⁰⁴

Em uma população existem inúmeros indivíduos, cada um com uma variedade de alelos distribuídos por seu genoma. Esta diversidade se deve a quantidade de variação desses alelos em um único indivíduo ou na população inteira. A variedade de alelos pode ser utilizada como parâmetro de diferenciação para mensurar aspectos filogenéticos e estruturais em uma população. Sua distribuição baseada em diferenças intra-populacionais ou em diferentes populações pode ser mensurada com a utilização da estatística criada por Wright¹⁰⁵, das quais fazem parte: (a) índice de heterogeneidade genética (F_{st}) $F_{st} > 0.25$ indica grande variação genética; $0.25 > F_{st} > 0.15$ indica diferenciação genética moderada; $0.15 > F_{st} > 0.05$ indica baixa diferenciação genética; $F_{st} < 0.05$ indica variação genética desprezível; (b) coeficiente de endogamia (F_{is}), que pode ser

representado pelos seguintes valores de 0 a 1, sendo 0=ausência de endogamia e 1=elevada endogamia.^{92,106,107}

Outros modelos importantes para estudos de genética de população são o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o de Cavalli-Sforza e Edwards. O princípio do modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg assume que em uma população panmítica, em crescimento constante, as frequências alélicas e genotípicas devem ser constantes de uma geração para outra, na ausência de migração, mutação e seleção natural.¹⁰⁸ O modelo de Cavalli-Sforza e Edwards assume que as diferenças genéticas entre populações surgem devido à deriva genética aleatória.¹⁰⁹

Os marcadores microssatélites auxiliam a análise da estrutura genética de populações, porém para serem utilizados esses marcadores precisam possuir as seguintes características: 1) Herdados de forma Mendeliana codominante, 2) Serem polimórficos, 3) Não sofrerem pressões seletivas, 4) Associados aleatoriamente, 5) Sem a presença de alelos nulos e 6) Aplicáveis em amplas regiões.⁹⁸ Os dados gerados pela análise de microssatélites possuem um grande poder de detecção e descrição de diferenças genéticas entre populações.¹¹⁰

Embora sejam extensamente utilizados, marcadores microssatélites também apresentam algumas limitações em consequência da presença de alelos nulos, que ocorrem quando mutações na região flangeadora não permitem que o *primer* se anele e amplifique. A presença dos alelos nulos pode acarretar em incorreta suposição de baixa diversidade genética e superestimação dos valores de F_{st} .¹¹¹ Apesar de cuidado ser recomendado ao se utilizar *primers* suscetíveis a alelos nulos, eles ainda podem ser incluídos na análise, desde que, seu viés não interfira significativamente nos resultados.^{112,113}

Esse marcador molecular tem sido extensamente utilizado em vários gêneros do reino animal, como por exemplo: répteis¹¹⁴, aves¹¹⁵, peixes¹¹⁶, mamíferos^{117,118} e humanos.¹¹⁹ Também são utilizados em culicídeos, principalmente nos três grandes gêneros de importância epidemiológica: *Aedes*, *Culex* e *Anophele*.^{94,113,120–123}

O complexo de espécies *Culex pipiens* foi analisado utilizando marcadores microssatélites em populações da América do Norte e Europa, mostrando diferenças epidemiológicas e genéticas.¹²⁴ Kothera et al.¹²³ analisou populações do Complexo *Culex pipiens* do Colorado, nos EUA e observou diferenciação genética significativa e certa quantidade de fluxo gênico entre todas as populações.

Diversos estudos de estruturação populacional foram realizados com a espécie *Ae. aegypti*, como o de Ayres et al.¹²⁵, no qual, foi possível observar diferenças significativas entre populações provenientes de algumas regiões do Brasil. O estudo de Olanratmanee et al.¹²⁶, realizado em vilas na Tailândia com aproximadamente 10 km de distância, demonstrou diferença entre populações de *Ae. aegypti*, e entre populações da espécie *Ae. albopictus* da África Central, Kamgang et al.¹²⁷, encontrou diferença populacional moderada e estaticamente significante.

A cidade de São Paulo tem sofrido um elevado processo de urbanização, tornando as áreas verdes do município cada vez mais escassas, quadro que leva a uma sinantropia de várias espécies de insetos, que se tornam pragas urbanas. Trabalhos recentes realizados em parques municipais de São Paulo sugerem que os mosquitos vetores de doenças pertencentes à família culicidae são abundantes e muito bem adaptados a essas áreas verdes inseridas no ambiente urbano. O mosquito *Ae. fluviatilis* foi coletado em grande número em diversos parques

localizados em ambientes antropizados da cidade de São Paulo, indicando que essa espécie é altamente antropofílica e bem adaptada ao ambiente urbano. Essa espécie não foi implicada na transmissão de doenças, porém em laboratório possui competência e capacidade vetorial para agentes etiológicos de importância epidemiológica e os estudos de infectividade realizados com ela são antigos e pouco informativos. Levando-se em consideração o pouco conhecimento sobre a biologia, ecologia e sobre as características genéticas de *Ae. fluviatilis*, obter melhor compreensão do processo de adaptação e seleção deste culicídeo torna-se importante para compreender seu potencial epidemiológico. Desse modo, neste estudo foram utilizados oito *loci* microssatélites, conhecidos por serem marcadores polimórficos e amplamente utilizados em estudos microevolutivos para elucidar a estrutura genética das populações de *Ae. fluviatilis* do município de São Paulo.

OBJETIVOS

Geral

Análise genética da estrutura populacional de mosquitos *Aedes fluviatilis* provenientes de nove parques localizados no município de São Paulo.

Específicos

Testar parâmetros de funcionalidade de marcadores microssatélites em *Ae. fluviatilis*, previamente utilizados com sucesso em outras espécies de culicídeos.

Avaliar a variabilidade genética e o fluxo gênico entre populações do mosquito *Aedes fluviatilis*, no município de São Paulo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Populações de *Aedes fluviatilis* e área de estudo

As populações de *Aedes fluviatilis* que foram utilizadas para realização deste trabalho são provenientes de nove dos dez parques estudados durante o projeto de pesquisa: “*Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques municipais da cidade de São Paulo*” (Programa BIOTA FAPESP 2010/51230-8). As coletas foram realizadas de março de 2011 a fevereiro de 2012 nos parques: Alfredo Volpi, Carmo, Ibirapuera, Santo Dias, Chico Mendes e Shangrilá, e de agosto de 2012 a julho de 2013 nos parques: Burle Marx, Piqueri e Previdência (Figura 1). Foram utilizadas 30 fêmeas de *Ae. fluviatilis* de cada um dos nove parques onde foi encontrada esta espécie (Tabela 1). Os parques selecionados para o estudo estão descritos abaixo:

2.1.1 Burle Marx

Os jardins deste parque foram criados por Burle Marx para compor uma casa projetada por Oscar Niemeyer na década de 1950. Em 1990, a casa foi demolida e em 1994 o Estado de São Paulo tombou a Chácara Tangará, duas manchas de mata atlântica e os jardins para dar vida ao parque. Com uma área de aproximadamente 138.279m², esse parque conta com uma fauna de 92 espécies, entre aves, mamíferos e répteis. Sua flora é composta por remanescente de Mata Atlântica e de reflorestamento de eucaliptos, com áreas ajardinadas onde se destacam palmeiras, andá-açu, marinheiro, pau brasil, abacates e palmeiras imperiais.⁴⁹

2.1.2 Ibirapuera

Esse parque foi inaugurado em 21 de agosto de 1954, durante comemorações do IV Centenário da cidade de São Paulo. Este é um dos parques mais procurados pela população paulistana como área de lazer e é uma das mais importantes áreas verdes da cidade. Possui uma extensão de 1.584.000m², sua

fauna é composta por 163 espécies de animais entre aranhas, peixes, anfíbios, cágados, gambás, morcegos e 142 espécies de aves, incluindo aves migratórias. Sua vegetação foi implantada e é constituída de eucaliptal com sub-bosque, jardins, bosques heterogêneos e gramados. Em um trecho do Córrego do Sapateiro há vegetação ribeirinha espontânea protegida com cerca.⁴⁹

2.1.3 Piquerí

A história deste parque está ligada ao Rio Tietê, as águas do rio adentravam a área original da Chácara do Piquerí, antes de seu alinhamento por volta de 1950. O nome do parque faz menção ao nome da tribo indígena que habitava perto de sua área. O parque Piquerí possui 97.200m², sua fauna é composta por 82 espécies, com quatro naturais de mata atlântica: o periquito-rico, o pica-pau-anão-de-coleira, arredio-pálido e a saíra-da-mata, além de aves rapinantes e aves aquáticas. A flora é composta por eucaliptal, alameda de sibipirunas, bosques heterogêneos com árvores nativas e exóticas.⁴⁹

2.1.4 Previdência

No local onde hoje se encontra o parque funcionava um reservatório de água que abastecia o bairro da Previdência até 1968. Partes da estrutura antiga foram adaptadas e hoje funcionam como centros culturais para a população. Possui uma área de 91.500m² e sua fauna possui 63 espécies de animais, destas 58 espécies são de aves nativas e não nativas de mata atlântica. Sua flora é composta por remanescentes de mata atlântica, uma área com reflorestamento heterogêneo e área ajardinada.⁴⁹

2.1.5 Santo Dias

A área de 134.000m² do parque é originária da antiga fazenda do Instituto Adventista e seu nome é uma homenagem a um morador do Capão Redondo, morto em 1979. Sua fauna é composta por 80 espécies relatadas, destas 70 são de aves rapinantes, nativas e não nativas de mata atlântica. Sua flora é composta por

remanescente de mata atlântica com destaque para a palmeira *Lytocaryum hoehnei*.⁴⁹

2.1.6 Shangrilá

O parque Shangrilá fica dentro da Área de Proteção Ambiental Bororé-Colônia e faz parte de um conjunto de parques que estão sendo implantados para proteger a represa Guarapiranga. Sua área é de 75.643,00m², a fauna é composta por 66 espécies registradas e dentre elas estão o lagarto teiú, o gamba-de-orelha-preta e 64 espécies de aves. A flora contempla áreas de mata em regeneração, com plantio de árvores pioneiras e eucaliptal.⁴⁹

2.1.7 Alfredo Volpi

Esse parque possui o projeto paisagístico elaborado por três grandes arquitetos e seu nome é uma homenagem a um dos mais conceituados pintores brasileiros. Com uma área de 142.400m², esse parque possui uma fauna diversa, são 86 espécies de animais, sendo 76 aves, duas espécies de crustáceos de água doce, além de anfíbios, lagartos e mamíferos. Sua flora é composta por remanescentes de mata atlântica.⁴⁹

2.1.8 Chico Mendes

A área do parque pertencia à Chácara Figueira Grande, em São Miguel Paulista. Essa região é carente e isso se deve à derrubada de matas e capoeiras para fornecimento de lenha e carvão, matéria-prima utilizada na urbanização da região na década de 1930. Seu nome é uma homenagem à Francisco Mendes Filho, seringueiro, sindicalista e ecologista. Com uma área de 61.600m², esse parque possui uma fauna composta por alguns espécimes de aves silvestres ameaçados pela expansão urbana, outras aves e mamíferos. Sua flora é composta por áreas ajardinadas, pomar, eucaliptal e remanescente de Mata Atlântica.⁴⁹

2.1.9 Parque do Carmo

A área de 1.500.000m² do parque pertencia à fazenda de Oscar Americano de Caldas Filho. O casarão da fazenda foi mantido como parte das edificações do parque. Esse é um dos parques com maior diversidade de fauna composta por 134 espécies, sendo 117 de aves. Sua flora é composta por remanescentes de Mata Atlântica, com mata ciliar, campos antrópicos, brejos e gramados.⁴⁹

Tabela 1 - Populações, coordenadas dos parques, número total de mosquitos e de *Ae. fluviatilis* coletados, e número de fêmeas de *Ae. fluviatilis* utilizadas no estudo.

População	Coordenadas	Total de mosquitos coletados	Total de <i>Ae. fluviatilis</i> coletados	Nº fêmeas utilizados no estudo
Burle Marx	23°37'54"S 46°43'16"O	4.424	1.264	30
Ibirapuera	23°35'14"S 46°39'27"O	2.582	247	30
Piquerí	23°31'40"S 46°34'14"O	9.083	1.104	30
Previdência	23°34'49"S 46°43'33"O	2.123	157	30
Santo Dias	23°39'50"S 46°46'23"O	2.235	231	30
Shangrilá	23°45'41"S 46°40'06"O	6.615	1.006	30
Alfredo Volpi	23°35'16"S 46°42'09"O	1.205	151	30
Chico Mendes	23°30'24"S 46°25'44"O	4.487	151	30
Carmo	23°35'04"S 46°27'47"O	1.092	76	30

Figura 1 - Parques públicos e áreas de proteção situadas na cidade de São Paulo indicando a localização dos nove parques utilizados no estudo.

2.2 Métodos de Coletas

Foram realizadas coletas mensais em cada parque, durante o período de um ano. As formas adultas foram coletadas no interior dos parques, mediante uso de aspirador a bateria 12 Volts¹²⁸, armadilhas automáticas CDC e armadilhas de Shannon.^{129,130} As aspirações foram realizadas em três áreas fixas de cada parque, compreendendo 20 minutos cada. As armadilhas CDC, acrescidas de gelo seco como isca, foram instaladas em dois pontos de cada parque, sendo em área aberta e dentro da mata. Em cada ponto foram colocadas duas armadilhas, sendo uma a cerca de um metro do solo e outra a 5 metros ou mais de altura. Essas armadilhas foram acionadas uma hora antes do crepúsculo vespertino e mantidas por três

horas. Simultaneamente à operação das armadilhas CDC, instalou-se, no interior da mata, uma armadilha de Shannon, com luz de lâmpião a gás e com no mínimo dois coletores. Os operadores, munidos de aspiradores elétricos manuais (6V) ou tubos contendo clorofórmio, efetuaram coletas nas superfícies da armadilha durante duas horas após o crepúsculo vespertino.

2.3 Identificação dos espécimes

A identificação morfológica dos espécimes foi realizada no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (LESP/FSP/USP) e foi baseada em chaves taxonômicas de literatura especializada, tais como Lane¹³¹, Forattini³ e Consoli & Lourenço-de-Oliveira.²

2.4 Extração de DNA e Reações de PCR

A extração do DNA genômico dos espécimes de todas as populações foi realizada utilizando o Kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. A reação de amplificação dos fragmentos foi preparada a partir do DNA extraído de cada mosquito, com volume final de 25µL utilizando-se 1,0µL de DNA da amostra, 12,5µL de PCR MasterMix (Thermo Scientific), 1,0µL (1,0 nM) de *forward primer*, 1,0µL (1,0 nM) de *reverse primer* e 9,5µL de água ultrapura, em todas as reações foram adicionados controle negativo (sem adição de DNA). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf (Mastercycler Nexus Gradient), seguindo os protocolos de temperatura estabelecidos nas publicações de cada *primer*^{100,132–136}. Os *primers* que não apresentaram amplificação dos fragmentos como esperado, foram submetidos a um PCR gradiente com a temperatura de anelamento variando de 48°C até 60°C. Após a amplificação dos fragmentos, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz Ultra Violeta e fotografadas com câmera digital (Figura 2). Os

fragmentos amplificados de forma consistente em todas as populações selecionadas foram adquiridos com marcação na extremidade 5' com fluorescências adequadas para o sequenciador ABI 3730 (6-Fam, Hex e Ned).

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1%, no qual é possível observar os fragmentos amplificados referentes ao *primer* Albtri33 com aproximadamente 150 pares de bases, para as populações: Burle Marx (1), Ibirapuera (2), Piquerí(3), Previdência (4), Santo Dias (5), Shangrilá (6), Alfredo Volpi (7), Chico Mendes (8), Carmo (9) e controle negativo sem adição de DNA (C-). PM=Peso Molecular de 100 pb (Invitrogen).

2.5 Sequenciamento ABI

Após a amplificação dos fragmentos marcados com fluorescência, foram realizadas diluições dos produtos de PCR (1:7), adicionando 3µL de cada um dos produtos amplificados com fluorescência distintas em 21 µL de água ultrapura para um volume final de 30µL. Uma nova diluição foi realizada, 2µL da primeira diluição foram ressuspensos em 8,925µL de Formamida HI-DI (Applied Biosystems) e 0,075µL do marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) para um volume final de 11µL. As amostras foram então encaminhadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo onde foi

realizada a análise dos fragmentos por eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3730.

2.6 Análise dos Fragmentos Obtidos e Análise Estatística

A análise do tamanho dos fragmentos amplificados foi realizada utilizando o programa GeneMarker (v1.85). O software online Genepop (v4.2 <http://genepop.curtin.edu.au/>) e o programa Arlequin (v3.5) foram utilizados para calcular o número de alelos por *locus*, Índice de Heterogeneidade genética (F_{st}), Coeficiente de endogamia (F_{is}), Equilíbrio de Hardy-Weinberg, Heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e), os valores de P foram submetidos à correção de Bonferroni. O software online Genepop (v4.2 <http://genepop.curtin.edu.au/>) foi utilizado para calcular o Desequilíbrio de Ligação (LD) entre os *loci* e o fluxo gênico entre as populações. A probabilidade de ocorrência de Alelos Nulos em cada *locus* dentro de cada população foi calculada utilizando o programa FreeNa¹¹², o mesmo programa também foi utilizado para estimar os índices de F_{st} e Cavalli-Sforza e Edwards, considerando a presença dos alelos nulos. O programa Structure (v2.3.3) foi utilizado para a análise Bayesiana de *cluster multi-locus* e o número estimado de clusters k (ΔK) foi calculado com o programa Structure Harvester (Web v0.6.94).

O programa Past (v2.17c) foi utilizado para a construção da árvore de Neighbour-Joining, com 10.000 iterações de bootstrap, baseada no índice de distância genética Cavalli-Sforza e Edwards, para a construção dos gráficos de Correlações Lineares entre distância genética e distância geográfica (Km) e para a construção dos gráficos de Correlação Linear entre distância genética e variáveis ambientais (elevação, relevo, forma do fragmento, vegetação por habitante (m²), pluviosidade, temperatura média anual, área (Km²)), os dados foram normalizados

para diminuir a variância e o viés de escala na realização da análise. As correlações entre distância genética e variáveis ambientais foram conduzidas entre cada uma delas separadamente.

A fim de observar se as populações de *Ae. fluviatilis* passaram por processos de deriva genética, a análise que investiga os *loci* que exibem déficit ou excesso de heterozigosidade, foi realizada através do programa Bottleneck (v1.2.2), essas análises comparam duas expectativas de heterozigosidade esperada (H_e) baseada nas frequências alélicas e heterozigosidade esperada (H_{eq}) pelo número de alelos observados. Portanto, $H_e > H_{eq}$, indica um recente efeito de gargalo de garrafa (*Bottleneck*) nas populações analisadas e $H_e < H_{eq}$, indica que as populações analisadas sofreram uma expansão demográfica e consequente aumento no número de indivíduos.^{137,138}

3 RESULTADOS

Foram testados 40 pares de *primers* que amplificam microssatélites em espécimes de *Ae. fluviatilis* (Tabela 2), todos funcionais e descritos para as espécies *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Ae. caspius*. Destes, os *primers* OchcB5, OchcB9, OchcD11, AEDC, Albtri-3, Albtri-20 Albtri-33 e Albtri-44 foram funcionais e amplificaram de forma consistente em todas as nove populações de *Ae. fluviatilis* (Tabela 3). Os resultados da transferência de *primers* de microssatélites desenvolvidos para as espécies *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Ae. caspius* para a espécie *Ae. fluviatilis*, estão apresentados no artigo anexado no final dessa dissertação.¹³⁹

Os testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram feitos para todos os oito *loci* microssatélites (Tabela 4). Os valores de H_o foram maiores do que H_e em 37 dos 64 testes conduzidos, o valor médio do F_{is} foi de 0,142. Após 150 testes possíveis, desequilíbrios de ligação significantes foram encontrados nas populações Burle Marx entre os *loci* OchcB9 e Albtri20, Piquerí entre os *loci* OchcB9 e Albtri33, Previdência entre os *loci* OchcD11 e Albtri3, Shangrilá entre os *loci* Albtri33 e Albtri20 e Chico Mendes nos *loci* OchcD11 e Albtri20, porém nenhuma dessas ligações foram consideradas significantes, pois só apareceram uma vez nas populações citadas. Nas populações Ibirapuera, Santo Dias, Alfredo Volpi e Carmo não foram encontrados *loci* em desequilíbrio de ligação.

Tabela 2 - Loci microssatélites testados em *Aedes fluviatilis*, motivos de repetição e referência bibliográfica.

Locus	Sequências 5'-3'	Motivo de Repetição	Referência
38/38	F: CGG TGG ACG AAT CAT R: GAT GCC GCC TAG TCC AAT	GCT	Huber et al. ¹³²
C2A8	F: CGG AAG GAA TCC ATC CAA C R: GGT GTG GAC AAC TGG AGC	GCC	Huber et al. ¹³²
T3A7	F: CGA CAG ATG GTT ACG GAC GG R: GTC CCG CTC CAA AAA TGC CC	TTTA	Huber et al. ¹³²
AED19	F: GTA TGA CAA CTC TGG AAT GG R: TTATGGAAGTGGTAAGCCCAGC	GGAC	Huber et al. ¹³²
34/72	F: CGT AGT GAT TCT GTG ATA R: TGG CAT CAG ATT CAG TAA	GAAA	Huber et al. ¹³²
A10	F: AATCGTGACGCGTCTTTTG R: TAACTGCATCGAGGGAAACC	CT	Chambers et al. ¹⁰⁰
B07	F: CAAACAACGAACTGCTCACG R: TCGCAATTTCAACAGGTAGG	GA	Chambers et al. ¹⁰⁰
B19	F: ATTGGCGTGAGAACATTTTG R: GAGGAGTGAGCAGATAGGAGTG	CAT	Chambers et al. ¹⁰⁰
G11	F: TGTCTCATGGATTGCCTTATT R: GTCAGAACTTTTGGGGACCA	TTA	Chambers et al. ¹⁰⁰
OchcA2	F: ATC TAT TCC GTG CTG CTG CT R: GCA AAC TAC CAC TCC GGA AC	GT	Porretta et al. ¹³³
OchcB3	F: GCA CCC TGC ATA AGC CAT R: GTG GGT CGC AAC TCA TAG GT	TC	Porretta et al. ¹³³
OchcB7	F: AATGGCGATGGTAATGGATG R: TTGCAGTTTTGGGAG AAACC	AC	Porretta et al. ¹³³
OchcB10	F: GTGGTCAATTCTGCGGTT TT R: ATGGCGAGGGAAATTGATAA	TG	Porretta et al. ¹³³
OchcB4	F: TCCGCTGAAGAGTTTTCCAT R: GACATTCGAGAAACC TCCGA	GTCA	Porretta et al. ¹³³

Continua

Tabela 2 – Loci microssatélites testados em *Aedes fluviatilis*, motivos de repetição e referência bibliográfica (Continuação).

<i>Locus</i>	Sequências 5'-3'	Motivo de Repetição	Referência
OchcA4	F: TCCGCTGAAGAGTTTTCCAT R: CCTGAGGGCCGAGTGTC	CA	Porretta et al. ¹³³
OchcB5	F: GCTTCGAATCTTGATGAGCA R: TGGATGCAGAGTGTT TTGGA	CAC	Porretta et al. ¹³³
OchcB9	F: CCAAAACACTCTGCATCCAA R: GGACTGGCCGAATACAGAGA	CTA	Porretta et al. ¹³³
OchcD11	F: TTCGACTCAGTTCGACGAGA R: GGTCAATTCGGTTGAGTGTT	GTTG	Porretta et al. ¹³³
Alb-di-4	F: TGGCGACCTATTATACCCGC R: CAACTCGTTCCTTGACCGTG	TGG	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-di-6	F: TCTTCATCTACGCTGTGCTC R: GACGCCAATCCGACAAAGTC	TCT	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-3	F: AGATGTGTCGCAATGCTTCC R: GATTCGGTGATGTTGAGGCC	AGA	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-6	F: AGCACGAGTACAGAATGTGC R: TGGCCTCCTACCGTTTATCTG	AGC	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-18	F: ACACAATTGCCGTTGAGCTC R: CGTCTAATAGCTCCGGTCCC	ACA	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-20	F: GTGCCGTTGATCATCCTGTC R: TCCAGCACCGTGAGTAATCC	GTG	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-21	F: AGGGCTTCAATGGGTCTCTC R: TGGTTATTAATACGGCGAGGC	AGGG	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-25	F: CCAACCAACAACCCAGGAAC R: TACGATGCGCAACCATCATC	CCAA	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-33	F: GGCTGCTGTTGTTGGTACG R: CACGTTCAATCACCGTTCC	GGC	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-41	F: GATCGATTTGGGAGCTTCTG R: GAACCTCTTCTCGCTTGGCT	GAT	Beebe et al. ¹³⁵

Continua

Tabela 2 - Loci microssatélites testados em *Aedes fluviatilis*, motivos de repetição e referência bibliográfica (Conclusão).

<i>Locus</i>	Sequências 5'-3'	Motivo de Repetição	Referência
Alb-tri-44	F: CACTCGCGCGTGTTCCTTC R: GACGCACCATCAGCATCATC	CAC	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-45	F: TTTCAGCTCGGTGTTATGGC R: TGATGTTGATGATGATGACTACGA	TTT	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-46	F: TTCACAACATACGGAATCGC R: GGTCCGGTGTAATAGCCTCC	TTC	Beebe et al. ¹³⁵
AealbB52	F: GGGTCTAGAAGTAATAGCGATG R: GCATTCTTTGCTTCTGTTTGC	AC	Porretta et al. ¹³⁴
AealbB51	F: CCACGTGGTATAACTCTGA R: GTAGTTGTCCAATTAACATCG	AC	Porretta et al. ¹³⁴
AealbA9	F: TGGGACAAGAGCTGAAGGAT R: CTCGTTCTCTACTCTCTCCGTT	AC	Porretta et al. ¹³⁴
AealbB6	F: ATGAGGTGACCCTTTTGTGC R: AAATTTTATAGGGCCCTCGG	AC	Porretta et al. ¹³⁴
AealbD2	F: GAATCCCACACAGCGTCTTT R: GGTGCTTGACACCTTGAAT	AAC	Porretta et al. ¹³⁴
AealbF3	F: CTCGTGAGTACGTTCCGTGA R: AGGGAAACAAGGACTTCATCA	ACGC	Porretta et al. ¹³⁴
AEDC	F: TGCAGGCCCAGATGCACAGCC R: TCCGCTGCCGTTGGCGTGAAC	GTA	Chambers et al. ¹⁰⁰
alb212	F: GGAGTGTCTCTCACCATC R: GACGAACTGAGCAAATGTCT	AC	Delatte et al. ¹³⁶
alb222	F: GACGAGAACGGTGAACAG R: GTCGAAGGTACAAATAGATCG	GT	Delatte et al. ¹³⁶

Tabela 3 - *Loci* microsatélites amplificados em *Ae. fluviatilis*, espécies, temperatura de anelamento e tamanho de seus alelos.

<i>Locus</i>	Espécie	T (°C)	Tamanho do alelo	Referência
OchcB5	<i>Ae. caspius</i>	52* (55)	194-196* (155-157)	Porretta et al. ¹³³
OchcB9	<i>Ae. caspius</i>	55	90-288* (272-282)	Porretta et al. ¹³³
OchcD11	<i>Ae. caspius</i>	55	88-132* (135-148)	Porretta et al. ¹³³
Alb-tri-3	<i>Ae. albopictus</i>	56	93-453* (123-153)	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-20	<i>Ae. albopictus</i>	56	105-120* (165-201)	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-33	<i>Ae. albopictus</i>	56	102-219* (137-182)	Beebe et al. ¹³⁵
Alb-tri-44	<i>Ae. albopictus</i>	56	165-180* (173-212)	Beebe et al. ¹³⁵
AEDC	<i>Ae. aegypti</i>	60	246-477* (210-230)	Chambers et al. ¹⁰⁰

*Valores encontrados em *Ae. fluviatilis*. Entre parênteses, valores dos manuscritos originais.

Os testes de probabilidade para a presença de alelos nulos realizado no programa FreeNA sugerem que o *locus* OchcB5 possui alta probabilidade (12,35% - 28,38%) de ter alelos nulos nas populações Ibirapuera, Piquerí, Santo Dias e Alfredo Volpi, nas outras populações a probabilidade de ocorrência de alelos nulos é de 0,1%. O *locus* OchcB9 possui alta probabilidade de ter alelos nulos nas populações Burle Marx (18,59%) e Chico Mendes (12,62%), nas outras populações a probabilidade de ocorrência de alelos nulos é menor que 7%. O *locus* Albtri3 possui alta probabilidade (9,09% - 19,23%) de ocorrência de alelos nulos nas populações Burle Marx, Previdência, Alfredo Volpi, Chico Mendes e Carmo, nas outras populações a probabilidade é menor que 7,71% e nas populações Piquerí e Shangrilá não há ocorrência de alelos nulos. O *locus* Albtri33 possui alta probabilidade de ocorrência de alelos nulos apenas na população Ibirapuera (16,01%) e probabilidade mais baixa (6,78%) na população Previdência, nas outras

populações a probabilidade de alelos nulos é menor que 0,1%. O *locus* Albtri44 possui probabilidade de ocorrência de alelos nulos apenas nas populações Alfredo Volpi (2,1%), Chico Mendes (3,71%) e Carmo (7,36%). Os *loci* OchcD11, Albtri20 e AEDC possuem baixa (0,1%), ou nenhuma probabilidade de ocorrência de alelos nulos (Tabela 5).

Tabela 4 - Heterozigosidade Observada (H_o), Heterozigosidade Esperada (H_e), Coeficiente de Endogamia (F_{is}) e desvios de Hardy-Weinberg observados para cada população nos oito *loci* testados. Em negrito, valores de P estatisticamente significantes, após correção de Bonferroni.

População	Locus	N. de alelos	Heterozigosidade Observada	Heterozigosidade Esperada	F_{is}	P
Burle Marx	OchcB5	1	/	/	/	/
	OchcB9	5	0.233	0.481	0.5201	0.00723
	OchcD11	3	0.933	0.521	-0.8145	<0.00001
	Albtri3	13	0.586	0.860	0.3224	<0.00001
	Albtri33	1	/	/	/	/
	Albtri20	5	0.100	0.129	0.2335	0.04396
	AEDC	2	0.933	0.506	-0.8710	<0.00001
	Albtri44	5	0.966	0.662	-0.4716	<0.00001
Ibirapuera	OchcB5	2	0	0.363	1	<0.00001
	OchcB9	3	0.333	0.371	0.1036	0.68683
	OchcD11	4	0.966	0.571	-0.7128	<0.00001
	Albtri3	7	0.793	0.799	0.0085	<0.00001
	Albtri33	3	0.033	0.157	0.7914	0.00168
	Albtri20	1	/	/	/	/
	AEDC	2	1	0.508	-1	<0.00001
	Albtri44	6	0.966	0.624	-0.5617	<0.00001
Piquerí	OchcB5	3	0	0.235	1	<0.00001
	OchcB9	3	0.333	0.371	0.1036	0.68970
	OchcD11	4	0.933	0.597	-0.5767	<0.00001
	Albtri3	11	0.923	0.766	-0.2097	0.06812
	Albtri33	3	0.100	0.097	-0.0235	1
	Albtri20	2	0.035	0.035	/	1
	AEDC	2	1	0.524	-0.9355	<0.00001
	Albtri44	6	1	0.670	-0.5052	<0.00001
Previdência	OchcB5	1	/	/	/	/
	OchcB9	2	0.300	0.304	0.0151	1
	OchcD11	3	0.866	0.569	-0.5356	<0.00001
	Albtri3	10	0.689	0.827	0.1691	<0.00001
	Albtri33	2	0.133	0.183	0.2750	0.23455
	Albtri20	3	0.066	0.066	-0.0087	1
	AEDC	3	1	0.508	-1	<0.00001
	Albtri44	7	0.966	0.726	-0.3381	<0.00001

Continua

Tabela 4 - Heterozigosidade Observada (H_o), Heterozigosidade Esperada (H_e), Coeficiente de Endogamia (F_{is}) e desvios de Hardy-Weinberg observados para cada população nos oito *loci* testados. Em negrito, valores de P estatisticamente significantes, após correção de Bonferroni (Continuação).

População	Locus	N. de alelos	Heterozigosidade Observada	Heterozigosidade Esperada	F_{is}	P
Santo Dias	OchcB5	2	0	0.065	1	0.01376
	OchcB9	2	0.233	0.304	0.2368	0.23673
	OchcD11	3	0.966	0.575	-0.6990	<0.00001
	Albtri3	11	0.700	0.837	0.1663	<0.00001
	Albtri33	2	0.433	0.345	-0.2609	0.29782
	Albtri20	6	0.266	0.299	0.1111	<0.00001
	AEDC	2	1	0.508	-1	<0.00001
	Albtri44	11	0.966	0.768	-0.2628	<0.00001
Shangrilá	OchcB5	1	/	/	/	/
	OchcB9	2	0.366	0.462	0.2104	0.41099
	OchcD11	4	0.933	0.620	-0.5178	<0.00001
	Albtri3	13	0.931	0.850	-0.0964	0.00624
	Albtri33	2	0.366	0.304	-0.2083	0.54535
	Albtri20	3	0.166	0.157	-0.0584	1
	AEDC	2	0.966	0.507	-0.9333	<0.00001
	Albtri44	5	1	0.707	-0.4227	<0.00001
Alfredo Volpi	OchcB5	2	0	0.067	1	0.01921
	OchcB9	3	0.344	0.346	0.0036	0.01663
	OchcD11	3	0.896	0.539	-0.6813	<0.00001
	Albtri3	15	0.551	0.860	0.3632	<0.00001
	Albtri33	1	/	/	/	/
	Albtri20	3	0.103	0.101	-0.0244	1
	AEDC	2	0.892	0.503	-0.8000	<0.00001
	Albtri44	5	0.730	0.608	-0.2056	0.02287
Chico Mendes	OchcB5	1	/	/	/	/
	OchcB9	2	0.166	0.304	0.4569	0.03644
	OchcD11	3	0.900	0.592	-0.5323	<0.00001
	Albtri3	15	0.500	0.867	0.4276	<0.00001
	Albtri33	2	0.033	0.033	/	1
	Albtri20	3	0.100	0.097	-0.0235	1
	AEDC	2	0.900	0.503	-0.8125	<0.00001
	Albtri44	6	0.733	0.695	-0.0554	<0.00001

Continua

Tabela 4 - Heterozigosidade Observada (H_o), Heterozigosidade Esperada (H_e), Coeficiente de Endogamia (F_{is}) e desvios de Hardy-Weinberg observados para cada população nos oito *loci* testados. Em negrito, valores de P estatisticamente significantes, após correção de Bonferroni (Conclusão).

População	Locus	N. de alelos	Heterozigosidade Observada	Heterozigosidade Esperada	F_{is}	P
Carmo	OchcB5	1	/	/	/	/
	OchcB9	3	0.413	0.387	-0.0701	1
	OchcD11	2	0.896	0.503	-0.8065	<0.00001
	Albtri3	14	0.518	0.857	0.3998	<0.00001
	Albtri33	3	0.133	0.128	-0.0404	1
	Albtri20	5	0.166	0.160	-0.0394	1
	AEDC	2	0.931	0.506	-0.8667	<0.00001
	Albtri44	8	0.655	0.759	0.1392	0.01842

Os valores de estruturação genética entre as populações, calculados no programa Arlequin, foram considerados baixos ($F_{st} < 0,05$) indicando que há uma baixa estruturação genética entre as populações de *Ae. fluviatilis*, com 67% dos valores significantes ($P < 0,05$) (Tabela 6).

Os valores de F_{st} calculados pelo programa FreeNA, com 95% de intervalo de confiança, foram maiores do que os valores encontrados pelo programa Arlequin. Com a retirada do viés dos alelos nulos, os valores de F_{st} foram mais consistentes, pois os valores iguais a zero foram substituídos por valores maiores, indicando, baixa, porém alguma estruturação entre as populações. Apesar dos valores ainda indicarem que há baixa estruturação entre as populações, a diferença genética entre Burle Marx e Ibirapuera aumentou consideravelmente de $F_{st} = 0,02$ para 0,1, indicando que há moderada estruturação entre as duas populações (Tabela 6).

Tabela 5 - Probabilidade de alelos nulos por *locus* por população de *Ae. fluviatilis*.

<i>Locus</i>	População	Frequência de alelos nulos	<i>Locus</i>	População	Frequência de alelos nulos
OchcB5	Burle Marx	0,10%	Albtri33	Burle Marx	0,10%
	Ibirapuera	28,38%		Ibirapuera	16,01%
	Piquerí	22,98%		Piquerí	0
	Previdência	0,10%		Previdência	6,78%
	Santo Dias	12,35%		Santo Dias	0
	Shangrilá	0,10%		Shangrilá	0
	Alfredo Volpi	12,55%		Alfredo Volpi	0,10%
	Chico Mendes	0,10%		Chico Mendes	0,01%
	Carmo	0,10%		Carmo	0
OchcB9	Burle Marx	18,59%	Albtri20	Burle Marx	0
	Ibirapuera	2,77%		Ibirapuera	0,10%
	Piquerí	2,77%		Piquerí	0,01%
	Previdência	0,03%		Previdência	0
	Santo Dias	6,67%		Santo Dias	0
	Shangrilá	6,37%		Shangrilá	0
	Alfredo Volpi	5,20%		Alfredo Volpi	0
	Chico Mendes	12,62%		Chico Mendes	0
	Carmo	0,10%		Carmo	0
OchcD11	Burle Marx	0	AEDC	Burle Marx	0
	Ibirapuera	0		Ibirapuera	0
	Piquerí	0		Piquerí	0
	Previdência	0		Previdência	0
	Santo Dias	0		Santo Dias	0
	Shangrilá	0		Shangrilá	0
	Alfredo Volpi	0		Alfredo Volpi	0
	Chico Mendes	0		Chico Mendes	0
	Carmo	0		Carmo	0
Albtri3	Burle Marx	12,08%	Albtri44	Burle Marx	0
	Ibirapuera	4,99%		Ibirapuera	0
	Piquerí	0		Piquerí	0
	Previdência	9,09%		Previdência	0
	Santo Dias	7,71%		Santo Dias	0
	Shangrilá	0		Shangrilá	0
	Alfredo Volpi	15,45%		Alfredo Volpi	2,10%
	Chico Mendes	19,23%		Chico Mendes	3,71%
	Carmo	17,56%		Carmo	7,36%

Tabela 6 - Valores de Heterogeneidade genética (F_{st}) na diagonal de baixo (valores significantes em negrito). Valores de Heterogeneidade genética (F_{st}), após correção considerando os alelos nulos, na diagonal de cima (com 95% de intervalo de confiança).

População	Burle Marx	Ibirapuera	Piquerí	Previdência	Santo Dias	Shangrilá	Alfredo Volpi	Chico Mendes	Carmo
Burle Marx	-	0,127191	0,087206	0,041835	0,068672	0,054136	0,051514	0,012642	0,016439
Ibirapuera	0,02532	-	0,011509	0,106105	0,060741	0,107423	0,077694	0,121562	0,112774
Piquerí	0,01921	0	-	0,061351	0,053808	0,070472	0,038238	0,071351	0,067885
Previdência	0,00689	0,01076	0	-	0,020186	0,026623	0,040804	0,022762	0,00806
Santo Dias	0,0234	0,02643	0,01208	0,00016	-	0,022285	0,06136	0,054108	0,034118
Shangrilá	0,02427	0,02051	0,00764	0,00111	0,00375	-	0,056687	0,046673	0,027126
Alfredo Volpi	0,01683	0,01821	0,00416	0,00263	0,01906	0,01352	-	0,021597	0,029473
Chico Mendes	0,00295	0,02415	0,00687	0	0,00811	0,01704	0,00208	-	0,010507
Carmo	0	0,0178	0,00581	0	0,00528	0,00878	0,00075	0	-

Tabela 7 - Matriz de distância genética Cavalli-Sforza e Edwards, na diagonal de baixo: valores considerando os alelos nulos com 95% de intervalo de confiança. Valores da distância geográfica (Km) entre as populações, na diagonal de cima.

População	Burle Marx	Ibirapuera	Piquerí	Previdência	Santo Dias	Shangrilá	Alfredo Volpi	Chico Mendes	Carmo
Burle Marx	-	8,2	12,7	5,7	6,4	15,5	5,2	33,2	27
Ibirapuera	0,324218	-	4,8	4,9	14,5	19,4	4,5	25	19,8
Piquerí	0,336238	0,214414	-	16,7	25,3	27,8	14,7	14,8	12,6
Previdência	0,282279	0,279477	0,294603	-	10,4	21	2,8	31,6	27
Santo Dias	0,307703	0,295739	0,305046	0,239788	-	15,2	11,1	39,2	32,9
Shangrilá	0,289095	0,312509	0,308232	0,229726	0,250238	-	19,7	37,4	28,6
Alfredo Volpi	0,278052	0,283769	0,299989	0,268357	0,277858	0,301559	-	29,4	24,5
Chico Mendes	0,261493	0,32315	0,321811	0,261467	0,294802	0,296721	0,261852	-	9,4
Carmo	0,282888	0,323484	0,325534	0,240085	0,283695	0,298977	0,265212	0,257891	-

Os resultados da árvore de *Neighbour-Joining* (NJ), com valores de *bootstrap*, construída a partir dos valores de distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards, não foram consistentes com as distâncias geográficas entre as populações (Tabela 7). Apenas as populações Ibirapuera e Piquerí que possuem distância geográfica de 4,8km entre si, apareceram com alto valor de *bootstrap* (99%), indicando que essas duas populações são próximas geneticamente (Figura 3).

Figura 3 - Árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) construída a partir dos valores de distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards, com valores de *bootstrap* (10.000 iterações).

Os resultados da análise de correlação linear apresentada no gráfico entre distância genética (F_{st} (1- F_{st})) e distância geográfica, medida em quilômetros,

indicam que não ocorre isolamento por distância entre as populações estudadas ($r=-0,2421$; $r^2=0,058614$; $P=0,15485$) (Figura 4).

Figura 4 - Correlação linear entre distância genética ($F_{st} (1-F_{st})$) e distância geográfica (Km) entre as populações ($r=-0,2421$; $r^2=0,058614$; $P=0,15485$).

Os resultados das análises de correlação linear entre distância genética ($F_{st} (1-F_{st})$) e variáveis ambientais indicam que as distâncias genéticas calculadas para as populações estudadas não se correlacionam com nenhuma variável ambiental testada (Tabela 8). Somente uma correlação demonstrou o valor de P significativo ($P=0,048595$), relevo x $F_{st} (1-F_{st})$, porém o valor de r foi negativo, indicando que as duas variáveis se correlacionam negativamente, ou seja, a medida que o relevo é maior a distância genética entre as populações diminui.

Tabela 8 – Análises de Correlações Lineares entre distância genética (F_{st} ($1-F_{st}$)) e variáveis ambientais. Em negrito, valor de P significativo.

F_{st} ($1-F_{st}$)	r	r^2	P
Elevação	-0,51321	0,26338	0,15765
Forma do fragmento	-0,43596	0,19006	0,24078
Vegetação por hab (m ²)	-0,51414	0,26434	0,15677
Relevo	-0,6694	0,4481	0,048595
Pluviosidade	-0,025753	0,0006632	0,94757
Temperatura	-0,2338	0,054662	0,54487
Área do parque (km ²)	0,45157	0,20392	0,2224

O fluxo gênico entre as populações após correção para o tamanho da amostra foi de 7,74 por geração por população. Indicando alta similaridade alélica entre as populações. Os resultados obtidos pela análise bayesiana de cluster multi-locus realizada no programa Strucuture, foram submetidos ao método de Evanno et al.¹⁴⁰ para identificação do ΔK , valor que representa o número de grupos genéticos que melhor explica os resultados obtidos. Para os resultados dessa análise o ΔK proposto foi $k=2$ (Figura 6).

O cluster de $k=2$ indica que as populações fazem parte de dois grandes grupos genéticos, porém sem diferenças visíveis entre as mesmas (Figura 7A). Subseqüentes valores de k foram testados, $k=4$ indicou que as populações Ibirapuera e Piquerí se estruturam em um grupo genético distinto, no qual é possível observar através do gráfico prevalência do grupo genético verde; e as populações Santo Dias e Shangrilá também se estruturam, porém com uma prevalência maior do grupo genético azul (Figura 7B). O valor $k=9$ também foi testado e indicou que as populações possuem um padrão genético homogêneo,

porém, ainda assim as populações Ibirapuera e Piquerí se estruturam em um grupo genético distinto do restante, no qual é possível observar a prevalência do grupo genético amarelo (Figura 7C).

Figura 5 - Gráfico do ΔK , no qual é possível observar o valor de $k=2$ como melhor número de grupos genéticos para explicar dados.

Figura 6 - Análise Bayesiana de *cluster multi-locus* de genótipos microssatélites, mostrando as configurações $k=2$ (A), $k=4$ (B) e $k=9$ (C). Cada um dos 270 indivíduos é representado por uma linha vertical, fracionada em segmentos de cores que representam a probabilidade dos indivíduos em pertencer a algum dos *clusters* genéticos.

O resultado dos testes de heteroziguidade realizados no programa Bottleneck sob o modelo SMM (*Stepwise Mutation Model*) mostrou mais *loci* com déficit de heteroziguidade em oito de nove populações e com valores de P significantes ($<0,05$) para as populações Piquerí e Carmo. As populações Burle Marx e Alfredo Volpi apresentaram valores de P limítrofes (Tabela 8). Os resultados encontrados indicam que as populações de *Ae. fluviatilis* tenham sofrido, ou estão sofrendo um evento de expansão populacional ($H_e < H_{eq}$). Apesar de a população Shangrilá apresentar mais *loci* com excesso de heteroziguidade, o valor de P ($H_e > H_{eq}$) apresentado não foi significativo.

Em outra análise realizada no programa *Bottleneck*, na qual, todos os 270 indivíduos de todas as populações foram considerados como uma única população representando toda a cidade de São Paulo, teve como resultado seis *loci* apresentando déficit de heterozigosidade ($H_e < H_{eq}$) e dois apresentando excesso de heterozigosidade ($H_e > H_{eq}$). Com valor de P significativo ($P = 0,01367$) para déficit de heterozigosidade. Esse resultado corrobora que as populações sofreram um evento recente de expansão populacional.

Tabela 9 - Número de *loci* exibindo excesso de heterozigosidade (H_e) e heterozigosidade esperada pelo número de alelos observados (H_{eq}) sob o modelo SMM. Em negrito, valores de P significantes para déficit de heterozigosidade.

		Burle Marx	Ibirapuera	Piquerí	Previdência	Santo Dias	Shangrilá	Alfredo Volpi	Chico Mendes	Carmo
SMM	$H_e < H_{eq}$	4	4	7	4	4	2	5	4	5
	$H_e > H_{eq}$	2	3	1	3	4	5	2	3	2
	$P (H_e < H_{eq})$	0,07813	0,28906	0,00977	0,28906	0,23047	0,59375	0,05469	0.23438	0,03906

4 DISCUSSÃO

Grandes metrópoles do Mundo, cidades como São Paulo, Nova Iorque, Londres, entre outras, possuem um desenho urbano similar, composto de pequenas ilhas verdes, como parques e praças, inseridas na malha urbana da cidade. Essas ilhas verdes possuem condições adequadas para sustentar o ciclo biológico de mosquitos vetores, provendo criadouros e alimento, abrangendo tudo o que o mosquito necessita para manter seu ciclo, servindo de refúgio e em alguns casos podendo levar ao aumento de suas populações.^{52,57,141}

A alta adaptabilidade e abundância de algumas espécies de mosquitos em ambientes urbanos se devem a dois fatores principais: alta taxa de criadouros e disponibilidade de alimento. Contudo, variações ambientais, limitação de comida e mudanças climáticas, podem impactar o tamanho de populações de mosquitos adaptados ao meio urbano. Dois elementos são necessários para explicar a dinâmica de populações de mosquitos: 1) Variáveis exógenas ou ambientais; 2) Variáveis endógenas.^{81,82} As variáveis ambientais podem desempenhar uma ação principal na dinâmica populacional de mosquitos, principalmente, as alterações nos ambientes propiciadas pelos seres humanos, como a urbanização podem expandir os habitats de espécies adaptadas a esse ambiente e em consequência, aumentar sua abundância.^{84,87,142}

Os resultados encontrados com a utilização de *loci* microsatélites nas populações de *Ae. fluviatilis* provenientes da cidade de São Paulo indicam que essa espécie sofreu uma expansão populacional demográfica (aumento no número de indivíduos), fato que pode sugerir que as populações de *Ae. fluviatilis* se adaptaram e aumentaram, conforme a cidade de São Paulo expandia seu território urbano.

Os resultados sugerem que as populações estudadas sofreram um processo de expansão populacional demográfica ($H_e < H_{eq}$), pois o número de *loci* apresentando déficit de heterozigosidade foi maior do que *loci* apresentando

excesso de heterozigiosidade. Esse resultado é corroborado pela baixa estruturação, alto fluxo gênico e pela alta taxa de homozigotos presentes nas populações. A hipótese de expansão populacional, contou com valores de P significantes ($<0,05$) para duas populações (Piquerí e Carmo) e valores limítrofes para Burle Marx ($P = 0,078$) e Alfredo Volpi ($P = 0,054$) (Tabela 8). Devido ao teste realizado com todas as populações juntas sugerir expansão populacional com valores significantes ($P = 0,01$), é possível afirmar que as populações de *Ae. fluviatilis* seguem uma tendência de expansão populacional demográfica e que esse processo, possivelmente, seja contemporâneo e esteja ocorrendo junto com o crescimento da cidade.

Evidências de expansão populacional foram observadas em outros mosquitos, como por exemplo, em *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. darlingi* e *An. funestus*, nos quais foi possível observar uma recente expansão populacional, com alta taxa de fluxo gênico entre as populações e sem evidência de isolamento por distância.^{143–145} Em *Cx. tarsalis*, foi possível observar a evidência de expansão populacional, porém com fluxo gênico moderado e com evidências de isolamento por distância, sugerindo que as populações dessa espécie tiveram a sua expansão populacional associada com os eventos de glaciação que ocorreram no Pleistoceno.¹⁴⁶ Esses resultados sugerem que a expansão populacional é um fenômeno comum entre populações de mosquitos e que, muitas vezes, pode estar ligada a expansão populacional do ser humano.

Os testes realizados para Equilíbrio de Hardy-Weinberg por *locus* por população, sugerem que as populações do mosquito *Ae. fluviatilis* estudadas apresentam desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $H_o > H_e$ por *locus* por população em 37 de 64 testes realizados, representando cerca de 60% dos valores, com 34 valores de P significantes, indicando excesso de heterozigiosidade (Tabela 4). O valor médio de F_{is} encontrado em todas as populações foi de 0,1, sugerindo

que há moderada endogamia nas populações como um todo. Duas populações apresentaram indícios de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, Piquerí e Chico Mendes, para um *locus* cada uma, porém sem valores de P significantes.

Em todas as populações, nas quais o desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($H_o > H_e$) foi significativo, os valores de F_{is} foram baixos, ou negativos, indicando que não há presença de endogamia nessas populações (Tabela 4). Uma das possíveis explicações para o excesso de heterozigosidade encontrado nas populações é que quando os números de criadouros que formarão a próxima geração se tornam escassos, as frequências alélicas nos pais, machos e fêmeas, irão diferir em consequência do erro de amostragem binomial e, conseqüentemente, levarão a um excesso de heterozigosidade na prole pelas proporções das medidas de Hardy-Weinberg.¹⁴⁷ Populações de *Ae. aegypti* coletadas no começo da estação seca também foram encontradas em excesso de heterozigosidade pelas proporções de Hardy-Weinberg.¹⁴⁸

Contudo, nos resultados deste presente estudo descritos em Multini et al.¹³⁹, todos os 270 indivíduos de *Ae. fluviatilis* da cidade de São Paulo, foram analisados para os testes de Hardy-Weinberg como uma grande população, com os mesmos oito *loci* e os resultados indicaram $H_o < H_e$ em cinco dos oito testes realizados, com valores de P significantes. Esse resultado indica que quando o teste é realizado em todos os indivíduos, sem rótulos, a taxa de homozigotos é maior do que de heterozigotos para cinco dos oito *loci* utilizados, corroborando o déficit de heterozigosidade encontrado em outras análises. O déficit de heterozigosidade pode ser explicado por pressões seletivas exógenas que podem estar ocorrendo com esta espécie e, principalmente, pela expansão populacional sugerida em outros testes.

Os resultados da Heterogeneidade genética (F_{st}), tanto obtido através do programa Arlequin, quanto pelo FreeNA, que leva em consideração o viés imposto

pela presença dos alelos nulos, sugerem que há baixa estruturação genética entre as populações, ou seja, há pouca diversidade genética. Esses resultados são validados por valores de P significantes em 67% das amostras. Baixa estruturação populacional é, frequentemente, encontrada em estudos conduzidos com espécies do gênero *Aedes*, como no estudo de Olanratmanee et al.¹²⁶ em que a média do F_{st} entre populações de *Ae. aegypti* em escala micro espacial foi de 0,037, indicando baixa estruturação populacional nas amostras como um todo. Em Monteiro et al.¹¹³ a média do F_{st} em populações de *Ae. aegypti* em escala continental foi de 0,175, indicando moderada estruturação populacional.

As populações de *Ae. fluviatilis* foram geneticamente semelhantes e a correlação entre distância genética e distância geográfica não foi significativa. Esses resultados sugerem que as populações de *Ae. fluviatilis* estudadas possuem baixa estruturação genética a qual não pode ser definida por variáveis relacionadas à distância geográficas e que, provavelmente, seja definida pelo processo de expansão populacional. Evidências de isolamento por distância também não foram encontrados em outras espécies de culicídeos do gênero *Aedes* em pequenas escalas, como o *Ae. aegypti* na África¹⁴⁹ e na Tailândia¹²⁶. Sugerindo que as populações de espécies do gênero *Aedes* de pequenas distâncias geográficas tendem a exibir similaridades genéticas. Na Alemanha, o *Ae. japonicus* não demonstrou evidências de isolamento por distância e suas populações apresentaram um padrão de rápida expansão populacional e os autores implicam que, provavelmente, essa expansão seja mediada pelos seres humanos.¹⁵⁰

Os resultados da árvore de NJ construída a partir dos valores de Cavalli-Sforza e Edwards não possuem correlações com as distâncias geográficas e corroboram os resultados que não indicam estruturação populacional causada por isolamento por distância. Indicando que a escassa diferença genética encontrada nessas populações não foi causada por eventos de deriva genética, mas,

provavelmente, por algum impacto que o ser humano possa ter causado nessa espécie. Como, por exemplo, a alta quantidade de habitats heterogêneos encontrados em toda a paisagem urbana que podem gerar variabilidade genética para a sobrevivência e potencial de transmissão de patógenos em mosquitos vetores.¹⁴¹

Os resultados obtidos através da análise realizada no programa Structure corroboram os outros resultados encontrados, as populações de *Ae. fluviatilis* se mostraram homogêneas em sua estruturação (Figura 7). Corroborando os resultados da árvore de NJ (Figura 3), as populações Ibirapuera e Piquerí possuem grupos genéticos distintos e se estruturam de forma distinta em relação às outras populações analisadas. Esses dois parques possuem algumas semelhanças, ambos estão inseridos em uma área amplamente antropizada da cidade, recebem alta taxa de visitantes por mês, são compostos por bosques e áreas ajardinadas e em ambos o *Ae. fluviatilis* representou aproximadamente 10% do total de todos os espécimes de mosquitos coletados, sugerindo que as condições presentes nesses parques são benéficas a essa espécie e, portanto, podem ter correlações com a estrutura populacional encontrada.^{49,151}

Embora moderada estruturação populacional tenha sido encontrada em duas populações, as populações de *Ae. fluviatilis* se mostraram muito semelhantes como um todo quando comparadas a outras espécies de culicídeos. Kothera et al.¹²³, identificaram diferenças genéticas significantes entre populações de *Cx. pipiens* no Estado do Colorado, EUA. Em outro estudo, Wilke et al.⁹⁴, identificaram distâncias genéticas significantes entre populações de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil, mostrando um padrão de estruturação de populações do Norte e Sul do país.

Apesar das variáveis ambientais testadas não terem correlação com as distâncias genéticas encontradas é conhecido que os mosquitos vetores são pequenos organismos ectotérmicos e seu crescimento, sobrevivência e

comportamento são altamente sensíveis às condições ambientais e fenotípicas.^{141,152} Outras variáveis podem estar influenciando o comportamento de expansão populacional das populações de *Ae. fluviatilis*, como por exemplo, o comportamento humano. Os humanos são uma grande influência na capacidade vetorial de insetos em ecossistemas urbanos, as suas práticas culturais, as variáveis socioeconômicas e o seu comportamento, ajudam a configurar os componentes bióticos e abióticos dos ecossistemas urbanos e a interação de espécies com a transmissão de patógenos.^{141,153} As alterações ambientais conduzidas pelos seres humanos nos ambientes urbanos podem ser benéficas a essa espécie e contribuir para sua expansão populacional.

As populações de *Ae. fluviatilis* apresentaram um alto fluxo gênico, a similaridade genética entre as populações estudadas equivale a 7,74 migrantes por geração por população. O fluxo gênico é um termo que caracteriza o movimento dos genes entre espécies e intra-espécies. As altas variações genéticas existentes entre espécies são resultantes de forças evolutivas que tendem a produzir diferenças, como a deriva genética e a seleção natural. As baixas variações genéticas intra-espécies são resultantes das forças que tendem a produzir uma homogeneização genética entre as populações, como o fluxo gênico¹⁵⁴. Desse modo, a alta taxa de fluxo gênico, sugere um efeito genético de homogeneização das populações de *Ae. fluviatilis*, mostrando baixa estruturação populacional. Esse fenômeno também foi observado em populações do mosquito *Ae. taeniorhynchus* na Colômbia.^{155,156}

Os resultados mostraram que os *loci* microssatélites desenvolvidos para *Ae. caspius*, *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* foram transferidos com sucesso para *Ae. fluviatilis*¹³⁹, corroborando os resultados encontrados por Bello e Becerra¹⁵⁵, que transferiram *loci* microssatélites desenvolvidos para *Ae. caspius* para *Ae. taeniorhynchus*. Os oito pares de *primers* amplificados em *Ae. fluviatilis* (OchcB5,

OchcB9, OchcD11, Albtri-3, Albtri-20, Albtri-33, AEDC e Albtri-44) (Tabela 3), se mostraram moderadamente polimórficos, o que era esperado, uma vez que *loci* microsatélites em mosquitos do gênero *Aedes* são, frequentemente, menos polimórficos do que *loci* desenvolvidos para outros gêneros de mosquitos, como *Cx. quinquefasciatus* e *An. funestus*.^{94,113,122}

Primers que amplificam microsatélites transferidos de uma espécie para outra, frequentemente apresentam alelos nulos, devido às mutações na região flanqueadora.¹¹² Os *loci* OchcB5, OchcB9 e Albtri3, tiveram as maiores frequências de alelos nulos encontrados nas populações, o que pode levar a uma incorreta suposição de baixa diversidade genética entre as populações.¹¹¹ A transferência de *primers* de microsatélites entre espécies também pode resultar em um viés de averiguação (*ascertainment bias*), que significa que as taxas de variações podem ser menores na espécie nova, do que nas espécies para as quais os *primers* foram desenvolvidos. O que pode erroneamente ser interpretado como flutuações de dinâmicas evolutivas entre espécies. Contudo, esse viés é drasticamente diminuído quando a nova espécie e a espécie original possuem padrões demográficos distintos.¹⁵⁷

O *Ae. fluviatilis* é um mosquito pouco estudado e que tem demonstrado ser bem adaptado a ambientes urbanos. Os resultados encontrados nesse estudo indicam que as populações dessa espécie possuem baixa estruturação populacional e alto fluxo gênico, medidas que corroboram suas populações estarem em uma tendência de expansão populacional. Processos de urbanização tendem a aumentar o micro clima de certa região e juntamente com as mudanças climáticas, podem aumentar a abundância de mosquitos em grandes cidades. Modelos utilizando vetores de malária e dados climáticos da África descobriram que um aumento de 0,5% na temperatura média pode levar ao aumento de 30-100% na abundância de mosquitos.¹⁵⁸ Além do aumento das temperaturas médias

proporcionarem um ambiente suscetível para o desenvolvimento dos mosquitos, as áreas urbanizadas podem facilitar a emergência de patógenos e oferecem disponibilidade de habitats para os mosquitos, nos parques urbanos e praças públicas, por exemplo, e disponibilidade de hospedeiros, para o repasto sanguíneo das fêmeas.¹⁴¹ Juntos esses fatores podem influenciar o comportamento de populações de mosquitos e beneficiá-las em sua sobrevivência e adaptabilidade ao ambiente urbano.

Apesar do *Ae. fluviatilis* não estar implicado na transmissão de patógenos aos seres humanos em condições naturais, com a emergência de novos patógenos às grandes cidades, os mosquitos autóctones adaptados a esse meio podem mudar sua capacidade epidemiológica, como ocorreu com o mosquito *Cx. tarsalis* nos Estados Unidos com a chegada do WNV.⁶⁶ Assim como, com a confirmação de mudança na importância epidemiológica do *Ae. ochraceus* na epidemia de *Rift Valley fever* (RVFV) em 2007 no Quênia. Além disso, os grandes níveis de complexidade genética das espécies do gênero *Aedes* evidencia a importância de compreender geneticamente as populações de seus mosquitos para investigação de sua importância epidemiológica.¹⁵⁹

5 CONCLUSÕES

a) *Primers* que amplificam microssatélites desenvolvidos para as espécies *Ae. caspius*, *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* puderam ser transferidos com sucesso para *Ae. fluviatilis*;

b) Os fragmentos amplificados pelos *primers* em *Ae. fluviatilis* se mostraram moderadamente polimórficos, porém com alto grau de informação para essa espécie;

c) As populações de *Ae. fluviatilis* se mostraram com alta taxa de fluxo gênico, baixa estruturação populacional e alta taxa de homozigotos;

d) Não houve evidências de isolamento por distância entre as populações de *Ae. fluviatilis*;

e) Não houve evidências de correlação entre distância genética e variáveis ambientais nas populações;

f) Evidências indicam que as populações de *Ae. fluviatilis* estão em expansão populacional e que esse evento esteja ocorrendo junto com a expansão da área urbana de São Paulo.

REFERÊNCIAS

1. Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory. 2014 [Cited 2015 Oct 19]. Available from: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>.
2. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1994.
3. Forattini OP. Culicidologia Médica. São Paulo: EDUSP; 2002. v.2.
4. World Health Organization. Fact Sheet: Malaria. 2016 [Cited 2016 Feb 26]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.
5. World Health Organization. World Malaria Report. Geneva: WHO; 2012.
6. World Health Organization. Fact Sheet: Dengue and severe dengue. 2015 [Cited 2016 Feb 26]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
7. Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. BMJ. 2002;324(7353):1563–6.
8. World Health Organization. Scientific Working Group: Report on Dengue. Geneva: WHO; 2006.
9. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. N Engl J Med. 2012 Apr 12;366(15):1423–32.
10. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature. Nature Publishing Group. 2013;496(7446):504–7.
11. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. Dengue viral infections. Indian J Dermatol. 2010;55(1):68–78.
12. Frierson JG. The Yellow Fever Vaccine: A History. YALE J Biol Med. 2010;83:77–85.
13. Pialoux G, Gaüzère B-A, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. Lancet Infect Dis. 2007 May;7(5):319–27.

14. Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(9):1347–50.
15. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile Virus in the United States: Guidelines for surveillance, prevention, and control. Washington: CDC; 2013.
16. World Health Organization. Fact Sheet: West Nile virus. 2011 [Cited 2015 Nov 09]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/en/>.
17. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode A V, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(8):1174–9.
18. Huhn GD, Sejvar JJ, Montgomery SP, Dworkin MS. West Nile virus in the United States: an update on an emerging infectious disease. *Am Fam Physician.* 2003 Aug;68(4):653–60.
19. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet Infect Dis.* 2002 Sep;2(9):519–29.
20. Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. *CMAJ.* 2004;170(11):1693–702.
21. Caminade C, Kovats S, Rocklov J, Tompkins AM, Morse AP, Colón-González FJ, et al. Impact of climate change on global malaria distribution. *Proc Natl Acad Sci.* 2014 Mar 4;111(9):3286–91.
22. Emerson KJ, Conn JE, Bergo ES, Randel M a., Sallum MAM. Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) clusters by major biogeographical region. *PLoS One.* 2015;10(7):e0130773.
23. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MVG, Brasil PP, Ladislau JJLB, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CCT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.* 2010;9:115.
24. Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(5):618–33.
25. Govindarajan M, Sivakumar R. Larvicidal, ovicidal, and adulticidal efficacy of *Erythrina indica* (Lam.) (Family: Fabaceae) against *Anopheles stephensi*,

Aedes aegypti, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. Springer; 2014 Feb;113(2):777–91.

26. Kudom A, Mensah B, Froeschl G, Boakye D, Rinder H. Preliminary assessment of the potential role of urbanization in the distribution of carbamate and organophosphate resistant populations of *Culex* species in Ghana. Parasit Vectors. 2015;8(1):1–10.
27. Bracco JE, Dalbon M, Marinotti O, Barata JMS. Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. Rev Saude Publica. 1997 Apr;31(2):182–3.
28. Montada Dorta D, Vasuki V, Rajavel A. Evaluation of organophosphorus and synthetic pyrethroid insecticides against six vector mosquito species. Rev Saude Publica. 1993 Dec;27(6):391–7.
29. Pocquet N, Milesi P, Makoundou P, Unal S, Zumbo B, Atyame C, et al. Multiple insecticide resistances in the disease vector *Culex p. quinquefasciatus* from Western Indian Ocean. PLoS One. 2013 Jan 21;8(10):e77855.
30. 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(1717):2446–54.
31. Hemme RR, Thomas CL, Chadee DD, Severson DW. Influence of urban landscapes on population dynamics in a short-distance migrant mosquito: Evidence for the dengue vector *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(3):1–9.
32. Beier JC, Keating J, Githure JI, Macdonald MB, Impoinvil DE, Novak RJ. Integrated vector management for malaria control. Malar J. 2008;7 Suppl 1:S4.
33. World Health Organization. Global strategic framework for integrated vector management. Geneva: WHO; 2004.

34. Axtell RC, Arends JJ. Ecology and Management of Arthropod Pests of Poultry. *Annu Rev Entomol.* 1990 Jan;35(1):101–26.
35. Besansky NJ, Collins FH. The mosquito genome: Organization, evolution and manipulation. *Parasitol Today.* 1992 Jun;8(6):186–92.
36. Bracco JE, Barata JMS, Marinotti O. Evaluation of Insecticide Resistance and Biochemical Mechanisms in a Population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999 Jan;94(1).
37. Campos J, Andrade CFS. Larval susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations to chemical insecticides. *Rev Saude Publica.* 2003;37(4):523–7.
38. Wilke ABB, Marrelli MT. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasit Vectors. Parasites & Vectors;* 2015;8(1):342.
39. Phuc H, Andreasen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol.* 2007;5(1):11.
40. Wilke ABB, Nimmo DD, StJohn O, Kojin BB, Capurro ML, Marrelli MT. Mini-review: Genetic enhancements to the sterile insect technique to control mosquito populations. *Asia-Pacific J Mol Biol Biotechnol.* 2009;17(3):65–74.
41. Knippling EF. Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. *J Econ Entomol.* 1955 Aug 1;48(4):459–62.
42. Handler AM. Prospects for Using Genetic Transformation for Improved SIT and New Biocontrol Methods. *Genetica.* 2002;116(1):137–49.
43. Carvalho DO, Nimmo D, Naish N, McKemey AR, Gray P, Wilke ABB, et al. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. *J Vis Exp.* 2014;(83):e3579.
44. Ghosh K, Ribolla PE, Jacobs-Lorena M. Targeting Plasmodium ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(23):13278–81.

45. Walker T, Johnson PH, Moreira L, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, et al. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*. 2011;476(7361):450–3.
46. Scalise W. Parques Urbanos - evolução, projeto, funções e uso. *Rev Assent Hum*. 2002;4(1):17–24.
47. Macedo S, Sakata F. Parques Urbanos no Brasil. São Paulo: EDUSP; 2003.
48. Limnios G, Furlan SA. Parques urbanos no município de São Paulo – SP (Brasil): Junho de 2013. *Rev Labverde*. 2013;6:173–89.
49. São Paulo. Guias dos parques municipais de São Paulo. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e Meio Ambiente; 2010. v.2.
50. Instituto Socioambiental. Parques urbanos Subsídios para a gestão. São Paulo: Instituto Socioambiental; 2008.
51. IBGE. São Paulo. 2015 [Citado 2015 Nov 17]. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=355030&search=sao-paulo|sao-paulo|infograficos:-informacoes-completas>.
52. Taípe-Lagos CB, Natal D. Culicidae mosquito abundance in a preserved metropolitan area and its epidemiological implications. *Rev Saude Publica*. 2003 Jun;37(3):275–9.
53. Li Y, Kamara F, Zhou G, Puthiyakunnon S, Li C, Liu Y, et al. Urbanization Increases *Aedes albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(11):e3301.
54. Samson DM, Archer RS, Alimi TO, Arheart KL, Impoinvil DE, Oscar R, et al. New baseline environmental assessment of mosquito ecology in northern Haiti during increased urbanization. *J Vector Ecol*. 2015 Jun;40(1):46–58.
55. Urbinatti PR, Sendacz S, Natal D. Imaturos de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parque de área metropolitana aberto à visitação pública. *Rev Saude Publica*. 2001;35(5):461–6.
56. Laporta GZ, Urbinatti PR, Natal D. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) em abrigos situados no

Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. Rev Bras Entomol. 2006;50(1):125–7.

57. Medeiros-Sousa AR, Ceretti W, Urbinatti PR, de Carvalho GC, de Paula MB, Fernandes A, et al. Mosquito fauna in municipal parks of São Paulo City, Brazil: a preliminary survey. J Am Mosq Control Assoc. 2013;29(3):275–9.
58. Ceretti-junior W, Christe RDO, Rizzo M, Strobel C, Otavio M, Junior DM, et al. Species Composition and Ecological Aspects of Immature Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Bromeliads in Urban Parks in the City of São. 2016;10(March):102–12.
59. Ceretti-Júnior W, Medeiros-Sousa AR, Multini LC, Urbinatti PR, Vendrami DP, Natal D, et al. Immature Mosquitoes in Bamboo Internodes in Municipal Parks, City of São Paulo, Brazil. J Am Mosq Control Assoc. 2014 Dec;30(4):268–74.
60. Downs WG. History of epidemiological aspects of yellow fever. Yale J Biol Med. 1982;55(3-4):179–85.
61. Pereira LE, Suzuki A, Coimbra TLM, Souza RP de, Chamelet ELB. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). Rev Saude Publica. 2001 Apr;35(2):119–23.
62. Fisher B, Christopher T. Poverty and biodiversity: Measuring the overlap of human poverty and the biodiversity hotspots. Ecol Econ. 2007 Apr;62(1):93–101.
63. Lagos, AR, Muller BDLA. Hotspot Brasileiro. Saúde Ambiente. 2007;2(2):35–45.
64. Dorvillé LFM. Mosquitoes as bioindicators of forest degradation in southeastern Brazil, a statistical evaluation of published data in the literature. Stud Neotrop Fauna Environ. 1996 Jun 1;31(2):68–78.
65. Forattini OP. Mosquitos Culicidae como vetores emergentes de infecções. Rev Saude Publica. 1998;32(6):497–502.
66. Venkatesan M, Rasgon JL. Mosquito-Mediated Dispersal of West Nile Virus. Mol Ecol. 2012;19(8):1573–84.

67. Mitchell CJ, Forattini OP. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. *J Med Entomol*. 1984 Jan 26;21(1):34–7.
68. Mitchell CJ, Forattini OP, Miller BR. Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. *Rev Saude Publica*. 1986 Jun;20(3):171–7.
69. Castro M. Ongoing study on arbovirosis in Rio de Janeiro State. *Viológica*. 1991;91:4.
70. Wilkerson RC, Linton Y-M, Fonseca DM, Schultz TR, Price DC, Strickman DA. Making mosquito taxonomy useful: A stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PLoS One*. 2015 Jul 30;10(7):e0133602.
71. WRBU. Systematic Catalog of Culicidae. 2015 [Cited 2015 Nov 10]. Available from: http://www.mosquitocatalog.org/taxon_descr.aspx?ID=16082
72. 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.
73. Cônsoli RAGB, Williams P. Laboratory observations on the bionomics of *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res*. 1978 Apr;68(01):123.
74. Consoli R, Mendes NM, Pereira JP, Santos BS, Lamounier M. Influência de diversos derivados de vegetais na sobrevivência das larvas de *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1988. p. 87–93.
75. Davis C, Shannon R. Studies on yellow fever in South America: attempts to transmit the virus with certain Aedine and Sabethine mosquitoes and with Triatomas (Hemiptera). *Am J Trop Med Hyg*. 1931;11:21–9.
76. Kasai N. Susceptibilidade do mosquito *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) à infecção por *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1979.

77. Camargo MVT, Cônsoli RAGB, Williams P, Krettli AU. Factors influencing the development of *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes fluviatilis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1983 Mar;78(1).
78. Vezzani D, Eiras DF, Wisnivesky C. *Dirofilariasis* in Argentina: Historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. Vet Parasitol. 2006 Mar;136(3-4):259–73.
79. Baton LA, Pacidônio EC, Gonçalves DDS, Moreira LA. wFlu: Characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. PLoS One. 2013;8(3).
80. Moreira L, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery J, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*. Cell. 2009;139(7):1268–78.
81. Edman JD. Disease control through manipulation of vector-host interaction: some historical and evolutionary perspectives. In: Scott TW, Gumstrup-Scott, editors. The Role of vector-host interactions in disease transmission; 1988; Landover, Maryland. Entomological Society of America, 1988. p 43–50.
82. Chaves LF, Morrison AC, Kitron UD, Scott TW. Nonlinear impacts of climatic variability on the density-dependent regulation of an insect vector of disease. Glob Chang Biol. 2012;18(2):457–68.
83. Tipayamongkhogul M, Fang C-T, Klinchan S, Liu C-M, King C-C. Effects of the El Niño-southern oscillation on dengue epidemics in Thailand, 1996-2005. BMC Public Health. 2009;9:422.
84. Descloux E, Mangeas M, Menkes CE, Lengaigne M, Leroy A, Tehei T, et al. Climate-Based Models for Understanding and Forecasting Dengue Epidemics. Anyamba A, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2012 Feb 14;6(2):e1470.
85. Moreno ES, Barata RDCB. Methodology for definition of yellow fever priority areas, based on environmental variables and multiple correspondence analyses. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(7).

86. Norris DE. Mosquito-borne Diseases as a Consequence of Land Use Change. *Ecohealth*. 2004 Mar 1;1(1):19–24.
87. Chaves LF, Koenraadt CJM. Climate change and highland malaria: fresh air for a hot debate. *Q Rev Biol*. 2010;85(1):27–55.
88. Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(3):442–50.
89. Fonseca DM, Smith JL, Wilkerson RC, Fleischer RC. Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(2):284–9.
90. Demari-Silva B, Vesgueiro FT, Sallum MAM, Marrelli MT. Taxonomic and Phylogenetic Relationships Between Species of the Genus *Culex* (Diptera: Culicidae) From Brazil Inferred From the Cytochrome c Oxidase I Mitochondrial Gene. *J Med Entomol*. 2011 Mar 1;48(2):272–9.
91. Vesgueiro FT, Demari-Silva B, Malafronte RS, Sallum MAM, Marrelli MT. Intragenomic variation in the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA of species of the genera *Culex* and *Lutzia* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(1):1–8.
92. Volkman SK, Neafsey DE, Schaffner SF, Park DJ, Wirth DF. Harnessing genomics and genome biology to understand malaria biology. *Nat Rev Genet*. 2012 Apr 12;13(5):315–28.
93. Wang G, Li C, Guo X, Xing D, Dong Y, Wang Z, et al. Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. *PLoS One*. 2012;7(10):1–11.
94. Wilke A, Vidal P, Suesdek L, Marrelli M. Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. 2014;7(1):468.
95. Cameron SL. Insect mitochondrial genomics: Implications for evolution and phylogeny. *Annu Rev Entomol*. 2014 Jan 7;59(1):95–117.

96. Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and molecular taxonomy of the rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(4):460–5.
97. Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Gentile C, Grisard EC, Peixoto AA. Assessing the molecular divergence between *Anopheles (Kerteszia) cruzii* populations from Brazil using the timeless gene: further evidence of a species complex. *Malar J.* 2009;8:60.
98. Edillo FE, Tripet F, McAbee RD, Foppa IM, Lanzaro GC, Cornel 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):145–9.
99. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Mol Ecol.* 2002;11(1):1–16.
100. Chambers EW, Meece JK, McGowan J a., 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):202–10.
101. Zielke DE, Ibáñez-Justicia A, Kalan K, Merdić E, Kampen H, Werner D. Recently discovered *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) populations in The Netherlands and northern Germany resulted from a new introduction event and from a split from an existing population. *Parasit Vectors.* 2015;8(1):1–9.
102. Almeida NF, Leitão ST, Caminero C, Torres AM, Rubiales D, Vaz Patto MC. Transferability of molecular markers from major legumes to *Lathyrus* spp. for their application in mapping and diversity studies. *Mol Biol Rep.* 2014;41(1):269–83.
103. Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 2000;10(7):967–81.
104. Sia E, Butler C, Dominska M, Greenwell P, Fox TD, Petes TD. Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):250–5.

105. Wright S. Genetical structure of populations. *Nature*. 1950 Aug 12;166(4215):247–9.
106. Wright S. Coefficients of inbreeding and relationship. *Am Nat*. 1922;56(645):330–8.
107. Li CC, Horvitz DG. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am J Hum Genet*. 1953;5(2):107–17.
108. Cannings C, Edwards A. Expected genotypic frequencies in a small sample: Deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet*. 1969;21(3):245–7.
109. Cavalli-Sforza LL, Edwards a WF. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet*. 1967;19(3):233–57.
110. Kalinowski ST. Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. *Mol Ecol*. 2002;11(8):1263–73.
111. Carlsson J. Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *J Hered*. 2008;99(6):616–23.
112. Chapuis M-P, Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol*. 2006;24(3):621–31.
113. Monteiro F, 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):e3167.
114. Gullberg A, Olsson M, Tegelström H. Colonization, genetic diversity, and evolution in the Swedish sand lizard, *Lacerta agilis* (Reptilia, Squamata). *Biol J Linn Soc*. 1998 Nov;65(3):257–77.
115. Griffith SC, Dawson DA, Jensen H, Ockendon n, Greig C, Neumann K, et al. Fourteen polymorphic microsatellite loci characterized in the house sparrow *Passer domesticus* (Passeridae, Aves). *Mol Ecol Notes*. 2007 Mar;7(2):333–6.
116. Doyle JM, Siegmund G, Ruhl JD, Eo SH, Hale MC, Marra NJ, et al. Microsatellite analyses across three diverse vertebrate transcriptomes

(*Acipenser fulvescens*, *Ambystoma tigrinum* and *Dipodomys spectabilis*). Genome. 2013 Jul;56(7):407–14.

117. Grigoryeva OO, Oparin ML, Potapov SG, Orlov VN. The genetic structure of an isolated population of the common shrew *Sorex araneus* L. (Mammalia) as determined from microsatellite variation. Dokl Biol Sci. 2012 Sep 6;446(1):300–1.
118. Nagai T, Murakami T, Masuda R. Genetic variation and population structure of the sable *Martes zibellina* on eastern Hokkaido, Japan, revealed by microsatellite analysis. Mammal Study. 2012 Dec;37(4):323–30.
119. Highnam G, Franck C, Martin A, Stephens C, Puthige A, Mittelman D. Accurate human microsatellite genotypes from high-throughput resequencing data using informed error profiles. Nucleic Acids Res. 2013;41(1):e32–e32.
120. Louise C, Vidal PO, Suesdek L. Microevolution of *Aedes aegypti*. PLoS One. 2015;10(9):e0137851.
121. Hickner P V., de Bruyn B, Lovin DD, Mori A, Behura SK, Pinger R, et al. Genome-based microsatellite development in the *Culex pipiens* complex and comparative microsatellite frequency with *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. PLoS One. 2010;5(9):1–8.
122. Samb B, Dia I, Konate L, Ayala D, Fontenille D, Cohuet A. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles funestus*, in a recently re-colonized area of the Senegal River basin and human-induced environmental changes. Parasit Vectors. 2012;5(1):188.
123. Kothera L, Godsey MS, Doyle MS, Savage HM. Characterization of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) populations in Colorado, USA using microsatellites. PLoS One. 2012;7(10):1–9.
124. Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm C a, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, et al. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. Science. 2004;303(5663):1535–8.

125. Ayres CFJ, Melo-Santos M a V, Solé-Cava a M, Furtado a F. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. J Med Entomol. 2003;40(4):430–5.
126. Olanratmanee P, Kittayapong P, Chansang C, Hoffmann A, 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).
127. Kamgang B, Brengues C, Fontenille D, Njiokou F, Simard F, Paupy C. Genetic Structure of the Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). PLoS One. 2011 May 24;6(5):e20257.
128. Natal D, Marucci D. Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. Rev Saude Publ, São Paulo. 1984;18:418–20.
129. Bustamante F, Pires W. Shannon dawn trap: its use in the verification of the durability of residual toxic effects of insecticides. Folha Med. 1951;32(8):53.
130. Gomes AC, Rabello EX, Natal D. Uma nova câmara coletora para armadilha CDC-miniatura. Rev Saude Publica. 1985 Apr;19(2):190–1.
131. Lane J. Neotropical Culicidae. São Paulo: EDUSP; 1953.
132. Huber K, Mousson L, Rodhain F, Failloux B. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. Mol Ecol Notes. 2001;1(4):219–22.
133. Porretta D, Bellini R, Urbanelli S. Characterization of microsatellite markers in the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Diptera: Culicidae). Mol Ecol Notes. 2005;5(1):48–50.
134. Porretta D, Gargani M, Bellini R, Calvitti M, Urbanelli S. Isolation of microsatellite markers in the tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse). Mol Ecol Notes. 2006 Sep;6(3):880–1.
135. Beebe NW, Ambrose L, Hill L, Davis JB, Hapgood G, Cooper RD, et al. Tracing the tiger: Population genetics provides valuable insights into the *Aedes (Stegomyia) albopictus* invasion of the Australasian region. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(8).

136. Delatte H, Toty C, Boyer S, Bouetard A, Bastien F, Fontenille D. Evidence of habitat structuring *Aedes albopictus* populations in Réunion Island. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(3).
137. Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics. 1996;144(4):2001–14.
138. Conn JE, Vineis JH, Bollback JP, Onyabe DY, Wilkerson RC, Póvoa MM. 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.
139. Multini LC, Marrelli MT, Wilke ABB. Microsatellite loci cross-species transferability in *Aedes fluviatilis* (Diptera:Culicidae): a cost-effective approach for population genetics studies. Parasit Vectors. 2015 Dec 15;8(1):635.
140. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Mol Ecol. 2005 Jul;14(8):2611–20.
141. LaDeau SL, Allan BF, Leishnam PT, Levy MZ. The ecological foundations of transmission potential and vector-borne disease in urban landscapes. Funct Ecol. 2015 Jul;29(7):889–901.
142. McKinney ML. Effects of urbanization on species richness: A review of plants and animals. Urban Ecosyst. 2008 Jun 29;11(2):161–76.
143. 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 Jul 1;18(7):1353–64.
144. Michel AP. Divergence with gene flow in *Anopheles funestus* from the Sudan Savanna of Burkina Faso, West Africa. Genetics. 2006 Apr 30;173(3):1389–95.

145. Mirabello L, Conn JE. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in central and South America. *Heredity*. 2006 Dec;97(6):438–438.
146. Venkatesan M, Westbrook CJ, Hauer MC, Rasgon JL. Evidence for a population expansion in the West Nile Virus vector *Culex tarsalis*. *Mol Biol Evol*. 2007;24(5):1208–18.
147. Pudovkin I, Zaykin DV., Hedgecock D. On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics*. 1996;144(1):383–7.
148. 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(2):303–9.
149. 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 Feb;68(2):514–25.
150. Zielke DE, Werner D, Schaffner F, Kampen H, Fonseca DM. Unexpected patterns of admixture in German populations of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) underscore the importance of human intervention. *PLoS One*. 2014 Jul 3;9(7):e99093.
151. Ceretti-Júnior W, Medeiros-Sousa AR, Bruno Wilke AB, Strobel RC, Dias Orico L, Souza Teixeira R, et al. Mosquito faunal survey in a central park of the city of São Paulo, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc*. 2015 Jun;31(2):172–6.
152. Paaijmans KP, Heinig RL, Seliga R, Blanford JI, Blanford S, Murdock CC, et al. Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Glob Chang Biol*. 2013 Aug;19(8):2373–80.
153. Levy MZ, Barbu CM, Castillo-Neyra R, Quispe-Machaca VR, Ancca-Juarez J, Escalante-Mejia P, et al. Urbanization, land tenure security and vector-borne Chagas disease. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2014 Jul 2;281(1789):20141003–20141003.

154. Slatkin M. Gene flow in natural populations. *Annu Rev Ecol Syst.* 1985;16:393–430.
155. Bello F, Becerra V. Genetic variability and heterogeneity of Venezuelan equine encephalitis virus vector *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) populations of the Colombian Atlantic coast, based on microsatellite loci. *Genet Mol Res.* 2009;8(3):1179–90.
156. Bello FJ, Segura NA, Ruiz-García M. Analysis of the genetic variability and structure of *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) populations from the Colombian Atlantic coast on the basis of random amplified polymorphic DNA markers. *Genet Mol Res.* 2014;13(2):4110–23.
157. Li B, Kimmel M. Factors influencing ascertainment bias of microsatellite allele sizes: Impact on estimates of mutation rates. *Genetics.* 2013;195(2):563–72.
158. Pascual M, Ahumada JA, Chaves LF, Rodo X, Bouma M. Malaria resurgence in the East African highlands: Temperature trends revisited. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Apr 11;103(15):5829–34.
159. Tchouassi DP, Bastos ADS, Sole CL, Diallo M, Lutomiah J, Mutisya J, et al. Population genetics of two key mosquito vectors of Rift Valley fever virus reveals new insights into the changing disease outbreak patterns in Kenya. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Dec 4;8(12):e3364.

APÊNDICE A

SHORT REPORT

Open Access

Microsatellite loci cross-species transferability in *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae): a cost-effective approach for population genetics studies

Laura Cristina Multini¹, Mauro Toledo Marrelli^{1,2} and André Barretto Bruno Wilke^{2*}

Abstract

Background: *Aedes fluviatilis* is a neotropical mosquito species thought to be a potential vector of Yellow Fever viruses and can be infected with *Plasmodium gallinaceum* in laboratory. A better understanding of its genetic structure is very important to understand its epidemiologic potential and how it is responding to urbanization. The objective of this study was to survey the transferability of microsatellites loci developed for other *Aedes* to *Ae. fluviatilis*.

Findings: We tested in *Ae. fluviatilis* 40 pairs of primers known to flank microsatellite regions in *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Aedes caspius*, and found eight loci that amplified consistently. The number of alleles per locus ranged from 2 to 15, and the expected heterozygosity ranged from 0.09 to 0.85.

Conclusions: We found that several microsatellite primers successfully transferred to *Ae. fluviatilis*. This finding opens avenues for cost-effective optimization of high-resolution population genetic tools.

Keywords: *Aedes fluviatilis*, Microsatellite, Culicidae, Genetic structure

Findings

Background

Aedes fluviatilis (Lutz, 1904) [1] is a neotropical species found in Central and South America [2]. These mosquitoes can be found in wild, semi wild, urbans and sub-urbans environments [3]. Females are highly anthropophilic, more active during the day but can also bite at night and have been observed blood feeding while already developing eggs [4]. *Ae. fluviatilis* mosquitoes are considered a potential vector of the yellow fever viruses, are naturally infected with *Wolbachia* (wFlu) and can be experimentally infected with *Plasmodium gallinaceum* [5–7].

Previous studies showed that *Ae. fluviatilis* is adapted to the urban environment [8, 9]. Considering, the scarce information about this species biology and ecology, a better understanding of its genetic structure is important

to access its epidemiologic potential and how it is responding to increasing urbanization. However, no molecular markers are currently available for population genetic studies to better understand adaptation and selection processes affecting this culicid.

Microsatellites or Simple Sequence Repeats (SSR) are molecular markers commonly used for population genetics studies, they are repetitive non-codon DNA regions composed by 1 to 6 base pairs in tandem, present in eukaryotic and prokaryotic genomes and are very useful to analyze the genetic structure of mosquitoes [10, 11]. However only a few species have specific designed microsatellite primers and their development is not a simple task, a fact that limits its utilization in a broader spectrum of species.

Transferability of microsatellite loci between close taxa have been successfully performed before [12, 13], reducing primer development cost encouraging studies of population genetic structure in species with no specific developed microsatellite loci. Our objective was to survey the transferability to *Ae. fluviatilis* of microsatellite

* Correspondence: andrebw.br@gmail.com

²Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, São Paulo, SP CEP-01246-904, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

Table 1 Microsatellite loci amplified in *Aedes fluviatilis*

Locus	Sequences 5'-3'	Repetitive motif	Source species	T (°C)	Size range	References
OchcB5	F: GCTTCGAATCTTGATGAGCA R: TGGATGCAGAGTGTT TTGGA	CAC	<i>Ae. caspius</i>	52* (55)	194-196* (155–157)	Porretta et al. [15]
OchcB9	F: CCAAAACACTCTGCATCCAA R: GGACTGGCCGAATACAGAGA	CTA	<i>Ae. caspius</i>	55	90-288* (272–282)	Porretta et al. [15]
OchcD11	F: TTCGACTCAGTTCGACGAGA R: GGTCAATTCGGTTGAGTGGTT	GT	<i>Ae. caspius</i>	55	88-132* (135–148)	Porretta et al. [15]
Alb-tri-3	F: AGATGTGTCGCAATGCTTCC R: GATTCGGTGATGTTGAGGCC	AGA	<i>Ae. albopictus</i>	56	93-453* (123–153)	Beebe et al. [19]
Alb-tri-20	F: GTGCCGTTGATCATCTGTC R: TCCAGCACCGTGAGTAATCC	GTG	<i>Ae. albopictus</i>	56	105-120* (165–201)	Beebe et al. [19]
Alb-tri-33	F: GGCTGCTGTTGTTGGTACG R: CACGTTCAATCACCGGTTCC	GGC	<i>Ae. albopictus</i>	56	102-219* (137–182)	Beebe et al. [19]
Alb-tri-44	F: CACTCGCGCGTGTCTTC R: GACGCACCATCAGCATCATC	CAC	<i>Ae. albopictus</i>	56	165-180* (173–212)	Beebe et al. [19]
AEDC	F: TGCAGGCCAGATGCACAGCC R: TCCGCTGCCGTTGGCGTGAAC	GTA	<i>Ae. aegypti</i>	60	246-477* (210–230)	Chambers et al. [17]

T = annealing temperature; *Values found in *Aedes fluviatilis*. In parenthesis, size range found in original studies

primers previously developed for *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Aedes caspius*.

Methods

Forty microsatellite primers originally designed for *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* or *Ae. caspius* were tested in nine *Ae. fluviatilis* populations composed of 30 female mosquitoes each, comprising a total of 270 individuals, collected in urban parks throughout the city of São Paulo [8]. DNA samples were extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturers' protocol.

PCR reactions were performed as in Huber et al. [14], Porretta et al. [15], Porretta et al. [16], Chambers et al. [17], Delatte et al. [18], Beebe et al. [19] in an E6331000025 Eppendorf Thermocycler (Mastercycler Nexus Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany). A gradient PCR was performed to identify the ideal annealing temperature for primers that did not amplify with the developer's original protocol by testing identical PCR reactions across a range of annealing temperatures. Successful amplifications were size sorted in 1 % agarose gels, stained with GelRed™ dye (Biotium, Hayward, CA, USA) and examined under UV light.

After incorporation of the fluorescent dye (FAM, HEX and NED), PCR products were diluted (1:7) by mixing 3 µL of each product with 21 µL of ultra-pure water for a final volume of 30 µL. A second dilution was performed with 2 µL of the previous dilution suspended in 8.925 µL of formamide HID1 (Applied Biosystems,

Foster City, CA, USA) and 0.075 µL of molecular weight marker GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for a final volume of 11 µL. The samples were sent to the Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo and processed in the automatic sequencer ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Fragment analyzes were performed on the software Gene Marker (v1.85 SoftGenetics, Centre County, State College, PA, USA). The allele number, observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), deviations from Hardy-Weinberg equilibrium and assessment of linkage disequilibrium were calculated in Genepop (v4.2 <http://genepop.curtin.edu.au/>) [20] and Arlequin (v3.5) [21].

Table 2 Characterization of microsatellite loci in *Aedes fluviatilis*

Locus	N _a	H _O	H _E	P
OchcB5	2	0.00000	0.09248	0.00000
OchcB9	5	0.30224	0.37172	0.00000
OchcD11	4	0.92164	0.56264	0.00000
Albtri3	15	0.68605	0.85359	0.01953
Albtri33	3	0.13704	0.14910	0.00495
Albtri20	6	0.11236	0.11912	0.01130
AEDC	3	0.95880	0.50203	0.00000
Albtri44	11	0.89057	0.69567	0.00000

All 270 individuals were analyzed with 8 microsatellite loci; N_a = Number of alleles found in each locus; H_O = Observed Heterozygosity; H_E = Expected Heterozygosity; P value of Hardy-Weinberg equilibrium, in bold significant values after Bonferroni correction

Results and discussion

Our results show that several primers were successfully transferred to *Ae. fluviatilis*, which corroborates the results of Bello & Becerra [12] that successfully used microsatellite primers developed for *Ae. caspius* in *Ae. taeniorhynchus*. The 8 microsatellite primer pairs that successfully transferred to *Ae. fluviatilis* (OchcB5, OchcB9, OchcD11, AEDC, Albtri-3, Albtri-20, Albtri-33 and Albtri-44) (Table 1) were found to be moderately polymorphic, which may not be surprising since microsatellite loci in *Aedes* mosquitoes are often less polymorphic than loci developed for other Culicidae genera (e.g. *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles funestus*) [22–24].

The number of alleles ranged from 2 to 15 per locus per population, the allele sizes were different from the alleles found in original manuscripts, except for locus OchcB5. Although locus Albtri3 had a high number of alleles per locus in *Ae. fluviatilis*, two alleles were found most frequently in the populations examined. Tests for Hardy-Weinberg equilibrium were made for the 8 functional microsatellite loci (Table 2). The H_E values were higher than the H_O values in 5 of 8 conducted tests (Table 2). After 150 possible tests, linkage disequilibrium was found between the loci OchcB9 and Albtri20; OchcB9 and Albtri33; OchcD11 and Albtri3; Albtri33 and Albtri20; and OchcD11 and Albtri33, however none of the linkages were considered significant, once no two loci were consistently correlated across the tested mosquitoes. The highest level of polymorphism was found in locus Albtri3. In contrast OchcB5 was close to monomorphic and might not be useful for *Ae. fluviatilis* genetic structure studies although additional populations should be tested. Both Albtri20 and Albtri33 were monomorphic in one of the nine populations. The other loci were moderately polymorphic and potentially very useful in future population genetics analyses of this species.

Null alleles, which occur when mutations in the primer regions prevent primers from annealing, are commonly found in studies using microsatellite markers [23]. Their presence can lead to incorrect assumptions of low genetic diversity and possibly consequent overestimation of Wright's F -statistics values [25]. Although caution is recommended regarding the use of microsatellite loci that may have null alleles, as they are less informative and may be more ambiguous, they still could be included in the analysis if their bias do not influence the results significantly. [13, 23, 25]. Also, cross-species microsatellite loci transfer might result in an ascertainment bias, which means that rates of variability may be consistently lower in the new species than in the species for which the markers were developed. This may be erroneously interpreted as evolutionary dynamics fluctuations

among species. However, this bias is drastically diminished when the target and original populations have distinct demographic patterns [26].

Cross-species microsatellite loci transferability from *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and *Ae. caspius* to *Ae. fluviatilis* demonstrate that loci developed for a few species can be recast for population genetic studies of less well studied species. This finding may open a new range of genetic structure studies of poorly known and/or neglected mosquitoes, e.g. secondary epidemiological importance species as well as a cost-effective genetic population accessible tool.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LCM, ABBW and MTM conceived and designed the experiments. LCM performed the experiments. LCM and ABBW analyzed the data. LCM, ABBW and MTM wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for providing financial support (Grant 2013/15313-4). LCM is a fellow of FAPESP (2013/22347-2). ABBW is the recipient of a postdoctoral fellowship from FAPESP (2012/19117-2).

Author details

¹Institute of Tropical Medicine of São Paulo, University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, São Paulo, SP CEP 05403-000, Brazil.

²Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, São Paulo, SP CEP-01246-904, Brazil.

Received: 23 September 2015 Accepted: 10 December 2015

Published online: 15 December 2015

References

- 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):e0133602.
- WRBU. Walter Reed Biosystematics Unit. Systematic Catalogue of Culicidae. 2013. <http://www.wrbu.org/>. Accessed 07 Oct 2013.
- Cônsoli RAGB, Williams P, Moreno EC, Santos BS. Features of reproduction in laboratory reared *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983;78:37–47.
- Carvalho GC, Malafronte RS, Izumisawa CM, Teixeira RS, Natal L, Marrelli MT. Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol*. 2014;39:146–52.
- Davis NC, Shannon RC. Studies on yellow fever in South America: attempts to transmit the virus with certain Aedine and Sabethine mosquitoes and with Triatomas (Hemiptera). *Am J Trop Med Hyg*. 1931;11:21–9.
- de Camargo MV T, Cônsoli RAGB, Williams P, Krettl AU. Factors influencing the development of *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes fluviatilis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983;78:83–94.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al. A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*. 2009;139:1268–78.
- Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Jr W, Urbinatti PR, Carvalho GC, Paula MB, Fernandes A, et al. Mosquito fauna in municipal parks of São Paulo City, Brazil: a preliminary survey. *J Am Mosq Control Assoc*. 2013;29:275–9.
- Ceretti-Júnior W, Medeiros-Sousa AR, Wilke ABB, Strobil RC, Orico LD, Teixeira RS, et al. Mosquito faunal survey in a central park of the city of São Paulo, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc*. 2015;31:172–6.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res*. 2000;10:967–81.

11. Edillo FE, Tripet F, McAbee RD, Foppa M, Lanzaro GC, Cornel AJ, et al. A set of broadly applicable microsatellite markers for analyzing the structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) populations. *J Med Entomol*. 2007;44:145–9.
12. Bello F, Becerra V. Genetic variability and heterogeneity of Venezuelan equine encephalitis virus vector *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) populations of the Colombian Atlantic coast, based on microsatellite loci. *Genet Mol Res*. 2009;8:1179–90.
13. Belisário CJ, Pessoa GCD, Santos PF, Dias LS, Rosa ACL, Diotaiuti L. Markers for the population genetics studies of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasit Vectors*. 2015;8:269.
14. Huber K, Mousson L, Rodhain F, Failloux AB. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. *Mol Ecol Notes*. 2001;1:219–22.
15. Porretta D, Bellini R, Urbanelli S. Characterization of microsatellite markers in the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Diptera: Culicidae). *Mol Ecol Notes*. 2005;5:48–50.
16. Porretta D, Gargani M, Bellini R, Calvitti M, Urbanelli S. Isolation of microsatellite markers in the tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse). *Mol Ecol Notes*. 2006;6:880–1.
17. 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;98:202–10.
18. Delatte H, Toty C, Boyer S, Bouetard A, Bastien F, Fontenille D. Evidence of habitat structuring *Aedes albopictus* populations in Reunion Island. *PLoS Trop Dis*. 2013;7:e2111.
19. Beebe NW, Ambrose L, Hill LA, Davis JB, Hapgood G, Cooper RD, et al. Tracing the tiger: population genetics provides valuable insights into the *Aedes (Stegomyia) albopictus* invasion of the Australasian Region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):e2361.
20. Rousset F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour*. 2008;8:103–6.
21. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2005;1:47–50.
22. Samb B, Dia I, Konate L, Ayala D, Fontenille D, Cohuet A. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles funestus*, in a recently re-colonized area of the Senegal River basin and human-induced environmental changes. *Parasit Vectors*. 2012;5:188.
23. Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-Soria, Brown JE, Powell JR. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e3167.
24. Wilke ABB, Vidal PO, Suesdek L, Marrelli MT. Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. 2014;7:468.
25. Carlsson J. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *J Hered*. 2008;99(6):616–23.
26. Li B, Kimmel M. Factors influencing ascertainment bias of microsatellite allele sizes: impact on estimates of mutation rates. *Genetics*. 2013;195:563–72.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit