UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

Análise da estrutura populacional de mosquitos *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* e *Culex* (*Culex*) *nigripalpus* (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de microssatélites e morfometria geométrica alar.

Gabriela Cristina de Carvalho

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

Área de Concentração:
Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

São Paulo

2017

Análise da estrutura populacional de mosquitos *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* e *Culex* (*Culex*) *nigripalpus* (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de microssatélites e morfometria geométrica alar.

Gabriela Cristina de Carvalho

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

Área de Concentração:
Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Biblioteca/CIR: Centro de Informação e Referência em Saúde Pública
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Carvalho, Gabriela Cristina de
- Análise da estrutura populacional de mosquitos *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* e *Culex* (*Culex*) *nigripalpus* (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de microssatélites e morfometria geométrica alar. / Gabriela Cristina de Carvalho; orientador Dr. Mauro Toledo Marrelli. -- São Paulo, 2017.
130 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2017.

1. Estruturação populacional. 2. Marcadores de Microssatélites. 3. Morfometria geométrica alar. 4. *Cx. quinquefasciatus*. 5. *Cx. nigripalpus*. I. Marrelli, Dr. Mauro Toledo, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sandra e Wagner.

E ao meu parceiro na vida, Leandro.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2013/18965-2) pelo financiamento desse projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli, por toda a orientação, amizade e confiança durante os sete anos de convivência no laboratório.

Agradeço também ao Dr. André Barreto Bruno Wilke, pelas contribuições para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço enormemente a contribuição da senhora Kátia e do senhor Wagner, ambos funcionários do Centro de Genoma Humano e Célula Tronco, (IB-USP) por todo suporte dado aos sequenciamentos desse trabalho.

Aos doutores Eunice A. B. Galati, Fábio de Almeida, Paulo Eduardo M. Ribolla e Tamara N. Lima Camara, por aceitarem a participar da minha defesa de doutorado e por todas as contribuições na pré-banca. Agradeço também o Dr. Lincoln Suesdek e a Dra. Bruna Demari Silva, pelas recomendações na fase de qualificação desse projeto.

Aos meus grandes amigos de laboratório, “os meninos”, que fizeram e fazem parte de muitos momentos bons da minha vida, seja dentro do laboratório ou fora dele. Em especial, ao Antônio (Tuni!), Daniel e Ramon, um “super” obrigada por tudo a todo momento!

Aos queridos amigos Walter, Amanda, Edu, Karol, Denise, Natasha e Rafa, por todo o convívio e momentos de alegria.

Aqui ressalto, o meu obrigada e amor incondicional à minha família: Pai, mãe e meu irmão Anderson, por toda a compreensão, paciência e incentivo, pois sem vocês, nada disso seria possível.

E por fim, mas não menos importante, ao Leandro Ucela Alves, meu amor, que me acompanha na vida acadêmica desde a época da iniciação científica. Obrigada por toda atenção, carinho, paciência, incentivo e amor.

Deixo aqui o meu sincero muito obrigada a todos!

EPÍGRAFE

“Nada na biologia faz sentido exceto à luz da Evolução”.

Theodosius Dobzhansky.

RESUMO

Carvalho, GC. Análise da estrutura populacional de mosquitos *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de microssatélites e análise de morfometria geométrica alar. (Tese). São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2017.

Introdução: Parques inseridos na malha urbana de grandes metrópoles possuem potencial para manter o ciclo biológico de diversas espécies vetoras de patógenos, como as espécies *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus*. Consideradas antropofílicas, essas espécies têm importância epidemiológica e são abundantemente encontradas na cidade de São Paulo. Porém, pouco se sabe sobre as características genéticas dessas espécies em escala microgeográfica. Visando o melhor entendimento sobre a estrutura populacional dessas espécies, foi analisado os padrões da forma alar e a caracterização genética por marcadores de microssatélites, afim de se obter informações que contribuam para o entendimento da situação populacional desses vetores dentro do município. **Objetivos:** (1) Analisar a variabilidade da forma alar nas populações de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*; (2) Analisar a variabilidade genética e o fluxo gênico nas mesmas populações; (3) Testar a funcionabilidade de *primers* desenvolvidos para regiões de microssatélites nas populações de *Cx. nigripalpus*. **Material e Métodos:** No total, foram estudadas cinco populações de *Cx. quinquefasciatus* e sete populações de *Cx. nigripalpus*, coletados em parques urbanos da cidade de São Paulo. Análises discriminantes, como variável canônica, teste de reclassificação cruzada e dendrograma de *Neighbor-joining*, utilizando os *software* Morpho J e Past, foram realizadas para a compreensão do formato e tamanho da asa direita nas populações. Em relação ao estudo da estruturação genética, foram testados 12 pares de *primers* de microssatélites em mosquitos *Cx. quinquefasciatus* e 33 pares de *primers* em mosquitos *Cx. nigripalpus*. **Resultados:** Análise da morfometria geométrica alar nas populações de *Cx. quinquefasciatus* demonstrou homogeneidade nos formatos alares, sendo um carácter preservado nessa espécie pela cidade, contudo, há tênues diferenças na população coletada em ambiente mais silvestre. O mesmo foi observado para as populações de *Cx. nigripalpus*, onde foi possível visualizar uma subestruturação na forma alar dentro da população Shangrilá. Dos *primers* testados, 12 amplificaram de forma consistente em todas as populações de *Cx. quinquefasciatus* e seis *primers* nas populações de *Cx. nigripalpus*. Os resultados encontrados sugerem que ambas as espécies possuem baixa estruturação genética, com fluxo gênico moderado entre as populações de *Cx. quinquefasciatus* e baixo entre as de *Cx. nigripalpus*, apresentando alto índice de heterozigosidade, onde as únicas populações que estão em expansão são as que foram coletadas em ambientes onde a urbanização está avançando. **Discussão:** Processos de urbanização, somados às mudanças causadas no ambiente, beneficiam e tendem a elevar a abundância dessas espécies em

ambientes antropizados. A baixa estruturação genética e morfométrica das asas dessas espécies indicam a adaptação delas na cidade, havendo segregação devido à heterogeneidade do ambiente em que as populações se encontram. **Conclusão:** Evidências de baixa estruturação entre as populações e indícios de expansão em populações de ambientes mais silvestres indicam que essas espécies estão atreladas ao processo de urbanização da cidade de São Paulo.

Descritores: Marcadores, *Culex*, urbanização, forma alar, estruturação populacional.

ABSTRACT

Carvalho, GC. Analysis of the population structure of *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes using microsatellite markers and morphometric geometric analysis of the wing. (Thesis). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2017.

Introduction: Urban parks have the potential to harbor and maintain the life cycle of several mosquitoes such as *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus*, both are anthropophilic species with epidemiological importance and very abundant in São Paulo city. However, their genetics characteristics are poorly know. Aiming the better understanding of the population structure of these species in microregion, was evaluated the wing shape variation and selected microsatellite *loci*. In this way, the information obtained can contribute to the understanding of the population situation of these vectors in São Paulo city. **Objectives:** (1) To evaluate the wing shape variability in populations of *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus*; (2) To evaluate the genetic variability and gene flow in the *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. nigripalpus* populations (3) Test microsatellite markers functionality parameters in *Cx. nigripalpus*, previously used successfully in other *Culex* species. **Material and Methods:** Were studied, five populations of *Cx. quinquefasciatus* and seven population of *Cx. nigripalpus* collected in urban parks in São Paulo city. Discriminant analysis was made to evaluate the wing shape patterns, such as Canonical variate analysis, cross validated test and Neighbor-joining dendrogram using Morpho J and Past softwares, were performed to understand the size and shape of the right wing in these populations. For the study of genetic structuring, there were tested 12 pairs of microsatellite *loci* in *Cx. quinquefasciatus* samples and 33 pairs of microsatellite *loci* in *Cx. nigripalpus* samples. **Results:** The wing shape patterns in *Cx. quinquefasciatus* population were homogeneous, showing a preserved character in this population, however, has been tenuous differences in the more sylvatic population. The same pattern was observed in *Cx. nigripalpus* populations and was observed substructuring in the Shangrilá population. From the tested primers, 12 were functional and amplified consistently in the all five *Cx. quinquefasciatus* population and for *Cx. nigripalpus*, six primers were amplified. The results suggest both species having low genetic structure, moderate gene flow and the only populations which are expanding were collected in areas that the urbanization is increasing. **Discussion:** Urbanization processes added to the environmental changes benefit and tend to raise the abundance of these species in anthropized locals. The low genetic structure and alar morphometry indicates the adaptation of these species in São Paulo city, there being segregated due to the environment heterogeneity which the population inhabit. **Conclusion:** Evidence of low structure between populations studied and signs of expansion in populations of more sylvatic environments indicate that these species are linked to urbanization process.

Descriptors: Markers, *Culex*, urbanization, wing shape, structure population.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar da espécie <i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i>	18
Figura 2. Exemplar da espécie <i>Culex (Culex) nigripalpus</i>	19
Figura 3. Município de São Paulo com a localização dos parques municipais estudados	34
Figura 4. A. Asa direita digitalizada ilustrando os 18 pontos anatômicos	37
4. B. Conformação alar obtida com os 18 pontos anatômicos	
Figura 5. Gráfico de <i>box-plot</i> para tamanho do centróide das cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	46
Figura 6. Correlação linear entre a distância de Mahalanobis e distância geográfica dos parques para as cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	48
Figura 7. Distribuição no morfoespaço das duas principais variáveis canônicas das cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	49
Figura 8. Dendrograma de <i>Neighbor-Joining</i> das cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	50
Figura 9. Gráfico de <i>box-plot</i> para o tamanho do centróide das sete populações de <i>Culex nigripalpus</i>	52
Figura 10. Correlação linear entre distância de Mahalanobis e distância geográfica dos parques para as sete populações de <i>Culex nigripalpus</i>	53
Figura 11. A. Distribuição no morfoespaço das duas principais variáveis canônicas das sete populações de <i>Culex nigripalpus</i>	54
11. B. Distribuição no morfoespaço das duas principais variáveis canônicas das populações de <i>Culex nigripalpus</i> , ressaltando os dois subgrupos da população SHA	
Figura 12. A-F. Análise da função discriminante das seis populações de <i>Culex nigripalpus</i> comparadas com a forma alar do subgrupo SHA 1	56
Figura 13 A-F. Análise da função discriminante das seis populações de <i>Culex nigripalpus</i> comparadas com a forma alar do subgrupo SHA 2	59
Figura 14. Análise da função discriminante das asas da população SHA	61
Figura 15. Dendrograma de <i>Neighbor-Joining</i> das sete populações de <i>Culex nigripalpus</i>	62
Figura 16. Dendrograma de UPGMA com valores de distância genética de Cavalli- Sforza & Edwards para as cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	70
Figura 17. Gráfico ΔK com o melhor número de grupos genéticos para as cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	71
Figura 18. Análise Bayesiana para as cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	72
Figura 19. Dendrograma de UPGMA com valores de distância genética de Cavalli- Sforza & Edwards para as cinco populações de <i>Culex nigripalpus</i>	78
Figura 20. Gráfico ΔK com o melhor número de grupos genéticos para as cinco populações de <i>Culex nigripalpus</i>	79
Figura 21. Análise Bayesiana para as cinco populações de <i>Culex nigripalpus</i>	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Populações, coordenadas geográficas dos parques, <i>n</i> amostral das espécies de <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Culex nigripalpus</i>	33
Tabela 2. <i>Loci</i> de microssatélites testados nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Culex nigripalpus</i>	41
Tabela 3. Teste ANOVA para comparação das médias do tamanho do centróide das cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	47
Tabela 4. Valor da distância de Mahalanobis para as cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	50
Tabela 5. Valor do teste de reclassificação de validação cruzada (%) para as cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	51
Tabela 6. Teste ANOVA para comparação das médias do tamanho do centróide das sete populações de <i>Culex nigripalpus</i>	52
Tabela 7. Valor da distância de Mahalanobis para as sete populações de <i>Culex nigripalpus</i>	63
Tabela 8. Valor do teste de reclassificação de validação cruzada (%) para as sete populações de <i>Culex nigripalpus</i>	64
Tabela 9. <i>Loci</i> de microssatélite amplificados nas cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	64
Tabela 10. Heterozigosidade observada, Heterozigosidade esperada, Coeficiente de endogamia e desvios de Hardy-Weinberg para as cinco populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	66
Tabela 11. Probabilidade de alelos nulos por população de <i>Culex quinquefasciatus</i>	68
Tabela 12. Riqueza alélica para as populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	68
Tabela 13. Valores de heterogeneidade genética (<i>F_{st}</i>) para as populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	69
Tabela 14. Número de <i>loci</i> exibindo excesso de heterozigosidade e heterozigosidade esperada por números de alelos observados sob modelo SMM	72
Tabela 15. <i>Loci</i> de microssatélites nas populações de <i>Culex nigripalpus</i>	73
Tabela 16. Heterozigosidade observada, Heterozigosidade esperada, Coeficiente de endogamia e desvios de Hardy-Weinberg para as sete populações de <i>Culex nigripalpus</i>	74
Tabela 17. Probabilidade de alelos nulos por população de <i>Culex nigripalpus</i>	76
Tabela 18. Riqueza alélica para as populações de <i>Culex nigripalpus</i>	76
Tabela 19. . Valores de heterogeneidade genética (<i>F_{st}</i>) para as populações de <i>Culex nigripalpus</i>	77
Tabela 20. Número de <i>loci</i> exibindo excesso de heterozigosidade e heterozigosidade esperada por números de alelos observados sob modelo SMM	81

LISTA DE ABREVIações

WNV	Vírus do Nilo Ocidental
SLV	Vírus da Encefalite de <i>Saint Louis</i>
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
DENV	Vírus da Dengue
EEL	Encefalite Equina do Leste
EEO	Encefalite Equina do Oeste
EEV	Encefalite Equina Venezuelana
FNO	Febre do Nilo Ocidental
ESL	Encefalite de <i>Saint Louis</i>
ITS2	Segundo Espaçador Transcrito interno
COI	Citocromo Oxidase Subunidade 1
mtCytb	Citocromo b
SSRs	Sequências Simples Repetidas
DNA	Ácido Dexorribonucléico
<i>Fst</i>	Heterogeneidade genética
<i>Fis</i>	Coeficiente de endogamia
EHW	Equilíbrio de Hardy- Weinberg
CRAS	Centro de Reabilitação para Animais Silvestres
LESP	Laboratório de Entomologia em Saúde Pública
IB	Instituto de Biociências
FSP	Faculdade de Saúde Pública
USP	Universidade de São Paulo
TC	Tamanho do Centróide
AVC	Análise de Variável Canônica
NJ	<i>Neighbor- Joining</i>
KM	Quilômetros
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Ho	Heterozigosidade observada
He	Heterozigosidade esperada
DL	Desequilíbrio de Ligação
UPGMA	<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
Heq	Heterozigosidade esperada baseada na frequência alélica
ANH	População Anhanguera
ALV	População Alfredo Volpi
BMX	População Burle Marx
IBR	População Ibirapuera
PIQ	População Piqueri
PRV	População Previdência
SDS	População Santo Dias
SHA	População Shangrilá
VC	Variável Canônica
Na	Riqueza alélica
Np	Riqueza de alelo privado
SMM	<i>Stepwise Mutation Model</i>

ÍNDICE

1. Introdução	
1.1 Família Culicidae	13
1.2 Importância epidemiológica do gênero <i>Culex</i>	14
1.2.1 <i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i> (Say, 1823)	17
1.2.2 <i>Culex (Culex) nigripalpus</i> (Theobald, 1901)	18
1.3 Culicídeos e a urbanização	19
1.4 Parques urbanos	20
1.5 Microevolução em culicídeos	22
1.5.1 Morfometria geométrica alar	23
1.5.2 Marcadores de microssatélites	24
2. Objetivos	
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Material e Métodos	
3.1 Populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Culex nigripalpus</i> e área de estudo	29
3.1.1 Parque Alfredo Volpi	29
3.1.2 Parque Anhanguera	30
3.1.3 Parque Burle Marx	30
3.1.4 Parque Ibirapuera	31
3.1.5 Parque Piqueri	31
3.1.6 Parque Previdência	31
3.1.7 Parque Santo Dias	32
3.1.8 Parque Shangrilá	32
3.2 Coleta dos espécimes	35
3.3 Identificação das espécies	36
3.4 Confeção de lâminas das asas	36
3.5 Análises morfométricas	37
3.6 Extração de DNA e reações de PCR	39
3.7 Identificação dos alelos pelo sequenciador automático	42
3.8 Análise estatística	43
4 Resultados	
4.1 Morfometria geométrica alar das populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	45
4.1.1 Tamanho das asas nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	45
4.1.2 Forma alar nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	48
4.2 Morfometria geométrica alar das populações de <i>Culex nigripalpus</i>	51
4.2.1 Tamanho para as asas nas populações de <i>Culex nigripalpus</i>	51
4.2.2 Forma alar nas populações de <i>Culex nigripalpus</i>	53
4.3 Análises de marcadores microssatélites nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i>	64
4.4 Análises de marcadores microssatélites nas populações de <i>Culex nigripalpus</i>	73
5 Discussão	82
6 Conclusões	99
Referências	100
Anexos	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família Culicidae

Os mosquitos pertencem à ordem Diptera, família Culicidae (Meigen, 1818), e constituem um grupo abundante na natureza, com 3.554 espécies descritas distribuídas em duas subfamílias: Anophelinae, com três gêneros, e Culicinae, com 109 gêneros divididos em 11 tribos. As espécies de culicídeos podem ser encontradas em quase todas as regiões do globo terrestre, com exceção das regiões congeladas permanentemente ¹.

Os culicídeos são insetos holometábolos, com as formas imaturas aquáticas e as formas adultas terrestres. O ciclo de vida compreende o ovo, quatro estádios larvais, a pupa e o adulto alado. Com exceção do gênero *Toxorhynchites*, as fêmeas são hematófagas e se alimentam do sangue de vertebrados, o que é essencial para o desenvolvimento de seus ovos. Em algumas situações, a hematofagia permite a transmissão de patógenos entre os hospedeiros. Destes, se destacam diversos vírus (arbovírus), filárias (nematóides) e protozoários ^{2,3}.

Algumas espécies dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* são responsáveis pela transmissão dos patógenos causadores de malária, dengue e febre do Nilo Ocidental, respectivamente. Para o homem, tais doenças em conjunto, afetam mais de três bilhões de pessoas ao redor do mundo e representam mais de três milhões de mortes anuais ³⁻⁶. Segundo Harbach (2007)⁷, algumas espécies desses gêneros de mosquitos são indiretamente responsáveis por mais casos de morbidade e mortalidade entre humanos do que qualquer outro grupo de organismos.

1.2 Importância epidemiológica do gênero *Culex*

O gênero *Culex* foi descrito por Linnaeus em 1758, sendo o gênero que possui a maior diversidade de espécies entre os culicídeos (cerca de 300 espécies descritas) ¹. Representantes desse gênero podem ocupar diversos nichos ecológicos e colonizar criadouros naturais e artificiais, onde depositam seus ovos em forma de jangada diretamente sobre a superfície aquática, a qual pode variar desde de limpa até rica em matéria orgânica ^{2,3}. Diversas espécies do gênero *Culex* são consideradas vetoras de nematóides e de diversos arbovírus que causam filarioses e encefalites, tanto em humanos quanto em outros vertebrados ⁸⁻¹⁵, ressaltando, assim, a importância epidemiológica desse gênero.

Dentre as arboviroses que acometem a saúde humana no século XXI, destaca-se o vírus do Nilo Ocidental (WNV), responsável por ocasionar encefalites em aves, humanos e equinos. Esse vírus é transmitido por mosquitos vetores do gênero *Culex*, sendo as aves um reservatório natural que mantêm um ciclo zoonótico (mosquito-ave-mosquito). O WNV possui distribuição global, sendo encontrado nos continentes africano, asiático, europeu, americano e na Oceania, e foi responsável por epidemias na Rússia, Romênia e Israel, entre as décadas de 50 e 70 ¹⁶.

Em 1999, o WNV foi isolado pela primeira vez no continente da América do Norte, durante uma epidemia de meningoencefalite na cidade de Nova Iorque (EUA) e, atualmente, é a principal doença viral transmitida por mosquitos nesse continente ¹⁷⁻²⁰. No Brasil, no ano de 2009, foram registradas pela primeira vez evidências sorológicas do WNV em cavalos na região do Pantanal no Estado do Mato Grosso do Sul ²¹ e, em anos subsequentes, houve

registros da dispersão do WNV para outras regiões brasileiras. O primeiro registro de caso humano documentado ocorreu no Estado do Piauí, em 2015^{13,22,23}.

Outro arbovírus transmitido por mosquitos do gênero *Culex* que tem importância em Saúde Pública é o vírus da Encefalite de Saint Louis (SLV), que é amplamente distribuído nas Américas (do Canadá à Argentina), e pertence ao Complexo da encefalite japonesa (JEV), também transmitido por mosquitos *Culex*. Os reservatórios deste vírus incluem, principalmente, aves silvestres, primatas e marsupiais²⁴. A doença causada pelo SLV pode variar de sintomas leves (febre e dor de cabeça) a graves (meningite e encefalite), sendo que a maioria dos casos fatais ocorre entre a população idosa²⁵.

O primeiro isolamento do SLV no Brasil ocorreu em 1960, a partir de dois pacientes que apresentaram febre e icterícia, sem envolvimento neurológico. Alguns casos de encefalites causadas por SLV ocorreram simultaneamente ao surto de dengue na cidade de São José do Rio Preto (SP) na década de 2000, onde alguns pacientes acometidos por SLV apresentaram manifestações hemorrágicas e, posteriormente ao surto, foi observado um caso raro de coinfeção de dengue (sorotipo DENV-3) e SLV^{24,26}.

Entre outros arbovírus que podem ser transmitidos por vetores do gênero *Culex*, destacam-se os agentes das Encefalites Equinas do Leste (EEL), Encefalites Equinas do Oeste (EEO) e Encefalites Equina Venezuelana (EEV), todas consideradas zoonoses, sendo o humano um hospedeiro acidental²⁷⁻³⁰. Além disso, estudos comprovaram a atuação desta espécie de mosquito como vetora secundária do vírus Oropouche^{14,24,31}.

Entre outras enfermidades relacionadas à transmissão por mosquitos do gênero *Culex*, destaca-se a dirofilariose, que possui como agente etiológico a microfilária *Dirofilaria immitans*, parasita de cães e outros mamíferos, com o homem sendo o seu hospedeiro terminal ³²⁻³⁵. Os vetores desta microfilária são mosquitos adaptados aos centros urbanos, que se alimentam do sangue de cães infectados e têm competência e longevidade para o desenvolvimento do agente até a fase infectiva, momento que é capaz de transmiti-lo ao homem por meio de um novo repasto sanguíneo ³⁶. Dentre os culicídeos mais relatados em ciclos enzoóticos de dirofilariose estão *Culex (Culex) nigripalpus*, *Culex (Culex) declarator* e *Cx. quinquefasciatus*, além de espécies do gênero *Aedes* ^{33,35,37}.

Outra enfermidade com importância em Saúde Pública é a bancroftose americana (popularmente conhecida como elefantíase) que possui como agente etiológico helmintos da espécie *Wuchereria bancrofti*. O mosquito *Cx. quinquefasciatus* é considerado o vetor primário no ciclo de transmissão e veiculação deste helminto, devido à elevada antropofilia, domiciliação e hábitos noturnos, que coincidem com a filaremia do patógeno ^{8 3,36}.

Da perspectiva em Saúde Pública, entre as espécies do gênero *Culex*, destacam-se os mosquitos *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*, devido as consequências epidemiológicas que esses vetores oferecem e por apresentarem ampla distribuição no território nacional, principalmente em grandes centros urbanos ^{11,38,39}.

1.2.1 *Culex (Culex) quinquefasciatus* (Say, 1823)

Os adultos desta espécie possuem tarsos escuros, coloração do tegumento marrom, densamente recoberto de escamas amarelas/douradas e o occipício com escamas eretas forquilhadas esbranquiçadas. As formas imaturas possuem a superfície do corpo glabra e sifão alongado (de quatro a cinco vezes o valor da largura basal) ^{2,3} (Figura 1).

O mosquito *Cx. quinquefasciatus* é uma espécie cosmopolita, ocorrendo nas porções meridionais da Ásia, da África, das Américas (do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina) e da Oceania. Ocorre em todo o Brasil, mas com distribuição e abundância fortemente influenciadas pela presença do homem, caracterizando-se como uma espécie com alto grau de sinantropia ^{38,40}. Seus criadouros são predominantemente depósitos artificiais, localizados no solo ou em recipientes com água rica em matéria orgânica em decomposição e detritos. Podem sobreviver em coleções hídricas altamente comprometidas com dejetos domésticos e industriais, habitando locais onde predadores naturais estão ausentes, como o caso de rios em grandes centros urbanos ^{41,42}. Esta espécie de mosquito é endofílica, sendo as fêmeas consideradas antropofílicas e com tendências à ornitofilia, embora já tenham sido relatados outros hospedeiros como fonte de alimentação ³⁶. Tais características, justificam a incriminação do *Cx. quinquefasciatus* como o vetor primário dos agentes da malária aviária, de filarioses, além de estar implicado na veiculação de diversas arboviroses, como FNO, EEO, EEL, EEV e ESL ^{2,19,42,43}.

Figura 1: Exemplar da espécie *Culex (Culex) quinquefasciatus*.

Fonte: J. Stoffer, WRBU (http://www.wrbu.org/mqID/mq_medspc/AD/CXqui_hab.html, 2017).

1.2.2 *Culex (Culex) nigripalpus* (Theobald, 1901)

Os adultos desta espécie possuem patas escuras, tarsos sem marcação clara, escudo marrom coberto de escamas escuras e occipício recobertos de escamas escurecidas ^{2,3} (Figura 2).

A espécie ocupa grande parte da América tropical (do sul do Estados Unidos ao Paraguai) e utiliza como criadouros coleções de água no solo, principalmente as de caráter natural e permanente (charcos, alagados, poças de água, rios, canais e lagos), além de diversos tipos de criadouros artificiais ⁴⁴, fato que vem contribuindo no aumento da abundância dessa espécie em regiões antropizadas ^{10,38,39}. A espécie é exófila, com padrões de hematofagia crepuscular-vespertino, e ornitófila, porém humanos e outros mamíferos podem servir de hospedeiros ^{36,44}. O *Cx. nigripalpus* é vetor de muitos agentes causadores de arboviroses como ESL, EEO, EEL e pode ser infectado com vírus Mucambo, entre outros ^{12,43,45,46}.

Figura 2: Exemplar da espécie *Culex (Culex) nigripalpus*.

Fonte: J. Stoffer, WRBU (http://wrbu.si.edu/mqID/mq_medspc/AD/CXnpp_hab.html, 2017).

1.3 Culicídeos e a urbanização

Nas últimas décadas, o Brasil vem apresentando alterações no espectro de doenças, reduzindo endemias rurais e aumentando a frequência de agravos à saúde nas sociedades modernas, como consequência da alta migração de populações do ambiente rural para aglomerados urbanos ⁴⁷. A crescente urbanização devido à expansão das cidades, geralmente com sérios problemas de planejamento e saneamento, tem contribuído para a domiciliação de insetos, o que demonstra o caráter eclético da maior parte dos artrópodes. A capacidade de certas espécies de mosquitos habitarem ambientes antropizados está associada a dois fatores: disponibilidade de criadouros e de fontes de hospedeiros para realização da hematofagia ^{48,49}. Os mosquitos adaptados ao ambiente urbano podem se dispersar, tornando-se pragas que, além de provocarem incômodo, podem transmitir diversos patógenos causadores de doenças ¹¹.

Chaves et. al., (2012) ⁵⁰ elucidaram as duas principais variáveis que podem explicar a dinâmica populacional dos culicídeos: as variáveis exógenas, as quais estão relacionadas a fatores ambientais/climáticos, como temperatura e pluviosidade; e as variáveis endógenas, que estão relacionadas às

características da espécie, como flutuação no tamanho populacional. Dessa forma, ações realizadas pelo homem podem gerar desequilíbrios no ambiente, favorecendo a expansão e colonização de habitats por determinadas espécies e diminuir a riqueza geral de espécies em determinado local. Estes impactos ecológicos influenciam diretamente a transmissão de patógenos por mosquitos: como exemplo, temos a associação entre as mudanças climáticas, o aumento de incidência de casos de dengue e o aumento da população de *Aedes aegypti* em ambiente urbano ^{51,52}.

1.4 Parques urbanos

No Brasil, a criação de parques urbanos teve como objetivo atender às necessidades da elite emergente brasileira, a qual buscou referências urbanas em cidades internacionais, como Londres e Paris, para a construção desses locais ^{53,54}. O surgimento de parques urbanos em São Paulo pode ser caracterizado em três períodos:

O primeiro momento está associado ao início do século XX, com a transformação do comércio local devido a expansão da fase cafeeira, onde os parques foram projetados como locais de cultura e ponto de encontro para a elite paulistana, exemplos de parques criados sob essa perspectiva foram os parques Jardim Luz e Ibirapuera ⁵⁵.

O segundo momento remete-se ao período onde a cidade de São Paulo já se configurava como uma metrópole, sendo os parques criados a partir de remanescentes de grandes fazendas, como o caso do parque do Carmo e Piqueri ⁵⁵.

O terceiro e último momento começou por volta da década de 70 e transcorre até os dias atuais. Agrega a real necessidade da criação de novas áreas (principalmente nas periferias), com a finalidade de melhorar a qualidade de vida da população. Atualmente, o poder público investe na criação de parques chamados Lineares (que são considerados parques com pequena extensão de área), no intuito de criar espaços recreativos e evitar problemas com o escoamento de água de chuva ^{55,56}.

A cidade de São Paulo está inserida na região de Mata Atlântica, um bioma considerado altamente diverso e com alto grau de endemismo, sendo inserido como um dos 34 “*hotspots*” de biodiversidade do planeta, com vasta importância ecológica, porém, é considerado um dos ecossistemas mais devastados e ameaçados ⁵⁷⁻⁵⁹.

Atualmente, a cidade de São Paulo possui uma população estimada em 12 milhões de habitantes vivendo em área densamente urbanizada e mal planejada ⁶⁰. Nesse contexto, os parques são destinados ao lazer e entretenimento da sociedade, à preservação de resquícios da flora original, além de servir como abrigo à fauna silvestre ⁵⁶. No entanto, os parques proporcionam condições para o desenvolvimento e aumento da abundância de algumas espécies de mosquitos adaptadas ao ambiente urbano, como é o caso das espécies de *Ae. aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes scapularis*, *Aedes fluviatilis*, *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*, que possuem importância médica por serem vetoras ou potenciais vetoras de diversos patógenos ^{10,40,61}.

Como exemplo da importância epidemiológica dos parques urbanos, no Parque Ecológico do Tietê, foi isolado o arbovírus Ilhéus em mosquitos do gênero *Culex* ⁶². Sendo um local que abriga diversas espécies de mosquitos e

de animais da fauna brasileira, a constante presença da população humana o torna um local potencial para veiculação e manutenção de arboviroses na cidade ⁶².

1.5 Microevolução em culicídeos

O fenômeno de microevolução pode ser entendido como o conjunto de alterações evolutivas ocorridas em níveis taxonômicos intra-específicos, como em populações. Devido aos fatores incidentes na dinâmica populacional, os processos microevolutivos podem surgir como variações alélicas (substituições nucleotídicas de inserções e deleções ou “*indels*”) e, mais raramente, como rearranjos cromossômicos. Com o passar do tempo, somado à influência do fluxo gênico, esses processos podem gerar diferenças ou convergências nos padrões das populações ^{63,64}.

Como já mencionado, muitos fatores endógenos e exógenos podem influenciar no ciclo de vida das espécies de culicídeos, modulando a dinâmica populacional ⁵⁰. A capacidade de rápida reprodução e prole em número grande, somadas a fatores ambientais, frequentemente resultam em rápida evolução de suas populações. Como é o exemplo da espécie *Cx. quinquefasciatus* e a evolução de sua resistência a inseticidas em um pequeno período de tempo ⁶⁵. Outro ponto importante na evolução de populações de mosquitos é a diferenciação de populações geograficamente isoladas a ponto de constituir barreiras ao intenso fluxo gênico ⁶⁶.

Para estudar microevolução, é necessário caracterizar as populações em relação aos padrões genéticos, morfológicos e comportamentais ao longo de determinadas áreas geográficas. Sendo que, estudos temporais podem

acrescentar informações valiosas por permitir a observação em tempo real dos processos microevolutivos ⁶⁷⁻⁷⁰.

Na última década, a combinação de genética populacional e morfometria corporal tem sido cada vez mais utilizada na Entomologia Médica, como, por exemplo, na descrição da reinfestação de vetores de patógenos da doença de Chagas após uso de inseticidas em vilarejos e na descrição da diferenciação populacional de diversas espécies com importância epidemiológica ⁷⁰⁻⁷⁴

1.5.1 Morfometria geométrica alar

Análises morfométricas têm como objetivo descrever e analisar variações nas dimensões de determinada estrutura corpórea, as quais são imperceptíveis à observação direta ⁷⁵. De forma geral, é uma ferramenta que estuda forma e tamanho e como essas duas variáveis se relacionam ⁷⁶.

No início dos anos 90, surgiu a morfometria geométrica, diferenciando – se da chamada morfometria tradicional, por abranger técnicas que visam a descrição e representação da geometria da forma estudada. Enquanto nas abordagens tradicionais a variação da forma é estudada por meio de covariação entre pares de medidas lineares, a morfometria geométrica é capaz de descrever e localizar mais claramente as regiões de mudanças na forma e de construir e reconstituir graficamente tais diferenças, estabelecendo pontos anatômicos de referência, os quais geram coordenadas cartesianas, possuindo alto poder de resolução e mais robustez estatística ⁷⁶.

Geralmente, utiliza-se as asas dos insetos nas análises de morfometria geométrica, por se tratar de ser uma estrutura bidimensional (o que reduz erros de digitalização), e possuir características herdáveis que podem ser

importantes no mecanismo adaptativo e evolutivo da espécie ⁷¹. Dujardin (2008) ⁷¹ salienta que a melhor compreensão da variação fenotípica pode contribuir para o melhor entendimento das características biológicas de insetos com importância em Saúde Pública, devido ao fato que insetos vetores de patógenos estão frequentemente submetidos a vários tipos de pressões seletivas, como infecção por patógenos, mudanças ambientais e paisagísticas, uso de inseticidas, entre outros.

Há diversos estudos empregando morfometria geométrica para mosquitos de importância médica tanto para estudos microevolutivos quanto para distinção de complexos de espécies crípticas, como mostram estudos de microevolução em populações de *Anopheles darlingi* no Brasil, *Ae. aegypti* na cidade de São Paulo e *Anopheles atroparvus* no sudeste europeu ^{68,77,78}. O uso desta ferramenta na descrição de espécies foi relatado em diversos trabalhos: Vidal et. al., (2011) ⁷⁹ utilizaram-na para separar espécies do gênero *Culex*; Wilke et. al., (2016) ⁸⁰ utilizaram este método na separação de gêneros de mosquitos com importância epidemiológica; e Christe et. al., (2016) ⁷⁴ utilizaram esta ferramenta na identificação de dimorfismo sexual em populações de *Ae. fluviatilis*.

1.5.2 Marcadores de microssatélites

O conhecimento da estrutura genética em populações de mosquitos vetores de patógenos pode contribuir e auxiliar na elaboração de estratégias de controle e monitoramento, tornando-as mais efetivas e específicas ^{81,82}. Para tais estudos, geralmente utilizam-se diversos tipos de marcadores moleculares, como o segundo espaçador transcrito interno (ITS2), citocromo oxidase

subunidade I (COI), citocromo B (mtCytB) e diversos marcadores de microssatélites, empregando-os tanto em estudos de filogenia como para estudos de genética populacional ^{83–86}. Esses marcadores moleculares são usados em estudos populacionais na identificação de espécies crípticas, na classificação taxonômica e na estruturação populacional ^{68,73,83,84}.

Os marcadores de microssatélites também conhecidos como sequências simples repetidas (SSRs) estão entre os marcadores mais polimórficos encontrados em genomas de animais e plantas. São regiões compostas por 1 a 6 pares de bases repetidos em *tandem* (em sequência), encontradas em organismos procariontes e eucariontes, nas regiões codificantes e não-codificantes do genoma ^{64,87}. Devido à alta variabilidade (em consequência da alta taxa de mutação, variando de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos por *locus* por geração), torna-se um bom marcador molecular em estudos de genética de populações em diversos organismos ^{68,73}. Além de ser um marcador muito utilizado na observação de distância genética entre populações em escalas tanto geográficas quanto evolutivas ⁸⁸

Há dois modelos que explicam a formação da variabilidade das regiões de microssatélites no genoma: (1) recombinação desigual durante a divisão meiótica, causada por mal alinhamento entre os cromossomos homólogos e (2) o deslizamento da enzima DNA polimerase durante replicação do DNA, com a dissociação transitória de sua cadeia e posterior reassociação desalinhada ⁸⁹.

A distribuição da variação alélica baseada em diferenças intra e interpopulacionais pode ser mensurada por meio do método estatístico descrito por Wright (1951) ⁹⁰ que leva em consideração os seguintes pressupostos: (1) Índice de Heterogeneidade Genética (*F_{st}*) que mede a variação genética de

uma subpopulação em relação a população total, esse índice considera: grande variação genética quando $F_{st} > 0.25$, diferenciação genética moderada quando $0.25 > F_{st} > 0.15$, baixa diferenciação genética quando $0.15 > F_{st} > 0.05$ e diferenciação genética desprezível quando $F_{st} < 0.05$. (2) Coeficiente de Endogamia (F_{is}) intrapopulacional que pode ser interpretado numa escala de 0 a 1, onde 0= ausência de endogamia e 1= elevada endogamia ⁹¹⁻⁹³.

Dois outros modelos importantes para estudos de genética populacional são o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o Cavalli-Sforza e Edwards. O primeiro modelo assume como pressupostos que em uma população diplóide panmítica, infinitamente grande, sob o regime de reprodução sexuada, com ausência de seleção natural, mutação, migração e deriva genética, a frequência alélica e genotípica se manterá constante de geração em geração ⁶⁴. Já o modelo de Cavalli-Sforza e Edwards pressupõe que as mudanças genéticas entre as populações surgem devido a deriva genética de forma aleatória ⁹⁴.

Os marcadores de microssatélites, embora sejam amplamente utilizados na descrição de diferenças genéticas entre populações, podem apresentar limitações oriundas da presença de alelos nulos (que ocorrem quando mutações na região flangeadora não permitem que o *primer* se hibride de forma correta). Isso pode acarretar em uma incorreta suposição de baixa diversidade genética e superestimar os valores de F_{st} . Tais *primers* suscetíveis a alelos nulos podem ser incluídos nas análises, desde que seu viés não tenha interferência significativa nos resultados ^{95,96}.

A utilização desses marcadores em estudos com Culicidae pode ser exemplificada com as diferenças genéticas e relacionadas com a capacidade

vetorial encontradas em espécies pertencentes ao Complexo *pipiens* entre populações da Europa e América do Norte ⁹⁷. E estudos com populações brasileiras de *Ae. aegypti* que demonstraram diferenças genéticas significativas entre localidades estaduais diferentes, indicando que a atuação de estratégias de controle e monitoramento do vetor podem ser realizadas a nível regional e de forma independente ⁹⁸.

Dessa forma, informações sobre a estrutura populacional das espécies *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* são fundamentais para o entendimento da distribuição geográfica e comportamento das populações, fornecendo informações para melhorias de estratégias de controle, uma vez que, são espécies consideradas vetoras de patógenos e estão amplamente distribuídas por toda a extensão da cidade de São Paulo ^{39,99,100}.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a estrutura populacional em fêmeas das espécies de mosquitos *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus* provenientes de parques localizados no município de São Paulo.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a variabilidade morfológica alar entre as populações de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* por meio da morfometria geométrica;
- Analisar a variabilidade genética e o fluxo gênico nas populações de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* por meio de marcadores microssatélites;
- Testar a funcionalidade de marcadores microssatélites em *Cx. nigripalpus*, previamente utilizados com sucesso em outras espécies do gênero *Culex*.

3. Material e métodos

3.1 Populações de *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus* e área de estudo

Indivíduos fêmeas de ambas as espécies, utilizadas para a realização deste trabalho, são provenientes dos parques municipais da cidade de São Paulo coletados durante o projeto de pesquisa “Biodiversidade de mosquitos (Diptera:Culicidae) nos parques municipais da cidade de São Paulo” (Programa BIOTA FAPESP 2010/51230-8). As coletas foram realizadas de Março de 2011 a Fevereiro de 2012 nos seguintes parques: Alfredo Volpi, Anhanguera (1º ano), Ibirapuera, Santo Dias e Shangrilá. E de Agosto de 2012 a Julho de 2013 nos parques: Anhanguera (2º ano), Burle Marx, Piqueri e Previdência (Figura 3). O parque Anhanguera foi selecionado para o estudo durante os dois períodos citados, por ser o maior parque urbano da cidade (9,5 milhões de m²) e possuir diversas formações florestais ^{56,99}.

A distribuição das populações de ambas as espécies, o *n* amostral de cada população trabalhada e a localização dos respectivos parques estão descritos na Tabela 1. Os parques estudados serão descritos nos próximos subtópicos.

3.1.1 Parque Alfredo Volpi

Esse parque está localizado no distrito do Morumbi, zona oeste da cidade de São Paulo, e possui uma área de 142.433 m². A fauna encontrada nesse local consiste em 86 espécies, sendo 76 aves, duas espécies de

crustáceos de água doce, anfíbios, lagartos e mamíferos, possuindo remanescentes de Mata Atlântica como flora ⁵⁶.

3.1.2 Parque Anhanguera

Localizado no distrito de Perus, zona oeste da metrópole, é o maior parque gerido pela prefeitura paulistana (9.500.000m²), recebendo cerca de 4.500 visitantes aos finais de semana. É uma área rica em fauna, totalizando 154 espécies, sendo 105 de aves (entre elas algumas espécies ameaçadas de extinção e aves endêmicas de Mata Atlântica), abrigando anfíbios, répteis e várias espécies de mamíferos de pequeno a grande porte. A fauna é composta por remanescentes de Mata Atlântica com matas ciliares, campos secos, brejos e grande quantidade de cursos d'água. Sob o extenso eucaliptal, há sub-bosque com espécies nativas de floresta além de áreas ajardinadas. Além de possuir um Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), que recebe representantes da fauna paulista que necessitam de cuidados veterinários ⁵⁶.

3.1.3 Parque Burle Marx

O parque Burle Marx está localizado no distrito da vila Andrade, na região sul da cidade de São Paulo, onde os jardins existentes no local foram criados por Burle Marx para enriquecer paisagisticamente uma casa projetada por Oscar Niemeyer na década de 50. Em 1990, a casa foi demolida e quatro anos mais tarde, o estado de São Paulo tombou como patrimônio manchas de mata nativa existentes na área e os jardins, fundando o atual parque. Possui cerca de 138.279m², abrigando espécies da fauna, distribuídas em aves,

mamíferos e répteis, tendo na composição da flora remanescentes de Mata Atlântica ⁵⁶.

3.1.4 Parque Ibirapuera

É o parque urbano mais famoso da cidade de São Paulo, localizado na vila Mariana. Possui uma área de 1.584.000m² e é um dos parques mais procurados pela população paulistana/paulista como espaço para lazer. Sua fauna é representada por 163 espécies, incluindo artrópodes, peixes, anfíbios, répteis e mamíferos, além de cerca de 142 espécies de aves, incluindo aves migratórias. Em relação a vegetação, a mesma é constituída por eucaliptos, áreas ajardinadas, bosques heterogêneos e gramados ⁵⁶.

3.1.5 Parque Piqueri

Localizado no bairro do Tatuapé, originalmente era uma área da Chácara Piqueri, a qual possuía braços do Rio Tietê em sua propriedade (antes do alinhamento do percurso d'água na década de 50). Possui uma área de 97.200m², onde habitam aproximadamente 82 espécies de animais e a flora é composta por bosques heterogêneos com árvores nativas e exóticas além de eucaliptal ⁵⁶.

3.1.6 Parque Previdência

O parque Previdência é um parque situado no extremo oeste da capital paulista, no bairro da Previdência, próximo a rodovia Raposo Tavares. Possui uma área de cerca de 91.500m² com centros culturais para população. A fauna foi listada em 63 espécies, das quais 58 são aves nativas e não-nativas da

Mata Atlântica. A flora exhibe remanescentes de vegetação nativa, uma área de reflorestamento e áreas ajardinadas ⁵⁶.

3.1.7 Parque Santo Dias

Localizado no distrito de Capão Redondo, zona sul da cidade de São Paulo, o parque foi originado de uma antiga fazenda do Instituto Adventista, tendo uma área de 134.000m². A fauna residente é composta por 80 espécies, das quais 70 são aves de rapina nativas e não-nativas da Mata Atlântica, e a flora é composta por exemplares de mata com destaque para a palmeira *Lytocaryum hoenei* ⁵⁶.

3.1.8 Parque Shangrilá

Pertencente ao distrito do Grajaú na zona sul paulistana, o parque está implementado próximo a Represa Billings, na área de proteção ambiental Bororé-Colônia, que tem como objetivo a preservação do patrimônio ambiental da cidade a partir da aquisição de áreas verdes potenciais e estratégicas, preservando e enriquecendo a biodiversidade da cidade e protegendo a represa com um sistema de gestão adequado. Sua área compreende cerca de 75.643m², onde a vegetação é composta por espaços ajardinados, eucaliptal e sub-bosques de árvores nativas da Mata Atlântica. A fauna é considerada heterogênea com 109 espécies, variando de invertebrados a mamíferos de pequeno porte e cerca de 90 espécies de aves, algumas endêmicas ⁵⁶.

Tabela 1: Populações, coordenadas dos parques, *n* amostral de fêmeas das espécies *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* e *Culex* (*Culex*) *nigripalpus* utilizadas no estudo.

Espécie	População	Coordenadas	<i>n</i> amostral
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Alfredo Volpi	23°35'16" S 46°42'09" O	19
	Anhanguera (1° ano)	23°29'33" S 46°45'43" O	30
	Anhanguera (2° ano)	23°29'33" S 46°45'43" O	30
	Burle Marx	23°37'55" S 46°43'17" O	30
	Ibirapuera	23°35'14" S 46°39'27" O	30
	Piqueri	23°31'39" S 46°34'24" O	26
	Anhanguera (1° ano)	23°29'33" S 46°45'43" O	30
	Anhanguera (2° ano)	23°29'33" S 46°45'43" O	30
	Burle Marx	23°37'55" S 46°43'17" O	30
	Ibirapuera	23°35'14" S 46°39'27" O	23
<i>Culex nigripalpus</i>	Piqueri	23°31'39" S 46°34'24" O	30
	Previdência	23°34'40" S 46°43'37" O	30
	Santo Dias	23°45'29" S 46°46'23" O	30
	Shangrilá	23°45'29" S 46°39'44" O	30

Figura 3: Município de São Paulo com a localização dos parques municipais estudados.
Fonte: Prefeitura Municipal de São Paulo, Secretaria do Verde e Meio Ambiente, 2012 ⁵⁶ (modificado).

3.2 Coleta dos espécimes

As coletas foram realizadas mensalmente e as fêmeas adultas (formas aladas) foram coletadas em pontos fixos no interior de cada parque ⁹⁹, mediante o uso de aspiradores manuais à bateria 12 volts ¹⁰¹, armadilhas automáticas luminosas tipo CDC ¹⁰² e armadilhas de Shannon ¹⁰³.

A técnica de aspiração foi realizada durante os períodos matutino e vespertino, compreendendo 20 minutos de duração cada aspiração. Foram selecionadas três áreas fixas de cada parque definidas como (1): área administrativa (próximo à sede do parque e banheiros públicos, onde a presença da população humana é frequente); (2): área intermediária (que foi definida entre a área administrativa e área de vegetação mais densa do local); (3): área mais preservada (local do parque com vegetação mais densa, formando bosques ou trilhas inseridas na mata).

As armadilhas luminosas tipo CDC foram acrescidas de gelo seco (CO₂) como atrativo e instaladas em dois pontos definidos do parque, levando em consideração uma área aberta e outra onde a vegetação é mais densa. Em cada ponto mencionado, foram instaladas duas armadilhas tipo CDC, sendo uma caracterizada solo, instalada cerca de um metro de altura do chão, e a outra caracterizada como copa, instalada em copa arbórea, com cinco metros de altura ou mais. Tais armadilhas foram acionadas durante o crepúsculo vespertino e mantidas por três horas pós-crepusculares.

Na área de vegetação mais densa do parque, uma armadilha de Shannon foi instalada equipada com luz de lampião a gás, acompanhada por dois coletadores munidos de aspiradores elétricos manuais (6 volts) ou tubos

coletores com clorofórmio. A coleta teve duração de duas horas após o crepúsculo vespertino.

3.3 Identificação das espécies

A identificação morfológica em nível de espécie do material coletado foi realizada no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (LESP/FSP/USP) e se baseia em chaves taxômicas de literatura especializada, como Forattini (2002) ³ e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994) ².

As fêmeas das espécies de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* foram armazenadas em caixas entomológicas com sílica com suas respectivas informações anotadas.

3.4 Confeção das lâminas das asas

As asas direitas dos espécimes fêmeas de cada população foram removidas do tórax com auxílio de pinça entomológica e montadas entre lâmina e lamínula (0,08-0,12 mm) usando bálsamo do Canadá (Sigma, Saint Louis, MO, USA), diluído a 70% em xilol. Após a montagem, as lâminas foram deixadas em estufa por cerca de sete dias para total secagem do bálsamo e fixação da asa.

A imagem de cada asa foi obtida com câmera Leica M205C acoplada à lupa estereoscópica, com aumento de 47x para a espécie *Cx. quinquefasciatus* e 35x para a espécie *Cx. nigripalpus*. Em cada imagem, foram marcados 18 pontos anatômicos (*landmarks*), localizados nas intersecções das veias alares, utilizando o *software* TpsDig (v 1.4) ¹⁰⁴ (Figura 4).

Após a retirada da asa, cada espécime foi colocado em um microtubo de 1,5 mL, com sua respectiva identificação, e armazenado em freezer -20°C para futura extração de DNA.

Figura 4: **A:** Asa direita digitalizada de uma fêmea de *Cx. nigripalpus*, com 18 pontos de encontro das intersecções alares marcados em preto e numerados. **B:** Conformação alar obtida com a ligação dos pontos.

Fonte: Gabriela Carvalho, 2014.

3.5 Análises morfométricas

Para as análises de morfometria geométrica alar foi utilizado o *software* MorphoJ (v. 1.02) ¹⁰⁵. As variáveis tamanho e forma das estruturas alares foram analisadas de forma independente para todas as populações de ambas as espécies estudadas.

Para verificar o tamanho alar de cada população, foi calculado o estimador isométrico conhecido como tamanho do centróide (TC) ¹⁰⁶ e os resultados de TC das populações foram comparados por teste ANOVA não-paramétrico e teste Tukey post-hoc utilizando o *software* PAST (v. 2.17) ¹⁰⁷ na construção dos gráficos de *box-plot*.

A influência do tamanho na forma alar (alometria) foi removida da análise da forma alar. A alometria foi verificada por meio de análise de regressão múltipla empregando as coordenadas de Procrustes (variáveis dependentes) e o TC (variáveis independentes). A significância estatística do efeito alométrico foi determinada por teste de permutação com 10.000 randomizações.

Análise discriminante foi aplicada para explorar o grau de dissimilaridade da forma entre as populações no morfoespaço, utilizando a análise da variável canônica (AVC). Sendo essa, também usada para calcular a distância de Mahalanobis, para averiguar a similaridade entre as populações.

Os valores métricos obtidos foram usados na construção de um dendrograma de *Neighbor-joining* (NJ), com teste de reamostragem de 100 interações, utilizando o *software* PAST (v. 2.17). Para o estudo da morfometria geométrica alar nas populações de *Cx. quinquefasciatus*, asas de *Cx. nigripalpus* (n=30) foram colocadas como grupo externo. O oposto foi feito para o estudo morfométrico geométrico alar das populações de *Cx. nigripalpus* (n=30).

Para verificar a precisão do reconhecimento das asas dos espécies em suas populações, foi realizado o teste de reclassificação de validação cruzada, no qual a asa do indivíduo é reclassificada comparando-a com a média geral

do formato alar de cada população, sendo a acurácia de reclassificação representada em valor percentual.

A possível correlação entre as distâncias de Mahalanobis e distância geográfica (km) dos parques foi feita por meio de regressão linear simples empregando essas duas variáveis. Posteriormente, foi empregado o teste de Mantel para comprovar a correlação, com 10.000 interações, utilizando o *software* PAST (v. 2.17). As distâncias geográficas (km) dos locais de coleta foram obtidas por meio do *software online Google Earth* (v 7.1.5.1557) ¹⁰⁸.

3.6 Extração de DNA e reações de PCR

A extração do DNA genômico dos espécimes de todas as populações foi realizada utilizando o *Kit Dneasy Blood and Tissue* (Qiagen[®]) seguindo o protocolo do fabricante. As reações de amplificação, pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), dos *loci* de microssatélites foram preparadas a partir do DNA extraído de cada mosquito, com volume final de 20µL composto por: 1µL de DNA da amostra; 4µL de 5X *FirePol[®] Master Mix PCR* (12,5 mM MgCl₂) (Solis BioDyne); 1µL (1,0 nM) de *foward primer*; 1µL (1,0 nM) de *reverse primer* e 13µL de água ultra-pura, sendo que, em todas as reações, foi colocado uma amostra de controle negativo (substituindo o DNA por água) para verificação de contaminação dos reagentes. Os *primers* testados para amplificação de *loci* de microssatélites para as populações de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* estão descritos na Tabela 2.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo *Eppendorf Mastercycler Nexus Gradient[®]*, seguindo os protocolos de temperatura de hibridação estabelecidos nas publicações de cada *primer* ^{109–}

¹¹². Após a amplificação dos fragmentos, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com *HydraGreen*[®]. As bandas foram visualizadas em transluminador de luz ultra-violeta.

Após a confirmação da amplificação dos fragmentos de maneira consistente em todas as populações, eles foram adquiridos com marcação fluorescente na extremidade 5' (6-Fam, Hex e Ned) adequada para a análise de tamanho de fragmento no equipamento ABI 3730.

Tabela 2: Loci de microssatélites testados nas populações de *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus*, motivo de repetição e referência bibliográfica.

Locus	Sequência 5'-3'	Motivo de repetição	Referência	
CxqGT108	F:ACGTGTTTTATAGGCTTCTTTC R:TCTTCCTTAACTTTACCCACTC	GT	Edillo al. ¹⁰⁹	et
CxqATG9	F:CCACTCAAACATAAACACCACA R: AATGCCATAACCATCGTCAT	TTG	Edillo al. ¹⁰⁹	et
CxqCA118	F: ACCCCGAGCCAAACCTTAT R: CCCCCATTTACACCTGT	CA	Edillo al. ¹⁰⁹	et
CxqCA115	F: GTCGTCAAACCTGCCAATAA R: GCGGAAATAGAACAAACG	CAAACA	Edillo al. ¹⁰⁹	et
CxqGT2	F: GGTGGCTGGGAAGAGAGTA R: GTGTCCGTGTGATGAATGAC	GTTTGT	Edillo al. ¹⁰⁹	et
CxqCA9	F: GTGCGGTGTAGTAGTGTGC R: TGTTTTCCAACCTTTTCAGAC	CA	Edillo al. ¹⁰⁹	et
CxqCAG5	F: CACCCCAAATGGGTCAAC R: CGGGATTCATGGGCATAC	CAG	Edillo al. ¹⁰⁹	et
CxqCTG10	F:CGTTCTCCAACCTGTCATCTTTC R:AACCGAAATCGGAAGGTATTAA	CTGTTGCTG	Edillo al. ¹⁰⁹	et
CxqCAG101	F: CAATCAGGGAACCTCAATC R: GGGACTGGGTATTAGGAGAC	CAG	Edillo al. ¹⁰⁹	et
CxqGA12	F: ACCCGTTCTGGCAACACTG R: TGGTGCGGATGGACGTT	CT	Smith al. ¹¹⁰	et
CxqGT14	F: TGTTAGCCTAGTGGGAAGGTG R: AATCCACCATGCACGGATAC	GT	Smith al. ¹¹⁰	et
CxqGT6b	F: CAACCAGCAAAACCCTCATC R: TAGCCGGGCAGATTCATTAC	CA	Smith al. ¹¹⁰	et
CxqGT8	F: TGTTGCATCTTCCCAGTAGC R:CCGCGCTAAATTACAAAATACAC	GT	Smith al. ¹¹⁰	et
CxqTri4	F: CTAGCCCGGTATTTACAAGAAC R: AACGCCAGTAGTCTCAGCAG	TGC	Smith al. ¹¹⁰	et
CxpGT4	F: GTCGTCGCTAACCCTTGTT R: CGCGATAGTCGGTAATCGT	TTTGCG	Keyghobadi et al. ¹¹¹	
CxpGT20	F: CAACCGCTAAATTGCCTCA R: GCAAACCCGATACCGAAT	TG	Keyghobadi et al. ¹¹¹	

Continua

Tabela 2 (Continuação): Loci de microssatélites testados nas populações de *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus*, motivo de repetição e referência bibliográfica.

Locus	Sequência 5'-3'	Motivo de repetição	Referência
CxpGT51	F: GAGTATCGCTCGTTGGAGATT R: ACCCTCTTTTCTTTCTATGTCTGT	TGCGTG	Keyghobadi et al. ¹¹¹
CxpGT9	F: AATCTCCCCGTATAATTGTG R: TATAAGACCAGTGAAGCCAG	GT	Keyghobadi et al. ¹¹¹
CxpGT40	F: CATCATCTGTCCACGATCC R: TTATGCAGTTGCTGTCATATCC	GT	Keyghobadi et al. ¹¹¹
CxpGT46	F: CCGACACCGTGTTCAAAGAG R: TGACGACGACGGTACAAGAG	TG	Keyghobadi et al. ¹¹¹
CxpGT51	F: GAGTATCGCTCGTTGGAGATT R: ACCCTCTTTTCTTTCTATGTCTGT	TGCGTG	Keyghobadi et al. ¹¹¹
CxpGT53	F: GTCCCGTTTGGTTGGTTG R: CCATCTCCTCCTGAATCCTG	TG	Keyghobadi et al. ¹¹¹
Cxpq51	F: TGCGCGTAACCCTCAACAG R: TCACTCCTTTTTGCCTCCTCCCATC	TCCT	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq59	F: TGTGGCATCCTGGTTTAATTATTT R: CGCGCTTTTCCGTCTCACTG	TTT	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq68	F: GCTTCCGAAATATTGCCACACGAT R: CACCGCCACTTCACAGCTACCAACAA	CCAA	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq69	F: ACTCCTTTCACCCCAATCCTGTTT R: TCTTTTAGTGCGGCGGTGA	CTTT	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq79	F: GCGGCGCGTGTTATCT R: GTGAGCTAGGGGCGGTGTCC	GGG	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq109	F: TCCGAAGCCGATGAATAAGGTA R: GACAGCGTGATGATGAGAAGGGGATAGG	TGATGA	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq110	F: GACAGACCGCGAACATTAGACGA R: TAAGCAGCAGCAGCGAGTAGTGG	CAG	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq114	F: CRKRGWAATTGGTGTCTCA R: CATCTGTTCTCTCTGCGCCATCATC	CT	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq119	F: TCGGGGATGCAAGTACAGGGTGTGT R: GGGCGATAACGATGGCGAGGAT	GGGTGT	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq78	F: CTTATCAACGGACGACCTTACCC R: TACCGTTACCCGTTGCTCCTTACA	CCT	Kothera et al. ¹¹²
Cxpq117	F: CCGGCCGGGAGAACTATGAA R: CAGCAGCCAGGCGAACTTA	GGA	Kothera et al. ¹¹²

3.7 Identificação dos alelos pelo sequenciador automático

Foram realizadas duas diluições com os produtos de PCR com fragmentos fluorescentes. A primeira diluição adicionou-se 3µL de cada um dos produtos amplificados com fluorescência distintas (6-Fam, Hex e Ned) em 21µL de água ultrapura para um volume final de 30µL. A segunda diluição foi

realizada com 2µL de produto da primeira diluição e ressuspendidos em 8,925µL de formamida *HI-DI* (*Applied Biosystem*®) e 0,075µL do marcador de peso molecular *GeneScan 500 ROX* (*Applied Biosystem*®) para um volume final de 11µL de produto. As amostras foram então encaminhadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), para a realização da análise do tamanho dos fragmentos por eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3730. A análise do tamanho dos fragmentos amplificados, isto é, o tamanho do “pico alélico” por indivíduo de cada população, foi realizada com o *software GeneMarker* (v1.85).

3.8 Análise estatística

O *software online Genepop* (v4.2) (<http://genepop.curtin.edu.au/>) e o *software* Arlequin (v.3.5) ¹¹³ foram utilizados para calcular o número de alelos por *locus*; o índice de heterozigosidade genética (*Fst*); o coeficiente de endogamia (*Fis*); o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW), a heterozigosidade observada (*Ho*) e a heterozigosidade esperada (*He*), onde os valores de *P* foram submetidos à correção de Bonferroni.

Para calcular o desequilíbrio de ligação (DL) entre *loci* e o fluxo gênico entre as populações, foi utilizado o *software online Genepop* (v.4.2 <http://genepop.curtin.edu.au/>), com todos os valores *P* ajustados por correção de Bonferroni. A probabilidade de ocorrência de alelos nulos em cada *locus* dentro de cada população foi calculada por meio do *software FreeNa*⁹⁶, que estimou os valores de *Fst* e Cavalli- Sforza & Edwards, considerando a presença de alelos nulos.

O *software Structure* (v.2.3.3) foi usado para a análise Bayesiana de *cluster multi-locus* e o número estimado de *cluster* K (ΔK) foi calculado com o *software Structure Harvester* (web v.0.6.94)¹¹⁴.

Foi utilizado o *software PAST* (v. 2.17) para a construção do dendrograma *Unweighted pair group method with arithmetic mean* (UPGMA), com interação de 10.000 *bootstrap*, baseado na distância genética de Cavalli-Sforza & Edwards e também para a construção gráfica de correlação linear entre distância genética e distância geográfica (km) para as populações. A fim de verificar se as populações de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* passaram por processos de deriva genética, a análise que investiga os *loci* que exibem déficit ou excesso de heterozigosidade foi feita por meio do *software Bottlenek* (v.1.2.2)¹¹⁵, onde foi comparada duas expectativas de heterozigosidade esperada (H_e) baseada nas frequências alélicas e heterozigosidade esperada pelo número de alelos observados (H_{eq}). Portanto, $H_e > H_{eq}$ indica um recente efeito de gargalo (efeito de *bottlenek*) nas populações estudadas e $H_e < H_{eq}$, indica que tais populações sofreram uma expansão demográfica e consequente aumento de número de indivíduos

72,115,116

4 Resultados

Os resultados a seguir estão apresentados conforme a ferramenta utilizada (morfometria geométrica alar e microssatélites) e a espécie estudada (*Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus*).

Para apresentação dos resultados, as populações foram referenciadas com siglas que representam o local onde foram coletados os espécimes. Dessa forma: ANH corresponde à população do parque Anhanguera, ALV à população do parque Alfredo Volpi, BMX à população do parque Burle Marx, IBR a população do parque Ibirapuera, PIQ a população oriunda do parque Piqueri, PRV a população do parque Previdência, SDS a população do parque Santo Dias e SHA a população do parque Shangrilá.

Ressalta-se que em análises prévias realizadas para ambas as ferramentas (morfometria geométrica alar e microssatélites), não houve diferenças significativas entre as populações ANH coletadas nos dois anos de estudo, tanto para a espécie *Cx. quinquefasciatus* quanto para a espécie *Cx. nigripalpus*. Por essa razão, as duas populações foram consideradas como uma população única (n=60 indivíduos) para ambas espécies.

4.1. Morfometria geométrica alar das populações de *Culex quinquefasciatus*

4.1.1 Tamanho das asas nas populações de *Culex quinquefasciatus*

Os valores de TC variaram de 2,5 a 4,31 mm, com a população IBR possuindo a menor média (3,13 mm) sendo também a população com maior variação intra-populacional (2,56 a 3,86 mm). Já a população que apresentou maior média no tamanho foi a ANH com 3,63 mm (Figura 5).

A significância estatística das médias das variações no TC foi calculada usando ANOVA ($F=13,05$; $df=60,95$; $P < 0,05$), pois os dados apresentaram distribuição normal, e resultou em valores significativos quando comparado os valores da média da população ANH com os obtidos para as populações ALV, BMX e IBR e quando comparado os valores médios entre as populações IBR e PIQ (Tabela 3).

Figura 5: Gráfico de *box-plot* ilustrando o tamanho do centróide das asas dos espécimes de *Culex quinquefasciatus*. Ls= Limite superior, Li= Limite inferior.

Tabela 3: Valores referentes ao teste ANOVA para significância estatística da comparação entre médias do tamanho do centróide entre as populações de *Culex quinquefasciatus*. Teste de comparação de Tukey post hoc foi usado.

	ANH	ALV	BMX	IBR	PIQ
ANH	-	0,0022	0,0013	<0,0001	0,1791
ALV	5,192	-	0,9999	0,2595	0,5822
BMX	5,391	0,1995	-	0,3324	0,4903
IBR	8,039	2,847	2,648	-	0,0045
PIQ	3,113	2,079	2,278	4,926	-

Valores na comparação da média na diagonal inferior. Valor de *P* na diagonal superior. Em negrito, os valores significantes ($P < 0,05$).

A contribuição do tamanho na forma alar (alometria) foi significativa ($P < 0,0001$), contribuindo com 4,39% na variação. Embora considerada baixa, a alometria foi retirada na realização das análises da forma alar.

O teste de correlação linear mostrou fraca correlação positiva entre os valores de Mahalanobis e a distância geográfica (Km) ($r = 0,54547$; $r^2 = 0,29754$), sendo ela não significativa ($P = 0,10292$) (Figura 6).

Figura 6: Correlação linear entre a distância de Mahalanobis e distância geográfica (Km) a partir dos locais de coleta para as cinco populações de *Culex quinquefasciatus* ($r= 0,54547$; $r^2=0,29754$, $P=0,1092$).

4.1.2 Forma das asas nas populações de *Culex quinquefasciatus*

A AVC revelou leves diferenças entre as formas alares das populações de *Cx. quinquefasciatus*, onde a maior divergência ocorreu entre as populações de ANH e BMX. Entre as demais populações, é possível observar pequenas variações no morfoespaço, com sobreposição entre os padrões da forma alar (Figura 7).

Figura 7: Distribuição no morfoespaço das duas principais variáveis canônicas das cinco populações de *Culex quinquefasciatus*. Valores das contribuições relativas de cada variável canônica estão entre parentêses.

O dendrograma de NJ mostrou a população ANH segregada das demais, sendo um ramo suportado com alto valor de *bootstrap* (100). As demais populações mostraram baixos valores de *bootstrap*, com as populações PIQ e IBR compartilhado o mesmo ramo, demonstrando alta similaridade (Figura 8).

Os valores para distância de Mahalanobis mostraram diferenças significantes ($P < 0,05$) entre as populações, exceto quando comparadas as populações ALV e IBR ($P = 0,0594$) (Tabela 4).

Figura 8: Dendrograma de *Neighbor-Joining* das cinco populações de *Culex quinquefasciatus*. Valores de *bootstrap* em cada ramo.

Tabela 4: Valor da Distância de Mahalanobis para as cinco populações de *Culex quinquefasciatus*.

	ALV	ANH	BMX	IBR	PIQ
ALV	-	0,0006	0,0025	0,0594	0,0325
ANH	2,1537	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
BMX	2,2900	2,7413	-	<0,0001	0,0236
IBR	2,0166	1,7998	1,9844	-	0,0292
PIQ	2,1733	2,1736	1,8477	1,8472	-

Na diagonal inferior, encontra-se os valores da distância de Mahalanobis. Na diagonal superior, os valores de *P* (em negrito estão os valores significantes $P < 0.05$).

O teste de reclassificação de validação cruzada mostrou, em sua generalidade, baixos valores na reclassificação entre as formas alares, exceto entre as populações IBR e ALV a qual demonstrou valores acima de 80%. A população ANH foi a que possuiu os maiores valores de reclassificação entre todas as populações estudadas, variando de 70,5% quando comparada a população PIQ a 80,8% quando compara às populações ALV e BMX (Tabela 5).

Tabela 5: Valor do teste de reclassificação de validação cruzada (%) para as cinco populações de *Culex quinquefasciatus*.

	ALV	ANH	BMX	IBR	PIQ
ALV	-	56,2	56,2	75	43,7
ANH	80,8	-	80,8	73,5	70,5
BMX	69,4	66,6	-	58,3	72,2
IBR	81,8	63,6	54,5	-	57,5
PIQ	45,8	54,1	50	41,6	-

4.2 Morfometria geométrica alar das populações de *Culex nigripalpus*

4.2.1 Tamanho para as asas das populações de *Culex nigripalpus*

Os valores de TC variaram de 3,25 a 4,85 mm, com a população SHA possuindo a menor média (3,84 mm) e a população SDS a maior média (4,13 mm). A população IBR foi o grupo com a maior variação intra-populacional (3,25 a 4,78 mm) (Figura 9).

A significância estatística das médias das variações no TC foi calculada usando o ANOVA ($F=5,62$; $df=94,59$; $P< 0,05$) por se tratar de dados com distribuição normal, e resultou em valores significativos quando comparado os valores da média da população SDS com as populações IBR e PIQ e quando comparado os valores médios da população SHA com as populações ANH, BMX e SDS (Tabela 6).

Figura 9: Gráfico de *box-plot* ilustrando o tamanho do centróide das asas dos espécimes das sete populações de *Culex nigripalpus*. Ls= Limite superior, Li= Limite inferior.

Tabela 6: Valores referentes ao teste ANOVA para significância estatística da comparação entre médias do tamanho do centróide entre as sete populações de *Culex nigripalpus*. Teste de comparação de Tukey post hoc foi usado.

	ANH	BMX	IBR	PIQ	PRV	SDS	SHA
ANH	-	1	0,142	0,2685	0,7608	0,8731	0,0044
BMX	0,1667	-	0,1853	0,3332	0,8254	0,8175	0,0069
IBR	3,605	3,439	-	0,9999	0,9352	0,0027	0,9211
PIQ	3,183	3,016	0,4225	-	0,9871	0,0083	0,7899
PRV	2,084	1,917	1,522	1,099	-	0,09174	0,2955
SDS	1,772	1,939	5,377	4,955	3,856	-	<0,0001
SHA	5,195	5,028	1,589	2,012	3,111	6,967	-

Valores na comparação da média na diagonal inferior. Valor de *P* na diagonal superior. Em negrito, os valores significantes ($P < 0,05$).

A alometria foi significativa ($P = 0,0027$), contribuindo com 1,45% na variação da forma. Embora esse valor seja considerado baixo, a alometria foi retirada na realização das análises da forma.

O teste de correlação linear mostrou fraca correlação positiva entre os valores de Mahalanobis e a distância geográfica (Km) ($r = 0,31979$; $r^2 = 0,10226$), sendo não significativa ($P = 0,1583$) (Figura 10).

Figura 10: Correlação linear entre a distância de Mahalanobis e distância geográfica (Km) a partir dos locais de coleta para as sete populações de *Culex nigripalpus* ($r = 0,31979$; $r^2 = 0,10226$, $P = 0,1583$).

4.2.2 Forma das asas das populações de *Culex nigripalpus*

A AVC revelou sutis segregações entre as populações IBR, SHA e SDS, mostrando uma sobreposição entre as populações BMX, PRV, SDS, ANH, IBR e a população PIQ (Figura 11 A).

A população SHA foi segregada em dois subgrupos na distribuição do morfoespaço em relação ao padrão da forma alar, sendo um grupo próximo às demais populações e o outro grupo com padrão de forma alar distinto das demais populações (Figura 11 B).

Figura 11: A: Distribuição no morfoespaço das duas principais variáveis canônicas das sete populações de *Culex nigripalpus* **B:** Distribuição no morfoespaço das duas principais variáveis canônicas das sete populações de *Culex nigripalpus*, ressaltando os dois subgrupos da população SHA. Valores das contribuições relativas de cada variável canônica estão entre parentêses.

Para verificar a consistência dos dois subgrupos na população SHA, um teste de reclassificação com validação cruzada foi realizado. Dessa forma, as asas da população SHA foram rotulados com SHA 1 (asas que se encontram próximas no morfoespaço às das demais populações) e SHA 2 (asas que se encontram segregadas na análise de AVC da figura 11).

A comparação (*cross-validada*) da subpopulação SHA 1 com as demais populações mostra uma sobreposição nas formas alares analisadas, não havendo padrões nítidos de segregação entre a forma alar denominada SHA 1 e as demais populações (Figura 12 A-F).

Figura 12: Análise da função discriminante das seis populações de *Culex nigripalpus* comparadas com a forma alar SHA 1. A: População Anhanguera (ANH); B: Burle Marx (BMX); C: Ibirapuera (IBR) (continua).

Figura 12 (continuação): Análise da função discriminante das seis populações de *Culex nigripalpus* comparadas com a forma alar SHA 1. D: Piqueri (PIQ); E: Previdência (PRV); F: Santo Dias (SDS).

A mesma análise foi realizada comparando as asas da subpopulação denominada SHA 2 com as asas das demais populações. A análise revelou um agrupamento diferente na comparação da subpopulação SHA 2 com as demais populações individualmente, inclusive quando comparado com a subpopulação SHA 1.

Houve uma segregação total das formas entre as asas da população ANH e da subpopulação SHA 2. A comparação entre a subpopulação SHA 2 com as demais populações mostrou um padrão de leve sobreposição entre as formas alares, mas segregando a maioria das asas analisadas (Figura 13 A-F).

Figura 13: Análise da função discriminante das seis populações de *Culex nigripalpus* comparadas com a forma alar SHA 2. A: População Anhanguera (ANH); B: Burle Marx (BMX); C: Ibirapuera (IBR) (continua).

Figura 13 (continuação): Análise da função discriminante das seis populações de *Culex nigripalpus* comparadas com a forma alar SHA 2. D: Piqueri (PIQ); E: Previdência (PRV); F: Santo Dias (SDS).

Ao se fazer a mesma análise comparando as duas subpopulações SHA 1 e SHA 2, denota-se um padrão uniforme em relação aos valores da VC1 com pouca sobreposição entre os dois grupos alares (Figura 14).

Figura 14: Análise da função discriminante das asas da população SHA de *Culex nigripalpus*. Em vermelho, asas da subpopulação SHA 1. Em azul, asas da subpopulação SHA 2.

No dendrograma de NJ, a população SHA se segregou em um ramo distinto, suportado com alto valor de *bootstrap* (100). Outra população que se segregou basalmente do clado foi a população SDS (com valor de *bootstrap* em 95). As demais populações mostraram baixo valores de *bootstrap*, tendo as populações PIQ e IBR compartilhado o mesmo ramo, demonstrando alta similaridade (Figura 15).

Os valores para a distância de Mahalanobis mostraram diferenças significantes ($P < 0,05$) entre todas as populações, exceto quando comparadas as populações IBR e PIQ ($P = 0,3839$) (Tabela 07).

Figura 15: Dendrograma de *Neighbor-Joining* das sete populações de *Culex nigripalpus*. Valores de *bootstrap* em cada ramo.

Tabela 07: Valor da Distância de Mahalanobis para as sete populações de *Culex nigripalpus*.

	ANH	BMX	IBR	PIQ	PRV	SDS	SHA
ANH	-	0,0033	0,0005	0,0165	<,0001	<,0001	<,0001
BMX	1,6282	-	0,0443	0,0049	0,0002	0,0013	<,0001
IBR	1,9803	2,0202	-	0,3839	0,0008	<,0001	<,0001
PIQ	1,4789	1,8354	1,6989	-	0,002	<,0001	<,0001
PRV	1,8624	1,922	2,1872	1,778	-	0,0021	<,0001
SDS	1,8088	1,9207	2,5802	2,0987	1,7741	-	<,0001
SHA	2,8565	3,0659	3,2112	2,9521	3,1257	2,8615	-

Na diagonal inferior, encontra-se os valores da distância de Mahalanobis. Na diagonal superior, os valores de *P* (em negrito estão os valores significantes $P < 0,05$).

O teste de reclassificação de validação cruzada mostrou, em sua generalidade, baixos valores na reclassificação entre as formas alares, exceto entre as populações SDS e IBR, a qual demonstrou valores acima de 80%. Em contraste, as populações ANH e IBR tiveram valores de 34% de reclassificação. A população SHA foi a que possuiu os maiores valores de reclassificação entre todas as populações estudadas, variando de 70,5% quando comparada a população PIQ a 88,3% quando comparada a população ANH, indicando que tal população possui um padrão de forma alar que lhe é característico, corroborando com a AVC (Tabela 08).

Tabela 08: Valor do teste de reclassificação de validação cruzada (%) para as sete populações de *Culex nigripalpus*.

	ANH	BMX	IBR	PIQ	PRV	SDS	SHA
ANH	-	56,6	34,7	55,8	68,7	60,6	75,7
BMX	75	-	78,2	55,8	78,1	54,5	69,6
IBR	71,6	76,6	-	52,1	60,8	65,2	69,5
PIQ	65	60	50	-	58,8	61,7	73,5
PRV	73,3	60	70	65,5	-	65,6	78,1
SDS	75,6	53,3	81,8	66,6	63,6	-	81,8
SHA	88,3	80	78,7	70,5	75,7	72,7	-

4.3. Análises de marcadores microssátélites em *Culex quinquefasciatus*

Foram testados 12 pares de *primers* que flanqueiam regiões de microssátélites nas populações de *Cx. quinquefasciatus*, sendo funcionais e descritos para esta espécie na literatura (Tabela 2). Todos os *primers* amplificaram com sucesso nas cinco populações de *Cx. quinquefasciatus* estudadas e estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: *Loci* de microssátélites amplificados nas cinco populações de *Culex quinquefasciatus*, temperatura de anelamento, tamanho dos respectivos alelos e referência.

<i>Locus</i>	T (°C)	Tamanho do alelo	Referência
CxqCA115	55	172-192* (157-289)	Edillo et al, ¹⁰⁹
CxqATG9	55	236-263* (184-262)	Edillo et al, ¹⁰⁹
CxqCA118	55	118-248* (114-282)	Edillo et al, ¹⁰⁹
CxqGT108	55	112-144* (100-214)	Edillo et al, ¹⁰⁹
CxqGT2	55	138-148* (98-228)	Edillo et al, ¹⁰⁹
CxqCA9	55	214-232* (172-370)	Edillo et al, ¹⁰⁹
CxqCAG5	55	272-278* (163-302)	Edillo et al, ¹⁰⁹
CxqGA12	54	110-126* (113-139)	Smith et al, ¹¹⁰
CxqGT14	54	161-169* (162-288)	Smith et al, ¹¹⁰
CxqGT8	54	089-121* (87-109)	Smith et al, ¹¹⁰
CxqTri4	54	112-125* (120-123)	Smith et al, ¹¹⁰
CxqGT6b	54	118-134* (128-136)	Smith et al, ¹¹⁰

*Valores encontrados nas populações de *Cx. quinquefasciatus*. Entre parentêses, valores dos manuscritos originais.

Embora o valor de n amostral ideal para estudos com marcadores microssatélite seja considerado 30 indivíduos por população, em nossas análises, consideramos 26 indivíduos para população PIQ e 19 para população ALV (Tabela 1). Mesmo sendo valores menores do que o considerado ideal, esse total de espécimes coletados em tais parques foram considerados suficientes, pois demonstraram poder estatístico para detectar estruturação genética e diversidade dentro das populações ¹¹⁷.

Os testes de EWH foram feitos para todos os 12 *loci* de microssatélites nas cinco populações. Os valores de H_e foram maiores do que H_o em 50 dos 60 testes conduzidos e o valor médio de F_{is} foi de 0,2 (Tabela 10).

Tabela 10: Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), Coeficiente de endogamia (Fis) e desvios de Hardy-Weinberg observados para cada população nos 12 *loci* testados. Valores de P significantes (* = 0,05), após correção de Bonferroni (** = $P < 0,0008$)

População	Locus	Heterozigosidade observada	Heterozigosidade esperada	Fis	P
ANH	CA115	0,48333	0,62829	0,2233	<0,0001***
	ATG9	0,62712	0,72592	0,1371	0,0353*
	CA118	0,40000	0,65658	0,3928	<0,0001***
	GT108	0,60000	0,74188	0,1925	0,0253*
	GA12	0,52542	0,70564	0,2570	0,0054*
	GT14	0,42593	0,57702	0,2637	0,0284*
	GT2	0,41667	0,59776	0,3047	0,0020*
	CA9	0,31579	0,37385	0,1565	0,1314
	CAG5	0,16949	0,21092	0,1978	0,1722
	GT8	0,66667	0,73203	0,0900	0,1194
	TRI4	0,41379	0,40390	0,0247	0,5471
	GT6b	0,77586	0,79415	0,0232	0,2089
ALV	CA115	0,21053	0,28450	0,2653	0,1926
	ATG9	0,63158	0,71693	0,1220	0,1323
	CA118	0,21053	0,60313	0,6571	0,0002***
	GT108	0,68421	0,71266	0,0410	0,3640
	GA12	0,21053	0,60313	0,3885	<0,0001***
	GT14	0,68421	0,71266	0,0421	0,3587
	GT2	0,42105	0,68137	0,0793	0,0301*
	CA9	0,63158	0,65861	0,0495	0,8633
	CAG5	0,52632	0,57041	0,0588	0,1591
	GT8	0,42105	0,44239	0,1429	0,2687
	TRI4	0,15789	0,14936	0,1077	0,9999
	GT6b	0,63158	0,73400	0,0000	0,0910
BMX	CA115	0,33333	0,65367	0,4943	<0,0001***
	ATG9	0,63333	0,76836	0,1782	0,0702
	CA118	0,27586	0,55354	0,5061	<0,0001***
	GT108	0,56667	0,81695	0,3100	0,0030*
	GA12	0,46667	0,71638	0,3525	0,0112*
	GT14	0,41379	0,66969	0,3863	0,0092*
	GT2	0,62069	0,63642	0,0251	0,5921
	CA9	0,36667	0,37006	0,0093	0,6370
	CAG5	0,06667	0,06554	0,0175	0,9999
	GT8	0,60000	0,69209	0,1350	0,0568
	TRI4	0,40000	0,36384	0,1013	0,9999
	GT6b	0,83333	0,78586	0,0615	0,9899
IBR	CA115	0,26667	0,30226	0,1195	0,3921
	ATG9	0,80000	0,77910	0,0273	0,1325
	CA118	0,50000	0,64972	0,2335	0,0160*
	GT108	0,46667	0,70000	0,3371	0,0391*
	GA12	0,33333	0,64011	0,4835	0,0002***
	GT14	0,33333	0,59718	0,4460	0,0013*
	GT2	0,51724	0,66122	0,2208	0,1632
	CA9	0,36667	0,42881	0,1471	0,0003***
	CAG5	0,20000	0,18305	0,0943	<0,0001
	GT8	0,66667	0,72994	0,0881	0,1102
	TRI4	0,36667	0,38644	0,0520	0,8223
	GT6b	0,80000	0,79605	0,0051	0,9428

Continua

Tabela 10 (Continuação): Heterozigosidade observada (H_o); Heterozigosidade esperada (H_e); Coeficiente de endogamia (F_{is}); e desvios de Hardy-Weinberg observados para cada população nos 12 *loci* testados. Valores significantes de P ($\alpha=0,05$), após correção de Bonferroni ($*** = P < 0,0008$).

PIQ	CA115	0,34615	0,55053	0,3759	0,0044*
	ATG9	0,53846	0,65686	0,1832	0,5107
	CA118	0,42308	0,53997	0,2199	0,1322
	GT108	0,53846	0,72021	0,2561	0,0041*
	GA12	0,19231	0,72090	0,7371	<0,0001***
	GT14	0,34615	0,60407	0,4318	0,0009*
	GT2	0,38462	0,50302	0,2390	<0,0001***
	CA9	0,57692	0,51810	0,1161	0,9999
	CAG5	0,19231	0,17722	0,0870	0,9999
	GT8	0,61538	0,73605	0,1667	0,0016*
	TRI4	0,26923	0,39140	0,3164	0,2048
	GT6b	0,73077	0,75943	0,0385	0,7585

Após 330 testes possíveis, o desequilíbrio de ligação foi considerado significativo somente entre os loci ATG9 e GT108 na população ALV ($P < 0,01$) (Anexo 1, Tabela A-1).

Os testes de probabilidade para a presença de alelos nulos foram considerados altos quando sua frequência foi igual ou superior a 20%⁹⁶. Assim, os *loci* GA12 na população PIQ, CA118 na população ALV e CA115 na população BMX apresentaram probabilidade de alelos nulos (Tabela 11).

Tabela 11: Probabilidade de alelos nulos por *locus* por população de *Culex quinquefasciatus*.

<i>Locus</i>	População	Frequência de alelo nulo	<i>Locus</i>	População	Frequência de alelo nulo
CA115	ANH	10,5%	GT2	ANH	12,3%
	ALV	7,8%		ALV	0
	BMX	20,6%*		BMX	0,07%
	IBR	4,9%		IBR	9,4%
	PIQ	14,1%		PIQ	0
ATG9	ANH	6,7%	GT8	ANH	5,1%
	ALV	4,4%		ALV	0
	BMX	6,9%		BMX	0,03%
	IBR	1,9%		IBR	0
	PIQ	7,3%		PIQ	0
CA118	ANH	14,2%	TRI4	ANH	5,3%
	ALV	23,5%*		ALV	0
	BMX	11,7%		BMX	0
	IBR	6,8%		IBR	0
	PIQ	4,1%		PIQ	0
GT108	ANH	8,9%	GT6b	ANH	1,7%
	ALV	0		ALV	0,2%
	BMX	13,2%		BMX	4,7%
	IBR	11,8%		IBR	0,4%
	PIQ	12,8%		PIQ	5,1%
GA12	ANH	11,1%	CA9	ANH	0
	ALV	15,4%		ALV	0
	BMX	14,6%		BMX	0
	IBR	18,5%		IBR	0
	PIQ	30,3%*		PIQ	9,4%
GT14	ANH	10,4%	CAG5	ANH	2%
	ALV	1,8%		ALV	0
	BMX	15,7%		BMX	0
	IBR	15,9%		IBR	0
	PIQ	16,6%		PIQ	0

* Valores considerados com alta probabilidade de alelos nulos (= >20%).

O número de alelos para os 12 *loci* analisados nas populações de *Cx. quinquefasciatus* variou de 3 a 13 por *locus* (Anexo 1, Tabela A-2). Em relação à riqueza alélica, esta variou de 4,13 na população IBR a 4,91 na população ANH; a riqueza de alelos privados variou de 0,19 a 0,64 nas populações BMX e ANH, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12: Riqueza alélica para as populações de *Culex quinquefasciatus*.

	ANH	ALV	BMX	IBR	PIQ
<i>Na</i>	4,91	4,33	4,62	4,13	4,67
<i>Np</i>	0,64	0,51	0,19	0,28	0,43

Na= Riqueza alélica **Np**= Riqueza de alelo privado

Os valores de estruturação genética entre as populações calculados no *software* Arlequin (considerando todos os alelos) foram considerados baixos ($F_{st} < 0,05$), indicando que há uma baixa estruturação genética entre as populações de *Cx. quinquefasciatus* estudadas, com 70% dos valores significantes ($P < 0,05$) (Tabela 13).

Os valores de F_{st} calculados pelo *software* FreeNa (com 95% de intervalo de confiança), no geral, diminuíram quando comparados com os valores obtidos pelo *software* Arlequin. As populações ALV e PIQ foram as que demonstraram maiores valores de F_{st} e os menores valores foram encontrados entre as populações ALV e IBR para ambas as análises (mantendo-se mesmo com a correção da presença de alelos nulos) (Tabela 13).

Tabela 13: Valores de Heterogeneidade genética (F_{st}).

	ANH	ALV	BMX	IBR	PIQ
ANH	-	0,016925	0,006299	0,007758	0,036805
ALV	0,01905	-	0,017745	0,000671	0,050255
BMX	0,00578	0,01815	-	0,01961	0,032597
IBR	0,00863	0,00089	0,01264	-	0,032597
PIQ	0,03816	0,04766	0,03219	0,03442	-

Na diagonal inferior (com valores significantes em negrito). Valores de heterogeneidade genética (F_{st}) após a correção considerando alelos nulos na diagonal superior (com intervalo de confiança de 95%).

Houve correlação positiva fraca entre as distâncias genéticas ($F_{st}/(1-F_{st})$) e a distância geográfica (km) dos parques, sendo não significativa, ($r=0,2341$; $r^2=0,056184$; $P=0,16853$). O dendrograma de UPGMA, construído a partir dos valores de distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards, revelou que a população ALV foi a mais distinta geneticamente entre as populações aqui estudadas, seguida pela população PIQ. As populações IBR, BMX e ANH se agruparam próximas entre si (Figura 16).

Figura 16: Dendrograma de UPGMA construído a partir dos valores de distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards para as cinco populações de *Culex quinquefasciatus*.

O fluxo gênico entre as populações foi de 2,9 por geração/população. Os resultados obtidos pela análise bayesiana de *cluster* multilocus foram submetidos ao método de Evanno et al.¹¹⁴ para identificação do melhor ΔK , sendo este o valor que representa o número de grupos genéticos que melhor explica os resultados obtidos. Nessa análise, o ΔK proposto foi o de $\Delta K= 4$ (Figura 17).

Figura 17: Gráfico ΔK no qual é possível observar o valor de $K=4$ como sendo o melhor número de grupos genéticos para explicar os dados.

Duas análises bayesianas de *cluster* com diferentes valores de K foram feitas. As análises com $K=2$ indicam que a população PIQ foi a população mais distinta, na qual é possível observar pelo gráfico a prevalência do grupo genético vermelho (Figura 18 A). Entretanto, as análises realizadas com $k=4$ (valor considerado adequado para os dados) não mostraram diferenças significantes nos padrões de variação genética entre as populações estudadas (Figura 18 B).

Figura 18: Análise Bayesiana para as cinco populações de *Culex quinquefasciatus* mostrando os *clusters* genéticos formados pelos espécimes analisados para K=2 (A) e K= 4 (B). Cada um dos 165 espécimes das cinco populações estão representados por uma linha vertical colorida de acordo com a probabilidade do espécime pertencer ao grupo genético representado pela cor.

O resultado dos testes de heterozigosidade realizado no *software Bottleneck* sob o modelo SMM (*Stepwise Mutation Model*) mostrou que para as cinco populações de *Cx. quinquefasciatus*, apenas a população ANH sofreu recentemente ou está sofrendo expansão populacional ($H_e < H_{eq}$). Para os 12 *loci* de microssatélites empregados na análise, 9 mostraram sinais de expansão populacional na referida população (Tabela 14).

Tabela 14: Número de *loci* exibindo excesso de heterozigosidade (H_e) e heterozigosidade esperada pelo número de alelos observados (H_{eq}) sob o modelo SMM. Em negrito, valores de P para déficit de heterozigosidade.

		ANH	ALV	BMX	IBR	PIQ
SMM	$H_e < H_{eq}$	9	8	5	6	7
	$H_e > H_{eq}$	3	4	7	6	5
	P	0,02091	0,06843	0,59384	0,36264	0,18922

Em outra análise, em que os 165 indivíduos de todas as populações foram considerados com sendo uma população única, foram observados 10

loci com déficit de heterozigosidade ($He < Heq$) e 2 *loci* com excesso de heterozigosidade ($He > Heq$) ($P = 0,00402$).

4.4 Análises de marcadores microssátélites em *Culex nigripalpus*

Foram testados 33 pares de *primers* nas populações de *Cx. nigripalpus*, que são funcionais e descritos na literatura para a espécie de *Cx quinquefasciatus* e *Culex pipiens* (Tabela 2). No total, 6 *primers* amplificaram com sucesso nas 7 populações de *Cx. nigripalpus* estudadas e estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15: *Loci* de microssatélites amplificados nas sete populações de *Culex nigripalpus*, temperatura de anelamento, tamanho dos respectivos alelos e referência.

<i>Locus</i>	T (°C)	Tamanho do alelo	Referência
CxqCA115	55	169-189*(157-289)	Edillo et al, ¹⁰⁹
CxqCTG10	55	100-121*(89-174)	Edillo et al, ¹⁰⁹
CxqTri4	54	107-125*(120-123)	Smith et al, ¹¹⁰
CxqGT6b	54	100-108*(128-136)	Smith et. al, ¹¹⁰
CxpGT51	54	80-92*(108-174)	Keyghobadi et al, ¹¹¹
Cxpq59	54	116-132*(100-118)	Kothera et al, ¹¹²

*Valores encontrados nas populações de *Cx. nigripalpus*. Entre parentêses, valores dos manuscritos originais.

Ressalta-se que houve a amplificação de produto de PCR em todas as populações de *Cx. nigripalpus* estudadas para os *loci* CxqATG9¹⁰⁹ e CxqCAG5¹⁰⁹, sendo observadas bandas no gel de agarose. Porém, esses *loci* foram descartados das análises, pois não tiveram bons resultados após a verificação do tamanho dos fragmentos no sequenciador automático, mesmo mudando os parâmetros de diluição, seguindo orientação de especialistas do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco IB/USP.

O *n* amostral para a população IBR foi de 23 indivíduos (Tabela 1). Mesmo sendo um valor menor do que o considerado ideal, esse total de espécimes coletados em tal parque foi considerado suficiente, pois demonstrou

ser estatístico para detectar estruturação genética e diversidade dentro das populações ¹¹⁷.

Os testes de EWH foram feitos para todos os seis *loci* microssatélites nas sete populações. Os valores de H_o foram maiores do que H_e em 36 dos 45 testes conduzidos e o valor médio de F_{is} foi de -0,193 (Tabela 16).

Tabela 16: Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), Coeficiente de endogamia (F_{is}) e desvios de Hardy- Weinberg observados para cada população nos seis *loci* testados. Valores de P significantes (*= 0,05) após correção de Bonferroni (**= $P < 0,001$).

População	Locus	Heterozigosidade observada	Heterozigosidade esperada	F_{is}	P
ANH	CA115	0,71667	0,69692	-0,0286	0,1576
	CTG10	0,75000	0,49608	-0,5184	<0,0001***
	TRI4	0,45000	0,43403	-0,0371	0,7164
	GT6b	0,58333	0,53403	-0,0932	0,6996
	GT51	0,78333	0,74608	-0,0504	0,2620
	59	0,66667	0,77381	0,1395	0,2010
BMX	CA115	0,56667	0,67062	0,1573	0,0268*
	CTG10	0,66667	0,45198	-0,4872	0,0108*
	TRI4	0,40000	0,39266	-0,0190	0,9999
	GT6B	0,70000	0,52373	-0,3444	0,0730
	GT51	0,60000	0,71469	0,1628	0,0082*
	59	0,66667	0,74463	0,1063	0,1071
IBR	CA115	1,00000	0,78367	-0,2834	0,0004***
	CTG10	1,00000	0,58122	-0,7467	<0,0001***
	TRI4	0,40000	0,41143	0,0283	0,9999
	GT6B	0,84000	0,58204	-0,4566	0,0055*
	GT51	0,80000	0,77796	-0,0289	0,0101*
	59	0,92000	0,85143	-0,0824	0,1004
PIQ	CA115	0,80000	0,67797	-0,1837	0,0307*
	CTG10	0,63333	0,46836	-0,3605	0,1431
	TRI4	0,50000	0,45932	-0,0902	<0,0001
	GT6B	0,90000	0,59661	-0,5219	0,0004***
	GT51	0,86667	0,77797	-0,1162	0,0552
	59	0,93333	0,81299	-0,1510	0,0489*
PRV	CA115	0,80000	0,70000	-0,1457	0,0190*
	CTG10	0,70000	0,53333	-0,3196	0,1845
	TRI4	0,73333	0,58588	-0,2571	0,0012*
	GT6B	0,80000	0,60791	-0,3232	0,1202
	GT51	1,00000	0,77740	-0,2927	<0,0001***
	59	0,90000	0,81412	-0,1075	0,0067*
SDS	CA115	0,86667	0,72260	-0,2035	0,0854
	CTG10	0,73333	0,47232	-0,5676	0,0017*
	TRI4	0,50000	0,48418	-0,0333	0,5719
	GT6B	0,80000	0,64011	-0,2552	0,0255*
	GT51	0,96667	0,75311	-0,2899	<0,0001***
	59	0,96667	0,80960	-0,1980	<0,0001***

Continua

Tabela 16 (Continuação): Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), Coeficiente de endogamia (F_{is}) e desvios de Hardy-Weinberg observados para cada população nos seis *loci* testados. Valores de P significantes (* = 0,05), após correção de Bonferroni (** = $P < 0,001$).

População	Locus	Heterozigosidade observada	Heterozigosidade esperada	F_{is}	P
SHA	CA115	0,63333	0,73955	-0,1457	0,1346
	CTG10	0,83333	0,62712	-0,3364	0,0117*
	TRI4	0,66667	0,63559	-0,0498	0,0120*
	GT6B	0,90000	0,71921	-0,2568	<0,0001***
	GT51	0,93333	0,75819	-0,2359	<0,0001***
	59	0,90000	0,81864	-0,1013	0,0171*

Após 105 testes possíveis e o valor de P ajustado por correção de Bonferroni, o desequilíbrio de ligação foi considerado significativo entre os *loci* CA115 e CTG10 na população IBR e entre os *loci* CTG10 e GT6b na população SHA (Anexo 2, Tabela B-1).

Os testes de probabilidade para presença de alelos nulos foram considerados altos quando sua frequência foi igual ou superior a 20%⁹⁶. Não houve valores significantes para a frequência de alelos nulos nas populações de *Cx. nigripalpus* estudadas, porém o *locus* GT6b na população SDS mostrou uma probabilidade considerável de ocorrência de alelos nulos (19,3%), seguido pelas populações ANH e BMX para o mesmo *locus* (Tabela 17).

O número de alelos para os seis *loci* analisados nas populações de *Cx. nigripalpus* variou de 2 a 10 alelos por *locus* (Anexo 2, Tabela B-2). Em relação à riqueza alélica, houve variação de 4,17 na população BMX à 5,67 na população ANH, e a riqueza de alelos privados variou de 0,00 nas populações IBR, PIQ e PRV à 1,00 na população SHA (Tabela 18).

Tabela 17: Probabilidade de alelos nulos por *locus* por população de *Culex nigripalpus*

<i>Locus</i>	População	Frequência de alelo nulo	<i>Locus</i>	População	Frequência de alelo nulo
CA115	ANH	2%	GT6B	ANH	14,6%
	BMX	5%		BMX	14,6%
	IBR	0		IBR	0
	PIQ	0		PIQ	0
	PRV	0		PRV	0
	SDS	0		SDS	19,3%
	SHA	6%		SHA	4,4%
CTG10	ANH	0	CxpGT51	ANH	4,1%
	BMX	0		BMX	9,5%
	IBR	0		IBR	6,7%
	PIQ	0		PIQ	8,5%
	PRV	0		PRV	0
	SDS	0		SDS	0
	SHA	0		SHA	1,4%
TRI4	ANH	0	Cxp59	ANH	4,4%
	BMX	0		BMX	5%
	IBR	0,26%		IBR	6,3%
	PIQ	0		PIQ	4,4%
	PRV	0		PRV	3,4%
	SDS	0		SDS	0
	SHA	0		SHA	1,5%

Tabela 18: Riqueza alélica para as populações de *Culex nigripalpus*.

	ANH	BMX	IBR	PIQ	PRV	SDS	SHA
<i>Na</i>	5,67	4,17	4,67	4,50	4,50	4,67	5,17
<i>Np</i>	0,33	0,17	0	0	0	0,17	1,00

Na= Riqueza alélica ***Np***= Riqueza de alelo privado

Levando em consideração todos os alelos, os valores de estruturação genética entre as populações calculados no *software* Arlequin foram de maneira geral, baixos ($F_{st} < 0,05$), excluindo a população SHA, que apresentou valores considerados moderados ($0,25 > F_{st} > 0,05$) quando comparada com as demais populações, indicado uma estruturação genética entre as populações com 76% dos valores significantes ($P < 0,05$). O valor de F_{st} global para as populações nos revela uma baixa estruturação dentre as populações ($F_{st} = 0,038$) (Tabela 19).

Os valores de F_{st} calculados pelo *software* FreeNa (com 95% de intervalo de confiança), no geral, aumentaram quando comparados com os valores obtidos pelo *software* Arlequin. A população SHA foi a que demonstrou maiores valores de F_{st} para ambas as análises, mantendo-se mesmo com a correção para presença de alelos nulos (Tabela 19).

Tabela 19: Valores de Heterogeneidade genética (F_{st}).

	ANH	BMX	IBR	PIQ	PRV	SDS	SHA
ANH	-	0,00398	0,02545	0,00654	0,01590	0,00976	0,11254
BMX	0,00387	-	0,04987	0,02534	0,04871	0,01549	0,12543
IBR	0,01552	0,03086	-	0,00654	0,08765	0,00176	0,10087
PIQ	0,00710	0,02476	0,00932	-	0,00121	0,00452	0,09876
PRV	0,01560	0,02944	0,01792	0,00132	-	0,00056	0,07654
SDS	0,00716	0,01136	0,00279	0,00336	0,00007	-	0,08965
SHA	0,10259	0,11759	0,10075	0,08294	0,05899	0,07672	-

Na diagonal inferior (com valores significantes em negrito). Valores de heterogeneidade genética (F_{st}) após a correção considerando alelos nulos na diagonal superior (com intervalo de confiança de 95%).

Houve correlação positiva fraca entre as distâncias genéticas ($F_{st}/(1-F_{st})$) e a distância geográfica (km) dos parques, sendo não significativa ($r=0,29053$; $r^2=0,08441$; $P=0,20138$). O dendrograma de UPGMA construído a partir dos valores de distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards revelou que a população SHA foi a mais distinta geneticamente entre todas as

populações. As populações BMX e ANH se agruparam próximas, assim como as populações PIQ e SDS, estando as populações PRV e IBR intermediárias a elas (Figura 19).

Figura 19: Dendrograma de UPGMA construído a partir dos valores de distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards para as sete populações de *Culex nigripalpus*.

O fluxo gênico entre as populações foi de 0,43 por geração/população. Os resultados obtidos pela análise bayesiana de *cluster multilocus* foram submetidos ao método de Evanno et al.¹¹⁴ para identificação do melhor ΔK ,

sendo esse o valor que representa o número de grupos genéticos que melhor explica os resultados obtidos. Nessa análise, o ΔK proposto foi o de $\Delta K= 4$ (Figura 20).

Figura 20: Gráfico ΔK no qual é possível observar o valor de $K=4$ como sendo o melhor número de grupos genéticos para explicar os dados.

Duas análises bayesianas de *cluster* com diferentes valores de K foram feitas. As análises com $K=2$ indicam que a população SHA foi a população mais distinta, na qual é possível observar pelo gráfico a prevalência do grupo genético vermelho (Figura 21 A). Já nas análises realizadas com $k=4$ (valor considerado adequado para os dados), não houve diferenças significantes visíveis nos padrões de variação genética entre as populações estudadas

(exceto pela menor quantidade do grupo verde na população SHA) (Figura 21 B).

Figura 21: Análise Bayesiana para as sete populações de *Culex nigripalpus* mostrando os *clusters* genéticos formados pelos espécimes analisados para K=2 (A) e K= 4 (B). Cada um dos 235 espécimes das sete populações estão representados por uma linha vertical colorida de acordo com a probabilidade do espécime pertencer ao grupo genético representado pela cor.

O resultado dos testes de heterozigosidade realizado no *software Bottleneck* sob o modelo SMM (*Stepwise Mutation Model*) mostrou que para as 7 populações de *Cx. nigripalpus*, apenas a população ANH e SHA sofreram recentemente, ou estão sofrendo, expansão populacional ($H_e < H_{eq}$). Para os 6 *loci* de microssatélites empregados na análise, 5 mostraram sinais de expansão populacional na população ANH e 4 para a população SHA (Tabela 20).

Tabela 20: Número de *loci* exibindo excesso de heterozigosidade (He) e heterozigosidade esperada pelo número de alelos observados (Heq) sob o modelo SMM. Em negrito, valores de *P* para déficit de heterozigosidade.

		ANH	BMX	IBR	PIQ	PRV	SDS	SHA
SMM	He<Heq	5	2	1	3	1	1	4
	He>Heq	1	4	5	3	5	5	2
	<i>P</i>	0,04314	0,49355	0,19321	0,45672	0,22629	0,19085	0,05315

Em uma outra análise, em que os 235 indivíduos de todas as populações foram considerados com sendo uma única população, teve como resultado 4 *loci* com déficit de heterozigosidade (He<Heq) e 2 *loci* com excesso de heterozigosidade (He> Heq) ($P = 0,19042$).

5 Discussão

Cidades consideradas metrópoles como São Paulo, Londres, Nova Iorque, Pequim, entre outras distribuídas pelo mundo, se configuram de forma similar em relação à ocupação de área e processos urbanísticos, tendo as áreas verdes como ilhas isoladas em meio as áreas construídas. Tais espaços verdes podem servir como locais de manutenção de espécies de culicídeos, pois oferecem condições para o desenvolvimento do ciclo biológico do mosquito, disponibilidade de criadouros e fontes para realização de repastos, o que podem contribuir para o aumento populacional de algumas espécies^{10,36,38,61,99}.

A família Culicidae apresenta flutuações populacionais frequentes, pois seu ciclo de vida é modulado por características endógenas e por variações nas condições ambientais (temperatura, pluviosidade, criadouros, etc), dessa maneira, alterações antrópicas realizadas no ambiente tendem a expandir os habitats de espécies adaptadas a tais condições, aumentando sua abundância^{3,50,118}. O conjunto dessas condições pode garantir uma rápida reprodução para os mosquitos, o que frequentemente pode levar à uma rápida evolução em suas populações, como o caso de resistência à inseticidas^{52,65,119}.

O uso de diversas abordagens para a caracterização populacional auxilia na descrição de padrões e processos microevolutivos, uma vez que os caracteres a serem estudados em uma espécie podem evoluir em taxas e velocidades diferentes e o uso de diversas abordagens permite aumentar a probabilidade de detecção de variações fenotípicas e genotípicas⁶⁷⁻⁶⁹.

Nossos resultados utilizando morfometria geométrica alar nas populações de *Cx. quinquefasciatus* indicaram que o padrão da forma da asa é

predominantemente homogêneo entre as populações estudadas. Quatro das cinco populações mostraram formas alares similares em todas as análises realizadas. Esse cenário provavelmente é resultante do fato dessas populações terem sido coletadas em parques inseridos em uma área altamente urbanizada, onde as pressões seletivas atuantes não devem diferir. As populações desses locais, provavelmente, estão sob as mesmas forças seletivas, resultando numa menor variação da forma alar, como já visto por diversos autores^{56,119,120}.

Apenas a população ANH de *Cx. quinquefasciatus* foi segregada no dendrograma de NJ e possuiu média no teste de reclassificação acima dos 75% (considerado moderado por se tratar de uma comparação entre populações da mesma espécie). Os indivíduos dessa população foram coletados em um parque que possui características mais diferenciadas quando comparadas aos demais parques onde as coletas de *Cx. quinquefasciatus* foram feitas. É um parque com 9.500.000 m² dos quais 400.000 m² são áreas abertas a visitação ao público, sendo o restante da área (cerca de 9.100.000 m²), região restrita à preservação do ecossistema e da diversidade biológica⁵⁶. Considerando os aspectos ecológicos e biológicos da espécie *Cx. quinquefasciatus*, que é amplamente adaptada a sobreviver em ambientes com degradações antrópicas e possui um grau elevado de sinantropia^{3,11,42}, a estruturação da população ANH pode estar relacionada a variações intraespecíficas resultantes de pressões seletivas oriundas de um ambiente mais preservado (em relação às demais populações estudadas), com menos exposição a inseticidas usados para o controle dessa espécie em grandes centros urbanos.

Já as populações ALV, BMX, IBR e PIQ foram coletadas em parques completamente inseridos na malha urbana paulistana e mostraram padrão de forma alar homogêneos entre si, com baixos valores de *bootstrap* no dendrograma de NJ, baixos valores percentuais no teste de validação cruzada, além de uma sobreposição no morfoespaço visto pela AVC, o que pode sugerir que as asas de *Cx. quinquefasciatus* estão estabilizadas ou bem-preservadas, apesar das pressões oriundas das mudanças do ambiente urbanizado. Estudos envolvendo morfometria geométrica alar de *Ae. aegypti* têm mostrado padrões similares ao nosso achado em diversos locais do mundo, como nos Estados Unidos, Colômbia e Tailândia ^{121–123}.

Estudos com o uso de morfometria geométrica alar têm discriminado populações de *Cx. quinquefasciatus* em escalas macrogeográficas, como o trabalho de Morais et al. (2010) ⁶⁹, que revelou estrutura populacional em indivíduos de *Cx. quinquefasciatus* das regiões nordeste e sudeste do Brasil, indicando ausência de fluxo gênico entre tais populações. Mas, diferentemente do trabalho de Morais et al. (2010) em que as populações eram oriundas de áreas com milhares de quilômetros de distância, as populações aqui estudadas estão distanciadas, no máximo a 25 km, um dos motivos que corrobora com a homogeneidade alar entre elas, podendo indicar fluxo gênico (resultados que serão discutidos adiante). O fato da população ANH ter apresentado forma alar diferenciada denota que as asas são marcadores sensíveis com potencial para acusar o processo de evolução como descrito por Dujardin (2008) ⁷¹.

Variações na temperatura, densidade populacional larvária no criadouro, ou recursos alimentares são fatores que já foram associados com a variação do tamanho das asas em mosquitos e em outros insetos ^{71,68,69,124}. Em nosso

estudo, somente a população ANH mostrou diferenças significantes no tamanho alar quando comparadas as demais populações. Essas diferenças encontradas para o tamanho das asas podem ser resultados das variadas condições do local (criadouro) onde os indivíduos se desenvolveram. Uma observação a ser feita é que, diferentemente dos demais parques, o parque Anhanguera não se encontra próximo aos Rios Pinheiros e Tietê. Considerando o raio de vôo do mosquito, a hipótese de que o criadouro das outras populações ter sido as margens dos rios é plausível, já que foram considerados locais onde há competição interlarvária da espécie ^{11,42}. Tal situação pode ter contribuído para a diferença do tamanho das asas quando comparada à população ANH.

A espécie *Cx. quinquefasciatus* é uma das mais bem adaptadas aos ambientes urbanos, especialmente em áreas degradadas ^{9,11}. Em um estudo prévio realizado sobre a biodiversidade de culicídeos na cidade de São Paulo, foi indicado que essa espécie esteve presente em 48 dos 59 parques urbanos pesquisados ³⁹.

Estudos sobre biodiversidade de mosquitos realizados em parques na cidade de São Paulo, revelaram a abundância da espécie de *Cx. quinquefasciatus*, variando de 15% do total de espécimes coletados no parque Piqueri a 53% no parque Ibirapuera ^{10,38,61,83}, tornando, assim, evidente que essa espécie se beneficiou das mudanças impostas pelo homem no ambiente.

Contudo, o presente estudo, utilizando 12 marcadores de microssatélites em *Cx. quinquefasciatus*, demonstrou um diferente cenário para essas populações quando comparado a outros estudos com estruturação genética de insetos abundantes em área urbanizada (como *Ae. aegypti*, *Ae. fluviatilis* e

Triatoma infestans)^{73,98,125,126}. Foram encontradas evidências de expansão populacional apenas na população ANH, oriunda do parque considerado o mais preservado no estudo onde foi coletada essa espécie. As demais populações, que eram esperadas terem sofrido expansão populacional, não mostraram sinais de expansão para esses *loci*.

Os parques Ibirapuera e Piqueri estão localizados em uma área altamente urbanizada, onde há intenso fluxo de pessoas e carros, o que poderia culminar em pressões seletivas sobre as populações de *Cx. quinquefasciatus*, especulando, assim, variação genética. Contudo, os resultados indicaram que as pressões seletivas dessas áreas não estão sendo causa de estruturação nas populações, contrastando com os resultados obtidos para a espécie *Ae. fluviatilis* em um estudo similar realizado nas mesmas áreas e no mesmo período de estudo (2011-2013)⁷³.

A ausência de estruturação populacional foi inesperada, uma vez que a espécie *Cx. quinquefasciatus* é uma das mais abundantes na cidade de São Paulo, sendo encontrada por toda a extensão da matriz urbana paulistana^{10,39,61}. Uma explicação plausível para a falta de estruturação genética entre as populações de *Cx. quinquefasciatus* é que, durante o processo de colonização dessa espécie pela cidade de São Paulo, ela já tenha sofrido expansão e, atualmente, encontra-se distribuída por toda a extensão do município, e possui migração (troca de fluxo gênico) modesta entre os parques (cerca de três indivíduos por geração e população).

Uma possível explicação para esse achado é considerar o processo de urbanização na maioria dos parques como sendo mais antigo do que na região do parque Anhanguera. Dessa forma, essas populações sofreram com as

mudanças antrópicas há mais de 30 anos e, portanto, os sinais de expansão para essas populações nesses parques já foram diluídos ao longo dos anos, sendo impossível sua observação.

A análise feita considerando todas as populações como uma única população (metapopulação) suporta essa hipótese, uma vez que seus resultados indicaram expansão populacional para esses mosquitos, corroborando com resultados de estudos populacionais com mosquitos com tendências antropofílicas ^{127,128}. Além disso, a fraca e não significativa correlação entre as distâncias genéticas e geográficas; o fato das populações estudadas serem geneticamente similares e haver fluxo gênico (análises bayesianas e de heterogeneidade genética); e a não existência de uma significativa estrutura populacional corroboram com o cenário de que o evento de expansão na espécie de *Cx. quinquefasciatus* já ocorreu.

Embora limitada, a população ALV foi a mais distinta no dendrograma de UPGMA em relação às distâncias genéticas. No entanto, essas diferenças não foram aparentes na análise bayesiana, tendo a população PIQ apresentado padrões mais definidos.

O risco de transmissão de patógenos está positivamente associado com o aumento na densidade e incidência de mosquitos vetores ^{52,129}. A homogeneização biótica é conhecida por ocorrer em áreas urbanizadas ¹¹⁹, como resultado da expansão de espécies adaptadas a esses ambientes, favorecendo e oferecendo vantagens para a espécie, como a redução do número de predadores e aumento na sua densidade. Esse fenômeno pode ser o caso da espécie *Cx. quinquefasciatus*, que está bem distribuída pela cidade

de São Paulo e pode colonizar ambientes altamente degradados além de ser altamente antropofílica^{36,91}.

Um estudo macrogeográfico com populações de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil também suporta essa idéia, pois mostrou uma significativa associação entre a variação genética e as variáveis ambientais⁸³, indicando que a dinâmica populacional do *Cx. quinquefasciatus* está associada com as características locais moduladas pela urbanização e uso de inseticidas e poluentes.

Um melhor entendimento dos mecanismos que envolvem a dispersão e colonização de novas áreas pela espécie *Cx. quinquefasciatus*, estando associados com a urbanização, principalmente em áreas que estão sofrendo a transição rural para urbana (como no parque Anhanguera), é de importância para melhoria de estratégias de controle ou monitoramento da espécie.

Embora os dois marcadores populacionais empregados nas populações de *Cx. quinquefasciatus* possuam suas peculiaridades, ambos apontam uma homogeneidade da espécie de *Cx. quinquefasciatus* distribuídas em áreas verdes localizados na cidade de São Paulo, não sendo possível a verificação de uma estruturação dessa espécie pela malha urbana paulistana.

Em relação à outra espécie estudada no presente trabalho, os resultados indicam que as formas alares das fêmeas de *Cx. nigripalpus* são moderadamente heterogêneas entre as populações analisadas. Das sete populações, seis exibiram formas alares similares, indicando que as populações foram moduladas por pressões oriundas do ambiente resultando em uma baixa variação da forma alar¹²⁰. Esse fenômeno também já foi

reportado em outras espécies de culicídeos como em *Aedes*, *Anopheles* e em outras espécies do gênero *Culex*.^{72,74,130}

Espécimes da população SHA, contudo, foram coletados em um parque que possui remanescentes de Mata Atlântica e faz fronteira com a Represa Billings, compreendendo uma parte da área de proteção ambiental (APA-Bororé- Colônia)¹³¹. Essa população apresentou dois padrões distintos de forma alar, um similar ao encontrado nas demais populações e outro predominante desta população. Tal variação pode ser explicada pelo fato da população ter sido coletada em uma área com influência de mata original de floresta atlântica, bem como de área urbanizada próxima à entrada do parque, promovendo dois distintos habitats para o desenvolvimento do *Cx. nigripalpus*. Uma hipótese é que a heterogeneidade ambiental pode ter afetado os padrões fenotípicos dos organismos, modulando, assim, as suas características para as condições locais.

A variabilidade da forma alar é um importante traço que pode inferir em como os insetos lidam com as variações ambientais. Uma possível explicação para o padrão observado na população SHA, que não foi observado em outras populações é que os demais parques são consideradas áreas que sofreram impactos antrópicos e, na atualidade, configuram-se como áreas reflorestadas ou em processo de reflorestamento¹³¹, incluindo aqui o parque Anhanguera, pois, mesmo sendo outro parque que possui remanescente de Mata Atlântica original, há uma extensa área a qual foi reflorestada com eucaliptos. Embora não seja possível inferir que o padrão da forma da asa encontrado seja devido a pressões seletivas específicas provenientes de ambientes urbanizados, a presença de um formato alar predominante encontrado em um ambiente

preservado com formação vegetal original pode indicar uma correlação entre essas variáveis. A modulação no formato alar de diversos insetos já foram correlacionados com as mudanças na região onde a população habita, como encontrado em borboletas numa área onde houve mudanças no perfil da agricultura na China, em populações de *Ae. aegypti* em um centro urbano e em populações de *Polietina orbitalis* (moscas) em diversos estratos na região do Paraná^{68,132,133}.

Como já mencionado anteriormente, a segregação da população SHA em um único ramo no dendrograma de NJ, com valor de *bootstrap* alto (100) pode também indicar uma possível retenção de poliformismo alar ancestral, uma vez que a espécie *Cx. nigripalpus* é nativa do Brasil^{3,118} e o parque Shangrilá localiza-se em uma zona de transição urbano-silvestre, formando um corredor ecológico entre os remanescentes de Mata Atlântica em São Paulo. Além disso, os valores do teste de reclassificação cruzada indicam que essa população possui um padrão de forma alar diferenciado das demais populações estudadas, corroborando com a hipótese que o padrão encontrado predominantemente na população SHA provém de um grupo de espécimes mais silvestres.

A adaptação de mosquitos vetores de patógenos em habitats urbanos é um importante indicador de seleção que pode conduzir a estruturação populacional e o surgimento de subpopulações. Com o aumento crescente dos ambientes urbanizados, os mosquitos necessitam se adaptar a novas condições impostas pelo ambiente, tais como restrição na variabilidade genética durante o início do processo de domesticação, dispersão pela dependência da fonte de alimento, isolamento e possível deriva genética

podem favorecer o surgimento de cenários para emergência de subpopulações
9,71,134–136 .

A forma alar nos mosquitos é conhecida como sendo uma característica hereditária ¹²³, podendo ser usada como indicativo de mudanças evolutivas. O fato das populações ANH, BMX, IBR, PIQ, PRV e SDS terem um padrão de asas homogêneas é consistente a um cenário genético homogêneo, em que as populações sofreram influências do processo de urbanização do ambiente, perdendo a estrutura durante esse processo, como visto em populações de *Ae. fluviatilis* coletadas em parques urbanos similares na cidade de São Paulo. ⁷³

O moderado polimorfismo nos padrões da forma alar encontrado nas populações descrito no morfoespaço da AVC, dendrograma de NJ e teste de reclassificação somado ao fato do isolamento por distância não ter sido significativo, indica que a heterogeneidade ambiental pode ter grande influência na estrutura populacional da espécie de *Cx. nigripalpus*. Resultados similares foram encontrados em outras espécies de mosquitos como em *Ae. aegypti* e *Ae. fluviatilis*. ^{73,125}

Assim como mencionado para as populações de *Cx. quinquefasciatus*, a densidade populacional larvária, condições e qualidade de comida e temperatura são fatores que podem influenciar no tamanho alar em insetos⁷¹. As diferenças entre o tamanho do centróide encontradas em nossas populações provavelmente resultam das condições e locais de criadouros onde esses indivíduos se desenvolveram. Somente as populações SHA e SDS exibiram diferenças significantes para o tamanho. Nossa hipótese é que os mosquitos pertencentes a população SHA possuam maior valência ecológica para utilizar os criadouros, assim como na população SDS que foram coletadas

em áreas antropizadas, onde os mosquitos podem estar se desenvolvendo em criadouros artificiais. A variação no tamanho da asa devida as condições impostas nos criadouros já foram descritos em *Triatoma sordida* e *Ae. aegypti*.

68,124

Espécies de mosquitos que podem sobreviver em ambientes urbanos tendem a ter vantagem sobre espécies silvestres, devido à sua habilidade de utilizar diversos habitats para o desenvolvimento da prole e por ter acesso mais facilmente a fontes de repastos em ambientes onde a presença humana é frequente, conduzindo, assim, em um aumento na abundância e na expansão territorial dessas espécies ^{48,119}. Entretanto, a estruturação observada na população de *Cx. nigripalpus*, que se segregou em dois grupos distintos - silvestre e urbano-, a sobreposição e baixa variação no formato alar das populações coletadas em ambientes urbanos que estão sobre altas pressões seletivas, indicam que a heterogeneidade do ambiente pode ter influência na forma alar das populações estudadas.

O resultado de transferência de *primers* para regiões de microssatélites de outras espécies do gênero *Culex* (especificamente para espécies de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens*) em populações de *Cx. nigripalpus* foi satisfatório, com 18% de sucesso em amplificação das regiões testadas. Resultados de transfêrencia de *primers* em insetos da família Culicidae são de importância para gerar novos campos de estudos em estruturação populacional de mosquitos, que possuem pouca ou nenhuma informação ou são negligenciados por não apresentarem capacidade vetorial ainda comprovada. Desta forma, esta ferramenta se mostra útil e de custo efetivo para elucidar maiores informações em relação a essas espécies. ¹³⁷

Os testes realizados para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg por *locus* por população sugerem que as populações de *Cx. nigripalpus* estudadas apresentam desvios de equilíbrio, com $H_o > H_e$ por *locus* por população em 36 dos 45 testes realizados, representando um total de 80% dos valores, com 8 valores significantes (após a correção por Bonferroni), indicando assim, excesso de heterozigosidade. O valor médio de *F_{is}* encontrado para todas as populações foi de -0,19, mesmo em populações onde o desvio de EHW foi significativo, sugerindo a ausência de endogamia nas populações como um todo.

Uma possível interpretação para o excesso de heterozigosidade encontrada nas populações pode ser atribuída à escassez de criadouros disponíveis, que seriam utilizados no desenvolvimento da próxima geração, ocasionando uma diferença alélica nos pais (macho e fêmea do mosquito) refletindo um excesso de heterozigosidade na prole^{138,139}. Fênomeno similar foi verificado em populações de *Ae. aegypti* coletados no início de uma estação seca, ocasionando o excesso de heterozigosidade nas populações pelas proporções de HHW¹⁴⁰. Nossos resultados corroboram com os indicativos de desequilíbrio de Hardy- Weinberg vistos em populações de *Ae. fluviatilis* colonizando áreas verdes numa grande metrópole⁷³.

Os resultados de heterogeneidade genética (*F_{st}*), obtidos tanto pelo *software* Arlequin quanto pelo FreeNa, que elimina o viés da presença de alelos nulos, sugeriram estruturação baixa entre as populações (valor médio de *F_{st}*= 0,038), onde a população SHA apresentou os maiores valores quando as populações foram comparadas entre si. Esses resultados corroboram com estudos sobre a estrutura populacional de *Ae. aegypti* em microrregião, onde o

valor encontrado entre as populações estudadas foi semelhante ao nosso ($F_{st}=0,037$)¹⁴². Wilke et al. (2014)⁸³ encontraram uma moderada estruturação em mosquitos do gênero *Culex* em populações distribuídas pelo território brasileiro, observando estruturação entre as populações do sul e norte, indicando, assim, que o fluxo gênico ocorre em escalas microgeográficas.

Os resultados utilizando *loci* de microssatélite indicam que as populações de *Cx. nigripalpus*, no geral, não estão sofrendo expansão populacional demográfica. Das populações estudadas, as únicas que apresentaram indicação de processo de expansão ($H_e < H_{eq}$) são as populações ANH e SHA, sendo o valor de P não significativo para a última população, num valor limítrofe. Este dado é interessante, pois essas duas populações foram coletadas nos parques onde o processo de urbanização é mais recente¹²⁰. A maioria dos *loci* amplificados nessas populações apresentaram valores para excesso de heterozigosidade maiores que de *loci* apresentando déficit de heterozigosidade. Esses resultados são sustentados pelo baixo fluxo gênico e a alta taxa de heterozigotos presentes na população.

O mesmo teste, quando realizado com todas as populações como sendo uma única população, apresentou quatro *loci* com déficit e dois com excesso de heterozigosidade, mostrando que em algum momento essas populações sofreram expansão (porém o valor de P não foi significativo). Dessa maneira, o resultado encontrado com as populações de *Cx. nigripalpus* se assemelham com os resultados encontrados com *Cx. quinquefasciatus*, onde foi demonstrado que as únicas populações que estão em expansão são as que se encontram em ambientes onde a urbanização ainda não é tão acentuada. Os resultados encontrados nas populações das duas espécies do gênero *Culex*

mostraram ter um perfil diferente do observado em populações de *Ae. fluviatilis*, que demonstraram estar em processo recente de expansão pela cidade.⁷³

Evidências de expansão populacional já foram observadas em diversas espécies de culicídeos com importância médica comprovada como *Anopheles darlingi*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles arabiensis*, onde o processo de expansão foi associado com a falta de isolamento por distância e a associação com a expansão territorial da população humana^{116,127,141}. Nossos achados com espécies do gênero *Culex* corroboram com tais resultados, uma vez que, as populações que foram encontradas com indícios de expansão populacional foram coletadas em áreas onde a presença de habitação humana vem se intensificando.

A correlação entre distância genética e distância geográfica foi não significativa, sugerindo que a estruturação genética entre a população SHA e as demais populações não está relacionada ao isolamento dessas populações. Esses resultados estão de acordo com outras espécies de mosquitos, onde não foi encontrado isolamento por distância entre suas populações e havendo similaridade genéticas entre seus indivíduos.^{95,125}

Os resultados apresentados no dendrograma de UPGMA, construído a partir dos valores de Cavalli-Sforza & Edwards, não possuem correlações com as distâncias geográficas, indicando que a pouca diferenciação genética encontrada nessas populações não foi causada por eventos de deriva genética, mas provavelmente, por algum impacto antrópico que possa ter atingido a espécie¹⁴².

Os resultados obtidos pelo *software* Structure corroboram os padrões vistos no dendrograma de UPGMA, onde a população SHA mostra ter um

padrão genético diferente das demais (menos presença do grupamento genético verde) e se segrega basalmente em um braço do UPGMA. Já as populações PIQ e SDS, as quais apresentaram similaridades entre os grupamentos genéticos (como observado na figura 21 A, onde a prevalência do grupamento verde e vermelhos estão distribuídos igualmente entre essas duas populações), se agruparam em um braço distinto do dendrograma UPGMA, seguido pelas populações IBR e PRV (que possuem homogeneidade na distribuição dos grupamentos genéticos). Além disso, as duas populações ANH e BMX se segregam em outro braço do UPGMA e possuem um perfil de grupamento genético semelhante as demais populações. O interessante nessas análises é que, novamente, a população SHA segrega-se das demais, demonstrando uma diferença visível no grupamento genético quando comparada as outras populações. Essa foi a única população coletada em local mais preservado, sem interferência na ocupação e modificação da área como as demais populações.

Embora essas sutis diferenças tenham sido encontradas entre as populações de *Cx. nigripalpus* estudadas, no geral, essas populações se encontraram muito semelhantes entre si, corroborando com os resultados na espécie de *Cx. quinquefasciatus* e divergindo de achados encontrados por Kothera et. al (2012)¹¹², que encontraram diferenças genéticas entre populações de *Culex pipiens* ao longo de estratos no estado do Texas, EUA. Denota-se a maior presença de riqueza de alelos privados nas populações ANH e SHA, o que nos leva a considerar que a urbanização é um fenômeno o qual homogeneiza as populações que estão inseridas nesses ecótopos.¹¹⁹

O fluxo gênico é um termo que caracteriza o movimento dos genes entre as espécies e intra-espécies. As altas variações entre espécies existentes são oriundas de forças evolutivas que tendem a gerar diferenças, como a deriva genética e a seleção natural. Por outro lado, baixas variações genéticas intra-espécies são resultantes das forças que tendem a produzir uma homogeneização genética entre as populações como o fluxo gênico¹⁴³. As populações de *Cx. nigripalpus* não apresentaram alto valor de fluxo gênico entre elas, mas devido à homogeneidade genética encontrada e a possível expansão da espécie em determinado momento do passado, é plausível que elas estiveram em fluxo gênico. Situações semelhantes entre fluxo gênico e homogeneidade genética já foram descritos em espécies como *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* e *Aedes taeniorhynchus*.^{144,145}

Os resultados mostraram que *primers* para regiões de microssatélites desenvolvidos para espécies do gênero *Culex* (*Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*) foram transferidos com sucesso para populações de *Cx. nigripalpus* corroborando com os resultados obtidos por Multini et. al.,¹³⁷ e Bello & Becerra¹⁴⁵, que conseguiram transferir *primers* de espécies consideradas vetoras para outras espécies da família Culicidae. Os seis *loci* amplificados em nossas populações foram moderadamente polimórficos, indo ao encontro dos resultados obtidos por *loci* de outros gêneros de mosquito como em *Aedes*.^{95,112,145}

Primers que amplificam regiões de microssatélites transferidos de uma espécie para outra podem apresentar alelos nulos, devido a mutações decorrentes da região flanqueadora⁹⁶. O *locus* GT6b¹¹⁰ e CxpGT51¹¹¹ tiveram as maiores frequências de alelos nulos encontrados nas populações de *Cx.*

nigripalpus, o que pode levar a uma incorreta interpretação da diversidade genética entre as populações, ocasionando também em um possível viés de averiguação, onde as taxas de variação podem ser menores na espécie nova do que nas espécies na qual o *primer* foi desenvolvido¹⁴⁶. De maneira geral, os *loci* amplificados em nossas populações não demonstraram ter a presença significativa de alelos nulos, dando consistência aos resultados encontrados.

A espécie *Cx. nigripalpus* tem implicações epidemiológicas já comprovadas^{11,62,147} e está amplamente distribuída na cidade de São Paulo^{38,39,61}. Os resultados aqui encontrados sugerem que a espécie sofreu um evento de expansão populacional no passado, pois compartilham de uma homogeneidade genética e baixo fluxo gênico na atualidade e que áreas as quais o processo de urbanização está se intensificando, as populações estão em processo de expansão. Processos de urbanização tendem a mudar o micro-clima da região, podendo, dessa forma, favorecer o aumento na abundância de determinadas espécies de mosquitos na cidade. Fenômeno esse já observado na abundância de mosquitos vetores da malária em regiões da África¹⁴⁸. Dessa forma, o processo de urbanização pode facilitar a emergência de patógenos e oferecer maior disponibilidade de habitat para o desenvolvimento de mosquitos, como é o caso dos parques urbanos.

6 Conclusões

- Ambos marcadores utilizados (morfometria geométrica alar e marcadores microssatélites) foram sensíveis na verificação de sutis diferenças entre as populações de ambas as espécies do gênero *Culex*;
- Tanto as populações de *Cx. quinquefasciatus* quanto as de *Cx. nigripalpus* passaram por processo de expansão populacional e se encontram com baixa estruturação genética;
- Processo de expansão populacional foi verificado em populações das duas espécies coletadas em áreas onde a influência antrópica é mais recente;
- A urbanização influencia no processo de homogeneização entre as populações de ambas as espécies;
- Não houve evidências de isolamento por distância entre as populações de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* para ambos os marcadores utilizados.
- *Primers* que amplificaram regiões de microssatélites desenvolvidos para outras espécies com importância epidemiológica do Complexo *pipiens* (*Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*) puderam ser transferidos com sucesso para as populações de *Cx. nigripalpus*;
- Os fragmentos amplificados pelos *primers* em *Cx. nigripalpus* mostraram-se moderadamente polimórficos, porém resultando em alto grau de informações para a espécie.

Referências

1. HARBACH, R. E. Mosquito Taxonomic. Inventory. Valid Species List. (2016).
2. Consoli, R. A. G. B. & Oliveira, R. L. de. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz **11**, (1994).
3. Forattini, O. P. Culicidologia Médica. Identificação, Biologia, Epidemiologia. (2002).
4. World Health Organization. Fact Sheet: Malaria. (2015).
5. World Health Organization. Fact Sheet: Dengue and severe dengue. *Control* (2016).
6. World Health Organization. Fact Sheet: West Nile Virus. *Control* (2011).
7. Harbach, R. E. The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* **638**, 591–638 (2007).
8. Rocha, E. M. M. & Fontes, G. Filariose bancroftiana no Brasil. *Rev. Saude Publica* **32**, 98–105 (1998).
9. Pocquet, N. *et al.* Multiple Insecticide Resistances in the Disease Vector *Culex p. quinquefasciatus* from Western Indian Ocean. *PLoS One* **8**, 1–14 (2013).
10. Ceretti-Júnior, W. *et al.* Mosquito Faunal Survey In a Central Park of the City of São Paulo, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **31**, 172–176 (2015).
11. Taípe-Lagos, C. B. & Natal, D. Culicidae mosquito abundance in a

- preserved metropolitan area and its epidemiological implications. *Rev. Saude Publica* **37**, 275–279 (2003).
12. Cardoso J, C. *et al.* Novos registros de potencial epidemiológico de algumas espécies de mosquitos (Diptera, Culicidae), no Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* **43**, 552–556 (2010).
 13. Vieira, M. A. C. S. *et al.* West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 377–379 (2015).
 14. Ayres, C. F. J. Comment Identification of Zika virus vectors and implications for control. *Lancet Infect Dis* **3099**, 4–5 (2016).
 15. Dibo, M. R., *et al.* Presença de culicídeos em município de porte médio do estado de São Paulo e risco de ocorrência de febre do nilo ocidental e outras arboviroses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **44**, 496–503 (2011).
 16. West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. *Whashington, CDC* 1–69 (2013).
 17. Hayes, E. B. & Gubler, D. J. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu. Rev. Med.* **57**, 181–194 (2006).
 18. 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.* **4**, 20 (2004).
 19. Varnado, W. & Goddard, J. Abundance and diversity of mosquito species

- collected from a rural area of Central Mississippi: Implications for West Nile Virus Transmission in Mississippi. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **31**, 182–186 (2015).
20. Center of Diseases Control (CDC). West Nile Virus home- statistics & maps.(2016).Availableat:<http://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/index.html>. (Accessed: 1st January 2016).
 21. Pauvalid-Corrêa, A. *et al.* Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106**, 467–474 (2011).
 22. Pauvalid-Corrêa, A. *et al.* Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).
 23. Lima-Camara, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev. saúde pública* **50**, 1–7 (2016).
 24. Lopes, N., Nozama, C. & Linhares, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* **5**, 55–64 (2014).
 25. Hull, R., *et al.* A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of St. Louis encephalitis and eastern equine encephalitis viruses. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**, 272–279 (2008).
 26. Mondini, A. *et al.* Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J. Clin. Virol.* **40**, 84–86 (2007).

27. Mackenzie, J. S., Gubler, D. J. & Petersen, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* **10**, S98–S109 (2004).
28. Richards, S. L., Anderson, S. L., Lord, C. C. & Tabachnick, W. J. Effects of Virus Dose and Extrinsic Incubation Temperature on Vector Competence of *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) for St. Louis Encephalitis Virus. *J. Med. Entomol.* **49**, 1502–1506 (2012).
29. Richards, S. L., Lord, C. C., Pesko, K. N. & Tabachnick, W. J. Environmental and biological factors influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) vector competence for West Nile Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 126–34 (2010).
30. Molaei, G. *et al.* Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and its role in transmission of West Nile virus in Harris County, Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 73–81 (2007).
31. Pereira Serra, *et al.* Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 20–29 (2016).
32. Carvalho, G. A. *et al.* Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 exposed to different densities of microfilariae of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Rev. Bras. Entomol.* **52**, 658–662 (2008).
33. Vezzani, D., *et al.* PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina. *Parasitol. Res.* **108**, 985–989 (2011).

34. Demirci, B., Lee, Y., Lanzaro, G. C. & Alten, B. Altitudinal genetic and morphometric variation among populations of *Culex theileri* Theobald (Diptera: Culicidae) from northeastern Turkey. *J. Vector Ecol.* **37**, 197–209 (2012).
35. Yildirim, A. *et al.* *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. *Vet. Parasitol.* **178**, 143–147 (2011).
36. de Carvalho, G. C. *et al.* Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in São Paulo, Brazil. *J. Vector Ecol.* **39**, 146–152 (2014).
37. Lai, C. H., Tung, K. C., Ooi, H. K. & Wang, J. S. Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial density. *Vet. Parasitol.* **90**, 231–237 (2000).
38. Medeiros-sousa, A. R. *et al.* Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera : Culicidae) in an urban park : Larval habitats and temporal variation. *Acta Trop.* **150**, 200–209 (2015).
39. Medeiros-Sousa, A. R. *et al.* Mosquito fauna in municipal parks of São Paulo City, Brazil: a preliminary survey. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **29**, 275–9 (2013).
40. Medeiros-Sousa, A.R., *et al.* Biodiversidade de mosquitos (Diptera : Culicidae) nos parques da cidade de São Paulo I Biodiversidade de mosquitos (Diptera : Culicidae). *Biota Neotrop.* **13**, 317–321 (2013).
41. Moraes, S. A. De, Marrelli, M. T. & 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.* **50**, 413–418 (2006).
42. Laporta, G. Z., Urbinatti, P. R. & Natal, D. Aspectos ecológicos da população de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) em abrigos situados no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, SP. *Rev. Bras. Entomol.* **50**, 125–127 (2006).
43. Diaz, L. A. *et al.* Transmission of endemic St Louis encephalitis virus strains by local *Culex quinquefasciatus* populations in Cordoba, Argentina. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **107**, 332–4 (2013).
44. Forattini, O. P., Kakitani, I., Massad, E. & Marucci, D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 10- Survey of adult behaviour of *Culex nigripalpus* and other species of *Culex (Culex)* in south-eastern Brazil. *Rev. Saude Publica* **29**, 271–278 (1995).
45. Rutledge, C. R., Day, J. F., Lord, C. C., Stark, L. M. West Nile Virus Infection Rates in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) Do Not Reflect Transmission Rates in Florida. *J. Med. Entomol.* **40**, 253–258 (2003).
46. Donihue, C. M. & Lambert, M. R. Adaptive evolution in urban ecosystems. *Ambio* **44**, 194–203 (2015).
47. Chaimowicz, F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: Problemas, projeções e alternativas. *Rev. Saude Publica* **31**, 184–200 (1997).

48. Li, Y. *et al.* Urbanization Increases *Aedes albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3301 (2014).
49. Samson, D. M. *et al.* New baseline environmental assessment of mosquito ecology in northern Haiti during increased urbanization. *J. Vector Ecol.* **40**, 46–58 (2015).
50. Chaves, L. F., Morrison, A. C., Kitron, U. & Scott, T. W. Nonlinear impacts of climatic variability on the density- dependent regulation of an insect vector of disease. *Glob. Chang. Biol.* **18**, 457–468 (2012).
51. Sang, S. *et al.* Predicting Unprecedented Dengue Outbreak Using Imported Cases and Climatic Factors in Guangzhou, 2014. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, 1–12 (2015).
52. Descloux, E. *et al.* Climate-based models for understanding and forecasting dengue epidemics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
53. Whately, Marussia; *et al.* Parques urbanos Subsídios para a gestão. (Prefeitura da Cidade de São Paulo, 2008).
54. Zulauf, W. E. O meio ambiente e o futuro. *Estud. Avançados* **14**, 85–100 (2000).
55. Limnios, G. & Furlan, S. Â. Parques urbanos no município de são paulo – SP (BRASIL): Junho de 2013. *Rev. Labverde* **6**, 173–189 (2013).
56. Secretaria do Verde e do Meio Ambiente(SVMA). Guia dos parques municipais de São Paulo. (2012).

57. Myers, S. S. & Patz, J. A. Emerging Threats to Human Health from Global Environmental Change. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **34**, 223–252 (2009).
58. Fisher, B. & Christopher, T. Poverty and biodiversity: Measuring the overlap of human poverty and the biodiversity hotspots. *Ecol. Econ.* **62**, 93–101 (2007).
59. Tabarelli, M., Pinto, L. P., Silva, J. M. C., Hirota, M. M. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade* **1**, 132–138 (2005).
60. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2013. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013).
61. Paula, M. B. de *et al.* Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna in parks in greater São Paulo, Brazil. *Biota Neotrop.* **15**, 1–9 (2015).
62. Pereira, L. E., Suzuki, A., Coimbra, T. L., de Souza, R. P. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). *Rev. Saude Publica* **35**, 119–123 (2001).
63. Ridley, M. *Evolution. Evolution* (2004). doi:10.1007/978-3-0348-6133-5
64. Templeton, A. R. *Genética de Populações e Teoria Microevolutiva*. (Sociedade Brasileira de Genética SBG, 2011).
65. Yebakima, A., Marquine, M., Rosine, J., Yp-Tcha, M.-M. Evolution of resistance under insecticide selection pressure in *Culex pipiens*

- quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) from Martinique. *J. Med. Entomol.* **41**, 718–725 (2004).
66. Powell, J. R., Tabachnick, W. J. & Arnold, J. Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. *Science* **208**, 1385–7 (1980).
 67. Reinert, J. F., Kaiser, P. E. & Seawright, J. A. Analysis of the *Anopheles* (*Anopheles*) *quadrimaculatus* Complex of Sibling Species (Diptera: Culicidae) Using Morphological , Cytological , Molecular , Genetic , Biochemical , and Ecological Techniques in an Integrated Approach. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **13**, 1–102 (1997).
 68. Louise, C., Vidal, P. O. & Suesdek, L. Microevolution of *Aedes aegypti*. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
 69. de Morais, S. A., Moratore, C., Suesdek, L. & Marrelli, M. T. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **105**, 672–676 (2010).
 70. Schachter-Broide, J., Gürtler, R. E., Kitron, U. & Dujardin, J.-P. Temporal variations of wing size and shape of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from northwestern Argentina using geometric morphometry. *J. Med. Entomol.* **46**, 994–1000 (2009).
 70. Lorenz, C., *et. al.* Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured. *Infect. Genet. Evol.* **30**; 205-215 (2017).
 71. Dujardin, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 875–890 (2008).

72. Gómes, G. F., Márquez, E. J., Gutiérrez, L. A., Conn, J. E. Geometric morphometric analysis of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) reveals significant effect of environmental factors on wing traits and presence of a metapopulation. *Acta Trop.* **135**, 75–85 (2015).
73. Multini, L. C., Wilke, A. B. B., Suesdek, L. & Marrelli, M. T. Population Genetic Structure of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *PLoS One* **11**, e0162328 (2016).
74. Christe, R. de O., Wilke, A. B. B., Vidal, P. O. & Marrelli, M. T. Wing sexual dimorphism in *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Infect. Genet. Evol.* **45**, 434–436 (2016).
75. Rohlf, F. J. Relative warps analysis and an example of its application to mosquito wings. *Contrib. to morphometrics* 131–159 (1993).
76. Moraes, D. A. Morfometria Geométrica E a ‘Revolução Na Morfometria’ Localizando E Visualizando Mudanças Na Forma Dos Organismos. *Bioletim* 1–5 (2003).
77. Motoki, M. T., Suesdek, L., Bergo, E. S. & Sallum, M. A. M. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 1246–1252 (2012).
78. Vicente, J. L. *et al.* Genetic and phenotypic variation of the malaria vector *Anopheles atroparvus* in southern Europe. *Malar. J.* **10**, 5 (2011).
79. Vidal, P. O., Peruzin, M. C. & Suesdek, L. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). *Rev. Bras. Entomol.* **55**, 134–137 (2011).

80. Wilke, A. B. B. *et al.* Morphometric wing characters as a tool for mosquito identification. *PLoS One* **11**, 1–12 (2016).
81. Fonseca, D. M., Smith, J. L., Wilkerson, R. C. & Fleischer, R. C. Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 284–289 (2006).
82. Keyghobadi, N., LaPointe, D., Fleischer, R. C. & Fonseca, D. M. Fine-scale population genetic structure of a wildlife disease vector: The southern house mosquito on the island of Hawaii. *Mol. Ecol.* **15**, 3919–3930 (2006).
83. Wilke, A., Vidal, P., Suesdek, L. & Marrelli, M. Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors* **7**, 468 (2014).
84. Demari-Silva, B., Vesgueiro, F. T., Sallum, M. A. & Marrelli, M. T. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. *J Med Entomol* **48**, 272–279 (2011).
85. Torres-Gutierrez, C. *et al.* Mitochondrial COI gene as a tool in the taxonomy of mosquitoes *Culex* subgenus *Melanoconion*. *Acta Trop.* **164**, 137–149 (2016).
86. Harbach, R. E. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): The foundation for molecular systematics and phylogenetic research. *Acta Trop.* **120**, 1–14 (2011).

87. Schlötterer, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**, 365–371 (2000).
88. Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Mol. Ecol.* **11**, 1–16 (2002).
89. Tóth, G. *et al.* Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* **10**, 967–981 (2000).
90. Wright, S. The Genetical Structure of Populations. *Ann. Eugen.* **15**, 322–354 (1951).
91. Volkman, S. K., Neafsey, D. E., Schaffner, S. F. & Wirth, D. F. Harnessing genomics and genome biology to understand malaria biology. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 315–328 (2012).
92. Wright, S. Coefficients of inbreeding and relationship. *Am. Nat.* **56**, 330–338 (1922).
93. Li, C. C. & Horvitz, D. G. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am. J. Hum. Genet.* **5**, 107–117 (1953).
94. Cavalli-Sforza, L. L. & Edwards, A. W. F. Phylogenetic Analysis Models and Estimation Procedures. *Am. J. Hum. Genet.* **19**, 233–57 (1967).
95. Monteiro, F. A. *et al.* Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, 1–10 (2014).
96. Chapuis, M. P. & Estoup, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 621–631 (2007).

97. Fonseca, D. M. Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. *Science* (80-.). **303**, 1535–1538 (2004).
98. Ayres, C. F. J., Melo-santos, M. A. V., Solé-Cava, A. M. & Furtado, A. F. Genetic Differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the Major Dengue Vector in Brazil. *J. Med. Entomol.* **40**, 430–435 (2003).
99. Sousa, A. R. M. de. Estudo dos padrões de diversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parques urbanos da cidade de São Paulo, SP. (Universidade de São Paulo, 2014). doi:10.11606/D.6.2014.tde-09052014-163758
100. Medeiros-Sousa, A. R. *et al.* Diversity and abundance of mosquitoes (Diptera:Culicidae) in an urban park: Larval habitats and temporal variation. *Acta Trop.* **150**, 200–209 (2015).
101. Natal, D. & Marucci, D. Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. *Rev. Saude Publica* **18**, 418–420 (1984).
102. Gomes, A. de C., Rabello, E. X. & Natal, D. Uma nova câmara coletora para armadilha cdc-miniatura. *Rev. Saude Publica* **19**, 190–1 (1985).
103. Felici, B. & W, P. Shannon dawn trap: its use in the verification of the durability of residual toxic effects of insecticides. *Folha Med.* **32**, 53 (1951).
104. Rohlf, F. J. TpsDig2, Digitize landmarks and outlines, Version 2.10. (2006).
105. Klingenberg, C. P. MorphoJ: An integrated software package for

- geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 353–357 (2011).
106. Bookstein, F. L. Morphometric Tools for Landmark Data : Geometry and Biology by Fred L . Bookstein Review by : Subhash Lele Published by : American Statistical Association Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2669711> . Your use of the JSTOR archive indicates your acce. *Am. Stat. Assoc.* **94**, 340–341 (1999).
 107. Hammer, Ø., Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. v.2.17. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. (2001).
 108. Google software. Google Earth. 0 (2008).
 109. Edillo, F. E. *et al.* A set of broadly applicable microsatellite markers for analyzing the structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) populations. *J. Med. Entomol.* **44**, 145–149 (2007).
 110. Smith, J L., Keyghobadi, N., Matrone, M. A, Escher, R. L. & Fonseca, D. M. Cross-species comparison of microsatellite loci in the *Culex pipiens* complex and beyond. *Mol. Ecol. Notes* **5**, 697–700 (2005).
 111. Keyghobadi, N. M., Michael A E. G., Kramer, L. F. D. Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 20–22 (2004).
 112. Kothera, L., Godsey, M. S., Doyle, M. S. & Savage, H. M. Characterization of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) Populations in Colorado , USA Using Microsatellites. **7**, 1–9 (2012).

113. Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* **1**, 47–50 (2005).
114. Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* **14**, 2611–2620 (2005).
115. Cornuet, J. M. & Luikart, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001–2014 (1996).
116. Conn, J. E. *et al.* Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 798–806 (2006).
117. Hale, M. L., Burg, T. M. & Steeves, T. E. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLoS One* **7**, (2012).
118. Consoli, Routraut AGB & Lourenço de Oliveira, R. *et al.* *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Cadernos de Saúde Pública* **11**, (Editora FIOCRUZ, 1994).
119. McKinney, M. L. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biol. Conserv.* **127**, 247–260 (2006).
120. Grostein, M. D. Metrpole e expanso urbana a persistncia de processos ‘insustentveis’. *So Paulo em Perspect.* **15**, 13–19 (2001).

121. Jirakanjanakit, N., Leemingsawat, S. & Dujardin, J. P. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 414–421 (2008).
122. Vidal, P. O., Carvalho, E. & Suesdek, L. Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **107**, 1030–1034 (2012).
123. Henry, A., Thongsripong, P., Fonseca-gonzalez, I., Jaramilo. & Dujardin, J. Infection , Genetics and Evolution Wing shape of dengue vectors from around the world . **10**, 207–214 (2010).
124. Vendrami, D. P., *et al.* Wing geometry of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Brazil. *Infect. Genet. Evol.* **49**, 17–20 (2017).
125. Olanratmanee, P. *et al.* Population Genetic Structure of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) at a Micro-Spatial Scale in Thailand: Implications for a Dengue Suppression Strategy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, (2013).
126. Piccinali, R. V. & Glurtler, R. E. Fine-scale genetic structure of *Triatoma infestans* in the Argentine Chaco. *Infect. Genet. Evol.* **34**, 143–152 (2015).
127. Donnelly, M. J., Licht, M. C. & Lehmann, T. Evidence for recent population expansion in the evolutionary history of the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1353–64 (2001).
128. Tchouassi, D. P. *et al.* Population Genetics of Two Key Mosquito Vectors

- of Rift Valley Fever Virus Reveals New Insights into the Changing Disease Outbreak Patterns in Kenya. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).
129. Meyer Steiger, D. B., Ritchie, S. A. & Laurance, S. G. W. Mosquito communities and disease risk influenced by land use change and seasonality in the Australian tropics. *Parasit. Vectors* **9**, 387 (2016).
 130. Carvajal, T. M. *et al.* Spatial analysis of wing geometry in dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* (L .) (Diptera: Culicidae) , populations in Metropolitan Manila , Philippines. 127–135 (2016).
 131. Secretaria do Verde e Meio Ambiente Guia dos Parques Municipais de São Paulo. 231 (2015).
 132. Bai, Y., Ma, L. Bin, Xu, S.-Q. & Wang, G.-H. A Geometric Morphometric Study of the Wing Shapes of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) from the Qinling Mountains and Adjacent Regions: An Environmental and Distance-Based Consideration. *Florida Entomol.* **98**, 162–169 (2015).
 133. Alves, V. M., Moura, M. O. & de Carvalho, C. J. B. Wing shape is influenced by environmental variability in *Polietina orbitalis* (Stein) (Diptera: Muscidae). *Rev. Bras. Entomol.* **60**, 150–156 (2016).
 134. Campbell-Lendrum, D. *et al.* Domestic and Peridomestic Transmission of American Cutaneous Leishmaniasis: Changing Epidemiological Patterns Present New Control Opportunities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**, 159–162 (2001).
 135. Trpis, M. & Hausermann, W. Genetics of house-entering behaviour in East African population of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) and its

- relevance to speciation. *Bull. Entomol. Res.* **68**, 521–532 (1978).
136. Schofield, C. J., Diotaiuti, L. & Dujardin, J. P. the Process of Domestication in Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**, 375–378 (1999).
 137. Multini, L. C., Marrelli, M. T. & Wilke, A. B. B. Microsatellite loci cross-species transferability in *Aedes fluviatilis* (Diptera:Culicidae): a cost-effective approach for population genetics studies. *Parasit. Vectors* **8**, 635 (2015).
 138. Pudovkin, A. I., Zaykin, D. V. & Hedgecock, D. On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics* **144**, 383–387 (1996).
 139. Luikart, G. & Cornuet, J. M. Estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics* **x**, x–x (1999).
 140. Da Costa-Ribeiro, M. C. V, Lourenço-de-Oliveira, R. & Failloux, A. B. Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in southeastern and southern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 303–309 (2007).
 141. Mirabello, L. & Conn, J. E. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *Heredity (Edinb)*. **96**, 311–321 (2006).
 142. LaDeau, S., Allan, B., Leishnam, P. & Levy, M. The ecological foundations of transmission potential and vector-borne disease in urban landscapes. *Funct Ecol* **29**, 889–901 (2015).

143. Slatkin, M. Gene flow in natural populations. *Anu. Rev. Ecol. Syst.* **16**, 393–430 (1985).
144. Bello, F. J., Segura, N. A. & Ruiz-Garcia, M. Analysis of the genetic variability and structure of *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) populations from the Colombian Atlantic coast on the basis of random amplified polymorphic DNA markers. *Genet. Mol. Res.* **13**, 4110–4123 (2014).
145. Bello, F. & Becerra, V. Genetic variability and heterogeneity of Venezuelan equine encephalitis virus vector *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) populations of the Colombian Atlantic coast, based on microsatellite loci. *Genet. Mol. Res.* **8**, 1179–1190 (2009).
146. Carlsson, J. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *J. Hered.* **99**, 616–623 (2008).
147. Laporta, G. Z. et al. *Culex nigripalpus* Theobald (Diptera, Culicidae) feeding habit at the Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* **52**, 663–668 (2008).
148. Pascual, M., Ahumada, J. A., Chaves, L. F., & Bouma, M. Malaria resurgence in the East African highlands: Temperature trends revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5829–5834 (2006).

ANEXO 1- TABELA A1

Desequilíbrio de Ligação nas populações de *Culex quinquefasciatus*. Valor de *P* significativo (*), após correção de Bonferroni ($P < 0,001$) (***)

População	Locus 1	Locus 2	P
ANH	ATG9	GA12	0,997310
ANH	GT14	GT8	0,973260
ANH	CA115	CAG5	0,970500
ANH	ATG9	GTBB	0,949890
ANH	ATG9	CA9	0,927540
ANH	CA115	GT2	0,923020
ANH	CA118	GT6B	0,900690
ANH	CA118	CA9	0,888700
ANH	GT14	CAG5	0,887130
ANH	CA115	GT108	0,883380
ANH	CA118	GT8	0,859350
ANH	CA115	GA12	0,840200
ANH	GT108	GT14	0,827710
ANH	CA115	GT6B	0,819600
ANH	GT108	GT8	0,804270
ANH	CA9	GT8	0,794350
ANH	CA118	CAG5	0,794070
ANH	GT2	CA9	0,741970
ANH	CA115	GT14	0,734080
ANH	CA115	TRI4	0,715720
ANH	GT14	GT2	0,707490
ANH	GT8	TRI4	0,685970
ANH	CA115	GT8	0,660210
ANH	CA118	GA12	0,649240
ANH	GT108	TRI4	0,627150
ANH	GA12	GT6B	0,621740
ANH	CA115	ATG9	0,586300
ANH	ATG9	GT14	0,582560
ANH	GT14	CA9	0,546110
ANH	ATG9	GT108	0,544490
ANH	ATG9	CAG5	0,522310
ANH	GT14	TRI4	0,520870
ANH	GT14	GT6B	0,520240
ANH	ATG9	TRI4	0,508290
ANH	CA9	GT6B	0,479800
ANH	GT108	CA9	0,478390
ANH	GA12	GT14	0,473840
ANH	CA115	CA9	0,471950
ANH	CA118	GT2	0,453190
ANH	CA118	TRI4	0,444230
ANH	ATG9	CA118	0,413980
ANH	CA118	GT108	0,378210
ANH	GT108	GA12	0,349460
ANH	CA118	GT14	0,349010
ANH	GT108	GT6B	0,304040
ANH	GT2	GT6B	0,301560
ANH	CA9	CAG5	0,268650
ANH	ATG9	GT2	0,265210
ANH	GA12	GT8	0,259850
ANH	GA12	TRI4	0,208700
ANH	GA12	CA9	0,201260
ANH	ATG9	GT8	0,168870
ANH	CAG5	GT6B	0,155180

Continua

Desequilíbrio de Ligação nas populações de *Culex quinquefasciatus*. Valor de *P* significativo (*), após correção de Bonferroni ($P < 0,001$) (***)

População	Locus 1	Locus 2	P
ANH	GT2	TRI4	0,152610
ANH	CAG5	TRI4	0,138450
ANH	GA12	CAG5	0,114030
ANH	GT2	GT8	0,108990
ANH	GT108	CAG5	0,077930
ANH	GA12	GT2	0,073930
ANH	CA9	TRI4	0,069970
ANH	GT2	CAG5	0,042460*
ANH	CAG5	GT8	0,038330*
ANH	GT8	GT6B	0,033100*
ANH	GT108	GT2	0,022630*
ANH	TRI4	GT6B	0,017170*
ALV	CA115	GT108	0,989650
ALV	CA118	GA12	0,965270
ALV	CA115	GA12	0,946300
ALV	CA115	ATG9	0,934600
ALV	GT14	CAG5	0,932820
ALV	CA115	GT2	0,919410
ALV	GT14	GT6B	0,915370
ALV	GT14	GT8	0,894940
ALV	CA118	GT14	0,893270
ALV	ATG9	GA12	0,851520
ALV	CA9	GT8	0,841350
ALV	GT2	TRI4	0,836440
ALV	CAG5	GT8	0,817020
ALV	GT2	GT8	0,772580
ALV	GT14	CA9	0,771460
ALV	CA118	TRI4	0,759380
ALV	ATG9	GT8	0,748920
ALV	GT108	CAG5	0,721640
ALV	CA118	GT6B	0,699760
ALV	CA115	GT8	0,689420
ALV	ATG9	CA9	0,684220
ALV	GT108	GT8	0,679290
ALV	ATG9	GT14	0,672520
ALV	GA12	CAG5	0,661420
ALV	GT108	GT14	0,646520
ALV	ATG9	CA118	0,646200
ALV	GT14	TRI4	0,616300
ALV	GT2	GT6B	0,610890
ALV	GA12	GT2	0,599460
ALV	GA12	CA9	0,592840
ALV	CA115	GT14	0,572170
ALV	CA118	CA9	0,537610
ALV	GT8	TRI4	0,529670
ALV	GT2	CA9	0,517350
ALV	GT14	GT2	0,510520
ALV	CA115	TRI4	0,495270
ALV	GA12	GT14	0,478760
ALV	GA12	GT6B	0,471060
ALV	GA12	GT8	0,459040
ALV	CA118	GT108	0,446850
ALV	CAG5	GT6B	0,427690
ALV	CA118	GT2	0,417870
ALV	GT108	GA12	0,392680
ALV	ATG9	CAG5	0,388340

Continua

Desequilíbrio de Ligação nas populações de *Culex quinquefasciatus*. Valor de *P* significativo (*), após correção de Bonferroni ($P < 0,001$) (***)

População	Locus 1	Locus 2	P
ALV	ATG9	GT2	0,312560
ALV	CA115	CAG5	0,246420
ALV	CA115	GT6B	0,240940
ALV	CA118	GT8	0,227040
ALV	GT108	GT2	0,218350
ALV	ATG9	TRI4	0,147990
ALV	CA9	CAG5	0,126180
ALV	GT108	TRI4	0,111270
ALV	CAG5	TRI4	0,100680
ALV	GT8	GT6B	0,099690
ALV	CA9	TRI4	0,088210
ALV	GT108	GT6B	0,076810
ALV	GA12	TRI4	0,072010
ALV	CA115	CA9	0,067500
ALV	ATG9	GT6B	0,039550*
ALV	TRI4	GT6B	0,036970*
ALV	CA115	CA118	0,033770*
ALV	ATG9	GT108	<0,00000***
ALV	CA118	CAG5	0,999999
ALV	GT2	CAG5	0,999999
ALV	CA9	GT6B	0,999999
BMX	GT14	GT8	0,997500
BMX	GT108	GA12	0,983630
BMX	ATG9	GT6B	0,975460
BMX	CA115	ATG9	0,965640
BMX	ATG9	CA118	0,941400
BMX	GT108	GT8	0,933860
BMX	CA118	GT6B	0,926610
BMX	GT108	GT6B	0,889550
BMX	CA115	CAG5	0,884240
BMX	GT2	GT6B	0,850820
BMX	GA12	GT2	0,847070
BMX	GT2	CA9	0,834210
BMX	GT108	GT2	0,824390
BMX	CA115	GA12	0,810230
BMX	CA115	CA9	0,798900
BMX	ATG9	TRI4	0,776800
BMX	CA115	GT108	0,761990
BMX	CA9	CAG5	0,754510
BMX	GT14	TRI4	0,707400
BMX	CA118	GT14	0,702470
BMX	GT2	GT8	0,661280
BMX	GA12	GT14	0,647010
BMX	GT14	CA9	0,630920
BMX	CA115	GT6B	0,629360
BMX	ATG9	GA12	0,622480,
BMX	ATG9	CA9	0,559330
BMX	CA9	GT6B	0,558650
BMX	GT14	GT6B	0,548000
BMX	GT108	TRI4	0,533350
BMX	CAG5	TRI4	0,529660
BMX	CA115	CA118	0,529060
BMX	ATG9	GT14	0,508260
BMX	TRI4	GT6B	0,507390
BMX	ATG9	CAG5	0,506380

Continua

Desequilíbrio de Ligação nas populações de *Culex quinquefasciatus*. Valor de *P* significativo (*), após correção de Bonferroni ($P < 0,001$) (***)

População	Locus 1	Locus 2	P
BMX	CA115	GT2	0,494190
BMX	CA118	GA12	0,488480
BMX	GA12	CA9	0,458620
BMX	CA118	CA9	0,438370
BMX	GT108	CAG5	0,435230
BMX	CA118	GT8	0,428340
BMX	CA9	GT8	0,425990
BMX	ATG9	GT8	0,415810
BMX	CA115	TRI4	0,390230
BMX	GA12	GT8	0,372940
BMX	CA115	GT14	0,335830
BMX	GT8	GT6B	0,318020
BMX	CA118	GT2	0,255860
BMX	GT108	GT14	0,252470
BMX	GT8	TRI4	0,244570
BMX	CA118	GT108	0,237560
BMX	GT14	CAG5	0,187160
BMX	GT2	TRI4	0,182000
BMX	CA118	TRI4	0,181770
BMX	GT14	GT2	0,177440
BMX	GA12	CAG5	0,163970
BMX	GT2	CAG5	0,157840
BMX	ATG9	GT108	0,106710
BMX	ATG9	GT2	0,099840
BMX	GT108	CA9	0,060580
BMX	GA12	GT6B	0,041859*
BMX	CA9	TRI4	0,035580*
BMX	GA12	TRI4	0,029730*
BMX	CA118	CAG5	0,999999
BMX	CAG5	GT8	0,999999
BMX	CAG5	GT6B	0,999999
IBR	CAG5	GT6B	0,946360
IBR	TRI4	GT6B	0,929740
IBR	CA118	GT6B	0,891230
IBR	GT8	GT6B	0,890900
IBR	GT14	TRI4	0,874270
IBR	CA118	CA9	0,870770
IBR	CA118	GT108	0,842020
IBR	ATG9	GT14	0,835480
IBR	CA115	CA9	0,787560
IBR	CA115	GT14	0,768450
IBR	GT2	GT6B	0,767810
IBR	GT108	GA12	0,728740
IBR	CA9	GT6B	0,712550
IBR	GT108	GT6B	0,699340
IBR	GT108	GT14	0,692910
IBR	GA12	GT14	0,689000
IBR	CA115	GT8	0,685530
IBR	CA118	GT8	0,679750
IBR	GT108	CA9	0,650110
IBR	CA118	GT2	0,628600
IBR	GA12	GT6B	0,624110
IBR	ATG9	GT108	0,607870
IBR	CA118	CAG5	0,600270

Continua

Desequilíbrio de Ligação nas populações de *Culex quinquefasciatus*. Valor de *P* significativo (*), após correção de Bonferroni ($P < 0,001$) (***)

População	Locus 1	Locus 2	P
IBR	ATG9	GT8	0,581210
IBR	GT8	TRI4	0,574220
IBR	GT108	GT8	0,573280
IBR	GT14	CAG5	0,571630
IBR	CA115	GT108	0,569060
IBR	CA115	GA12	0,566920
IBR	ATG9	CA118	0,541880
IBR	ATG9	GT6B	0,531320
IBR	CA115	ATG9	0,513060
IBR	GT108	CAG5	0,509740
IBR	GT14	GT6B	0,508320
IBR	ATG9	CAG5	0,500120
IBR	CA118	GA12	0,462300
IBR	GT14	GT8	0,444470
IBR	GT14	GT2	0,426460
IBR	CA115	GT6B	0,414870
IBR	CAG5	TRI4	0,408790
IBR	GA12	GT2	0,350110
IBR	CAG5	GT8	0,341840
IBR	CA115	CA118	0,327990
IBR	CA115	GT2	0,317150
IBR	ATG9	GA12	0,305770
IBR	GT2	GA12	0,268460
IBR	GT108	GT2	0,258940
IBR	GA12	CA9	0,257000
IBR	ATG9	GT2	0,254220
IBR	GA12	TRI4	0,251250
IBR	CA118	GT14	0,240990
IBR	GT108	TRI4	0,240600
IBR	GA12	CAG5	0,233210
IBR	GT14	CA9	0,232480
IBR	ATG9	TRI4	0,198140
IBR	GT2	GT8	0,182260
IBR	GT2	CA9	0,176660
IBR	CA9	CAG5	0,155490
IBR	CA115	CAG5	0,136660
IBR	GA12	GT8	0,130760
IBR	CA118	TRI4	0,126700
IBR	ATG9	CA9	0,112580
IBR	GT2	TRI4	0,108230
IBR	CA9	GT8	0,094550
IBR	CA9	TRI4	0,070900
IBR	CA115	TRI4	0,064940
PIQ	GT14	GT2	0,969110
PIQ	CA115	CAG5	0,961510
PIQ	GA12	CAG5	0,952090
PIQ	CA118	GT14	0,936720
PIQ	TRI4	GT6B	0,924830
PIQ	CAG5	TRI4	0,846070
PIQ	ATG9	GT2	0,820240
PIQ	CA118	CAG5	0,809740
PIQ	CA115	GA12	0,795390
PIQ	CA115	GT108	0,770930

Continua

Desequilíbrio de Ligação nas populações de *Culex quinquefasciatus*. Valor de *P* significativo (*), após correção de Bonferroni ($P < 0,001$) (***) (Conclusão)

População	Locus 1	Locus 2	P
PIQ	CA115	GT14	0,770820
PIQ	GA12	GT14	0,765540
PIQ	GT108	GT6B	0,762160
PIQ	GA12	GT8	0,755020
PIQ	ATG9	GT6B	0,754790
PIQ	CA115	CA118	0,748670
PIQ	GT8	TRI4	0,738710
PIQ	GT8	GT6B	0,722010
PIQ	CA115	GT2	0,710490
PIQ	GT14	CAG5	0,708920
PIQ	GT108	TRI4	0,704590
PIQ	GT2	CAG5	0,698770
PIQ	CA115	TRI4	0,680560
PIQ	GA12	TRI4	0,654520
PIQ	CA118	GT8	0,648270
PIQ	GA12	GT6B	0,646210
PIQ	GT2	TRI4	0,618450
PIQ	CAG5	GT6B	0,605120
PIQ	ATG9	GA12	0,600760
PIQ	GT2	CA9	0,592910
PIQ	CA118	CA9	0,585710
PIQ	CA118	GA12	0,522630
PIQ	GT2	GT8	0,520410
PIQ	GT14	GT6B	0,519910
PIQ	GT108	GT8	0,503220
PIQ	GT108	CAG5	0,487560
PIQ	CA115	GT8	0,467980
PIQ	CA118	TRI4	0,440810
PIQ	CA9	GT6B	0,433350
PIQ	GT2	GT6B	0,426020
PIQ	CA115	GT6B	0,421460
PIQ	CA9	CAG5	0,418470
PIQ	ATG9	CA118	0,416970
PIQ	GT108	GT2	0,395630
PIQ	CA9	TRI4	0,353900
PIQ	GT108	GT14	0,301130
PIQ	ATG9	TRI4	0,247500
PIQ	CA118	GT6B	0,241310
PIQ	ATG9	GT14	0,238490
PIQ	GT14	GT8	0,232080
PIQ	ATG9	CAG5	0,196050
PIQ	ATG9	GT108	0,191910
PIQ	GA12	CA9	0,150940
PIQ	ATG9	GT8	0,144860
PIQ	CA115	ATG9	0,118560
PIQ	CAG5	GT8	0,095420
PIQ	GA12	GT2	0,079520
PIQ	GT14	TRI4	0,078910
PIQ	GT108	CA9	0,064110
PIQ	CA118	GT2	0,058720
PIQ	CA118	GT108	0,046840*
PIQ	ATG9	CA9	0,039980*
PIQ	GT108	GA12	0,037600*
PIQ	CA115	CA9	0,029080*
PIQ	CA9	GT8	0,022170*

ANEXO 1- TABELA A2

Frequência alélica para os seis *loci* analisados nas populações de *Culex quinquesciatus*.

Locus	Alelo	ANH	ALV	BMX	IBR	PIQ
CA115	172	0,000	0,000	0,000	0,033	0,038
	174	0,000	0,000	0,033	0,000	0,019
	178	0,008	0,105	0,033	0,000	0,000
	180	0,092	0,053	0,150	0,017	0,000
	182	0,583	0,842	0,567	0,833	0,654
	184	0,033	0,000	0,033	0,067	0,096
	186	0,008	0,000	0,033	0,000	0,000
	188	0,125	0,000	0,067	0,000	0,058
	190	0,067	0,000	0,017	0,000	0,000
	192	0,083	0,000	0,067	0,050	0,135
ATG9	236	0,025	0,237	0,183	0,233	0,154
	239	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
	251	0,085	0,026	0,150	0,050	0,000
	254	0,186	0,105	0,167	0,217	0,231
	257	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
	260	0,415	0,447	0,383	0,300	0,519
	263	0,254	0,184	0,117	0,200	0,096
CA118	118	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
	206	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
	216	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000
	218	0,175	0,263	0,190	0,200	0,192
	220	0,550	0,579	0,638	0,550	0,654
	222	0,025	0,000	0,000	0,033	0,000
	224	0,075	0,053	0,103	0,100	0,058
	226	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019
	240	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019
	242	0,075	0,000	0,034	0,083	0,038
	244	0,058	0,053	0,034	0,017	0,019
	246	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
	248	0,017	0,000	0,000	0,017	0,000
GT108	112	0,017	0,079	0,000	0,000	0,000
	116	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038
	120	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
	124	0,167	0,158	0,167	0,200	0,015
	126	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
	128	0,017	0,000	0,050	0,000	0,000
	130	0,000	0,026	0,017	0,000	0,019
	132	0,450	0,500	0,283	0,467	0,500
	134	0,083	0,000	0,133	0,067	0,058
	138	0,050	0,132	0,033	0,050	0,077
	140	0,150	0,079	0,250	0,217	0,115
	142	0,033	0,000	0,067	0,000	0,077
	144	0,017	0,026	0,000	0,000	0,000
GA12	110	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
	112	0,381	0,289	0,217	0,400	0,231
	114	0,263	0,158	0,350	0,150	0,231
	122	0,000	0,026	0,050	0,000	0,077
	124	0,288	0,474	0,350	0,433	0,423
	126	0,051	0,053	0,033	0,017	0,038
GT14	161	0,324	0,421	0,345	0,417	0,231
	163	0,046	0,158	0,121	0,033	0,135
	165	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000
	167	0,565	0,395	0,448	0,483	0,577
	169	0,051	0,026	0,086	0,067	0,058

Continua

Frequência alélica para os seis *loci* analisados nas populações de *Culex quinquefasciatus*.

Locus	Alelo	ANH	ALV	BMX	IBR	PIQ
GT2	138	0,000	0,053	0,345	0,417	0,231
	140	0,400	0,553	0,121	0,033	0,135
	142	0,483	0,368	0,000	0,000	0,000
	144	0,000	0,000	0,448	0,483	0,577
	148	0,117	0,026	0,086	0,067	0,058
CA9	214	0,000	0,000	0,000	0,000	0,096
	218	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000
	220	0,000	0,000	0,133	0,000	0,000
	222	0,772	0,737	0,783	0,733	0,673
	226	0,175	0,079	0,067	0,183	0,154
	232	0,053	0,132	0,017	0,083	0,077
CAG5	272	0,881	0,921	0,967	0,900	0,904
	273	0,119	0,079	0,033	0,000	0,096
	278	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000
GT8	89	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000
	91	0,404	0,368	0,500	0,350	0,404
	93	0,167	0,316	0,167	0,250	0,154
	95	0,281	0,211	0,183	0,300	0,288
	97	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
	103	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000
	105	0,026	0,000	0,033	0,000	0,077
	113	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000
	115	0,009	0,000	0,050	0,083	0,038
	117	0,026	0,053	0,067	0,000	0,019
	119	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019
	121	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000
TRI4	112	0,000	0,079	0,000	0,000	0,000
	116	0,009	0,000	0,000	0,067	0,019
	119	0,733	0,842	0,767	0,767	0,750
	122	0,250	0,079	0,233	0,167	0,231
	125	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
GT6B	118	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000
	122	0,224	0,316	0,250	0,233	0,346
	124	0,129	0,237	0,200	0,250	0,288
	128	0,172	0,211	0,167	0,167	0,115
	130	0,310	0,158	0,300	0,250	0,192
	132	0,138	0,079	0,083	0,100	0,038
	134	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019

ANEXO 2- TABELA B1

Desequilíbrio de Ligação nas populações de *Culex nigripalpus*. Valor de *P* significativo (*), após correção de Bonferroni ($P < 0,001$) (***)

População	Locus 1	Locus 2	P
ANH	CA115	CTG10	0,78436
ANH	CA115	TRI4	0,82327
ANH	CTG10	TRI4	0,05257
ANH	CA115	GT6B	0,57079
ANH	CTG10	GT6B	0,12000
ANH	TRI4	GT6B	0,00446*
ANH	CA115	51	0,54353
ANH	CTG10	51	0,78396
ANH	TRI4	51	0,69733
ANH	GT6B	51	0,65366
ANH	CA115	59	0,35356
ANH	CTG10	59	0,71960
ANH	TRI4	59	0,62564
ANH	GT6B	59	0,31426
ANH	51	59	0,95376
BMX	CA115	CTG10	0,25208
BMX	CA115	TRI4	0,27901
BMX	CTG10	TRI4	0,39228
BMX	CA115	GT6B	0,64485
BMX	CTG10	GT6B	0,50990
BMX	TRI4	GT6B	0,19743
BMX	CA115	51	0,57545
BMX	CTG10	51	0,07871
BMX	TRI4	51	0,15515
BMX	GT6B	51	0,37525
BMX	CA115	59	0,13861
BMX	CTG10	59	0,16465
BMX	TRI4	59	0,99802
BMX	GT6B	59	0,56079
BMX	51	59	0,15277
IBR	CA115	CTG10	<0,0000***
IBR	CA115	TRI4	0,37149
IBR	CTG10	TRI4	0,53713
IBR	CA115	GT6B	0,04199*
IBR	CTG10	GT6B	0,00723*
IBR	TRI4	GT6B	0,11356
IBR	CA115	51	0,55733
IBR	CTG10	51	0,15337
IBR	TRI4	51	0,48495
IBR	GT6B	51	0,49059
IBR	CA115	59	0,17663
IBR	CTG10	59	0,02802*
IBR	TRI4	59	0,12733
IBR	GT6B	59	0,61446
IBR	51	59	0,68356
PIQ	CA115	CTG10	0,28347
PIQ	CA115	TRI4	0,34158
PIQ	CTG10	TRI4	0,40980
PIQ	CA115	GT6B	0,21921
PIQ	CTG10	GT6B	0,10762
PIQ	TRI4	GT6B	0,02406*
PIQ	CA115	51	0,30911
PIQ	CTG10	51	0,37168
PIQ	TRI4	51	0,57406

Continua

Desequilíbrio de Ligação nas populações de *Culex nigripalpus*. Valor de *P* significativo (*), após correção de Bonferroni ($P < 0,001$) (***) (conclusão)

População	Locus 1	Locus 2	P
PIQ	GT6B	51	0,28218
PIQ	CA115	59	0,48663
PIQ	CTG10	59	0,23891
PIQ	TRI4	59	0,16158
PIQ	GT6B	59	0,32495
PIQ	51	59	0,57000
PRV	CA115	CTG10	0,00139*
PRV	CA115	TRI4	0,27475
PRV	CTG10	TRI4	0,46990
PRV	CA115	GT6B	0,02574*
PRV	CTG10	GT6B	0,40000
PRV	TRI4	GT6B	0,02723*
PRV	CA115	51	0,16267
PRV	CTG10	51	0,46000
PRV	TRI4	51	0,05238
PRV	GT6B	51	0,19822
PRV	CA115	59	0,52198
PRV	CTG10	59	0,66356
PRV	TRI4	59	0,04980*
PRV	GT6B	59	0,20970
PRV	51	59	0,44079
SDS	CA115	CTG10	0,31317
SDS	CA115	TRI4	0,80505
SDS	CTG10	TRI4	0,24950
SDS	CA115	GT6B	0,84416
SDS	CTG10	GT6B	0,43851
SDS	TRI4	GT6B	0,16762
SDS	CA115	51	0,02525*
SDS	CTG10	51	0,07238
SDS	TRI4	51	0,27020
SDS	GT6B	51	0,40089
SDS	CA115	59	0,93683
SDS	CTG10	59	0,01000*
SDS	TRI4	59	0,59436
SDS	GT6B	59	0,17762
SDS	51	59	0,45307
SHA	CA115	CTG10	0,30594
SHA	CA115	TRI4	0,97000
SHA	CTG10	TRI4	0,00911*
SHA	CA115	GT6B	0,86782
SHA	CTG10	GT6B	0,00000***
SHA	TRI4	GT6B	0,03554*
SHA	CA115	51	0,18693
SHA	CTG10	51	0,45842
SHA	TRI4	51	0,01515*
SHA	GT6B	51	0,00109*
SHA	CA115	59	0,16911
SHA	CTG10	59	0,07277
SHA	TRI4	59	0,42426
SHA	GT6B	59	0,26257
SHA	51	59	0,15139

ANEXO 2- TABELA B2

Frequência alélica para os seis *loci* analisados nas populações de *Culex nigripalpus*

Locus	Alelo	ANH	BMX	IBR	PIQ	PRV	SDS	SHA
CA115	167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000
	169	0,067	0,000	0,200	0,200	0,183	0,200	0,083
	171	0,008	0,000	0,220	0,117	0,017	0,033	0,000
	173	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067
	175	0,008	0,000	0,040	0,000	0,017	0,017	0,000
	177	0,042	0,133	0,000	0,000	0,000	0,017	0,017
	179	0,492	0,533	0,360	0,517	0,483	0,467	0,383
	181	0,225	0,117	0,100	0,100	0,183	0,083	0,317
	183	0,075	0,133	0,040	0,017	0,017	0,150	0,117
	185	0,067	0,083	0,020	0,050	0,100	0,017	0,000
	187	0,008	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000
	189	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
CTG10	100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067
	106	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,417
	109	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
	112	0,342	0,333	0,480	0,267	0,333	0,367	0,050
	115	0,008	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000
	118	0,625	0,667	0,440	0,683	0,600	0,633	0,450
	121	0,025	0,000	0,080	0,017	0,067	0,000	0,000
TRI4	107	0,258	0,150	0,280	0,283	0,150	0,217	0,133
	113	0,708	0,767	0,720	0,683	0,567	0,683	0,483
	119	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	122	0,033	0,050	0,000	0,033	0,283	0,100	0,350
	125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
GT6b	100	0,167	0,067	0,160	0,333	0,300	0,217	0,317
	102	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,383
	104	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	106	0,642	0,617	0,580	0,533	0,533	0,483	0,167
	108	0,175	0,317	0,260	0,133	0,167	0,300	0,133
CxqGT51	80	0,067	0,033	0,120	0,100	0,150	0,083	0,200
	83	0,325	0,267	0,340	0,317	0,317	0,367	0,383
	86	0,233	0,400	0,240	0,267	0,283	0,267	0,217
	89	0,300	0,250	0,200	0,200	0,150	0,200	0,117
	92	0,075	0,050	0,100	0,117	0,100	0,083	0,083
Cxpq59	116	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	120	0,083	0,083	0,080	0,100	0,133	0,117	0,117
	122	0,342	0,383	0,180	0,200	0,183	0,183	0,183
	124	0,258	0,267	0,220	0,267	0,267	0,267	0,233
	126	0,192	0,200	0,220	0,250	0,250	0,267	0,267
	128	0,017	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
	130	0,058	0,050	0,100	0,083	0,100	0,100	0,133
	132	0,042	0,017	0,100	0,100	0,067	0,067	0,067