Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Estudos taxonômicos de espécies do gênero
Culex (Diptera: Culicidae) da região Neotropical,
utilizando a subunidade I do gene mitocondrial
citocromo oxidase**

Bruna Demari e Silva

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Grauação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre.**

**Área de Concentração: Epidemiologia
Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo
Marrelli**

São Paulo
2009

**Estudos taxonômicos de espécies do gênero
Culex (Diptera: Culicidae) da região Neotropical,
utilizando a subunidade I do gene mitocondrial
citocromo oxidase**

Bruna Demari e Silva

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Grauação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre.**

**Área de Concentração: Epidemiologia
Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo
Marrelli**

**São Paulo
2009**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A minha mãe, por todo
amor, carinho e apoio
incondicionais.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli, por acreditar na minha capacidade, pela enorme paciência em me ensinar, por me apoiar e por ter me dado esta oportunidade.

À Prof. Dra. Maria Anice Mureb Sallum, por ter cedido os mosquitos para este trabalho, pelo incentivo a esta pesquisa, pelos ensinamentos valiosos, pelo tempo que passou me ajudando e pela paciência em tirar todas as minhas dúvidas. Sem ela esse projeto não teria acontecido.

Ao Prof. Dr. Delsio Natal pelas valiosas sugestões dadas na minha qualificação.

Ao Dr. Lincoln Suesdek por ter aceitado o convite para fazer parte da banca e pelas sugestões.

À Dra. Cecília Simões Santos pelas aulas de bioquímica e biologia molecular.

A Capes pela bolsa.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao laboratório.

Aos antigos companheiros de laboratório Daniela Calado e Pedro Pedro por me socorrerem e ajudarem quando ainda não sabia usar os aparelhos do laboratório.

À minha amiga e companheira de laboratório Fabiana Tavares Vesgueiro, por compartilhar tanto os momentos de dúvida, quanto os aprendizados, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, por dividir também os momentos de alegria e descontração, enfim por estar comigo desde o começo desta empreitada.

Aos atuais companheiros de laboratório, Sérgio, Daniel, Walter e Sirlei, por tirarem os PCRs do termociclador, por compartilharem seus resultados, por suportarem os eventuais períodos de mau humor, e por qualquer outra ajuda que eu tenha esquecido de mencionar aqui.

A nossa técnica de laboratório Dulce pelas conversas e por toda ajuda.

Aos meus amigos de mestrado Kênia, Eli, Renato, Sandrinha, Shirley, Maysa, Edlaine, Selma, Cleiton pelos momentos de descontração e risadas na escada da facul, pelas reuniões acadêmicas “muito sérias” que ocorriam às quartas, por compartilharem os momentos de angústia também, pela companhia na hora do almoço no bandeirão, pela já extinta hora do café, em suma, pela amizade e carinho de todos vocês.

Às minhas amigas de sempre Débora e Vivian, pela disponibilidade em me ouvir.

Aos amigos que estão longe, mas que foram importantes em vários momentos da minha vida.

Ao meu pai pela ajuda e força dada nos últimos tempos e por me ensinar a amar a biologia.

Ao meu irmão que mesmo de longe sempre me apóia e dá forças para seguir em frente.

“Somos construídos como máquinas gênicas e cultivados como máquinas mêmicas, mas temos o poder de nos revoltarmos contra nossos criadores.”

Richard Dawkins

RESUMO

Diversas espécies de mosquitos do gênero *Culex* Linnaeus são vetores de nematóides que causam filariose linfática (*Wuchereria bancrofti*) e de vários arbovírus, incluindo o Vírus do Nilo Ocidental (VNO) que causa encefalites em animais e humanos. Embora seja o maior gênero da família Culicidae, com 763 espécies conhecidas, pouco se sabe sobre a taxonomia e as relações filogenéticas do grupo. Considerando-se a grande diversidade de espécies do gênero *Culex*, as dificuldades para a identificação morfológica, devidas principalmente ao fato das fêmeas serem morfológicamente muito similares, o presente trabalho teve como objetivos: (1) Solucionar problemas relacionados à nomenclatura; (2) Estimar as relações filogenéticas entre espécies de diferentes subgêneros; (3) Examinar o monofiletismo de subgêneros da Região Neotropical; (4) Estimar as relações evolutivas entre subgêneros neotropicais; (5) Estimar a posição filogenética do gênero *Lutzia* em relação à *Culex*; (6) Discutir sobre a utilização do gene citocromo c oxidase da subunidade I (COI) para o gênero *Culex*. Foram analisadas sequências correspondentes a um fragmento de 478 pares de bases do gene COI de 36 indivíduos pertencentes a 16 espécies do gênero *Culex*. Foram avaliadas espécies de quatro subgêneros, *Culex*, *Phenacomyia*, *Melanoconion* e *Microculex* e uma espécie do gênero *Lutzia*. As sequências do gene COI foram comparadas através das análises de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Bayesiana. Os resultados das análises das sequências de COI, utilizando ao modelo de Kimura 2-parâmetros, de *Culex dolosus*, *Culex mollis* e *Culex imitator*, demonstram a presença de divergências intraespecíficas altas (3,1%, 2,3% e 3,5%, respectivamente). Os valores do modelo Kimura 2-parâmetros indicam que essas taxa podem representar complexos de espécies. As topologias de MV, MP e Bayesiana mostraram que tanto o gênero *Culex* como o subgênero *Culex* são parafiléticos, pois o primeiro não inclui o gênero *Lutzia* e o segundo exclui o *Phenacomyia*. Os resultados indicam que *Lutzia* é subgênero de *Culex* e *Phenacomyia* um

grupo monofilético do subgênero *Culex*. O marcador molecular COI foi de fácil utilização e análise, provando ser ferramenta útil para estudos filogenéticos e para a taxonomia molecular de *Culex*.

Palavras Chave: *Culex*, taxonomia molecular, COI.

ABSTRACT

Species of the genus *Culex* Linnaeus mosquitoes have been pointed out as the main vectors of lymphatic filariases. Furthermore, they are important vectors of encephalitis across the world, including the West Nile Virus. Although being the major genus in Culicidae family, with 763 valid species, *Culex*, in a taxonomic and phylogenetic sense, is one of the least known. Considering the great diversity of species of mosquitoes in this genus, and the fact that females of several species are very similar morphologically, the present study aimed to: (1) Solve problems related to nomenclature (2) estimate the phylogenetic relationships of species used in the work; (3) examine the monophyly of subgenera of the Neotropical Region; (4) estimate the evolutionary relationships between neotropical subgenera; (5) estimate the phylogenetic position of the genus *Lutzia* in the *Culex*, (6) discuss the use of the gene cytochrome c oxidase subunit I (COI) to the genus *Culex*. We analyzed sequences corresponding to a fragment of 478 base pairs of the COI gene of 36 individuals belonging to 16 species of the genus *Culex*. Species were evaluated in four subgenera, *Culex*, *Phenacomyia*, *Melanoconion* and *Microculex* and one species of the genus *Lutzia*. The COI gene sequences were compared using analysis of Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian. The results of the analysis of the COI sequences, used the model of Kimura 2-parameters of *Culex dolosus*, *Culex mollis* and *Culex imitator*, demonstrate the presence of high intraspecific divergence (3.1%, 2.3% and 3.5% respectively). These values indicate that these taxa may represent complexes of species. The topologies of ML, MP and Bayesian showed that both genus *Culex* as subgenus *Culex* are paraphyletic because the first does not include the genus *Lutzia* and the second excludes the *Phenacomyia* subgenus. The results indicate that *Lutzia* is a subgenus of *Culex* and *Phenacomyia* is a monophyletic group of subgenus *Culex*. The molecular marker COI was easy to use and analyzing, proving to be useful tool for phylogenetic studies and the molecular taxonomy of *Culex*.

Keywords: *Culex*, molecular taxonomy, COI.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 FAMÍLIA CULICIDAE	8
1.2 O GÊNERO <i>CULEX</i> LINNAEUS	9
1.3 DISTRIBUIÇÃO E BIOLOGIA DOS MOSQUITOS DO GÊNERO <i>CULEX</i>	12
1.4 ALGUMAS ESPÉCIES DE <i>CULEX</i> COM IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	13 17
1.5 TÉCNICAS MOLECULARES E MÉTODOS BASEADOS NO DNA	18
1.6 O DNA MITOCONDRIAL E O GENE COI	20
1.7 MÉTODOS DE ANÁLISES EVOLUTIVAS	23
1.8 JUSTIFICATIVA	26
1.9 OBJETIVOS	27
2 MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1 COLETA E PROCEDÊNCIA DOS ESPÉCIMES	28
2.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	28
2.3 REAÇÕES EM CADEIA PELA	

	12
POLIMERASE (PCR)	31
2.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	31
2.6 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	32
2.7 SEQUENCIAMENTO	33
2.8 ANÁLISE DAS SEQUENCIAS	34
2.9 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	34
2.9.1 Análise de Máxima Parcimônia (MP)	34
2.9.2 Análise de Máxima Verossimilhança (MV)	35
2.9. 3. Análise Filogenética Bayesiana	36
3 RESULTADOS	37
3.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	41
3.1.1 Análise de Máxima Parcimônia	41
3.1.2 Análise de Máxima Verossimilhança	42
3.1.3 Análise Bayesiana	44
4 DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÕES	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida dos mosquitos do gênero <i>Culex</i>	13
Figura 2: Distribuição geográfica aproximada do vírus do Nilo Ocidental	14
Figura 3: Distribuição geográfica da filariose linfática	16
Figura 4: Mapa ilustrando as populações em risco para filariose bancroftiana, no ano de 2006.	17
Figura 5: Topologia de consenso estrito de Máxima Parcimônia	44
Figura 6: Topologia de Máxima Verossimilhança	45
Figura 7: Topologia Bayesiana	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de espécies utilizadas no trabalho, códigos e seus respectivos locais de coleta.	29
Tabela 2. Composição de nucleotídeos dos 36 Indivíduos estudados	38
Tabela 3. Média das distâncias entre as sequências Utilizando o algoritmo p-distance não corrigido	39
Tabela 4. Matriz de divergência, utilizando o modelo p-distance não corrigido.	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA CULICIDAE

A família Culicidae da ordem Diptera alberga aproximadamente 3.490 espécies (HARBACH, 2007). É uma das famílias mais primitivas dentro de Diptera (CAMERON et al., 2007), e são encontrados em quase todas as regiões do mundo, exceto aquelas que são permanentemente congeladas (FORATTINI, 2002). Três quartos de todos os mosquitos vivem nos trópicos e subtropicais, onde o ambiente úmido e o clima quente ajudam no rápido desenvolvimento do adulto, e a diversidade do ambiente, contribuem para evolução de muitas espécies (CLEMENTS, 1992).

Mosquitos são insetos de corpo delgado, com pernas longas que são facilmente reconhecidos por possuírem uma probóscida longa, além da presença de escamas em diversas partes do corpo (HARBACH, 2007). Assim como em outros grupos de Diptera, os mosquitos apresentam metamorfose completa, passando pelos estágios de larva e pupa que apresentam biologia e ecologia diferentes dos adultos (CLEMENTS, 1992).

Muitas espécies da família Culicidae são vetores de agentes infecciosos que podem causar diversas doenças em humanos e animais domésticos. Os agentes patogênicos transmitidos por esses mosquitos incluem vírus (arbovírus), filárias (nematóides), além de protozoários. Menos do que 150 espécies compreendidas nos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* são

responsáveis indiretamente pela alta morbidade e mortalidade entre humanos do que qualquer outro grupo de organismo (HARBACH, 2007).

Apesar do impacto causado pelos culicídeos na saúde humana e no desenvolvimento econômico, pouco se sabe a respeito de sua evolução e filogenia. Embora existam dúvidas a respeito do monofiletismo do grupo, três características morfológicas sustentam essa teoria: presença de escamas eretas forquilhadas na cabeça, partes do aparelho bucal dispostos em uma probóscida longa e a presença de cerdas pré-alares (HARBACH & KITCHING, 1998). A família Culicidae albergava três subfamílias: Toxorhynchitinae, Anophelinae e Culicinae, sendo a última subdividida em múltiplas tribos (CLEMENTS, 1992). No entanto, os resultados das análises morfológicas de HARBACH & KITCHING (1998) demonstraram que a subfamília Toxorhynchitinae compreende uma tribo dentro de Culicinae.

1.2 O GÊNERO *CULEX* LINNAEUS

O gênero *Culex* pertence à tribo Culicini, sendo o maior gênero da família Culicidae com 23 subgêneros e 763 espécies (HARBACH, 2007). Diversas espécies de mosquitos do gênero *Culex* são vetores de nematóides que causam filariose linfática (*Wuchereria bancrofti*) e de vários arbovírus, que causam encefalites em animais e em humanos (FORATTINI, 2002). Apesar disso, ele é um gênero pouco estudado (MILLER et al., 1996).

Até 2002 eram reconhecidos 13 subgêneros nas Américas: *Culex* Linnaeus, 1758; *Lutzia* Theobald, 1903; *Melanoconion* Theobald, 1903; *Aedinus* Lutz, 1904; *Carrollia* Lutz, 1905; *Neoculex* Dyar, 1905; *Micraedes* Coquillett, 1906; *Tinolestes* Coquillett, 1906; *Microculex* Theobald, 1907; *Anoediopora* Dyar, 1923; *Allimanta* Casal & Garcia, 1968; *Belkinomyia* Adames & Galindo, 1973; *Phenacomyia* Harbach & Peyton, 1992 e *Nicaromyia* Broche & Rodríguez, 2001. A maior parte das espécies da Região Neotropical pertence aos subgêneros *Melanoconion* e *Culex*. Estes subgêneros têm maior atenção epidemiológica, pois transmitem agentes causadores de arboviroses e filaríoses, dentre outros patógenos (FORATTINI, 2002; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Em 2008 foi descrito um novo subgênero neotropical *Phytotelmatomyia* Rossi & Harbach.

Análise de parcimônia utilizando 30 características do aparelho bucal de larvas de oito subgêneros neotropicais de *Culex*, realizada para inferir as relações filogenéticas entre membros da tribo Culicini, colocava o subgênero *Lutzia* como um táxon mais basal, sendo grupo irmão de *Phenacomyia* (NAVARRO & LIRIA, 2000). Estudo posterior tratou *Lutzia* como um gênero distinto de *Culex* e denominou dois novos subgêneros (*Metalutzia* e *Insulalutzia*) (TANAKA, 2003). Contudo, as relações filogenéticas dentro de *Culex* permanecem incertas, com as espécies apresentando formas e características polimórficas (HARBACH, 2007).

Além das dúvidas em relação ao monofiletismo de *Culex*, a identificação das espécies contidas nesse gênero ainda é dificultada pela falta de

características marcantes nas fêmeas adultas. Assim, a genitália dos machos tem sido considerada mais adequada para a identificação das espécies. Da mesma maneira, características das larvas de quarto instar possibilitam a separação das espécies de *Culex*. No entanto, a identificação de espécies de alguns subgêneros, tais como *Melanoconion* e *Microculex*, é bastante dificultada pela falta de chaves de identificação atualizadas e que incluam todos os taxa descritos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Acresce considerar que muitos mosquitos desse gênero também podem constituir complexos de espécies. Estes são formados por espécies que são reprodutivamente isoladas, mas que são muito semelhantes morfologicamente, ou até mesmo indistinguíveis (WALTON et al., 1999). Muitas vezes eles também podem envolver espécies vetoras e não vetoras que vivem em simpatria, tornando ainda mais difícil a identificação por meio de chaves taxonômicas.

O subgênero *Culex* possui dois complexos de grande importância epidemiológica: o Complexo Pipiens (*Cx. quinquefasciatus* Say, *Cx. pipiens* L., *Cx. australicus* Dobrotworsky & Drummond e *Cx. pallens* Coquillett), e o Complexo Coronator (*Cx. coronator*, *Cx. ousqua*, *Cx. usquatus*, *Cx. camposi*, *Cx. usquatissimus*) (BRAM, 1967). A única característica morfológica utilizada para distinguir as espécies dos dois complexos é baseada na comparação das estruturas da genitália dos machos, sendo que as fêmeas são morfologicamente indistinguíveis (FORATTINI, 2002).

1.3. DISTRIBUIÇÃO E BIOLOGIA DOS MOSQUITOS DO GÊNERO *CULEX*

Os mosquitos do gênero *Culex* têm distribuição mundial e podem ser encontrados tanto na Região Neártica como na Neotropical onde a diversidade de espécies é maior, com mais de 320 espécies descritas (FORATTINI, 2002; HARBACH, 2007).

Seus criadouros podem variar de depósitos artificiais no solo ou recipientes, com água rica em matéria orgânica em decomposição e detritos, como ocorre com muitas espécies do subgênero *Culex*, até recipientes naturais como bromélias (*Microculex* e *Carrollia*) ou grandes coleções de água no solo como charcos, alagados e lagos como ocorre com algumas espécies de *Melanoconion*. Os ovos são depositados na superfície da água, e com exceção de algumas espécies de *Melanoconion*, têm aspecto de "jangada" (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). O ciclo de vida dos mosquitos do gênero *Culex* está ilustrado na **Figura 1**.

Os adultos têm hábitos predominantemente noturnos e, embora algumas espécies sejam preferencialmente antropofílicas, a maior parte se alimenta preferencialmente de sangue de aves, que são reservatórios naturais de diversos arbovírus causadores de encefalites. Dessa forma, os mosquitos mantêm o ciclo silvestre de agentes infecciosos, tornando-se vetores potenciais ao homem. Além disso, algumas espécies, tal como o *Culex quinquefasciatus* Say, tornaram-se sinantrópicas, reproduzindo-se em águas poluídas e evoluindo para hábitos altamente domiciliados. Assim, a simples presença do

mosquito se torna um incômodo, levando à baixa qualidade de vida, à desvalorização econômica e reduzindo a eficiência do trabalho (FORATTINI, 2002).

Figura 1: Ciclo de vida dos mosquitos do gênero *Culex*.

1.4 ALGUMAS ESPÉCIES DE *CULEX* DE IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA:

Espécies do complexo *Culex pipiens* são os vetores mais importantes do Vírus do Nilo Ocidental (VNO) na América do Norte (ANDERSON et al.; 2000; TURELL et al., 2001). De acordo com Hayes, citado por TURELL (2001), “West Nile virus, a member of the encephalitis virus serogroup in the family Flaviviridae, has the potencial to cause febrile illness, encephalitis, and occasionally death in humans” (p 130), e tem como hospedeiros naturais as

aves (TEMPELIS, 1974). A excelente adaptação ao ambiente urbano, somada à preferência de se alimentar em aves e humanos, fazem com que essas espécies sejam vetores eficientes desse vírus, bem como de outros arbovírus responsáveis por encefalites (FORATTINI, 2002). Acresce considerar que o VNO pode ser transmitido verticalmente da fêmea para os descendentes (TURELL, 2001). Como mostra a **Figura 2**, o VNO ocorre na África, Ásia, Europa e América do Norte.

Fonte:Centers for Disease Control

Figura 2: Distribuição geográfica mundial aproximada do vírus do Nilo Ocidental. Fonte CDC, acessado em 15/06 de 2009.

O *Culex quinquefasciatus* é considerado o vetor primário da filariose bancroftiana (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002), doença que prevalece em regiões subdesenvolvidas (**Figura 3**). Sua predileção pelo sangue humano (o homem é o único hospedeiro da *Wuchereria bancrofti*) conjuntamente com seus hábitos noturnos – durante a noite ocorre microfilaremia periférica – facilitam o contato do mosquito com o parasito, tornando-o um vetor mais eficaz do que outros culicíneos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). No Brasil, embora a incidência de filariose tenha diminuído muito nos últimos trinta anos, algumas localidades ainda apresentam população em risco de contaminação pelo parasito, como mostra a **Figura 4**. A filariose bancroftiana é considerada pelo próprio Ministério da Saúde uma das doenças negligenciadas no Brasil.

Figura 3: Distribuição geográfica mundial da filariose linfática. Fonte: ASNOM acessado em 15/06 de 2009.

Além da filariose bancroftiana, o *Cx. quinquefasciatus* já foi encontrado naturalmente infectado com o vírus Oropouche. Entretanto, segundo Pinheiro e colaboradores, citados por FORATTINI (2002):

“No que concerne ao quadro febril atribuído à infecção pelo arbovírus Oropouche, embora esse agente tenha sido isolado de *Cx. quinquefasciatus* encontrado naturalmente infectado, o papel desse mosquito parece não ser apreciável como vetor urbano. Assim, ele somente tem mostrado competência experimental quando da ocorrência de viremia em níveis muito elevados. Essa situação, rara no ser humano, elimina virtualmente a capacidade vetora desse culicídeo em relação a essa arbovirose.” (p 699).

Nos Estados Unidos essa espécie também é responsável pela transmissão do vírus causador da encefalite de São Luís (FORATTINI, 2002).

Figura 4: Mapa ilustrando a população em risco para filariose bancroftiana, no ano de 2006.

Fonte: Ministério da Saúde acessado em 15/06 de 2009.

O *Culex nigripalpus* Theobald já foi encontrado naturalmente infectado pelo vírus da encefalite de São Luís (VESL) na região do Vale do Ribeira, Sudeste do país. Esse encontro levou à hipótese de que essa espécie participa da dinâmica da transmissão natural do vírus, que pode ocorrer no ambiente peridomiciliar (FORATTINI et al., 1995). Nos EUA é considerado responsável

pela transmissão do VESL e, na República Dominicana do vírus da encefalite do tipo leste (MICHELL et al., 1979; DAY & CURTIS, 1999).

O *Culex coronator* Dyar & Knab tem sido encontrado naturalmente infectado por alguns arbovírus, dentre eles VESL (no Brasil e em Trinidad e Tobago), e Vírus da Encefalite Equina Venezuelana no México (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Dessa espécie já foram isolados o Vírus da Encefalite Mucambo, na região amazônica brasileira (FORATINI, 2002).

Algumas espécies do subgênero *Melanoconion* já foram encontradas com infecção natural por alguns vírus causadores de encefalites (NATAL, 1981), juntamente com o subgênero *Culex*, encerra os grupos de maior interesse epidemiológico do gênero *Culex* (FORATTINI, 2002).

1.5 TÉCNICAS MOLECULARES E MÉTODOS BASEADOS NO DNA

A primeira técnica molecular que se tornou bastante empregada em sistemática foi a eletroforese de proteínas conhecidas como Aloenzimas e Isoenzimas. As aloenzimas são uma variação de proteínas de um locus gênico que se comporta de forma claramente Mendeliana. Dessa forma, pode ser interpretado como um simples produto de um alelo gênico. Já as isoenzimas são uma classe mais ampla, a qual engloba todas as variantes observadas em géis de eletroforese, incluindo produtos de múltiplos loci, variações que ocorrem no processo de tradução, entre outras alterações (AVISE, 1994). Essa técnica começou a ser empregada na década de 1960 e foi amplamente utilizada em

estudos de taxonomia e sistemática filogenética de diversos organismos, inclusive artrópodes (SELANDER, 1983; URBANELLI, 2000; MONTEIRO et al., 2002).

Durante a década de 1970 a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA - Restriction Fragment length polymorfism (RFLPs) -, também passou a ser utilizada em estudos de sistemática (AVISE, 1994). Com o emprego desta técnica foram analisadas diversas populações de anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus*, além de *Culex quinquefasciatus* e de *Aedes aegypti* (FORATTINI, 2002).

Em 1983, a Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) foi descrita por Kary Mullis revolucionando a genética molecular. A reação de PCR possibilitou uma nova estratégia na análise dos genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de sequências específicas de DNA *in vitro* (FARAH, 2000). Tal técnica também permitiu um melhor aproveitamento das informações filogenéticas contidas tanto nas sequências de DNA nuclear quanto do DNA citoplasmático (AVISE, 1994), e sua maior vantagem é ser eficaz com pequenas quantidades de DNA.

A técnica de PCR possibilitou aumento nas classes de marcadores moleculares para um número ilimitado de marcadores altamente polimórficos. As técnicas de PCR aliadas a outras, como clonagem de produtos de PCR e sequenciamento genômico, possibilitaram o acúmulo rápido de informações sobre os genomas dos eucariotos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares geram altos níveis de polimorfismo em comparação aos marcadores morfológicos e geralmente não apresentam efeitos epistáticos ou pleiotrópicos em relação aos fenótipos e possibilitam a caracterização do genótipo de indivíduos a partir de amostras celulares ou teciduais (BORTOLOTO, 2006). Assim, o advento da PCR tornou possível o estudo de espécimes incompletos ou danificados, difíceis de serem identificados morfolologicamente, assim como de exemplares depositados em museus, espécies de pequeno porte e animais fossilizados (WALTON et al., 1999).

Dessa forma, a genética molecular corrobora com a taxonomia clássica em diversas questões de nomenclatura e identificação de espécies. Do ponto de vista epidemiológico, essa colaboração é importante para programar medidas mais efetivas de controle de vetores.

1.6 O DNA MITOCONDRIAL E O GENE COI

Recentemente, graças às inúmeras vantagens quanto à sua estrutura e evolução, a análise de sequências do DNA mitocondrial (DNAMt) tem se tornado o método de escolha em estudos populacionais, taxonômicos e filogenéticos.

A organização do DNAMt dos animais é relativamente simples, sendo constituída, na grande maioria dos casos, por uma dupla fita circular contendo 37 genes, dos quais dois codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam RNAs

transportadores e 13 codificam proteínas. Além desses genes, o DNAm possui uma região não-codificante, que é responsável pelo controle da replicação e transcrição do genoma da mitocôndria. Esta região, denominada região controle ou D-Loop em vertebrados, é extremamente rica em adenina e timina, sendo conhecida também como região rica em A+T em invertebrados. (GODDARD & WOLSTENHOLME, 1978, 1980; CLARY & WOLSTENHOLME, 1985). Em 1996, CACCONI e colaboradores sequenciaram a região rica em A+T de seis espécies pertencentes ao complexo *Anopheles gambiae* e se surpreenderam com o fato de essa região evoluir menos nessas espécies do que a terceira posição de outros dois genes mitocondriais (ND4 e ND5). Tal resultado surpreendeu, uma vez que regiões não codificantes geralmente evoluem mais rapidamente do que as codificadoras.

Quando comparado ao DNA nuclear, o DNAm apresenta inúmeras vantagens: possui múltiplas cópias por célula; seu genoma haplóide é de origem materna, não sofre processos de recombinação gênica; os íntrons estão ausentes em muitos invertebrados; os erros de replicação e as altas concentrações de compostos de oxigênio, capazes de danificar o DNA, aliados a um sistema de reparo pouco eficiente, parecem acumular mutações (WILSON et al., 1985; MORITZ et al, 1987). Essas características, fazem com que o DNAm seja amplamente utilizado em estudos de genética de populações, padrões de evolução e filogenia molecular (HARRISON, 1989).

O gene COI (Citocromo Oxidase subunidade I) é responsável pela produção de uma pequena e conservada proteína heme (citocromo c), a qual

está envolvida no transporte de elétrons e na translocação de prótons através da membrana (SARASTE, 1990), e no mecanismo de apoptose (morte celular) em diversos organismos (ZHAO et al., 2008). É o maior e mais utilizado das três subunidades do gene citocromo do DNA mitocondrial (CLARY & WOLSTEINHOLME, 1985; BEARD et al., 1993).

Recentemente, esse gene foi utilizado em análises de genética populacional, identificação de espécies crípticas, filogenia e filogeografia de diversos grupos da Família Culicidae (SALLUM et al., 2002; PATSOULA et al., 2007; SCARPASSA & CONN, 2006; SAEUNG et al., 2007; SCARPASSA et al., 2008), provando ser uma ferramenta importante para a taxonomia, sistemática filogenética e genética de populações. Quando comparado ao gene nuclear Gpdh (Glicerol 3-fosfato desidrogenase) a taxa de substituição pode ser até 1,6 vezes maior no marcador mitocondrial do que no marcador nuclear. Entretanto, essas altas taxas de substituições por transições no gene COI somente foram constatadas em espécies muito próximas do gênero *Drosophila*, sendo que as taxas de transição em espécies mais distantes foram menores. As árvores filogenéticas produzidas com o COI também foram menos consistentes do que as filogenias produzidas com o gene Gpdh (GOTO & KIMURA, 2001).

Um estudo conduzido por HERMMERTER et al. (2009) analisou populações de *Culex annulirostris* e *Culex paupalis* da Austrália, empregando sequências do gene COI e do gene nuclear acetilcolina esterase 2 (ACE-2). Os resultados das análises realizadas com os marcadores não foram congruentes. Dessa maneira, o marcador mitocondrial COI superestimou a diversidade das

espécies, graças às suas altas taxas de substituição. Por outro lado, os resultados das análises do gene ACE-2 demonstraram a presença de menor diversidade genética nas espécies. Por isso, os autores concluíram que seria adequado utilizar as informações contidas em marcadores do genoma mitocondrial, juntamente àquelas de genes nucleares.

No entanto, um fragmento do gene COI foi utilizado satisfatoriamente para identificar 53 espécies pertencentes a nove gêneros e três subfamílias de Culicidae no Canadá. Assim, o marcador COI provou ser um marcador de fácil análise, com informações suficientes para permitir a identificação de mosquitos em nível de espécies (CYWINSKA et al., 2006).

1.7 MÉTODOS DE ANÁLISES EVOLUTIVAS

Embora os métodos morfológicos sejam muito úteis em uma grande variedade de situações, há muito mais instâncias em que eles não podem ser aplicados, pois não existem características morfológicas suficientes compartilhadas entre organismos mais distantemente relacionados (SOGIM et al. 1998). Além disso, os dados morfológicos tendem a colocar uma quantidade bem menor de características à disposição do pesquisador, pois não é possível fazer comparações significativas entre alguns grupos de bactérias, animais e plantas, para citar alguns exemplos.

O objetivo da análise filogenética é inferir as relações evolutivas entre três ou mais taxa através de caracteres (pode ser de aminoácidos, nucleotídeos

ou códons) de membros representativos de cada espécie (SCHADT et. al., 1998). Os métodos mais importantes utilizados para inferência filogenética, utilizando sequências gênicas, são os seguintes: métodos de distâncias, máxima parcimônia, máxima verossimilhança e Bayesiana.

Os métodos baseados em distância são considerados os mais simples. Nesses métodos, todas as distâncias evolucionárias entre os pares de bases entre sequências alinhadas são calculadas. Essas distâncias são utilizadas na construção de árvores que melhor expliquem essas mesmas distâncias (FOSTER, 2007). Assim, métodos baseados em distâncias entre sequências são os mais rápidos para os computadores na obtenção dos resultados, o que facilita o seu uso na análise de grandes quantidades de OTUs - unidades taxonômicas operacionais ou táxons (TAMURA & NEI, 1993).

Os métodos baseados em parcimônia (YANG & KUMAR 1996) se orientam no princípio de que uma mudança é mais provável do que duas, procurando uma árvore que minimize o número de passos necessários para explicar os padrões observados nos dados (SWOFFORD, 1998). Nessa análise as mudanças são equiprováveis e, assim, não é dado peso para os caracteres. Portanto, após os sítios informativos serem selecionados, a árvore que requer o menor número de mudanças (menor comprimento) é selecionada como a mais parcimoniosa.

Muitos autores preferem o método da máxima verossimilhança em análises de dados moleculares, já que estudos recentes baseados em simulações levam à conclusão que esse método é geralmente mais acurado

para inferir a árvore do que os outros existentes (GUINDON & GASCUEL, 1987; LIÓ & GOLDMAN, 1998). Especificamente no método de reconstrução de árvores filogenéticas baseado em máxima verossimilhança é necessário estabelecer um algoritmo de busca para obter a melhor topologia, e, nesta análise, os caracteres recebem pesos. O ideal seria avaliar todos os arranjos possíveis e escolher aquele que apresentasse o valor máximo de verossimilhança, sendo que o número de combinações possíveis de árvores é muito grande - para 10 sequências, o número de árvores excede a $2,0 \times 10^6$ (DAY, 1987). Portanto, a obtenção de uma topologia ótima é impossível para um número grande de sequências. Assim, os métodos existentes até hoje são baseados em buscas heurísticas que produzem árvores perto das ótimas. Para cada um dos modelos apresentados podem ser derivadas fórmulas para cálculos de distâncias entre seqüências, a partir das probabilidades de substituição.

Na década passada, a análise Bayesiana passou a ser incluída no repertório dos filogeneticistas. Na análise Bayesiana as árvores também se baseiam em verossimilhança, só que os valores não são otimizados como na análise de máxima verossimilhança. Assim, os resultados são expressos em termos de probabilidade posterior, levando em conta todos os parâmetros. A probabilidade posterior não pode ser calculada diretamente, mas pode ser aproximada pelo método MCMC (Markov chain Monte Carlo). Esse é um processo computacional que amostra as topologias das árvores, o tamanho dos ramos, e o modelo dos parâmetros em proporção às suas probabilidades

posteriores. As árvores com maior probabilidade posterior são mais amostradas do que as outras. Essa cadeia vai de um estado para outro por milhares de mudanças ou gerações (FOSTER, 2007).

1.8 JUSTIFICATIVA

Considerando o escasso conhecimento sobre a taxonomia e as relações filogenéticas de mosquitos do gênero *Culex*, a sua importância epidemiológica, a grande diversidade de espécies de mosquitos aliada às dificuldades na identificação morfológica das espécies de mosquitos desse gênero, principalmente devido ao fato das fêmeas serem morfológicamente muito similares, a presente dissertação foi centrada na análise de espécies de mosquitos pertencentes a este gênero. A utilização de marcadores moleculares, como o gene COI (subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase) utilizado neste estudo, mostra ser uma importante ferramenta taxonômica e filogenética, em conjunto com análises morfológicas, auxiliando o esclarecimento de muitas questões neste grupo de mosquitos.

1.9 OBJETIVOS

Considerando a importância epidemiológica dos mosquitos do gênero *Culex* e as dificuldades para a identificação morfológica das espécies, o presente projeto tem como objetivos:

Geral

- Examinar as relações filogenéticas entre espécies de *Culex* da Região Neotropical.
- Examinar o emprego de sequências de COI para o reconhecimento de espécies de *Culex*.

Específico

- Estimar as relações filogenéticas entre subgêneros de *Culex* da Região Neotropical.
- Examinar a presença de complexos de espécies dentro do subgênero *Culex*.
- Discutir sobre a utilização do gene mitocondrial COI como ferramenta para a identificação de espécies de *Culex*.
- Discutir sobre a utilização do gene mitocondrial COI como ferramenta para a identificação das relações filogenéticas dentro de *Culex*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA E PROCEDÊNCIA DOS ESPÉCIMES

Para a análise das sequências de nucleotídeos dos genes COI, foram utilizados exemplares de diversas espécies de mosquitos do gênero *Culex*.

Os mosquitos utilizados no trabalho (**Tabela 1**) foram coletados durante a fase imatura (larva 4º estágio e pupa) nos anos de 2006 e 2008. Os imaturos foram mantidos em laboratório até que se desenvolvessem em adultos. Sempre que possível, as exúvias das larvas e pupas foram fixadas em lâminas, identificadas e guardadas na Coleção de Referência da Faculdade de Saúde Pública. Parte dos adultos foi montada em alfinetes entomológicos e identificada, e também foram depositados na coleção. Outra parte foi identificada e armazenada individualmente em etanol 100% a -80°C, até a extração do DNA genômico.

2.2. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico foi feita com o Kit DNeasy Blood and Tissue Handbook (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante.

Tabela 1. Lista de espécies utilizadas no trabalho, códigos e seus respectivos locais de coleta.

Gênero (subgênero) espécie	Código	Estado	Localidade	Coordenadas
<i>Culex (Cux.) coronator</i>	VP01-3	São Paulo	Aparecida do Norte	22°50'34,4"S, 45°14'45,6"W
<i>Culex (Cux.) coronator</i>	SP40-84	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) coronator</i>	SP57-2	São Paulo	Mairiporã	
<i>Culex (Cux.) coronator</i>	ES05-100	Espírito Santo	Linhares	19°20.917'S, 40°07.103'W
<i>Culex (Cux.) quinquefasciatus</i>	RS01-1	Rio Grande do Sul	Bento Gonçalves	29°09'28.90"S, 51°30'43.55"W
<i>Culex (Cux.) quinquefasciatus</i>	RS01-2	Rio Grande do Sul	Bento Gonçalves	29°09'28.90"S, 51°30'43.55"W
<i>Culex (Cux.) quinquefasciatus</i>	SP40-86	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) quinquefasciatus</i>	SP40-8	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) quinquefasciatus</i>	SP40-85	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) dolosus</i>	VP05-42	São Paulo	Pindamonhangaba	22°57'35,1"S, 45°27'08,6"W
<i>Culex (Cux.) dolosus</i>	VP08-2	São Paulo	Pindamonhangaba	22°45'26,8"S, 45°30'49,5"W
<i>Culex (Cux.) mollis</i>	SP05-17	São Paulo	Pariquera-Açu	24°44.814'S, 47°56.927'W
<i>Culex (Cux.) mollis</i>	SP05-20	São Paulo	Pariquera-Açu	24°44.814'S, 47°56.927'W
<i>Culex (Cux.) mollis</i>	SP40-78	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) mollis</i>	SP40-80	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) bidens</i>	VP01-2	São Paulo	Aparecida do Norte	22°50'34,4"S, 45°14'45,6"W
<i>Culex (Cux.) chidesteri</i>	VP05-22	São Paulo	Pindamonhangaba	22°57'35,1"S, 45°27'08,6"W
<i>Culex (Cux.) nigripalpus</i>	SP40-43	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) nigripalpus</i>	SP40-90	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) declarator</i>	SP40-89	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) declarator</i>	SP40-94	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) usquatus</i>	SP41-35	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43.975'S, 47°49.502'W
<i>Culex (Cux.) usquatus</i>	SP41-1	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43.975'S, 47°49.502'W
<i>Culex (Cux.) usquatus</i>	SP41-18	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43.975'S, 47°49.502'W
<i>Culex (Mel.) zetekii</i>	SP03-105	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43.975'S, 47°49.502'W

Tabela 1. Continuação

Gênero (subgênero) espécie	Código	Estado	Localidade	Coordenadas
<i>Culex (Mel.) dyus</i>	ES28-109	Espírito Santo	Linhares	19°11'53,0"S, 39°57'13,0" W
<i>Culex (Mel.) dyus</i>	SP04-12	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43.975'S, 47°49.502'W
<i>Culex (Mel.) ybarmis</i>	ES25-104	Espírito Santo	Linhares	19°11'53,0"S, 39°57'13,0" W
<i>Culex (Mel.) caudelli</i>	SP40-82	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Mel.) caudelli</i>	SP40-83	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Phc.) corniger</i>	SP40-19	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Phc.) corniger</i>	SP40-5	São Paulo	Pariquera-Açu	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Mcx.) imitator</i>	VP10-2	São Paulo	Pindamonhangaba	22°45'31,7"S, 45°30'55,8"W
<i>Culex (Mcx.) imitator</i>	ES10-100	Espírito Santo	Santa Teresa	
<i>Lutzia (Lut.) bigoti</i>	PR03-11	Paraná	São José dos Pinhais	
<i>Lutzia (Lut.) bigoti</i>	SP58-1	São Paulo	Serra da Cantareira	

2.3 REAÇÕES EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A reação de amplificação foi montada a partir do DNA extraído de cada mosquito, com volume final de 50 µl utilizando-se 1,0 µl de DNA da amostra, Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8, 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl e 1,25 U *Taq* polymerase (Fermentas *life sciences*), 0,2 µM dos oligonucleotídeos específicos do gene COI denominados, C1- 1-1718 (5'- GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC-3') e C1-2191 (5'- GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC-3') (SIMON, 1994). Para cada uma das reações de PCR foi utilizado um controle negativo, para certificar que as amostras estavam livres de contaminações. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador My Cycler_ (Bio-Rad) com os ciclos de temperatura programados para: 1 ciclo de 94°C por 5 min,, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 min (para desnaturação), 50°C por 2 min (para anelamento), 72°C por 2 min (para extensão), com um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min. Após a amplificação os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo SAMBROOK et al., (1989) como descrito a seguir. As bandas foram visualizadas em transluminador de luz UV e as mesmas foram fotografadas com câmera digital.

2.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Utilizando um método padrão (SAMBROOK et al. 1989), os produtos amplificados pela reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose, usando uma mini cuba horizontal com 35 ml de gel a 1,5%, a 80V por

45min em Tris-borato (TBE 1x), utilizando 5µl do produto amplificado de cada amostra e 1,0µl de tampão de corrida (4,0 g de sacarose; 0,01 g de azul de bromofenol e 10 ml de Tris EDTA (TE) para um volume final de 10 ml). Foram utilizados 1,0 µl de peso molecular de 100 pares de base – pb - (Fermentas) como padrão para a comparação do peso molecular dos fragmentos amplificados. Os géis foram corados em solução de TBE 1X contendo 0,5 µg/ml brometo de etídio por 15 min. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de luz U.V., com o sistema de foto-documentação Digital Imaging System (Multidoc-It).

2.6 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para cada volume de produto de PCR (aproximadamente 45 µl) foi adicionado um volume de isopropanol e a seguir os tubos foram agitados por inversão e incubados a 37°C por 5 min. Após a incubação os tubos foram centrifugados em TA (temperatura ambiente) a uma velocidade de 13.000 rpm por 8 min. O isopropanol foi descartado por inversão dos tubos e foram acrescentados 250 µl de etanol 75% a cada amostra. Em seguida as mesmas foram centrifugadas novamente em TA, a 13.000 rpm por 5 min.

2.7 SEQUENCIAMENTO

As reações de sequenciamento foram realizadas nos dois sentidos (forward e reverse) com o kit comercial ABI Prism dGTP Big Dye[®] Terminator v3.1 (PE Applied Biosystem, Warrington, UK). Para cada reação foram utilizados 1.0µl dos oligonucleotídeos C1-1-1718 e C1-2191, e, aproximadamente, 20ng.de DNA. Essas reações foram feitas em termociclador My Cycler_ (Bio-Rad) com os ciclos de temperatura programados para: 96°C por 2min seguidos de 35 ciclos de 45s a 96°C, 30s a 50°C, 4 min a 60°C.,. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram utilizadas duas reações, sendo uma para o primer forward e outra para o reverse. A cada reação de sequenciamento foram adicionados 100 µl de etanol 100% com 3 M de acetato de sódio, e incubados no gelo por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 min na velocidade de 4.000 rpm a T.A. O isopropanol foi removido invertendo-se os tubos e, a seguir foram adicionados 200µl de etanol gelado 70% e as amostras foram novamente centrifugadas por 30min a 4.000 rpm a T.A.. Todo o etanol foi removido com o auxílio de uma micropipeta. As amostras foram secas a 95°C e em seguida cobertas com papel alumínio e mantidas à -20°C. As sequências foram corridas em sequenciador automático ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer/HITACHI.

2.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa Clustal X 1.8 (THOMPSON et al., 1997), e ajustadas manualmente por meio do programa MacClade 4.0 PPC (MADDISON & MADDISON, 2000). Duas matrizes de divergência foram geradas com o programa MEGA 4.0 (TAMURA et. al., 2007), para comparar as sequências de nucleotídeos do gene COI: uma para os subgêneros estudados e outra somente para os indivíduos do subgênero *Culex*. As matrizes foram geradas utilizando o modelo Kimura-2 parâmetros (K2P).

2.9 ANÁLISES FILOGÊNETICAS

Um fragmento de 478 pares de bases do gene COI foi utilizado para estimar as relações filogenéticas entre espécies do gênero *Culex* pelos métodos de Máxima Parcimônica, Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana, as árvores foram enraizadas com a sequência do gene COI de *Anopheles nuneztovari*.

2.9.1 Análise de Parcimônia (MP):

A análise de parcimônia foi feita com o programa PAUP 4.0 (Swofford, 1998) utilizando busca heurística para encontrar as topologias igualmente parcimoniosas. Para isso utilizou-se a opção TBR (Tree bisection-reconnection).

Os caracteres não informativos para parcimônia foram excluídos. A análise de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 1.000 repetições foi aplicada para estimar o suporte dos clados obtidos nas análises de máxima parcimônia.

2.9.2 Máxima Verossimilhança (MV):

Para obter o modelo de evolução de nucleotídeos mais adequado aos dados, dentre 56 implementados no programa Modeltest versão 3.0 (POSADA & CANDRAL 1998), bem como otimizar a busca pela topologia de máxima verossimilhança, foi gerada a árvore de Neighbor Joining com o programa PAUP.

Para iniciar as análises de máxima verossimilhança, foram empregados o modelo de evolução de nucleotídeos sugerido pelo ModelTest (POSADA & CANDRAL 1998) e a topologia de NJ gerada pelo PAUP. Os valores das variáveis que constam do modelo selecionado foram otimizados durante a análise de verossimilhança. No entanto, para iniciar a busca da topologia, empregamos os valores obtidos nas análises realizadas para a escolha do modelo de evolução. Os valores foram empregados no primeiro passo da análise e são aqueles do modelo selecionado. A busca pela topologia de máxima verossimilhança foi otimizada em três passos, que iniciaram pelo critério mais simples, evoluindo para o mais complexo, a saber: NNI (Nearest-Neighbor Interchange), SPR (Subtree Pruning and Regrafting) feito em duas rodadas e o TBR (Tree Bisection and Reconnection) feito também em duas

rodadas. Para todas as rodadas, a aproximação limite de Rogers-Swofford foi fixada em 0,05 ('approxlim=5') e todas as árvores produzidas foram salvas. O suporte para os clados obtidos na análise de máxima verossimilhança foi estimado por análise de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) sob o critério de máxima verossimilhança. Foram realizadas 1.000 repetições. Para encurtar o tempo do teste de bootstrap, a aproximação limite de Rogers-Swofford foi fixada em zero.

2.9.3 Análise Bayesiana

A análise bayesiana (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) foi feita com o programa Mr. Bayes versão 2.0 (HUELSENBECK & RONQUIST, 2000). Para a análise bayesiana combinada, o modelo de substituição para cada 10 partições, foi derivado do ModelTest 3.0 (POSADA & CRANDALL, 1998). O MCMC foi feito com 6.000.000 gerações, salvando uma árvore a cada 100 gerações; as árvores, obtidas antes dos valores estarem estabilizados foram descartadas ('burnin' de 2.000 topologias). A topologia de consenso de maioria e as probabilidades dos ramos foram geradas com as topologias restantes (14.000 topologias por análise).

3. RESULTADOS

Foram analisadas sequências de nucleotídeos correspondentes a um fragmento de 478 pares de bases do gene COI de 36 indivíduos do gênero *Culex* pertencentes a 16 espécies. A média da composição de nucleotídeos desse fragmento, incluindo o grupo externo, foi de 28,1%A, 39,4%T, 17,4%C, 15,1%G, e o conteúdo A+T teve média 66,9%. A composição de nucleotídeos das sequências de COI, bem como os respectivos conteúdos A+T estão na **tabela 2**. O número de sítios variáveis foi 150; sendo que as médias de transições (si) e transversões (sv) foram 19% e 23%, respectivamente, e a média si/sv (R) foi 0,8%.

A média das distâncias entre as sequências utilizando o modelo Kimura-2 parâmetros (K2P), implementada pelo programa MEGA 4.0, dentro dos subgêneros foi 4,9% para *Culex* (variando de 0,0 a 9,4%); 2,9% para *Phenacomyia*; 0,9% para *Lutzia*, 11,3% para *Melanoconion* (variando de 1,5 a 15,1%) e 3,3% para *Microculex*. A média do algoritmo K2P entre os subgêneros variou de 7,8% entre *Lutzia* e *Culex* a 15,4% entre *Phenacomyia* e *Melanoconion*, como pode ser visto na **tabela 3**.

Tabela 2. Composição de nucleotídeos de um fragmento de 478 pb do gene COI dos 36 indivíduos estudados.

Espécies	Código	Nucleotídeo (%)				
		T	C	A	G	A+T
<i>Culex bidens</i>	VP01-02	40,6	16,7	28,2	14,4	68,8
<i>Culex declarator</i>	SP40-89	40,8	16,5	28,2	14,4	69,0
<i>Culex declarator</i>	SP40-94	40,6	16,7	27,8	14,4	65,4
<i>Culex nigripalpus</i>	SP40-43	40,6	16,7	28,0	14,9	68,6
<i>Culex nigripalpus</i>	SP40-90	40,4	16,9	27,8	14,6	68,2
<i>Culex chidesteri</i>	VP05-22	39,5	17,4	28,0	14,4	67,5
<i>Culex mollis</i>	SP05-17	40,2	17,2	28,0	14,6	68,2
<i>Culex mollis</i>	SP05-20	40,2	17,2	28,0	14,6	68,2
<i>Culex mollis</i>	SP40-80	41,4	16,1	28,5	14,4	69,9
<i>Culex mollis</i>	SP40-78	40,6	16,5	28,7	14,4	69,3
<i>Culex dolosus</i>	VP08-2	39,5	17,2	28,7	14,6	68,2
<i>Culex dolosus</i>	VP05-42	39,1	17,2	28,0	15,1	67,1
<i>Culex coronator</i>	ES05-100	39,1	17,6	28,2	15,3	67,3
<i>Culex coronator</i>	SP40-84	39,1	17,6	28,2	15,1	67,3
<i>Culex coronator</i>	SP57-2	39,1	17,6	28,0	15,1	67,1
<i>Culex coronator</i>	VP01-3	39,1	17,8	28,7	15,1	67,8
<i>Culex usquatus</i>	SP41-18	38,7	17,8	28,5	14,9	67,2
<i>Culex usquatus</i>	SP41-1	38,9	17,4	28,2	14,9	68,4
<i>Culex usquatus</i>	SP41-35	39,3	18,0	29,1	15,1	68,4
<i>Culex corniger</i>	SP40-19	38,1	17,6	28,9	14,9	67,0
<i>Culex corniger</i>	SP40-05	38,7	16,9	28,0	14,9	66,7
<i>Culex quinquefasciatus</i>	RS01-1	39,1	16,9	28,0	15,9	67,1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	RS01-2	39,1	16,9	27,8	15,9	66,9
<i>Culex quinquefasciatus</i>	SP40-8	39,3	16,9	28,5	15,9	67,8
<i>Culex quinquefasciatus</i>	SP40-86	38,5	16,9	29,3	16,1	67,8
<i>Lutzia bigoti</i>	Lutzia	39,5	16,9	29,1	14,2	68,6
<i>Lutzia bigoti</i>	PR03-11	40,2	16,3	26,6	14,4	66,8
<i>Culex caudelli</i>	SP40-82	37,4	19,5	26,8	16,5	64,2
<i>Culex caudelli</i>	SP40-83	37,2	19,9	27,2	16,1	64,4
<i>Culex dyius</i>	SP04-12	38,5	18,4	27,2	15,9	65,7
<i>Culex dyius</i>	ES28-109	38,3	18,8	26,8	15,7	65,1
<i>Culex ybarmis</i>	ES25-104	38,9	18,8	26,6	15,5	65,5
<i>Culex zeteki</i>	SP03-105	38,1	19,0	28,2	16,3	66,3
<i>Culex imitator</i>	ES10-100	40,8	16,3	27,4	14,6	68,2
<i>Culex imitator</i>	VP10-2	39,5	17,8	29,5	15,3	69,0

Tabela 3. Média das distâncias entre as sequências de nucleotídeos do fragmento do gene COI entre os subgêneros de *Culex* e gênero *Lutzia*, utilizando o modelo Kimura-2 parâmetros através do programa Mega 4,0. As médias são dadas em porcentagem.

	1	2	3	4	5
1. <i>Culex</i>	-	-	-	-	-
2. <i>Phenacomyia</i>	7,9	-	-	-	-
3. <i>Lutzia</i>	7,8	9,3	-	-	-
4. <i>Melanoconion</i>	13,8	15,4	14,3		-
5. <i>Microculex</i>	14,8	15,0	12,2	14,2	-

Algumas espécies apresentaram alta divergência intraespecífica em suas sequências, utilizando o K2P. Um espécime de *Culex dolosus* Lynch Arribálzaga (VP08-2) coletado no Pico do Itapeva, no município de Pindamonhangaba, apresentou uma divergência de 3,2% em relação ao exemplar VP05-42, coletado num criadouro localizado em uma altitude mais baixa no mesmo município. Da mesma forma, os espécimes SP05-17 e SP05-20 de *Culex mollis* Dyar & Knab coletados em poça ao lado de um riacho situado dentro da mata do Sítio Galileia em Pariquera-Açu, apresentaram média de divergência de 2,3% em relação aos espécimes SP40-80 e SP40-78 coletados em área urbana no bairro Vila Maria do mesmo município. Por fim, o espécime ES10-100 de *Culex imitator* Theobald coletado no Espírito Santo, apresentou divergência de 3,6% em relação ao espécime VP10-2, coletado no Pico do Itapeva, situado no município de Pindamonhangaba, na Serra da Mantiqueira, São Paulo.

A matriz de divergência entre as espécies do subgênero *Culex* pode ser vista na **Tabela 4**. Diferenças observadas nas estruturas das genitálias

masculinas dessas espécies (**Figuras A, B e C**, em anexo) corroboram as divergências encontradas nas sequências do gene COI. Em contrapartida, o espécime VP01-2 de *Culex bidens* Dyar apresentou pouca divergência quando comparados com os espécimes SP40-89 e SP40-94 de *Culex declarator* Dyar (0,2 e 0,4%, respectivamente), como mostra a **Tabela 4**

Tabela 4. Matriz de divergência do fragmento do gene COI, implementada pelo programa MEGA 4.0, de espécies do subgênero *Culex*, utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros. Os valores estão em porcentagem.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. <i>Culex bidens</i>	VP01-02																							
2. <i>Culex declarator</i>	SP40-89	0,2																						
3. <i>Culex declarator</i>	SP40-94	0,4	0,2																					
4. <i>Culex nigripalpus</i>	SP40-43	1,3	1,1	1,3																				
5. <i>Culex nigripalpus</i>	SP40-90	1,3	1,1	1,3	0,4																			
6. <i>Culex chidesteri</i>	VP05-22	2,3	2,1	2,3	2,3	1,9																		
7. <i>Culex mollis</i>	SP05-17	1,9	1,7	1,7	1,9	1,9	3,0																	
8. <i>Culex mollis</i>	SP05-20	1,9	1,7	1,7	1,9	1,9	3,0	-																
9. <i>Culex mollis</i>	SP40-80	1,3	1,1	1,3	1,1	1,3	2,8	2,3	2,3															
10. <i>Culex mollis</i>	SP40-78	1,3	1,5	1,7	1,7	1,7	3,2	2,3	2,3	0,8														
11. <i>Culex dolosus</i>	VP08-2	3,6	3,4	3,6	3,6	3,6	5,2	4,3	4,3	3,2	4,1													
12. <i>Culex dolosus</i>	VP05-42	4,8	4,5	4,5	4,5	4,8	6,3	5,4	5,4	3,9	4,8	3,2												
13. <i>Culex coronator</i>	ES05-100	6,1	5,9	6,1	6,1	6,1	7,7	7,3	6,9	5,6	6,1	5,2	5,2											
14. <i>Culex coronator</i>	SP40-84	5,9	5,6	5,9	5,9	5,9	7,5	7,0	7,3	5,4	5,9	5,0	5,0	0,2										
15. <i>Culex coronator</i>	SP57-2	5,9	5,6	5,9	5,9	5,9	7,3	7,0	7,0	5,4	5,9	5,0	5,0	0,6	0,4									
16. <i>Culex coronator</i>	VP01-3	5,9	5,7	5,9	5,9	5,9	7,5	7,0	7,0	5,4	5,9	5,0	5,0	0,6	0,4	0,8								
17. <i>Culex usquatus</i>	SP41-18	5,7	5,4	5,7	5,7	5,7	6,8	6,3	7,0	5,0	5,6	4,8	4,6	0,8	0,6	1,1	1,1							
18. <i>Culex usquatus</i>	SP41-1	5,9	5,6	5,9	5,9	5,9	7,0	6,6	6,3	5,2	5,9	5,0	4,8	0,6	0,4	0,8	0,8	0,2						
19. <i>Culex usquatus</i>	SP41-35	5,2	5,0	5,2	5,2	5,4	6,8	6,3	6,6	5,4	6,1	4,8	5,0	0,8	0,6	1,1	1,1	1,3	1,1					
20. <i>Culex quinquefasciatus</i>	RS01-1	7,3	7,0	7,3	7,3	6,9	8,4	8,0	8,0	5,6	6,8	5,0	6,3	7,0	6,8	7,3	6,8	7,5	7,3	6,6				
21. <i>Culex quinquefasciatus</i>	RS01-2	7,3	7,0	7,3	7,3	6,9	8,4	8,0	8,0	6,3	6,8	5,0	6,3	7,0	6,8	7,3	6,8	7,5	7,3	6,6	-			
23. <i>Culex quinquefasciatus</i>	SP40-8	7,7	7,5	7,7	7,7	7,3	9,4	8,4	8,4	6,3	7,2	5,4	6,7	7,5	7,2	7,7	7,2	7,9	7,7	7,0	0,8	0,8		
24. <i>Culex quinquefasciatus</i>	SP40-86	7,3	7,0	7,3	7,3	7,3	8,7	7,9	7,9	6,8	6,8	5,4	6,7	7,0	6,8	7,2	6,8	7,5	7,2	6,6	1,3	1,3	1,7	

O número de sítios em cada posição do códon e o número de sítios variáveis foi: 159 sítios na posição 1, sendo 30 variáveis; 159 sítios estavam na posição 2, sendo 4 variáveis e 160 sítios estavam na posição 3, sendo 116 variáveis. A posição três possui mais sítios variáveis, pois a maior parte das mudanças nessa posição resulta em mutações sinônimas (SIMON, 1994). Nenhum “stop” códon foi detectado, suportando a hipótese de que o fragmento tem origem mitocondrial.

3.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Nos três métodos de análises filogenéticas (**Figuras 5, 6 e 7**) os clados obtidos nas topologias foram semelhantes. O gênero *Lutzia* e o subgênero *Phenacomyia* apareceram dentro do gênero *Culex*. Este encontro evidencia que o gênero *Culex*, como está definido atualmente, é parafilético em relação ao *Lutzia* e ao *Phenacomyia*. Já os subgêneros *Melanoconion* e *Microculex* aparentam ser monofiléticos. No entanto, o subgênero *Microculex* não ficou agrupado dentro do gênero *Culex*. Além disso, o subgênero *Melanoconion* apareceu como grupo irmão do agrupamento formado pelos subgêneros *Culex*, *Phenacomyia* e gênero *Lutzia*. Dentro do subgênero *Culex* são observadas duas politomias: uma com *Cx. bidens* agrupado com *Cx. declarator*, e outra com o indivíduo SP41-35 de *Culex usquatus* Dyar dentro de *Cx. coronator*.

3.1.1 Análise de Máxima Parcimônia (MP):

A análise de parcimônia das sequências de nucleotídeos do fragmento do gene COI identificou 123 sítios informativos. O teste de bootstrap para parcimônia (**figura 5**) teve 21 clados ativos (>50%). Com exceção do grupo Coronator que teve um suporte de 98% para sua monofilia, nenhum outro grupo de espécies apareceu com um suporte igual ou maior a 90%.

3.1.2 Análise de Máxima Verossimilhança (MV):

Para iniciar a análise de MV a árvore de NJ produzida pelo PAUP 4.0 foi avaliada pelo programa Modeltest 3.0, utilizando os testes hierárquico e o AIC. Ambos os testes acharam o maior valor de verossimilhança utilizando o modelo GTR+I+T, um modelo complexo de substituição que envolve distribuição gama e sítios invariantes. A árvore de máxima verossimilhança foi otimizada avaliando apenas os sítios mais informativos (p1 e p3).

O teste de bootstrap para a análise de MV (**figura 6**) foi mais pobre do que na análise de MP, com apenas 12 clados ativos. Grupos com duas ou mais espécies aparecem com suporte menor do que 80%. Nessa análise a monofilia do grupo Coronator obteve suporte de 93%. Grupos com cinco ou mais espécies aparecem com baixo suporte (67%, 66% e 78%). Suportes acima de 95% somente foram verificados entre indivíduos da mesma espécie.

3.1.3 Análise Bayesiana

A probabilidade posterior para as relações entre *Culex-Lutzia* e *Culex-Phenacomys* nessa análise foi de 1,0 e 0,99, respectivamente (**Figura 7**). Já os valores de probabilidade posterior que suportam o monofiletismo de *Melanoconion*, *Microculex* e do grupo Coronator foi 0,93, 1,0 e 1,0, respectivamente. As politomias de *Culex declarator-Culex bidens* e *Culex coronator-Culex usquatus* (espécime SP41-35) tiveram probabilidade posterior 0,98 e 0,82, respectivamente.

Figura 5: Topologia de consenso estrito de análise de Máxima Parcimônia de 36 mosquitos do gênero *Culex*, utilizando o gene mitocondrial COI. Os números mostram a confiança dos ramos através do teste de bootstrap de 1.000 réplicas. A árvore foi enraizada com a sequência do gene COI de *Anopheles nuneztovari* (GenBank/EMBL: AF368115.1).

Figura 6: Topologia de Máxima Verossimilhança de 36 mosquitos do gênero *Culex*, utilizando o gene mitocondrial COI. Os números mostram a confiança dos ramos através do teste de bootstrap de 1.000 réplicas. A árvore foi enraizada com a sequência do gene COI de *Anopheles nuneztovari* (GenBank/EMBL: AF368115.1).

Figura 7: Filogenia Bayesiana de 36 mosquitos do gênero *Culex*, utilizando o gene mitocondrial COI. A topologia de consenso de maioria foi feita após um burn-in de 2.000 topologias. A árvore foi enraizada com a sequência do gene COI de *Anopheles nuneztovari* (GenBank/EMBL: AF368115.1).

4. DISCUSSÃO

Apesar de ser o maior gênero da família Culicidae, o *Culex* é um dos menos conhecidos (MILLER, 1996). As relações filogenéticas entre as espécies e subgêneros são pouco esclarecidas, ou mesmo ambíguas. Acresce considerar a presença de polimorfismos em caracteres morfológicos e a variabilidade das formas observadas nas diversas fases de desenvolvimento (HARBACH, 2007). Algumas espécies desse gênero são consideradas os principais vetores da filariose bancroftiana, além de transmitirem diversos arbovírus ao homem e animais domésticos (FORATTINI, 2002).

O objetivo deste trabalho foi testar o marcador molecular COI no estudo filogenético de *Culex* e, dessa forma, analisar as relações dentro desse grupo e esclarecer dúvidas em relação à taxonomia de algumas espécies. Assim, foram utilizados três métodos de inferência filogenética (MP, MV e Análise Bayesiana), para confirmar se as relações permaneceriam as mesmas em diferentes análises e assim confirmar a consistência do estudo.

Um fragmento do gene COI tem sido empregado com um tipo de código de barras (conhecido como 'barcoding') capaz de identificar espécies (SIMON, 1994; HERBERT, 2003). Sequências do gene COI tem sido utilizadas como ferramentas em diversos estudos de filogenia, taxonomia, genética de populações e filogeografia dentro da família Culicidae (COOK et al., 2005; PATSOULA et al., 2006; OSHAGHI et al., 2006; HEMMERT et al., 2007).

Os resultados das análises filogenéticas de COI demonstraram que tanto o gênero como o subgênero *Culex* não formam grupos monofiléticos, uma vez que *Lutzia* e *Phenacomyia* ficaram agrupados dentro desses grupos. *Lutzia* foi descrito por THEOBALD (1903) como sendo um gênero distinto para a espécie mexicana denominada *Culex bigoti*. Em 1932, EDWARDS definiu *Lutzia* como um subgênero de *Culex*, e todos os autores seguintes adotaram essa classificação. BELKIN (1962) sugeriu que *Lutzia* deveria ser derivado de um ancestral comum ao gênero *Culex*, sendo que *Lutzia* seria mais primitivo do que *Culex*. Recentemente, NAVARRO & LIRIA (2000) empregaram caracteres morfológicos das partes do aparelho bucal de larvas para inferir as relações filogenéticas dentro da tribo Culicini, usando o método de parcimônia. Os resultados das análises indicaram que *Culex* e *Lutzia* formavam grupos monofiléticos, sendo que *Lutzia* seria o grupo mais primitivo entre os dois, confirmando a hipótese de BELKIN (1932). Já em 1979, TANAKA e colaboradores, fazendo uma revisão morfológica de larvas e mosquitos adultos no Japão, acreditaram que as mudanças morfológicas existentes em *Lutzia* eram maiores do que em outros subgêneros de *Culex*. Dessa maneira, TANAKA (2003) elevou *Lutzia* a gênero e estabeleceu dois subgêneros novos (*Metalutzia* e *Insulalutzia*). Os resultados das análises realizadas com o gene COI no presente estudo vão contra a classificação proposta por TANAKA (2003), uma vez que *Lutzia* ficou agrupado dentro do gênero *Culex* (**Figuras 5, 6 e 7**), corroborando a hipótese de EDWARDS (1932), de que *Lutzia* seria um subgênero de *Culex*. Essa hipótese também está de acordo com estudos do

segundo espaçador interno transcrito (ITS2) dessas mesmas espécies (VESGUEIRO 2009, dados não publicados).

Semelhantemente, o subgênero *Phenacomyia* que foi descrito por HARBACH & PEYTON (1992) quando identificaram uma estrutura não usual na escova maxilar das larvas de *Culex lactator* Dyar e Knab. Afirmando que as mudanças nas estruturas da maxila da larva são supraespecíficas na natureza, os autores consideraram que o *Cx. lactator* poderia pertencer a um novo subgênero. Assim, descreveram outras características morfológicas que corroboravam essa hipótese e, transferiram *Culex corniger* Theobald para o subgênero novo, como sendo espécie irmã de *Cx. lactator*. Semelhante ao resultado obtido para *Lutzia*, as análises do fragmento do gene COI indicam que as variações morfológicas empregadas por HARBACH & PEYTON (1992) podem não ser suficientes para indicar o monofilestimo desses grupos (**Figuras 6, 7 e 8**). A posição de *Phenacomyia* dentro do subgênero *Culex* também foi observada em estudos do segundo espaçador interno transcrito (VESGUEIRO 2009, dados não publicados).

A monofilia de *Melanoconion* está de acordo com outras hipóteses filogenéticas do grupo (BELKIN, 1962, SIRIVANAKARN, 1983, NAVARRO & LIRIA, 2000). Entretanto, a posição mais primitiva de *Melanoconion*, bem como a posição filogenética de *Microculex* fora do gênero *Culex* necessitam de estudos mais aprofundados.

Das 16 espécies analisadas, três - *Culex dolosus*, *Culex mollis* e *Culex imitator* - apresentaram alta divergência intraespecífica em suas sequências

(**Tabela 4**), indicando que esses táxons podem compreender três complexos de espécies. Esses dados estão de acordo com algumas análises morfológicas feitas em exemplares coletados no mesmo local (**Figuras A, B e C**, em anexo).

No caso de *Culex dolosus*, o isolamento da população do Pico do Itapeva, juntamente com as pressões evolutivas do clima e da altitude elevada, podem ter favorecido o distanciamento desses espécimes de outras populações também identificadas como *Culex dolosus*. Ainda, a ecologia e a distribuição geográfica de *Culex dolosus* s.s. é pouco conhecida, em parte porque essa espécie é confundida com *Culex eduardoi* Casal & García (SENISE & SALLUM, 2008). O espécime VP08-2 do Pico do Itapeva apresentou duas características na exúvia da pupa descritas por SENISE & SALLUM (2008): trompa longa e fina e cerdas 1 e 5 do segmento abdominal IV, mais curtas e pouco ramificadas (**Figura A**). Já o exemplar VP05-42 apresentou trompa curta e mais grossa e as cerdas 1 e 5 do segmento abdominal IV mais longas e mais ramificada (**Figura A**).

Já em *Culex mollis*, as diferenças intraespecíficas encontradas no gene COI podem corroborar variações morfológicas observadas no processo mediano e no braço ventral do falósoma que indicam que existem pelo menos duas espécies sob o nome *Cx. mollis* (**Figuras B**). A população do sítio Galileia difere daquela do bairro Vila Maria em Pariquera-Açu. BRAM (1967) fazendo uma revisão do subgênero *Culex* nas Américas analisou a variação no número de dentes do processo mediano do falósoma nos espécimes identificados como *Culex mollis* e *Culex tissemilli* (Senevet). Embora tenha sido observada variação

de 3 a 12 dentes entre os espécimes analisados, BRAM (1967) acreditou que essas variações seriam intraespecíficas e colocou *Culex tissei* na sinonímia com *Culex mollis*.

Nos espécimes de *Culex imitator* do Espírito Santo e São Paulo, além da divergência intraespecífica nas sequências analisadas, também foram encontradas duas variações na exúvia da pupa: uma mancha nos segmentos II, III e IV (**Figura C**) e a disposição das cerdas 2, 3, 4 e 5 do segmento II. Tais características também são encontradas em exemplares da subespécie *Cx. imitator imitator*.

A proximidade de *Culex chidesteri* e *Culex nigripalpus* nas três análises é suportada pelas características morfológicas dessas duas espécies. *Cx. chidesteri* Dyar é semelhante a *Cx. nigripalpus* por possuir espinhos amplos e espatulados na margem lateral do décimo esternito; a característica que os diferencia é o processo externo amplamente curvado e diretamente lateral (BRAM, 1967). Entretanto, nas duas análises o valor de bootstrap do ramo foi baixo (<50%) – **figuras 5 e 6**. Na topologia de MV é possível ver a distância entre essas duas espécies, através do filograma. Já na análise Bayesiana, os dois indivíduos de *Culex nigripalpus* ficaram separados, e, um deles ficou agrupado com *Culex chidesteri*, mas o valor da probabilidade posterior foi baixo (0,54) (**figura 7**).

Da mesma forma, *Culex bidens* é muito similar ao *Culex declarator*, a única característica morfológica que distingue as duas espécies é o dente no processo mediano do falósoma, que é longo, estreito e afilado em *Culex bidens*

é robusto, curvo e convexo em *Culex declarator* (BRAM, 1967). Nas três análises, *Culex bidens* e *Culex declarator* aparecem como espécies irmãs. No entanto o suporte do ramo foi mais elevado na análise Bayesiana (0,98) - **figura 7**- sendo baixa nas topologias de MP e MV (60%), como pode ser visto nas **figuras 6 e 7**. Nesse caso pode haver um processo de especiação recente que ainda não pode ser observado no fenótipo.

Já *Culex usquatus* faz parte do Complexo Coronator, e a característica que distingue essa espécie de *Culex coronator* são as cerdas apicais do gonocoxito (na genitália masculina) que são longas em *Culex usquatus* e curtas em *Culex coronator* (BRAM, 1967). Nas três topologias o indivíduo SP41-35 de *Cx usquatus* ficou agrupado com as espécies de *Cx. coronator*, mas o valor de bootstrap foi baixo (<50% na MP e 52% na MV, **figuras 5 e 6**). Na análise Bayesiana a probabilidade posterior para o ramo foi maior (0,82), como pode ser visto na **figura 7**, mas ainda assim pouco consistente (<0,95).

Os genes mitocondriais são frequentemente utilizados em estudos de filogenia por suas altas taxas de substituição em relação aos genes nucleares, sobretudo em insetos (MORIYAMA & POWELL, 1997; LIN & DANFORTH, 2004). Além disso, a sequência do gene COI é sugerida como um código de barras para identificação de qualquer espécie (HERBERT et al., 2003).

Por outro lado, as altas taxas de substituição no gene COI podem diminuir os sinais filogenéticos, uma vez que múltiplas substituições podem mascarar a verdadeira história evolutiva e gerar homoplasias, sobretudo quando as transições são mais frequentes do que as translocações (BAKER &

DESALLE, 1997; GLEASON et al., 1997; GOTO & KIMURA, 2001). Além disso, o gene COI também pode superestimar as diferenças, e por isso é recomendável que seja empregado juntamente com outros genes de origem nuclear (HEMMERT et al., 2009).

Segundo Avise, citado por HERBERT et al. (2003), “divergências intraespecíficas raramente são maiores que 2% e a maioria não ultrapassa 1%” (pS98). Neste trabalho, divergências >2% só ocorreram em casos de espécies com status de identificação controverso. Ainda, a frequência de transversões foi maior do que de transições ($R < 1$).

Segundo CYWINSKA (2006), o gene COI pode ser utilizado como um sistema de identificação de espécies em mosquitos, pois satisfaz três condições essenciais: recupera o DNA alvo de todas as espécies; a informação da sequência alvo pode ser facilmente analisada e o conteúdo da informação da sequência alvo é suficiente para a identificação das espécies. Aqui o fragmento de DNA de todas as espécies analisadas foi facilmente amplificado, alinhado e analisado, mostrando que esse marcador também é eficiente para o gênero *Culex*.

5. CONCLUSÕES

- A análise do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase da subunidade I, juntamente com a análise morfológica das espécies demonstrou que podem existir três complexos de espécies sob os seguintes nomes: *Culex dolosus* l. s., *Culex mollis* l. s. e *Culex imitator* l. s.
- A posição taxonômica do subgênero *Phenacomyia* e do gênero *Lutzia* deve ser revista e novos estudos devem ser feitos para confirmar se esses dois táxons devem ser validados ou não.
- O gene mitocondrial COI foi eficiente para a identificação e para inferências filogenéticas das espécies do gênero *Culex*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson JF, Andreadis, TG, Main AJ, Ferrandino FJ and Vossbrinck CR. Mosquito surveillance for West Nile virus from female and male mosquitoes.(Diptera: Culicidae) in subterranean, ground, and canopy habitats in Connecticut. J Med Entomol. 43: 1010-1019, 2006.
- Avise, JC. Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York: Chapman and Hall, 1994.
- Baker RH. and DeSalle R.1997. Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian Drosophilids. Syst Biol. 46: 654–673.
- Beard CB, Mills Hamm D and Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. Insect Mol Biol 2:103-124, 1993.
- Belkin JN. The mosquitoes of South Pacific (Diptera:Culicidae). Berkeley and Los Angeles: University of California, 1962.
- Bortoloto TM. Construção de mapa molecular de uma população de *Eucalyptus grandis* segregante para o caráter florescimento precoce utilizando marcadores RAPD [Dissertação de Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2006.
- Bram, RA. Classification of *Culex* subgenus *Culex* (Diptera: Culicidae). Proc US Nat Mus. 120: 1-123, 1967.

- Caccone A, Garcia BA, Powell JR. Evolution of the mitochondrial DNA control region in the *Anopheles gambiae* complex. *Insec Mol Biol*. 5:51-59, 1996.
- Cameron SL., Lambkin CL., Barker SC. and Whiting MF. A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. *Syst Entol*. 32: 40–59, 2007.
- Carpenter JM. Choosing among equally parsimonious cladograms. *Cladistics*. 4:291-296, 1988.
- Clary OD and Wolstenholme DR. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J Med Evol*. 22:252-271, 1985.
- Clements, AN. The biology of mosquitoes. London: Chapman and Hall, 1992.
- Consoli RAGB e Lourenço-de-Oliveira, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998.
- Cook S, Diallo M, Sall AA, Cooper A and. Holmes EC. Mitochondrial Markers for Molecular Identification of *Aedes* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Involved in Transmission of Arboviral Disease in West Africa. *J Med Entol*. 42:19-28, 2005.
- Cywinska A, Hunter FF and Herbert PDN. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med Vet Entol*. 20: 413-424, 2006.
- Day JF and Curtis GA. Blood feeding and oviposition by *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) before, during and after a widespread St. Louis encephalitis in Florida. *J Med Entomol*. 36:176-181, 1999.

- Day W. Computational complexity of inferring phylogenies from dissimilarity matrice. Bull Math Biol .49: 461-467, 1987.
- Edwards FW. Diptera, Fam. Culicidae. Bruxelas: Wystman, P. 1932.
- Farah, SB. DNA: Segredos e mistérios. São Paulo: Sarvier, 2000.
- Farris, JS. A sucessive approximations approach to character weighting. Systematic Zoology. 44:570-572, 1969.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution.17:368-76, 1985.
- Ferreira ME, Grattapaglia D, Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.
- Forattini OP, Kakitani I, Massadi E e Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. Survey of adult behavior of *Culex nigripalpus* and other species of *Culex* (*Culex*) in South-Eastern Brazil. Rev, Saúde Pública.29:271-278.
- Forattini OP. Culicidologia Médica: identificação, biologia e epidemiologia. v 2. São Paulo: EDUSP; 2002.
- Foster PG. Inferring phylogenetic relationships from sequence data. Bioinformatics, Ch 12. Bioinformatics: Methods Express. Paul H. Dear, ed (s.l). 2007.

- Gleason JM, Caccone A, Moriyama EN, White KP and Powell JR. Mitochondrial DNA phylogenies for the *Drosophila obscura* group Evolution 51: 433–440, 1997.
- Goddard JM and Wolstenholme DR. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci. 75:3886-3890,1978.
- Goddard JM and Wolstenholme DR. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from the genus *Drosophila*. Nucleic Acids Res. 8:741-757.
- Goto SG., Kimura MT. Phylogenetic utility of mitochondrial COI and nuclear Gpdh genes in *Drosophila*. Mol Phylogenet Evol.18:404-22, 2001.
- Guindon S.; Gascuel O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematics Biologists. 52: 639-704, 2003.
- Harbach E and Peyton EL. A new subgenus of *Culex* in the Neotropical region (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics. 24:242-252.
- Harbach RE and Kitching IJ. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). Systematic Entomology. 23:327-370,1998.
- Harbach RE. The Culicidae (Diptera): review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa. 1668:591-638, 2007.
- Harrison, RG. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. Trends Ecol. Evol. 4:6-11, 1989.

- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 22 : 160-74, 1985.
- Hemmerter S, Slapeta J, van den Hurk AF, Cooper RD, Whelan PI, Russell RC, et al. A curious coincidence: mosquito biodiversity and the limits of the Japanese encephalitis virus in Australasia. *BMC Evol Biol.* 7:100, 2007.
- Hemmerter S, Slapeta J and Beebe NW. Resolving genetic diversity in Australasian *Culex* mosquitoes: Incongruence between the mitochondrial cytochrome c oxidase I and nuclear acetylcholine esterase 2. *Mol Phyl Evol.* 50:317-325, 2009.
- Herbert PND, Ratnasingham S and deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond.* 270:S96-S99, 2003.
- Huelsenbeck JP and Ronquist F. Mr Bayes: Bayesian inference of phylogeny. Distributed by the autor, Department of Biology, University of Rochester, Rochester, 2000.
- Jukes TH., Cantor CR, Munro HN. Evolution of protein molecule. in. *Mammalian protein metabolism.* New York: Academic Press, 1969.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16: 111-20, 1980.

- Lin, CP, Danforth, BN. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Mol Phylogenet Evol.* 30: 686–702, 2004.
- Lió P, Goldman N. Models of molecular evolution and phylogeny. *Genome Res.* 1233-1244, 1998.
- Maddison DR and Maddison WP. *MacClade 4. Analysis of phylogen and character evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Miller BR., Crabtree MB, and Savage HM. Phylogeny of fourteen *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol Biol.* 5: 93-97, 1996.
- Mitchell CJ, Cabrera FA, Daggers SA and Jakob WL. Arthropod collection in the Dominican Republic during an outbreak of Eastern Equine Encephalitis. *Mosq. News.* 39:263-267, 1979.
- Moriyama EN and Powell JR. Synonymous substitution rates in *Drosophila*: Mitochondrial versus nuclear genes. *J Mol Evol.* 45: 378–391, 1997.
- Moritz C, Dowling TE and Brown WM. Evolution of animal mitochondrial relevance for population biology and systematics. *Ann Ver Ecol Syst.* 18:269-292, 1987.
- Natal, D. Importância Epidemiológica de *Culex* subgênero *Melanoconion* (Diptera: Culicidae) [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1981.

- Navarro Juan-Carlos and Liria J. Phylogenetic relationships between eighteen neotropical Culicini species. J Am Mosq. Cont Assoc.16:75-85, 2000.
- Oshaghi MA, Yaaghoobi F, Abaie MR. Pattern of mitochondrial DNA variation between and within *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) biological forms suggests extensive gene flow. Acta Tropica. 99:226-233.
- Patsoula E, Samanidou-Voyadjoglou A, Spanakos G, Kremastinou J, Nasioulas G and Vakalis NC. Molecular and Morphological Characterization of *Aedes albopictus* in Northwestern Greece and Differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. Mol Biol.43:40-54, 2006.
- Patsoula E, Samanidou-VoyaVoyadjoglou A, Spanakos G, Kremastinou J, Nasioulas G, Vakalis NC. Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. Med Vet Entomol 21: 36-43, 2007.
- Posada D and Crandall KA. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics.14:817-818, 1998.
- Saeung A, Baimai V, Otsuka Y, Rattarithikul R, Somboon P, Junkum A, et. al. Molecular and cytogenetic evidence of three sibling species of the *Anopheles barbirostris* form A (Diptera: Culicidae) in Thailand. Parasitol Res 102: 499-507, 2008.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 4: 406:25, 1987.

- Sallum MAM, Schultz TR, Foster PG, Aronstein K, Wirtz RA, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Syst Entol.* 27: 361-382, 2002.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Saraste M. Structural features of cytochrome oxidase. *Quart Rev Biophysics.* 23:331-366.
- Scarpassa VM and Conn JE. Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi* sensu lato (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the COI gene from mitochondrial DNA. *Genet Mol Res* 5: 493-502, 2006.
- Scarpassa VM, Cardoza TB and Junior RPC. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 78: 895-903, 2008.
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, and Whittam TS. Methods of Multilocus Enzyme Electrophoresis for Bacterial Population Genetics and Systematics. *Appl Env Microbiology.* 51:873-884, 1983.
- Senise LV and Sallum MAM. Redescription of *Culex* (*Culex*) *dolosus* (Lynch Arribálzaga) (Diptera: Culicidae), based on specimens from Pico do Itapeva, Serra da Mantiqueira, São Paulo, Brazil. *Zootaxa.* 1638:51-62, 2008.
- Schadt E; Sinsheimer J.; Lange K. Computational advances in maximum likelihood methods for molecular phylogeny. *Genome Research.* 8: 222-233, 1998.

- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entol Soc Am.* 87:651-701.
- Sirivanakarn S. A review of the systematics and proposed scheme of internal classification of the New World subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics.* 14:265-333.
- Sogin ML, Silberman JD. Evolution of the protistis and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol.* 28: 11-20, 1998.
- Swofford DL. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1998.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.. MEGA 4.0: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA). *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599, 2007.
- Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10: 512- 526, 1993.
- Tanaka K. Studies on the pupal mosquitoes of Japan. genus *Lutzia*, with establishment of two subgenera, *Metalutzia* and *Insulutzia*. *Japan J System Entol.* 9:159-169, 2003.
- Tempelis CH. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analyses of blood meals by serology. *J. Med Entomol.* 11: 635-653, 1974.

- Theobald FV. A monograph of mosquitoes. British museum (Natural History), London, 1903.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl. Acids Res. 25:4876–4882, 1997.
- Turell MJ, O'Guinn, Dohm DJ and Jones JW. Vector competence of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus. J Med Entomol. 38:130-134, 2001.
- Urbanelli, S, Bellini R, Carrieri M, Sallicandro P and Celli G. Population Structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. Heredity. 84:331-337, 2000.
- Yang Z., Kumar S. Approximate methods for estimating the pattern of nucleotide substitution and the variation of substitution rates among sites. Mol Biol Evol. 13: 650-659, 1996.
- Walton C, Sharpe RG, Pritchard SJ. Thelwell and NJ Butlin RK. Molecular identification of mosquito species. Biol J of Linn Soc. 68: 241-256, 1999.
- Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. Nature. 171:737-741, 1953.
- Wilson AC., Cann RL., Carr SM, Steven MC, George M, Gyllensten UB, et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol J Linn Soc, 26:375- 400, 1985.

Clary DO and Wolstenholme DR. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. J Mol Evol. 22: 252-271, 1985.

Zhao L, Pridgeon JW, Becnel JJ, Clark GG, and Linthicum KJ. Cytochrome c Gene and Protein Expression: Developmental Regulation, Environmental Response, and Pesticide Sensitivity in *Aedes aegypti*. J Med Entol. 45:401-408, 2008.

ANEXOS

Figura A. Fotos comparando as exúvias das pupas de *Culex dolosus* coletados no Pico do Itapeva, município de Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil, em uma região de maior altitude (esquerda) e outra de menor altitude (direita). O espécime da direita (**Fotos A e C**) apresenta a trompa da pupa fina e longa, e as cerdas 1 e 5 do segmento IV menores e pouco ramificadas. Já o espécime da direita (**Fotos B e D**) apresenta a trompa da pupa um pouco mais curta e grossa e as cerdas 1 e 5 do segmento IV nitidamente maiores e mais ramificadas do que o outro espécime.

Figura B: Fotos comparando os falósomas de *Culex mollis* coletado no Sítio Galileia, município de Pariquera Açu, Vale do Ribeira, São Paulo Brasil (**A**) e no bairro Vila Maria, município de Pariquera Açu, Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil (**B**). Os braços ventrais do falósoma do espécime procedente do Sítio Galileia apresentam ganchos (em destaque) que estão ausentes no espécime da Vila Maria. Além disso, o espécime da **foto A** apresenta um número menor de dentes no processo mediano do que o espécime da **foto B**.

Figura C. Fotos comparando as exúvias das pupas de *Culex imitator* do município de Santa Tereza, Espírito Santo, Brasil (**Foto A**) e de Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil (**Foto B**). O exemplar do Espírito Santo apresenta uma mancha mais acentuada nos segmentos II, III e IV.