

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLÁUDIA MAZZA RONCHI

Variabilidade de populações de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1884)  
(Diptera: Culicidae) de diferentes áreas urbanas.

CURITIBA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLÁUDIA MAZZA RONCHI

Variabilidade de populações de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1984)  
(Diptera: Culicidae) de diferentes áreas urbanas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas área de Concentração Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva.

Co-orientadora: Prof. Dra. Adriana Lacerda Twerdochilib

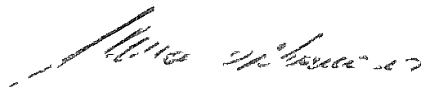
CURITIBA

2015

ANA CLAUDIA MAZZA RONCHI

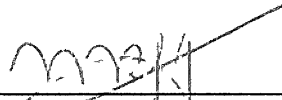
Variabilidade de populações de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1884)  
(Diptera Culicidae) de diferentes áreas urbanas'

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Mestre  
em Ciências Biológicas no Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas, Área de Concentração em Entomologia da Universidade Federal  
do Paraná, pela Comissão formada pelos professores



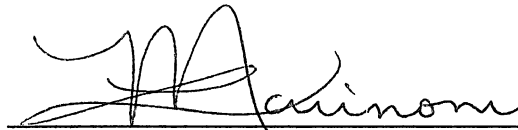
---

Prof. Dr. Mario Antônio Navarro da Silva (Orientador)  
(UFPR)



---

Profa. Dra. Marión do Rocio Foerster  
(SEPT/UFPR)



---

Profa. Dra. Luciane Marinoni  
(UFPR)

Curitiba, 29 de junho de 2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todas as forças superiores, que de alguma maneira me ajudaram a não desistir dos meus objetivos.

Ao meu orientador, prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva por todo o apoio, incentivo, puxões de orelha, compreensão e principalmente por ter acreditado e não desistido de mim (mesmo em todo período out), meu muito obrigada!

A minha co-orientadora, prof. Dr. Adriana L. Twerdochilib, pelos ensinamentos, conversas, discussões, ajuda e apoio.

A minha família que teve que aguentar altos níveis e índices de estresse, oscilação da minha saúde e sem dúvida por todo amor e carinho de forma incondicional. Aos meus irmãozinhos, vocês são tudo na minha vida. A minha titi Carol e Zizão, por tudo!

A minha avó Maria do Rosário Homem de Melo Mazza, por todo acolhimento, carinho, dedicação, ajuda, por sempre acreditar e nunca desistir de mim! E ao meu grande mestre, que já fez sua passagem um tempo antes sem conseguir ver nesse plano mais essa minha conquista, ao amor da minha vida, meu avô José Alberto Mazza. Meus avos, Marô e Zezinho, por e pra vocês que eu dedico essa e todas as minhas maiores e melhores conquistas, amo vocês infinitamente

A minha grande incentivadora e amiga, Dr Andreia Aparecida Barbosa ou minha Sis, pela amizade sincera de anos. Não existem palavras pra descrever o quanto você e sua amizade são essenciais em minha vida, agradeço todas as coisas que já fez e faz por mim.

Ao Dr Mario Luis Pessôa Guedes, pelo amparo desde o inicio dentro do laboratório. Por todos os conhecimentos transmitidos, pelas conversas infinitas e discussões, desde identificações de mosquitos, livros, rock n roll, molecular, morfometria e vida. Sua ajuda foi fundamental para o progresso e término do trabalho. Obrigada pela amizade, meu irmão!

Aos colegas de pós-graduação, e em especial, as amizades que marcaram o coração e vou levar pra vida: Marcelo Moussallem (Meu time, por todas as nossas infinitas conversas de cantina-a-bar, discussão desde conceitos de espécie a resolução de problemas estatísticos), João (Tapa, brother, irmão... por todo nosso convívio, dentro e fora da pós-graduação, por toda amizade e carinho, nosso e das nossas famílias).

Aos colegas de laboratório.

As meninas da sala e agregadas, por todo carinho e amizade.

Aos amigos de longa, longa data que a Biologia uniu e nada separa: Luana, Edson, Ferzinha, Danny, Marcio, Rodrigo.

Ao Willy, por todo convívio quase que diário, pelas infinitas conversas e mensagens.

Aos amigos queridos, que apesar da distância física, moram dentro do coração: Renato, Rayra, Heron, Marcinho e Luís cabeludo.

À minha amiga-irmã de infância, Bruna Tavares. Love ya!

Aos professores da pós-graduação, por todos os conhecimentos.

Aos funcionários, principalmente a Dona Vicentina, por todo o cuidado e carinho que tem por todos, ao Seu Luís, pelas infinitas conversas que me fizeram perder o horário na portaria.

Ao programa de pós-graduação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

## RESUMO

O *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse 1894), conhecido como tigre asiático é considerado uma espécie invasora em diferentes países, no Brasil foi detectada pela primeira vez em 1986 e hoje está presente em grande parte do território nacional apresentando relevância epidemiológica devido à sua capacidade de colonizar ambientes silvestres e antrópicos associado ao seu elevado potencial vetorial para transmissão de diferentes arboviroses. Diante da relevância da espécie é de sua ampla distribuição o objetivo do estudo foi avaliar a diversidade genética de *A. albopictus*, utilizando duas ferramentas: morfometria geométrica alar e utilização do DNA mitocondrial. Foram estudadas populações provenientes de cinco municípios: Cianorte (PR), Foz do Iguaçu (PR), Maringá (PR), Rondonópolis (MT) e Porto Velho (RO). Foram utilizados 149 exemplares de mosquitos, sendo 11 de Rondonópolis, 42 de Maringá, 23 de Foz do Iguaçu, 19 de Cianorte e 54 de Porto Velhos os quais tiveram suas asas fotografadas e delimitadas 23 marcos anatômicos. Nas análises moleculares foi utilizado o gene mitocondrial ND5. Dos cinquenta indivíduos sequenciados, foram encontrados seis haplótipos, onde cinco foram detectados na área urbana de Maringá, dois em Foz do Iguaçu e nas demais localidades apenas com um haplótipo, as populações de Cianorte, Rondonópolis e Porto Velho, apresentaram o mesmo haplótipo. Foi detectada baixa variabilidade genética entre as populações e alta variabilidade intrapopulacional. Com auxílio da morfometria geométrica foi possível discriminar as populações de *A. albopictus*.

## ABSTRACT

The *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse 1894) - also known as Asiatic tiger - is considered an invasive species in different countries. It was detected in Brazil for the first time in 1986 and today it is present in a large part of the national territory, presenting epidemiologic relevance due to its ability to colonize wild and man-made environments associated to its high potential vector to the transmission of different arboviruses. Facing the relevance of the species and its wide distribution, the intention of this review was to evaluate *A. albopictus*' genetic diversity, using two ways: the geometric morphometric of the wing and utilization of mitochondrial DNA. The population from five cities have been studied: Cianorte (PR), Foz do Iguaçu (PR), Maringá (PR), Rondonópolis (MT) and Porto Velho (RO). Have been used 149 samples of mosquitoes, which 11 were from Rondonópolis, 42 from Maringá, 23 from Foz do Iguaçu, 19 from Cianorte and 54 from Porto Velho that have had their wings photographed and 23 anatomic marks delimited. In the molecular analysis, the gene ND5 was used. From the 50 individuals sequenced, 6 haplotypes have been found, which 5 were detected in the urban area of Maringá, 2 in Foz do Iguaçu and just one in the other locations. The populations of Cianorte, Rondonópolis and Porto Velho presented the same haplotype. Low genetic variability and high intrapopulation variability was found. With the aid of geometric morphometry was possible to discriminate *A. albopictus* population.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Localidades onde foram realizadas amostragens das populações dos vetores.....	22
FIGURA 2: Etapas da manutenção das colônias .....	24
FIGURA 3: Esquema dos métodos adotados para obtenção das imagens das asas de <i>A. albopictus</i> analisadas através da técnica de morfometria geométrica.....	25
FIGURA 4: Posição dos 23 marcos anatômicos (LMs) utilizados na asa direita de fêmeas de <i>Aedes albopictus</i> .....	26
FIGURA 5: Produto de PCR de 400 pb que representa uma porção do gene ND5. ....	31
FIGURA 6: Deformações dos 23 marcos anatômicos (LMs) evidenciadas no primeiro (PC1) e segundo (PC2) componentes principais, escores positivo e negativo. ....	34
FIGURA 7: Análise de Variáveis Canônicas utilizando a forma das asas das cinco populações estudadas. As cores representam as populações.....	35
FIGURA 8: Deformações das LMs evidenciadas no primeiro (CV1) e segundo (CV2) eixo canônico de variáveis, escores positivo e negativo.....	36
FIGURA 9: Primeiro eixo da análise PLS (two-block partial least-squares analysis). Correlação entre as variáveis de forma (Block 1 PLS1) e variáveis abióticas (Block 2 PLS1) .....	38
FIGURA 10: Sítios variáveis em 6 haplótipos identificados de uma região de 332 pb do gene mitocondrial ND5 .....	39
FIGURA 11: Composição média dos nucleotídeos .....	39
FIGURA 12: Rede de haplótipos do gene ND5 de <i>Aedes albopictus</i> .....	41
FIGURA 13: Relação entre distancia genética e a distancia geográfica estabelecida pelo teste de Mantel.....	43
FIGURA 13: Árvore de Neighbor-joining (NJ) dos haplótipos de <i>A. albopictus</i> usando o modelo de distância genética do parâmetro-2 de Kimura .....	44



## LISTA DE TABELAS

TABELA I: Localização dos municípios através de coordenadas geográficas e os respectivos anos de coleta.....	24
TABELA II: Descrição dos marcos anatômicos inseridos nos pontos de convergência e divergência das veias alares de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> , seguindo a nomenclatura morfológica.....	26
TABELA III: Variáveis climáticas utilizadas do banco de dados climáticos Wordclim (Bioclim) obtidas através do programa DIVA-GIS 7.4.0 e sua descrição e resolução temporal .....	28
TABELA IV: Classificação dos municípios de acordo com IBGE, 2014.....	33
TABELA V: Coeficientes do PLS1. Incluindo as 19 variáveis climáticas extraídas do BioClim .....	37
TABELA VI: Frequências haplotípicas nas cinco amostras de <i>A. albopictus</i> .....	40
TABELA VII: Distribuição dos haplótipos encontrados para o gene ND5 deste estudo e de outras localidades já estudadas de <i>A. albopictus</i> .....	41
TABELA VIII: Análise da variância molecular, considerando os grupos das populações de <i>Aedes albopictus</i> .....	42
TABELA IX: Diversidade genética e testes de neutralidade calculados das cinco populações de <i>Aedes albopictus</i> .....	44

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS .....	13
2.1 Objetivo Geral .....	13
2.2 Objetivos Específicos. ....	13
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 <i>Aedes albopictus</i> .....	14
3.2 Variabilidade.....	16
3.3 DNA mitocondrial.....	17
3.4 Morfometria geométrica.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Áreas de Estudo.....	22
4.2 Procedimento em laboratório.....	23
4.3 Morfometria geométrica.....	25
4.4 Extração de DNA.....	29
4.4.1 Amplificação do gene mitocondrial ND5. ....	30
4.4.2 Reação de Sequenciamento.....	31
4.4.3 Análise das sequências.....	31
5 RESULTADOS .....	34
5.1 Morfometria .....	34
5.2 Análise Molecular. ....	38
5.2.1 Distribuição e frequência dos haplótipos.....	39
5.2.2 Rede de haplótipos.....	40
5.2.3 Análise da variância molecular (AMOVA) e interferência do fluxo gênico.....	42
5.2.4 Diversidade genética e teste de neutralidade.....	44
5.2.5 Classificação dos municípios.....	45
6 DISCUSSÃO.....	46
7 RESULTADOS .....	49
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

## 1 INTRODUÇÃO

Culicidae pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, infraordem Culicomorpha, e está dividida em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae, possuindo 3620 espécies e subespécies descritas, distribuídas em 175 gêneros e 145 subgêneros (HARBACH 2007, GUEDES 2012). Culicidae apresenta elevada importância epidemiológica, devido ao número de espécies envolvidas na veiculação de agentes patogênicos (NEVES 1976; FORATTINI 2002). Dentre estas destaca-se o gênero *Aedes* (Meigen, 1818), que engloba centenas de espécies.

O gênero *Aedes* reúne representantes de importância epidemiológica e constitui um grupo com capacidade de adaptação ao ambiente humano. Os criadouros em geral são recipientes, tanto naturais como artificiais, de caráter transitório, onde a eclosão dos ovos, colocados fora da coleção líquida, depende da flutuação do nível de água. Em períodos de acúmulo de pluviosidade a densidade destes Culicidae aumenta de forma exponencial (FORATTINI 1965, 2002; HUANG et al., 2010).

As espécies de importância epidemiológica estão agrupadas em dois subgêneros, *Stegomyia*, presente no Velho Mundo, particularmente na região Etiópica, com duas de suas espécies introduzidas em regiões fora de sua distribuição biogeográfica original, incluindo o Brasil: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895), (FORATTINI 1965; CONSOLI e LOURENÇO DE OLIVEIRA 1994) sendo uma das espécies mais importantes do ponto de vista epidemiológico.

As duas espécies podem existir na mesma região e utilizar criadouros de características semelhantes. Colonizam rapidamente locais onde as condições

são favoráveis para sua proliferação e, embora as fêmeas não percorram grandes distâncias, sua dispersão é rápida dependendo da disponibilidade de sítios para oviposição (FORATTINI, 2002; LOUNIBOS 2002; FANTINATTI 2007).

*A. aegypti* desenvolveu um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico, com hábito predominantemente urbano (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA 1994). Já *A. albopictus*, tem o potencial de se dispersar em diversos habitats, tanto na zona rural como na urbana (MARQUES & FORATTINI 2001), e sua presença nessas áreas evidencia a dispersão do ambiente silvestre para o urbano (ALBUQUERQUE *et al.* 2000).

Até o momento não foi apresentado estudo que aponte o *A. albopictus* como vetor da Dengue nas Américas, entretanto seu potencial não pode ser ignorado (PASSOS *et al.*, 2003). Alguns trabalhos demonstram a competência vetorial de *A. albopictus* para 23 arboviroses (MOORE & MITCHELL, 1997). SERUFO *et al.* (1993) isolaram o vírus DEN-1 a partir de larvas de *A. albopictus* no Brasil. Segundo LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.* (2003) exemplares de *A. albopictus* provaram estar experimentalmente suscetíveis ao vírus da dengue e febre amarela, entretanto, CASTRO *et al.* (2004), detectaram alta taxa de infecção na saliva do vetor.

Para insetos que são submetidos a várias pressões de seleção e mudanças climáticas, as variações fenotípicas são frequentemente observadas e são fontes de muitas questões epidemiológicas e taxonômicas. Há de fato um crescente corpo de evidências de que a plasticidade fenotípica tem importância evolutiva (PIGLIUCCI 2005; DUJARDIN 2008). Número expressivo de estudos abordou a variabilidade genética de populações de culicídeos. Nas análises da

variabilidade são utilizados marcadores moleculares, como isoenzimas (LARANJA et al 2003, SOUZA-POLEZZI & BICUDO 2004), RAPD (PADUAN et al 2006), DNA mitocondrial (BOSIO et al 2005) e microsatélites (CHAMBERS et al 2007).

Além disso, outra ferramenta que vem sendo utilizada, é a morfometria geométrica, capaz de estimar variação morfométrica intra e interpopulacional, nos culicídeos, os marcos anatômicos, são pontos de cruzamento de nervuras alares (DUJARDIN, 2008).

Por isso a importância do conhecimento da estruturação genética e dinâmica populacional é fundamental para ampliar o conhecimento da espécie diante do risco potencial de transmissão de agentes etiológicos ao homem.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar a diversidade e estrutura genética de *Aedes albopictus* em populações provenientes de cinco municípios utilizando análise do DNA mitocondrial ND5 e morfometria geométrica alar.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a estruturação e o grau de distância genética de cinco populações de *A. albopictus* utilizando o marcador molecular ND5;
- Estimar a variabilidade genética intra e interpopulacional.
- Avaliar variação no fenótipo dos indivíduos de populações brasileiras utilizando descritores de forma e tamanho da asa, testando se a geometria alar apresenta diferenças correlacionadas com estruturação genética.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Aedes albopictus*

*Aedes albopictus* é uma espécie de origem asiática, cuja distribuição original engloba desde o Sudeste do continente até os limites com a Cordilheira do Himalaia (FORATTINI 2002), no Brasil, foi encontrado pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro, em 1986 (FORATTINI 1986) e no mesmo ano, foi encontrado nos estados de São Paulo e Minas Gerais (BURALI *et al* 1991).

*A. albopictus* apresenta hábitos ecléticos quanto ao seu habitat, sendo zoofílico, exofílico e silvestre, com menor grau de domiciliação que o *Aedes aegypti*, utilizando diferentes ecotopos, naturais ou artificiais, para o desenvolvimento dos imaturos, como internódios de bambu, buracos em árvores, cascas de frutas em florestas ou plantações (FORATTINI, 1986; GOMES; MARQUES, 1988; NATAL *et al.*, 1997; SANTOS; NASCIMENTO, 1998). Também é encontrado em criadouros artificiais, produzidos pela ação antrópica, como por exemplo: pneus, sucatas de veículos e eletrodomésticos, entulhos de construção civil e recipientes plásticos (FORATTINI *et al.*, 1998; CALADO & NAVARRO-SILVA, 2002).

O ciclo de oviposição é estritamente diurno, com tendência crescente entre 13h às 16h, sendo colocados em média 60 a 65 ovos por fêmea. Esta espécie apresenta elevada facilidade para adaptar-se a temperaturas baixas, provavelmente, pela capacidade de sintetizar elevada quantidade de lipídios (FORATTINI, 1986, 2002; CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; PAUPY *et al.*, 2009). Os ovos do *A. albopictus* são fertilizados momentos antes da postura, após isso, inicia-se o desenvolvimento embrionário, cuja duração

depende diretamente da temperatura e umidade relativa (ALENCAR, 2008). A temperatura é um fator crítico em insetos, afetando diretamente o tempo do ciclo de vida aquática, mortalidade, e índices de desenvolvimento (AYTEKIN, 2009).

Esse mosquito possui relevância epidemiológica devido à sua capacidade de colonizar ambientes silvestres e antrópicos e ao seu elevado potencial vetorial para diferentes agentes patogênicos que podem afetar o ser humano e outros animais (FERNÁNDEZ & FORATTINI, 2003).

No continente asiático, o *A. albopictus* é o principal transmissor do vírus da dengue em epidemias ocorridas Japão, Indonésia, Seychelles, Tailândia, Malásia (HAWLEY 1988; MAIA 2011) e posteriormente também no Havaí (EFFLER *et al.*, 2005) e do vírus Chikungunya na África Central, Ásia e Europa. Este vetor pode ser considerado mais eficiente do que *A. aegypti* na transmissão de algumas variantes do vírus Chikungunya (DUBRULLE *et al.*, 2009; VAZEILLE *et al.*, 2011). Além disso, também é apontado como vetor de *Dirofilaria immitis* Leidy, 1956 no Japão (KONISHI, 1989) e de diversos arbovírus como o da encefalite do tipo leste, nos EUA (MITCHELI *et al.*, 1992). Para o continente Americano, foi relatado em 1997 por IBAÑES-BERNAL *et al.* o encontro de *A. albopictus* infectados com o vírus da dengue.

Existem ferramentas que auxiliam na compreensão da distribuição do mosquito fora do continente Asiático, como os estudos de genética populacional, proposto por KAMBHAMPATI *et al.* (1991). É provável que o intenso comércio de pneus usados com ovos aderidos a sua superfície tenha favorecido a rápida dispersão desta espécie, especialmente na década de 1980, além do tráfego intercontinental de outros produtos e as rotas variadas



também tem sido sugeridas como mecanismo de dispersão passiva (REITER 1998, LOUNIBOS 2002, BENTO *et.al.* 2007, PAUPY *et al.*, 2009). Entre novas regiões ocupadas na década de 1980, o primeiro registro nas Américas de *A. albopictus* foi no sul do EUA em 1985 (MOORE E MITCHELL 1997) e o Brasil quando foi detectado pela primeira vez em 1986 (FORATTINI , 1986).

Em território nacional, o *A. albopictus* pode se tornar um sério problema de saúde pública devido ao importante papel que desempenha na transmissão de arboviroses, apresentando frequentemente uma alta susceptibilidade a certos vírus, inclusive em alguns casos superior à do *A. aegypti* (MITCHELL, 1995). Outra preocupação é a possibilidade de transferência de focos silvestres do vírus da febre amarela para centros urbanos, pois essa espécie frequenta ambiente urbano e rural, apresentando também potencial para desenvolvimento do vírus amarílico (ALMEIDA et al., 2006).

### 3.2 Variabilidade

As diferentes características biológicas de Culicidae caracterizam o grupo por apresentar uma dinâmica evolutiva peculiar, que pode se apresentar em curtos intervalos de tempo e, seu ciclo de vida é influenciado por condições ambientais variáveis como temperatura, pluviosidade e disponibilidade de coleções hídricas para reprodução (FORATTINI, 2002; MORATORI, 2009).

Os insetos terrestres são afetados severamente pelas oscilações em relação à taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento, pressão de seleção de inseticidas usados para controle de vetores (HODKINSON, 2005).

Devido a essas capacidades e por apresentarem ciclo de vida rápido e curto, nota-se frequentemente uma acelerada evolução de suas populações, devido a sua grande capacidade de adaptação (FORATTINI, 2002; MORATORI, 2009).

A compreensão da variação genética dentro e entre as populações é necessário para compreender a história evolutiva de populações de mosquitos e da epidemiologia da doença (YAN *et al.*, 1998).

### 3.4 DNA mitocondrial

Existem várias técnicas disponíveis para detectar poliformismos de DNA, das quais podemos destacar: DNA mitocondrial (DNAMt), poliformismo de DNA amplificado randomicamente (RAPD), isoenzimas, poliformismo do comprimento de fragmentos de restrição (rflp), genes de RNA ribossomal (RNAr), sequenciamento e microssatélite. Uma das vantagens da utilização desses marcadores é a utilização de pequena quantidade de material biológico (MITCHELL-OLDS, 1995).

A utilização do DNA mitocondrial tem crescido nos últimos anos para inferir a variabilidade genética, o fluxo gênico e a história evolutiva de diversos grupos de organismos, incluindo os insetos (LIMA JÚNIOR & SCARPASSA, 2009; PAUPY *et al.*, 2012). O DNA mitocondrial possui uma região de controle responsável pela iniciação da replicação e transcrição (OKIMOTO *et al.*, 1992; DESJARDINS & MORAIS, 1999), apresenta formato de círculo de fita dupla, com 37 genes e tamanho aproximado de 16.569 pb, que codificam 22 RNAs, 2

RNAs e 13 proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa (ROBERTIS; 2006, LANG et al., 1999; BOORE, 1999).

Além disso, o DNAm<sub>t</sub> apresenta características próprias, como sistema independente de replicação, transcrição e tradução (WALLACE, 1992), possui também uma taxa de mutação até dez vezes maior que o DNA nuclear (BEATY & MARQUARDT, 1996). De toda composição genética que constituem o DNAm<sub>t</sub>, a região que codifica a subunidade cinco da proteína NADH desidrogenase é uma das mais polimórficas e tem sido utilizada para estudos evolutivos em anofelinos (BESANSKY et al., 1997; MOLINA-CRUZ *et al.*, 2004).

Foram realizados estudos isoenzimáticos em dezoito populações de *A. albopictus* da Itália, quatro populações dos Estados Unidos, quatro populações da Indonésia e quatro populações do Japão mostraram que dos dezoito loci estudados, quinze apresentavam polimorfismo e sugeriram a existência de deriva genética, além de apontar alta similaridade genética entre as populações da Itália e dos Estado Unidos, reforçando a hipótese de que a introdução desta espécie nestes países 6 ocorreram de modo semelhante (URBANELLI *et al.*, 2000). Em vinte e dois loci isoenzimáticos de seis populações da Tailândia, CHAREONVIRIYAPHA et al. (2004) observaram um fluxo gênico limitado, sugerindo uma dispersão geográfica lenta.

Além disso, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al. (2003) estudaram populações de *A. albopictus* originárias do Brasil, dos Estados Unidos e das Ilhas Caiman, onde observaram fluxo gênico restrito e alta diversidade genética entre as populações brasileiras e norte-americanas. Populações de *A. albopictus* provenientes de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Pernambuco foram

analisadas por AYRES et al. (2002) através da técnica de RAPD, onde as populações dos Estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro apresentavam maior similaridade genética, além de constatarem um fluxo gênico restrito entre todas as populações.

GUEDES (2006) utilizou como marcadores os genes mitocondriais Citocromo oxidase II (COII) e Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4 (ND4) e constatou que as populações de *A. albopictus* que estão sob forte influência de deriva genética, e que as populações de Minas Gerais e Rio de Janeiro são idênticas, pois apresentam os mesmos haplótipos para o ND4.

BIRUNGI e MUSTERMANN (2002) estudaram populações dos estados Unidos, Brasil, Madagascar, Malásia, Indonésia e Japão utilizando o gene mitocondrial ND5 e verificaram uma baixa variação genética nas populações e uma alta similaridade entre as populações do Brasil e dos Estados Unidos, porém com evidências de possibilidade de diferentes introduções.

Em populações norte-americanas de *A. vexans*, estudadas com o emprego do gene ND5, foram encontrados 40 haplótipos (SZALANSKI et al., 2006).

FONSECA et al. (2001) analisaram populações de *A. japonicus* proveniente dos Estados Unidos e do Japão utilizando o gene ND4 e encontraram 15 haplótipos.

Toda essa diversidade genética nas populações de *A. albopictus* podem implicar desde populações com maior susceptibilidade e competência vetorial para agentes patogênicos como sugere o estudo realizado por LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al. (2003).

Os marcadores moleculares constituem ferramenta eficiente nos estudos da biologia populacional e quando associado aos estudos de distribuição e biologia, podem fornecer informações fundamentais para a definição de estratégias de controle de insetos vetores.

### 3.3 Morfometria Geométrica

Nos culicídeos, as asas são alongadas e, no sexo masculino, são ligeiramente mais estreitas que do feminino. Quanto à venação e consequente disposição das células, adota-se aqui as interpretações apresentada em (FORATTINI, 1996).

A morfometria tradicional não permite obter informações significativas sobre a forma dos organismos, uma vez que são utilizadas apenas distâncias lineares o que impede a reconstrução dos organismos após as análises multivariadas. Já a morfometria geométrica tem por objetivo descrever e representar as formas sob análise, utilizando os marcos anatômicos ou pontos de referência, através de análises estatísticas para observar possíveis mudanças morfológicas e variações biológicas em relação a forma (BOOKSTEIN, 1997; BOMFIM et al., 2008).

Morfometria geométrica consiste em um método de estudo da geometria das formas a partir das coordenadas geográficas de marcos anatômicos, obtidos através de um sistema de eixos cartesianos, onde pontos são marcados na estrutura corporal de interesse, essas coordenadas são posicionais sobre um plano cartesiano imaginário que delimita a estrutura corporal e posteriormente são colocadas em tabelas de dados, para analisar e comparar as variações morfológicas através de estudos estatísticos, tornando

os indivíduos comparáveis, quanto à variação da forma (ROHLF; MARCUS, 1993; ADAMS et al., 2004) como essa uma ferramenta relevante para determinar variação fenotípica, centra-se nessa variação fenotípica, a sua parametrização e sua relação com fatores extrínsecos (HUGOT & BAYLAC 1996; PERIAGO *et al*, 2008).

Em Culicidae a utilização das asas em estudos morfométricos é particularmente interessante, uma vez que das asas frequentemente correlacionam-se com outras características biológicas dos mosquitos ligadas a sua importância em saúde pública, como capacidade de voo, produção de sons alares de corte pre-cópula, e até fecundidade (BROGDON, 1994).

As análises de morfometria geométrica alar em Culicidae permitem comparar espécies crípticas com a distância geográfica, avaliando dimorfismo sexual alar, variações temporais em laboratório e natureza, assimetria alar, efeitos morfológicos em decorrência da exposição ou não a inseticidas (JIRAKANJANAKIT et al., 2007, 2008)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Áreas de Estudo

Os ovos de *A. aegypti* e *A. albopictus* foram coletados através dos Núcleos de Entomologia das Secretarias dos Estado de Saúde de Rondônia, Mato Grosso e Paraná (Figura 1). Armadilhas foram distribuídas no interior das residências em vários pontos dos municípios, seguindo o padrão da Fundação Nacional de Saúde. As ovitrampas contendo paletas de madeira de 2 cm de largura por 12 cm de comprimento, foram presas em suporte plástico e submersas em 500 ml de solução de feno a 10% (REITER et al. 1991), permanecendo no campo durante cinco dias. Logo após a retirada das paletas do campo, estas foram encaminhadas ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

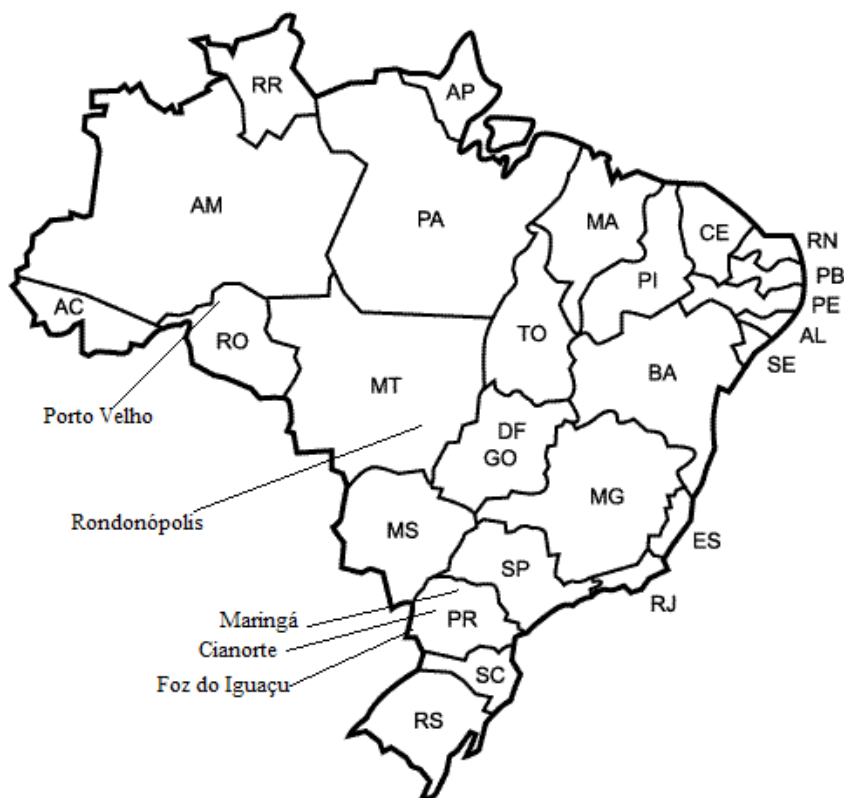


Figura 1. Localidades onde foram realizadas amostragens das populações dos vetores.

## 4.2 Procedimentos em laboratório

O processo de criação foi realizado em condições controladas de temperatura ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade ( $80\pm 10\%$ ) e fotoperíodo (12h: 12h). Para induzir a eclosão, as paletas com ovos foram submersas em copos plásticos de 770 ml contendo água desclorada e ração para gatos triturada (Purina® Cat Chow ®), por 48 horas. As larvas foram retiradas dos copos e colocadas em bandejas com água desclorada limpa. As paletas foram novamente submersas em água com alimento por mais 48 horas para maximizar a eclosão das larvas. As larvas foram transferidas para copos com tampa até a emergência do adulto. Após a emergência dos adultos, foi realizada a triagem do material, separando *Aedes aegypti* de *Aedes albopictus*, em gaiolas de criação e realizando a contagem desses mosquitos (Figura 2). Os exemplares *A. albopictus* foram armazenados em freezer  $-20^\circ\text{C}$ , acondicionados em tubos de microcentrífuga de 1,5mL em etanol absoluto.

No estágio adulto, o *A. albopictus* diferencia-se do *A. aegypti* por apresentar principalmente um desenho de escamas branco-prateadas, formando uma linha reta e longitudinal ao longo do escudo, enquanto este último apresenta na mesma estrutura uma marcação de escamas claras em formato de uma lira (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).



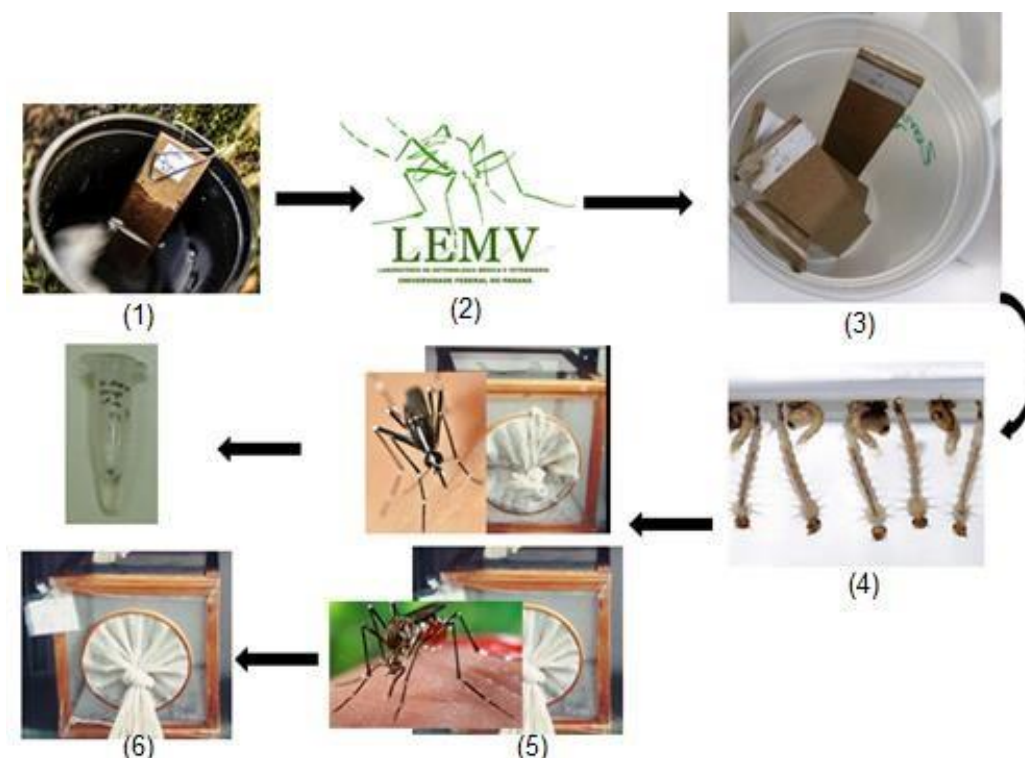


Figura 2. Etapas da manutenção das colônias. (1) Armadilha de oviposição; (2) Paletas com os ovos enviadas ao laboratório; (3) Indução a eclosão dos ovos; (4) Larvas em bandejas de plástico; (5) Mosquitos separados por espécies em gaiolas diferentes (*Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*, respectivamente) e (6) *Aedes albopictus* separados em microtubos de 1,5mL e *Aedes aegypti* foi transferido para outra gaiola para continuidade da criação.

Foram utilizadas populações provenientes de cinco municípios: Rondonópolis (Mato Grosso) apresentando 12 mosquitos, Porto Velho (Rondônia) 65 mosquitos, Maringá 25 mosquitos, Foz do Iguaçu 28 mosquitos e Cianorte 19 mosquitos (Paraná) (Tabela I).

Tabela I. Localização, ano de coleta de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

Município	Estado	Coordenada	Ano Coleta
Foz do Iguaçu	Paraná	25° 32' 49"S 54° 35' 18"W	2012
Maringá	Paraná	13° 1' 2"S 57° 4' 8"W	2012
Cianorte	Paraná	23° 39' 48 "S 52° 36' 20"W	2012
Rondonópolis	Mato Grosso	16° 28' 15"S 54° 38' 08"W	2013
Porto Velho	Rondônia	8° 45' 43"S 63° 54' 7"W	2012

### 4.3 Morfometria Geométrica

Foram utilizadas 149 exemplares de mosquitos ao total, sendo 11 de Rondonópolis, 42 de Maringá, 23 de Foz do Iguaçu, 19 de Cianorte e 54 de Porto Velho.

As asas direitas das fêmeas foram retiradas com auxílio de estilete sob estereomicroscópio Stemi SV6 Zeiss e colocadas em solução de Hipoclorito de Sódio para remoção das escamas. Esse processo foi acompanhado até a remoção total das escamas em cada indivíduo, e após esse procedimento, as asas foram lavadas em solução de Álcool Etílico Absoluto, e montadas sob lamina-lamínula. As asas foram fotografadas, em vista dorsal, utilizando o estereomicroscópio Zeiss Discovery V20 acoplado à câmera AxioCam ERc5s em aumento de 30x (Figura 3).

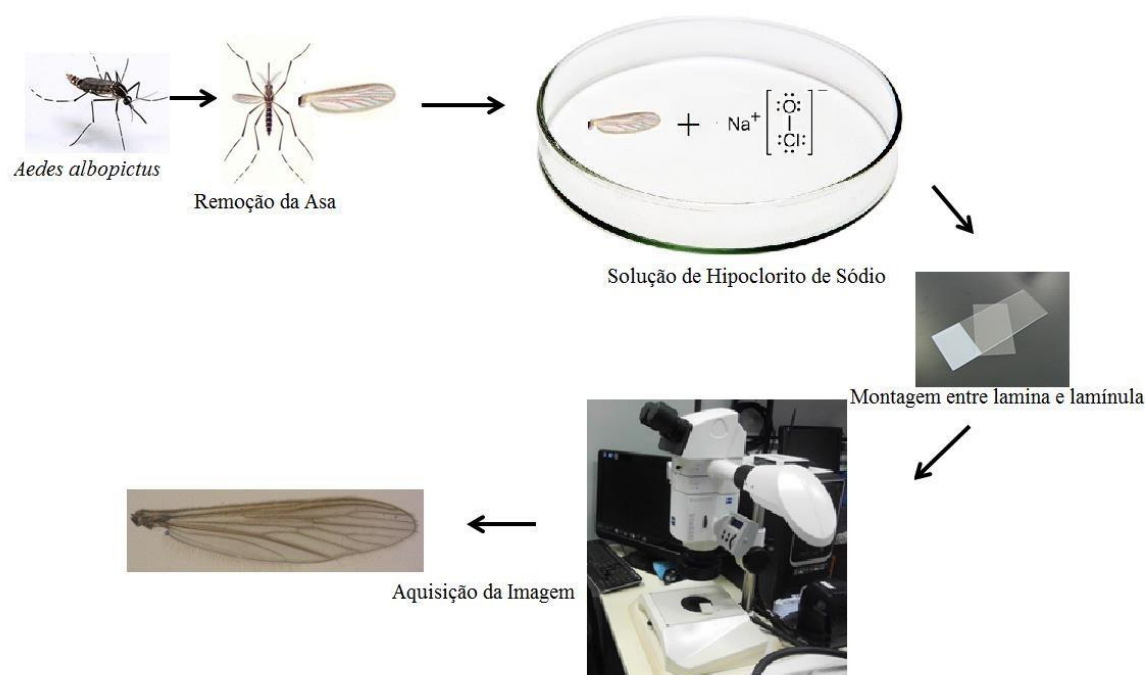


Figura 3. Esquema dos métodos adotados para obtenção das imagens das asas de *A. albopictus* analisadas através da técnica de morfometria geométrica.

Depois de capturadas as imagens, foi gerado um único arquivo de imagens com todos os espécimes do estudo, utilizando o programa TpsUtil (TPS Utility Program), versão 1.38 (ROHLF, 2006). Para digitalizar os marcos anatômicos nas imagens, utilizou-se o Programa TpsDig32, versão 2.05 (ROHLF, 2005). Foram escolhidos 23 marcos anatômicos, caracterizados por conexões e intersecções que fornecem informações acerca da conformação das asas, por justaposição de tecidos (Figura 4). Os *landmarks* (Tabela II) foram introduzidos numa mesma sequencia para cada espécime, por ser este um requisito para estabelecer a homologia espacial das estruturas mediante suas coordenadas, onde cada marco anatômico corresponde a uma coordenada num plano cartesiano imaginário (x, y). Para análise dos dados foi utilizado o programa MorphoJ 1.05f (ROHLF, 2008).



Figura 4 Posição dos 23 marcos anatômicos (LMs) utilizados na asa direita de fêmeas de *Aedes albopictus*.

Tabela II. Descrição dos marcos anatômicos inseridos nos pontos de convergência e divergência das veias alares de fêmeas de *Aedes aegypti*, seguindo a nomenclatura morfológica segundo Forattini (1996).

LM	Localização
1	Base da veia costa (C)
2	Junção da veia umeral (h) e subcosta (Sc)
3	Base da veia radial (R)
4	Intersecção da veia cubital anterior (CuA) e cubital posterior (CuP)

- 5 Base da veia anal (A)
  - 6 Ápice da veia anal (A)
  - 7 Intersecção da veia costa (C) com veia subcosta (Sc)
  - 8 Ápice da veia radio anterior ( $R_1$ );
  - 9 Ápice da veia radial ( $R_2$ )
  - 10 Ápice da veia radial ( $R_3$ )
  - 11 Ramificação da veia radial ( $R_4 + 5$ )
  - 12 Bifurcação da veia media na mediana anterior ( $M_1 + 2$ )
  - 13 Bifurcação da veia média na mediana posterior ( $M_3 + 4$ )
  - 14 Ápice da veia cubital anterior ( $CuA_1$ )
  - 15 Ápice da veia cubital posterior ( $CuA_2$ )
  - 16 Bifurcação da veia cubital (CuA) em cubital anterior ( $CuA_1$ ) e cubital posterior ( $CuA_2$ )
  - 17 Encontro da veia transversal média-cúbito (m-cu) com a veia cúbito anterior ( $CuA_1$ )
  - 18 Encontro da veia transversal radio-média (r-m) com a media (M);
  - 19 Intersecção da veia transversal radio-média (r-m) com radial ( $R_4 + 5$ )
  - 20 Intersecção da veia setor radial ( $Rs$ ) com veia radio ( $R_2 + 3$ )
  - 21 Bifurcação da veia média (M) em média anterior ( $M_1 + 2$ ) e posterior ( $M_3 + 4$ )
  - 22 Bifurcação da veia radial ( $R_2 + 3$ ) em radial dois ( $R_2$ ) e radial três ( $R_3$ )
  - 23 Bifurcação da veia cúbito anterior (CuA) em cubital anterior um ( $CuA_1$ ) e cubital anterior dois ( $CuA_2$ )
- 

A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada a partir da matriz de variância e covariância das coordenadas de Procrustes, foi utilizada para demonstrar as variações dos eixos em relação à variação da forma da asa entre as populações, reduzindo o espaço amostral aos principais componentes (MITTEROECKER & GUNZ 2009). Foi realizada uma ANOVA de Procrustes para evitar erros de medidas (KINGENBERG & MONTEIRO 2005) e uma análise de variância multivariada (MANOVA) para testar as diferenças existentes entre as população de acordo com a forma da asa (FORNEL *et al.*, 2010).

Para determinar as variações interpopulacionais em um espaço reduzido, foi utilizada uma análise das variáveis canônicas (CVA) (DHIVYA & MANIMEGALAI 2013), sendo também realizada uma análise de função discriminante, para determinar o grau de alocação entre as diferentes populações com base no formato da asa (DHIVYA & MANIMEGALAI 2013).

Para a análise de PLS (two-block partial least-squares analysis) utilizou-se o banco de dados disponível no BioClim (Worldclim – Global Climate Data), através de 19 variáveis temperatura e precipitação mensal (HIJMANS *et al.*, 2005) (Tabela III).

A coordenadas geográficas foram obtidas através da ferramenta – info XY – do projeto *Species Link* – Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas: a Integração do *Species Analyst* e do *SinBiota* (FAPESP) e a distância geográfica dos mapas, foi obtida através do programa DIVA-GIS 7.4.0. Sendo essa análise responsável pela correlação entre os dois conjuntos das covariações, forma (tamanho do centroide) e variações ambientais (distância geográfica e clima) (KLINGENBERG *et al.*, 2003).

Tabela III. Variáveis climáticas utilizadas do banco de dados climáticos Wordclim (Bioclim) obtidas através do programa DIVA-GIS 7.4.0 e sua descrição e resolução temporal.

Variável	Descrição	Resolução Temporal
BIO1	Temperatura média anual	Anual
BIO2	Temperatura média diurna (média mensal (T. máx – T. mín.))	Mensal
BIO3	Isotermia (BIO2-BIO7)*100	Anual
BIO4	Sazonalidade da temperatura (desvio padrão*100)	Sazonal
BIO5	Temperatura máxima do mês mais quente	Mensal
BIO6	Temperatura mínima do mês mais frio	Mensal
BIO7	Média da temperatura anual (BIO5-BIO6)	Anual
BIO8	Temperatura média do trimestre mais chuvoso	Trimestral
BIO9	Temperatura média do trimestre mais seco	Trimestral

---

BIO10	Temperatura média do trimestre mais quente	Trimestral
BIO11	Temperatura média do trimestre mais frio	Trimestral
BIO12	Precipitação anual	Anual
BIO13	Precipitação do mês mais chuvoso	Mensal
BIO14	Precipitação do mês mais seco	Mensal
BIO15	Sazonalidade da precipitação	Sazonal
BIO16	Precipitação do trimestre mais chuvoso	Trimestral
BIO17	Precipitação do trimestre mais seco	Trimestral
BIO18	Precipitação do trimestre mais quente	Trimestral
BIO19	Precipitação do trimestre mais frio	Trimestral

---

#### 4.4 Extração de DNA

Para a extração do DNA total foi utilizado o protocolo de Cheung *et al.* (1993) modificado. Cada mosquito adulto foi previamente congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em álcool absoluto em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, após a retirada da asa. Foram adicionados 160  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (Tris HCl pH 8,0, 200 mM, NaCl 2.0 M, EDTA pH 8.0 70 mM). Os mosquitos foram macerados em homogeneizador. Logo após a maceração, foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  de SDS 10% para rompimento da membrana celular.

Os tubos foram incubados em banho-maria durante 30 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$ . Para desproteinização, foram adicionados em cada tubo, 50  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e, em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante (150  $\mu\text{L}$ ) foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml já identificado e adicionado de 80  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio (7,5 M) e 300  $\mu\text{L}$  de etanol 96%. As amostras foram homogeneizadas por inversão e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos para precipitação do DNA.

As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 13.000 rpm. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a

13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, no sentido de evitar a perda do pellet. Os tubos foram colocados na estufa a 37 °C por 30 minutos para secagem. O DNA foi ressuspensão em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) . A concentração do DNA foi quantificada em espectrofotômetro 2000 (Thermo Scientific)

#### 4.4.1 Amplificação do gene mitocondrial ND5

Amostras de 20 ng de DNA foram usadas como molde para amplificar a porção de 400 pb do gene mitocondrial ND5. Os iniciadores utilizados foram (Forward (6500): 5'-TCCTTAGAATAAAATCCC-3' e Reverse (7398): 5'-GTTTCTGCTTTAGTTCATTCTTC-3') (IDT, Coralville, IA, USA). Em cada experimento um controle negativo foi utilizado. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita em um volume total de 25 µL usando protocolo padrão, com 2 mM Mg<sup>++</sup>, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.2 mM dNTPs (AMRESCO), 12.5 pMoles de cada iniciador, 1 U Taq DNA polymerase (SIGMA) e 1 µL de DNA molde.

As amostras foram amplificadas com os seguintes parâmetros: 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 45°C por 20 segundos, 68°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final de 68°C por 5 minutos. O resultado da amplificação foi verificado através de eletroforese de uma alíquota de 2,5 µL em gel de agarose 1% em tampão de corrida TBE (0,0 4mol/L Tris-borato e 0,001 mol/L EDTA pH 8,0). A visualização das bandas de DNA amplificado coradas com brometo de etídio (0,5 µg/mL) foi realizada em transiluminador através do programa Quantum Capt (Figura 5).

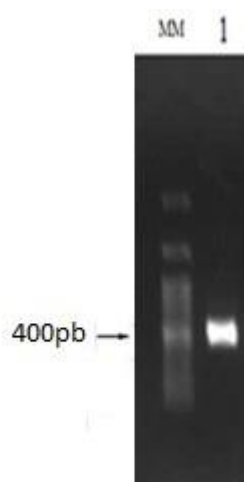


Figura 5. Produto de PCR de 400 pb que representa uma porção do gene ND5.

#### 4.4.2 Reação de Sequenciamento

Para o sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados usando o kit Qiaquick® PCR purification (QIAGEN, Hilden, Germany). A reação de sequenciamento foi feita com as duas fitas de DNA usando ABI Big Dye Chemistry (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) e as sequências foram geradas em um sequenciador automático ABI 377. A região amplificada do gene ND5 correspondente aos 400 pb mitocondrial de *A. albopictus*.

#### 4.4.3 Análise das sequências

As sequências consenso foram obtidas com o programa Staden Package version 1.6-r (STADEN *et al.*, 2001). As sequências foram editadas através do programa BioEdit version 7.0 (HALL 2004), e, foram alinhadas no ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta tblastx para confirmação do fragmento amplificado. A diversidade genética e os testes de



neutralidade foram calculados no programa DnaSP, versão 5.0 (LIBRADO & ROZAS 2009). A análise de variação molecular (AMOVA) foi realizada através do programa Arlequin versão 3.5 (EXCOFFIER *et al.* 2009). A estruturação das populações foi verificada através do índice de fixação (FST) de Wright (1921) e a estimativa de fluxo gênico (Nm), obtidos pelo programa Arlequin versão 3.5 (EXCOFFIER *et al.* 2010).

#### 4.4.4 Classificação dos municípios

O *A. albopictus* é uma espécie comum em ambientes periurbanos e rurais, as larvas têm como habitat pequenas coleções de água parada, com pouca matéria orgânica em decomposição, localizadas em criadouros sombreados, em recipientes artificiais como pneus ou habitats naturais como ocos de árvores, tocos de bambu e tanques de bromélias (FORATTINI, 2002; GOMES E MARQUES, 1988; FOSTER, 1989; GOMES *et al.*, 1992; O'MEARA *et al.*, 1995; NATAL *et al.*, 1997).

Por isso, para classificação dos municípios, foi utilizado o tamanho da população, densidade demográfica e da composição do Produto Interno Bruto (PIB), de acordo com o Estatuto da Cidade, Lei nº 10.257/01, classificando um município em rural e urbano, onde o Decreto-lei 311/38, trata da divisão territorial do país.

Com base no IBGE 2014 para indicar um município como rural, é necessário ter uma população inferior a 50 mil habitantes, valor adicionado da agropecuária a um terço da parte do PIB municipal e densidade demográfica inferior a 80 habitantes por quilômetro quadrado; município relativamente rural: a população precisa ser inferior a 50 mil habitantes, valor adicionado da

agropecuária entre uma terça parte e quinze centésimos do PIB municipal e densidade demográfica superior a 80 habitantes por quilometro quadrado; de pequeno porte: população inferior a 50 mil habitantes, valor adicionado da agropecuária inferior a quinze centésimos do PIB municipal e superior a 80 habitantes por quilometro quadrado; de pequeno porte: se a população tiver entre 50 mil e cem mil habitantes, ou se tiver densidade demográfica superior a 80 habitantes por quilometro quadrado e população entre 20 e 50 mil habitantes e de grande porte: se tiver população superior a cem mil habitantes.

Dessa forma poderia ser possível agrupar as variações fenotípicas dos mosquitos em decorrência as características do município (Tabela IV).

Tabela IV. Classificação dos municípios de acordo com IBGE, 2014

<b>Município</b>	<b>Densidade Demográfica</b>	<b>Porte</b>	<b>Classificação</b>
Maringá	733,14	Grande	Urbana
Foz do Iguaçu	414,58	Grande	Urbana
Cianorte	86,19	Médio	Processo de urbanização
Rondonópolis	47,00	Pequeno	Rural
Porto Velho	12,57	Pequeno	Rural

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Morfometria

A análise de componentes principais gerou 42 eixos de variação (PCs), indicando a variação amostral total. O PC1 explica 24% de toda variação. No quadrante positivo as asas demonstraram-se mais afiladas, com a margem apical posterior expandida (LM 6, 13, 14, 15), a margem apical anterior retraída (LM 8 ao 11), e ainda um deslocamento da base (LM 1 ao 5) e o centro da asa (LM 16 ao 20), no sentido proximal. No quadrante negativo a margem anal (LM 6) e apical anterior (LM 8 ao 11) são expandidas, demonstrando o ápice da asa arredondada e, um distanciamento entre o centro (LM 16 ao 20) e a base da asa. A distancia antero-posterior também demonstrou-se maior. O PC2 explica 14% da variação total. No quadrante positivo o ápice (LM 8 ao 12) está aproximado em relação ao centro da asa (LM 16 ao 20) e, mais expandida em relação ao centro (LM 16 ao 20) para base (LM 1 ao 5). No quadrante negativo o ápice da asa está alongado (LM 8 ao 12) em relação ao centro (LM 16 ao 20) e a base (LM 1 ao 5) retraída em relação ao centro da asa (LM 16 ao 20) (Figura 6).

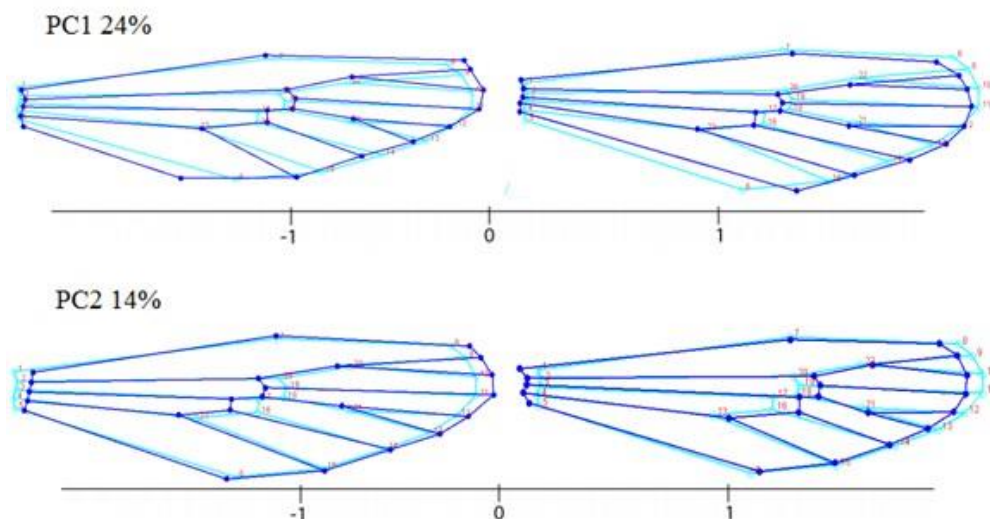


Figura 6. Deformações dos 23 marcos anatômicos (LMs) evidenciadas no primeiro (PC1) e segundo (PC2) componentes principais, escores positivo e negativo.

Todas as cinco populações de *A. albopictus* possuem diferença no formato alar. As populações de Maringá e Foz do Iguaçu, estão presentes no mesmo agrupamento, apresentando uma asa mais expandida. As populações de Cianorte, Porto Velho e Rondonópolis, estão no mesmo agrupamento, apresentando uma asa mais afilada em relação ao centro, ápice e base (Figura 7).

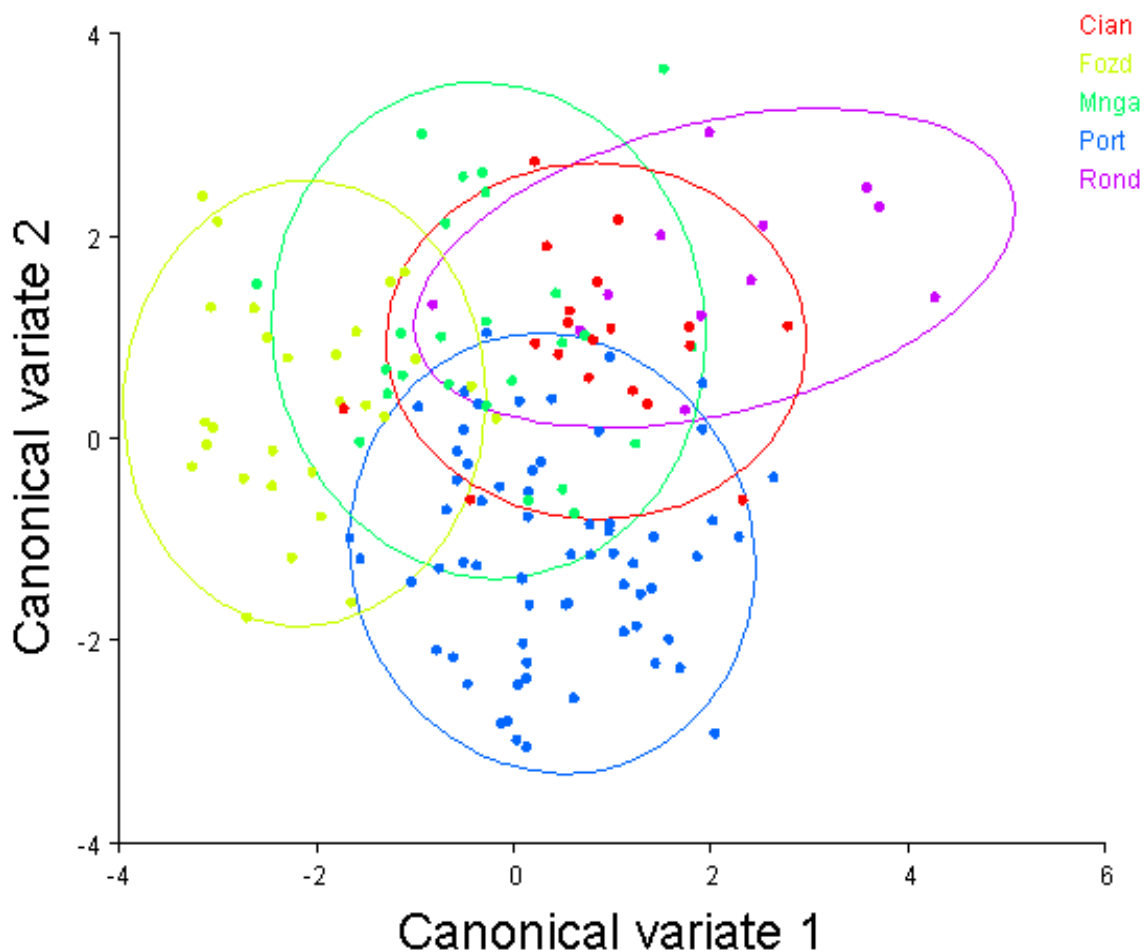


Figura 7 . Análise de Variáveis Canônicas utilizando a forma das asas das cinco populações estudadas. As cores representam as populações. (Cian- Cianorte, Fozd – Foz do Iguaçu, Mnga - Maringá, Port – Porto Velho, Rond- Rondonópolis.

A análise das Variações Canônicas indicam as diferenças dentro das populações, determinando os eixos de variação, comparando população por população. O CVA1 explica 37% de toda variação. No quadrante positivo a parte mediana superior (LM 7) sofre um estreitamento, centro (LM 18 ao 20) está distante em relação a área basal (LM 1 ao 5) e proximal em relação ao ápice superior, apresentando uma asa mais afilada na área central. No quadrante negativo ocorre uma expansão na área sagital (LM 7), o centro (LM 18 ao 20) está mais proximal a base (LM 1 ao 5) e distante do ápice superior (LM 8 ao 12). O CVA2 explica 31% de toda variação. No quadrante positivo a parte central (LM 18 ao 20) distanciou-se da base (LM 1 ao 5) e aproximou-se do ápice (LM 8 ao 12). No quadrante negativo, a parte central (LM 18 ao 20) aproximou-se da base (LM 1 ao 5) e distanciou-se do ápice (LM 8 ao 11), apresentando assim, uma asa mais expandida (Figura 8).

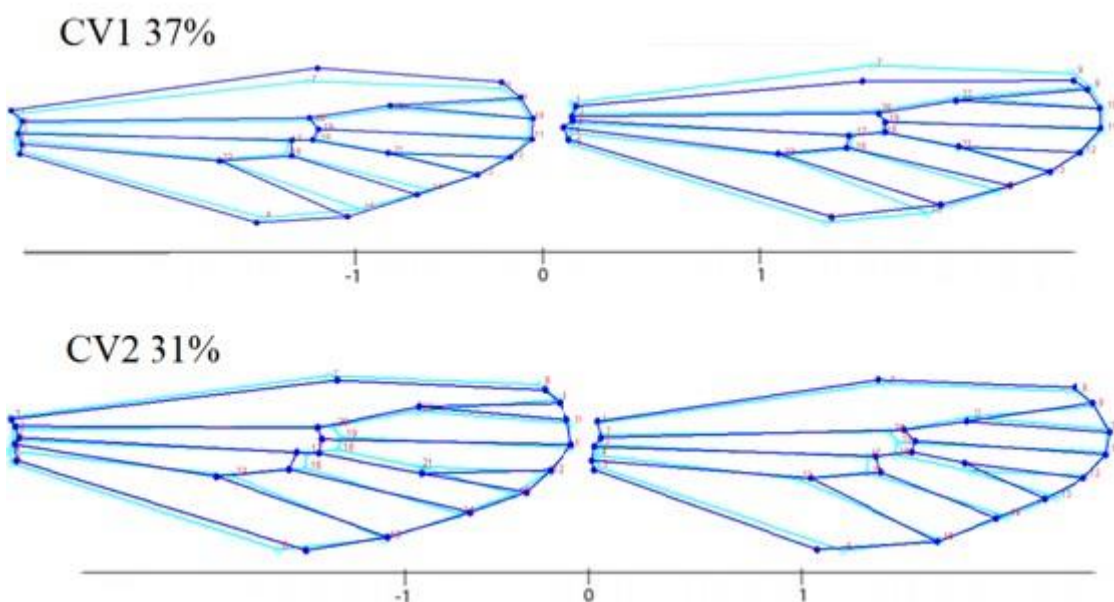


Figura 8. Deformações das LMs evidenciadas no primeiro (CV1) e segundo (CV2) eixo canônico de variáveis, escores positivo e negativo.

A PLS (two-block partial least-squares analysis) gerou cinco eixos de variação, sendo que o primeiro contém 89,95% (P-value <0,0100) da covariação total e o coeficiente geral de associação entre os dois blocos de variáveis de  $RV_{\text{coeficiente}} = 0,0769$ . As variáveis que apresentam valores extremos estão ligadas a sazonalidade, precipitação do trimestre mais chuvoso, precipitação do trimestre mais quente (Tabela V).

Tabela V. Coeficientes do PLS1. Incluindo as 19 variáveis climáticas extraídas do BioClim.

Variável	Descrição	PLS1
BIO1	Temperatura média anual	0,06085908
BIO2	Temperatura média diurna	0,03201161
BIO3	Isotermia	0,02188012
BIO4	Sazonalidade da temperatura	-0,39750789
BIO5	Temperatura máxima do mês mais quente	0,3449653
BIO6	Temperatura mínima do mês mais frio	0,08396665
BIO7	Média da temperatura anual	0,00092462
BIO8	Temperatura média do trimestre mais chuvoso	0,06993567
BIO9	Temperatura média do trimestre mais seco	0,02423443
BIO10	Temperatura média do trimestre mais quente	0,08421219
BIO11	Temperatura média do trimestre mais frio	-0,03374521
BIO12	Precipitação anual	0,14508726
BIO13	Precipitação do mês mais chuvoso	-0,44271554
BIO14	Precipitação do mês mais seco	0,42677786
BIO15	Sazonalidade da precipitação	0,13409652
BIO16	Precipitação do trimestre mais chuvoso	-0,45502006
BIO17	Precipitação do trimestre mais seco	-0,04143936
BIO18	Precipitação do trimestre mais quente	-0,04143936
BIO19	Precipitação do trimestre mais frio	-0,04143936

Com base nos coeficientes obtidos, foi possível separar as populações no segundo bloco de variáveis do PLS1 (Figura 9), sendo Porto Velho e Maringá no quadrante positivo, pelas variáveis de sazonalidade de precipitação, temperatura e isotermia.

As populações do quadrante negativo, Rondonópolis, Cianorte e Foz do Iguaçu, estão correlacionadas através das variáveis de sazonalidade, temperatura e precipitação.

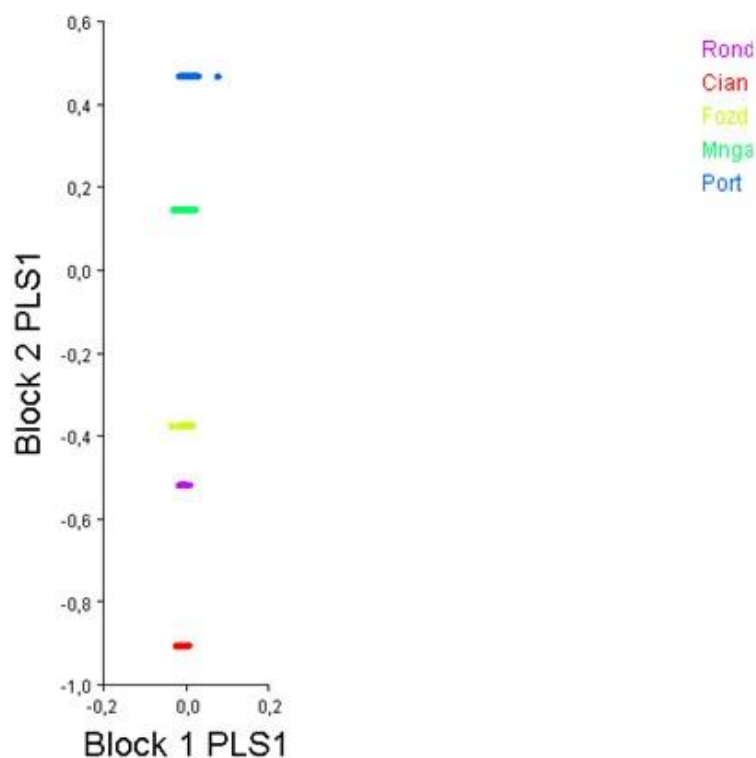


Figura 9. Primeiro eixo da análise PLS (two-block partial least-squares analysis). Correlação entre as variáveis de forma (Block 1 PLS1) e variáveis abióticas (Block 2 PLS1).

## 5.2 Análise Molecular

O fragmento de ND5 continha 400 pb, entretanto, somente 326 foram utilizados para a análise filogenética e genética de populações. Foram

analisados 50 indivíduos, resultando em 50 sequências com 332 pares de base (pb).

### 5.2.1 Distribuição e frequência dos haplótipos

As análises revelaram a existência de seis haplótipos (H1, H2, H3, H4, H5 e H6). Ao todo, foram encontrados 34 sítios variáveis (Figura 10). Os haplótipos puderam ser distinguidos por 14 transições (C↔T ou G↔A) (sítios 37,38, 38, 111, 119, 219, 234, 234, 246, 273, 276, 281, 303, 330), e por 20 transversões (A↔T ou G↔C) (sítios 6, 12, 12, 30, 48, 108, 119, 120, 157, 165, 174, 201, 219, 255, 263, 272, 272, 281, 297, 312).

Haplótipos	Sítios variáveis																																	
	6	12	30	37	38	39	48	75	108	111	117	119	120	157	159	162	165	174	201	219	234	246	255	267	272	273	276	279	281	297	303	304	312	330
H1	A	T	A	C	C	T	T	A	A	C	G	G	T	T	A	A	A	A	A	T	C	C	A	T	A	C	A	A	C	T	C	T	A	C
H2	T	A	T	T	T	T	A	G	T	T	T	A	A	A	T	C	T	T	T	C	T	T	T	A	T	T	G	T	T	A	T	G	T	T
H3	T	A	T	T	T	T	A	G	T	T	T	A	A	A	T	A	T	T	T	C	T	T	T	A	T	T	G	T	T	A	T	G	T	T
H4	T	A	T	T	T	T	A	G	T	A	T	A	A	A	T	C	T	T	T	C	T	T	T	A	T	T	G	T	T	A	T	G	T	T
H5	A	T	A	C	C	C	T	A	A	C	A	G	T	T	A	A	A	A	A	T	C	C	A	T	A	C	A	A	C	T	C	T	A	C
H6	T	A	T	T	T	T	A	G	T	T	T	A	A	A	A	T	T	T	T	C	T	T	T	A	T	T	G	T	T	A	T	G	T	T

Figura 10 Sítios variáveis em 6 haplótipos identificados de uma região de 332 pb do gene mitocondrial ND5

A composição média de nucleotídeos foi de 23,72 % para C + G e de 76,28% para A + T (Figura 11).



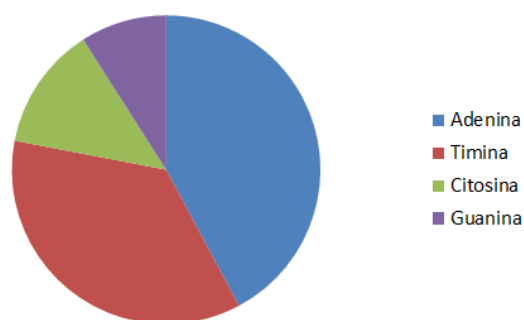


Figura 11. Composição média dos nucleotídeos.

O haplótipo H1 foi o mais frequente e encontrado em todas as populações analisadas, totalizando 45 indivíduos (95%). Os demais haplótipos apresentaram apenas a sua própria sequência haplotípica (Tabela VI). A população de Maringá apresentou cinco dos seis haplótipos analisados (H1, H2, H3, H4, H5). A população de Foz do Iguaçu foram encontrados dois haplótipos (H1 e H6). Cianorte, Porto Velho e Rondonópolis apresentaram apenas o H1.

Tabela VI. Frequências haplotípicas nas cinco amostras de *A. albopictus*

População	H1	H2	H3	H4	H5	H6
<b>Foz do Iguaçu</b>	9	0	0	0	0	1
<b>Maringá</b>	6	1	1	1	1	0
<b>Cianorte</b>	10	0	0	0	0	0
<b>Porto Velho</b>	10	0	0	0	0	0
<b>Rondonópolis</b>	10	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	45	1	1	1	1	1

### 5.2.2 Rede de haplótipos

Uma rede de haplótipos foi gerada (Figura 12), onde o formato dos quadrados é proporcional ao número de indivíduos encontrados. Nove diferentes tipos de grupamentos foram definidos: haplótipo 1, haplótipo 2, haplótipo 3, haplótipo 4, haplótipo 5, haplótipo 6, presentes no estudo e haplótipo 7, haplótipo 8 e haplótipo 9 presentes na literatura (Tabela VII). O haplótipo 1 deve ser provavelmente o que deu origem aos demais.

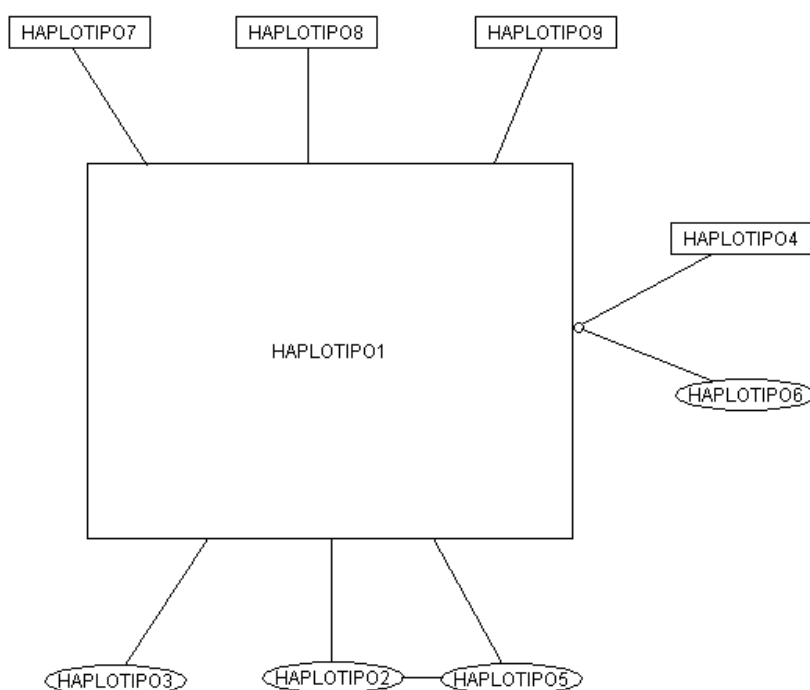


Figura 12. Rede de haplótipos do gene ND5 de *Aedes albopictus*.

Tabela VII. Distribuição dos haplótipos encontrados para o gene ND5 deste estudo e de outras localidades já estudadas de *A. albopictus*.

Haplótipo	Ocorrência	Referência Bibliográfica
H1	Brasil	Presente Estudo
H2, H3, H4, H5	Brasil	Presente Estudo
H6	Brasil	Presente Estudo
H7	Brasil, Estados Unidos, África	Birungi <i>et al.</i> , 2002

H8	África	Raharimalala <i>et al.</i> , 2012
H9	Europa	Falcuta <i>et al.</i> , 2012.

---

### 5.2.3 Análise de variância molecular (AMOVA) e interferência do fluxo gênico

Para verificar a variabilidade genética, foi utilizada a variância molecular (AMOVA). Nessa análise, as cinco populações foram consideradas como um único grupo, ou seja, os resultados mostraram que toda a variação da amostra está concentrada dentro da população (101,87%), enquanto a variação entre as populações não ocorreu (-1,87%) além do valor de  $F_{st}$  não ser baixo e não significativo ( $P > 0,05$ ), com 1000 permutações, indicando forte estruturação nas populações (Tabela VIII).

Tabela VIII Análise da variância molecular, considerando os grupos das populações de *Aedes albopictus*.

<b>Tipo de Variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Variação (%)</b>	<b>Índice de Fixação <math>F_{st}</math></b>
<b>Entre as populações</b>	4	- 1,87	
<b>Dentro das populações</b>	45	101,87	0.29717
<b>Total</b>	49	100	

A diferenciação genética e fluxo gênico mostraram valores de  $F_{st}$  baixos, inclusive as comparações par-a-par entre as populações, os valores de  $F_{st}$  não

foram significativos, sendo assim, não foi necessário aplicar a correção de Bonferroni (RICE, 1989).

Para verificar se existe correlação entre as distancias genéticas e geográficas, foi realizado o teste de Mantel (Figura 13). O valor obtido foi negativo e não significativo ( $P = -40.7385$ ,  $r = -0.6299$ ), indicando a não correlação entre as duas variáveis.

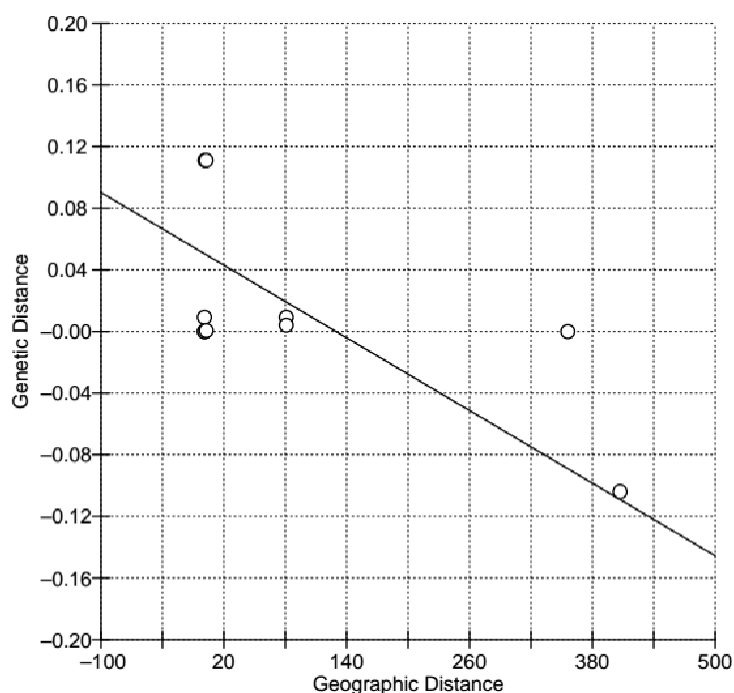


Figura 13. Relação entre distancia genética e a distancia geográfica estabelecida pelo teste de Mantel.

As relações genéticas foram estimadas pelo método de Neighbor-Joining (Figura 14). Com base no dendograma obtido, foi possível observar os dois agrupamentos. O primeiro agrupamento reuniu os haplótipos H1 (Presente em todas as populações) e H5 (população de Maringá) e no segundo agrupamento, reuniu os haplótipos H2, H3, H4 (presentes na população de

Maringá) e H6 (Foz do Iguaçu). Como grupo externo foram utilizadas as populações de *Aedes vexans* e *Aedes aegypti*.

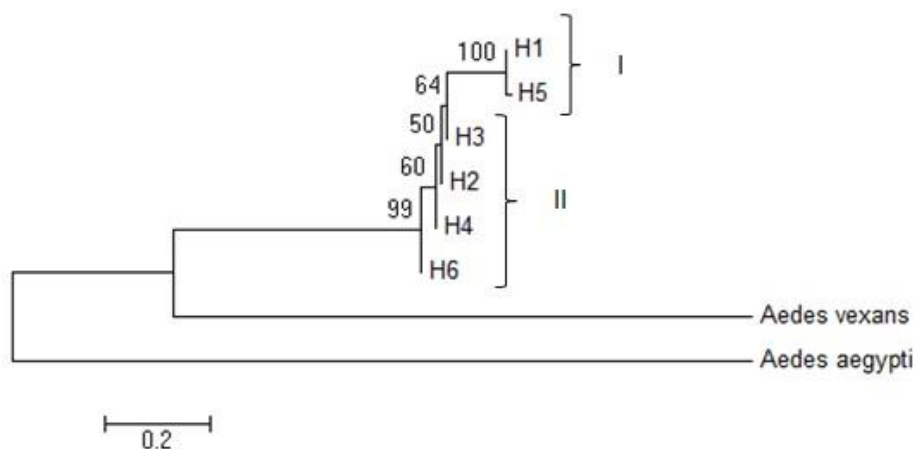


Figura 14. Árvore de Neighbor-joining (NJ) dos haplótipos de *A. albopictus* usando o modelo de distância genética do parâmetro-2 de Kimura.

#### 5.2.4 Diversidade genética e teste de neutralidade

A diversidade haplotípica (H) mais elevada foi encontrada na área urbana de Maringá (Tabela IX).

O teste D de Tajima indicou uma baixa frequência polimórfica para as Regiões de Maringá e Foz do Iguaçu, indicando que as populações estão em processo de expansão, já para as populações de Rondonópolis, Porto Velho e Cianorte, indicou a população com alta frequência de polimorfismo, indicando uma população em decréscimo ou uma seleção balanceada.

Tabela IX Diversidade genética e testes de neutralidade calculados das cinco populações de *Aedes albopictus*

População	NH	S	K	H	$\pi$	Teste D de Tajima	Teste FS de Fu
Rondonópolis	1	0	0.05924	0.000 ± 0.000	0.000000 ± 0.000000	0.00000	0.00000
Cianorte	1	0	0.05924	0.000 ± 0.000	0.000000 ± 0.000000	0.00000	0.00000
Maringá	5	34	0.05924	0.5333 ± 0.1801	0.021486 ± 0.012457	-1.96182	4.21085

Porto Velho	2	1	0.05924	0.3556 ± 0.1591	0.001071 ± 0.001278	0.01499	0.41670
Foz do Iguaçu	2	33	0.05924	0.200 ± 0.1541	0.019880 ± 0.011604	-2.09323	9.02364

### 5.2.5 Classificação dos municípios

Os municípios foram classificados em urbano, processo de urbanização e rural de acordo com a densidade demográfica dos municípios, nisso existe uma associação em relação as variações fenotípicas encontradas.

As populações de Maringá e Foz do Iguaçu que foram classificadas como municípios de porte grande e rurais, apresentam o primeiro agrupamento de asas e haplótipos diferentes dentro da população.

As populações de Cianorte, Rondonopolis e Porto Velho, foram classificadas como municípios em processo de urbanização com porte médio e rurais e porte pequeno respectivamente, correspondendo ao segundo agrupamento onde só apareceu um haplótipo dentro da população.

Apesar de existir uma distância geográfica entre os agrupamentos das populações, não justificaria a semelhança entre elas, por isso existe a necessidade de um estudo sobre a origem de entrada dos mosquitos nas determinadas regiões geográficas.

## 6 DISCUSSÃO

A Secretaria de Estado de Saúde prioriza coleta de ovos de *Aedes spp.* em localidades que apresentem registros de casos de dengue ou presença dos vetores. Ao analisarmos a classificação dos municípios, percebemos que Maringá e Foz do Iguaçu apresentam maior taxa de urbanização em relação a Cianorte, Rondonópolis e Porto Velho, segundo a classificação do IBGE.

O *Aedes albopictus* é considerado uma das espécies invasoras mais importantes do mundo (BENEDICT *et al.*, 2007, MEDLOCK *et al.* 2012), apesar de não ser considerado vetor natural de arbovírus no Brasil ou em qualquer país da América, existe a necessidade de conhecer a variabilidade dessa espécie de mosquito no sentido de orientar as medidas preventivas de controle.

A introdução do *A. albopictus* no Brasil é recente (FORATTINI 1986), e pode ser que ele esteja passando por um processo de mudanças fenotípica e genética de acordo com o ambiente, principalmente pela exposição aos efeitos das ações de controle direcionadas ao *A. aegypti* e outras pragas, apresentando maiores mudanças morfológicas e moleculares nas regiões aonde existe maior aplicação de inseticida.

MAIA (2009) observou dois haplótipos para *A. albopictus* em cinco bairros da cidade de Manaus. O primeiro haplótipo mostrou-se mais frequente em relação ao segundo haplótipo. Sugerindo a recém-entrada do mosquito e diferentes meios de introdução dos mosquitos no Estado.

NASCI (2014), descreveu a recente circulação do vírus no chikungunya Caribe. VEJA-RUA *et al* (2014) descreveram a alta competência vetorial de

populações de *A. albopictus* do Brasil e de outros nove países da América para transmitir dois genótipos CHIKV.

LOUNIBOS *et al.* (2003) constataram diferenças na diapausa em populações de *A. albopictus* provenientes de localidades de clima tropical e temperado, sugerindo uma evolução assimétrica do mosquito a diferentes condições ambientais, existindo a possibilidade de diversos meios de introdução nas diferentes regiões biogeográficas, existindo a possibilidade de apresentarem o fenótipo semelhante, mesmo estando geograficamente distantes.

Na morfometria geométrica foram denominados dois agrupamentos. O primeiro compreende os municípios de Porto Velho, Rondonópolis e Cianorte e o segundo com Maringá e Foz do Iguaçu. Existe uma grande distância geográfica entre localidades do primeiro agrupamento. As características de organização dos municípios analisados que apresentam áreas rurais próximas a núcleos residenciais podem favorecer a presença de *A. albopictus*.

Na análise molecular entre os cinco municípios estudados, haplótipo 1 foi detectado em todas as populações, ou seja, sendo o provável ancestral, apresentando 100% de presença em Rondonópolis, Porto Velho e Cianorte. Os outros haplótipos ficaram restritos a Maringá, onde foi detectado elevada diversidade haplotípica, e a Foz do Iguaçu, com dois haplótipos.

No teste AMOVA, foi encontrado uma variação maior dentro da população e não entre as populações. Esse fato pode ser devido consequência da intensa utilização de inseticidas para o controle de *A. aegypti* em Maringá e Foz do Iguaçu afetando indiretamente a população de *A. albopictus*, com isso,



proporcionando condições para modificações genéticas que refletem em maior escala no decorrer das gerações. Isso explica a grande variação haplotípica dentro da população de Maringá, possivelmente em decorrência das ações de controle do vetor diante da necessidade de redução do número de casos de dengue que foi elevado nos anos de 2012 em vista que existe uma grande incidência de controle de mosquito na região.

A diversidade genética de uma espécie poderá facilitar o surgimento de populações resistentes a inseticidas e a entomopatógenos utilizados no controle populacional de mosquitos (COLEMAN et al., 2002), além de identificar uma maior capacidade de dispersão e reprodução, resultando em populações mais adaptadas que outras, além das interações entre vetor, hospedeiro e parasita (REISEN et al., 1997; LAPOINT et al., 2005).

Desse modo, existe uma correlação entre o fator genético e a variabilidade morfológica dos mosquitos.

## 7 CONCLUSÃO

- Este trabalho é o primeiro associando morfometria geométrica alar e utilização do gene ND5 envolvendo as populações de *A. albopictus* de Maringá, Foz do Iguaçu, Cianorte, Rondonópolis e Porto Velho, além da utilização do mesmo mosquito para as duas análises.
- Foram encontrados seis haplótipos, dentro das cinco populações estudadas. O haplótipo 1 foi mais frequente e esteve presente em todas as populações. A distância geográfica não influenciou a diversidade haplotípica, as populações não estão estruturadas geneticamente.
- Na população de Maringá foi detectada a maior variação com cinco haplótipos diferentes, provavelmente devido a pressão de seleção dos produtos químicos, usados para controle de *A. aegypti* e outras pragas.
- As populações de Maringá e Foz do Iguaçu, estão presentes no mesmo agrupamento, apresentando uma asa mais expandida. As populações de Cianorte, Porto Velho e Rondonópolis, estão no mesmo agrupamento, apresentando uma asa mais afilada em relação ao centro, ápice e base. Em relação ao marcador utilizado, obtivemos os dois agrupamentos: Cianorte, Porto Velho e Rondonópolis com apenas o haplótipo 1 e Maringá e Foz do Iguaçu, além do haplótipo 1, apresentou haplótipos exclusivos.
- As deformações encontradas nas asas das diferentes populações de *A. albopictus* estão distribuídas desde a base ao ápice até as margens posteriores, indicando a variação no formato da asa.

- Essas deformações dividem-se em um encurtamento entre a base e a região mediana e a expansão do ápice, e o alongamento entre a base e o centro e a retração do ápice.
- Maringá apresentou cinco dos seis haplótipos analisados (H1, H2, H3, H4, H5). Foz do Iguaçu foi encontrado dois haplótipos (H1 e H6). Cianorte, Porto Velho e Rondonópolis apresentaram apenas o H1.
- Foi visto que existiu uma baixa variabilidade entre as populações e uma alta variabilidade intrapopulacional.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric Morphometrics: Ten Years of Progress Following the “Revolution.” **Italian Journal of Zoology**, v. 71, n. 1, p. 5–16, 2004.

ALBUQUERQUE, C. M. R. DE; MELO-SANTOS, M. A. V. *et al.* 2000. Primeiro registro de *Aedes albopictus* em área da Mata Atlântica, Recife, PE, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, **34**(3):314, 315.

ALENCAR J, ALMEIDA HM, MARCONDES CB, GUIMARÃES AE 2008. Effect of multiple immersions on eggs and development of immature forms of *Haemagogus janthinomys* from South-Eastern Brazil (Diptera: Culicidae). **Entomol News** 119: 239-244.

ALMEIDA, P. S. DE; FERREIRA, A. D.; PEREIRA, V. L.; FERNANDES, M. G.; FERNANDES, W. D. Distribuição espacial de *Aedes albopictus* na região sul do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 6, p. 1094–1100, 2006.

AYRES C F J, ROMÃO T P A, MELO-SANTOS M A V, FURTADO A F (2002) Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97:871-875.

BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C.. The biology of disease vectors. **University Press of Colorado. Niwot, USA**, 632p, 1996

BEATY & W. C. BLACK IV. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 66: 213–222, 2002

BENEDICT M.Q., LEVINE R.S., HAWLEY W. A., LOUNIBOS L. P. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. **Vector Borne Zoonotic Dis** 7: 76-85, 2007.

BESANSKY, N. J.; LEHMANN, T.; FAHEY, G. T.; *et al.* Patterns of Mitochondrial Variation Within and Between African Malaria Vectors, *Anopheles gambiae* and *An. ambiensis*, Suggest Extensive Gene Flow. **Genetics**, v. 147, n. 1, p. 1817–1828, 1997.

BIRUNGI, J.; MUNSTERMANN, L. E. 2002. Genetic Structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations Based on Mitochondrial ND5 Sequences: Evidence for an Independent Invasion into Brasil and United States. **Annals Of The Entomological Society of America**, 95: p. 125-132.

BROGDON, W. G. Measurement of flight tone differences between female *Aedes aegypti* and *A. albopictus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 31, n. 5, p. 700–703, 1994.

BOSIO C F, HARRINGTON L C, JONES J W, SITHIPRASASNA R, NORRIS D E, SCOTT T W. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 72:434-442, 2005.

BOMFIM, Z. V.; LIMA, K. M.; SILVA, J. G.; COSTA, M. A.; ZUCCHI, R. A. A Morphometric and Molecular Study of *Anastrepha pickeli* Lima (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 5, p. 587–594, 2008.

BOORE, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, 27 (8): 1767-1780.

BOOKSTEIN, F. L. **Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology**. Cambridge University Press, 1997.

BURALI GM, MARQUES GRAM, GEROLA JR O. **Disribuição geográfica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no estado de São Paulo**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 24 (supl II): 182, 1991.

CALADO, D. C.; NAVARRO-SILVA, M. A. Influência da temperatura sobre a longevidade, fecundidade e atividade hematofágica de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skuse , 1894 (Diptera, Culicidae) sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 46, n. 1, p. 93–98, 2002.

CASTRO, M.G.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, 99: 809-814, 2004.

CHAMBERS E W, MEECE J K, MCGOWAN J A, LOVIN D D, HEMME R R, CHADEE D D, MCABEE K, BROWN S E, KNUDSON D L, SEVERSON D L, DAVID W. Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Heredity** 98:202-210, 2007.

CHEUNG, W. Y.; N.HUBERT & B.S. LAUNDRY. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications** 3:69-70.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994.

COLEMAN, M.; VONTAS, J. G.; HEMINGWAY, J. 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus*. **Eur. J. Biochem.**, 269: 768-779.

DESJARDINS, P.; MORAIS, R. Sequence and Gene Organization of the Chicken Mitochondrial Genome: A Novel Gene Order in Higher Vertebrates. **Journal of Molecular Biology**, v. 212, n. 1, p. 599–634, 1999.

DHIVYA R, MANIMEGALAI K. Wing Shape Analysis of the Japanese encephalitis vector *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae) at the Foot Hill of Southern Western Ghats, India. **World Journal Zoology** 8(1): 119-125. doi: 10.5829/idosi.wjz.2013.8.1.7277, 2013.

DUBRULLE, M.; MOUSSON, L.; MOUTAILLER, S.; VAZEILLE, M.; FAILLOUX, A.-B. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. **PLoS one**, v. 4, n. 6, p. e5895, 2009.

DUJARDIN, J.-P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 875–890, 2008.

EFFLER PV, PANG L, KITSUTANI P, VORNDAM V, NAKATA M, AYERS T, ELM J, TOM T, REITER P, RIGAU-PEREZ JG, HAYES JM, MILLS K, NAPIER M, CLARK GG, GUBLER DJ. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. **Emerg Infect Dis** 11: 742-749, 2005.

ELLIOTT, S. A. *Aedes albopictus* in the Solomon and Santa Cruz Islands, South Pacific. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 6, p. 747-748, 1980.

ESTRADA-FRANCO, J. G.; CRAIG, G. B. JR. Biología, relaciones com enfermedades y control de *Aedes albopictus*. **Organización Panamericana de la Salud**, p. 1-51, 1995.

EXCOFFIER, L.; G. LAVAL & S. SCHNEIDER. Arlequin ver. 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 2010.

FERNÁNDEZ, Z.; FORATTINI, P. Sobrevivência de populações de *Aedes albopictus*: idade fisiológica e história reprodutiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 285–291, 2003.

FONSECA, D. M.; CAMPBELL, S.; CRANS, W. J.; MOGI, M.; MIYAGI, I.; TOMA, T.; BULLIANS, M.; ANDREADIS, T. G.; BERRY, R. L.; PAGAC, B.; SARDELIS, M. R.; WILKERSON, R. C. 2001. *Aedes (Finlaya) japonicus* (Diptera: Culicidae), a Newly Recognized Mosquito in the United States: Analyses of Genetic Variation in the United States and Putative Source Populations. **J. Med. Entomol.**, 38: 135-146.

FONTENILLE, D.; RODHAIN, F. Biology and distribution of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Madagascar. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 5, n. 2, p. 219-225, 1989.

FORATTINI, O. P.; LEÓN, P. M.; RABELLO, E. X. 1965. Notas sobre Culicidae (Diptera). 9. A respeito de algumas espécies de Sabethes. **Studia Entomologica** 8: 1-4.

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 244–245, 1986.

- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 1996.
- FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. 2. ed. São Paulo: EDUSP, 2002.
- FORATTINI, O. P.; MARQUES, G. R. A. M.; KAKITANI, I.; BRITO, M.; SALLUM, M. A. M. Significado epidemiológico dos criadouros de *Aedes albopictus* em bromélias. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 2, p. 186–188, 1998.
- FOSTER, B. E. 1989 *Aedes albopictus* larvae collected from tree holes in Southern Indiana. **J. Amer. Mosq. Control Assoc.**, 5: 95.
- GUEDES, M.R.P 2012. Culicidae (Diptera) No Brasil: Relações entre diversidade, distribuição e enfermidades. *Oecologia Australis* 16 (2): 283-296.
- GUEDES, D. R. D. 2006. Epidemiologia Molecular do *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Dissertação de Mestrado, **Fiocruz**.
- GOMES, A. de C.; FORATTINI, O. P; KAKITANI, I.; MARQUES, G. R. A. M.; MARQUES, C. C. de A.; MARUCCI, D.; BRITO, M. de. 1992. Microhabitats de *Aedes albopictus* (Skuse) na região do Vale da Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 26: 108-118.
- GOMES, A. DE C.; MARQUES, G. R. A. M. Encontro de criadouro natural de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse), Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 245, 1988.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* **Ser.** 41:95-98.
- HARBACH R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa** 1668: 591-638, 2007.
- HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 4, p. 1-39, 1988.
- HIRAGI, C.; SIMÕES, K.; MARTINS, E.; et al. Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 542–547, 2009.
- HIJMANS RJ, CAMERON SE, PARRA JL, JONES PG, JARVIS A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **Int J Climatol** 25: 1965-1978.
- HODKINSON, I. D. Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. **Biological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 489–513, 2005.

HUANG T, LIU L, QIAN Z, TU K, LI Y, XIE L (2010) Using GeneReg to construct time delay gene regulatory networks. *BMC Res Notes* 3(1):142

IBANEZ-BERNAL S, BRISENO B, MUTEPI JP, ARGOT E, RODRIGUEZ G, MARTINEZ-CAMPOS C, PAZ R, DE LA FUENTE-SAN ROMAN P, TAPIA-CONYER R, FLINER A. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med Veter Entomol* 11:305-309, 1997.

IBGE. 2012. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; DUJARDIN, J.-P. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 8, n. 4, p. 414–421, 2008.

JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; THONGRUNGIAT, S.; et al. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Tropical Medicine & International Health*, v. 12, n. 11, p. 1354–1360, 2007.

JOHNSON, B.W., T.V. CHAMBERS, M.B. CRABTREE, A.M.B. FILIPPIS, P.T.R. VILARINHOS, M.C. RESENDE M.DE.G. MACORIS & R.B. MOLEIRO. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 96: 611-3, 2002.

KAMBHAMPATI, S.; BLACK IV, W. C.; RAI, K. S. Geographic origin of the US and *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. *Heredity*, 67: 85-93, 1991.

KLINGENBERG C. P, MEBUS K, AUFFRAY J. C. Developmental integration in a complex morphological structure: how distinct are the modules in the mouse mandible? *Evol Dev* 5: 522–531, 2003.

KLINGENBERG CP, MONTEIRO LR. Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Syst Biol* 54(4): 678–688, 2005.

KONISHI, E. Susceptibility of *Aedes albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) collected in Miki City, Japan, to *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Filariidae). *Journal of Medical Entomological entomology*, v. 26, n. 5, p. 420–424, 1989.

LAILLE, M.; FAURAN, P.; RODHAIN, F. Note Sur La Presence D'*Aedes (Stegomyia) albopictus* Dans Les Iles Fidji. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, v. 83, n. 1, p. 394–398, 1990.



LANG, B. F.; GRAY, M. W.; Burger, G. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 33: 351-397, 1999.

LARANJA A T, MANZATTO A J, BICUDO H E M C. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genet Mol Biol* 26:419-429, 2003.

LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25:1451–1452.

LIMA JÚNIOR, R. S.; SCARPASSA, V. M. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon , based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 2, p. 414–422, 2009.

LOUNIBOS, L. P. Invasions by insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, v. 47, n. 1, p. 233–266, 2002.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; FILIPPIS, A. M. B.; FAILLOUX, A.-B. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 69, n. 1, p. 105–114, 2003.

MAIA, R. T. et al. (2009). Reduced levels of genetic variation in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazonas State, Brazil, based on analysis of the mitochondrial DNA ND5 gene. *Genetics and molecular research: GMR*. v.8, n.3, p. 998–1007, 2009.

MARQUES GRAM, SANTOS RC, FORATTINI OP. *Aedes albopictus* em bromélias de ambiente antrópico no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 33 [On-line] 2001; Disponível em URL [http:// www.fsp.scielo.br/rsp](http://www.fsp.scielo.br/rsp)

MEDLOCK JM, HANSFORD KM, SCHAFFNER F, VERSTEIRT V, HENDRICKX G, ZELLER H, BORTEL WV. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks and control options. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 12: 435-447, 2012.

MITTEROECKER P, GUNZ P (2009) Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology* 36(2), 235-247

MITCHELL, C. J. The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. *Parasitologia*, v. 37, n. 2-3, p. 109–113, 1995.

MITCHELL, C; M. NIELBYLKI; G. SMITH; N. KARABATSOS; D. MARTIN; J.P. MUTEBI; C. B. CRAIG & M. MAHLER. Isolation of Eastern equine encephalitis from *Aedes albopictus* in Florida. *Science* 257:526-527, 1992.

MITTEROECKER P, GUNZ P. Advances in geometric morphometrics. *Evol. Biol.* 3: 235-247, 2009.

MOLINA-CRUZ, A.; DE MÉRIDA, A. M. P.; MILLS, K.; RODRÍGUEZ, F.; SCHOUA, C.; YURRITA, M. M.; MOLINA, E.; PALMIERI, M.; BLACK IV, W. C. Gene Flow Among Anopheles albimanus Populations in Central América, South América and the Caribbean Assessed by Microsatellites and Mitochondrial DNA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 71 (3): 350-359, 2004.

MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto: Holos Editora, 1999. 188p.

MOORE CG, MITCHELL CJ. Aedes albopictus in the United States: ten-year presence and public health implications. **Emerging Infectious Diseases** 3: 329-334, 1997.

MORATORE C., SUESDEK L., Novos caracteres diagnosticos para mosquitos de interesse médico: *Culex quinquefasciatus* e *Culex corniger* (Diptera: Culicidae). **Rev Univap**. 2008; 15.

NASCI R. S. Movement of Chikungunya virus into the Western hemisphere. **Emerg Infect Dis** 20: 1394-1395, 2014.

NATAL, D.; URBINATTI, P. R.; TAÍPE-LAGOS, C. B.; CERETI-JUNIOR, W.; DIEDERICHSEN, A. T. B.; SOUZA, R. G.; SOUZA, R. P. Encontro de Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) em Bromeliaceae na periferia de São Paulo, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 517-518, 1997.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 342p, 1976.

OKIMOTO, R.; MACFARLANE, J. L.; CLARY, D. O.; WOLSTENHOLME, D. R. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. **Genetics**, v. 130, n. 1, p. 471–498, 1992.

O'MEARA, G. F.; EVANS Jr., L. F.; GETTMAN, A. D.; CUDA, J. P. 1995. Exotic tanks bromeliads harboring immature Aedes albopictus and Aedes bahamensis (Diptera: Culicidae) in Florida. **J. Vector Ecol.**, 20: 216-224.

PASSOS, R. A.; MARQUES, G. R. A. M.; VOLTOLINI, J. C.; CONDINO, M. L. F. Dominância de Aedes aegypti sobre Aedes albopictus no litoral sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 6, p. 729–734, 2003.

PÄÄBO, S.; HIGUCHI, R. G.; WILSON, A. C. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. **J. Biol. Chem.**, 264: 9709-9712.

PADUAN K. S, ARAÚJO J. P, RIBOLLA P. E. M. Genetic variability in geographical populations of Aedes aegypti in Brazil elucidated by molecular markers. **Genet Mol Biol** 29:391-395, 2006.

PADUAN K. DOS S. & P. E. M. RIBOLLA. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of Aedes aegypti in Brazil. **Journal of Medical Entomology** 45: 59–67, 2008.

PASHLEY, D. N.; PASHLEY, D. P. Observations on *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes in Micronesia and Melanesia. **Mosquito Systematics**, v. 15, n. 1, p. 41-49, 1983.

PAUPY, C.; DELATTE, H.; BAGNY, L.; CORBEL, V.; FONTENILLE, D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 11, n. 1, p. 1177–1185, 2009. Elsevier Masson SAS.

PAUPY, C.; GOFF, G. LE; BRENGUES, C.; et al. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1260–1269, 2012. Elsevier B.V.

PERIAGO M., VALERO M., SAYED M., ASHRAFI K., WAKEEL A., MOHAMED M., DESQUESNES M., CURTALE F. & MAS-COMA S. First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from human endemic area of the Nile Delta Egypt. **Infection, Genetics and Evolution**, 2008, 8, 51–58.

PIGLIUCCI, M. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 9, p. 481–486, 2005.

QUEIROZ, P. R.; MARTINS, E. S.; MONNERAT, R. G.; LIMA, L. H. C. Análise da variabilidade genética de uma população de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2004.

REISEN, W. K.; LOTHROP, H. D.; PRESSER, S. B.; HARDY, J. L.; GORDON, E. W. 1997. Landscape ecology of arboviruses in southeastern California: temporal and spatial patterns of enzootic activity in Imperial Valley, 1991-94. **J. Med. Entomol.**, 34:179-188.

REITER, P.; M.A. AMADOR & N. COLON. 1991. Enhancement on the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **Journal of the American Mosquito Control Association** 7:52-55, 1991.

ROBERTIS E DE, HIB J. Bases da Biologia Celular e Molecular. 4 ed. Rio de Janeiro, RJ: **Guanabara Koogan**; 2006.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution in Morphometrics. **Tree**, v. 8, n. 4, p. 129–132, 1993.

ROHLF F.J. tpsUtil version 1.38. New York: **Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook**.

ROHLF F. J. 2005 tpsDig version 2.05. New York: **Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook**, 2005.

ROHLF FJ, CORTI M 2000. The use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. **Syst Biol** 49:740–753.

SOUZA-POLEZZI R C, BICUDO H E M C (2004) Effect of phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Genet Mol Biol** 27:275-283.

SANTOS, S. O. DOS; NASCIMENTO, J. C. DO. Primeiro registro da presença do *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 486, 1998.

SERUFO, J. C.; OCA, H. M. DE; TAVARES, V. A.; et al. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 3, p. 503–504, 1993. Fundação Oswaldo Cruz.

SZALANSKI, A. L., J. W. AUSTIN, AND M. T. MESSENGER. 2006. Genetic evidence of a new subterranean termite species (Isoptera: Rhinotermitidae) from western United States and Canada. **Fla. Entomol.**

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

URBANELLI, S., BELLINI, R.; CARRIERI, M; SALICANDRO, P.; CELLIS, G. 2000. Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. **Heredity**, 84, 331-337.

VAZEILLE, M.; MARTIN, E.; MOUSSON, L.; FAILLOUX, A. Chikungunya, a new threat propagated by the cosmopolite *Aedes albopictus*. **BMC Proceedings**, v. 5, n. 1, p. O8, 2011. BioMed Central Ltd.

VEJA-RUA A, ZOUACHE K, GIROD R, FAILLOUX AB, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **J Virol** 88: 6294-6306, 2014.

WALLACE, D. C. Diseases of the Mitochondrial DNA. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 1175–212, 1992.

YAN, G.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Evidence for Genetic Hitchhiking Effect Associated With Insecticide Resistance in *Aedes aegypti*. **Genetics**, v. 148, n. 1, p. 793–800, 1998.