**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Relações morfométricas e genética populacional de
Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)**

SIRLEI ANTUNES DE MORAIS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Doutora
em Saúde Pública.

Área de concentração:
Epidemiologia

ORIENTADOR:
PROFº. DR. MAURO TOLEDO
MARRELLI

**São Paulo
-2011-**

Relações morfométricas e genética populacional de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

SIRLEI ANTUNES DE MORAIS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Doutora
em Saúde Pública.

Área de concentração:
Epidemiologia

ORIENTADOR:
PROFº. DR. MAURO TOLEDO
MARRELLI

**São Paulo
-2011-**

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

*Dedico esta pesquisa Àquele que verdadeiramente me guiou.
Que esteve comigo em momentos muito difíceis para mim.
Aconselhou-me, e me deu habilidades.
Ao meu amado, meu Pai, meu Senhor*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, meu porto seguro. Apesar de eu ter ficado distante, os laços de amor jamais serão rompidos.

Ao meu orientador Mauro Marrelli, que soube me guiar nos estudos do Doutorado e ainda mais no conhecimento sobre genética. Muito obrigada.

À FAPESP pelo auxílio financeiro, imprescindível a esta obra, e ao revisor anônimo pelas sugestões e análise do meu projeto.

Ao Prof Delsio Natal. Meu primeiro Mestre e para sempre. Amigo e companheiro inseparável nessa incógnita chamada *Culex*.

Ao Prof Almério Gomes. Pelo companheirismo e presença constante na minha vida. Pelas conversas e a projeção no futuro!

Ao Lincoln Rocha, cuja parceria nos trabalhos contribuiu grandemente no meu aprendizado. E também pela amizade e os conselhos. Excelente pessoa que adorei conviver.

Aos companheiros da faculdade, Paulo Urbinatti, Walter Ceretti e Prof Barata. Importantes para a minha convivência.

Ao Ari, que foi um grande cooperador. A sua disposição e ajuda foi e sempre será imprescindível para mim.

A amiga Kelvilin Anahí. Companheira fiel e sempre muito próxima. Agradeço por ter quebrado alguns ‘galhos’ durante o curso e também pelos passeios, conversas e descontração. Serei sua eterna amiga.

Às amigas Mariana, Camila e Paloma. Obrigada pela amizade, as viagens pra Recife e Holanda, e os passeios que fizemos juntas e nos divertimos. Essas lembranças muito me alegram e ficarão guardadas para sempre!

*" Feliz aquele que suporta, com perseverança, a provação;
porque depois de ter sido aprovado, receberá a coroa da vida,
a qual o Senhor prometeu aos que o amam "*

Tiago 1:12

RESUMO

MORAIS SA. **Relações morfométricas e genética populacional de *Culex quinquefasciatus***. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Objetivo. *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say 1823 tem distribuição expansiva em aglomerados humanos e é vetor em ciclos de transmissão de agentes patogênicos, como filarídeos e arbovírus. Taxonomicamente, essa espécie está dentro do subgrupo *pipiens*, cuja principal característica é a similaridade morfológica dos seus integrantes. Este estudo objetivou caracterizar genética e morfológicamente espécies *Cx. quinquefasciatus* de dez localidades brasileiras e da região da bacia do Prata, na Argentina. **Métodos.** Para análises morfológicas foram utilizados valores morfométricos das veias alares de fêmeas e a razão DV/D do edeago, na genitália de machos adultos. Para testes genéticos foram sequenciados os genes mitocondriais *cox1* e *nd4*, clonados fragmentos do segundo espaçador ribossomal *ITS2* e analisado o padrão de bandas eletroforéticas do segundo intron do locus da Acetilcolinesterase (*ace2*). **Resultados.** A forma das veias alares de fêmeas agrega dois principais grupos, um com mosquitos do Brasil e outro de La Plata, tendo este último maior variação interna. Esses dados estão relacionados à distribuição encontrada no fragmento *ace2*, que indica La Plata como área de hibridação entre *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens*. Os valores de tamanho da asa apresentam três principais agrupamentos. Um deles em áreas ao norte do Brasil, outro no sudeste e sul, e outro na Argentina. O mesmo ocorre com a razão DV/D da genitália masculina. Os dados de sequências de bases do gene *cox1* apresentam polimorfismos, com baixa diversidade e agrupamento populacional na região Sul do Brasil. Os SNPs encontrados são silenciosos, pois não apresentam modificação na estrutura da proteína produzida. O gene *nd4* é idêntico em todas as amostras. Esses fragmentos sugerem características de homoplasma em *Cx. quinquefasciatus*. O espaçador *ITS2* mostrou variedade de polimorfismos, por eventos intra-genômicos de inserção, deleção, translocação e transição de bases. Porém, esses eventos são sincrônicos em populações de diferentes áreas geográficas; assim como, mostra pouca variação nas estruturas dos transcritos RNAr. Por outro lado, os dados *ITS2* apontam a segregação de um trinucleotídeo GTC, em mosquitos de La Plata, caracterizando essa área como de isolamento geográfico de mosquitos do complexo *pipiens*. **Conclusão.** A espécie *Cx. quinquefasciatus* possui baixa diversidade genética e morfológica, duas linhagens mitocondriais no Brasil e mosquitos de origem híbrida com *Cx. pipiens* na Bacia do Prata, na Argentina.

Descritores: *ace2*, *cox1*, *Culex quinquefasciatus*, *ITS2*, morfometria, *nd4*.

ABSTRACT

MORAIS SA. **Morphometric relationships and population genetics of *Culex quinquefasciatus***. São Paulo, 2010. [PhD Thesis - School of Public Health -USP].

Objective. The *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say 1823 is widely distributed in human settlements, and is a vector in the transmission cycles of pathogens such as arboviruses and filarids. This species belongs to *Cx pipiens* complex, whose main characteristic is the morphologic similarity of their species. This study aimed to characterize genetic and morphological *Cx quinquefasciatus* species from different regions of Brazil and La Plata, Argentina. **Methods.** Were used morphometric values of wing veins of females and the DV/D ratio of aedeagus in adult male genitalia. For genetic testing were sequenced mitochondrial *cox1* and *nd4* genes, cloned fragments of ribosomal ITS2 spacer and examined the pattern of electrophoretic bands of the second intron of Acetylcholinesterase (*ace2*) locus. **Results.** The shape of the wing veins of female aggregates two main groups, one with mosquitoes of the Brazil and one from La Plata, the latter having greater internal variance. These data are related to the distribution found in *ace2* fragment, which indicates La Plata as hybridization area between *Cx. pipiens* and *Cx. quinquefasciatus*. The values of wing size form a geographical cline, with three main groupings. One of these areas in the north of Brazil other in the southeast and south, and another in Argentina. The same happens with reason DV/D of the male genitalia. Sequence data bases have *cox1* gene polymorphisms with low diversity and clustering of population in southern Brazil. The *cox1* SNPs found are trace, because it does not show modification in the structure of the protein produced. The *nd4* gene is identical in all samples. These fragments suggest homoplasmic features in *Cx. quinquefasciatus*. ITS2 showed polymorphisms and intragenomic events by insertion, deletion, translocation and transition bases. However, these events are synchronous in populations from different geographic areas and shows little variation in the structures of rRNA transcripts. Moreover, the data indicate ITS2 segregation of a trinucleotide GTC in mosquitoes from La Plata, featuring this area as the geographic isolation of the subgroup *pipiens* mosquitoes. **Conclusion.** *Cx quinquefasciatus* species has low genetic and morphological diversity, two mitochondrial lineages in Brazil and mosquitoes of hybrid origin with *Cx pipiens* in La Plata, Argentina.

Key words: *ace2*, *cox1*, *Culex quinquefasciatus*, ITS2, morphometry, *nd4*.

INDICE

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 O complexo <i>Culex pipiens</i>	9
1.2 Distribuição do <i>Cx. quinquefasciatus</i>	9
1.3 O complexo <i>Cx. pipiens</i> em áreas de introgressão gênica	9
1.4 Diferenciação dos membros do subgrupo <i>pipiens</i> por caracteres morfológicos	11
1.5 Marcadores moleculares em mosquitos	12
1.5.1 O DNA mitocondrial	13
1.5.2 O DNA ribossômico	14
1.5.3 Espaçadores, introns e repetições satélites	16
1.5.4 Diferenciação molecular pelo intron <i>ace2</i>	17
1.6 Importância em Saúde Pública	18
1.6.1 Alimentação sanguínea	18
1.6.2 Incômodo em centros urbanos	19
1.6.3 Arboviroses	19
1.6.3.1 Encefalite Equina Venezuelana (EEV)	19
1.6.3.2 Encefalite Saint Louis (SLE)	20
1.6.3.3 Febre do Vírus do Oeste do Nilo (WNV)	20
1.6.4 Filariose	21
1.6.4.1 Dirofilariose Canina	21
1.6.4.1 Bacroftose Americana (Elefantíase)	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 MÉTODOS	24
3.1 Amostragem	24
3.1.1 Obtenção de geração F1	25
3.2 Identificação morfológica	26
3.3 Área de estudo	26
3.4 Testes morfométricos	28
3.4.1 Genitália masculina	28
3.4.2. Morfometria da asa	29
3.5 Marcadores moleculares	30
3.5.1 O gene da Acetilcolinesterase (<i>ace</i>)	30
3.5.2 Genes mitocondriais	31
3.5.2.1 Extração do DNA, amplificação e sequenciamento	32
3.5.2.2 Construção e análise das sequências gênicas	33
3.5.3 DNA ribossômico	33
3.5.3.1 Extração do DNA e amplificação	34
3.5.3.2 Clonagem do <i>ITS2</i>	34
3.5.3.3 Construção e análise das sequências gênicas	35
4 RESULTADOS e DISCUSSÃO	36
4.1 Caracterização morfológica	36
4.1.1 Estrutura da genitália de adulto macho	36
4.1.2 Morfometria da asa	37
4.2 Marcadores moleculares	38
4.2.1 Genes mitocondriais <i>cox1</i> e <i>nd4</i>	38
4.2.1.2 Homoplasmia	39

4.2.1.3 Análise de predição de proteínas	42
4.2.2 Locus <i>ace2</i>	43
4.2.3 Espaçador <i>ITS2</i> do DNAr	45
4.2.3.1 Domínios homólogos do <i>ITS2</i>	46
4.2.3.2 Marcador genético no <i>ITS2</i>	48
4.2.3.3 Estrutura Secundária (RNAr)	49
4.3 A estrutura genética no Brasil e implicações em ciclos de doenças infecciosas	53
5 CONCLUSÕES	52
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	
Anexo 1 - Paper: Genetic-morphometric variation in <i>Culex quinquefasciatus</i> from Brazil and La Plata, Argentina.	A1
Anexo 2 - Manuscrito: Low mitochondrial diversity of <i>Culex quinquefasciatus</i> infected by <i>Wolbachia</i>	A2

1 INTRODUÇÃO

1.1 O complexo *Culex pipiens*

Os membros do complexo *Culex pipiens* L. incluem *Cx. (Cx.) pipiens* L. 1758, *Cx. (Cx.) pipiens f. molestus* Forskal 1785, *Cx. (Cx.) quinquefasciatus* Say 1823, *Cx. (Cx.) pipiens pallens* Coquillett 1898 e *Cx. (Cx.) australicus* Dobrotworsky & Drummond 1953. O *Cx. p. f. molestus* é considerado um variante do *pipiens*, sendo encontrado em áreas temperadas, juntamente com este. Essas duas formas apresentam diferenças fisiológicas, comportamentais e epidemiológicas e, em áreas de simpatria, passam por processos de introgressão gênica (BAHNCK & FONSECA, 2006). O *Cx. australicus* tem distribuição restrita à Austrália e *Cx. p. pallens* tem ocorrência em zona de hibridação, com *Cx. pipiens*, em países próximos à Coreia do Norte (SMITH & FONSECA, 2004).

As espécies *Cx. (Cx.) torrentium* Martini 1925 e *Cx. (Cx.) pervigilans* Von Bergroth 1889 são morfologicamente muito similares aos membros do complexo *Cx. pipiens*, porém não pertencem a este subgrupo. *Culex torrentium* ocorre em simpatria com *Cx. pipiens* através da Europa e em algumas partes da Ásia (SERVICE, 1968). *Culex pervigilans* tem sido relatado na Nova Zelândia e ilhas vizinhas como espécie de distribuição fechada, ocorrendo juntamente com *Cx. quinquefasciatus* (BELKIN, 1962).

Culex pipiens e *Cx. quinquefasciatus* possuem distribuição geográfica temperada e equatorial-tropical, respectivamente. Na dispersão e distribuição acompanham a atividade e convivência humana. Segundo FONSECA et al. (2004), em áreas urbanas da América do Norte estão presentes as espécies *Cx. pipiens* acima de 39°N, *Cx. quinquefasciatus* abaixo de 36°N e os híbridos destes entre 35 e 38°N.

Existem relatos da existência de zonas de hibridação entre essas duas espécies na América do Norte, Argentina e Madagascar (UBANELLI et al. 1997; HUMERES et al. 1998).

1.2 Distribuição do *Cx. quinquefasciatus*

Conhecido como o mosquito tropical, o *Cx. quinquefasciatus* tem distribuição expansiva no meio urbanizado entre as faixas equatorial e tropical de todo o mundo (BARR 1957; BELKIN 1962), incluindo o território brasileiro (FORATTINI 2002). Isso porque essa espécie tem maior desempenho em ambientes com baixa exposição a

variações climáticas bruscas, pois não exibe expressão de produtos de resistência ao frio (LEATHER et al. 1995; MORI et al. 2007).

Figura1. Imagens das fases de vida do *Cx. quinquefasciatus*. **A** Jangada de ovos. **B** Larva. **C** Pupa. **D** Macho em alimentação de açúcar. **E** Fêmea. Fotos: Moraes SA

No Brasil, ainda não foi relatada a presença de outro membro do complexo *pipiens*. Entretanto, existem trabalhos que indicam a presença de *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* e os híbridos destes em países vizinhos, como na Argentina, (HUMERES et al. 1998; ALMIRÓN et al. 1995). O extremo sul do Brasil está localizado nos limites da zona de intergradação de clima subtropical e temperado, com possibilidades de abrigar outras formas de mosquitos do complexo *Cx pipiens*.

1.3 O complexo *Cx pipiens* em áreas de introgressão gênica

Em geral, organismos híbridos interespecíficos são comumente estéreis (BURKE & ARNOLD, 2001). Uma explicação é que os pares cromossômicos, que consistem em

um cromossomo de cada espécie, não segregam regularmente na meiose, sendo que para evoluir em uma nova espécie biológica, essa esterilidade precisa ser superada. Um mecanismo favorável é a poliploidia, relatado em insetos (HOY, 2003). Nesse caso, se os números de cromossomos estão duplicados, cada par em meiose contém dois cromossomos de cada espécie; assim, a segregação regular é restaurada mais rapidamente (RIDLEY, 2006).

Outro mecanismo para o sucesso evolutivo da população híbrida é a introgressão, onde os indivíduos híbridos retrocruzam com os genitores. Se os híbridos e os tipos parentais cruzam, durante certo número de gerações, a população híbrida tende a constituir uma mistura complexa de genes dos parentais. Isso a torna isolada reprodutivamente, evoluindo para nova espécie (RIDLEY, 2006).

Assim, regiões de intergradação constituem áreas de hibridação de alta pressão seletiva. A exemplo da América do Norte, em que a faixa híbrida se estende entre 35 a 38° N de latitude (FONSECA et al. 2004), na América do Sul, provavelmente ocorre processos de hibridação ao longo da faixa latitudinal subtropical-temperada. As regiões sul-americanas próximas a esta faixa abrange o extremo Sul do Brasil, Uruguai e Argentina. ALMIRÓN et al. (1995) relatam a presença de *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens* e híbridos entre 32 a 38° S de latitude, sendo esta última gradação nas proximidades de Buenos Aires, na Argentina. Nos estudos de ALMIRÓN et al. (1995) a diferenciação dos membros do complexo *Cx. pipiens* foi feita por meio de confecção de lâminas da genitália de adultos machos, com observação das medidas do raio DV/D dos braços dorsais e ventrais do edeago, no falossoma.

1.4 Diferenciação dos membros do subgrupo *pipiens* por caracteres morfológicos

Um dos parâmetros morfométricos mais utilizados para diagnose de *Cx. quinquefasciatus* adulto pela morfologia interna é a razão entre as distâncias D e DV que separa os braços dorsais e ventrais do edeago, no falossoma da genitália masculina, conforme demonstrado na Figura 2.

As medidas do raio DV/D dos braços dorsais do falossoma, na genitália de adulto macho, dos membros do complexo *Cx. pipiens* foram revisadas por SANOGO et al. (2008), juntamente com técnicas moleculares de identificação das espécies. Os resultados apontam que as diferenças morfológicas na genitália masculina estão mais relacionadas com a origem geográfica da população e as variações sazonais e de

temperatura, do que pela determinação genética dos táxons, dentro dos subgrupos. Esses dados são ainda mais significativos na população híbrida.

Figura 2. Estrutura da genitália de adulto macho de *Cx. quinquefasciatus*. A. Edeago, em montagem de lâmina. B. Edeago, em desenho manual. BDO. Braço dorsal. BVE. Braço ventral. Escala: 0,2 mm.

A compilação de chaves taxonômicas feita por Forattini, e publicada em 2002, cita diferenças morfométricas em pontos da asa de fêmeas adultas, envolvendo dicotomia das veias subcosta (*Sc*), costa (*C*) e radial₂₊₃ (*R*₂₊₃) entre as subespécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* (Fig. 3).

Figura 3. Estrutura da asa de fêmeas adultas. As medidas das veias alares *R*₂ e *R*₂₊₃ apresentam diferenças significativas. **A** *Cx. quinquefasciatus*. **B** *Cx. pipiens*. Indivíduos híbridos têm medidas intermediárias.

Estudos de HUMERES et al. (1998) e de LINAM & NIELSEN (1962) relatam diferenças significativas nas medidas do raio das veias alares R_2 e R_{2+3} entre essas duas espécies (Fig. 3), com os indivíduos híbridos apresentando medidas intermediárias. Como esses dados até o momento não haviam sido revisados entre táxons do subgrupo, em populações neotropicais e em grupos distantes geograficamente, os mesmos foram realizados e estão descritos no contexto desta pesquisa.

1.5 Marcadores moleculares em mosquitos

As sequências de bases do DNA de mosquitos Culicidae têm sido estudadas no sentido de obter subsídios para a caracterização de espécies e populações. Porém, estudos feitos somente com dados de sequências primárias podem incorrer na super estimação dos níveis de diversidade. Para reduzir possíveis erros de estimativas, um recurso é utilizar dados de sequências secundárias. Isso porque os índices de variação observados em sequências primárias para o genótipo podem não ser os mesmos fenotipicamente.

A transferência de informação de gene para produto do gene apresenta algumas peculiaridades. No genoma mitocondrial, a informação para RNA é quase imediatamente convertida em uma cadeia de aminoácido (polipeptídio), e em genes nucleares a transferência da informação é espacialmente separada, sendo a transcrição no núcleo e a tradução no citoplasma (GRIFFITHS et al. 2008). Em vista disso, estudos com estruturas secundárias são usualmente feitos com base em predição de estrutura de proteína para os marcadores mitocondriais (exceto para os genes rRNAm) e inferência de estrutura de RNA em espaçadores e genes para transcritos de RNA.

1.5.1 O DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial (DNAm) tem sido usado como uma ferramenta importante na análise genética de populações de insetos. A organização deste é relativamente simples, sendo constituído por uma dupla fita circular contendo 37 genes, dos quais 2 codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam RNAs transportadores e 13 codificam proteínas (HOY, 2003). Além destes genes, todo DNAm possui uma região não-codante, que é responsável pelo controle da replicação e transcrição do genoma da mitocôndria. Esta região, denominada Região Controle ou D-Loop é extremamente rica

em adenina e timina, sendo conhecida como região rica em A+T (UPHOLT & DAWID, 1977).

O genoma mitocondrial é herdado maternalmente, não sofrendo, portanto, recombinação. A herança materna do DNAm permite que esta molécula seja usada como um importante marcador molecular com o objetivo de traçar a história evolutiva e a filogenia entre as populações existentes. Outra característica importante do DNAm é a sua alta taxa de evolução, pois este evolui 10 vezes mais rápido que o DNA nuclear. Isso é explicado pela presença reduzida de mecanismos de reparo nesta molécula, facilitando o acúmulo de mutações (GRAY, 1989). Por essa razão, as variações intra-específicas são mais facilmente detectadas.

Embora exista uma homogeneidade qualitativa das moléculas de DNAm em um mesmo indivíduo, existe uma diferença entre a taxa de acúmulo de mutações nos genes ou regiões do genoma. Os genes codificadores das subunidades da nicotinamida adenina dinucleotídeo - NADH desidrogenase (*nd1-6*), citocromo c oxidase (*cox1-3*) e RNAt são os que acumulam mais rapidamente as substituições de bases. Porém, os genes codificadores para as unidades ribossômicas RNAr (12S e 16S) e para o citocromo b (*cyt b*) estão entre os genes mais conservados do genoma mitocondrial (GRAY, 1989; HOY, 2003). As regiões de controle ou D-loop são as mais variáveis, podendo acumular mutações do tipo substituições de bases ou inserção/deleção (UPHOLT & DAWID, 1977), o que pode alterar o tamanho da molécula. Essas variações na evolução das regiões do DNAm permitem o estudo de diferentes níveis taxonômicos, por variados marcadores mitocondriais.

Por outro lado, o DNAm está presente em grande quantidade em todas as células (entre 1.000 e 10.000 moléculas de DNA por célula), o que lhe confere menor risco de degradação em relação ao DNA nuclear. O DNAm é extremamente importante quando do estudo de espécimes biológicas antigas, cujo DNA nuclear encontra-se degradado (BURGER et al. 2003).

A detecção de polimorfismos em geral, os *SNPs* (*Single-Nucleotide Polymorphisms*) e a distribuição de diferentes linhagens mitocondriais contribui para o conhecimento de processos de fluxo gênico e deriva genética. Assim como, na investigação de barreiras biológicas em populações de mosquitos provocadas por organismos endossimbiontes, tal como a *Wolbachia pipiens* (Turelli and Hoffmann

1999), uma riquétisia envolvida com incompatibilidade citoplasmática reprodutiva (GUILLEMAUD et al. 1997; RASGON & SCOTT, 2003) .

1.5.2 O DNA ribossômico

Em eucariotos, o DNA ribossômico é uma família multigênica organizada em unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região organizadora nucleolar. Cada unidade repetida contém genes para os RNAs 18S, 5.8S e 28S, intercaladas por regiões mais variáveis de espaçadores não-codantes. Na maioria dos animais, existem de 100 a 500 cópias do gene DNAr no genoma nuclear. Cada unidade de transcrição é composta de uma região promotora líder (ETS – *External Transcribed Spacer*), uma região codante do RNAr 18S, um espaçador não-codante interno (ITS-1), uma região codante do RNAr 5.8S, um outro espaçador não-codante interno (ITS-2), uma região para o RNAr 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não-transcrito, IGS (HILLIS e DIXON, 1991; POLANCO et al. 1998).

O transcrito RNAr destes é formado por nucleotídeos e possui uma estrutura helicoidal resultante do dobramento de um polímero de fita simples sobre si mesmo, em áreas onde são possíveis ligações por pontes de hidrogênio, devido a pequenas extensões em que encontra estrutura complementar (CONN & STUMPF, 1980).

Uma vez que o RNAr não tem a estrutura helicoidal dupla do DNA, estável e extremamente rígida, ele pode existir em várias conformações. Essas conformações representam um fenótipo, podendo apresentar índices de diversidade diferentes dos encontrados nas estruturas primárias do DNAr (BHARGAVI et al. 2005). Em insetos são normalmente utilizados os genes ribossomais nucleares 18S, 5.8S e 28S, assim como os espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2 para os mais variados estudos populacionais (HASAN et al. 2009; WESSON et al. 1992).

A partir do momento em que sequências do genoma nuclear possam ser eficientemente acessadas, elas passam a fornecer um estoque infindável de marcadores para estudos genéticos e evolutivos. A grande vantagem de trabalhar com sequências de *loci* conhecidos é que estes apresentam um potencial maior de verificação de sua variação com outras espécies e, assim, ser beneficiado pela sinergia entre estudos de evolução e sistemática molecular.

1.5.3 Espaçadores, introns e repetições satélites

As análises das sequências em regiões de introns devem ser feitas com cautela, pois os sítios com mutações de bases são menos informativos para estudos evolucionários e biológicos, uma vez que as estruturas secundárias não podem ser avaliadas, pois os introns são removidos durante a transcrição, em um processo denominado *splicing* (GRIFFITHS et al. 2008). Assim como, os testes de comparação por pares com outros táxons apresentam valores altos de variabilidade (SMITH & FONSECA, 2004), demonstrando o caráter menos conservado dessa região.

Por outro lado, os introns têm um conhecido papel estrutural na molécula de DNA e, por serem diplóides, sofrem recombinação gênica. Nesse caso, um determinado genotipo tende a ser mais frequente em linhagens mais puras, variando juntamente com outros nos híbridos e em áreas de introgressão gênica. Em vista disso, esses fragmentos estão sendo utilizados em conjunto com outros marcadores para avaliação da estrutura genética de populações de mosquitos e na tentativa de diferenciar subespécies e espécies consideradas crípticas dentro de subgrupos taxonômicos. Um exemplo são os estudos com a região do segundo intron do locus Acetilcolinesterase (*ace2*) (BOURGUET et al. 1998; ASPEN & SAVAGE, 2004).

Outra característica importante ao longo do genoma são as chamadas Sequências de Repetição Única (SRR – *single sequence repeat*) ou marcador microssatélite (WATSON et al. 2009). Os microssatélites podem ser mono, di ou trinucleotídeo, repetidos de 1 a 50 vezes ou mais. Esses segmentos representam erros no entrelaçamento de genes, durante o crossing-over na meiose (LEVINSON & GUTMAN 1987). Os microssatélites são marcadores valiosos, não somente porque são frequentemente polimórficos, mas porque existem dezenas e milhares deles ao longo do genoma. Tais marcadores podem ser dimensionados pela determinação de seus comprimentos, por reação de PCR, seguida de padronização de bandas eletroforéticas.

As repetições de bases aumentam o tamanho das sequências, assim como a variabilidade das espécies, o que gera possibilidades adaptativas na introdução dos organismos em novos ambientes. Quando as repetições são evolutivamente negativas, são eliminadas naturalmente por pressão seletiva. Em vista disso, se encontram mais frequentemente acumuladas nos introns e espaçadores intra-gênicos, pela menor pressão seletiva dessas regiões ao longo do genoma (ARENSBURGER et al. 2010).

1.5.4 Diferenciação molecular pelo intron *ace2*

Estudos sobre a sequência de bases do gene codificador da Acetilcolinesterase-1 (*ace1*), um dos genes ligados com resistência a inseticidas, nas espécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* apontam similaridade genética mundial. Esse gene é nuclear e conservado, no entanto, entre os taxa existem polimorfismos nas regiões de introns. Uma explicação é que essa região gênica tenha divergido em épocas remotas, num ancestral comum, evoluindo posteriormente, de modo bidirecional (BOURGUET et al. 1998).

Os genes *ace1* e *ace2* estão presentes na maioria dos insetos e provavelmente derivam de um evento de duplicação altamente remoto. Em *Anopheles gambiae*, os genes *ace1* e *ace2* alcançam 53% de similaridade na composição de aminoácidos e uma filogenia global indica que eles divergiram antes da diferenciação dos insetos (LABBÉ et al, 2007a).

O *ace1* codifica para a enzima Acetilcolinesterase-1 (AChE1), que tem participação nos mecanismos de resistência a inseticida. Contudo, somente no complexo *Cx. pipiens*, a AChE1 está realmente associada com resistência, apresentando amplificação e distribuição mundial (LENORMAND & RAYMOND, 2001). Isso porque essa enzima tem como alvo organofosforados e carbamatos, dois importantes pesticidas mundialmente usados para controle de mosquitos em saúde pública, nos centros urbanos (LABBÉ et al. 2007b). O *ace2* codifica para a distinta bioquimicamente AChE2, que não está associada com resistência, bem como sua função ainda não é conhecida (MALCOLM et al. 1998). Ao longo do tempo, a região não-codante do segundo intron do gene *ace2* vem sofrendo eventos evolutivos diferenciados entre os membros do complexo *Cx. pipiens*, tornando possível a análise molecular por visualização dos polimorfismos nas sequências de bases e testes de padronização de bandas produzidas por eletroforese.

Outros estudos têm registrado diferenças interespecíficas entre *pipiens* e *quinquefasciatus* na estrutura de genes nucleares ligados à resistência a inseticidas (RAYMOND et al. 1991; SEVERINI et al. 1996). LENORMAND & RAYMOND (2000) destacam casos de adaptação local na população do complexo *Cx. pipiens* para os níveis de expressão de esterases, em dois loci ligados com resistência a inseticida. Os autores relatam modificações no padrão clinal durante o desenvolvimento larvário entre os períodos de inverno e verão.

Os membros do subgrupo *pipiens* possuem similaridades tanto morfológicas quanto genética. Em vista disso, as pequenas diferenças existentes nessas espécies são muito difíceis de serem detectadas. Por outro lado, esses mosquitos possuem uma série de diferenças fisiológicas e comportamentais, tornando-os de menor ou maior importância na cadeia de transmissão de arbovírus e filarídeos, o que justifica a pesquisa de novos marcadores moleculares e morfológicos para diferenciar corretamente essas espécies e caracterizar o *Cx. quinquefasciatus*, objeto deste estudo.

1.6 Importância em Saúde Pública

1.6.1 Alimentação sanguínea

Na hematofagia, os produtos do sangue são convergidos para os constituintes da gema, sendo que os carboidratos e reserva de lipídeos são fontes importantes de energia para a fase de reprodução. As fêmeas de mosquitos que se alimentam de sangue (Fig. 4) e açúcar põem mais ovos que outras que ingerem apenas sangue, pois a produção de ovos incorre em alto custo de energia (CLEMENTS, 1999).

Figura 4. Fêmea de *Culex quinquefasciatus*, após ingestão de sangue. Fonte Web

Segundo revisão feita por ZINSER et al. (2004), as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* são consideradas ‘oportunistas’ no que se refere ao comportamento de alimentação de sangue. Isso porque em aglomerados humanos onde se encontram aves, roedores, cachorros e gatos, há uma frequência mesmo que pequena de fêmeas com sangue desses animais, ainda que a ingestão de sangue humano seja sempre maior.

Sob outro aspecto, a variação genética parece ser um fator relevante no comportamento de alimentação sanguínea. Em áreas de clima moderado a frio, fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* são encontradas tanto com sangue de aves como de humanos, o que pode ser devido à origem híbrida, em áreas de introgressão gênica, com a espécie *Cx. pipiens*. Esse mosquito tem comprovada tendência em incluir sangue de aves na sua alimentação diária (FONSECA et al. 2004).

1.6.2 Incômodo em centros urbanos

As fêmeas adultas de *Cx. quinquefasciatus* têm atividade de alimentação sanguínea durante o crepúsculo e à noite. Uma vez que esta espécie possui mecanismos adaptativos no órgão da visão, que possibilitam a ela enxergar ‘no escuro’ refletâncias de comprimentos de onda por raios ultravioleta (BECK, 1968). Assim, o *Cx. quinquefasciatus* costuma se alimentar quando as pessoas descansam ou dormem. O que provoca desconforto e incômodo em comunidades, onde a frequência da população de mosquitos é alta ou mesmo moderada (TAIPE-LAGOS & NATAL, 2003; NATAL et al. 1991).

1.6.3 Arboviroses

1.6.3.1 Encefalite Equina Venezuelana (EEV)

Segundo FORATTINI (1965), alguns autores levantam a hipótese de que *Cx. quinquefasciatus* fez parte do ciclo de transmissão da Encefalite Equina Venezuelana (EEV) durante a década de 60, na Colômbia. Segundo o autor, essa espécie foi encontrada naturalmente infectada pelo vírus da EEV no Panamá. Outras espécies dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Mansonia* são consideradas vetores desta arbovirose.

A EEV é uma infecção que afeta equino, e é transmissível ao homem, no qual determina um quadro de afecção cefálica. As investigações sugerem um papel relevante de roedores, morcegos e aves no ciclo enzoótico natural desta virose. Esse fator contribui para estudos sobre a tendência alimentar dos culicídeos envolvidos na transmissão da doença.

1.6.3.2 Encefalite Saint Louis (SLE)

O vírus da encefalite Saint Louis (Flaviridae: Flavivirus) é mantido em um ciclo enzoótico envolvendo mosquitos ornitofílicos e pássaros suscetíveis. Esse vírus torna-se uma ameaça para seres humanos toda vez que mosquitos com alimentação oportunista, se infectam com o agente e o amplificam na população humana (Richards et al. 2009).

Os vetores primários do vírus da SLE nos EUA, onde existem registros dessa doença, têm sido identificados como *Cx. tarsalis*, *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*. Nos testes de laboratório, o *Cx. quinquefasciatus* mostra maior suscetibilidade e competência para abrigar o vírus da SLE (Reisen et al 2005).

Segundo Flores et al (2010), a SLE é registrada em áreas temperadas da Argentina e o *Cx. pipiens* é considerado vetor primário. Em laboratório, o *Cx. quinquefasciatus* apresenta infectividade e transmissão vertical, porém, em áreas endêmicas onde ele está presente, a virose é reduzida em épocas de inverno, pois o *Cx. quinquefasciatus* não realiza diapausa.

1.6.3.3 Febre do Vírus do Oeste do Nilo (WNV)

As investigações de TURELL et al. (2001) demonstrou que *Cx. quinquefasciatus* é uma das principais espécies presentes na transmissão de encefalites e meningites provocadas pelo vírus do Oeste do Nilo. Segundo os autores, uma variedade de mosquitos apresenta suscetibilidade ao vírus, entretanto, algumas espécies pertencentes ao gênero *Culex* apresentam maior capacidade para transmitir o vírus, principalmente pela sua conhecida adaptação hematofágica por aves e seres humanos.

O híbrido resultante do cruzamento das subespécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* foi alvo de estudos na América do Norte, pela sua potencialidade como vetor-ponte do vírus do Oeste do Nilo (SAVAGE et al. 2008). Um dos fatores mais relevantes para o potencial vetor do híbrido é a tendência das fêmeas em se alimentar de sangue tanto em pássaros como em seres humanos. Esses hábitos são característicos dos parentais separadamente, sendo que o híbrido os adquire em igual proporção (FONSECA et al. 2004). Essa condição sugere outra dinâmica em áreas de hibridação para ciclos epidemiológicos de doenças veiculadas por vetores.

O vírus do Oeste do Nilo é um flavivírus originário da África, e vem se alastrando pelo mundo através da migração de aves infectadas. A doença parece ter

como cadeia de transmissão: ave $\leftrightarrow$ ave $\rightarrow$ mosquito transmissor $\rightarrow$ ave, homem ou outros mamíferos (MCLEAN et al. 2001). O primeiro caso no continente americano ocorreu em 1999, na cidade de Nova York, EUA. Este caso representou preocupação das autoridades públicas de saúde nos Estados Unidos, pela sua rápida dispersão (ASNIS et al. 2001).

LUNA et al. (2003) discutem as possibilidades de introdução do vírus do Oeste do Nilo no Brasil, com ênfase aos deslocamentos migratórios de aves provenientes do hemisfério Norte, onde o vírus tem sido detectado recentemente. A parada de aves em locais de altas densidades de mosquitos transmissores favoreceria o estabelecimento de um ciclo enzoótico do vírus, pela infecção de aves residentes.

1.6.4 Filarioses

1.6.4.1 *Dirofilariose Canina*

O agente etiológico da dirofilariose é o microfilarídeo *Dirofilaria immitis*, parasita de cães e de outros mamíferos, sendo o homem hospedeiro terminal. Na dirofilariose, o parasito adulto se instala no coração e libera microfílias no sangue, desencadeando uma série de complicações no aparelho circulatório (VEZZANI et al. 2006)

Para AHID & LOURENÇO DE OLIVEIRA (1999), o *Cx. quinquefasciatus* é considerado vetor secundário da dirofilariose canina no sudeste e provável vetor primário no nordeste brasileiro, em uma área enzoótica, localizada em São Luiz, no Maranhão. Os vetores desta microfílias são mosquitos adaptados em centros urbanos, que se alimentam do sangue de cães parasitados, e tem competência e longevidade o suficiente para o desenvolvimento do agente até a fase infectiva e capacidade para transmiti-lo ao homem por meio de nova ingestão de sangue. Dentre os culicídeos mais relatados em ciclos enzoóticos de dirofilariose estão *Ae. aegypti*, *Ae. scapularis*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. declarator* e *Cx. quinquefasciatus* (LABARTHE et al. 1998).

Recentemente, a dirofilariose tem sido relatada em Buenos Aires, na Argentina, sendo o mosquito *Cx. pipiens*, juntamente com *Ae. aegypti*, considerados vetores principais desta zoonose (VEZANI et al. 2010).

1.6.4.2 Bancroftose Americana (Elefantíase)

A bancroftose americana (elefantíase) tem como agente etiológico um helminto da família Filariidae, a espécie *Wuchereria bancrofti*. Este parasita apresenta filaremia periódica noturna no sangue periférico dos indivíduos infectados. Os vermes adultos formam conjuntos enovelados que prejudicam a circulação da linfa (RAJU et al. 2010).

O mosquito *Cx quinquefasciatus* é considerado vetor primário no ciclo de transmissão e veiculação da bancroftose americana (REGIS et al. 2005). Tal capacidade decorre do seu comportamento, como elevada antropofilia, domiciliação e hábitos noturnos – este último tal qual a filaremia do helminto. O *Cx. quinquefasciatus* é infectado facilmente pelos embriões da *W. bancrofti*, o que aumenta a sua competência na transmissão da doença (BARTHOLOMAY et al. 2010). Além disso, em regiões endêmicas, possui longevidade suficiente para permitir o desenvolvimento do parasita até a fase infectante (FORATTINI, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O estudo genético e morfológico em populações naturais de *Cx. quinquefasciatus* foi realizado com o intuito de entender a estrutura populacional dessa espécie em diferentes regiões brasileiras. Assim como, objetivou-se conhecer aspectos de identificação e distribuição dos componentes do complexo *Cx. pipiens* na América do Sul.

2.2 Objetivos específicos

- Conhecer valores morfométricos de asa de fêmeas e genitália de adultos machos, a fim de identificar possíveis variações morfológicas em espécies de diferentes áreas geográficas.
- Caracterizar populações de *Cx. quinquefasciatus* por marcadores genéticos mitocondriais e infecção por *Wolbachia*, relatada para o mosquito *Culex* em todo o mundo.
- Identificar o perfil genético de *Cx. quinquefasciatus* pela região do segundo locus da Acetilcolisterase (*ace2*). Esse fragmento evoluiu de modo bidirecional entre os membros do complexo *Cx. pipiens*. E, sendo um intron nuclear, diplóide e de recombinação Mendeliana, espera-se identificar eventos de introgressão gênica e hibridação entre os táxons do subgrupo *pipiens*.
- Analisar o segundo espaçador interno (*ITS2*) do DNA ribossomal. Essa região, por conter múltiplas cópias e transcrever RNA estrutural, importante na fisiologia celular, sofre constante pressão por seleção positiva. Também os dados de frequência de bases e estrutura de RNA por predição permitem reconhecer a estrutura molecular para diferentes linhagens de *Culex*.
- Relacionar o perfil genético e morfológico de populações de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil e da região de La Plata na Argentina, com aspectos epidemiológicos em ciclos de doenças veiculadas por este vetor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Todos os procedimentos abaixo descritos foram realizados nas dependências da Faculdade de Saúde Pública da USP. Incluídos o laboratório de Epidemiologia Molecular, Entomologia Médica, laboratório de Informática e recursos do sistema de Biblioteca.

As capturas de mosquitos adultos foram realizadas utilizando aspirador à bateria do tipo descrito por NATAL & MARUCCI (1984), o qual é passado lentamente em meio à vegetação. Ainda no campo, os mosquitos foram mortos por aspersão de acetato de etila e acondicionados individualmente em frascos tipo crio-tubos, com sílica gel azul (Fig. 5).

O procedimento a seco com sílica gel é realizado para manter a integridade das características externas do mosquito, facilitando a identificação morfológica. Assim como, para perda de água e controle da carga microbiana para posteriormente ser conservado em isopropanol ou continuamente a seco. Haja vista que organismos frescos contêm água, podendo diluir o álcool, degradando-se mais facilmente.

Figura 5. Acondicionamento individual dos mosquitos em frascos tipo crio-tubos, sobre sílica gel azul e com etiquetas de identificação. Foto: Moraes SA

Inicialmente, os mosquitos foram identificados pela morfologia, com o auxílio de lupa e microscópio óptico e de acordo com a compilação de chaves taxonômicas de FORATTINI (2002). Posteriormente foram montadas lâminas das estruturas da

genitália de adultos machos para provas de arquivo das amostras trituradas e também para confirmação da identificação morfológica dos caracteres externos.

Nos locais distantes foram realizadas coletas de larvas vivas, com a utilização de concha entomológica (Fig. 6), sendo acondicionadas em potes plásticos com água para transporte. Nos locais de coleta próximos de São Paulo foram capturadas fêmeas adultas grávidas por meio de aspirador e colocadas em gaiolas para o transporte até o laboratório. Com esses dois procedimentos, intencionou-se a obtenção de indivíduos F1.

3.1.1 Obtenção de geração F1.

Para obtenção de geração F1, as larvas vivas coletadas no campo foram encaminhadas ao laboratório e colocadas em recipiente contendo água, equipado com sistema de aeração. As larvas foram alimentadas diariamente com 2g de comida para peixe e, após a formação de pupas, transferidas para a gaiola até a emergência em formas adultas. Os mosquitos machos e fêmeas foram colocados na mesma gaiola para atividade de cópula, sendo alimentados com açúcar a 10%, o qual é posto em um frasco, contendo água e um feixe de algodão, forrado com gaze. Para a primeira oviposição não foi necessário alimentação de sangue, uma vez que fêmeas da espécie *Cx. quinquefasciatus* são autogênicas (OLEJNÍČEK & GELBIC, 2000). Essa habilidade também serve para diferenciar esta espécie de outras pertencentes ao complexo *pipiens*, como o *Cx. pipiens* e a forma *molestus*.

Figura 6. Coleta de mosquitos imaturos, com concha entomológica.
Foto: Moraes SA

Os mosquitos vivos coletados no campo foram encaminhados ao laboratório e, após triagem, as fêmeas grávidas e os machos foram selecionados. As fêmeas foram colocadas juntamente com os machos em uma gaiola, pois a espécie *Cx. quinquefasciatus*, em condições naturais e, diferente da maioria dos culicídeos, realiza

suas atividades de cópula no voo e em nuvem (CLEMENTS, 1999). No laboratório, este ambiente coletivo parece melhorar a oviposição. Assim, as fêmeas realizaram oviposição em recipientes contendo água, sendo selecionada somente uma jangada de ovos para criação de indivíduos irmãos da mesma linhagem materna.

As condições climáticas do insetário foram mantidas em torno de 70 a 80% de umidade relativa, temperatura em 30°C, com sistema de ventilação e luzes acesas durante o dia e apagadas ao anoitecer.

A amostragem F1 serve para aumentar a segurança no teste molecular, pois este pode ser repetido com amostras irmãs, no caso de erro na extração ou dúvidas nos resultados obtidos. Além disso, os mosquitos F1 ficarão guardados na FSP/USP, podendo ser disponibilizados para futuras experiências.

3.2 Identificação morfológica

Os mosquitos foram inicialmente identificados pela observação dos caracteres externos das formas adultas, com o auxílio de lupas e chaves taxonômicas, segundo FORATTINI (2002). Este método se limita a identificação do subgrupo *pipiens*. Para distinguir subespécies, espécies crípticas e outros membros do complexo são necessárias outras análises.

3.3 Áreas de estudo

O mosquito *Cx. quinquefasciatus* ocupa espaços urbanos, onde encontra abrigo e alimento para todas as fases do seu ciclo de vida. Estes espaços, situados em diferentes regiões do Brasil, possuem características peculiares, principalmente no que se refere à altitude, clima e diversidade biológica.

Foram coletadas amostras de mosquitos nas cidades de Belém PA, Teresina PI, Recife PE, Rio Branco AC, Pontes e Lacerda MT, Pariquera-Açú SP, São Paulo SP, Chapecó SC, Pelotas RS, Santa Vitória do Palmar RS e La Plata, na Argentina. A distribuição dos locais de coletas é mostrada na Figura 7.

Os mosquitos foram capturados em diversas regiões do Brasil, considerando-se os locais próximos à faixa da linha equatorial (Belém PA, Teresina PI), área litorânea de Recife PE, Amazônica em Rio Branco AC, trópico de capricórnio (São Paulo e

Pariquera-Açú SP), Cerrado brasileiro (Pontes & Lacerda MT), localidades subtropical-úmidas (Chapecó, Pelotas e Santa Vitória) e regiões de clima subtropical-temperado (La Plata). Para as coletas na Argentina, também foi levado em consideração o fato de essa região ser conhecida como zona intermediária de espécies do complexo *Cx. pipiens*, assim como para processos de hibridação (HUMERES et al. 1998).

Figura 7. Mapa físico da América do Sul, com indicação das localidades de coleta de mosquitos e dos respectivos pontos latitudinais. As coletas foram feitas entre os anos de 2007 a 2010. Imagem de Fundo: Web

Destes locais foram obtidos em média 200 mosquitos adultos do campo, de cada localidade, e 80 a 100 indivíduos resultantes de geração F1, sendo 50% machos e 50% fêmeas. Também foram separadas algumas larvas, de cada localidade e acondicionadas em isopropanol.

As amostras de Recife PE e Pontes & Lacerda foram providenciadas pelo Prof. Delsio Natal, da FSP/USP, em parceria com Dra. Leda Régis e equipe, da Fiocruz de Pernambuco.

Foram adquiridas 100 amostras, sendo 50 fêmeas e 50 machos da cidade de La Plata, na Argentina. Essa amostragem foi cedida pelo Sr. Gustavo Rossi, do Centro de Estudios Parasitologicos Y de Vectores – CEPAVE/UNLP/CONICET, em La plata.

Os mosquitos coletados na cidade de Teresina PI foram doados pelo Prof. Almério de Castro Gomes da FSP/USP. Esta amostragem contou com 100 mosquitos, sendo 50% machos e 50% fêmeas. Dessa amostragem e também de La Plata e Belém não foi possível a obtenção de F1.

Para os testes genéticos e morfológicos foram utilizadas somente amostras do campo. As amostras F1 foram guardadas para comprovação da amostragem e estudos futuros.

3.4 Testes morfométricos

3.4.1 Genitália masculina

Para complementação da identificação morfológica foram observados caracteres internos aleatoriamente, por meio de técnica de montagem da genitália de adultos machos (Fig.8). Para isso foram montadas 30 lâminas, conforme descrição sugerida por CONSOLI & LOURENÇO DE OLIVEIRA (1994), com modificações. Primeiramente, o VII e VIII segmento do abdômen do adulto macho foi cortado com alicate entomológico. Após, para a clarificação, desidratação, coloração e secagem do material, foram utilizadas soluções de KOH10%, álcool 70, 80, 90 e 95%, álcool absoluto, creosoto de faia e bálsamo do Canadá. Na sequência, a genitália foi retirada e o restante do material descartado. A estrutura do edeago foi então isolada e adicionada uma gota de bálsamo, para posteriormente serem feitas imagens digitalizadas de cada uma das amostras.

De acordo com SUNDARARAMAN (1949), $S=DV/D$, em que S= razão de Sundararaman, DV= média das distâncias entre as extremidades dos braços dorsais e ventrais e D= média das distâncias entre as extremidades dos braços dorsais. Assim, o valor médio da razão S ao redor de 1,0 está para *Cx. quinquefasciatus* e próximo de zero para mosquitos *pipiens*.

Figura 8. Aspecto geral do falósoma de *Cx. quinquefasciatus* e localização dos pontos para medida da razão DV/D (raio da distância dos braços dorsais e ventrais do edeago). Foto: Morais SA

3.4.2 Morfometria da asa

Foram processadas de 22 a 31 fêmeas de Rio Branco, Teresina, Pariquera-Açú, Santa Vitória do Palmar, Pelotas e da cidade de La Plata, na Argentina para análises dos caracteres morfométricos da asa. Esse procedimento foi realizado em parceria com o Dr. Lincoln Suesdek, do Instituto Butantan e objetivou a provisão de dados de distribuição morfométrica em populações de *Cx. quinquefasciatus* distintas geograficamente, assim como a revisão de dados de identificação taxonômica, por meio de caracteres morfométricos da asa de fêmeas adultas.

As asas foram retiradas e montadas entre lâmina e lamínula. Após foram feitas imagens, e digitalizados 18 pontos conforme a distribuição mostrada na Figura 9. Com as montagens foi computada a razão R_{2+3} de cada indivíduo, dividindo o comprimento da célula $Radial_2$ (R_2) pelo comprimento da veia $Radial_{2+3}$ (R_{2+3}), utilizando os pontos 4, 16 e 17, de acordo com LINAM AND NIELSEN (1962). Para o teste foi utilizado o software tpsDig (v1.40 James Rohlf) e as análises foram feitas de acordo com os trabalhos de ROHLF (1993; 2006). Com os dados morfométricos foram ordenados os valores de forma e tamanho das asas de fêmeas adultas.

Figura 9. **A** Asa com marcação dos pontos para análise morfométrica. **B** Aspecto da asa de mosquitos do complexo *Cx. pipiens*, com destaque para a localização da célula Radial₂ (R₂) e a veia Radial₂₊₃ (R₂₊₃). Ambas utilizadas para testes morfométricos neste estudo.

3.5 Marcadores moleculares

3.5.1 O gene da Acetilcolinesterase (*ace*)

Para auxílio na identificação de subespécies, possíveis híbridos e espécies crípticas do complexo *Cx. pipiens* foram adotados testes com multiplex PCR, por visualização do padrão de bandas eletroforéticas, da região nuclear polimórfica, do segundo *intron* do locus da acetilcolinesterase (*ace2*). Os testes foram feitos conforme protocolos descritos nos trabalhos de BOURGUET et al. (1998), SANOGO et al. (2008) e SMITH & FONSECA (2004).

A região de estudo abrange uma parte do exon 2, o fragmento completo do segundo intron e uma parte do exon 3 (Fig. 10).

Figura 10. Fragmento *ace2* da família de genes da Acetilcolinesterase.

Os estudos de SMITH & FONSECA (2004) relatam uma série de polimorfismos na região do *ace2* entre os membros do complexo *Cx. pipiens*, sendo que na região dos

exons, poucos polimorfismos são encontrados. Praticamente todas as substituições de bases encontradas no intron *ace2* das espécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus* são diferentes interespécies e semelhantes intra-espécies. Assim, tornou-se possível padronizar tamanhos de bandas eletroforéticas, com a utilização de enzimas de restrição ou desenhos de primers internos e amplificação dos fragmentos por técnica de mutiplex.

Neste estudo, optou-se pelo PCR-multiplex, que combina dois primers *forwards* espécie-específicos e um *reverse*, na parte do exon 3 (ACEquin 5'-CCTTCTT-GAATGGCTGTGGCA-3', ACEpip 5'-GGAAACAACGACGTATGTACT-3', B1246s 5'-TGGAGCCTCCTCTTCACGG-3'), conforme representado na Figura 11. Para análises dos resultados da amplificação do *ace2* foram observados os tamanhos de bandas, após eletroforese.

3.5.2 Genes mitocondriais

O genoma mitocondrial, sendo haplóide, não possui pares de cromossomos ou permutas de alta complexidade. Também são raros os casos de inserções/deleções ao longo da sequência, bem como as ligações da dupla fita são menos estáveis, pela maior quantidade de ligações-duplas A↔T. Em vista disso, os fragmentos gênicos são facilmente amplificados, permitindo bandas eletroforéticas mais homogêneas e métodos de sequenciamento direto para leitura das sequências de bases. Neste estudo, os fragmentos de genes mitocondriais utilizados foram partes da subunidade 1 da citocromo c oxidase (*cox1*) e subunidade 4 da NADH desidrogenase (*nd4*).

Segundo GRAY (1989), os genes codantes das subunidades da nicotinamida adenina dinucleotídeo - NADH desidrogenase (*nd1-6*) e *cox1-3* são os que acumulam mais rapidamente as substituições de bases, dentro do genoma mitocondrial. A causa mais provável é que sofram constantes impactos de stress oxidativo, durante os processos metabólicos de respiração intracelular e, posteriormente, os produtos desses genes sofram pressão de seleção (WEY et al. 1998). Essa dinâmica contribui para a diversidade e evolução das espécies. Em vista disso, foram escolhidos os genes *cox1* e *nd4* para as análises da região mitocondrial.

Figura 11. Alinhamento de sequências *ace2*, apontando as diferenças de bases e os primers externos F1457 e B1246 e primers internos espécie-específicos para *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*.

3.5.2.1 Extração do DNA, amplificação e sequenciamento

O DNA foi extraído de amostras individuais, com utilização do kit DNeasy® Blood & Tissue (Quiagen). As reações para amplificação dos fragmentos gênicos foram desenvolvidas seguindo os protocolos de SAMBROOK & RUSSEAL (2006), com alguns ajustes e volume final de 50µl. Como iniciadores foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores *forward* UEA3 (ZHANG & HEWLTLE, 1996) e *reverse* Fly10 (LUNT et al. 2007) e desenhos internos para amplificação de fragmentos do gene *cox1* e os pares *nd4+* e *nd4-* (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE et al. 2000) para o gene *nd4*.

A reação de amplificação para o gene *cox1* resulta em um fragmento com mais de 1Kbases. Em vista disso, foram desenhados primers internos para obtenção de fragmentos menores, facilitando a amplificação e sequenciamento do gene alvo.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), sendo os produtos sequenciados pelo método de Sanger, no sequenciador ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer/HITACHI.

3.5.2.2 Construção e análise das sequências gênicas

Para visualização das sequências no formato cromatográfico foi utilizado o aplicativo Chromas (Technelysium Pty). As sequências foram alinhadas com o programa Clustalw2 (EBI) e editadas por meio do software Geneious Pro 4.5 (Biomatters) (DRUMMOND et al. 2009), e o editor de sequências biológicas BioEdit 7.0.9 (Ibis Biosciences). A leitura estrutural das sequências foi feita utilizando as ferramentas do ORF Finder (NCBI) e os testes de predição de estrutura de proteínas foram desenvolvidos inicialmente por meio do servidor PSIPRED (JONES, 1999; MCGUFFIN et al. 2000), seguido de consulta nas bases de dados do InterPro (NCBI). As comparações por pares e os dados de similaridade e distância genética foram extraídos do Geneious Pro 4.5. O Dendograma e o Teste de Neutralidade, segundo TAJIMA (1989) foram computados utilizando o software para análises evolucionárias Mega 4.1 (TAMURA et al. 2007). Os dados de estatística genética, como diversidade de haplótipos (Hd) e diversidade de nucleotídeos por sítio (π) foram tabulados no software para análises de polimorfismos de sequências gênicas DnaSP 5.0 (LIBRADO & ROZAS, 2009).

3.5.3 DNA ribossômico

Para o DNAr foram utilizadas partes dos genes 5.8S e 28S e toda a extensão do segundo espaçador interno transcrito - ITS2. Uma vez que o DNAr contém uma variedade de polimorfismos, como deleção, inserção e repetições de bases em tandem, foi necessário o uso de técnicas específicas para amplificação e leitura das sequências de bases, como otimização do PCR e clonagem.

3.5.3.1 Extração do DNA e amplificação

Como iniciadores para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados os primers *forward* 5.8S (5'-ATCACTCGGCTCGTGGATCG-3') e *reverse* 28S (5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTAGTC-3') descritos em COLLINS & PASKEWITZ (1996). A concentração dos reagentes para a PCR foi calculada segundo SAMBROOK & RUSSEAL (2006), com ajustes para volume final de 50µl.

O protocolo para ciclagem dos fragmentos DNAr foi configurado inicialmente segundo as sugestões do fabricante da *Taq Polymerase* Fermentas®. Contudo, passou por processos de otimização ora pelo fato da composição da sequência de bases DNAr apresentar maioria ligações-triplas C↔G, e assim, exigir temperaturas diferenciadas para as etapas de hibridação/elongação ora para obtenção de bandas eletroforéticas únicas. Pois, a amplificação de fragmentos *ITS* tende a apresentar bandeamento duplo com regiões não-alvo, o que dificulta os procedimentos de clonagem e a leitura da sequência alvo.

Para os testes com *ITS2*, foram processados inicialmente os mesmos genomas utilizados para os outros marcadores. Com essas amostras, foram feitas amplificações para otimização da reação de PCR, intencionando a seleção da sequência-alvo, visualizada por tamanho e banda única, em gel de agarose. Os primeiros PCRs com temperaturas de hibridação/elongamento mais baixas resultaram em variados tipos de sequencias, pela alta taxa de repetição e diversidade do DNAr. Com temperaturas mais altas e tempo maior, os testes foram mais eficientes para a amplificação de sequências únicas e mais longas.

Posteriormente, foram extraídos DNA de novas amostras, com redução no volume final de 200 para 100µl de TE, na tentativa de obter maior concentração de DNA. Assim, dos testes com DNAr foram separadas e processadas 42 sequências, todas de excelente qualidade para leitura e análise dos dados.

3.5.3.2 Clonagem do *ITS2*

Para os ensaios de clonagem do fragmento 5.8S-*ITS2*-28S foi adquirido o kit *pGem®-T Easy Vector Systems* da Promega®. O protocolo para as reações de clonagem foi feito inicialmente segundo o manual técnico do fabricante, com alguns ajustes, visando economia de material e maior efetividade.

Para a reação de ligação foram utilizados 5,0 µl de tampão 2x, 0,5µl do vetor, 1,0µl de enzima Ligase e 3,5µl de produto de PCR para volume final de 10µl. Para a transformação foi adicionado 10µl da reação de ligação em 50µl de bactérias resistentes a antibiótico, e colocado no gelo por 20min e no banho seco a 42°C por 2min. Após, novamente no gelo por 5min. Foi adicionado 250µl de meio LB e incubado por 01h30min, a 37°C e 200rpm, no Shake. Por último, foi adicionado e espalhado 80µl da reação em placas previamente preparadas com meio LB-ágar e ampicilina, e colocado a 37°C por 24 horas na estufa.

As colônias resultantes da reação de clonagem foram pescadas e armazenadas individualmente em 20µl de *Water Free Dnase*. Para verificação da positividade do teste foi feito novo PCR com os primers do plasmídio T7 e SP6 que acompanham o kit Promega®, seguido de reação de eletroforese para visualização do tamanho de bandas e detecção dos clones. Após este procedimento, os PCR-clones foram sequenciados.

3.5.3.3 Construção e análise das sequências gênicas

O alinhamento e leitura das sequências primárias do fragmento 5.8-ITS2-28S e a análise estatística dos dados foram feitas conforme descrito para os genes *cox1* e *nd4*. Uma vez que o DNAr não é codante para proteínas e sim para transcritos de RNAr, a leitura das sequências secundárias e os testes de predição da estrutura molecular do RNAr produzido, bem como os valores de energia livre mínima e níveis de termodinâmica foram trabalhados no servidor para predição de estruturas secundárias de RNA - RNAFold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>).

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica

4.1.1 Estrutura da genitália de adulto macho

A análise pela montagem de genitália masculina de adultos apresentou três morfotipos ao longo dos gradientes geográficos, desde o norte do Brasil até a Argentina (Fig.12). Indivíduos machos representativos exibiram as seguintes médias DV/D: Norte, Nordeste e Sudeste = 1.02, Sul = 0.86 e La Plata = 0.02. Os valores morfométricos da estrutura do edeago no Brasil estão de acordo com os referenciados para *Cx. quinquefasciatus* e híbridos de outras partes do mundo (BARR 1957). Autores mais contemporâneos como JAKOB & FRANCY (1984) sugerem valores DV/D acima de 0,50 para populações mais puras de *Cx. quinquefasciatus* na América do Norte.

Figura 12. Estrutura do edeago da genitália masculina de mosquitos do complexo *Culex pipiens*, com destaque para diferenças nos braços ventral (1) e dorsal (2). A forma geral das amostras do Norte, Nordeste e Sudeste. B Sul do Brasil. C La Plata, na Argentina. Imagens: Morais SA

A estrutura dos braços ventrais e dorsais do edeago se apresenta maior nas populações do sudeste, norte e nordeste do Brasil, menor nas populações da Argentina e com forma intermediária nas amostras da região sul e extremo sul do Brasil. Essas formas sugerem clinas geográficas latitudinais na população de *Cx. quinquefasciatus* da América do Sul.

As variações fenotípicas em populações de diferentes gradientes geográficos são relatadas em insetos e se constituem casos de clinas latitudinais (MORIN et al. 1999; GILBERT et al. 2004). URBANELLI et al. (1997) revisaram a morfologia da genitália

nos membros do complexo *Cx. pipiens* em áreas norte americanas e constataram que o desenvolvimento fenotípico deste caractere sofre influência da temperatura, com valores reduzidos do raio DV/D em ambientes com temperaturas baixas, aumentando gradativamente em direção as altas temperaturas.

Aqui, as divergências fenotípicas dos braços dorsais do edeago corroboram com os dados genéticos do intron *ace2*. Pois esse marcador molecular aponta população híbrida em La Plata e *Cx. quinquefasciatus* em todas as regiões amostradas do Brasil. Entretanto, a distribuição dos dados da razão D/VD apresentou um caráter clinal, podendo estar mais relacionado com variações fenotípicas de tamanho e desenvolvimento geográfico dos mosquitos.

4.1.2 Morfometria da asa

Os dados de morfometria da asa foram publicados em revista científica e o manuscrito MORAIS et al. (2010) está anexo (A1).

Os valores radiais da célula R_2 e da veia R_{2+3} (raio R_2/R_{2+3}) e o tamanho do centróide da asa de membros do complexo *Cx. pipiens* foram analisados, juntamente com os dados de polimorfismos do intron *ace2*. Foram encontradas diferenças significativas entre populações distantes geograficamente e poucas diferenças entre populações mais próximas referentes aos dados de tamanho do centróide da asa (Fig. 13A). Os tipos morfométricos de tamanho da asa no complexo *Cx. pipiens* apresentam subgrupos ao longo da América do Sul. Os valores de tamanho da asa não separam dicotomicamente os táxons dentro do complexo, tendo os tipos de asa mais relação com origem geográfica da população e fatores de desenvolvimento dos mosquitos.

Os dados de forma da asa (Fig.13B) mostraram que a população de mosquitos da Argentina possui maior variância interna nos valores radiais, provavelmente devido às diferenças genéticas interespecíficas, como demonstradas pelas análises com o gene *ace2*, descritas abaixo, e por ser região de alta pressão seletiva e de hibridação dos membros do complexo *Cx. pipiens*.

Figura 13. Plots com os valores de medidas de veias e células da asa de fêmeas. **A** Tamanho do centróide, em milímetros. Ponto: média. Linha: desvio padrão. Quadrado: margem de erro. **B** Valores da forma alar, em milímetros, média e desvio padrão. Fonte: Moraes et al (2010).

4.2 Marcadores moleculares

4.2.1 Genes mitocondriais *cox1* e *nd4*

Com os dados obtidos nos testes com os genes *cox1* e *nd4* foi elaborado um manuscrito, que está anexo (A2), e será encaminhado para publicação.

Os ensaios com os fragmentos *cox1* e *nd4* produziram 1260pb e 350pb, respectivamente. O fragmento *cox1*, por ser muito extenso - mais de 1Kb, sofreu alguns processos no sentido de melhorar a amplificação e leitura da sequência gênica. Para tanto, foi utilizado inicialmente um Kit-PCR de Enzima-Mix, com extensor (Invitrogen®), sem muito sucesso. Como nova tentativa foram desenhados dois primers, a partir do interior da sequência até as pontas 5'. Com este procedimento a PCR produziu cópias fragmentadas de ≈ 700 pb, que foram unidas novamente por método informatizado, resultando na sequência linear de 1260pb.

O gene *nd4* não apresentou polimorfismos em nenhum dos sítios nem entre populações de diferentes regiões geográficas. O gene *cox1* apresentou quatro haplótipos entre todas as amostras testadas.

As sequências da estrutura primária dos genes *nd4* e *cox1* foram depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: GQ255653 para o *nd4* e para os quatro haplótipos do gene COI, GQ255650 (H1), GQ255651 (H2), GQ255649 (H3) e GQ255648 (H4).

O gene *cox1* apresentou polimorfismos com estimativas de baixa diversidade genética, pelos valores de diversidade de haplotipo (Hd 0,636) e diversidade de

nucleotídeo por sítio (π 0,00091). HASAN et al. (2009) também encontrou dados de baixa diversidade (H_d 0,502 / π 0,0007) no fragmento mitocondrial *cox2*, em populações de *Cx. quinquefasciatus* da área central de Bangladesh, na Ásia.

As frequências de nucleotídeos do gene *nd4* de *Cx. quinquefasciatus* são idênticas, sem diferenças intra-espécies. Esses dados demonstram que o sequenciamento deste fragmento pode servir como auxiliar para a diferenciação/identificação da espécie *Cx. quinquefasciatus*, mesmo que esta seja proveniente de diferentes regiões do Brasil.

Em relação ao gene mitocondrial *nd4*, GORROCHOTEGUI – ESCALANTE et al. (2002) compararam populações de *Ae. aegypti* de várias regiões do México. Os autores detectaram que o padrão de estruturação desta espécie varia por região. BOSIO et al. (2005) caracterizaram a estrutura genética de populações de *Ae. aegypti* na Tailândia, utilizando o gene *nd4*. Os autores relatam que a estruturação desta espécie não varia por região, ao contrário do que aconteceu no México.

O quadro acima pode ter ocorrido pelas diferenças temporais na ocupação do espaço (introdução anterior na Tailândia e recente no México) ou os efeitos dos esforços no controle destes mosquitos, levando as populações da Tailândia a sofrerem efeito de gargalo, afetando profundamente a diversidade genética. Esses dados estão em concordância com a similaridade genética do *nd4* de *Cx. quinquefasciatus* apresentada neste estudo, pois esta espécie, além de estabelecida, vem sendo alvo de aplicações de controle há décadas no Brasil (MORAIS et al. 2007).

4.2.1.1 Homoplasmia

Estudos de PADUAN & RIBOLLA (2008) registram a presença de sete haplótipos para um fragmento de 450 pb do gene *cox1*, em populações brasileiras do mosquito *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.), sendo que estes se encontram mais concentrados nas proximidades do porto de Santos, o que sugere um processo de introduções múltiplas deste mosquito em terras brasileiras, assim como dispersão recente mundial. Neste estudo, os autores abordam sobre características de heteroplasmia – presença de múltiplos haplótipos no DNA mitocondrial de um único organismo – em populações brasileiras de *Ae. Aegypti*. Portanto, é de se esperar que a população do complexo *Cx. pipiens* seja mais homogênea, uma vez que estes mosquitos têm ocupação remota nas Américas, assim como a sua distribuição e dinâmica de dispersão passiva é diferenciada do *Ae. aegypti*.

Assim, a identidade detectada em fragmentos *nd4* indica homoplasma mitocondrial no *Cx quinquefasciatus*. Entretanto, as mutações encontradas no gene *cox1* sugerem pequeno grau de heteroplasma em amostras populacionais do Brasil e em La Plata, na Argentina.

A Figura 14 mostra a leitura das sequências de bases do gene *cox1*, no formato cromatográfico, sendo que a presença de linhas inferiores ao pico principal, com curvas ou mesmo na forma linear pode auxiliar na análise. Assim, os sítios com mutação, no gráfico A apresentam uma sobreposição muito tênue de linhas para ambas as substituições de bases encontradas. Isto é, sem picos internos de uma ou de outra mutação, o que reforça a idéia de homoplasma e fixação do padrão genético mitocondrial nas duas principais linhagens brasileiras.

Como o H2 está restrito a uma determinada área geográfica, podemos inferir que mitocôndrias mutantes possam ter se submetido a uma força seletiva dentro das células, de tal maneira que algumas foram mantidas e outras eliminadas. Assim, no curso de sucessivas gerações, os tipos mitocondriais parecem ter se direcionado a segregação na condição de homoplasma. Este haplotipo tem um histórico de sucesso em determinadas áreas geográficas, haja vista que possui homólogos em outras partes do mundo, conforme os dados de comparação por pares, já descritos.

No gráfico B e C da Figura 14 aparece alguma sobreposição entre as bases mutantes, dos haplótipos 3 e 4, com um pequeno pico interno da variante H1, a qual é mais frequente e de distribuição expansiva. Esses dados sugerem baixo grau de heteroplasma materna desses haplótipos, ressaltando que esses *SNPs* aparecem em somente uma amostra de mosquito, respectivamente.

A heteroplasma é comum nos organismos, porém com o tempo estes acabam divergindo, constituindo-se em indivíduos homoplásmicos. As populações de *Cx. quinquefasciatus* no Brasil mostram-se essencialmente homoplásmicas. Isto pode explicar a baixa diversidade fenotípica desses mosquitos (BALLANA et al. 2008).

MAGNACCA E BROWN (2010) encontraram heteroplasma no gene *cox1* de abelhas. Os autores fazem referência à dificuldade na identificação taxonômica pelo DNA barcode em indivíduos heteroplásmicos. Pois, nesse caso, o sucesso na identificação pelo barcode dependerá da frequência intra-individual dos haplótipos.

Figura 14. Comparação por pares de parte das sequências ITS2, no formato cromatográfico. **A** substituições de bases dos Haplótipos H1 e H2. **B** Haplótipo H3 e **C** Haplótipo H4. As linhas verticais apontam os sítios com mutação.

Para MAGNACCA E BROWN (2010), um estudo mais detalhado da taxonomia por DNAm pode ser feito pela clonagem da região controle D-loop, juntamente com *cox1* de cada indivíduo da amostra, seguido de sequenciamento.

4.2.1.2 Análise de predição de proteínas

As análises por predição de proteínas demonstraram que das quatro substituições de bases encontradas no gene *cox1*, três são sinônimas (H1, H2 e H3) e, portanto sem alteração no fenótipo, e uma (H4) não-sinônima. Esta última produz alteração na estrutura do aminoácido com aumento na extensão de uma das hélices. Os resultados do

teste de predição de expressão, com parte da estrutura de aminoácidos primária e secundária do H4 são demonstrados na Figura 15.

Figura 15. Parte das estruturas de aminoácidos primária (AA 81-120) e secundária da proteína COX1, por predição (PSIPRED), produzida pelo gene *cox1*. O quadro destaca uma mutação não-sinônima em H4, por modificação na extensão de uma das hélices.

A análise dos dados com gene *cox1* sugere a existência de algum tipo de barreira biológica, uma vez que marcadores genéticos mitocondriais têm sua origem no citoplasma celular. Como auxiliar deste estudo foi realizado testes com a bactéria *Wolbachia pipientis*, um organismo simbiote encontrado em populações do grupo *pipiens* em todo o mundo (MORAIS et al. 2010). A *Wolbachia* é conhecida por provocar incompatibilidade citoplasmática reprodutiva em *Cx. quinquefasciatus* (RASGON & SCOTT, 2003). Diferentes cepas ou a presença ou não deste simbiote nos mosquitos resulta em incompatibilidade nos processos de reprodução, podendo provocar eventos de seleção nas populações de mosquitos hospedeiras.

O estudo com *Wolbachia* revelou que todas as amostras de mosquitos no Brasil e em La Plata estão infectadas, e com a mesma cepa bacteriana. Assim, a infecção com *Wolbachia* pode ter relação com a baixa diversidade mitocondrial. Porém, sem relação

com uma possível barreira biológica, na segregação mitocondrial da linhagem no extremo sul do Brasil.

Outro fator relevante para explicar a segregação de linhagens no Brasil seria o ‘efeito fundador’. Nesse caso, os primeiros haplótipos poderiam ter se introduzido no extremo Sul por imigrantes europeus, tendo se adaptado e expandido com maior facilidade pelas condições climáticas do local. Ainda mais que estas mutações são silenciosas, pois as análises de predição de expressão de proteínas mostraram que as diferenças genéticas encontradas não exercem influência sobre o polipeptídio produzido.

4.2.2 Locus *ace2*

Um modelo dos tamanhos de banda em gel de agarose, pela amplificação do intron *ace2* é apresentado na Figura 16. O multiplex PCR produziu fragmentos de 610pb em *Cx. pipiens* e 274bp em *Cx. quinquefasciatus*, com ambos os fragmentos em indivíduos híbridos. As análises mostram a presença de somente *Cx. quinquefasciatus* nas cidades de Belém, Teresina, Recife, Rio Branco, Pontes & Lacerda, São Paulo, Pariquera e Chapecó (100%) e *Cx. quinquefasciatus* (99%) e baixa frequência de híbridos (1%) nas cidades de Pelotas e Santa Vitória do Palmar. Foram encontradas bandas para *Cx. pipiens* (23%), *Cx. quinquefasciatus* (35%) e alta frequência de híbridos (41%) na região da Bacia do Prata, na Argentina.

Figura 16. Visualização do multiplex PCR do *ace2* de amostras de mosquitos do complexo *Cx. pipiens*, em gel de agarose 1.5%, coradas com brometo de etídio. **M** PM 100bp. **P** *Cx. pipiens* (610pb). **Q** *Cx. quinquefasciatus* (274pb). **H** produto de PCR de indivíduos híbridos, com ambos os fragmentos. **N** negativo.

A Figura 17 mostra as possibilidades de recombinação gênica e o padrão de bandas eletroforéticas formado pela amplificação de fragmentos *ace2*, com primers espécie-específicos. A recombinação permite descendências que combinam as características genéticas dos progenitores, sendo por isso uma fonte de variabilidade genética ao favorecer diferentes combinações de genes. Em vista disso, os dados com o intron *ace2* são mais bem entendidos quando analisados ao nível de população. Pois, devido a distribuição de herança mendeliana, pode-se ter um indivíduo com caractere de banda *ace2* para somente *Cx quinquefasciatus* e, no entanto, ser um mosquito de origem híbrida.

Figura 17. Representação esquemática da distribuição alélica, na recombinação gênica de genes da Acetilcolinesterase. À direita, padrão de bandas eletroforéticas dos produtos do fragmento *ace2*, em gel de agarose a 1,5%.

Assim, as amostras de mosquitos das regiões brasileiras são consideradas *Cx. quinquefasciatus* e a região de La Plata, na Argentina, uma área de introgressão gênica, com mosquitos de origem híbrida. A região do extremo sul do Brasil parece ser uma área limítrofe para eventos de fluxo gênico e hibridação de populações *pipiens* pela presença de somente 1% de híbridos na amostragem. Essa afirmação é reforçada pelos dados morfométricos da asa de fêmeas que mostram agregação na região de La Plata e dispersão dos dados sem sobreposição para outras populações geográficas, conforme MORAIS et al. 2010.

A frequência alélica do *ace2* pode não estar fixada na população de La Plata pela possibilidade de os indivíduos híbridos não possuírem o mesmo potencial reprodutivo que os táxons parentais *quinquefasciatus* e *pipiens*.

4.2.3 Espaçador *ITS2* do DNAr

Como as extremidades 3' do gene 5.8S e 5' do gene 28S (GenBank HQ848556) não apresentaram variação, a análise das sequências de bases ficou concentrada ao longo do espaçador intra-gênico *ITS2*, que apresentou uma variedade de polimorfismos e sequências de diferentes tamanhos (325 a 332pb). Os 42 clones processados do fragmento *ITS2* resultaram em 22 sequências polimórficas (GenBank HQ404254-58, HQ404260, HQ848557-72), chamadas de domínios homólogos. A distribuição de cada clone é mostrada na Tabela I.

Os dados de polimorfismos do espaçador *ITS2* apresentam índices de diversidade molecular (H_d 0,801 $\pm$ 0,058) e diversidade de nucleotídeo por sítio (π 0,00684 $\pm$ 0,00097) maiores que o gene mitocondrial *cox1* (H_d 0,636, π 0,00091). Bem como, diferente dos genes mitocondriais que apresentam maioria conteúdo A+T (75%) na composição de bases, o fragmento do DNAr possui maioria conteúdo C+G (58%).

A distribuição das sequências *ITS2* apresentou variação intra-genômica. Esse tipo de distribuição é comum ser encontrada em fragmentos do DNAr (HARRIS & CRANDALL, 2000). Isso porque as sequências de bases são caracterizadas por domínios homólogos, com múltiplas inserções microssatélites. As inserções apresentam um número variável de elementos repetidos e, à medida que ocorrem, tornam a sequência maior ou menor em níveis de extensão (Fig.18). O estudo desses eventos permite avaliar algumas relações entre diferentes espécies e populações.

Pela distribuição dos dados na Tabela I, é possível inferir que os domínios S5, S6 e S14 juntos, fecham um elo entre amostras de populações do Brasil, e o restante das sequências possui um tipo de distribuição randômica, variando com frequências intra-genômicas mais baixas.

Algumas sequências de Recife (S9), Pontes e Lacerda (S3,4,13,19), Pariquera (S7,8,17,21,22), Chapecó (S11,16) e Santa Vitória (S10,12,15,18) são similares às outras, porém se encontram separadas na Tabela I por uma ou outra transição pontual. Isso sugere que tais mutações ainda não estão fixadas, mostrando maior diversidade genética nas populações dessas localidades. Esse perfil deve ser mais bem investigado, em conjunto com marcadores microssatélites, com distribuição alélica. Igualmente, as

amostras de La Plata estão separadas das demais, sendo discutido em detalhes mais adiante.

Tabela I. Distribuição de clones do *ITS2* de *Cx. quinquefasciatus*, segundo o local de coleta.

Sequências <i>ITS2</i>	Belém	Teresina	Recife	Rio Branco	Pontes e Lacerda	PET SP	Pariquera	Chapecó	Pelotas	Santa Vitória	La Plata
S1											2
S2											2
S3					1						
S4					1						
S5	1	1	5				1	1		1	
S6				2				1	1	1	
S7							1				
S8							1				
S9			1								
S10										1	
S11								1			
S12										1	
S13					1						
S14			1			2			2		
S15										1	
S16								2			
S17							1				
S18										1	
S19					1						
S20									1		
S21							1				
S22							1				
Total (42)	1	1	7	2	4	2	6	5	4	6	4

4.2.3.1 Domínios homólogos do *ITS2*

As sequências de bases *ITS2* do *Cx. quinquefasciatus* mostram evidências de homologia, pela presença de um domínio conservado em comum. Após a divergência, os possíveis eventos de especiação ocorridos ao longo do tempo resultam na formação de fragmentos gênicos polimórficos. A Figura 19 mostra detalhes das sequências de bases onde, mesmo com uma série de polimorfismos, a construção do dendrograma forma um cluster principal entre espécies do subgrupo *pipiens* e outro com espécies do subgrupo *vishnui*. Entre os subconjuntos está o *Cx. torrentium* que, sabe-se, não pertence ao subgrupo *pipiens*, entretanto é muito próximo a este.

Figura 18. Parte de sequências *ITS2*, com inserções microsatélites, em domínios homólogos de *Cx. quinquefasciatus*. O genoma apresenta sequências de tamanho diferenciado.

Assim, em regiões repetitivas, uma cópia do gene está livre para mudar com o tempo porque a outra cópia continua a exercer sua função original. Os precedentes podem adquirir uma nova função ou podem ser expressos em diferentes tecidos ou em diferentes momentos durante o desenvolvimento, em comparação com os seus

Assim, primers internos (LPF 5'ACGCCGTCACGTCGTCGT3', com 28S / LPR 5'TGACGGCGTGAGAGATGC3', com 5.8S) foram desenhados para novas reações de PCR fragmento-específico em cada uma das amostras geográficas, objetivando verificar se o fragmento GTC está presente no genoma de mosquitos de outras localidades. Para o teste, os mesmos genomas utilizados na reação de clonagem, mais 5 mosquitos de cada localidade foram processados e amplificados com os iniciadores fragmento-específico. Após, os resultados positivos (LPF 157/LPR 350pb, respectivamente) foram visualizados em gel de agarose 1,5%.

Para diagnóstico por sítio de restrição, pode ser utilizada a enzima *BceAI*, com restrição nas bases ACGGC (*reverse*). Contudo, os laboratórios de São Paulo não comercializam esta enzima.

Como resultado, todas as amostras de La Plata foram positivas para amplificação fragmento-específico, enquanto que as amostras de mosquitos brasileiras foram positivas em 20% para este fragmento. Os dados mostram que este genótipo está fixado em mosquitos de La Plata, na Argentina e presente em mosquitos do Brasil, porém em baixa frequência intra-genômica, pelo fato de não ter sido detectado inicialmente nos clones, bem como pela ausência do locus em 80% das amostras processadas do Brasil.

Na análise de comparação por pares foi observado homologia para este fragmento em amostras de *Cx. quinquefasciatus* (FJ16058) de Bangladesh (23°N), no continente Asiático, em estudos publicados por Hasan et al. (2009). De outro modo, o trinucleotídeo GTC não foi detectado em amostras de *Cx. quinquefasciatus* da África do Sul (DQ341111), segundo sequências depositadas por Rasgon et al. (2006). Na América do Norte, o trinucleotídeo não está presente em *pipiens* (CPU22126) nem em híbridos (CPU33043), conforme os depósitos de sequências feitas por Miller et al. (1996). Ressalvo que esses dados são resultados de sequências- clones.

A constatação de homologia confirma a região do *ITS2* como conservada, podendo ser devido a sua localização proximal-centromérica nos cromossomos do mosquito e o baixo ritmo de recombinação intra-cromossomal (Rafael et al. 2003). Igualmente segundo MARCHI e PILI (1994), o DNAr tem sido encontrado em alelos únicos, no genoma de mosquitos. Desse modo, os genes ribossomais acompanham a evolução cariotípica. Não tendo, portanto, o mesmo equilíbrio de recombinação alélica, de maneira mendeliana.

Os testes com morfometria das veias alares de *Cx. quinquefasciatus* e o marcador *ace2* (Morais et al. 2010) indicam que a amostragem populacional de La Plata possui um tipo de distribuição restrita àquela área. Assim, somando os dados do marcador *ITS2*, pode-se inferir que mosquitos de La Plata não passam por cruzamentos com mosquitos do Brasil.

4.2.3.3 Estrutura Secundária RNAr

Os polimorfismos e as diferentes sequências de DNAr detectadas nas amostras de populações *Cx. quinquefasciatus* parecem não ser tão expressivos quando visualizados sob a forma de produtos destes fragmentos gênicos – os transcritos RNAr.

A estratégia mais difundida para se prever a estrutura secundária de uma molécula de DNAr é baseada no cálculo de energia livre mínima. Tal estratégia utiliza-se da idéia de atribuir uma energia a cada um de seus pares de bases, ou a seus elementos formadores estruturais, como laços internos, barrigas, arcos, hélices e multilaços (ZUKER & SANKOFF, 1984). A conformação geral da estrutura secundária do fragmento 5.8S-ITS2-28S e somente do ITS2, com indicação dos tipos de laços formados, está especificada nas Figuras 20 e 21.

As estruturas dos transcritos RNAr produzidos a partir dos 22 domínios homólogos do ITS2 mostraram alta similaridade, com algumas diferenças, em uma das alças, do tipo grampo. A Figura 22 mostra quatro estruturas RNAr, com apontamento das principais diferenças encontradas.

Figura 20. Estrutura secundária RNAr, do fragmento 5.8S-ITS2-28S, feita por predição no programa RNAFold. Letras A e B indicam os tipos de forças iônicas formadas pelas ligações, durante o enovelamento molecular.

De modo geral, a região do trinucleotídeo encontrado nas amostras de La Plata, e com uma lacuna (*gap*) nas amostras brasileiras foi a que mais diferenciou o conjunto de

estruturas secundárias do fragmento *ITS2*. Os detalhes do enovelamento das sequências de bases são mostrados na Figura 23. A região com o fragmento GTC forma um laço, pelo mau pareamento por ligações iônicas. E as sequências com lacunas, também não mostram pareamento completo, por desencadear um agrupamento de bases, porém sem formação de laço. Essa região do DNAr parece ser a mais suscetível nos eventos de variações intra-genômicas. Pois, as outras regiões com polimorfismos apresentam mudança compensatória de bases (MATHEWS 2006), sem indicação de evolução molecular.

As estruturas moleculares de RNAr que apresentam níveis físico-químicos positivos podem não ser funcionais pela pouca estabilidade. No caso das estruturas encontradas para o fragmento *ITS2*, os valores negativos apresentados na Tabela III são fundamentais para entender que, apesar dos polimorfismos e da diversidade do DNAr existentes no mosquito *Cx. quinquefasciatus*, todos os tipos de sequências encontradas são funcionais e conservadas.

Figura 21. Estrutura secundária do espaçador *ITS2* do DNAr de *Cx. quinquefasciatus*, com os tipos de laços formados.

Os dados mais relevantes de baixa diversidade para as estruturas secundárias do espaçador *ITS2* são os valores da média e desvio padrão de energia físico-química, gastos durante o enovelamento molecular, conforme mostrados em detalhes na Tabela III. Bem como, os valores de coeficiente de variação (CV) menores de 10 são considerados baixos (Gomes e Garcia 2002, Cienfuegos 2005), sendo que as moléculas

RNAr preditas apresentam valores de CV de 2,7 e 2,4 de energia livre mínima e termodinâmica, respectivamente.

Figura 22. Exemplos de estruturas secundárias do ITS2, encontradas em *Cx. quinquefasciatus*. **A** Amostra de Pelotas. **B** Belém. **C** La Plata. **D** La Plata.

Figura 23. Indel trinucleotídeo (GTC) do DNAr, detectado em maior frequência nas amostras da Argentina. O indel gera um laço do tipo grampo, no lado 3', durante o enovelamento da estrutura secundária RNAr.

Tabela II. Níveis de energia físico-química de estruturas secundárias RNAr, feitas por predição, a partir das estruturas primárias de DNAr, de 22 clones diferentes.

Sequências	Energia Livre Mínima Kcal/mol	Energia Termodinâmica Kcal/mol
S1	-123,4	-127,95
S2	-123,4	-127,95
S3	-126,3	-130,57
S4	-129,9	-134,03
S5	-123,4	-127,42
S6	-125,8	-130,49
S7	-126,2	-130,81
S8	-126,5	-130,97
S9	-123,5	-127,71
S10	-123,4	-127,42
S11	-129,9	-134,03
S12	-118,8	-123,16
S13	-129,7	-133,95
S14	-120,1	-124,65
S15	-124	-128,21
S16	-125,8	-129,75
S17	-123,9	-127,92
S18	-130,41	-134,92
S19	-129,6	-133,8
S20	-123,4	-127,95
S21	-130	-134,13
S22	-129,9	-134,03
Média	-125,8	-130,3
Desvio Padrão	3,4	3,2
CV	2,7	2,4

Além da baixa diversidade detectada pelo estudo das estruturas RNAr, o fato de o trinucleotídeo GTC desencadear uma mudança na molécula do transcrito, e estar fixado nas amostras de La Plata, pode-se inferir a existência de evolução molecular de maneira bidirecional, assim como duas linhagens de *Cx. quinquefasciatus* bem definidas na amostragem deste estudo.

4.3 A estrutura genética do *Cx. quinquefasciatus* no Brasil e implicações em ciclos de doenças infecciosas

O *Cx. quinquefasciatus* se distribui desde os pequenos assentamentos rurais até os ambientes urbanos metropolitanos. Neste estudo foi verificado que a população brasileira desse mosquito é portadora generalizada do endossimbionte *Wolbachia*, agente que certamente deve afetar a sobrevivência da espécie. Assim como, em decorrência de seu controle, o *Culex* vem sofrendo constantes aplicações de inseticidas. O meio urbano degradado representa uma forma de pressão seletiva que atua sobre as diferentes variantes dessa espécie. Sob esses estressores é de se esperar que o *Cx. quinquefasciatus* apresente eventos de gargalo em sua estrutura genética, detectada pela baixa variabilidade e homogeneidade fenotípica.

O padrão genético pode ser refletido no comportamento. O *Cx. quinquefasciatus* mais ‘puro’, apesar de ser oportunista com relação à fonte de alimentação, está mais presente em aglomerados urbanos e tende a ser antropofílico, reduzindo sua participação em ciclos de zoonoses. Sob outro olhar, as variantes sobreviventes podem ser altamente especializadas em determinados aspectos. Assim, em regiões endêmicas de filarioses, por exemplo, a adaptação e fixação do filarídeo podem ser mais rápidas do que com outros agentes, em áreas onde vetores artrópodes são mais diversificados e menos abundantes.

O *Cx. quinquefasciatus* de La Plata apresentou diferenças no perfil genético e morfológico. O espaçador ribossômico *ITS2* mostrou evolução molecular para outra linhagem gênica, os testes morfométricos apresentaram maior variação fenotípica, e o locus *ace2* apontou eventos de hibridação com *Cx. pipiens*.

A região da Argentina possui registros de arboviroses, com circulação do agente pelo mosquito *Cx. pipiens*. Essa espécie é conhecida pela tendência em se alimentar concomitantemente em pássaros e em humanos. Como estratégia de sobrevivência entra em diapausa e consegue atravessar os períodos de inverno. O *Cx. quinquefasciatus* dessa região apresenta características de híbrido com *Cx. pipiens*, podendo favorecer a área como porta de entrada para arboviroses.

Entretanto, deve ser considerado que, geneticamente, a população de *Culex* da Argentina central tem distribuição restrita àquela área e parece não haver cruzamentos naturais com populações brasileiras. Assim, com a fonte presente - em pássaros ou cavalos - a expansão de arbovírus no Brasil seria, de fato, por outra direção. Bem como, maiormente veiculado por outros mosquitos vetores, com alimentação mais zoo-antropofílica que o *Cx. quinquefasciatus*.

5 Conclusões

Apenas os valores morfométricos da forma da asa de fêmeas adultas de *Cx. quinquefasciatus* apresentam relação com variações genéticas, em nível de populações. Os dados de tamanho da asa têm relação com as áreas geográficas onde vivem os mosquitos. Igualmente, os valores da razão DV/D dos braços dorsais do edeago, na genitália masculina podem não distinguir táxons dentro do subgrupo *pipiens*, como anteriormente se pensava, e sim, serem apenas medidas de tamanho, mais relacionadas com fatores de desenvolvimento.

Os marcadores mitocondriais mostram alguns sinais de diversidade em *Cx. quinquefasciatus*. Entretanto, as mutações encontradas são silenciosas, pois não tem efeito na função da proteína produzida. Assim como, as formas estão agrupadas na região sul do Brasil, sugerindo efeitos de fixação do evento mutacional. Também toda a amostragem possui infecção pelo endosimbionte *Wolbachia*, conferindo ao *Cx. quinquefasciatus* colonização remota, efeitos de gargalo e seleção por pressão seletiva ou efeito fundador.

O segundo intron do locus da Acetilcolinesterase (*ace2*) mostrou estar fixado na população de *Cx. quinquefasciatus*, pois foi amplificado facilmente com primers espécie-específico de amostras de outras partes do mundo. De outro modo, na população híbrida com *Cx. pipiens* parece estar ainda em processo de fixação, pois foi eficiente para detectar evidências de hibridação e introgressão gênica. Este estudo foi primordial no sentido de conhecer os limites de introgressão entre essas duas espécies na região da bacia do Prata, na Argentina.

A região do espaçador ribossômico *ITS2* forneceu um emaranhado de informações pela sua diversidade de sequências gênicas. O estudo deste fragmento proporcionou saber que populações de *Cx. quinquefasciatus* de diferentes áreas geográficas possuem eventos genéticos sincrônicos e de alta complexidade. Apesar disso, de todas as populações estudadas foi encontrada somente uma contendo um fragmento marcador, na região da bacia do Prata, na Argentina. No entanto, o trinucleotídeo possui homologia com mosquitos do Norte da Ásia. Essa característica aponta para o estado conservado dessa região gênica.

Apesar de polimórfico, o espaçador *ITS2* forma estruturas secundárias RNAr muito similares, com ação compensatória de bases. Como são regiões de transcritos,

com função essencial no metabolismo celular, essas moléculas provavelmente sofrem pressão de seleção. Assim, certa diversidade, mesmo que pequena, parece contribuir para a evolução da espécie.

O *Cx. quinquefasciatus*, sendo urbano, recebe uma série de pressões do meio onde vive, reduzindo sua diversidade genética. Dentre essas, as aplicações de inseticidas para o controle populacional, a degradação ambiental característica do meio urbano, excesso de radiação solar, assim como extremos de amplitude térmica. Igualmente, o fato de este mosquito estar bem adaptado nas Américas lhe confere um histórico expansivo de simbiose com organismos como a *Wolbachia*, que interfere na atividade reprodutiva e, conseqüentemente, na evolução molecular dessa espécie.

Nos estudos epidemiológicos de doenças veiculadas por este vetor, deve ser considerado que as populações da área equatorial-tropical são mais estabelecidas genética e morfológicamente. E que a região sul do Brasil, comporta outra linhagem mitocondrial. Bem como, no extremo-sul do Brasil e limites do Uruguai e Argentina existe uma área de introgressão gênica, com híbridos para *Cx. pipiens*, que possui comportamento e capacidade vetorial diferente do *Cx. quinquefasciatus*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahid SMM, Lourenço-de-Oliveira R. Mosquitos vetores potenciais de dirofilariose canina na Região Nordeste do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1999; 33: 650-65.
- Almirón WR, Humeres SG, Gardenal CN. Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995; 90: 469-473.
- Arensburger P, et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science*. 2010; 330: 86.
- Asnis DS, Conetta R, Waldman G, Teixeira AA. The West Nile vírus encephalitis outbreak in the United States. *Ann NY Acad Sci*. 2001; 951: 161-71.
- Aspen S, Savage HM. Polymerase chain reaction assay identifies North American members of the *Culex pipiens* complex based on nucleotide sequence differences in acetylcholinesterase gene Ace.2. *J Am Mosq Control Assoc*. 2004; 19:323-8.
- Bahnck CM, Fonseca DM. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (culex) pipiens* L. (diptera: culicidae) and hybrid populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75: 251–255.
- Ballana E, Govea N, de Cid R, Garcia C, Arribas C, Rosell J, Estivill X. Detection of unrecognized low-level mtDNA heteroplasmy may explain the variable phenotypic expressivity of apparently homoplasmic mtDNA mutations. *Hum Mutat*. 2008; 29:248-257.
- Barr AR. The distribution of *Culex p. pipiens* and *C. p. quinquefasciatus* in North América. *Am J Trop Med Hyg*. 1957; 6: 153-65.
- Bartholomay, et al. Pathogenomics of *Culex quinquefasciatus* and Meta-Analysis of Infection Responses to Diverse Pathogens. *Science*. 2010; 88: 90.
- Beck SD. Insect photoperiodismo. New York: Academic Press; 1968.
- Belkin JN. The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera:Culicidae). Berkeley, CA: University of California Press; 1962.
- Bhargavi R, Vishwakarma S, Murty US. A secondary structural common core in the ribosomal ITS2 (internal transcribed spacer) of *Culex* species from diverse geographical locations. *Bioinformation*. 2005; 1: 52-55.
- Bosio CF, Harrington LC, Jones JW, Sithiprasasna R, Norris DE, Scott TW. Genetic structure of *aedes aegypti* populations in thailand using mitochondrial DNA. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72: 434–42.
- Bourguet D, Fonseca D, Vourch G, Dubois MP, Chandre F, Severini C, Raymond M. The Acetylcholinesterase Gene ACE: A Diagnostic Marker for the *pipiens* and *quinquefasciatus* Forms of the *Culex pipiens* Complex. *J Am Mosq Control Assoc*. 1998; 14: 390-6.
- Burger G, Forget L, Zhu Y, Gray MW, Lang BF. Unique mitochondrial genome architecture in unicellular relatives of animals. *Biochemistry*. 2003; 100: 892-7.
- Burke JM, Arnold ML. Genetics and the fitness of hybrids. *Annu Rev Genet*. 2001; 35: 31-52.
- Cienfuegos F. Estatística aplicada ao laboratório. Rio de Janeiro: Interciência; 2005.
- Clements AN. The biology of mosquitoes: sensory reception and behaviour. v2. Wallingford: CABI; 1999.
- Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic Anopheles species. *Insect Mol Biol*. 1996; 5: 1-9.
- Conn EE, Stumpf PK. Introdução à Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Edgard Blucher; 1980.

- Consoli RAGB, Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fundação Instituto Oswaldo Cruz; 1994.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A. Geneious v4.7; 2009. Available from <http://www.geneious.com>.
- Flores FS, Diaz LA, Batallán GP, Almirón WR, Contigiani MS. Vertical Transmission of St. Louis Encephalitis Virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Córdoba, Argentina. Vector Borne Zoonotic Dis. 2010; 10 (10): 1999-1002.
- Fonseca MD, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer FC, Wilkerson RC. Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. Science. 2004; 303: 1535.
- Forattini OP. Entomologia Médica. São Paulo: EDUSP; 1965.
- Forattini OP. Culicidologia Médica. v 2. São Paulo: EDUSP; 2002.
- Friedlander TP, Regier JC, Mitter C. Nuclear gene sequences for higher level phylogenetic analysis: 14 promising candidates. Sys Biol. 1992; 41: 483-90.
- Gibert P, Capi P, Imasheva A, Moreteau B, Morin JP, Pétavy G, & David JR. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. Genetica. 2004; 120: 165-79.
- Gomes FP, Garcia CH. Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e Florestais. V11. Piracicaba: Fealq; 2002.
- Gorrochotegui-Escalante N, Munoz ML, Fernandez-Salas I, Beaty BJ, Black IV WC. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2000; 62: 200-209.
- Gorrochotegui-Escalante N, Gomez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas I, Munoz ML, Farfan-Ale JA, Garcia-Rejon J, Beaty BJ, Black IV WC. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. Am J Trop Med Hyg. 2002; 66: 213-22.
- Gray MW. Origin and evolution of mitochondrial DNA. Annu Rev Cell Bio. 1989; 5: 25-50.
- Griffiths AJ, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. Introduction to Genetic Analysis. 9 ed. New York: Freeman; 2008.
- Guillemaud T, Pasteur N, Rousset F. Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*. Proc R Soc Lond. 1997; 264: 245-251.
- Harris DJ, Crandall KA. Intra-genomic variation within ITS1 and ITS2 of *Freshwater crayfishes* (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. Mol Biol Evol. 2000; 17: 284-291.
- Hasan AU, Suguri S, Ahmed SM, Fujimoto C, Harada M, Rahman SM, Zaman RU, Kakehi Y. Molecular phylogeography of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in central Bangladesh. Acta Tropica. 2009; 112:106-14.
- Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. Quart Rev Biol. 1991; 66: 411-53.
- Hoy MA. Insect Molecular Genetics. An introduction to principles and applications. 2 ed. London: Academic Press; 2003.
- Humeres SG, Almirón WR, Sabattini MS, Gardenal CN. Estimation of genetic divergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 57-62.

- Jakob WL, Francy DB. Observations on the DV/D Ratio of male genitalia of *Culex pipiens* complex mosquitoes in the United States. *Mosq Syst.* 1984; 16: 282-288.
- Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol.* 1999; 292: 195-202.
- Labarthe N, Serrão ML, Melo YF, de Oliveira SJ, Lourenço-de-Oliveira R. Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998; 93: 145-54.
- Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M. Independent Duplications of the Acetylcholinesterase Gene Conferring Insecticide Resistance in the Mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol.* 2007a; 24:1056-67.
- Labbe' P, Berticat C, Berthomieu A, Unal S, Bernard C, Weill M, Lenormand T. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *PLoS Genet.* 2007b; 3: 205.
- Leather SR, Walters KFA, Bale JS. The ecology of insect overwintering. Cambridge: University Press; 1995.
- Lenormand T, Raymond M. Analysis of Clines with Variable Selection and Variable Migration. *Am Nat.* 2000; 155: 70-82.
- Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol.* 1987; 4: 203-21.
- Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009; 25: 1451-1452.
- Linam JH, Nielsen LT. Notes on the taxonomic separation of adult females of *Culex pipiens* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Mosq News.* 1962; 22: 390-393.
- Luna EJA, Pereira LE, Souza RP. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia?. *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 2003; 12: 7- 19.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewlitt OM. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol.* 2007; 5: 153-165.
- Malcolm CA, Bourguet D, Ascolillo A, Rooker SJ, Garvey CF, Hall LMC, Pasteur N, Raymond M. 1998. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Mol Biol.* 1998; 7: 107-120.
- Magnacca KN, Brown MJF. Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (*Nesoprosopis*) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evol Biol.* 2010; 10:174-190.
- Marchi A, Pili E. Ribosomal RNA genes in mosquitoes: localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Heredity.* 1994; 72: 599-605.
- Mathews, D. H. Revolutions in RNA Secondary Structure Prediction. *J Mol Biol.* 2006; 359: 526-532.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics.* 2000; 16: 404-405.
- McLean RG, Ubico SR, Docherty DE, Hansen WR, Sileo L, McNamara TS. West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 951: 54-57.
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol Biol.* 1996; 5: 93-107.
- Morin JP, Moreteau B, Peâ Tavy G, David JR. Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *J Evol Biol.* 1999; 12: 329-39.

- Morais AS, Marrelli MT, Natal D. Aspectos da distribuição de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) na região do rio Pinheiros, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Entomol.* 2006; 50: 413-18.
- Morais SA, Marrelli MT, Natal D. Observações sobre aplicações de controle em ecótopo com alta infestação de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae). *Rev Bras Entomol.* 2007; 51: 246-51.
- Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105: 672-676.
- Mori A, Romero-Severson J, Severson DW. Genetic basis for reproductive diapause is correlated with life history traits within the *Culex pipiens* Complex. *Insect Molecular Biology.* 2007; 16: 515-524.
- Natal D, Marucci D. Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. *Rev Saúde Publica.* 1984; 18: 418-20.
- Natal D, Paganelli CH, Santos JLF. Composição da população adulta de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823 em ecótopos próximos à represa Edgard de Souza, no município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Entomol.* 1991; 35: 539-543.
- Navajas M, Fournier D, Lagnel J, Gutierrez J, Boursot P. 1996. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. *Insect Mol Biol.* 1996; 5: 281-285.
- Olejníček J, Gelbic I. Autogeny in *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. *J Vector Ecol.* 2000; 25: 118-122.
- Paduan KS, Ribolla PEM. Mitochondrial DNA Polymorphism and Heteroplasmy in Populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J Med Entomol.* 2008; 45: 59-67.
- Polanco C, Gonzalez AI, de la Fuente A, Dover GA. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions. A possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics.* 1998; 149: 243-56.
- Rafael MS, Tadei WP, Recco-Pimentel SM. Location of ribosomal genes in the chromosomes of *Anopheles darlingi* and *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) from the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98: 629-635.
- Raju K, Jambulingam P, Sabesan S, Vanamail P. Lymphatic filariasis in India: epidemiology and control measures. *J Postgrad Med.* 2010; 56:232-238.
- Rasgon JL, Cornel AJ, Scott TW. Evolutionary history of a mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proc Biol Sci.* 2006; 273: 1603-1611.
- Rasgon JL, Scott TW. *Wolbachia* and Cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* Mosquito Species Complex: Parameter Estimates and Infection Dynamics in Natural Populations. *Genetics.* 2003; 165: 2029-2038.
- Raymond M; Callaghan A; Fort P; Pasteur N. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature.* 1991; 350: 151-53.
- Reisen WK, Fang Y, Martinez VM. Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J Med Entomol.* 2005; 42(3):367-75.
- Regis L, Silva-Filha MHNL, Oliveira CMF, Rios EM, Silva SB, Furtado A. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, The vector of filariasis in Recife. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995; 90: 115-119.
- Richards SL, Lord CC, Pesko K, Tabachnick WJ. Environmental and Biological Factors Influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) Vector

- competence for Saint Louis Encephalitis Virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81(2): 264–272.
- Ridley M. *Evolução*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
- Rohlf FJ. Morphometric tools for landmark data. *J Classification.* 1993; 10: 133–136.
- Rohlf FJ. tpsRelw, relative warps analysis, version 1.44. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook; 2006.
- Sambrook J, Russel D. *The Condensed Protocols*. New York: CSHL Press; 2006.
- Service MW. The taxonomy and biology of two sympatric sibling species of *Culex*, *C. pipiens* and *C. torrentium* (Diptera, Culicidae). *J Zool Soc Lond.* 1968; 156: 313–323.
- Sanogo YO, Kim C, Lampman R, Halvorsen JG, Gad AM, Novak RJ. Identification of Male Specimens of the *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) in the Hybrid Zone Using Morphology and Molecular Techniques. *J Med Entomol.* 2008; 45: 203–209.
- Savage HM, Anderson M, Gordon E, Mcmillen L, Colton L, Delorey M, Sutherland G, Aspen S, Charnetzky D, Burkhalter K, Godsey M. Host-Seeking Heights, Host-Seeking Activity Patterns, and West Nile Virus Infection Rates for Members of the *Culex pipiens* Complex at Different Habitat Types Within the Hybrid Zone, Shelby County, TN, 2002 (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2008; 45: 276–288.
- Severini C, Silvestrini F, Mancini P, La Rosa G, Marinucci M. 1996. Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Insect Mol Biol.* 1996; 5: 181–186.
- Smith JL, Fonseca DM. Rapid assays for identification of members of the *Culex (culex)pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 70: 339–345.
- Sundararaman S. Biometrical studies on intergradation in the genitalia of certain populations of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* in the United States. *Am J Hyg.* 1949; 50: 307–314.
- Taipe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. *Rev Saúde Pública.* 2003; 37: 275–279.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007; 24:1596–1599.
- Tajima F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 1989; 123:585–595.
- Turell MJ, Sardelis MR, Dohm DJ, O’Guinn ML. Potential North American vectors of West Nile virus. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 951: 317–24.
- Urbanelli S, Silvestrini F, Reisen WK, De Vito E, Bullini L. Californian hybrid zone between *Culex pipiens pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* revisited (Diptera:Culicidae). *J Med Entomol.* 1997; 34: 116–27.
- Upholt WB, Dawid IB. Mapping of mtDNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region. *Cell.* 1977; 11: 571–583.
- Vezzani D, Eiras DF, Wisnivesky C. *Dirofilariasis* in Argentina: historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Vet Parasitol.* 2006; 136:259–273.
- Vezzani D, Mesplet M, Eiras DF, Fontanarrosa MF, Schnittger L. PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina. *Parasitol Res.* 2010. *In press*.

- Watson JD, Myers RM, Caudy AA, Witkowski JA. DNA Recombinante: genes e genomas. 3 ed. Porto Alegre: Artmed; 2009.
- Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY, Ma YS. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 854:155-70.
- Wesson D M, Porter CH, Collins FH. Sequence and Secondary Structure Comparisons of ITS rDNA in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol.* 1992; 1: 253-269.
- Zhang DX, Hewlitt GM. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Mol Biol.* 1996; 6: 143-150.
- Zinser M, Ramberg F, Willott E. *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: Blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds. *J Insect Sci.* 2004; 4:20.
- Zuker M, Sankoff D. RNA secondary structures and their prediction. *Bull Math Biol.* 1984; 46: 591–621.

ANEXO 1

Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina

Sirlei Antunes de Moraes¹, Camila Moratore^{2,3}, Lincoln Suesdek^{2,3}, Mauro Toledo Marrelli^{1/+}

¹Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública ³Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil ²Seção de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

Variation among natural populations of Culex (Culex) quinquefasciatus Say is associated with different vectorial capacities. The species Cx. quinquefasciatus is present in the equatorial, tropical and subtropical zones in the Brazilian territory, with intermediate forms between Cx. quinquefasciatus and Culex pipiens occurring in regions of latitudes around 33°-35°S. Herein, we studied geographically distinct populations of Cx. quinquefasciatus by genetic characterization and analysis of intra-specific wing morphometrics. After morphological analysis, molecular characterization of Cx. quinquefasciatus and intermediate forms was performed by polymerase chain reaction of the polymorphic nuclear region of the second intron of the acetylcholinesterase locus. Additionally, the morphology of adult female wings collected from six locations was analyzed. Wing centroid sizes were significantly different between some geographical pairs. Mean values of R_2/R_{2+3} differed significantly after pairwise comparisons. The overall wing shape represented by morphometric characters could be divided into two main groupings. Our data suggest that Brazilian samples are morphologically and genetically distinct from the Argentinean samples and also indicated a morphological distinction between northern and southern populations of Brazilian Cx. quinquefasciatus. We suggest that wing morphology may be used for preliminary assessment of population structure of Cx. quinquefasciatus in Brazil.

Key words: *Culex pipiens* complex - *Culex quinquefasciatus* - clines - molecular identification - wing morphology

The *Culex (Culex) pipiens* complex in the Americas is composed of two main species, *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, which is adapted to tropical zones and *Cx. pipiens* L., which is found in temperate zones. In intermediate areas, these two members can mate yielding hybrids and intermediate forms (Barr 1957), through the processes of gene flow and introgression (Humeres et al. 1998, McAbee et al. 2008, Kothera et al. 2009). Mosquitoes of the *Cx. pipiens* complex are potential vectors of filarid worms in tropical and subtropical areas (Bockarie et al. 2009) and diverse arboviruses, including West Nile virus (Apperson et al. 2004, Cook et al. 2006).

Adult females and immature stages of the *Cx. pipiens* complex are morphologically similar. The differentiation of adult males can be made by analysis of genitalia, which includes measuring the DV/D ratio of the dorsal arms of the aedeagus in the phallosome, as reported by Sundararaman (1949). Because members of the *Cx. pipiens* complex have a broad geographical distribution, other phenotypical differences beyond those of the male genitalia can be found. For example, some wing characters can also be used for morphologic identification of mosquito species.

The taxonomic keys compiled by Forattini (2002) compared wing morphology of adult females. In that report, the subcosta vein (Sc) was reported to bind with the costa vein (C) before the bifurcation of the radial₂₊₃ vein (R_{2+3}) in *Cx. quinquefasciatus*, whereas in *Cx. pipiens*, the Sc vein binds to vein C at the same point or beyond the R_{2+3} bifurcation. To our knowledge, these findings have not been investigated in other geographically distant populations.

Linam and Nielsen (1962) reported that Bekku (1956), in Northern Japan, also attempted to use wing characteristics [the length of radial cell R_2 (second marginal cell) divided by the length of vein R_3] to distinguish adults of the *pipiens* group. The results of Bekku (1956) were inconclusive, which was later explained when Kamura (1958) found that these particular wing measurements varied with the temperature of the environment. Nielsen and Rees (1961) and Linam and Nielsen (1962) reported that the most reliable method of separating females of *Cx. pipiens* and *Cx. quinquefasciatus* was by a wing measurement value obtained by dividing the length of the cell R_2 by the length of the vein R_{2+3} (R_2/R_{2+3} ratio). These authors reported the value of this ratio to be about 5.0 in *Cx. pipiens* and 3.0 or less in *Cx. quinquefasciatus*, with intermediate values present in the hybrids. However, these studies did not evaluate morphometric data among mosquito populations and climatic/geographic gradients.

In insects, the phenotypic variations among members of species complexes have been intensely investigated, especially those concerning the size and shape of adult wings (James & Partridge 1998, Morin et al. 1999). In *Drosophila*, which has a worldwide distribution, significant morphometric wing variations were found in

Financial support: FAPESP (05/50225-2, 06/02622-5) SAM and CM contributed equally to this work (FAPESP 06/57272-9 and 07/1665-5, respectively).

+ Corresponding author: mmarelli@usp.br

Received 24 November 2009

Accepted 29 April 2010

populations from different geographic regions, forming clusters or latitudinal clines (Van'T Land et al. 1999). Some studies report that variations in the wings may be related to intrapopulation genetic variations, life history [such as conditions during larval development (Swindell & Bouzat 2006)], the direction of selection throughout the population sources (Hansen & Houle 2008) and the fitness or possible targets of natural selection (Buggs 2007, Gay et al. 2008). Other studies have related morphological differences to species divergence or ecological adaptations (James et al. 1997).

The taxonomy of the *Cx. pipiens* complex is difficult to interpret, since members of the complex present several similarities in terms of both genetics and morphology. To correctly distinguish the taxa, morphological and molecular investigations are needed, as well as knowledge about the characteristics of populations throughout their biogeographical gradients. Likewise, the correct identification of females and hybrids is of epidemiological importance, mainly due to ecophysiological differences, which include autogeny, reproductive diapause, stenogamy, feeding behavior and vector potential (Humeres et al. 1998, Lenormand & Raymond 2000, Fonseca et al. 2004, Savage et al. 2008).

Molecular markers have become an important tool to solve taxonomic problems and to identify sibling species. For example, Bourguet et al. (1998) reported variability at the nucleotide level of the acetylcholinesterase (*ace-2*) gene in several strains and natural populations of the *Cx. pipiens* complex. Few polymorphisms were found in coding regions within a subspecies, but many polymorphisms were observed between subspecies in noncoding regions. In their study, Bourguet et al. (1998) described a method based on a restriction enzyme polymorphism in polymerase chain reaction (PCR) amplified DNA, in which the presence or absence of a single restriction site discriminates between *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* and their hybrids. This technique has since been used to reliably discriminate between mosquitoes from more than 30 worldwide strains or populations.

The present paper is a preliminary investigation of genetic-morphological variability of *Cx. quinquefasciatus* in Brazil. In addition, the presence of a hybrid zone for *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. pipiens* in Argentina is discussed. It also revises the morphological identification data of the females by morphometric characters of the wing.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito samples - Immature stages of mosquitoes were collected in the field. Larvae were reared to adults in the laboratory and examined after emergence. The samples were collected in urban areas during the hot months of February and March of 2008, in the Brazilian municipalities of Teresina (5°05'S), Rio Branco (9°58'S), Pariquera-Açu (24°42'S), Pelotas (31°45'S) and Santa Vitória do Palmar (33°31'S). Samples were also collected in the city of La Plata (34°55'S), Argentina (Fig. 1). Sampling covered a latitudinal extension of 30° throughout South America. Mosquitoes were identified as *Cx. quinquefasciatus* by analysis of morphologic characters, according to taxonomic keys in Forattini (2002). For wing

Fig. 1: *Culex* mosquito collection sites in South America. 1: Teresina; 2: Rio Branco; 3: Pariquera; 4: Pelotas; 5: Santa Vitória do Palmar (Brazilian municipalities); 6: La Plata (Argentina).

morphology and molecular analyses, only females were selected because species diagnosis is more difficult among female adults. Each individual was used for both analyses. DNA was extracted from whole bodies (without wings). Additionally, adult males were used for description of genitalia (phallosome) and calculation of DV/D ratio (Sundararaman 1949).

Nucleic acid isolation - After removing of the wings for morphometric analysis, genomic DNA was isolated from the remaining body parts using Qiagen DNeasy® Blood & Tissue kits, following the manufacturer's recommendations with slight modification. DNA was eluted in a final volume of 100 µL and stored at -20°C until used for PCR.

PCR - Taxon-specific PCR primers based on polymorphisms in the second intron of the *ace-2* locus were used to assist in distinguishing sibling species of *Cx. pipiens* complex and to characterize populations and zones of hybridization (Bourguet et al. 1998, Aspen & Savage 2003, Smith & Fonseca 2004, Savage et al. 2007, Sanogo et al. 2008, Kothera et al. 2009). The fragment of the *ace-2* locus was amplified from each DNA sample by PCR in a final reaction volume of 50 µL with 2 mM Mg²⁺, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.5 mM of each primer, 0.2 mM dNTP mix, 2 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen) and approximately 6.0 ng of genomic DNA.

We used multiplex forward and reverse primers for each species of interest: ACEquin 5'-CCTTCTTGAATGGCTGTGGCA-3', ACEpip 5'-GGAAACAACGACGTATGTACT-3', B1246s 5'-TGGAGCCTCCTCTTCACGG-3'. All primers were described by Smith

and Fonseca (2004). The multiplex produces a 610-bp fragment in *Cx. pipiens*, a 274-bp fragment in *Cx. quinquefasciatus* and may produce one or both fragments in hybrids of the two species. The amplification program consisted of one cycle at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 30 seconds, 72°C for 1 min and one cycle at 72°C for 5 min.

Wing morphology - Wings of females from the following six locations were analyzed: Teresina (n = 22), Rio Branco (n = 27), Pariquera-Açu (n = 28), Pelotas (n = 22), Santa Vitória (n = 22) and La Plata (n = 31). Right wings were mounted on slides under a coverslip using Entellan. Photographs of wings were taken with a Leica DFC320 digital camera coupled to a stereomicroscope Leica S6 using 40X magnification.

In each wing image, coordinates of 18 landmarks (Fig. 2) were digitized using tpsDig software (v1.40 James Rohlf). Subsequent morphological analyses were performed according to Rohlf (1993). Computation of the R_2/R_{2+3} ratio for each individual was performed using landmarks 4, 16 and 17, according to Nielsen and Rees (1961) and Linam and Nielsen (1962). Scores of this ratio were statistically compared within and among the six geographical samples.

Overall wing shape based on the 18 landmarks was compared among geographical samples through discriminant multivariate analysis. Following this analysis, we generated validated reclassification tests and a phenogram of Mahalanobis distances within each pair of samples. For overall wing size assessment, we used the centroid size as extracted from coordinates of the 18 landmarks. Morphometric analyses were performed using tpsRelw 1.44 (Rohlf 2006) and PAD softwares (Dujardin 2002) and graphical outputs were generated using Statistica 7.0 software (StatSoft).

RESULTS

Our results confirmed that *Cx. quinquefasciatus* is distributed in the equatorial, tropical and subtropical zones in the Brazilian territory, with hybrids forms between *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. pipiens* occurring in regions of latitudes around 34-35°S, in La Plata. The multiplex PCR produced a 274-bp fragment in all specimens from Brazilian localities (Teresina, Rio Branco, Pariquera, Pelotas and Santa Vitória), identifying them as pure *Cx. quinquefasciatus* populations. In the sample from La Plata (Argentina), three PCR band profile were found: (i) only the 274-bp band (35% of specimens), (ii) only the 610-bp band (23%) and (iii) both bands (42%).

Fig. 2: wing of female of *Culex* mosquitoes with the 18 selected landmarks. Lines between 16-17 and between 17-4 define radial₂₊₃ veins and R_2 , respectively.

These results suggest that La Plata is a hybrid region. Therefore, in this study, the samples collected in the Brazilian regions were labelled *Cx. quinquefasciatus* (Q) and the samples from La Plata were labelled as a population of hybrid origin (H). In another study (unpublished observations), 3% of the samples collected from Santa Vitória do Palmar in the winter showed fragments with both bands of *ace-2*. This suggested that the border of an area with high levels of hybridization area is approaching the latitude of 33°S, in Brazil. Our findings are in accordance with the observations by Almirón et al. (1995) and Humeres et al. (1998), which indicated the presence of hybrids in the region of Argentina based on morphology of male genitalia, allele frequencies and experimental crosses. Those authors suggest latitudes between 33-35°S as a possible hybridization region.

Among Brazilian samples, populations from the tropical locations Teresina and Rio Branco had larger wings than subtropical areas (Pariquera, Pelotas and Santa Vitória do Palmar). Pairwise comparisons of samples from the six geographical regions using non-parametrical Kruskal-Wallis + Dunn's *post-hoc* test indicated significant differences in centroid size ($p < 0.05$) between Teresina and the others (except Rio Branco) and between Rio Branco and the others (except Teresina) (Fig. 3). No other pairs of samples differed significantly regarding the centroid size. These results suggest a temperature-dependent cline. Other studies have suggested that unlike wing shape, wing size may be a labile trait influenced by temperature (James et al. 1997, Gibert et al. 2004, Polak et al. 2004). However, it is currently difficult to perform a more profound interpretation of wing size data because wing size in culicids is reportedly also influenced by food availability (Jirakanjanakit et al. 2007).

The R_2/R_{2+3} ratio scores of Brazilian samples were in accordance with the *Cx. quinquefasciatus* geographical zones, whereas the scores of Argentinean samples were similar to mosquitoes of hybrid origin, reported by Linam and Nielsen (1962) (Fig. 4). Comparisons using non-parametrical Kruskal-Wallis + Dunn's *post-hoc* test indicated that samples from La Plata differed significantly ($p < 0.001$) from samples of the other five

Fig. 3: centroid sizes, in millimeters. Black dot: mean; whiskers: standard deviation; boxes: standard error.

geographical regions. No other pair of samples differed significantly regarding that ratio. These results may be indicative of low gene flow between Q and H populations because wing shape is genetically determined and has evolutionary significance (Dujardin 2008, Jirakanjanakit et al. 2008). A possible barrier to gene flow between Q and H would be the geographic distribution of *Cx. pipiens*, which appears to be climatically constrained to south of 33°S, according to Almirón et al. (1995) and Humeres et al. (1998).

Discriminant analysis of wing shape data obtained from the 18 landmarks yielded a matrix of Mahalanobis distances, which is represented as a phenogram in Fig. 5. The overall wing shape showed a clear distinction among the Brazilian (Q) and Argentinean (H) samples, with two visible major clusters. Validated reclassification tests also showed that these two major clusters can be distinguished with 100% accuracy. Among Brazilian samples, there is an inner division separating northern (Teresina + Rio Branco) from southern (Pariquera + Pelotas + Santa Vitória) geographical samples.

Genetic data based on *ace-2* amplification corroborated the morphological divergence between populations of Brazilian and Argentinean mosquitoes. Populations

from La Plata did not show a homogeneous banding pattern, indicating that this population may be composed of hybrids that originated from an introgression event between *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. pipiens* species.

DISCUSSION

Our data suggest that the Brazilian populations of *Cx. quinquefasciatus* sampled are morphologically and genetically distinct from the Argentinean population of La Plata. These results, which are similar to some observed in North America (Linam & Nielsen 1962), indicate that wing characters may serve as diagnostic markers in future studies of the *pipiens* complex. However, more studies will certainly be needed to confirm such usefulness and to determine the geographical extension of the hybrid zone around La Plata.

Wing shape analysis also revealed a geographical population structure in the Brazilian samples. Northern samples, collected from a tropical zone, clustered separately from southern populations (collected from a subtropical zone), which leads us to believe that gene flow is lower between these two regions than within them. This conclusion is supported by the knowledge that wing shape can be indicative of population genetic structure since it is strongly determined by quantitative genetic heritage (Dujardin 2008). Morphological divergence between northern and southern samples might be enhanced by a geographical barrier, since the shortest linear distance between any pair of northern-southern locations (Teresina - Pariquera) is over 2100 km. A morphoclimatic barrier consisting of the transition between tropical and subtropical zones is another hypothesis to be tested. Genetic data were homogeneous for the five Brazilian samples regarding this portion of *ace-2*, suggesting that *Cx. pipiens* is not present in those Brazilian locations.

Male representatives of the three main wing morphological clusters exhibited the following DV/D mean ratios: Q-northern (Rio Branco) = 1.02; Q-southern (Pelotas) = 0.86 and H (La Plata) = 0.02. Although these results are preliminary (sample sizes were 2, 4 and 2, respectively) and part of another survey in course, they are in accordance with the expected DV/D ratios: values near to zero are typical of *Cx. pipiens* (Sundararaman 1949). In addition, the overall shape of phallosomes of H samples and H samples were more similar to *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. pipiens*, respectively (data not shown). Thus, data from males reinforces the evidence that population H represents a hybrid zone. Differences between northern and southern Brazilian samples suggest that wing characters are also useful for a preliminary assessment of population structure of *Cx. quinquefasciatus* in Brazil and should be helpful if utilized in population genetic surveys.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Almério de Castro Gomes (School of Public Health, University of São Paulo), for providing mosquito samples from Teresina, to Gustavo Rossi (Centro de Estudios Parasitológicos Y de Vectores, La Plata, Argentina), for providing specimens from La Plata, and to Ministry of Health (FUNASA) and Departments of Health of municipalities of Pelotas and Rio Branco, for helping us during the field works.

Fig. 4: descriptive whisker plot of radial cells R_2/R_{2+3} ratio, means and standard deviation (SD).

Fig. 5: phenogram with Mahalanobis distances among geographical samples (complete linkage amalgamation).

REFERENCES

- Almirón WR, Humeres SG, Gardenal CN 1995. Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 469-473.
- Apperson CS, Hassan HK, Harrison BA, Savage HM, Aspen SE, Farajollahi A, Crans W, Daniels TJ, Falco RC, Benedict M, Anderson M, McMillen L, Unnasch TR 2004. Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the Eastern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4: 71-82.
- Aspen S, Savage HM 2003. Polymerase chain reaction assay identifies North American members of the *Culex pipiens* complex based on nucleotide sequence differences in acetylcholinesterase gene *ace-2*. *J Am Mosq Control Assoc* 19: 323-328.
- Barr AR 1957. The distribution of *Culex p. pipiens* and *C. p. quinquefasciatus* in North America. *Am J Trop Med Hyg* 6: 153-165.
- Bekku H 1956. Studies on the *Culex pipiens* group of Japan. I. Comparative studies on the morphology of those obtained from various localities in the Far East. *Nagasaki Igakkai Zasshi* 31: 956-966.
- Bockarie MJ, Pedersen EM, White GB, Michael E 2009. Role of vector control in the global program to eliminate lymphatic filariasis. *Annu Rev Entomol* 54: 469-487.
- Bourguet D, Fonseca D, Vourch G, Dubois MP, Chandre F, Severini C, Raymond M 1998. The acetylcholinesterase gene *ace*: a diagnostic marker for the *pipiens* and *quinquefasciatus* forms of the *Culex pipiens* complex. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 390-396.
- Buggs RJ 2007. Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity* 99: 301-312.
- Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, de Lamballerie X 2006. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* 87: 735-748.
- Dujardin JP 2002. Permutations and discriminant analyses (PAD). Available from: mpl.ird.fr/morphometrics.
- Dujardin JP 2008. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol* 8: 875-890.
- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer RC, Wilkerson RC 2004. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303: 1535-1538.
- Forattini OP 2002. *Culicidologia médica*, Edusp, São Paulo, 860 pp.
- Gay L, Crochet PA, Bell DA, Lenormand T 2008. Comparing clines on molecular and phenotypic traits in hybrid zones: a window on tension zone models. *Evolution* 62: 2789-2806.
- Gibert P, Capy P, Imasheva A, Moreteau B, Morin JP, Pétavy G, David JR 2004. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica* 120: 165-179.
- Hansen TF, Houle D 2008. Measuring and comparing evolvability and constraint in multivariate characters. *J Evol Bio* 21: 1201-1219.
- Humeres SG, Almirón WR, Sabattini MS, Gardenal CN 1998. Estimation of genetic divergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 57-62.
- James AC, Azevedo RB, Partridge L 1997. Genetic and environmental responses to temperature of *Drosophila melanogaster* from a latitudinal cline. *Genetics* 146: 881-890.
- James AC, Partridge L 1998. Geographic variation in competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 151: 530-537.
- Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP 2008. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Infect Genet Evol* 8: 414-421.
- Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrungrakiat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, Dujardin JP 2007. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Trop Med Int Health* 12: 1354-1360.
- Kamura T 1958. Studies on the *Culex pipiens* group of Japan. 3. On the seasonal changes of morphological characters in Isahaya *pallens*. *Nagasaki Igakkai Zasshi* 33 (Suppl.): 78-85.
- Kothera L, Zimmerman EM, Richards CM, Savage HM 2009. Microsatellite characterization of subspecies and their hybrids in *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) mosquitoes along a north-south transect in central United States. *J Med Entomol* 46: 236-248.
- Lenormand T, Raymond M 2000. Analysis of clines with variable selection and variable migration. *Am Nat* 155: 70-82.
- Linam JH, Nielsen LT 1962. Notes on the taxonomic separation of adult females of *Culex pipiens* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Mosq News* 22: 290-293.
- McAbee RD, Green EN, Holeman J, Christiansen J, Frye N, Dealey K, Mulligan FS 3rd, Brault AC, Cornel AJ 2008. Identification of *Culex pipiens* complex mosquitoes in a hybrid zone of West Nile virus transmission in Fresno County, California. *Am J Trop Med Hyg* 78: 303-310.
- Morin JP, Moreteau B, Pétavy G, Parkash R, David JR 1999. Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *J Evol Biol* 12: 329-339.
- Nielsen LT, Rees DM 1961. An identification guide to the mosquitoes of Utah. *University of Utah Biological Series* 12: 1-59.
- Polak M, Kroege DE, Cartwright IL, Ponce de Leon C 2004. Genotype-specific responses of fluctuating asymmetry and of pre-adult survival to the effects of lead and temperature stress in *Drosophila melanogaster*. *Environ Pollut* 127: 145-155.
- Rohlf FJ 1993. Morphometric tools for landmark data. *J Classification* 10: 133-136.
- Rohlf FJ 2006. tpsRelw, relative warps analysis, version 1.44. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Sanogo YO, Kim CH, Lampman R, Halvorsen JG, Gad AM, Novak RJ 2008. Identification of male specimens of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in the hybrid zone using morphology and molecular techniques. *J Med Entomol* 45: 203-209.
- Savage HM, Aggarwal D, Apperson CS, Katholi CR, Gordon E, Hassan HK, Anderson M, Charnetzky D, McMillen L, Unnasch EA, Unnasch TR 2007. Host choice and West Nile virus infection rates in blood-fed mosquitoes, including members of the *Culex pipiens* complex, from Memphis and Shelby County, Tennessee, 2002-2003. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7: 365-386.
- Savage HM, Anderson M, Gordon E, McMillen L, Colton L, Delorey M, Sutherland G, Aspen S, Charnetzky D, Burkhalter K, Godsey M 2008. Host-seeking heights, host-seeking activity patterns and West Nile virus infection rates for members of the *Culex pipiens* complex at different habitat types within the hybrid zone, Shelby County, TN, 2002 (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 45: 276-288.
- Smith JL, Fonseca DM 2004. Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* 70: 339-345.
- Sundaraman S 1949. Biometrical studies on intergradation in the genitalia of certain populations of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* in the United States. *Am J Hyg* 50: 307-314.
- Swindell WR, Bouzat JL 2006. Associations between environmental stress, selection history and quantitative genetic variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 127: 311-320.
- Van'T Land J, Van Putten P, Zwaan B, Kamping A, Van Delden W 1999. Latitudinal variation in wild populations of *Drosophila melanogaster*: heritabilities and reaction norms. *J Evol Bio* 12: 222-223.

ANEXO 2

LOW MITOCHONDRIAL DIVERSITY IN NEOTROPICAL *CULEX QUINQUEFASCIATUS* RELATED WITH *WOLBACHIA* INFECTION

Sirlei Antunes Morais¹, Fábio de Almeida^{2,3}, Lincoln Suesdek^{2,3}, Mauro Toledo Marrelli^{1,3}

¹ Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

² Seção Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. ³ Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Culex quinquefasciatus Say is an important vector of several human pathogens, including agents of lymphatic filariasis and arboviruses such as West Nile virus. Samples of the *Cx. quinquefasciatus* were collected in nine cities in Brazil and in La Plata, Argentina for analysis of mitochondrial diversity, using *cox1* and *nd4* genes and infection by *Wolbachia pipiens*, amplifying *coxA* and *wsp* fragments. The sequence of bases of the mitochondrial genes had high A/T content and the fragment *nd4* had 100% of similarity among all samples tested. The gene *cox1* presented polymorphisms by four transitions, resulting in four haplotypes. This fragment has low genetic diversity between *Cx. quinquefasciatus* populations in Brazil and among members of the sub-group *pipiens* from other parts of the world. *Cox1* data show the presence of two maternal lineages of *Cx. quinquefasciatus* in Brazilian territory, being one of them grouped, around 31 and 33 °S. Testing of protein structure prediction indicated that three of the events detected in gene *cox1* are synonym mutations. Therefore trace, without detectable effects in the evolution of the gene. Samples of hybrid origin of Argentina did not present mitochondrial variation in relation to more inbred populations of *Cx. quinquefasciatus* from Northern and southeastern Brazil, suggesting that the use of mitochondrial DNA did not distinguish the taxa within *pipiens* subgroups. Testing for infection by *Wolbachia* showed that Argentinian and Brazilian samples are infected and contain a single bacterial strain. Data indicate that the low mitochondrial diversity might be related to mechanisms of environmental pressure and infection by *Wolbachia*. Since symbionts have influence on the cytoplasmic and reproductive events during mating in populations of *Cx. quinquefasciatus*.

Key words: mosquitoes, endosymbionts, *cox1*, *nd4*, *coxA*, *wsp*.

Culex quinquefasciatus has epidemiological importance because it is involved in transmission of microfilariae and arboviruses. In equatorial-tropical regions, the *Cx. quinquefasciatus* is reported as the primary vector of *Wuchereria bancrofti* parasite in the cycle of transmission of lymphatic filariasis (Vasuki et al. 2008, Regis et al. 1995). As well as mosquitoes present in urban areas of North America have been incriminated as primary vectors of West Nile virus (Reisen et al. 2004, Kwan et al. 2010).

The species *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) belongs *Culex pipiens* complex, and it is morphologically very similar to *Culex pipiens* L., another member of this complex. These mosquitoes proliferate in human settlements, being *Cx. quinquefasciatus* adapted to tropical and subtropical areas worldwide and *Cx. pipiens* to temperate areas (Barr 1957). In intermediate areas, these species, along with other variants, go through gene flow processes and introgression (Humeres et al. 1998, Cornel et al. 2003, McAbee et al. 2008).

In Brazil, *Cx. quinquefasciatus* has expansive distribution in tropical and equatorial areas, occurring in almost all cities of Brazilian territory (Regis et al. 1995, Forattini 2002, Morais et al. 2006). However, it is known the presence of hybrids between *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. pipiens* in Uruguay and Argentina central area, with *Cx. pipiens* occupying regions located in the South of Argentina (Almirón et al. 1995, Morais et al. 2010).

Studies with endosymbionts indicate that the *Wolbachia pipientis* rickettsies is associated with cytoplasmatic incompatibility in mosquitoes *Cx. pipiens* complex (Rasgon and Scott 2003, Rasgon et al. 2006). These studies show reduction in egg as a result of the mating between males infected with non-infected female. The progenies originated from mating between females infected with males infected or not infected are always fertile. As result, females infected have a reproductive advantage, allowing the expansion of infection in these populations (Sinkins 2004).

A recent study by Almeida (2007) encountered *Wolbachia* infecting all of *Cx. quinquefasciatus* tested samples from São Paulo City, Brazil, as well as a single bacterial strain. The constant intra and interspecific crosses, the velocity with which they occur, and the selection reproductive induced infection by *Wolbachia* seem to be the key factors for the decrease in diversity populations of *Culex* infected. The introduction of a small population of mosquitoes +/- to different strains of *Wolbachia* can reduce the diversity of mitochondrial DNA without modifying the default nuclear genome (Guillemaud et al. 1997).

Here, we analysed the pattern of mitochondrial diversity of *Cx. quinquefasciatus* populations from urban areas of Brazil and central Argentina (La Plata), using cytochrome c oxidase subunit I (*cox1*) and NADH dehydrogenase subunit 4 (*nd4*) genes and also the dispersal patterns by endosymbionts, performing tests to verify infection of *Wolbachia pipientis*, by analysis the gene fragments of the *Wolbachia* surface protein (*wsp*) and cytochrome c oxidase subunit I (*coxA*).

Material and Methods

Mosquitoes, morphological. Adults mosquitoes were collected by aspiration, according Nasci (1981), during February and March of 2008. Collections were made in the Brazilian municipalities of Teresina (5°S), Recife (8°S), Rio Branco (9°S), Paríquera-Açu (24°S), Pelotas (31°S), Chapeco (27°S), Pontes e Lacerda (15°), Santa Vitoria do Palmar (33°S) and Sao Paulo (23°S), and in the city of La Plata (34°S), Argentina (Fig. 1). Samples were stored dried in individual tubes with silica gel until processing. Twenty five to 35 adult mosquito samples of each locality were analyzed, being an equivalent number of males and

females, initially identified by external morphological characters, according to taxonomic keys by Forattini (2002).

DNA Extraction and amplification of mitochondrial genes. Genomic DNA was isolated from the individual mosquitoes using DNeasy® Blood & Tissue kits (Qiagen), following the manufacturer's recommendations. DNA was eluted in a final volume of 100µl and stored at -20°C until processing by polymerase chain reaction (PCR), using the primers UEA3 (Zhang and Hewltle 1996) and Fly10 (Lunt et al. 2007), with internal designs to amplify *coxI* gene, and ND4+ e ND4- (Gorrochotegui-Escalante et al. 2000) to *nd4* gene.

Polymerase chain reaction (PCR) were performed in a final volume of 50µl with 2mM Mg⁺⁺, 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 0.5mM of each primer, 0.2mM dNTP mix, 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen), and 5-10ng genomic DNA. The thermocycler program was configured for an initial denaturation step at 94°C 5min, followed by 35 cycles at 94°C 40s, 52°C 40s, and 72°C for 60s, final elongation step at 72°C 10min.

Amplification of *Wolbachia* genes (*wsp* and *coxA*). Using the same preparations of total DNA employed in the studies, mosquito samples of Teresina, RioBranco, Santa Vitoria and La Plata where checked for the presence of the endosymbiont *Wolbachia* using primers and PCR conditions described by Zhou et al. (1998) and Sanogo et al. (2007) for *wsp* gene. Following that, samples of *Wolbachia* from each of those mosquito populations were submitted to amplification of bacterial cytochrome c oxidase gene (*coxA*) aiming to detect any population/lineage polymorphism, using primers and PCR conditions described by Baldo et al. (2006).

DNA sequencing and sequence analyses. Amplified fragments was carried out using the BigDye™ Terminator 3.1 (Applied Biosystems), following the manufacturer's recommendations and direct sequencing by ABI prism ® 3100. The sequences were analyzed through application Chromas (Technelysium Pty), aligned with the program Clustalw2 (EBI) and edited through software Geneious Pro 4.5 (Biomatters) (Drummond et al. 2009) and BioEdit 7.0.9 (Ibis Biosciences).

Reading structural fragments was made using tools of ORF Finder (NCBI) and testing of protein structure prediction were developed initially through PSIPRED (Jones 1999 McGuffin et al. 2000), followed by query in the databases of InterPro (NCBI). Pairwise, similarity data and genetic distance were extracted from Geneious Pro 4.5. The dendrogram was built using the software MEGA 4.1 (Tamura et al. 2007). Statistical data, such as haplotypes diversity (HD) and nucleotides diversity per site (δ) were automatically tabulated in software DnaSP 5.0 (Librado and Rozas 2009).

Results

Gene *nd4*. Amplification of *nd4* gene produced fragments of about 321pb, and the sequence was deposited in GenBank under access number GQ255653. This fragment presented high A/T content (72.6%) and 100% identity among the samples.

Gene *cox1*. PCR for gene *cox1* produced fragments with 1260pb, being detected four different haplotypes, whose geographical distribution is shown in Figure 1. The sequences were deposited in GenBank, under accession numbers: GQ255650 (H1), GQ255651 (H2), GQ255649 (H3) and GQ255648 (H4).

The H1 showed the highest frequency in the total number of samples (76.6%), following by H2 (22.6%), H3 and H4 (0.4%). The alignment of the four haplotypes showed 99.7% of genetic identity among geographical samples. Genetic diversity at the *cox1* fragment was low, observed by the values of haplotype diversity ($H_d = 0.636$) and nucleotide diversity per site ($\pi = 0.00091$). H2 haplotypes are restricted to southern Brazil. The dendrogram (Fig. 2) constructed with these data presents two main clades, or geographic haplotypes. This framework suggests the presence of two genic lineages of *Cx. quinquefasciatus* in Brazil.

Fig. 1. Map with the locations of mosquito collection and distribution of four haplotypes of gene *cox1* in Brazil and in La Plata, Argentina.

Protein structure prediction. The analyses by prediction confirmed the proteins cytochrome c oxidase COX1 (1 EC1.9.3.1) and NADH4 (NADH dehydrogenase 4 EC1.6.5.3) as products of *cox1* and *nd4* fragments, respectively (Rasgon et al., 2006; Robich et al. 2007).

The analyses show that one of the events of transition (C-T) detected in *coxI* of a single sample of La Plata (H4) results in amino acid modification in the primary structure throughout the domain region. In pairwise, this modification on amino acid did not show identity with other COX1 enzymes. Other transitions (H1, H2, H3) did not produce change the primary structure of the protein. Pairwise testing with the enzyme COX1 by predicting resulted in 100% identity with species *Cx. pipiens* and *Cx. quinquefasciatus* around world, suggesting homology and functional domain conserved.

***Wolbachia* genes *wsp* and *coxA*.** The length of amplified fragments of *wsp* and *coxA* genes were respectively 504pb (61% A/T) and 478 bp (62,6% A/T), both of them partly covered the genes. Sequence of both were identical for samples Santa Vitoria, Teresina, Rio Branco e La Plata and were deposited in GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) under accession numbers HM563687 and HM563686. In comparison to the genome of *Wolbachia* available at GenBank website (accession #AM999887.1), sequence of the obtained *wsp* fragment was 100% similar to the homologous region of *wsp* gene of *Wolbachia* strain *WPip* endosymbiont of *Cx. quinquefasciatus*. Sequence of *coxA* was also 100% similar to the homologous region of cytochrome c oxidase subunit I of *WPip* strain.

Fig. 2. Dendrogram calculated using UPGMA method, showing the relationships among the four haplotypes of mitochondrial gene *coxI*. The numbers presented were obtained from 500 replications bootstrapped using the model of nucleotides maximum composite likelihood.

Discussion

Regarding the structure of the *coxI* gene, the variation data for the four haplotypes are incongruent with the results provided by *ace2* intron for *Cx. quinquefasciatus* and mosquitoes of hybrid origin with *Cx. pipiens* in Moraes et al. (2010). This suggests that the use of

mitochondrial DNA did not distinguish the taxa within *pipiens* subgroups. As nucleotide sequences of *cox1* gene present intra and interspecific polymorphisms, the use of this gene in taxonomic identification procedures must be done in conjunction with nuclear markers in order to avoid overestimation in diversity of *Cx quinquefasciatus-pipiens* populations. This is because that the *ace2* locus mutates more slowly than *cox1* gene (Hemmerter et al. 2009).

Considering only the samples Rio Branco, Teresina, Pariquera, Pelotas, Santa Vitoria do Palmar and La Plata, Morais et. al (2010) reported correlation between morphological and geographical distances, the genetic distances reported here did not followed those patterns. In fact, the low diversity observed for *cox1* locus does not allow one to perceive the populational structure once revealed for those samples.

H1 haplotype has wide distribution throughout the Brazilian tropical area and in La Plata, Argentina. In the search pairwise this haplotype has homology with *Cx. quinquefasciatus* of tropical areas in India (FN395201). The H2 forms a population group, with latitudinal location around 31 and 33 °S, Brazil. In sequences comparison the H2 presents 100% similarity with *cox1* fragments of *Cx. pipiens* (DQ360492) from Ohio (Robich et al. 2007), *Cx. pipiens* (FN395187) from Russia and *Cx. p. f. molestus* (FN395179) from Russia, *Cx. p. pallens* (FN395203) from Japan and *Cx. quinquefasciatus* (DQ181446) from Puerto Rico (Cook et al. 2006). In closed populations it seems likely that, a greater ancestral genic diversification eventually lead to in traits determined by few genes.

H2 is predominant and almost exclusive of southern Brazil. Arguably, populations bearing H2 are confined to that region and may be originated by founder effect. However population from La Plata is considered to be hybrid (Morais et al. 2010), it contains individuals which share genes *nd4* and *cox1* with *Cx. quinquefasciatus* from the other samples. Reproductive isolation is incomplete within *pipiens* complex and this may impair the taxonomical resolution generally provided by *cox1* barcode fragment.

In comparison tests, the differences of bases found in H3 and H4 are insufficiently to be related as intra-specific differences or having relationship with mosquitoes from other areas of the world. Singleton mutations are also found in *cox1* sequences by Cook et al. (2006) and reflect the variable character and polymorphic of this gene.

Predictions tests show that the four base substitution detected in *cox1* gene are events of transition. Three occur as synonym and two of these form population groups. Sites of transition and synonym substitutions in *cox1* also were found by Navajas et al. (1996) in other insects. According to those authors, changes in the composition of bases in mitochondrial genes occur most often through synonym transitions without detectable effects in the evolution of the gene. However, the analysis of the sequence of bases enables to find traces of divergence and dynamic of gene flow in biogeographically distinct populations.

The low diversity in mitochondrial genes, in *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. pipiens* populations is also reported by Guillemaud et al. (1997). Hasan et al. (2009) also found low diversity data (H_d 0.502; θ 0.0007) in the mitochondrial gene *cox2* in populations of *Cx. quinquefasciatus* from central area of Bangladesh, in Asia. Such scenario may be due to a recent common mitochondrial ancestor. As has been attributed to recent and rapid expansion of these species in a passive way related to human migration growth and successive occurrences of bottlenecks, caused mainly by chemical pressure in the control of the species in the urban environment (Fonseca et al. 2000).

Analysis of the two mitochondrial genes, showed population structure only when using *cox1*. Possibly, the rate of mutation in *nd4* gene was smaller than *cox1*, with no time to accumulate changes. The sequence of bases of the gene *nd4* for Brazilian *Cx. quinquefasciatus* populations is identical with sequences deposited by Rasgon et al. (2006) in North America (AY793688) and parts of Asia (AY793691), being distant from 5 to 6% of South African populations (AY793694). Possibly the low diversity has been driven by infection by *Wolbachia*, either through selection or genetic drift. Rasgon et al. (2006) suggested that the diversity in mitochondrial genes may be related to the infection by *Wolbachia*, because the American and Asian types are infected and have low diversity, and isolated population found in the South Africa are not infected and have higher mitochondrial variation.

Apparently all those *Culex* samples were infected by a single *Wolbachia* strain, since long fragments of its genes (*wsp* e *coxA*) were identical. This strain appears to be *WPip* owing to the high sequence similarity and to the fact of sharing the same hosts, *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. pipiens*. If all mosquito populations sampled here, despite being geographically scattered, actually share the same *Wolbachia* strain, it could be explained by host-endosymbiont specificity, as pointed out by Werren et al. (2008). The genetic homogeneity observed among *Wolbachia* samples might also be reflection of infection history, indicating that endosymbiosis is a recent event for these *Culex* populations sampled. Since the sequences obtained here are partial, we cannot completely discard the hypothesis of existence of any geographical polymorphism in *Wolbachia*.

Regarding the encounter aggregation of H2 lineage, this study must be extended to other regions of the mitochondrial genome, considering possible base substitution with functional changes in the protein produced. In this case, the protein function has been found could have relationship with the aggregation of lineage of *Cx. quinquefasciatus* in the southern Brazil by compensatory action or pressure mechanisms for positive selection.

References

- Almeida F 2008. Análise comparativa de *Culex quinquefasciatus* infectados e não infectados. M. S. thesis. University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.
- Almirón WR, Humeres SG, Gardenal CN 1995. Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 469-473.
- Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MCJ, Tettelin H, Werren JH 2006. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol* 72: 7098-7110.
- Barr AR 1957. The distribution of *Culex p. pipiens* and *C. p. quinquefasciatus* in North America. *Am J Trop Med Hyg* 6: 153-165.
- Cook S, Bennett SN, Holmes EC, De Chesse R, Moureau G, Lamballerie X 2006. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* 87: 735-748.
- Cornel AJ, McAbee RD, Rasgon J, Stanich MA, Scott TW, Coetzee M 2003. Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. *J Med Entomol* 40: 36-51.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A. 2009. Geneious v4.7. Available from <http://www.geneious.com>.
- Fonseca DM, Lapointe DA, Fleischer RC 2000. Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. *Mol Ecol* 9 (11): 1803 . 1814.
- Forattini OP 2002. *Culicidologia Médica*. EDUSP: São Paulo, 860pp. Gorrochotegui-Escalante N, Munoz ML, Fernandez-Salas I, Beaty BJ, Black IV WC 2000. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 62: 200-209.
- Guillemaud T, Pasteur N, Rousset F 1997. Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*. *Proc R Soc Lond* 264: 245-251.
- Hasan AU, Suguri S, Ahmed SM, Fujimoto C, Harada M, Rahman SM, Zaman RU, Kakehi Y 2009. Molecular phylogeography of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in central Bangladesh. *Acta Trop* 112:106-14.
- Hemmerter S, Slapeta J, Beebe NM 2009. Resolving genetic diversity in Australasian *Culex* mosquitoes: Incongruence between the mitochondrial cytochrome c oxidase I and nuclear acetylcholine esterase 2. *Mol Phylogenet Evol* 50: 317-325.
- Humeres SG, Almirón WR, Sabattini MS, Gardenal CN 1998. Estimation of genetic divergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 57-62.
- Jones DT 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 292: 195-202.
- Kwan JL, Kluh S, Madon MB, Reisen WK 2010. West Nile virus emergence and persistence in Los Angeles, California, 2003-2008. *Am J Trop Med Hyg* 83: 400-12.
- Librado P, Rozas J 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewlitt OM 2007. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 5: 153-65.
- McAbee RD, Green EN, Holean J, Christiansen J, Frye N, Dealey K, Mulligan III FS, Braut AC, Cornel AJ 2008. Identification of *Culex pipiens* complex mosquitoes in a hybrid zone of West Nile virus transmission in Fresno country, California. *Am J Trop Med Hyg* 78: 303-310.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16: 404-405.
- Morais SA, Marrelli MT, Natal D 2006. Aspectos da distribuição de *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) na região do rio Pinheiros, na cidade de São Paulo, estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Entomol* 50: 413-418.
- Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT 2010. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 672-676.
- Nasci RS 1981. A light weight battery powered aspirator for collecting resting mosquitoes in the field. *Mosq News* 41: 808-11.
- Navajas M, Fournier D, Lagnel J, Gutierrez J, Boursot P 1996. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. *Insect Mol Biol* 5: 281-285.

- Regis L, Silva-Filha MHN, Oliveira CMF, Rios EM, Silva SB, Furtado AF 1995. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 115-119.
- Reisen W, Lothrop H, Chiles R, Madon M, Cossen C, Woods L, Husted S, Kramer V, Edman J 2004. West Nile virus in California. *Emerg Infect Dis* 10:1369-78.
- Rasgon JL, Cornel AJ, Scott TW 2006. Evolutionary history of a mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proc R Soc B* 273: 1603-1611.
- Rasgon JL, Scott TW 2003. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics* 165: 2029-2038.
- Robich RM, Rinehart JP, Kitchen LJ, Denlinger DL 2007. Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization. *J Insect Physiol* 53: 235-245.
- Sanogo YO, Dobson SL, Bordenstein SR, Novak RJ 2007. Disruption of the *Wolbachia* surface protein gene *wspB* by a transposable element in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (Diptera, Culicidae). *Insect Mol Biol* 16: 143-154.
- Sinkins SP 2004. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34:723-729.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
- Vasuki V, Hoti SL, Patra KP 2008. RT-PCR assay for the detection of infective (L3) larvae of lymphatic filarial parasite, *Wuchereria bancrofti*, in vector mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Vector Borne Dis* 45: 207-216.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6: 741-751.
- Zhang DX, Hewltle GM 1996. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Mol Biol* 6: 143-50.
- Zhou W, Rousset F, O'Neill S 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B* 265: 509-515.