

Aplicação de marcadores microssatélites para o estudo de Culicidae (Diptera): revisão com especial referência a *Haemagogus*

Gerson Azulim Müller^{1*}, Carlos Brisola Marcondes² & Mário Antônio Navarro-Silva¹

Marcadores moleculares microssatélites se caracterizam pela neutralidade, alto polimorfismo e elevada abundância com ampla distribuição pelo genoma de eucariotos. O seu emprego em estudos relacionados a espécies de mosquitos vetoras é ideal para o mapeamento genético e físico, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações. Esta revisão sumariza e fornece informações sobre estudos envolvendo culicídeos através da utilização de marcadores microssatélites e propõe sugestões de pesquisas para uma melhor compreensão da biologia e dinâmica de transmissão do vírus da febre amarela por espécies do gênero *Haemagogus*.

Palavras-chave: Febre Amarela; SSRs; Marcadores moleculares; Mosquito.

INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares baseados na amplificação de microssatélites, também denominados de repetições de seqüências simples (simple sequence repeats; SSRs), compreendem uma classe de DNA repetitivo composto de pequenas seqüências de 1 a 4 nucleotídeos repetidos adjacentes que se encontram dispersos no genoma (Schlötterer & Pemberton, 1998). Estes marcadores são co-dominantes, hipervariáveis, apresentam variações de comprimento entre os alelos e estão distribuídos aleatoriamente pela região eucromática do genoma, embora sejam raros nas regiões codificadoras (Hancock, 1999; Schlötterer & Wiehe, 1999).

Em genomas de eucariotos, essas pequenas seqüências repetitivas de DNA são mais frequentes, mais bem distribuídas e formam loci genéticos muito polimórficos que podem ser amplificados via PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir

de um par de primers específicos (de vinte a trinta bases) que flanqueiam os microssatélites. Os segmentos amplificados a partir destes sítios, quase invariavelmente, apresentam um extenso polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim, cada microssatélite, independente do elemento repetido (e.g. CA, TG e ATG) constitui um locus genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (Sunnucks, 2000).

Cada segmento amplificado de tamanho diferente (geralmente de várias dezenas até algumas centenas de pares de bases) representa um alelo diferente do mesmo locus (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Cada locus de microssatélite é analisado individualmente ao utilizar-se um par de primers construído especificamente para sua amplificação ou, ainda, pode-se analisar mais de um locus por vez, desde que os alelos dos loci tenham tamanhos suficientemente diferentes para migrarem em direções distintas no gel. Neste método de genotipagem, denominado de “multiplex”, são utilizados simultaneamente mais de um par de primers específicos na mesma reação de PCR.

Hoje, os microssatélites são um dos mais poderosos métodos para estudos genéticos de

¹ Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, CP 19020, CEP 81531-980, Curitiba, PR, Brasil.

² Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

*Autor para correspondência: geozul@hotmail.com

populações (Selkoe & Toonen, 2006). Podem ser utilizados para a determinação do grau de relação entre indivíduos e/ou grupos de uma mesma espécie (Blouin *et al.*, 1996), para análise de ascendência (e.g. teste de paternidade; Isagi *et al.*, 2004), como ferramenta para avaliar os níveis de endogamia de uma população (e.g. Arbeláez-Cortes *et al.*, 2007), para analisar a história demográfica de uma população (e.g. evidência da ocorrência de gargalos populacionais; Hoelzel *et al.*, 2002), determinar o tamanho efetivo de uma população (e.g. Hauser *et al.*, 2002), e avaliar a magnitude e direcionamento do fluxo de genes entre as populações (Gaggiotti *et al.*, 2002). Os microssatélites também fornecem dados apropriados para estudos filogeográficos que procuram explicar a concordância da história biogeográfica e genética da flora e fauna de regiões em larga escala (Koskinen *et al.*, 2002) e em estudos filogenéticos em escala fina com espécies proximamente relacionadas (Richard & Thorpe, 2001). Maudet *et al.* (2002) destacam que todos esses estudos são possíveis, principalmente, por três características presentes nesse marcador: (1) a elevada abundância com ampla distribuição pelo genoma; (2) a neutralidade e (3) o alto polimorfismo.

Apesar das múltiplas aplicações citadas para os microssatélites, sua utilização apresenta certa limitação no que tange o baixo índice de transferibilidade dos primers entre espécies, especialmente naquelas classificadas em famílias e/ou ordens diferentes. Segundo Zane *et al.* (2002), o maior problema vinculado aos microssatélites é que eles precisam ser isolados de novo na maioria das espécies que estão sendo analisadas pela primeira vez. Isso ocorre porque os microssatélites são usualmente encontrados em regiões não codificadoras onde a taxa de substituição é maior do que nas regiões codificadoras. Conseqüentemente, a estratégia de projetar primers combinando seqüências conservadas, que foi muito efetivo para DNA mitocondrial (Kocher *et al.*, 1989), por exemplo, é mais problemático para esse tipo de marcador molecular. Segundo Selkoe & Toonen (2006) à medida que se trabalha com níveis sistemáticos mais altos, problemas como fenômenos de homoplasia tornam-se mais prováveis devido à alta taxa de mutação, e seqüências de microssatélites utilizadas, por exemplo, para a espécie A podem não ser polimórficas para a espécie B. No entanto, em níveis sistemáticos mais baixos, como gênero e subgênero, a possibilidade de transferibilidade de microssatélites entre as espécies é mais elevada, chegando perto de

60% de sucesso em Arthropoda, por exemplo (Barbará *et al.*, 2007).

Os culicídeos são responsáveis pela veiculação de diversos agentes infecciosos ao homem e animais, o que confere a esse grupo significativa importância em saúde pública. Tendo em vista que os microssatélites são os marcadores que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, seu emprego em estudos relacionados a espécies de mosquitos vetoras é ideal para o mapeamento genético e físico, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações desse grupo. O objetivo do presente trabalho é resumir e fornecer informações sobre estudos envolvendo culicídeos através da utilização de marcadores microssatélites e propor sugestões de pesquisas para uma melhor compreensão da biologia e dinâmica de transmissão do vírus da febre amarela por espécies do gênero *Haemagogus*. Foram utilizadas as abreviaturas de gêneros de Culicidae propostas por Reinert (1975).

O EMPREGO DE MICROSSATELITES EM ESTUDOS COM MOSQUITOS

Isolamento e transferibilidade

Os microssatélites passaram a ser utilizados em estudos com culicídeos a partir de meados da década de 1990 (e.g. Lanzaro *et al.*, 1995) e desde então o número de trabalhos publicados aumentou, principalmente em consequência das metodologias de isolamento e sequenciamento desse marcador terem se tornado mais simples, automatizadas e econômicas ao longo dos anos (Barbará *et al.*, 2007). Foi possível esclarecer com mais eficiência questões que antes, com o emprego de outras metodologias, dificilmente eram solucionadas. Por exemplo, Fonseca *et al.* (2004) analisaram o complexo de espécies *Culex pipiens* e identificaram aquelas com maior e menor capacidade para transmitir o Vírus do Oeste do Nilo, Chen *et al.* (2008) observaram o padrão de distribuição dos ovos de *Anopheles gambiae* e *An. arabiensis* ao longo dos criadouros, Widdel *et al.* (2005) identificaram as regiões que serviram como “portas” de entrada para *Aedes japonicus* nas Américas, e Ranson *et al.* (2004) utilizaram-se deste marcador para localizar QTLs associados a resistência a inseticidas em *An. gambiae*. Para demonstrar a frequência com que esse marcador tem sido utilizado em Culicidae, foi realizado um censo a partir de publicações no periódico *Molecular Ecology*

Resources entre os anos de 2001 a 2008. Foram identificados 255 artigos envolvendo o isolamento e caracterização de novos loci de microssatélites em diferentes grupos dentro de Insecta, sendo que desses, 21 (8,2%) referiam-se a indivíduos da família Culicidae (Fig. 1). Todas as espécies desse grupo estavam associadas à transmissão de algum agente infeccioso ao homem, sendo integrantes de três gêneros: *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (Fig. 2).

O isolamento e caracterização de loci de microssatélites úteis para a realização de estudos moleculares através de métodos comuns de identificação, como a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas, mostrou-se mais difícil para algumas espécies de Culicidae do que para outras. Em *Ae. aegypti*, essas metodologias resultaram na descrição de apenas vinte loci de microssatélites úteis

(Lovin *et al.*, 2009), já para *An. gambiae*, propiciaram a descrição de mais de cem sequências (Zheng *et al.*, 1996). O gênero *Anopheles* apresenta o maior número de espécies com microssatélites isolados e geneticamente ou citologicamente mapeados, tendo as sequências depositadas em bancos de dados genômicos (e.g. GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) que podem ser livremente acessados por qualquer pesquisador.

A metodologia de identificação de loci de microssatélites com base na construção de bibliotecas genômicas enriquecidas é, historicamente, a mais utilizada. Já foram descritas sequências desse marcador através dessa metodologia para: *Ae. aegypti* (Slotman *et al.*, 2007), *Ae. albopictus* (Porretta *et al.*, 2006), *Ae. caspius* (Porretta *et al.*, 2005), *Ae. polynesiensis* (Behbahani *et al.*, 2004), *Ae. taeniorhynchus* (Bataille

Fig. 1. Artigos publicados no periódico *Molecular Ecology Resources* entre o período de 2001 e 2008 com o isolamento e caracterização de novos loci de microssatélites para espécies da classe Insecta.

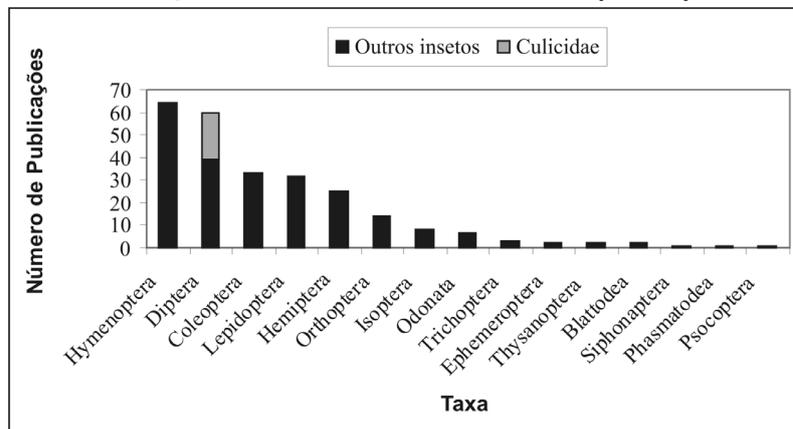
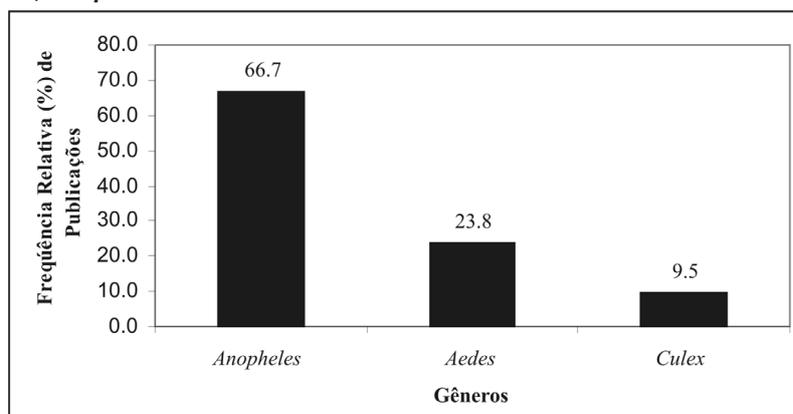


Fig. 2. Frequência relativa de artigos publicados no periódico *Molecular Ecology Resources* entre o período de 2001 e 2008 com o isolamento e caracterização de novos loci de microssatélites para espécies de *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*.



et al., 2009), *An. maculipennis* (Weill *et al.*, 2003), *An. marajoara* (Li *et al.*, 2005), *An. stephensi* (Verardi *et al.*, 2002), *An. sinensis* (Ma & Fan, 2008), *Culex pipiens* (Keyghobadi *et al.*, 2004) e *Cx. tarsalis* (Rasgon *et al.*, 2006, Venkatesan *et al.*, 2007).

Atualmente outras metodologias para o isolamento e caracterização de microssatélites estão sendo utilizadas. Para *Ae. aegypti*, espécie que as metodologias usuais não eram eficientes para se obter as sequências de microssatélites, Lovin *et al.* (2009), através de varreduras no genoma da mesma associadas com a utilização de PCR multiplex, conseguiram obter com sucesso 20 loci polimórficos desse marcador. Outra importante inovação utilizada para a obtenção de sequências de microssatélites de vários organismos e, que poderá ser aplicada para os Culicidae, é o seqüenciamento pelo pirosequenciador. O pirosequenciamento quando comparado com as abordagens tradicionais oferece uma maior rapidez, menores custos e necessidades técnicas para a obtenção dos microssatélites (Perry & Rowe, 2010).

Outra alternativa para o estudo com microssatélites em Culicidae seria a obtenção dos mesmos pela transferência de primers que flanqueiam as sequências desse marcador de uma espécie em que os mesmos já tenham sido obtidos para outra. Alguns trabalhos demonstram que esta transferibilidade é perfeitamente possível para o grupo (Tab. I). Barbará *et al.* (2007) sugerem que a amplificação cruzada de loci de microssatélites deve ser analisada caso a caso, baseada, principalmente, em informações evolutivas inerentes ao crescimento do número de seqüências genômicas completas disponíveis, sendo que a proximidade dos taxa analisados está diretamente associada ao sucesso da transferibilidade dos primers.

Estrutura Genética das Populações

A habilidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética. A informação da variação genética dentro e entre as populações é importante para compreender a história evolutiva de populações de mosquitos e da epidemiologia da doença (Yan *et al.*, 1998). Assim, o estudo da estrutura genética da população é essencial para o entendimento da dinâmica das populações do vetor e para a análise de fatores responsáveis pela resistência e adaptação ecológica.

Os microssatélites permitem analisar com eficiência a estrutura genética das populações por apresentarem um maior conteúdo informativo por locus gênico do que outros marcadores moleculares. Permitem observar diferenças genéticas em populações separadas por poucos quilômetros (escala microgeográfica; diferentes bairros de uma cidade, por exemplo) (Costa-Ribeiro *et al.*, 2006) ou ainda, analisar a mesma população em momentos temporais distintos (e.g. diferentes estações do ano) (Lehmann *et al.*, 2003). Segundo Hanski & Gilpin (1997), a detecção da variabilidade genética a nível intra-específico ao longo de gradientes geográficos e/ou temporais é capaz de fornecer dados para estimar se uma população está em extinção, expansão ou em equilíbrio.

Simard *et al.* (2000) estudaram a diversidade genética, através de oito loci de marcadores microssatélites, de *An. arabiensis*, importante vetor da malária na África, ao longo de vários meses, incluindo um período de severa seca, no Senegal e observaram que durante a estação de seca, quando as populações desse vetor caem drasticamente, a diversidade genética continua constante. Também obtiveram resultados que demonstraram uma baixa diferenciação genética entre duas populações amostradas em locais distantes 250 km entre si, o que levanta a possibilidade da existência de um contínuo fluxo gênico entre as mesmas. Temu *et al.* (2004) demonstraram que a distância geográfica está correlacionada com heterogeneidade genética das populações de *An. funestus* de diferentes regiões africanas e relacionaram esse padrão com a existência de barreiras geográficas causadas pela fragmentação das áreas de estudo. Keyghobadi *et al.* (2006), através de 12 loci de marcadores microssatélites, analisaram como a estrutura espacial e as diferenças no gradiente altitudinal atuam na estruturação das populações de *Cx. quinquefasciatus*, vetor da malária aviária na ilha do Havaí, ao longo de distâncias relativamente pequenas, menores que 100Km. Assim, identificaram um moderado isolamento entre a maioria das 34 populações amostradas na ilha e uma redução na diversidade genética nas populações oriundas de regiões mais elevadas em relação àquelas de regiões de menor altitude. Pode-se ainda citar, nessa mesma abordagem, estudos desenvolvidos por Lehmann *et al.* (2003) com *An. gambiae*, Morlais *et al.* (2005) com *An. arabiensis*, Ali *et al.* (2007) com *An. stephensi*, e Antonio-Nkondjio *et al.* (2007) com *An. moucheti*.

Tab. I. Transferibilidade de loci de microssatélites isolados a partir de uma espécie ou subespécie de Culicidae (Táxon I) e amplificados em outra espécie/subespécie (Táxon II).

Loci	Taxon I	Taxon II	Referência
AgXH7, AgXH49, AgXH53, AgXH131, AgXH638, Ag2H803, Ag2H26, Ag2H46, Ag2H79, Ag2H141, Ag2H143, Ag2h325, Ag2H603, Ag2H637, 29C, 33C, 45C, Ag3H93, Ag3H158, Ag3H555, 1D1	<i>An. gambiae</i>	<i>An. arabiensis</i>	Morlais et al. (2005), Temu & Yan (2005)
Atae09, Atae10	<i>Ae. taeniorhynchus</i>	<i>Ae. aegypti</i>	Bataille et al. (2009)
Atae09, Atae11, Atae13	<i>Ae. taeniorhynchus</i>	<i>Ae. albopictus</i>	Bataille et al. (2009)
Atae13	<i>Ae. taeniorhynchus</i>	<i>Ae. japonicus</i>	Bataille et al. (2009)
Ap1, Ap2, Ap3, Ap5, Ap6	<i>Ae. polynesiensis</i>	<i>Ae. albopictus</i> , <i>Ae. pseudoscutellaris</i> , <i>Ae. tongae</i>	Behbahani et al. (2004)
Ap1, Ap2, Ap5, Ap6	<i>Ae. polynesiensis</i>	<i>Ae. katherinensis</i>	Behbahani et al. (2004)
OJ5, OJ10, OJ70, OJ85, OJ100, OJ187, OJ338	<i>Ae. japonicus japonicus</i>	<i>Ae. japonicus yayamensis</i> , <i>Ae. j. shintienensis</i> , <i>Ae. koreicus</i>	Widdel et al. (2005)
CxqGA12, CxqGT4, CxqGT6, CxqGT8, CxqGT14, CxqGT17, CxTri4	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Cx. australicus</i>	Smith et al. (2005)
CQ26, CxqATG9, CxqCAG101, CxqCTG10, CxqGT4, CxqGT6, CxqGT17, CxqGT108, CxTri4	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Cx. pipiens pipiens</i>	Edillo et al. (2007), Kothera et al. (2009), Smith et al. (2005)
CxqGT4, CxqGT6, CxqGT8, CxqGT14, CxqGT17	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Cx. p. pallens</i>	Smith et al. (2005)
CxqGT4, CxqGT6, CxqGT8, CxqGT14, CxqGT17, CxTri4	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Cx. pervigilans</i> , <i>Cx. torrentium</i>	Smith et al. (2005)
CxqGT4, CxqGT6	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Cx. restuans</i> , <i>Cx. salinarius</i>	Smith et al. (2005)
CxpGT4, CxpGT9, CxpGT12, CxpGT40, CxpGT46, CxpGT51	<i>Cx. p. pipiens</i>	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Kothera et al. (2009), Smith et al. (2005)
CxpGT4, CxpGT9, CxpGT20, CxpGT40, CxpGT51	<i>Cx. p. pipiens</i>	<i>Cx. australicus</i>	Smith et al. (2005)
CxpGT4, CxpGT9, CxpGT40, CxpGT51	<i>Cx. p. pipiens</i>	<i>Cx. pervigilans</i>	Smith et al. (2005)
CxpGT4, CxpGT9, CxpGT12, CxpGT46, CxpGT51	<i>Cx. p. pipiens</i>	<i>Cx. p. pallens</i>	Smith et al. (2005)
CxpGT40, CxpGT51	<i>Cx. p. pipiens</i>	<i>Cx. restuans</i>	Smith et al. (2005)
CxpGT9, CxpGT40, Cx- pGT51	<i>Cx. p. pipiens</i>	<i>Cx. salinarius</i>	Smith et al. (2005)
CxpGT9, CxpGT40, Cx- pGT51	<i>Cx. p. pipiens</i>	<i>Cx. torrentium</i>	Smith et al. (2005)

Segundo Selkoe *et al.* (2006), apesar de morfologicamente idênticas, subespécies de mosquitos podem apresentar diferenças fisiológicas e ecológicas importantes, inclusive diferenças na capacidade vetora de certos agentes patogênicos. Assim, indicam os microssatélites, devido ao alto polimorfismo, como a metodologia mais eficiente para separar subespécies. Kothera *et al.* (2009), através de oito loci de marcadores microssatélites, caracterizaram as subespécies e híbridos de *Cx. p. pipiens* e *Cx. p. quinquefasciatus*. Eles determinaram a variação e extensão da hibridização dessas espécies e definiram uma zona geográfica híbrida. Também Kent *et al.* (2007), com o emprego de 12 loci de marcadores microssatélites, identificaram diferenças genéticas nos EUA entre *Cx. p. pipiens* e *Cx. p. molestus* e seu potencial de hibridização. Nos dois casos, os autores demonstraram que as subespécies estudadas não estão reprodutivamente isoladas.

Comportamento de Oviposição

Como descrever o comportamento e padrões de oviposição dos mosquitos in natura é uma tarefa muito difícil, métodos indiretos realizados a partir de testes de verificação de parentesco podem ser utilizados para a detecção do padrão de oviposição das fêmeas de mosquitos através da análise genética das larvas presentes nos criadouros. Faleiro (2007) sugere que, de modo geral, marcadores moleculares co-dominantes e multialélicos, como os microssatélites, são os mais indicados para os estudos de identificação e testes de parentesco.

Segundo Barbosa-Neto *et al.* (1996), a melhor forma de se estabelecer o grau de parentesco entre indivíduos se dá pela obtenção do chamado coeficiente de parentesco (r), que em sua definição, expressa a probabilidade de dois indivíduos terem genes idênticos herdados de ancestrais comuns. Esse coeficiente pode ser obtido diretamente através do padrão de bandas obtido com os microssatélites. No entanto, em populações naturais de mosquitos, onde informações do pedigree não podem ser obtidas a priori, estabelecer o coeficiente de parentesco a partir de genótipo apresentado por cada indivíduo para esse marcador representa um desafio. Diante disso, diversos estimadores para o coeficiente de parentesco foram desenvolvidos. Lunn & Ritland (1999) destacam que, entre eles, a utilização de métodos de reamostragem (bootstrap) sobre indivíduos são os mais adequados,

pois parecem solucionar a construção de intervalos de confiança para a obtenção dos coeficientes de parentesco em populações naturais sem informações referentes ao genótipo parental.

Ao analisar o parentesco das larvas de *An. gambiae*, Chen *et al.* (2006), utilizando nove loci de microssatélites, observaram que as fêmeas utilizam múltiplos locais para realizar a mesma oviposição, sendo que criadouros com altas densidades de larvas tendem a ter uma baixa correlação genética, ou seja, apresentam oviposições de diferentes fêmeas. Chen *et al.* (2008), através da análise de nove loci de microssatélites, analisaram o comportamento de oviposição de *An. gambiae* e *An. arabiensis* e observaram que as fêmeas da primeira espécie ovipositam, em média, 5,2 ovos por criadouro, e as da segunda cinco ovos. Também forneceram evidências de que ambas as espécies compartilham os mesmos locais para oviposição, sendo atraídas pela concentração de matéria orgânica na água e pela ausência de predadores.

PERSPECTIVAS OFERECIDAS PELOS MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA ESTUDOS COM *Haemagogus*

A febre amarela é uma doença que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América causando periodicamente epidemias de impacto variável na saúde pública. Sob o ponto de vista epidemiológico a febre amarela divide-se em duas formas, a urbana e a silvestre que diferem entre si quanto à natureza dos transmissores e dos hospedeiros vertebrados e o local de ocorrência. A forma silvestre é transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Haemagogus* e secundariamente por mosquitos *Sabethes* ao homem quando este adentra a mata (Vasconcelos, 2003). No Brasil registram-se anualmente casos isolados de febre amarela silvestre (FAS) a 19 Estados, manifestando-se de forma cíclica a cada 5 a 7 anos, conseqüentes às epizootias em primatas não humanos. No período de 2000 a 2009 foram registrados 320 casos de FAS, com 152 óbitos distribuídos por 15 estados, destacando-se os anos de 2007 a 2009 com 105 casos e 53 óbitos, envolvendo os Estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (Gomes *et al.*, 2010).

Além da vacinação de pessoas residentes de áreas endêmicas, o entendimento dos diversificados aspectos da biologia dos vetores (e.g. horários de

maior atividade hematofágica) é fundamental para o controle de casos de FAS. A utilização de metodologias com base em marcadores moleculares, como os microssatélites, fornece uma nova perspectiva de estudos ecológicos, comportamentais e genéticos, oferecendo a oportunidade de buscar formas mais eficientes de controlar a distribuição e crescimento populacional dos vetores, bem como ajudar a prever os efeitos de alterações realizadas pelo homem na natureza, como o desmatamento, nos ciclos de transmissão dessa doença.

Não existe registro de sequências de microssatélites descritas para as 28 espécies conhecidas de *Haemagogus*. Uma excelente alternativa para se obter microssatélites seria a transferibilidade de primers desse marcador, já descritas para outros Culicidae, para as espécies de interesse. Esse procedimento demanda menos tempo e recursos financeiros do que o isolamento e descrição das sequências a partir da construção de bibliotecas genômicas. Para aumentar as chances de sucesso dessa alternativa, o ideal seria começar com microssatélites a partir de taxa filogeneticamente próximos aos *Haemagogus*. Reinert *et al.* (2004) apresentaram uma filogenia para Aedini, e das espécies proximamente relacionadas a *Haemagogus* com microssatélites descritos, pode-se destacar *Oc. triseriatus* (Bataille *et al.*, 2009).

Uma das principais espécies envolvidas no ciclo de transmissão da FAS é *Hg. janthinomys*, que apresenta ampla distribuição de Honduras ao sudeste do Brasil, incluindo também Amazônia e Argentina (Trapido & Galindo, 1955; Arnell, 1973). A presença dessa espécie em diferentes biomas florestais em diferentes regiões do continente fizeram com que Alencar *et al.* (2009) sugerissem a existência do “complexo janthinomys”, semelhante ao observado em *An. gambiae* s.l. (Parmakelis *et al.*, 2008). Essa hipótese poderia ser testada através do emprego de marcadores microssatélites, a partir de mosquitos coletados em diferentes locais da área de ocorrência da espécie. Poderia ser relacionada à existência das possíveis espécies crípticas com a menor ou maior competência vetorial na transmissão da FAS pela inoculação do vírus em laboratório, ou ainda com a possibilidade de transmissão transovariana do vírus, observada para algumas espécies do gênero e importante para a manutenção do vírus na natureza.

Outra espécie com importante papel no ciclo da FAS é *Hg. leucocelaenus* que, como *Hg. janthinomys*, apresenta ampla distribuição na América Central e do Sul. Komp (1938) reportou que duas

formas de *Hg. leucocelaenus* existem no Panamá, e mais tarde, Galindo *et al.* (1952) confirmaram as observações de Komp. Esses autores sugeriram que *Hg. leucocelaenus* é composta por um complexo de cinco morfotipos, distribuído da Costa Rica até o oeste da América do Sul, na Argentina. Zavortink (1972) observou que a população de *Hg. leucocelaenus* do nordeste da Argentina formam um grupo com características morfológicas que o distingue de outras populações americanas da mesma espécie. E mais recentemente, Alencar *et al.* (2005) analisando seis populações dessa espécie oriundas do Mato Grosso, Goiás (três populações, sendo uma delas na região da Hidrelétrica de Corumbá, município de Caldas Novas), Paraná e Rio de Janeiro através de análises morfométricas, observaram que apenas a população oriunda da Hidrelétrica de Corumbá (Goiás) apresentava diferenças significativa em relação as outras cinco.

Pelo fato dos marcadores microssatélites representam uma ferramenta útil para a investigação de problemas taxonômicos, como a delimitação de populações da mesma espécie, no caso de *Hg. leucocelaenus*, eles poderiam ser empregados de forma associada com estudos morfométricos, por exemplo, oferecendo, certamente, excelentes resultados. A identificação das diferentes populações dessa espécie seria importante, visto que populações distintas podem ter seu ritmo da atividade horária e ao longo das estações do ano influenciados de forma diferenciada pelos fatores ecológicos e climáticos (temperatura, umidade relativa do ar e pluviosidade). Esta informação seria de grande valia para estabelecer períodos com maior ou menor probabilidade de transmissão da FAS nas diferentes regiões de ocorrência de *Hg. leucocelaenus*.

Pouco se sabe a respeito do comportamento de oviposição de *Haemagogus* em condições de campo. Os imaturos usualmente se desenvolvem em ocos de árvores e bambus cortados, muitas vezes localizados em elevadas alturas, o que torna muito difícil a obtenção de quantidades apreciáveis de formas imaturas. Associado a isso, existe outra dificuldade, observar a fêmea durante a atividade de oviposição.

O emprego de métodos indiretos com abordagem genética, no caso, marcadores moleculares altamente polimórficos, como os microssatélites, permite associar o parentesco das larvas do mesmo e de diferentes criadouros bem como os adultos.

Para facilitar e amplificar a obtenção de imaturos de *Haemagogus*, armadilhas para postura são uma excelente alternativa, pois já vêm sendo usadas com sucesso para obter material de *Hg. equinus* (Fay & Eliason, 1966) e *Hg. janthinomys* (Alencar *et al.*, 2004). Assim, seria possível obter importantes informações a respeito do padrão de distribuição das posturas e estabelecer os fatores relativos ao potencial criadouro que influenciam na oviposição. Relacionar larvas irmãs de diferentes criadouros também permite, de modo indireto, estabelecer a capacidade de dispersão das fêmeas no interior das matas e obter informações, por exemplo, se espécies de atividade acrodendrófilas como *Hg. janthinomys*, podem, em uma mesma postura, distribuir seus ovos em criadouros próximos ao solo e dossel.

Apesar do empenho necessário para o desenvolvimento prévio dos microsatélites, esse marcador possibilitaria que estudos envolvendo a biologia e dinâmica populacional de *Haemagogus*, como os citados anteriormente, se dessem de forma mais rápida e fácil, não exigindo conhecimento aprofundado de biologia molecular por parte do analista nem equipamentos sofisticados de laboratório. Isso faz com que os microsatélites se destaquem entre os marcadores moleculares, por serem de simples execução, apresentarem alta resolução em matriz de poliacrilamida e necessitarem pequenas quantidades de DNA. Sem dúvida, esse marcador representa uma metodologia interessante para um melhor entendimento de diversos fatores relacionados aos vetores e, conseqüentemente, ao ciclo da FAS.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado para GAM. Ao Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino pelas preciosas considerações e ajuda na elaboração da presente revisão.

Aplicación de marcadores microsatélites para el estudio de Culicidae (Diptera): una revisión con especial referencia a *Haemagogus*

RESUMEN

Los marcadores moleculares microsatelitales se caracterizan por su neutralidad, alto polimorfismo y elevada abundancia con amplia distribución en

el genoma de eucariotas. Su empleo en estudios relacionados a especies de mosquitos vectores es ideal para el mapeo genético y físico, para la identificación y discriminación de genotipos y estudios de genética de poblaciones. Esta revisión sintetiza y provee información sobre estudios de mosquitos que utilizan marcadores microsatelitales y propone nuevas líneas de investigación para una mejor comprensión de la biología y dinámica de transmisión del virus de la Fiebre Amarilla por especies del género *Haemagogus*.

Palabras clave: Fiebre Amarilla, SSRs, Marcadores moleculares, Mosquito.

Application of microsatellite markers for the study of Culicidae (Diptera): a review with special reference to *Haemagogus*

SUMMARY

Microsatellite molecular markers are characterized by neutrality, high polymorphism and wide distribution with high abundance in the genome of eukaryotes. Its use in studies related to species of mosquito vectors is ideal for genetic and physical mapping, for the identification and discrimination of genotypes and genetic studies of populations. This review summarizes and provides information on studies involving mosquitoes by using microsatellite markers and suggests avenues of research to better understand the biology and dynamics of transmission of Yellow Fever virus by *Haemagogus* mosquitoes.

Key words: Yellow fever; SSRs; molecular Markers; mosquito.

REFERÊNCIAS

- Alencar J. A., Gil-Santana H. R., Lopes C. M., Santos J. S. & Guimarães A. E. (2004). Utilização de armadilha “ovitrapa” para monitoramento de *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) em área de Mata Atlântica. *Entomol. vectores*. **11**: 369-374.
- Alencar J., Lorosa E. S., Dégallier N., Serra-Freire N. M., Pacheco J. B. & Guimarães A. E. (2005). Feeding patterns of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae) in different regions of Brazil. *J. Med. Entomol.* **42**: 981-985.

- Alencar J., Silva J. S., Serra-Freire N. M. & Guimarães A. E. (2009). Dispersion and ecological plasticity patterns of *Haemagogus capricornii* and *H. janthinomys* (Diptera: Culicidae) populations in different regions of Brazil. *Entomol. News*. **120**: 53-60.
- Ali N., Hume J. C. C., Dadzie S. K. & Donnelly M. J. (2007). Molecular genetic studies of *Anopheles stephensi* in Pakistan. *Med. Vet. Entomol.* **21**: 265-269.
- Antonio-Nkondjio C., Ndo C., Awono-Ambene P., Ngassam P., Fontenille D. & Simard F. (2007). Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles moucheti* in south Cameroon forest region. *Acta Trop.* **101**: 61-68.
- Arbeláez-Cortes E., Castillo-Cárdenas M. F., Toro-Perea N. & Cárdenas-Henao H. (2007). Genetic structure of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) on the Colombian Pacific detected by microsatellite molecular markers. *Hydrobiologia* **583**: 321-330.
- Arnell J. J. (1973). Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **10**: 1-174.
- Barbará T., Palma-Silva C., Paggi G. M., Bered F., Fay M. F. & Lexer C. (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol. Ecol.* **16**: 3759-3767.
- Barbosa-Neto J. F., Sorrells M. E. & Cisar G. (1996). Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP - based estimates of genetic relationship. *Genome*. **39**: 1142-1149.
- Bataille A., Horsburgh G. J., Dawson D. A., Cunningham A. A. & Goodman S. J. (2009). Microsatellite markers characterized in the mosquito *Aedes taeniorhynchus* (Diptera, Culicidae), a disease vector and major pest on the American coast and the Galápagos Islands. *Infect. Genet. Evol.* **9**: 971-975.
- Behbahani A., Dutton T. J., Raju A. K., Townson H. & Sinkins S. P. (2004). Polymorphic microsatellite loci in the mosquito *Aedes polynesiensis*. *Mol. Ecol. Notes*. **4**: 59-61.
- Blouin M. S., Parsons M., Lacaille V. & Lotz S. (1996). Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Mol. Ecol.* **5**: 393-401.
- Chen H., Fillinger U. & Yan G. (2006). Oviposition Behavior of Female *Anopheles gambiae* in Western Kenya Inferred from Microsatellite Markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**: 246-250.
- Chen H., Minakawa N., Cui L. & Yan G. (2008). Conspecific Sharing of Breeding Sites by Anopheline Female Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Inferred from Microsatellite Markers. *J. Insect Behav.* **21**: 24-33.
- Costa-Ribeiro M. C. V., Lourenço-de-Oliveira R. & Failloux A. B. (2006). Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **101**: 917-921.
- Edillo F. E., Tripet F., McAbee R. D., Foppa I. M., Lanzaro G. C., Cornel A. J. & Spielman A. (2007). A Set of Broadly Applicable Microsatellite Markers for Analyzing the Structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Populations. *J. Med. Entomol.* **44**: 145-149.
- Faleiro F. G. (2007). *Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Ed. Embrapa. Planaltina, Brasil.
- Fay R. W. & Eliason D. A. (1966). A preferred oviposition site as surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosq. News*. **26**: 531-535.
- Ferreira M. E. & Grattapaglia D. (1998). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3a Ed. Embrapa/Cenargen. Brasília, Brasil.
- Fonseca D. M., Keyghobadi N., Malcolm C. A., Mehmet C., Schaffner F., Mogi M., et al. (2004). Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. *Science*. **303**: 1535-1538.
- Galindo P., Trapido H. & Carpenter S. (1952). The taxonomic status of the *Aedes leucocelaenus* complex with description of two new forms. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **45**: 529-542.

- Gaggiotti O. E., Lange O., Rassmann K. & Gliddon C. A. (2002). Comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Mol. Ecol.* **8**: 1513-1520.
- Gomes A. C., Torres M. A. N., Paula M. B., Fernandes A., Marassá A. M., Consales C. A., *et al.* (2010). Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae) em áreas epizooticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde.* **19**: 101-113.
- Hancock J. M. (1999). Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. pp. 1-9. En: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Eds. Goldstein D. B. & Schlotter C. Oxford University Press. New York, EUA.
- Hanski I. & Gilpin M. E. (1997). *Metapopulation biology: ecology, genetics and evolution*. Ed. Academic Press. San Diego, EUA.
- Hauser L., Adcock G. J., Smith P. J., Ramirez J. H. B. & Carvalho G. R. (2002). Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 11742-11747.
- Hoelzel A. R., Natoli A., Dahlheim M. E., Olavarria C., Baird R. W. & Black N. A. (2002). Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* **269**: 1467-1473.
- Isagi Y., Kanazashi T., Suzuki W., Tanaka H. & Abe T. (2004). Highly variable pollination patterns in *Magnolia obovata* revealed by microsatellite paternity analysis. *Int. J. Plant Sci.* **165**: 1047-1053.
- Kent R. J., Harrington L. C. & Norris D. E. (2007). Genetic differences between *Culex pipiens f. molestus* and *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New York. *J. Med. Entomol.* **44**: 50-59.
- Keyghobadi N., Matrone M. A., Ebel G. D., Kramer L. D. & Fonseca D. M. (2004). Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. *Mol. Ecol. Notes.* **4**: 20-22.
- Keyghobadi N., LaPointe D., Fleischer C. & Fonseca D. M. (2006). Fine-scale population genetic structure of a wildlife disease vector: the southern house mosquito on the island of Hawaii. *Mol. Ecol.* **15**: 3919-3930.
- Kocher T. D., Thomas W. K. & Meyer A. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 6196-6200.
- Komp W. H. W. (1938). *Aedes leucotaeniatus*, a new species of *Aedes* allied to *A. leucocelaenus* D. & S.; and descriptions of the male and larva of *A. leucocelaenus* D. & S. (Diptera, Culicidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **40**: 260-266.
- Koskinen M. T., Nilsson J., Veselov A. Je., Potutkin A. G., Ranta E. & Primmer C. R. (2002). Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity.* **88**: 391-401.
- Kothera L., Zimmerman E. M., Richards C. M. & Savage H. M. (2009). Microsatellite characterization of subspecies and their hybrids in *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) mosquitoes along a North-South transect in the Central United States. *J. Med. Entomol.* **46**: 236-248.
- Lanzaro G. C., Toure Y. T., Zheng L., Kafatos F. C. & Vernick K. D. (1995). Microsatellite DNA and isozyme variability in a West African population of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* **4**: 105-112.
- Lehmann T., Hawley W. A., Kamau L., Fontenille D., Simard F. & Collins F. H. (2003). Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity.* **77**: 192-208.
- Li C., Wilkerson R. C. & Fonseca D. M. (2005). Isolation of polymorphic microsatellite markers from the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae). *Mol. Ecol. Notes.* **5**: 65-67.
- Lovin D. D., Washington K. O., deBruyn B., Hemme R. R., Mori A., Epstein S. R., Harker B. W., Streit T. G. & Severson D. W. (2009). Genome-based polymorphic microsatellite development

- and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. *BMC Genomics*. **10**: 1-9.
- Lunch M. & Ritland K. (1999). Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*. **152**: 1753-1766.
- Ma Y. & Fan Y. (2008). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from Asian malaria mosquito *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Mol. Ecol. Resources*. **8**: 1059-1061.
- Maudet C., Miller C., Bassano B., Breitenmoser-Würsten C., Gauthier D., Obexer-Ruff G. *et al.* (2002). Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in *Alpine ibex* [*Capra ibex (ibex)*]. *Mol. Ecol.* **11**: 421-436.
- Morlais I., Girod R., Hunt R., Simard F. & Fontenille D. (2005). Population structure of *Anopheles arabiensis* on la réunion Island, Pacific Ocean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**: 1077-1082.
- Parmakelis A., Russelo M., Caccone A., Marcondes C. B., Costa J., Forattini O. P., *et al.* (2008). Historical analysis of a near disaster: *Anopheles gambiae* in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **78**: 176-178.
- Perry J. C. & Rowe L. (2010). Rapid Microsatellite Development for Water Striders by Next-Generation Sequencing. *J. Hered.* **101**: 1-5.
- Porretta D., Bellini R. & Urbanelli S. (2005). Characterization of microsatellite in the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Diptera: Culicidae). *Mol. Ecol. Notes*. **5**: 48-50.
- Porretta D., Gargani M., Bellini R., Calvitti M. & Urbanelli S. (2006). Isolation of microsatellite markers in the tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse). *Mol. Ecol. Notes*. **6**: 880-881.
- Ranson H., Paton M. G., Jensen B., McCarroll L., Vaughan A., Hogan J. R., Hemingway J. & Collins F. H. (2004). Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* **13**: 379-386.
- Rasgon J. L., Venkatesan M., Westbrook C. J. & Hauer M. C. (2006). Polymorphic microsatellite loci from the West Nile virus vector *Culex tarsalis*. *Mol. Ecol. Notes*. **6**: 680-682.
- Reinert J. F. (1975). Mosquito generic and subgeneric abbreviations (Diptera: Culicidae). *Mosq. Sys.* **7**: 105-110.
- Reinert J. F., Harbach R. E. & Kitching I. J. (2004). Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zool. J. Linn. Soc.* **142**: 289-368.
- Richard M. & Thorpe R. S. (2001). Can Microsatellites Be Used to Infer Phylogenies? Evidence from Population Affinities of the Western Canary Island Lizard (*Gallotia galloti*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **22**: 351-360.
- Schlötterer C. & Pemberton J. (1998). The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. pp. 71-86. En: *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Eds. Desalle R. & Schierwater B. Birkhäuser, Basel.
- Schlötterer C. & Wiehe T. (1999). Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. pp. 238-248. En: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Eds. Goldstein D. B. & Schlötterer C. Oxford University Press, New York, USA.
- Selkoe K. A. & Toonen R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* **9**: 615-629.
- Simard F., Lehmann T., Lemasson J. J., Diatta M. & Fontenille D. (2000). Persistence of *Anopheles arabiensis* during the severe dry season conditions in Senegal: an indirect approach using microsatellite loci. *Insect Mol. Biol.* **9**: 467-479.
- Slotman M. A., Kelly N. B., Harrington L. C., Kitthawee S., Jones J. W., Scott T. W. *et al.* (2007). Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. *Mol. Ecol. Notes*. **7**: 168-171.
- Smith J. L., Keyghobadi N., Matrone M. A., Escher R. L. & Fonseca D. M. (2005). Cross-species

- comparison of microsatellite loci in the *Culex pipiens* complex and beyond. *Mol. Ecol. Notes*. **5**: 697-700.
- Sunnucks P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* **15**: 199-203.
- Temu E. A. & Yan G. (2005). Microsatellite and mitochondrial genetic differentiation of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from western Kenya, the Great Rift Valley, and coastal Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**: 726-733.
- Temu E. A., Hunt R. H. & Coetzee M. (2004). Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity in the malaria vector mosquito *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in east and southern Africa. *Acta Trop.* **90**: 39-49.
- Trapido H. & Galindo P. (1955). The Investigation of a sylvan yellow fever epizootic on the North coast of Honduras, 1954. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **4**: 665-674.
- Vasconcelos P. F. C. (2003). Febre Amarela. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* **36**: 275-293.
- Venkatesan M., Hauer M. C. & Rasgon J. L. (2007). Using fluorescently labelled M13-tailed primers to isolate 45 novel microsatellite loci from the arboviral vector *Culex tarsalis*. *Med. Vet. Entomol.* **21**: 204-208.
- Verardi A., Donnelly M. J., Rowland M. & Townson H. (2002). Isolation and characterization of microsatellite loci in the mosquito *Anopheles stephensis* Liston (Diptera: Culicidae). *Mol. Ecol. Notes*. **2**: 488-490.
- Weill M., Severini C., Guillemin M. L., Berticat C., Berthomieu A., Rousset F. *et al.* (2003). Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles maculipennis*. *Mol. Ecol. Notes*. **3**: 417-419.
- Widdel A. K., MacCuiston L. J., Crans W. J., Kramer L. D. & Fonseca D. M. (2005). Finding Needles in the Haystack: Single Copy Microsatellite Loci for *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**: 744-748.
- Yan G., Chadee D. D. & Severson D. W. (1998). Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics*. **148**: 793-800.
- Zane L., Bargelloni L. & Patarnello T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* **11**: 1-16.
- Zavortink T. J. (1972). Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXVIII. The New World species formerly placed in *Aedes* (Finlaya). *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **8**: 1-206.
- Zheng L., Benedict M. Q., Cornel A. J., Collins F. H. & Kafatos F. C. (1996). An integrated genetic map of the African human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics*. **143**: 941-952.

Recibido el 16/08/2010
Aceptado el 18/10/2010