

**Caracterização do segundo espaçador interno
transcrito do DNA ribossômico de espécies do gênero
Culex e *Lutzia bigoti* (DIPTERA, Culicidae)**

Fabiana Tavares Vesgueiro

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Saúde Pública.**

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 tese/dissertação.

51020/2009 doc

*Aos meus queridos avós, Eduardo e Josepha,
e José e Maria, pelo amor, luta e sabedoria
na criação da família.*

*Aos meus amados pais, João e Sonia,
pelo amor e carinho incondicionais, pelo
esforço e dedicação na minha formação
como pessoa e profissional,
pelo exemplo de caráter.*

*Aos meus queridos irmãos,
Henrique e Felipe,
e à toda a família pelo
constante carinho e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli pela orientação e pela oportunidade concedida acreditando na minha capacidade deste o início, mesmo num campo do conhecimento totalmente novo para mim, até então. Agradeço pela paciência, confiança, pelo importante ensinamento, constante incentivo e por mostrar-se sempre muito solícito, principalmente nos momentos difíceis e de prazos apertados.

À Dra. Maria Anice Mureb Sallum por ter cedido os mosquitos para este estudo e, sobretudo, por todo o apoio durante o desenvolvimento do trabalho, do projeto às correções da dissertação final. Agradeço pelo valioso ensinamento, pela extrema paciência nos esclarecimentos das inúmeras dúvidas durante as análises, enfim, por mostrar-se sempre muito atenciosa.

Aos membros da banca da qualificação Dra. Daniéla Cristina Calado e Dra. Maria Anice Mureb Sallum, pelas importantes críticas e sugestões ao projeto.

Aos membros titulares da pré-banca Dr. Lincoln Suesdek Rocha e Dra. Rosely dos Santos Malafronte pelas correções, comentários e valiosas sugestões para a finalização da dissertação. Aos membros suplentes Dra. Rosa Maria Tubaki, Dra. Maria Anice Mureb Sallum e Dr. Paulo Urbinatti.

À Dra. Roseli dos Santos Malafronte por abrir as portas do laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical – USP para a realização dos experimentos de clonagem, oferecendo toda a infra-estrutura e me deixando sempre à vontade no seu laboratório. Agradeço também a todo o pessoal (Tasciane, Bianca, Bel e pessoal do lab. vizinho) pelo excelente convívio. Em especial à minha amiga Amanda, por ter me auxiliado e ensinado cada etapa do processo de clonagem pacientemente. Ao técnico Luciano pelas inúmeras vezes que me socorreu com as autoclavagens de material.

À companheira de laboratório Bruna Demari e Silva, que mesmo sendo tão diferente de mim, tornou-se uma grande amiga. Agradeço muito pela especial ajuda nos primeiros dias de bancada (quando eu ainda não sabia usar nem mesmo uma simples micropipeta), por compartilhar momentos de dúvida e aprendizado, pela força e incentivo nos momentos de dificuldade e por compartilhar muitos momentos de alegria e descontração.

Aos companheiros de laboratório Daniéla Calado, Pedro Pedro, Sérgio Arakaki, Sirlei de Moraes e Daniel Vendrami, pela ajuda e convívio harmonioso. Aos técnicos Walter Ceretti Júnior e Maria Dulce Bianchi Rosa pelo auxílio, conversas e grande incentivo.

À Dra. Cecília Luiza Simões Santos pelo treinamento em Biologia Molecular.

Ao técnico Aristides Fernandes pelo apoio durante as aulas de Sistemática.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro ao laboratório (Projeto Jovem Pesquisador 05/50225-2).

À Dra. Rosa Maria Tubaki da Superintendência de Controle de Endemias de São Paulo (SUCEN) pelo exemplo profissional, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim ao guiar meus primeiros passos na Entomologia Médica. Aos companheiros de laboratório Regiane, Cidinha, Mariana, Juliana, Renata, Amanda, Thalita e Robson, pelo grande apoio durante meu estágio. Aos queridos amigos e colegas da SUCEN (Izilda, Esther, Rúbens, Iole, Julinha, Rosângela, Janete, Kléber, D. Benê e todos os estagiários) pelo agradável convívio e incentivo para que eu ingressasse no mestrado.

Ao pessoal do Laboratório de Culicidologia, Tatiane, Denise, Caio e Gabriel pela atenção e educação nas inúmeras vezes que precisei incomodá-los procurando a professora.

Ao inigualável presente que esta jornada proporcionou, a aquisição de novos e queridos amigos, Maysa, Sandrinha, Eli, Kênia, Cleiton, Renato, Daniel, Edlaine, Selma, Shirley e o amigo “anexo” da turma FSP, Kinow. Agradeço pelo apoio e carinho nos momentos de “surto”, angústia e desespero, e principalmente por terem compartilhado inúmeros momentos de descontração e alegria. Momentos que estarão sempre na lembrança, os almoços no bandejão, as conversas na escadaria da faculdade, a hora do café e as clássicas (porém extintas) “reuniões” às quartas. Momentos que com certeza foram fundamentais para a chegada ao final desta etapa.

A todos os amigos. Em especial à Ana Paula, por me ouvir e entender os “furos” por conta das atividades do mestrado.

À minha família, especialmente aos meus avós, pelo apoio, carinho e compreensão pela ausência em inúmeras reuniões familiares durante os períodos mais conturbados deste trabalho.

Aos meus queridos pais e irmãos pelo constante carinho e apoio.

*" Aqueles que passam por nós, não vão sós,
não nos deixam sós. Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós."*

(Antoine de Saint-Exupéry)

*“As coisas são semelhantes, isso torna a ciência possível.
As coisas são diferentes, isso torna a ciência necessária.”*

Levins & Lewontin, 1985

RESUMO

Culex é o maior gênero da tribo Culicini, com 767 espécies descritas e inclui vetores de muitos arbovírus e filárias. Apesar disso, estudos sobre sua taxonomia e filogenia ainda são muito escassos. A identificação dos mosquitos, etapa fundamental para estudos epidemiológicos, ecológicos e genéticos, geralmente é feita com base nos caracteres morfológicos. Entretanto, muitas espécies de *Culex* são morfológicamente semelhantes, dificultando a identificação correta. Atualmente, técnicas moleculares são utilizadas em estudos de evolução e na distinção de espécies. Dessa forma, sequências de ITS2 do DNAr de 15 espécies do gênero *Culex* e uma do gênero *Lutzia* foram clonadas e sequenciadas, para examinar o nível de divergência genômica e verificar a aplicabilidade desse marcador em análises filogenéticas no grupo estudado. Três a sete clones por indivíduo foram sequenciados, gerando 144 sequências com comprimentos de 199 a 339 pb. Foi gerada topologia de distância pelo método de *Neighbour-joining* (NJ), com *p-distance* não corrigido. A matriz de distância gerada evidenciou a presença de variação intragenômica e intra-específica. Dos 31 espécimes clonados e sequenciados, apenas um de *Culex (Culex) mollis* apresentou todas suas sequências idênticas (5 clones), enquanto um exemplar de *Culex (Cux.) coronator* apresentou diferença na composição nucleotídica entre todos os seus clones (6 clones). Devido à presença de variabilidade intragenômica, optou-se por selecionar as cópias que seriam utilizadas nas análises de distância empregando a similaridade das estruturas secundárias do ITS2. Assim, foi possível eliminar as cópias mais divergentes e que apresentavam similaridade inferior a 75%. Apesar da heterogeneidade observada, as sequências geradas de indivíduos das mesmas espécies se agruparam e foi condizente com a atual classificação baseada em morfologia. A topologia de NJ indica a possível monofilia dos subgêneros *Melanoconion* e *Microculex*. No entanto, indica também o parafiletismo do gênero *Culex* em relação ao *Lutzia* e do subgênero *Culex* em relação ao *Phenacomysia*. O posicionamento de *Lutzia* dentro do grupo formado por espécies do gênero *Culex* indica que o atual *status* genérico do táxon não é

sustentado pela análise de NJ do ITS2, assim, o mais apropriado seria *Lutzia* ser considerado subgênero de *Culex*. O posicionamento de *Phenacomyia* dentro do grupo do subgênero *Culex* indica que este táxon não pode ser considerado subgênero de *Culex*. Apesar da variabilidade intragênômica, o ITS2 parece ser marcador adequado à soluções de questões taxonômicas de *Culex*.

Palavras-chave: Diptera, *Culex*, ITS2, DNAr, filogenia, evolução em concerto

ABSTRACT

Culex is the largest genus of the tribe Culicini with 767 described species and includes vectors of several arboviruses and filarial worms. Nevertheless, studies about their taxonomy and phylogeny are still scarce. The identification of mosquitoes is usually based on morphological characters. However, many species of *Culex* are morphologically similar, making difficult their correct identification. Currently, molecular techniques have been used in both evolution studies and the species distinction, including those belonging to complex. Thus, sequences of ITS2 of rDNA from 15 species belonging to the genus *Culex* and one of *Lutzia* were cloned and sequenced in order to examine the genomic divergences and verify the applicability of this marker in phylogenetic analysis in the study group. Three to seven clones per individual were sequenced, generating 144 sequences, ranging from 199 to 339 bp. The topology was obtained using the Neighbor-joining method with uncorrected p-distance. The distance matrix obtained revealed the presence of intragenomic and intraspecific variation. Of the 31 specimens cloned and sequenced only one of *Culex* (*Culex*) *mollis* showed all their identical sequences (5 clones), while one specimen of *Culex* (*Culex*) *coronator* showed differences in nucleotide composition between all the clones (6 clones). Due to the intragenomic variability we selected the copies to distance analysis using the similarity of secondary structures of ITS2. It was possible to delete the copies that were more varied and less than 75% of similarity. Despite the heterogeneity observed within the sequences obtained from individuals of the same species are grouped and it was consistent with the current classification based on morphology. The NJ topology indicates the possible monophyly of subgenera *Melanoconion* and *Microculex*. However, this topology also indicates the paraphyly of the genus *Culex* related to *Lutzia* and subgenus *Culex* related to *Phenacomyia*. The position of *Lutzia* in the same group of *Culex* genus indicates that the generic status of this taxon is not supported by NJ analysis of ITS2 and, therefore, the correct would be *Lutzia* being considered a subgenus of *Culex*. The position of *Phenacomyia* in the group of *Culex* subgenus indicates this taxon can not

be considered a *Culex* subgenus. Despite the heterogeneity, the ITS2 seems to be an appropriate marker to solve taxonomic questions of *Culex*.

Keywords: Diptera, *Culex*, ITS2, rDNA, phylogeny, concerted evolution

ÍNDICE

Lista de tabelas	14
Lista de figuras	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Considerações gerais sobre a Família Culicidae Meigen, 1818	16
1.2 Importância epidemiológica dos culicídeos	16
1.3 O gênero <i>Culex</i> Linnaeus, 1758	19
1.4 O conceito de espécie	21
1.5 Métodos de identificação de espécies	22
1.6 Taxonomia molecular	24
1.7 O DNA ribossômico	25
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Coleta e procedência dos espécimes	31
4.2 Extração do DNA genômico	31
4.3 Amplificação do DNA	32
4.4 Eletroforese e purificação dos produtos de PCR	35
4.5 Clonagem	36
4.5.1 Ligação	36
4.5.2 Transformação	36
4.5.3 Preparação das placas e plaqueamento	36
4.5.4 Seleção das colônias	37
4.6 <i>Colony PCR</i>	37
4.7 Sequenciamento	38
4.8 Alinhamento e análise das sequências	39
4.8.1 Seleção dos clones pela estrutura secundária	41
5. RESULTADOS	43
5.1 Variação intragenômica	43
5.2 Variação intra-específica	47
5.3 Variação interespecífica	50

5.4 Topologia de Neighbor-joining (NJ)	51
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES	65
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
10. ANEXOS	
Anexo 1	79
Anexo 2	83
11. CURRÍCULO LATTES	
Lattes do orientador	84
Lattes da aluna	85

Lista de Tabelas

- Tabela 1 – Espécies estudadas, código dos espécimes, sexo, 33
localidades e coordenadas geográficas.
- Tabela 2 – Variabilidade das sequências de ITS2 entre todos os 44
clones do mesmo indivíduo.
- Tabela 3 – Variabilidade intragenômica, entre as sequências de 46
ITS2 de todos os clones e das variantes selecionadas
pela estrutura secundária, do mesmo indivíduo.
- Tabela 4 – Variabilidade das sequências de ITS2 entre todos os 47
clones selecionados (pela estrutura secundária) e entre
as variantes dentro da mesma espécie.
- Tabela 5 – Matriz de distância (p -distance não corrigido) entre os 49
grupos de variantes selecionadas pela estrutura
secundária, dentro de cada indivíduo.
- Tabela 6 – Matriz de distância (p -distance não corrigido) entre os 51
grupos de diferentes haplótipos de cada espécie.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Esquema do cistron ribossômico em eucariotos. 26
- Figura 2 – Árvore de NJ gerada com as variantes de ITS2 de quinze espécies do gênero *Culex* e uma do gênero *Lutzia*. 53
- Figura 3 – Árvore de NJ gerada com as variantes de ITS2 selecionadas pela estrutura secundária. 54
- Figura 4 – Relações filogenéticas de quatro subgêneros (14 espécies) de *Culex* utilizando os espaçadores ITS1 e ITS2 do DNAr (modificado de MILLER et al., 1996). 58
- Figura 5 – Foto das exúvias de pupas. A) *Culex imitator* (Espírito Santo), com indicação da mancha escura nos segmentos II, II e IV, e do padrão de distribuição das cerdas 2, 3, 4 e 5 do segmento II. B) *Culex imitator* (São Paulo), sem mancha e com outra disposição das cerdas do segmento II. 59
- Figura 6 - Relações filogenéticas de alguns Culicini com base nas estruturas morfológicas das peças bucais das larvas (modificado de NAVARRO e LIRIA, 2000). 62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais Sobre a Família Culicidae Meigen, 1818

Os mosquitos são dípteros pertencentes à família Culicidae e formam táxon monofilético (HARBACH e KITCHING, 1998). Suas primeiras espécies foram descritas em meados do século XVIII e alguns aspectos gerais de seu ciclo biológico também foram então conhecidos (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998). Apresentam distribuição mundial, exceto em regiões permanentemente congeladas como é o caso do continente Antártico (FORATTINI, 2002).

O grupo desses insetos reúne grande número de espécies, sendo mais diverso e menos conhecido nos ambientes das florestas tropicais (HARBACH, 2007). Atualmente, são reconhecidas cerca de 3523 espécies (HARBACH, 2009) distribuídas em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae. Tradicionalmente, a família era dividida em três subfamílias: Anophelinae, Toxorhynchitinae e Culicinae, como foi representado na primeira árvore evolucionária da família construída por ROSS (1951). Entretanto, em 1998 HARBACH e KITCHING não reconheceram o *status* de subfamília de *Toxorhynchitinae*, considerando-a como tribo da subfamília Culicinae.

1.2 Importância Epidemiológica dos Culicídeos

Por muito tempo pensou-se que a única inconveniência causada pelos mosquitos era o incômodo gerado por suas picadas, sendo eles então simplesmente tolerados ou evitados.

O papel epidemiológico dos culicídeos como vetores biológicos, teria sua primeira comprovação com as observações de Manson (1879) para filariose bancroftiana (FORATTINI, 2002). Desde então, esses dípteros passaram a ser intensamente estudados e hoje é sabido que muitos deles estão relacionados à transmissão de agentes infecciosos ao homem e a outros vertebrados, gerando graves problemas de Saúde Pública ao redor do mundo. Dentre seus representantes, os pertencentes aos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* são os principais vetores de agentes infecciosos responsáveis por doenças como a malária, dengue e filarioses, respectivamente.

Menos de 150 espécies de mosquitos são causas indiretas de morbidade e mortalidade, mais do que qualquer outro grupo de organismos (HARBACH, 2007). Dentro do gênero *Culex*, os mosquitos dos subgêneros *Melanoconion* Theobald, 1903 e *Culex* Linnaeus, 1758 são os que apresentam maior importância epidemiológica.

No subgênero *Melanoconion*, a competência na transmissão de vários arbovírus tem sido demonstrada tanto pelo isolamento em mosquitos naturalmente infectados, quanto em testes de transmissão em laboratório (FORATTINI et al., 1995). Assim, muitas espécies desse grupo são consideradas importantes vetores, principalmente do vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) (WEAVER et al., 2004).

Em relação ao subgênero *Culex*, na América do Norte, *Culex nigripalpus* Theobald é considerado importante vetor do agente causador das encefalites Equina do Leste (VEEL), do Oeste (VEEO) e de São Luís (VESL). Na Amazônia brasileira, o vírus da encefalite São Luís (VESL) foi isolado das espécies *Culex coronator* Dyar e Knab e *Cx. declarator* Dyar e Knab (VASCONCELOS et al., 1991).

Nas Américas, além de ter sido encontrado naturalmente infectado com vírus causadores de encefalites, *Cx. (Cux.) quinquefasciatus* Say é o principal vetor relacionado à filariose linfática humana, conhecida também como

elefantíase na sua fase sintomática mais avançada (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998). No Brasil, essa parasitose é causada exclusivamente por helmintos da espécie *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877), com focos de transmissão ativa em Recife (PE) e Maceió (AL) (FONTES et al., 1998, 2005). BRITO et al. (1997) ao verificarem a susceptibilidade de populações de *Cx. quinquefasciatus* tanto de região endêmica (Maceió/AL) quanto de região não endêmica (Belo Horizonte/BH) para a infecção por *W. bancrofti*, alertaram para o potencial risco da dispersão deste agente para regiões nas quais a filariose nunca foi registrada ou já está erradicada, devido à migração de pessoas infectadas para áreas com a presença desse potencial vetor.

No Brasil, a espécie também é considerada vetor potencial do Vírus do Nilo Ocidental (VNO) (NATAL e UENO, 2004). A infecção por VNO, um flavivírus, provoca mortalidade em aves domésticas, silvestres e equinos. No homem induz quadro febril, podendo evoluir para meningite aguda, encefalite e óbito. As aves são os hospedeiros e reservatórios naturais do VNO, fator que pode justificar a notável velocidade de disseminação do vírus (LUNA et al. 2003). O VNO foi isolado pela primeira vez em Uganda em 1937. Dispersou-se pela África, Europa e Ásia. Em 1999 foi registrada sua introdução em Nova Iorque, EUA. Em 2002 o vírus havia se espalhado por vários estados americanos e após algum tempo atingiu o Canadá e o México (NATAL e UENO, 2004).

Além da importância epidemiológica, as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* apresentam alto grau de antropofilia. Esse comportamento prejudica a qualidade de vida da população humana pelo incômodo gerado principalmente no horário destinado ao repouso das pessoas. Assim, essa espécie vem sendo alvo de medidas de controle pelo Poder Público há décadas, com aplicações intensivas de produtos químicos e biológicos, além de obras de saneamento. Contudo, esse mosquito continua a proliferar-se no meio urbano.

As frustradas tentativas de controle da malária em muitos países em desenvolvimento e não desenvolvidos, principalmente na África, também

ilustram a complexidade envolvida no controle tanto de populações vetoras quanto dos agentes infecciosos que elas transmitem.

Segundo FORATTINI (1998), as mudanças ecológicas no ambiente e as de comportamento humano, atuam provocando pressão seletiva sobre os vetores biológicos. Como respostas a essa pressão, podem ser enumeradas a resistência aos inseticidas e a adaptação às transformações de origem antrópica (SERVICE, 1991). Estas respostas estão relacionadas à grande capacidade de reprodução e flexibilidade genômica dos mosquitos. A última, demonstrada não apenas pela resistência aos inseticidas mas também pela existência de complexos de espécies crípticas, algumas das quais parecem estar sofrendo especiação no processo de adaptação ao ambiente antrópico (BESANSKY e COLLINS, 1992).

Diante disso, o desenvolvimento de novas tecnologias e estratégias eficazes para o controle e vigilância dos culicídeos tem representado um grande desafio à Saúde Pública, tornando-se crucial o incremento de informações bioecológicas, taxonômicas e genéticas relacionadas a esses mosquitos.

1.3 O Gênero *Culex* Linnaeus, 1758

A monofilia da tribo Culicini nunca foi contestada. A tribo atualmente é dividida em quatro gêneros: *Culex*, *Deinocerites*, *Galindomyia* e *Lutzia*. Recentemente, TANAKA (2003) elevou o subgênero *Lutzia* ao *status* de gênero da tribo Culicini. NAVARRO e LIRIA (2000) formalmente rebaixaram o gênero *Deinocerites* a subgênero de *Culex*, mas esta classificação não foi amplamente aceita.

Culex é o maior gênero da tribo Culicini, com 767 espécies distribuídas em 26 subgêneros (HARBACH, 2009). Os representantes desse gênero variam de pequeno a grande porte e têm coloração geral marrom ou enegrecida.

Apresentam hábitos noturnos e crepusculares, mas algumas espécies podem praticar hematofagia durante o dia, quando o hospedeiro se encontra próximo aos seus abrigos e criadouros. As fêmeas depositam seus ovos em conjuntos, com aspecto de “jangada” que flutuam na superfície da água, exceto no caso de algumas espécies do subgênero *Melanoconion*. Seus criadouros variam muito conforme as espécies (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998).

Apesar de ser um dos maiores gêneros dentro da família Culicidae, no sentido taxonômico é um dos menos conhecidos. Poucas fêmeas do gênero detêm características morfológicas marcantes e pouco variáveis. Isso dificulta a identificação segura de espécies coletadas na forma adulto-fêmea, com base na morfologia externa (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998). Outro agravante refere-se ao fato de que muitos mosquitos membros desse gênero pertencem a complexos de espécies morfológicamente semelhantes. Essas espécies normalmente apresentam poucas diferenças morfológicas, muitas vezes restritas a um único estágio de desenvolvimento.

Nas Américas as espécies estão agrupadas em 14 subgêneros: *Culex* Linnaeus, 1758; *Melanoconion* Theobald, 1903; *Aedinus* Lutz, 1904; *Carrollia* Lutz, 1905; *Neoculex* Dyar, 1905; *Micraedes* Coquillett, 1906; *Tinolestes* Coquillett, 1906; *Microculex* Theobald, 1907; *Anoedioporpa* Dyar, 1923; *Allimanta* Casal & Garcia, 1968; *Belkinomyia* Adames & Galindo, 1973; *Phenacomyyia* Harbach & Peyton, 1992; *Nicaromyia* Broche & Rodríguez, 2001 e *Phytotelmatomyia* Rossi & Harbach, 2008. A maioria das espécies neotropicais pertence aos subgêneros *Culex* e *Melanoconion* (FORATTINI, 2002).

Na literatura sobre a taxonomia do subgênero *Culex* destaca-se o trabalho de BRAM (1967), que apresenta uma revisão taxonômica do grupo e descrição de novas espécies. Segundo FORATTINI (2002), a falta de caracteres diferenciados em todos os estágios de desenvolvimento e nas estruturas da genitália masculina de muitas espécies pertencentes ao

subgênero *Culex*, as exclui das chaves taxonômicas propiciando a aglomeração de representantes em algumas dicotomias.

Quanto ao subgênero *Melanoconion*, sua história taxonômica foi bem documentada por SIRIVANAKARN (1983), que estabeleceu a divisão do grupo em 3 seções: *Ocellatus*, *Spissipes* e *Melanoconion*. Porém, PECOR et al. (1992) determinaram que a *Ocellatus* não pertencia ao subgênero, que passou a ter apenas duas seções: a *Melanoconion* e a *Spissipes*. Esta classificação é adotada até hoje, no entanto, o grupo também apresenta muitos problemas quanto à identificação. De maneira geral, são poucos os estudos mesmo para a Seção *Spissipes* que encerra diversas espécies de interesse epidemiológico. Vale assinalar que a maioria dos estudos é focada em estruturas externas da genitália masculina (FORATTINI, 2002).

1.4 O conceito de espécie

A espécie representa enorme importância, uma vez que, sendo a menor unidade taxonômica, nela se concentram a análise e o estudo da sistemática e da biologia em geral (FORATTINI, 1996). No entanto, até o momento não há definição clara e incontestável quanto ao seu conceito. Dessa maneira, diversos critérios podem ser utilizados na definição de espécie.

A maioria das espécies reconhecidas como tais pelos taxonomistas foi assim designada com base em critérios anatômicos e morfológicos. Esse critério é seguido até hoje e conceitua a assim chamada espécie morfológica ou morfo-espécie. Mas o seguimento estrito da tipologia no tratamento da espécie, e o seu aspecto de imutabilidade constitui-se em impedimento para a aceitação das mudanças que fundamentam a evolução (FORATTINI, 1996). Numa visão evolutiva, uma espécie sofre mudanças graduais à medida que ela se move no espaço e no tempo.

Dentre os diferentes conceitos de espécie, o biológico enfatiza o critério reprodutivo através da troca gênica entre os indivíduos da população. De acordo com esse conceito, espécies são grupos de populações naturais que se inter cruzam e que se encontram reprodutivamente isolados de outros grupos (MAYR e ASHLOCK, 1991). Dessa forma, as populações podem ser fenotipicamente indistinguíveis mas, se não se inter cruzarem, serão consideradas como espécies distintas, as chamadas espécies crípticas.

No entanto, este conceito não se aplica a todas as situações reais da natureza sendo passível de críticas. Uma delas se refere à sua inadequação quanto à ocorrência das mudanças lentas que se dão na espécie ao longo do tempo. Havendo reprodução sexuada, o isolamento reprodutivo pode ser apenas parcial, existindo a possibilidade de hibridação. Estes híbridos tendem a ocorrer em áreas de recente instabilidade ecológica (WRIGHT e PAL, 1967).

Conforme o conceito filogenético, a espécie recebe a definição de ser o menor grupo populacional de indivíduos, dentro do qual se poderá estabelecer uma ancestralidade, e que apresenta a possibilidade de ser identificado mediante combinação única de caracteres (ELDREDGE e CRACRAFT, 1980 *apud* FORATTINI, 1996).

1.5 Métodos de Identificação de Espécies

Embora os culicídeos sejam uma das famílias mais estudadas de insetos, ainda há muitas dúvidas no campo da sistemática, filogenia e evolução. A pesquisa em mosquito tem sido aplicada e centralizada na identificação, biologia e controle das espécies responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos (MILLER et al., 1996).

Os métodos empregados na identificação de espécies incluem: cruzamentos experimentais; características morfológicas; citogenética e análise de cromossomos politênicos; tipagem de isoenzimas e, mais recentemente, técnicas diretas de análise do genoma (HILL e CRAMPTON, 1994; WALTON et al., 1999). Estes métodos variam muito quanto ao custo; tempo e trabalho despendidos; quantidade, qualidade e tipo de conservação dos exemplares a serem analisados; tipo de informação gerada e aplicabilidade (HILL e CRAMPTON, 1994).

Rotineiramente, mosquitos e outros insetos são identificados com a utilização de chaves taxonômicas, com base na dicotomia de caracteres morfológicos. Ao longo dos anos, isso levou à realização de estudos anatômicos detalhados, atingindo-se o diagnóstico das chamadas morfo-espécies (FORATTINI, 2002).

Segundo FORATTINI (2002), o diagnóstico baseado em caracteres morfológicos possibilita as identificações iniciais de populações, que podem ser testadas mais detalhadamente por técnicas moleculares. Dessa maneira, várias espécies tidas anteriormente como únicas e homogêneas, provam ser constituídas por outras, isomórficas. Pois, entende-se que as populações passam por processos de especiação, alcançando níveis de isolamento reprodutivo, sem ainda ter atingido caracteres diferenciados morfolologicamente (FORATTINI, 2002).

Diferentes espécies dentro de um complexo podem exibir diferenças na ecologia, apresentar variações quanto à capacidade e competência vetoras, e diferentes respostas às medidas de controle. Assim, elucidação taxonômica de espécies pertencentes a complexos pode ajudar a resolver problemas na epidemiologia da transmissão de vários patógenos e nas medidas de controle.

Atualmente os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em Entomologia, com a finalidade de distinguir espécies crípticas, realizar estudos de genética de populações e filogenéticos, além de outras aplicações

(LINTON et al., 2002; LABRUNA et al., 2002; AYRES et al., 2003; COOK et al., 2005; BAHNCK e FONSECA, 2006; HAJIBABAEI et al., 2006; MARRELLI et al., 2007; PAVAN e MONTEIRO, 2007; MATSON et al., 2008, MIRABELLO e CONN, 2008).

1.6 Taxonomia Molecular

Em muitos casos os problemas de identificação morfológica, principalmente de espécies crípticas, foram resolvidos por métodos baseados em análises de sequências de DNA. As técnicas empregadas em taxonomia molecular são numerosas e bem diferenciadas quanto ao tipo de informação gerada e aplicabilidade (HILL e CRAMPTON, 1994). Sequências gênicas são ferramentas importantes para estudos de genética de populações (KAMBHAMPATI et al., 1992a), identificação de espécies e detecção de espécies crípticas (COOK et al., 2005; MARRELLI et al., 2005), detecção de introgressão genética (BESANSKY et al., 1994) e análises filogenéticas (BESANSKY e FAHEY, 1997; SALLUM et al., 2002; HASAN et al., 2008).

Atualmente, as técnicas mais utilizadas para identificação de variações moleculares têm sido ensaios de hibridização, utilizando sequências espécie-específica e/ou pela amplificação de fragmentos de DNA, pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Uma abordagem que foi amplamente utilizada para o diagnóstico de espécies de vários grupos de mosquitos é conhecida como "*Random Amplified Polymorphic DNA*" (RAPD-PCR). Esta técnica pode ser aplicada sem nenhuma informação molecular do genoma da espécie analisada (KAMBHAMPATI et al., 1992b; WILKERSON et al., 1993). Entretanto, um dos problemas dela é que os protocolos de RAPD-PCR, baseados em *primers* curtos, são de difícil reprodutibilidade em laboratórios com diferentes equipamentos e reagentes (COLLINS & PASKEWITZ, 1996), ou com DNA extraído e estocado por diferentes métodos (BLACK, 1993).

Por sua vez, as abordagens diretas envolvem a análise de sequências de DNA, nas quais se espera encontrar variações entre espécies próximas. Estas sequências são geralmente encontradas entre regiões repetitivas de DNA, uma vez que elas evoluem mais rápido do que genes de cópias únicas (HILL & CRAMPTON, 1994). Além disso, sequências em múltiplas cópias são mais fáceis de detectar em pequenas quantidades de DNA, tornando a técnica mais sensível. Um exemplo de tal sequência é o DNA nuclear ribossômico (DNAr), que está presente no genoma nuclear de mosquitos com aproximadamente 500 cópias (MACLAIN & COLLINS, 1989; PASKEWITZ et al., 1993).

Apesar de HEBERT et al. (2003) terem sugerido um sistema global de bio-identificação animal com o emprego de sequências da subunidade I do gene citocromo oxidase (COI) do DNA mitocondrial, como “código de barras” para cada táxon, muitos pesquisadores usam diferentes marcadores. Assim, o DNAr é empregado para a identificação de espécies e de complexos de espécies crípticas de diferentes grupos de insetos (BEEBE et al., 1999; YOUNG e COLEMAN, 2002; STAGE et al., 2007; MATSON, et al., 2008; DORN et al., 2009).

1.7 O DNA Ribossômico

O DNA ribossômico é a sequência de DNA responsável pela síntese de uma classe de moléculas essencial para a fisiologia celular, os RNAs ribossômicos (rRNAs). Eles interagem de modo específico com as proteínas ribossômicas para formar as subunidades dos ribossomos que atuam na síntese de proteínas. As sequências de DNAr ocorrem em número variado nos diferentes organismos. Nos eucariotos, essas cópias estão organizadas em série (*tandem*) e agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas (GORAB, 2001). Em *Drosophila* essas cópias podem chegar a mais de 1.000.

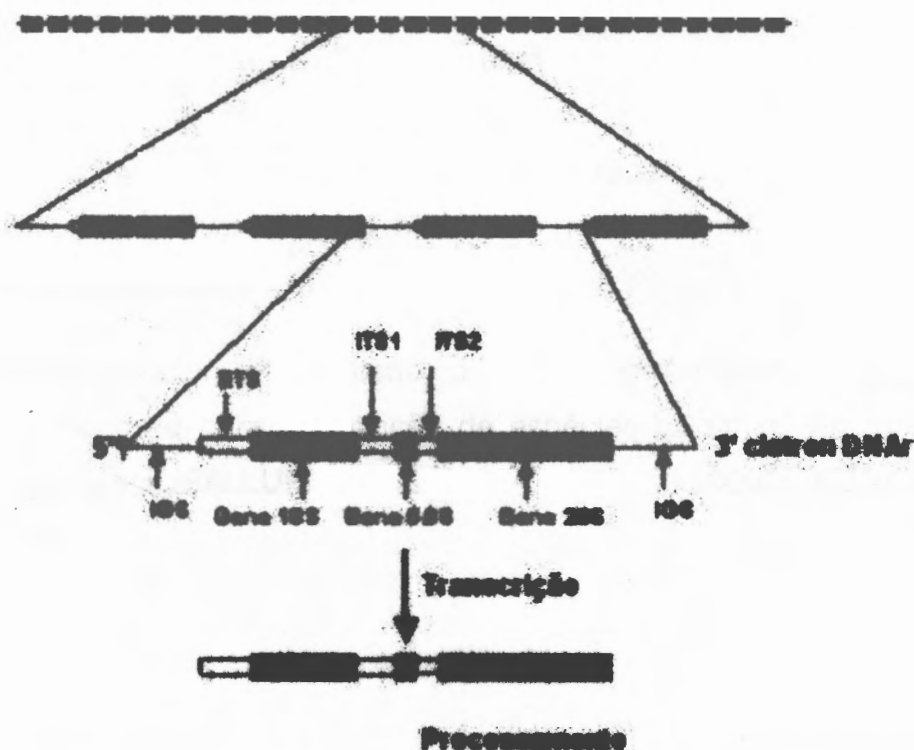


Figura 1 - Esquema do cistron ribossômico em eucariotos. Genes 18S, 5.8S e 28S, codificam para os componentes do RNA ribossômico. Espaçadores internos transcritos, ITS1 e ITS2. Espaçador externo transcrito (ETS) e espaçador intergênico (IGS).

De forma geral, cada unidade de repetição do DNA eucarionte possui uma organização conservada (Figura 1), sendo constituída por: 1) um espaçador intergênico não transcrito (IGS) que é altamente variável; 2) um espaçador externo transcrito (ETS), que é transcrito em uma sequência que contém a extremidade 5' da molécula precursora do RNA; 3) três regiões transcritas, cada uma delas com as respectivas sequências que codificam para três genes ribossômicos: 5.8S, 18S e 28S (regiões altamente conservadas); 4) dois espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) (COLLINS e PASKEWITZ, 1996). Os dois espaçadores internos transcritos fazem parte da unidade transcripcional, mas não são incluídos no RNA ribossômico final e são apenas utilizados na maturação da transcrição primária, permitindo que as três subunidades codificadoras sejam processadas.

As múltiplas cópias do DNAr tendem a se homogeneizar devido ao mecanismo da evolução em concerto, mantendo um baixo nível de variação intra-específica e intragenômica. Atualmente, acredita-se que a homogeneização de genes e famílias gênicas nos grupos seja o resultado dos processos de *crossing over* desigual, conversão gênica, deslizamento de fitas de DNA durante a replicação e amplificação (LIAO, 1999).

Graças à evolução em concerto, o ITS2 é amplamente utilizado em estudos filogenéticos e para a distinção de espécies próximas em diversos grupos de organismos (SALLUM et al., 2002; FOLEY et al., 2007; DORN et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Com 767 espécies descritas, *Culex* é o maior gênero da tribo Culicini (HARBACH, 2009). No entanto, a literatura sobre sua taxonomia, sistemática e filogenia é relativamente escassa. Este problema é refletido na dificuldade de identificação de grande parte das espécies do grupo, uma vez que poucas fêmeas apresentam características morfológicas marcantes e pouco variáveis, além de muitas pertencerem a complexos de espécies morfológicamente semelhantes. A maior parte dos estudos deste grupo está relacionada às espécies com importância epidemiológica. Estudos sobre espécies sem comprovada implicação vetorial também são poucos. Este fato contribui para a identificação imprecisa de espécies vetoras, uma vez que representantes de ambos os grupos podem ser morfológicamente semelhantes.

A correta identificação das espécies é etapa fundamental para estudos ecológicos, biológicos, epidemiológicos, de capacidade vetora (SALLUM e FORATTINI, 1996), e até mesmo para estudos de filogenia molecular. Em estudos de capacidade vetora, por exemplo, isolamentos de vírus de mosquitos coletados na natureza constituem uma evidência preliminar do envolvimento da espécie no ciclo de transmissão. No entanto, para que uma espécie não seja erroneamente incriminada como vetora há problemas, como erros na identificação entomológica, que devem ser considerados (TURELL et al., 2001).

Atualmente, sequências de DNA são amplamente utilizadas para distinção de espécies próximas e para inferências filogenéticas (PHUC et al., 2003; BAHNCK e FONSECA, 2006; BESANSKY e FAHEY, 1997). Estes estudos contribuem para o estabelecimento de uma classificação natural dos organismos baseada na sua evolução, ajudam na solução de problemas da epidemiologia da transmissão de doenças veiculadas por esses culicídeos e

nas medidas de controle das populações vetoras. Isso porque, mesmo espécies muito próximas, pertencentes a complexos, apresentam diferenças ecológicas e de comportamento (COLLINS e PASKEWITZ, 1996), podendo apresentar variações quanto à capacidade vetorial e à resposta às medidas de controle. Nesse sentido, o segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNAr é constantemente empregado na filogenia e distinção de espécies próximas de culicídeos, inclusive as crípticas (SALLUM et al., 2002; MARRELLI et al., 2005; DIJADID et al., 2007; FOLEY et al., 2007).

A primeira abordagem molecular na investigação das relações entre mosquitos *Culex* foi realizada por MILLER et al. (1996). Os autores utilizaram os espaçadores ITS1 e ITS2 do DNAr para inferir as relações entre 14 espécies do gênero *Culex*. Desde então, poucas espécies de *Culex* foram estudadas com o uso da biologia molecular, sendo as pertencentes ao complexo *pipiens* as mais bem representadas devido à sua importância epidemiológica e vasta distribuição mundial (SEVERINI et al., 1996; BAHNCK e FONSECA, 2006; KASAI et al., 2008).

Diante do apresentado, o presente estudo investigou a variabilidade intragenômica, intra-específica e interespecífica entre algumas espécies do gênero *Culex* utilizando o marcador molecular ITS2 do DNAr, com o objetivo primário de aprimorar o conhecimento taxonômico do grupo, uma vez que a maioria das espécies aqui analisadas, nunca havia sido estudada molecularmente.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- ♦ Verificar a aplicabilidade do ITS2 em taxonomia molecular de *Culex* e *Lutzia*;

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ♦ Caracterizar a região do ITS2 do DNAr de 15 espécies de *Culex* e *Lutzia bigoti* Bellardi;
- ♦ Caracterizar a variabilidade intragenômica, intra-específica e interespecífica de espécies de culicídeos pertencentes aos gêneros *Culex* e *Lutzia*.
- ♦ Estimar o *status* taxonômico de *Lutzia* em relação ao *Culex*;
- ♦ Estimar o *status* taxonômico de *Phenacomyia* em relação ao *Culex*;
- ♦ Verificar a presença de complexos de espécies crípticas em *Culex*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e Procedência dos Espécimes

O estudo foi realizado com a colaboração da Professora Maria Anice Mureb Sallum, do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública – USP, responsável pela doação dos exemplares de mosquitos utilizados neste trabalho.

Larvas e pupas de mosquitos foram coletadas no período que compreende de 2005 a 2008, em 14 localidades de quatro estados brasileiros. Os imaturos foram levados ao laboratório e mantidos até a obtenção dos adultos. As sequências de ITS2 foram caracterizadas, sempre que possível, a partir de machos adultos. As exúvias das larvas, pupas e as genitálias masculinas dos adultos usados para a extração de DNA foram montadas entre lâmina e lamínula em bálsamo do Canadá e empregadas para a identificação das espécies. Em seguida, o material foi codificado e rotulado, sendo depositado na Coleção de Referência da Faculdade de Saúde Pública como *vouchers*. Os respectivos adultos foram conservados individualmente em etanol 100% a -80°C, até o momento da extração do DNA para a realização deste trabalho. As informações sobre espécies, número de indivíduos, suas localidades e coordenadas geográficas estão listadas na Tabela 1.

4.2 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico dos mosquitos foi extraído individualmente com a utilização do kit comercial “DNeasy Blood & Tissue kit” (QIAGEN), conforme as

orientações do fabricante. Todos os tampões foram fornecidos pelo fabricante. Cada exemplar de mosquito, sem a genitália masculina, foi colocado em um tubo de microcentrífuga tipo eppendorf de 1,5 ml e macerado com o auxílio de um pistilo em 180 µl de tampão de lise ATL Eamark. Foram adicionados 20 µl de proteinase K e a solução foi incubada por 1 hora a 56°C, sendo “vortexada” a cada 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de tampão AL, e a solução foi novamente homogeneizada após a adição de 200 µl de etanol 100%.

Todo o conteúdo do tubo foi transferido para uma coluna com a membrana “DNeasy Mini spin”, acoplada ao tubo coletor de 2 ml e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. Para a realização da primeira lavagem do DNA aderido à membrana, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor. Foram adicionados 500 µl de tampão AW1 e a amostra centrifugada por 1 minuto a 8.000 rpm. Na segunda lavagem foram utilizados 500 µl de tampão AW2, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. Foram realizadas duas eluições do DNA aderido à membrana da coluna, em microtubos separados. A primeira, em 200 µl de tampão AE com incubação de 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. A segunda eluição foi conduzida em 100 µl de tampão AE, seguida de centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. Os tubos com o DNA da primeira e segunda eluições foram identificados e armazenados a -20°C.

4.3 Amplificação do DNA

A amplificação da região do ITS2 do DNAr foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) com a utilização dos *primers* 5.8S (5' ATC ACT CGG CTC GTG GAT CG 3') e 28S (5' ATG CTT AAA TTT AGG GGG TAG TC 3'), desenhados a partir de regiões conservadas que flanqueiam a região do espaçador de interesse (DJADID et al., 2007).

Tabela 1 – Espécies estudadas, código dos espécimes, sexo, localidades e coordenadas geográficas.

Espécie	Espécime	Sexo	Localidade	Coordenadas
<i>Culex (Cux.) coronator</i> Dyar e Knab	A_coro_CJ	♂	São Paulo, Campos do Jordão, Pico do Itapeva	22°45'50"S, 45°30'87"W
	B_coro_ES	♂	Espírito Santo, Linhares, Chapadão do XV	19°20.917'S, 40°07.103'W
	C_coro_VP	♂	São Paulo, Aparecida do Norte, Bairro Ponte Alta	22°50'34,4"S, 45°14'45,6"W
<i>Culex (Cux.) usquatus</i> Dyar	3_usquaSP	♂	São Paulo, Pariquera-Açu, Pariquera-Mirim	24°43.975'S, 47°49.502'W
	4_usquaSP	♂	São Paulo, Pariquera-Açu, Pariquera-Mirim	24°43.975'S, 47°49.502'W
<i>Culex (Cux.) mollis</i> Dyar e Knab	I_moll_SP	♂	São Paulo, Pariquera-Açu, Sítio Galiléia, Riacho com pedras	24°44.814'S, 47°56.927'W
	J_moll_SP	♂	São Paulo, Pariquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) chidesteri</i> Dyar	5_chid_VP	♂	São Paulo, Pindamonhangaba, Pico do Itapeva, Estrada do Instituto Agronômico	22°57'35,1"S, 45°27'08,6"W
<i>Culex (Cux.) dolosus</i> Lynch Arribalzaga	M_dolo_VP	♂	São Paulo, Pindamonhangaba, Pico do Itapeva, Estrada do Instituto Agronômico	22°57'35,1"S, 45°27'08,6"W
	N_dolo_VP	♂	São Paulo, Pindamonhangaba, Pico do Itapeva, Chácara Saint Claire	22°45'26,8"S, 45°30'49,5"W
<i>Culex (Cux.) nigripalpus</i> Theobald	O_nigr_SP	♂	São Paulo, Pariquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
	P_nigr_SP	♂	São Paulo, Pariquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Cux.) quinquefasciatus</i> Say	Q_quin_SP	♀	São Paulo, Pariquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
	R_quin_SP	♂	São Paulo, Pariquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
	S_quin_RS	♂	Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, Bairro Borgo	29°09'28.90"S, 51°30'43.55"W
	T_quin_RS	♂	Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, Bairro Borgo	29°09'28.90"S, 51°30'43.55"W
<i>Culex (Cux.) declarator</i> Dyar e Knab	W_decl_SP	♂	São Paulo, Pariquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
	Y_decl_SP	♂	São Paulo, Pariquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W

continua

Tabela 1 – Continuação

Espécie	Espécime	Sexo	Localidade	Coordenadas
<i>Culex (Cux.) bidens</i> Dyar	U_bidnsVP	♂	São Paulo, Aparecida do Norte, Bairro Ponte Alta	22°50'34,4"S, 45°14'45,6"W
<i>Culex (Mcx.) imitator</i> Theobald	D_imit_ES	♂	Espírito Santo, Santa Teresa	19°55'54,46"S, 40°35'41,61"W
	E_imit_VP	♂	São Paulo, Pindamonhangaba, Pico do Itapeva, Fazenda Saint Claire	22°45'31,7"S, 45°30'55,8"W
<i>Culex (Mel.) zeteki</i> Dyar	F_zetk_SP	♀	São Paulo, Parquera-Açu, Parquera-Mirim, Mata B	24°43.975'S, 47°49.502'W
<i>Culex (Mel.) dyius</i> Root	G_dyiusSP	♂	São Paulo, Parquera-Açu, Parquera-Mirim, Mata A	24°43.975'S, 47°49.502'W
	H_dyiusES	♂	Espírito Santo	19°11'53,0"S, 39°57'13,0"W
<i>Culex (Mel.) ybarmis</i> Dyar	Z_ybar_ES	♂	Espírito Santo	19°11'53,0"S, 39°57'13,0"W
<i>Culex (Mel.) caudelli</i> (Dyar e Knab)	V_caud_SP	♂	São Paulo, Parquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
	X_caud_SP	♂	São Paulo, Parquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Culex (Phc.) corniger</i> Theobald	1_corniSP	♂	São Paulo, Parquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
	2_corniSP	♂	São Paulo, Parquera-Açu, Bairro Vila Maria	24°43'0"S, 47°52'60"W
<i>Lutzia (Lut.) bigoti</i> (Bellardi)	K_bigotSP	♀	São Paulo, Serra da Cantareira	23°26'12,44"S, 46°38'05,09"W
	L_bigotPR	♀	Paraná, São José dos Pinhais	25°33'14,48"S, 49°14'08,69"W

A reação de amplificação foi conduzida em volume final de 25 µl, contendo de 3 a 10 µl de DNA genômico (1.^a eluição), 2,5 µl de 10X PCR buffer (Fermentas), 1,25 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas), 10 picomoles de cada iniciador, 8% de DMSO, 1,25 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas) e água ultrapura (Distilled Water DNase, RNase Free -Invitrogen) para completar o volume total. A amplificação foi realizada em termociclador "MyCycle Thermal Cycler" (BIO-RAD), programado para desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 34 ciclos com desnaturação a 94°C, anelamento a 55°C e extensão a 72°C, cada fase com duração de 30 segundos, e extensão final a 72°C por 20 minutos.

4.4 Eletroforese e Purificação dos Produtos de PCR

Alíquotas de 3 µl dos produtos de PCR, com 1 µl de tampão de amostra 6x, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1.5%. Após eletroforese a 80 v, por 45 minutos, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) (SAMBROOK et al., 2001) por 20 minutos, visualizado em transiluminador SYNGENE (Synoptics Ltd.) com luz ultravioleta, seguido de captura de imagem com câmera UVP-Biolmaging Systems, e foto documentação pelo programa LABWorks™. Como marcador de peso molecular para verificação do tamanho das bandas das sequências amplificadas, foi utilizado o Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Os produtos amplificados foram purificados com isopropanol. A cada reação de PCR foi adicionado 1 volume de isopropanol, em seguida a solução foi homogeneizada por inversão e incubada a 37°C por 5 minutos. Após 8 minutos de centrifugação a 13.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado lavado duas vezes com etanol 75% gelado (-20°C). As amostras permaneceram a 37°C em banho seco até secarem, o DNA ressuspendido em 15 µl de água ultrapura (Invitrogen) e armazenadas a -20°C.

4.5 Clonagem

4.5.1 Ligaç o

Os fragmentos de ITS2 amplificados foram inseridos em plasm deo vetor pTZ57R/T do sistema "InsTAclone™ PCR Cloning Kit" (Fermentas). A rea o de liga o foi conduzida em volume final de 10 µl, contendo 4,5 µl de produto de PCR purificado, 1 µl de vetor pTZ57R/T, 2,5 µl de tamp o de liga o 5X e 2 µl de enzima T4 DNA ligase. Cada rea o foi incubada   temperatura ambiente por 1 hora e mantida a 4°C *overnight*. Na manh  seguinte a rea o foi armazenada a -20°C, at  o momento da transforma o.

4.5.2 Transforma o

Para o processo de transforma o, os 10 µl de cada liga o foram adicionados a 50 µl de bact ria competente *E. coli* linhagem DH5α (Invitrogen), e mantidos em banho de gelo por 25 minutos. Em seguida foi realizado choque t rmico a 42°C em banho-maria por 2 minutos e as amostras foram recolocadas no gelo por mais 5 minutos. Foram adicionados 250 µl de meio de cultura LB (Lennox LB Broth Base, Invitrogen) l quido, e as bact rias foram levadas ao *shaker* por 1h e 30 minutos, a 37°C, com agita o constante a 200 rpm.

4.5.3 Prepara o das placas e plaqueamento

Foram preparadas placas com meio de cultura LB- gar (Lennox L Agar, Invitrogen) com adi o de ampicilina (100 mg/ml), e tratadas com IPTG (100 mM) e XGal 2% (20 mg/1 ml de dimetilformamida), para o cultivo

das bactérias transformadas. As placas com as alíquotas de 80 μ l e 100 μ l de bactérias da mesma transformação foram semeadas em diferentes placas e mantidas na estufa a 37°C *overnight*.

4.5.4 Seleção das colônias

As colônias azuis foram desprezadas e pelo menos 10 colônias brancas de cada ligação foram selecionadas aleatoriamente, sempre que possível. Cada colônia branca foi pescada com auxílio de uma alça calibrada estéril e descartável, colocada individualmente em tubos tipo *ependorf* (1,5 ml) identificados e contendo 20 μ l de água ultrapura para serem empregadas na *colony PCR*.

4.6 Colony PCR

A *colony PCR* foi a técnica escolhida para a obtenção das sequências de ITS2 clonadas em *E. coli*, por ser relativamente rápida e eficiente. Para a PCR das colônias foram utilizados os *primers* M13/pUC F (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') e M13/pUC R (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'), específicos para regiões do plasmídeo que flanqueiam o inserto.

A reação de amplificação foi conduzida em volume total de 25 μ l, contendo de 3 a 5 μ l de colônia, 2,5 μ l 10X PCR buffer (Fermentas), 1,25 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas), 10 picomoles de cada iniciador do vetor de clonagem, DMSO a 8%, *Taq* DNA Polimerase (Fermentas) e água ultrapura (Invitrogen) para completar o volume total. A amplificação foi realizada em termociclador "MyCycler Thermal Cycler" (BIO-RAD) com ciclagem para desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 34 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 3

minutos. Os produtos da *colony* PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) após eletroforese.

Os produtos foram purificados com isopropanol, conforme protocolo descrito anteriormente, para posterior quantificação em gel de agarose. Como marcador de peso molecular foi utilizado o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A visualização das bandas no gel para cálculo do peso molecular aproximado foi feita em transiluminador UV, seguida de captura de imagem.

4.7 Sequenciamento

Para o sequenciamento dos clones foram utilizados os mesmos *primers* (M13/pUC F e M13/pUC R) do vetor empregados na *colony* PCR. Todas as reações de sequenciamento foram conduzidas pelo método de Sanger (1977), sequenciamento pela terminação em cadeia pelos didesoxirribonucleosídeos trifosfatados, com utilização do fluoróforo Big Dye[®] Terminator v3.1 (PE Applied Biosystem, Warrington, UK). As amostras de DNA foram sequenciadas em ambas as direções. Cada reação foi conduzida em volume final de 15 µl, contendo de 20 a 50 ng de DNA dos produtos purificados da *colony* PCR, 3 µl Tampão 5x, DMSO a 10%, 3,2 pmoles de cada iniciador (em reações separadas), 1 µl de Big Dye[®] Terminator v3.1 e água ultrapura (Invitrogen) para completar o volume final. A reação foi conduzida em termociclador "MyCycler Thermal Cycler" (BIO-RAD) por 25 ciclos com desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Após a PCR o DNA foi precipitado para remoção de sais e componentes do kit não incorporados. Os 15 µl de reação foram homogeneizados com 100 µl de solução de acetato de sódio (3 M) com etanol 100% e incubados no gelo por 15 minutos. A seguir, foram centrifugados por 30 minutos, a 4.000 rpm, à temperatura ambiente. Todo o conteúdo do tubo foi descartado e foram

adicionados 200 µl de etanol 70% gelado, sem “vortexar”. As amostras foram novamente centrifugadas por 30 minutos a 4.000 rpm, à temperatura ambiente, e todo o sobrenadante desprezado. Os tubos com o DNA precipitado foram mantidos a 95°C por aproximadamente 1 minuto, até secarem completamente, protegidos da luz em papel alumínio e armazenados a -20°C até o sequenciamento. Após a precipitação, as amostras foram encaminhadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA (SSDNA) do Departamento de Bioquímica – IQUSP, para a análise fluorescente das sequências em sequenciador automático modelo ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer/HITACHI. Foram sequenciados de 3 a 7 clones por indivíduo.

4.8 Alinhamento e Análise das Sequências

Todas as sequências de ITS2 obtidas, incluindo as porções do gene 5.8S e do 28S, foram editadas com o uso do programa Chromas Lite v. 2.01, a partir da comparação entre as fitas senso e antisenso para eliminação de erros de leitura do sequenciamento. A fita consenso de cada clone foi submetida à busca por similaridade pelo programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTN) (ZHANG, 2000), disponível no banco mundial de dados genéticos para confirmação da região amplificada. Em seguida, cada sequência foi submetida à análise no site ITS2 *database* (SCHULTZ et al., 2006; SELIG et al., 2008) com o uso da ferramenta “ITS2 *annotation*” (KELLER et al., 2009) para determinação exata da região do ITS2 e das porções do 5.8S e 28S. Para o alinhamento múltiplo das sequências foi utilizado o programa Clustal X v. 2.0 (LARKIN et al., 2007), com penalidades 10 e 5 para os parâmetros “*gap opening*” e “*gap extension*”, respectivamente. Para o grupo externo foram utilizadas sequências disponíveis no GenBank de três espécies: *Psorophora (Janthinosoma) ferox*

(Von Humboldt) (M95129), *Aedes (Aedimorphus) vexans* Meigen (EF539857) e *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (AY512670). Na tentativa de minimizar erros de alinhamento, esse foi realizado aos grupos, em etapas sucessivas. Primeiro todos os clones das espécies dos subgêneros *Microculex*, *Melanoconion* e (*Culex* + *Phenacomyia* + gênero *Lutzia*) foram alinhados separadamente. Em seguida, os clones previamente alinhados do subgênero *Meanoconion* foram realinhados com base no alinhamento do grupo *Microculex*. A seguir, os clones alinhados do grupo (*Culex* + *Phenacomyia* + *Lutzia*) foram realinhados com base no alinhamento anterior (*Microculex*. + *Melanoconion*). Finalmente, o grupo externo previamente alinhado foi realinhado ao grupo interno.

As variações intragenômicas, intra-específicas e interespecíficas das sequências foram estimadas no programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (MEGA) v. 4.0 (TAMURA et al., 2007) a partir de análises das respectivas matrizes de distância com modelo *p*-distance não corrigido. Como parte da análise intra-específica foi realizada ainda uma busca por similaridade entre as sequências disponíveis no GenBank, com o uso da ferramenta “FASTA search” no BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Como na maioria dos casos houve variação de clones por indivíduo, sempre que possível foram utilizadas as duas sequências clonadas mais frequentes por espécie, ou quando da impossibilidade de definir as sequências mais frequentes, duas variantes foram selecionados aleatoriamente para a busca.

Após a remoção das sequências repetidas e novo alinhamento, aos grupos como descrito anteriormente, foi construída uma árvore de distância. Assim, do total de 144 sequências clonadas, 99 foram utilizadas para gerar uma topologia pelo método de *Neighbour-joining* (NJ) (SAITOU e NEI, 1987), com *p*-distance não corrigido, pelo programa “Phylogenetic Analysis Using Parsimony*” (PAUP) v. 4.0 (SWOFFORD, 2003).

4.8.1 Seleção dos clones pela estrutura secundária

Devido à alta variabilidade intragenômica observada em alguns indivíduos, a topologia de NJ apresentou ambiguidades. Assim, com o intuito de minimizar as ambiguidades e obter topologia com melhor definição dos agrupamentos, adotou-se critério para seleção das sequências pela estrutura secundária do DNAr.

Primeiro, pelo menos duas sequências de cada indivíduo foram utilizadas para a obtenção das estruturas secundárias com a ferramenta “*Model*” disponível no site ITS2 *database* (SCHULTZ et al., 2006; SELIG et al., 2008), para o conhecimento e comparação do padrão das estruturas geradas.

Diante da variabilidade interespecífica no padrão espacial das estruturas, principalmente entre os diferentes subgêneros, realizou-se uma busca pelo melhor modelo de estrutura secundária entre as espécies estudadas. Para isso, uma sequência de cada espécie, com a estrutura em formato *Vienna* obtida com o programa “*DNA Folding*” (ZUKER, 2003), foi utilizada como molde para o estabelecimento de homologia com os demais clones usando a ferramenta “*Homology Modelling*” (WOLF et al., 2005).

Após a obtenção do molde consenso (5a_chidVP), todos os clones referentes ao mesmo exemplar de *Culex chidesteri* foram testados como molde para verificar se este clone ainda permaneceria como o melhor modelo. Realmente, o clone 5a_chidVP foi o que apresentou melhor cobertura em relação à todas as espécies. Desta forma, a seleção dos clones para a nova árvore de NJ foi realizada com o programa “*Homology Modelling*” (WOLF et al., 2005), tendo como molde o clone 5a_chidVP e os seguintes parâmetros estabelecidos: matriz de identidade, transferência das hélices com similaridade >75% e penalidades 10 e 5 para “*gap opening*” e “*gap extension*”, respectivamente. Para assegurar alto desempenho na predição do modelo, foi estabelecida similaridade >75%,

para que a estrutura só fosse transferida se mais de 75% de todos os pares de bases de cada hélice pudessem ser adotados. A lista com a classificação dos modelos obtidos para cada clone com os valores de transferência de cada hélice e energia, é apresentada no Anexo 1. Apenas os clones com modelo de alta qualidade (*high quality model* >75%) foram selecionados. Devido à alta variabilidade entre os subgêneros *Microculex* e *Melanoconion* em relação ao *Culex*, nenhum representante dos dois subgêneros apresentou modelo de alta qualidade. Assim, o mesmo critério de busca do melhor modelo foi aplicado separadamente para o grupo destes subgêneros.

O clone F4_zete_SP da espécie *Culex (Mel.) zeteki* foi selecionado como molde e a lista dos modelos obtidos para os demais clones é apresentada no Anexo 2. Apenas as sequências com modelo de alta qualidade foram selecionadas, exceto no caso dos clones de *Microculex*. Por não terem apresentado nenhum exemplar com modelo de alta qualidade, neste subgênero foram selecionados apenas os clones que obtiveram valores >75% pelo menos para duas das quatro hélices da estrutura. Sendo excluídos apenas os exemplares D3_imit_ES, D4_imit_ES e D5_imit_ES, conforme o Anexo 2.

Após a seleção dos clones, o alinhamento foi editado manualmente no programa MacClade versão 4.0 (MADDISON e MADDISON, 2000). Embora pouca alteração tenha sido feita por conta da elevada variabilidade intra e interespecífica, foi gerada nova árvore de NJ apenas com os diferentes clones por indivíduo (variantes) como descrito anteriormente.

5 RESULTADOS

Foram clonados produtos de PCR de 31 indivíduos pertencentes aos subgêneros *Microculex*, *Melanoconion*, *Culex* e *Phenocomyia* e ao *Lutzia* (*Lutzia*) (Tabela 1). O número de clones sequenciados por indivíduo variou de três a sete, perfazendo um total de 144 clones sequenciados.

Os comprimentos dos fragmentos de ITS2 clonados, incluindo 41 pb da porção final do gene 5.8S e 41 pb da porção inicial do 28S do DNAr, variaram de 281 a 421 pb. A maior sequência (421 pb) foi observada em *Culex quinquefasciatus* (Q_quin_SP) e a menor (281 pb) em *Cx. imitator* Theobald (D_imit_ES). A média do conteúdo GC entre todos os clones foi de 51%.

5.1 Variação Intragenômica

Dentre os 31 espécimes analisados, 9 (J_moll_SP, U_bidnsVP, P_nigri_SP, W_decl_SP, H_dyiusES, Z_ybar_ES, V_caud_SP, K_bigotSP e L_bigotPR) não apresentaram variação no tamanho dos fragmentos clonados dentro de cada indivíduo. No entanto, desses, apenas o exemplar *Culex mollis* Dyar e Knab (J_moll_SP) não apresentou variação quanto à composição nucleotídica entre seus clones. As diferenças nos comprimentos dos fragmentos são resultados de inserções ou perdas de nucleotídeos (indel) na região do ITS2. Não foram observados indéis no 5.8S e 28S. Os clones de *Cx. dolosus* Lynch Arribalzaga (N_dolo_VP) apresentaram diferenças de até 16 pares de bases.

O número total de clones e suas “variantes” (clones diferentes) por espécime, o tamanho dos fragmentos de ITS2, a média das distâncias (p -

Tabela 2 – Variabilidade das sequências de ITS2 entre todos os clones do mesmo indivíduo.

Espécimes	N.º clones (variantes)	Comprimento ITS2 (pb)	Média p-distance não corrigido	Média frequência (%) Nucleotídica				Média substituição nucleotídica		
				T	C	A	G	ti	tv	R
A_coro_CJ	6 (6)	384 - 386	0,016	24,2	28,5	22,9	24,4	4	2	2,4
B_coro_ES	3 (2)	380 - 386	0,004	24,6	28,7	22,5	24,2	1	0	-
C_coro_VP	5 (5)	382 - 388	0,017	24,1	28,7	23,0	24,2	5	2	2,7
3_usquaSP	5 (5)	376 - 379	0,005	23,9	28,7	23,0	24,4	2	0	4,0
4_usquaSP	5 (2)	376 - 380	0,006	24,2	28,3	22,9	24,7	2	1	2,0
I_moll_SP	5 (4)	363 - 367	0,012	24,5	27,6	24,6	23,3	3	2	1,7
J_moll_SP	5 (1)	374	0	25,4	27,8	24,1	22,7	0	0	-
U_bidnsVP	4 (3)	359	0,005	24,8	29,0	22,8	23,4	2	0	-
5_chid_VP	5 (4)	368 - 370	0,005	23,6	29,4	24,8	22,2	1	1	0,7
M_dolo_VP	5 (2)	365 - 367	0,008	24,1	28,7	23,8	23,3	3	0	-
N_dolo_VP	7 (3)	350 - 366	0,009	24,8	28,6	23,1	23,5	3	1	4,5
O_nigr_SP	5 (5)	359 - 362	0,013	24,1	28,2	25,3	22,5	4	0	11,0
P_nigr_SP	5 (2)	362	0,002	23,9	28,2	25,5	22,4	0	1	-
Q_quin_SP	5 (4)	418 - 421	0,005	21,1	29,8	25,2	24,0	2	0	-
R_quin_SP	4 (3)	406 - 417	0,013	21,3	29,7	24,9	24,1	4	1	4,3
S_quin_RS	6 (4)	414 - 420	0,007	20,9	30,0	25,1	23,9	3	0	-
T_quin_RS	5 (2)	415 - 418	0,007	20,8	29,9	25,2	24,0	3	0	-
W_decl_SP	5 (3)	368	0,004	23,9	29,1	23,5	23,4	1	0	3,0
Y_decl_SP	3 (2)	365 - 369	0,011	23,8	29,3	23,6	23,4	3	1	5,0
D_imit_ES	5 (3)	281 - 286	0,039	27,0	27,7	25,2	20,1	8	3	2,4

continua

Tabela 2 – Continuação

Espécimes	N.º clones (variantes)	Comprimento ITS2 (pb)	Média p-distance não corrigido	Média frequência (%) nucleotídica				Média substituição nucleotídica		
				T	C	A	G	ti	tv	R
E_imit_VP	5 (2)	293 - 295	0	26,3	28,0	26,2	19,4	0	0	-
F_zetk_SP	5 (3)	288 - 289	0,005	27,3	26,4	25,6	20,7	0	1	0,4
G_dyiusSP	3 (3)	290 - 294	0,012	27,8	26,3	25,4	20,5	1	2	0,7
H_dyiusES	5 (2)	287	0,004	28,4	25,3	27,0	19,3	1	0	-
Z_ybar_ES	3 (2)	300	0,009	26,6	27,8	25,4	20,2	3	0	-
V_caud_SP	5 (4)	287	0,023	28,2	25,4	27,3	19,2	5	1	4,3
X_caud_SP	5 (3)	287 - 288	0,017	28,4	24,7	27,6	19,2	4	1	7,0
1_corniSP	5 (3)	360 - 361	0,003	26,6	26,3	25,2	21,9	1	0	-
2_corniSP	3 (2)	350 - 358	0,006	25,4	26,9	24,7	23,0	2	0	-
K_bigotSP	4 (2)	358	0,002	23,7	29,5	24,2	22,6	1	0	-
L_bigotPR	3 (2)	360	0,002	23,5	29,8	24,2	22,5	1	0	-

Notas:

Ti = taxa de transições

Tv = taxa de transversões

R = Ti/Tv

distance) entre as sequências clonadas, a média da composição nucleotídica e das taxas de substituição entre os clones do mesmo indivíduo estão apresentados na Tabela 2. Os dados mostram que apesar do exemplar *Culex imitator* (E_imit_VP) ter apresentado distância zero (0%) entre todas as sequências de seus clones, a maior média de distância entre todos os clones por indivíduo foi observada na mesma espécie, no exemplar coletado no Espírito Santo (D_imit_ES) com 3,9%. A distância média entre os dois espécimes, de São Paulo e do Espírito Santo, foi de 5,4%, a partir da comparação de todos os clones agrupados por indivíduo (matriz não apresentada).

Tabela 3 – Variabilidade intragenômica, entre as sequências de ITS2 de todos os clones e das variantes selecionadas pela estrutura secundária, do mesmo indivíduo.

Espécimes	Comprimento ITS2 (pb)	Todos clones		Variantes	
		N.º clones	Média p-distance não corrigido	N.º variantes	Média p-distance não corrigido
A_coro_CJ	304 – 302	6	0,019	5	0,023
B_coro_ES	298 – 304	3	0,002	2	0,003
C_coro_VP	300 – 306	5	0,022	5	0,024
3_usquaSP	294 – 297	5	0,007	5	0,007
4_usquaSP	294 – 298	5	0,007	2	0,009
I_moll_SP	281 – 285	5	0,009	4	0,007
J_moll_SP	292	5	0	1	0
U_bidnsVP	277	4	0,004	3	0,005
5_chid_VP	286 – 288	5	0,009	4	0,009
M_dolo_VP	283 – 285	5	0,011	2	0,018
N_dolo_VP	268 – 284	6	0,011	2	0,019
O_nigr_SP	277 – 280	5	0,014	5	0,014
P_nigr_SP	280	5	0,002	2	0,004
Q_quin_SP	336 – 339	5	0,007	4	0,009
R_quin_SP	324 – 335	4	0,011	3	0,015
S_quin_RS	332 – 338	6	0,009	4	0,013
T_quin_RS	333 – 336	5	0,009	2	0,015
W_decl_SP*	-	-	-	-	-
Y_decl_SP	283 – 287	3	0,014	2	0,021
D_imit_ES	199	2	0	1	0
E_imit_VP	211 – 213	5	0	2	0
F_zetk_SP	206 – 207	5	0,002	3	0,003
G_dyiusSP	208 – 212	3	0,016	3	0,016
H_dyiusES	205	5	0,006	2	0,010
Z_ybar_ES	218	3	0,009	2	0,014
V_caud_SP	205	5	0,029	4	0,032
X_caud_SP	205	4	0,020	2	0,040
1_corniSP	279	4	0,002	2	0,004
2_corniSP	268 – 276	3	0,007	2	0,011
K_bigotSP	276	4	0,002	2	0,004
L_bigotPR	278	3	0,002	2	0,004

Notas: * exemplar excluído das análises devido à seleção pela estrutura secundária.

A tabela 3 mostra os dados referentes à variabilidade intragenômica após a seleção das sequências (apenas do ITS2) pela estrutura secundária da molécula. De maneira geral, observou-se discreto aumento nos valores das médias das distâncias em comparação aos dados da Tabela 2, exceto no caso de *Culex imitator* (D_imit_ES) que passou a apresentar média de distância zero devido à exclusão de 3 sequências.

5.2 Variação Intra-específica

Tabela 4 – Variabilidade das sequências de ITS2 entre todos os clones selecionados (pela estrutura secundária) e entre as variantes dentro da mesma espécie.

Espécie (n.º espécime)	Comprimento ITS2 (pb)	Todos clones		Variantes	
		N.º clones	Média p-distance não corrigido	N.º variantes	Média p-distance não corrigido
<i>Cx. (Cux.) coronator</i> (3)	298 – 306	14	0,019	12	0,019
<i>Cx. (Cux.) usquatus</i> (2)	294 – 298	10	0,007	7	0,010
<i>Cx. (Cux.) mollis</i> (2)	281 – 285	10	0,012	5	0,011
<i>Cx. (Cux.) bidens</i> (1)	277	4	0,004	3	0,005
<i>Cx. (Cux.) chidesteri</i> (1)	286 – 288	5	0,009	4	0,009
<i>Cx. (Cux.) dolosus</i> (2)	268 – 285	11	0,017	4	0,020
<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i> (2)	277 – 280	10	0,009	7	0,012
<i>Cx. (Cux.) quinquefasciatus</i> (4)	324 – 339	20	0,009	13	0,010
<i>Cx. (Cux.) declarator</i> (1)	283 – 287	3	0,014	2	0,021
<i>Cx. (Mcx.) imitator</i> (2)	199 – 213	7	0,038	3	0,050
<i>Cx. (Mel.) zeteki</i> (1)	206 – 207	5	0,002	3	0,003
<i>Cx. (Mel.) dyius</i> (2)	205 – 212	8	0,030	5	0,037
<i>Cx. (Mel.) ybarmis</i> (1)	218	3	0,009	2	0,014
<i>Cx. (Mel.) caudelli</i> (2)	205	9	0,027	6	0,030
<i>Cx. (Phc.) corniger</i> (2)	268 – 276	7	0,006	4	0,008
<i>Lt. (Lut.) bigoti</i> (2)	276 – 278	7	0,003	4	0,004

A partir da análise das matrizes de distância por espécie, a Tabela 4 apresenta o número de exemplares por espécie, o tamanho dos fragmentos

de ITS2 (sem as porções 5.8S e 28S), o número total de clones selecionados pela estrutura secundária com suas médias de distâncias e o número de variantes por espécie com suas médias de distâncias. Considerando-se apenas as espécies com mais de um indivíduo clonado, *Lutzia (Lut.) bigoti* apresentou a menor média de divergência entre todas as sequências selecionadas dentro da espécie (0,3%) e entre suas variantes (0,4%). *Culex imitator* apresentou as maiores médias de distâncias, 3,8% (entre todos os clones selecionados) e 5% (entre as variantes selecionadas).

Na matriz de distância com *p-distance* não corrigido, confeccionada a partir da seleção e separação apenas das variantes por indivíduo (Tabela 5), observou-se maior divergência (7,1%) entre os espécimes de *Culex imitator* (D_imit_ES e E_imit_VP) e 3,3% em *Culex dyius* Root (G_dyiusSP e H_dyiusES). Em ambos os casos, entre espécimes de diferentes localidades (São Paulo e Espírito Santo). *Culex caudelli* (V_caud_SP e X_caud_SP) apresentou distância de 1,4% e as demais distâncias entre exemplares da mesma espécie foram abaixo de 0,7%, com distância zero (0) entre os indivíduos de *Culex mollis* (I_moll_SP e J_moll_SP), *Cx. quinquefasciatus* (Q_quin_SP, R_quin_SP, S_quin_SP, T_quin_SP) e *Lutzia bigoti* (K_bigotSP e L_bigot_PR).

5.3 Variação Interespecífica

Na busca por similaridade (BLASTN) entre as sequências selecionadas (duas por espécie) e as disponíveis no GenBank, houve cobertura de 100% em todos os casos. No entanto, dentre as espécies estudadas, só há sequências de *Culex (Cux.) quinquefasciatus* e *Cx. (Cux) nigripalpus* Theobald depositadas no GenBank. Nestes casos, além da cobertura de 100%, a similaridade entre a sequência selecionada para a busca e a encontrada no banco de dados foi de 100% (T4_quin_RS x GenBank:U22124.1) e 98% (Q1_quin_SP x GenBank:U22128.1) para *Cx. quinquefasciatus*, e 98% para *Cx. nigripalpus* (P1_nigr_SP x GenBank:AF521663.1 e O5_nigr_SP x AF521663.1). Quando comparada a sequência de *Cx. quinquefasciatus* do espécime de São Paulo com o mesmo clone do GenBank, com o qual o exemplar do Rio Grande do Sul apresentou 100% de similaridade, observa-se 96% de similaridade entre as sequências. A distância “*p*” entre as sequências T4_quin_RS e Q1_quin_SP foi 0,4% (considerando as porções 5.8S e 28S).

Como relatado anteriormente, observou-se heterogeneidade no tamanho dos fragmentos de ITS2 clonados. Considerando apenas a região do ITS2, a espécie representante do subgênero *Microculex (Culex imitator)* apresentou as menores sequências (199 a 213 pb), enquanto as espécies pertencentes ao subgênero *Culex*, os maiores fragmentos (277 a 339 pb). Em *Melanoconion* o comprimento variou de 205 a 213 pb, em *Phenacomyia* de 268 a 276 pb, e em *Lutzia bigoti*, a variação foi de 276 a 278 pb.

Conforme os dados da matriz de distância com *p-distance* não corrigido entre as variantes por espécie (Tabela 6), a menor distância entre sequências de diferentes espécies foi observada entre *Culex declarator* Dyar e Knab e *Cx. bidens* Dyar (0,5%) e entre *Cx. coronator* e *Cx. usquatus* (0,5%). Dentro do subgênero *Melanoconion* a menor diferença foi observada entre *Culex ybarmis* Dyar e *Cx. dyius* (2,2%). *Culex caudelli* apresentou a maior diferença em relação a todas as outras espécies do subgênero, com

7,7% de distância em relação a *Cx. zetekii* Dyar, 7,8% em relação a *Cx. ybarmis* e 8,2% em relação a *Cx. dyius*.

Tabela 6 – Matriz de distância (p-distance não corrigido) entre os grupos de diferentes haplótipos de cada espécie. As amostras estão abreviadas conforme a Tabela 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>Cx. imitator</i>																
2. <i>Cx. zetekii</i>	0.239															
3. <i>Cx. dyius</i>	0.245	0.051														
4. <i>Cx. ybarmis</i>	0.243	0.041	0.022													
5. <i>Cx. caudelli</i>	0.248	0.077	0.082	0.078												
6. <i>Cx. mollis</i>	0.427	0.380	0.360	0.353	0.389											
7. <i>Cx. dolosus</i>	0.408	0.364	0.344	0.337	0.377	0.019										
8. <i>Cx. bidens</i>	0.412	0.365	0.345	0.338	0.387	0.053	0.037									
9. <i>Cx. declarator</i>	0.411	0.364	0.344	0.337	0.386	0.054	0.038	0.005								
10. <i>Cx. nigripalpus</i>	0.411	0.377	0.357	0.349	0.392	0.062	0.046	0.052	0.053							
11. <i>Cx. chidesteri</i>	0.400	0.372	0.352	0.345	0.387	0.056	0.040	0.052	0.053	0.029						
12. <i>Lt. bigoti</i>	0.389	0.368	0.347	0.340	0.382	0.038	0.022	0.034	0.035	0.037	0.030					
13. <i>Cx. coronator</i>	0.402	0.381	0.357	0.349	0.389	0.037	0.030	0.039	0.040	0.041	0.035	0.018				
14. <i>Cx. usquatus</i>	0.403	0.381	0.354	0.347	0.389	0.041	0.035	0.043	0.044	0.046	0.040	0.022	0.005			
15. <i>Cx. corniger</i>	0.407	0.379	0.357	0.351	0.394	0.079	0.063	0.055	0.056	0.064	0.051	0.046	0.051	0.056		
16. <i>Cx. quinquefasciatus</i>	0.406	0.391	0.379	0.369	0.408	0.115	0.099	0.098	0.099	0.101	0.082	0.083	0.088	0.092	0.103	

5.4 Topologia Neighbor-joining (NJ)

A grande variabilidade entre as sequências das espécies estudadas levou à obtenção de um alinhamento ambíguo. A inclusão de muitas inserções/deleções e as substituições nucleotídicas dificultou a identificação de sítios homólogos.

Diante da dificuldade e impossibilidade de edição manual do alinhamento, apenas a árvore de NJ foi gerada a fim de examinar a variabilidade entre as sequências clonadas. Mesmo com o alinhamento ambíguo, foram feitas tentativas para produzir uma árvore filogenética pelo método de Máxima Parcimônia com o programa “Phylogenetic Analysis Using Parsimony*” (PAUP) v.4.0. Porém, o programa só chegou a um determinado ponto da análise, não conseguindo finalizar a busca pela árvore mais parcimoniosa.

A árvore de distância foi obtida pelo método de *Neighbour-joining* (NJ) com base nos dados da matriz de distância das variantes das sequências

clonadas (com as regiões do 5.8S e 28S), com *p-distance* não corrigido. O suporte dos grupos obtidos foi estimado pelo método de *bootstrap*, com 1.000 réplicas. Na topologia de NJ (Figura 2) os clones gerados de indivíduos distintos de um mesmo táxon se agruparam.

No subgênero *Culex*, *Culex nigripalpus* + *Cx. chidesteri* Dyar, *Culex declarator* + *Cx. bidens* e *Cx. mollis* + *Cx. dolosus* formaram grupos próximos com suporte de *bootstrap* de 100% para os dois primeiros grupos e 99% para o último. A posição do grupo das espécies do complexo Coronator (*Culex usquatus* e *Cx. coronator*) também foi sustentada pelo valor elevado de *bootstrap* (100%). Apenas *Culex quinquefasciatus* não se agrupou ao conjunto dos demais táxons do subgênero, ocupando um posicionamento como grupo vizinho aos demais.

Na topologia de NJ, *Lutzia* e *Phenacomyia* ficaram posicionados dentro do gênero *Culex*. Os subgêneros *Melanoconion* e *Microculex* formaram grupos distintos, porém geneticamente próximos. Dentre as espécies do subgênero *Melanoconion*, *Culex dyius* e *Cx. ybarmis* formaram grupos próximos. Em *Culex imitator* a grande variabilidade intragenômica em um de seus exemplares (D_imit_ES) foi refletida na árvore. Assim, na tentativa de minimizar essas ambiguidades na topologia, uma segunda árvore de NJ foi gerada a partir de sequências selecionadas pela similaridade das estruturas secundárias (Figura 3).

A segunda árvore de NJ (Figura 3) apresentou uma sutil diminuição das ambiguidades, observada pela melhor definição dos táxons terminais principalmente no caso de *Culex imitator* e *Cx. usquatus*. No entanto, a alteração mais notável foi a modificação do posicionamento de *Lutzia*, que na primeira topologia estava entre *Culex (Phc.) corniger* e o grupo dos representantes do complexo Coronator (*Cx. coronator* + *Cx. usquatus*) e que passou a compartilhar o mesmo grupo formado por *Cx. mollis*, *Cx. dolosus*, *Cx. bidens*, *Cx. declarator*, *Cx. nigripalpus* e *Cx. chidesteri*, embora em ambos os casos o suporte de *bootstrap* tenha sido baixo, 54% e 56% respectivamente.

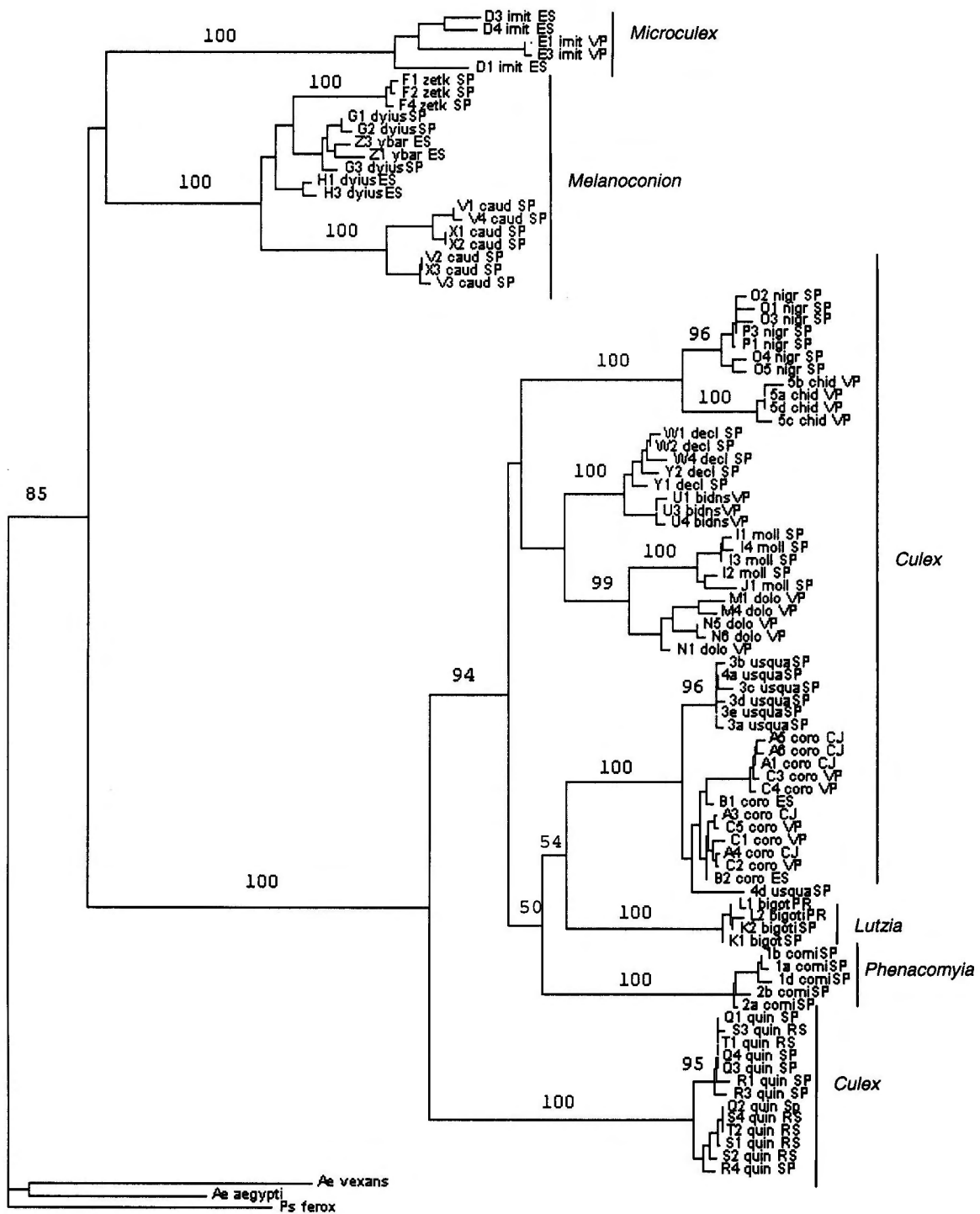


Figura 2 – Árvore de NJ gerada com as variantes de ITS2 de quinze espécies do gênero *Culex* e uma do gênero *Lutzia*. A árvore foi construída pelo método de NJ, *p-distance* não corrigido, *bootstrap* de 1000 réplicas (%) e enraizada com as sequências do GenBank de *Ae. vexans* (EF539857), *Ps. ferox* (M95129) e *Ae. aegypti* (AY512670).

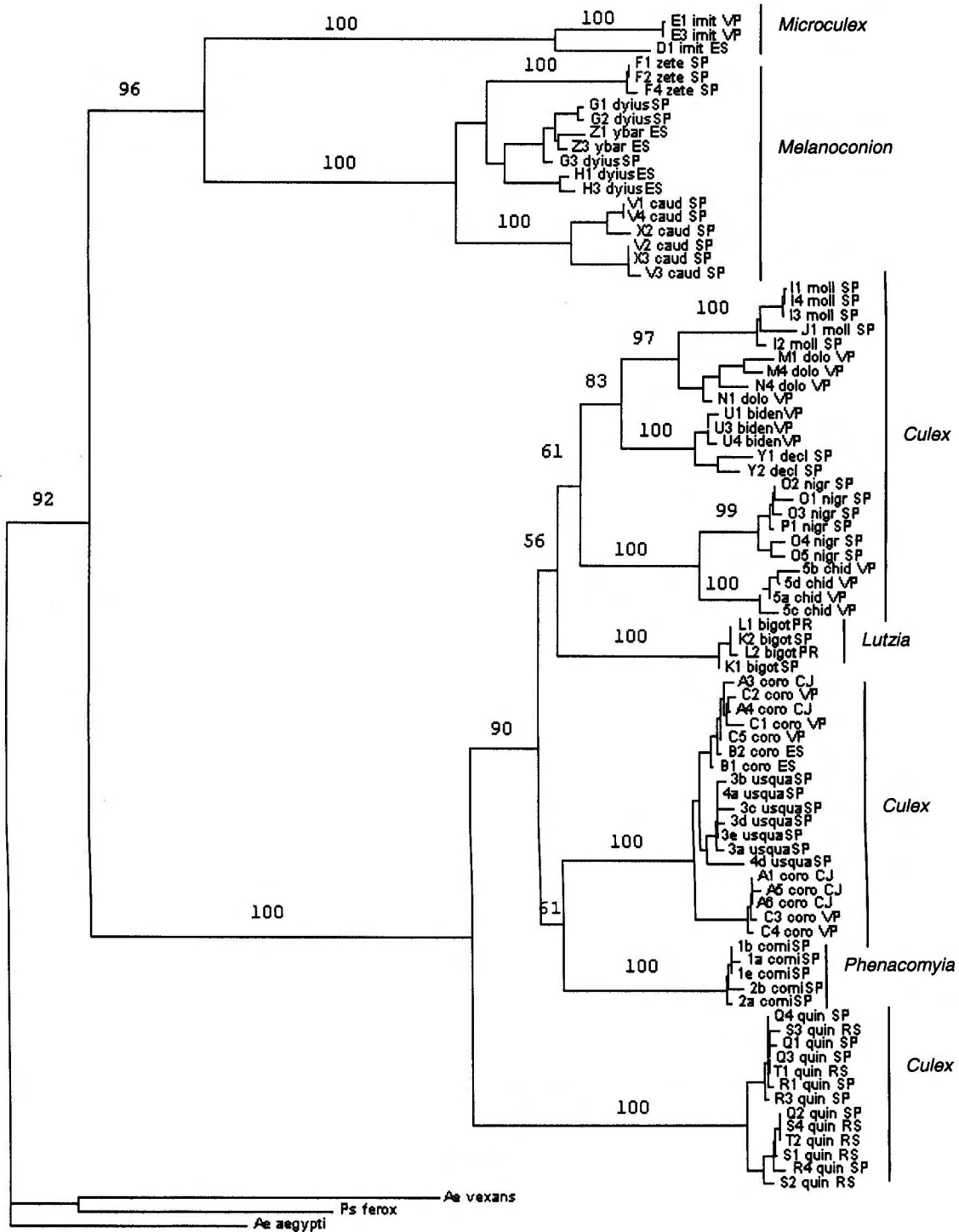


Figura 3 – Árvore de NJ gerada com as variantes de ITS2 selecionadas pela estrutura secundária. Apenas as estruturas com modelo de alta qualidade (>75%) na transferência das hélices, usando a ferramenta “Homology Modelling” (WOLF et al., 2005) foram selecionadas. A árvore foi construída pelo método de NJ, p -distance não corrigido, bootstrap de 1000 réplicas (%) e enraizada com as sequências do GenBank de *Ae. vexans* (EF539857), *Ps. ferox* (M95129) e *Ae. aegypti* (AY512670).

6. DISCUSSÃO

O segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNAr é constantemente empregado em filogenia e distinção de espécies próximas de culicídeos. Contudo, maior atenção é dada às espécies vetoras, principalmente da subfamília Anophelinae (MARRELLI et al., 2005, 2006; ALAM et al., 2007a e 2007b; DJADID et al., 2007; HWANG, 2007).

A primeira abordagem molecular na investigação das relações entre mosquitos *Culex* foi realizada por MILLER et al. (1996). Os autores utilizaram os espaçadores ITS1 e ITS2 do DNAr para inferir as relações entre 14 espécies pertencentes a quatro subgêneros de *Culex* (*Melanoconion*, *Neoculex*, *Culex* e *Lutzia*). Desde então, poucas espécies de *Culex* foram estudadas com o uso da biologia molecular, sendo as pertencentes ao complexo *pipiens* as mais bem representadas devido à sua importância epidemiológica e vasta distribuição mundial (SEVERINI et al., 1996; BAHNCK e FONSECA, 2006; KASAI et al., 2008). Em relação ao subgênero *Melanoconion*, destaca-se o trabalho realizado por NAVARRO e WEAVER (2004) na investigação das relações filogenéticas entre nove espécies dos grupos *Vomerifer* e *Pedroi*, pertencentes à seção *Spissipes*, utilizando sequências do ITS2. A escassez de espécies estudadas pôde ser comprovada durante a etapa de busca de sequências de ITS2 disponíveis no banco público de dados genéticos GenBank, durante a execução do presente trabalho.

Assim, um dos objetivos deste estudo foi caracterizar a variação intragenômica, intra-específica e interespecífica de espécies de culicídeos pertencentes ao gênero *Culex* e uma do gênero *Lutzia*, a fim de contribuir para o melhor conhecimento do grupo.

Uma vez que a atual classificação dos culicídeos divide a tribo Culicini em quatro gêneros (*Culex*, *Deinocerites*, *Galindomyia* e *Lutzia*), o

posicionamento de *Lutzia* dentro do gênero *Culex* na topologia de NJ (Figura 3) foi conflitante à classificação atual. No entanto, esse posicionamento de *Lutzia* foi corroborado pelos resultados obtidos em topologias geradas a partir do marcador COI do DNAm (SILVA, 2009 dados não publicados).

Em 1903, THEOBALD estabeleceu *Lutzia* como gênero distinto da espécie mexicana, *Culex bigoti*. EDWARDS (1932) rebaixou *Lutzia* ao status de subgênero de *Culex* e os autores seguintes adotaram esta classificação. TANAKA et al. (1979) observaram que as modificações morfológicas de *Lutzia* eram mais distintas do que aquelas apresentadas em outros subgêneros de *Culex*, julgando que seria mais razoável considerar o táxon como gênero. Em 2000, NAVARRO e LIRIA inferiram as relações filogenéticas entre sete subgêneros de *Culex* e um de *Deinocerites*, por análises de parcimônia baseadas em caracteres das peças bucais das larvas. As árvores obtidas pelos autores indicaram a posição basal de *Lutzia* e sua relação de grupo-irmão com o grupo monofilético formado por espécies do gênero *Culex*. Este resultado corroborou a classificação tradicional de BELKIN (1962), na qual *Lutzia* é tratado como linhagem especializada que compartilha similaridades e ancestral comum com os subgêneros de *Culex*. A topologia obtida por MILLER et al. (1996), pela análise de sequências do DNAr, também corroborou as análises apresentadas por NAVARRO e LIRIA (2000). Assim, em 2003, TANAKA elevou *Lutzia* ao status de gênero da tribo Culicini, seguindo as sugestões de TANAKA et al. (1979).

Apesar disso, as análises moleculares com o espaçador ITS2 e gene COI sugerem que as modificações morfológicas observadas nos estudos anteriormente mencionados, não seriam suficientes para sustentar a atual posição de *Lutzia* como gênero de Culicidae. Assim, o mais apropriado seria a permanência da classificação de EDWARDS (1932), na qual *Lutzia* é considerado subgênero de *Culex*.

A topologia também mostrou que o posicionamento do subgênero *Phenacomylia* dentro do grupo dos representantes do subgênero *Culex*, com

suporte de *bootstrap* do ramo de 90%, também foi conflitante à atual classificação, não corroborando os resultados de NAVARRO e LIRIA (2000). Apesar disso, os resultados de ITS2 mais uma vez foram corroborados pelas análises filogenéticas baseadas no marcador COI do DNAm (SILVA, 2009 dados não publicados) que indicaram o parafiletismo do subgênero *Culex*, dado que *Phenacomyia* se posicionou no mesmo clado do subgênero *Culex* nas três topologias obtidas pelos métodos de Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana. As espécies incluídas no subgênero *Phenacomyia* pertenceram ao gênero *Culex* até 1992 quando HARBACH e PEYTON observaram uma escova maxilar diferenciada em larvas de *Culex* (*Cux.*) *lactator* Dyar e Kanb. Considerando que as diferenças na estrutura maxilar são de natureza supra-específicas, os autores propuseram que *Culex lactator* pertenceria a um novo subgênero. Estudando mais a fundo as larvas da espécie, demonstraram a presença de sinapomorfias que distinguiam *Culex lactator*, juntamente com sua espécie-irmã *Cx. corniger*, de todos os outros membros de *Culex*. Por esse motivo, *Culex corniger* e *Cx. lactator* foram considerados membros de linhagem filogenética distinta do subgênero *Culex*. Os autores reconheceram *Culex* (*Cux.*) *airozai* Lane como membro da mesma linhagem filogenética com base em caracteres dos adultos e validaram o subgênero *Phenacomyia*. Porém, os resultados das análises moleculares com o espaçador ITS2 e gene COI sugerem que *Phenacomyia* não é subgênero de *Culex*.

Com um valor de *bootstrap* de 96% (Figura 3), os subgêneros *Microculex* e *Melanoconion* formaram um agrupamento, dentro do qual existem grupos distintos suportados por *bootstrap* de 100% (Figura 3). A topologia de NJ obtida por MILLER et al. (1996) (Figura 4), com os espaçadores ITS1 e ITS2 indicou maior afinidade entre os subgêneros *Neoculex* e *Melanoconion*. Como no presente estudo não foram analisadas espécies de *Neoculex*, não foi possível corroborar o resultado de MILLER et al. (1996). No entanto, pode-se supor que os subgêneros *Melanoconion*, *Microculex* e *Neoculex* possam formar grupo monofilético dentro do gênero

Culex. Obviamente, a hipótese terá de ser testada, com amostras e marcadores que permitam avaliar o monofiletismo do agrupamento.

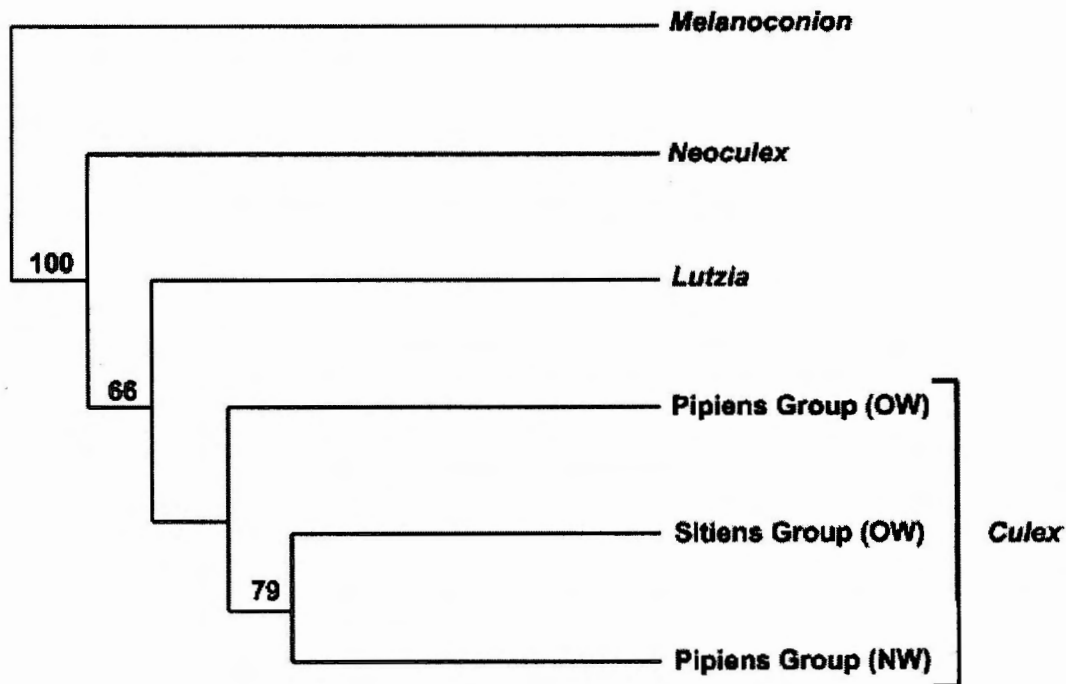


Figura 4 – Relações filogenéticas de quatro subgêneros (14 espécies) de *Culex* utilizando os espaçadores ITS1 e ITS2 do DNAr (modificado de MILLER et al., 1996): árvore de NJ enraizada em *Melanoconion* (bootstrap > 50% são apresentados).

A seleção das sequências pela estrutura secundária excluiu algumas ambiguidades presentes na topologia original (Fig. 1), permitindo melhor interpretação dos dados obtidos (Fig. 3), principalmente no caso de *Culex (Mcx.) imitator*. *Culex imitator*, única espécie de *Microculex* analisada neste estudo, apresentou a maior divergência intra-específica, 7,1% (Tabela 5) entre os exemplares de São Paulo (E_imit_VP) e do Espírito Santo (D_imit_ES). Esta alta diferenciação, ao lado das variações morfológicas encontradas nas exúvias das pupas de espécimes de SP e ES, parece indicar que os dois exemplares possam pertencer a espécies distintas de um complexo. A pupa de um indivíduo de *Culex imitator* do mesmo local de coleta do espécime do Espírito Santo analisado molecularmente, apresentou caracteres típicos da espécie: mancha escura nos seguimentos II, III e IV

(Figura 5 - A) e padrão da disposição das cerdas 2, 3, 4 e 5 do seguimento II, enquanto o exemplar de São Paulo não apresentou mancha e possuía outro padrão de disposição das cerdas (Figura 4 - B). Os resultados das análises utilizando o marcador COI também indicaram alta variação intra-específica para esses exemplares (SILVA, 2009 dados não publicados), corroborando com a hipótese morfológica de que estes indivíduos possam pertencer a táxons distintos de um complexo de espécies.

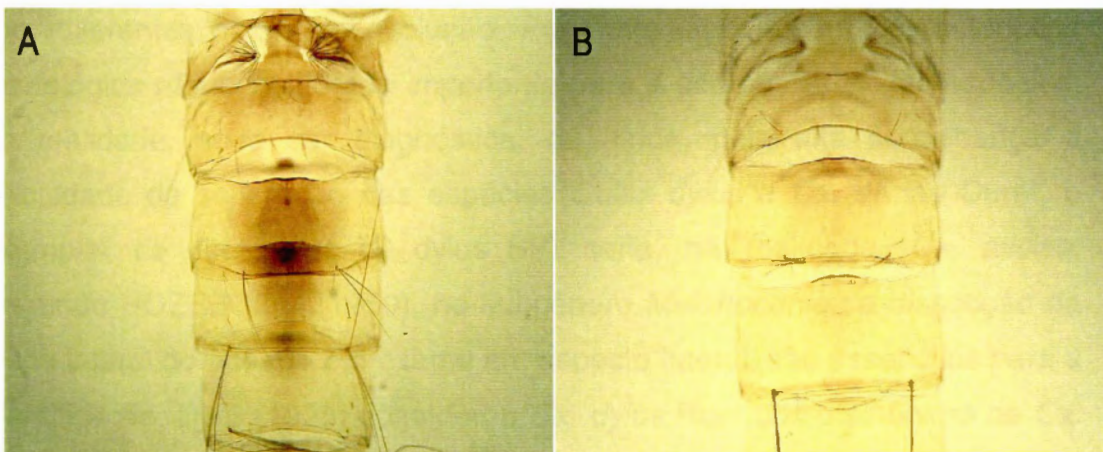


Figura 5 – Exúvia de pupas. A) *Culex imitator* (Espírito Santo), com indicação da mancha escura nos segmentos II, III e IV, e do padrão de distribuição das cerdas 2, 3, 4 e 5 do segmento II. B) *Culex imitator* (São Paulo), sem mancha e com outra disposição das cerdas do segmento II.

No subgênero *Melanoconion*, *Culex zeteki* e *Cx. caudelli* formaram grupos distintos bem suportados pelo valor de *bootstrap* de 100% (Figura 3). Já o posicionamento das sequências de *Culex ybarmis* e *Cx. dyius* não condiz com a identificação morfológica, uma vez que não foram observadas variações de caracteres morfológicos entre os dois exemplares de *Cx. dyius* que apresentaram divergência intra-específica maior (3,3% - Tabela 5) que a interespecífica (2,2% em relação a *Cx. ybarmis* - Tabela 6). Pela topologia observa-se que há maior proximidade entre as sequências dos exemplares *Culex dyius* de São Paulo (G_dyius_SP) e *Cx. ybarmis* do Espírito Santo (Z_ybar_ES), do que entre o primeiro e *Cx. dyius* do Espírito Santo

(H_dyius_ES), com distâncias de 1,7% e 3,3%, respectivamente (Tabela 5). Esses dados permitem levantar a hipótese de que um dos métodos de identificação, o molecular ou o morfológico, não está refletindo a real identidade das unidades taxonômicas referentes à *Cx. dyius*. Em relação ao método molecular, o equívoco pode estar na questão da natureza do marcador utilizado. A alta variabilidade intragenômica indica que a evolução em concerto não atuou de forma eficiente na homogeneização das sequências do ITS2. Assim, a alta variação intra-específica pode ser resultado da comparação de sequências provenientes de *clusters* parálogos, com diferentes níveis de evolução. Por outro lado, alguma característica morfológica não considerada importante para a diferenciação das espécies, na realidade, pode ser diagnóstica, ou ainda, pela alta semelhança e dificuldade de separação das espécies *Culex dyius* e *Cx. aliciae* Duret, o exemplar de *Cx. dyius* (G_dyius_SP) seria, na realidade, *Cx. aliciae*. Segundo ROZEBOOM (1950), no subgênero *Melanoconion* a dissecção da placa lateral do edeago e o exame em aspecto lateral, são essenciais para a identificação. Dyar (1928) considerou *Cx. dyius* Root como sinônimo de *Cx. elevator* Dyar e Knab. Porém, ROZEBOOM (1950) considerou *Culex dyius* espécie válida. Em *Cx. dyius*, a placa lateral do edeago apresenta forma delgada com uma ponta longa, larga e romba, formando um ângulo mediano e com pequenos dentes na margem apical (LANE, 1953). Em *Culex aliciae* essa mesma estrutura é muito semelhante, com ângulo mediano e ápice serrilhado DURET (1953). Em *Cx. ybarmis*, no entanto, a placa lateral do edeago apresenta-se bem diferenciada, com três pontas (LANE, 1953). Assim, sugere-se a utilização de outros marcadores moleculares para o esclarecimento dos resultados obtidos.

Conduzindo um estudo filogenético com representantes dos grupos Vomerifer e Pedroi do subgênero *Melanoconion*, NAVARRO e WEAVER (2004) também encontraram divergência intragenômica nos exemplares analisados, com variação de 0-0,5%. A variação intra-específica variou de 0-3,3% entre exemplares da mesma localidade e 0-4,5% entre aqueles de localidades diferentes.

Em relação ao subgênero *Culex*, a topologia (Figura 3) apresentou três grupos principais: 1) formado exclusivamente pelas sequências de *Cx. quinquefasciatus* (*bootstrap* 100%); 2) Complexo coronator + *Phenacomyia* (*bootstrap* 61%); 3) *Culex mollis*, *Cx. dolosus*, *Cx. bidens*, *Cx. declarator*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. chidesteri* + *Lutzia* (*bootstrap* 56%). Apesar do suporte de *bootstrap* ter dado boa sustentação apenas ao grupo de sequências de *Cx. quinquefasciatus*, dentro dos demais grupos pôde-se observar que os ramos comuns às duas espécies terminais de cada grupo também foram suportados por valor elevado de *bootstrap*, 97% para *Culex mollis* + *Cx. dolosus* e 100% para *Cx. bidens* + *Cx. declarator*, *Cx. nigripalpus* + *Cx. chidesteri* e *Cx. coronator* + *Cx. usquatus*.

As espécies pertencentes ao complexo *Culex coronator* (*Cx. coronator* e *Cx. usquatus*) apresentaram distância de 0,5%. Esta baixa divergência interespecífica é corroborada pela grande similaridade morfológica entre as duas espécies. *Culex coronator* se distingue de *Cx. usquatus*, e de todos os outros membros do complexo, pela presença de duas a três cerdas fortes acompanhadas por um conjunto de cerdas curtas localizadas no ápice do gonocoxito da genitália masculina. Em *Culex usquatus* as cerdas são muito longas, atingindo pelo menos a porção mediana do gonóstilo.(BRAM, 1967). *Culex bidens* e *Cx. declarator* também apresentaram 0,5% de divergência, confirmando a grande semelhança entre as espécies. Neste caso, os caracteres distintivos e diagnósticos são os dentes da divisão lateral da placa lateral do edeago, que em *Culex declarator* são robustos, curvados, com margens convexas e ápice rombo. Em *Culex bidens* os dentes são longos, retos e pontiagudos (BRAM, 1967).

A baixa distância (2,9%) entre *Cx. nigripalpus* com *Cx. chidesteri* corroborou a proximidade morfológica das duas espécies. *Culex chidesteri* é similar a *Culex nigripalpus* por possuir espinhos espatulados na margem lateral do décimo esternito, enquanto que o caráter distintivo é o processo externo curvado e direcionado lateralmente (BRAM, 1967).

Culex mollis e *Cx. dolosus* apresentaram distância de 1,9%. Embora em ambos os casos tenham sido observadas algumas variações morfológicas entre os exemplares da mesma espécie, a divergência intra-específica foi muito baixa, zero e 0,6%, respectivamente.

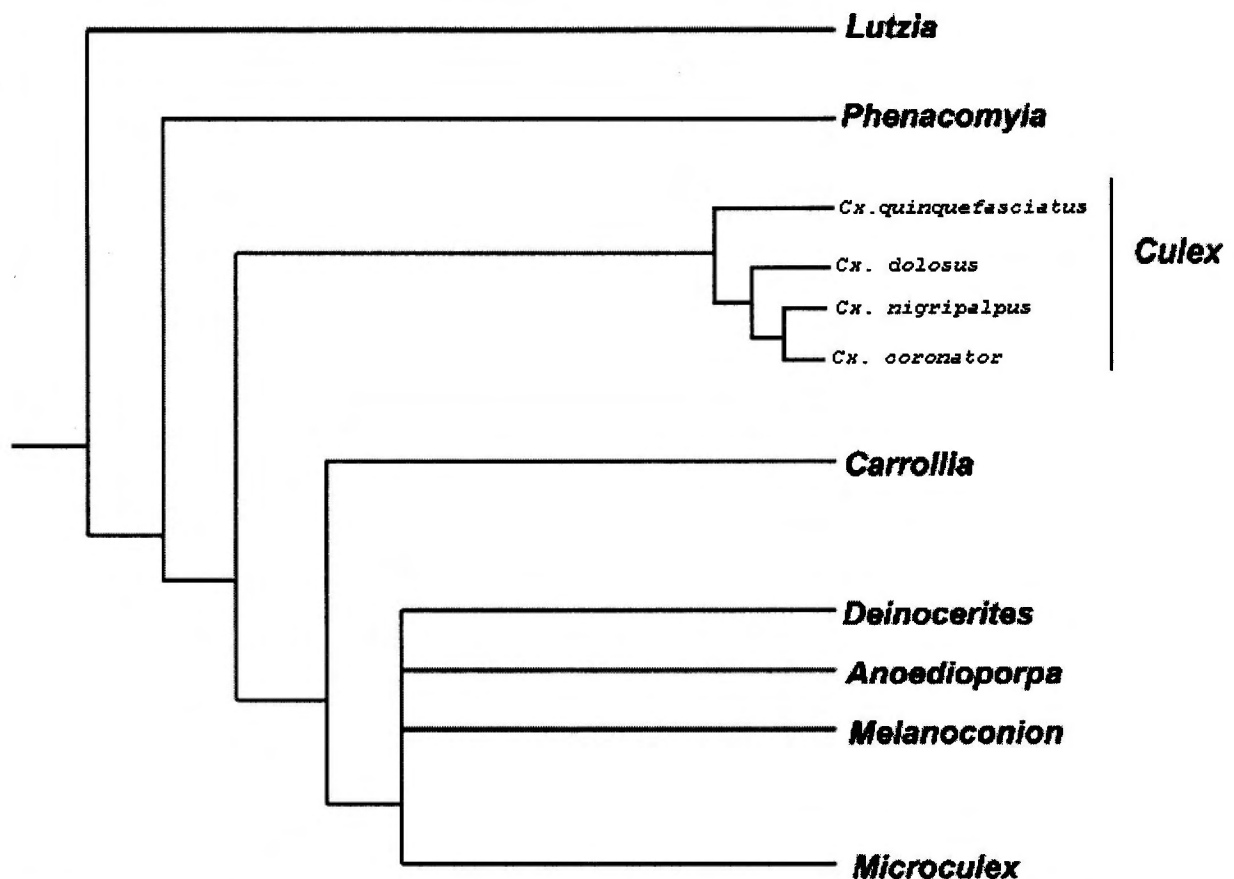


Figura 6 – Relações filogenéticas de alguns Culicini com base nas estruturas morfológicas das peças bucais das larvas (modificado de NAVARRO e LIRIA, 2000): consenso estrito das duas árvores mais parcimoniosas das análises de MP de 18 espécies.

O posicionamento de *Cx. quinquefasciatus* dentro de *Culex* sugere que essa espécie forma grupo monofilético dentro de *Culex*, que inclui as demais espécies do complexo Pipiens. A topologia obtida por NAVARRO e LIRIA (2000) (Figura 6), com base em dados morfológicos das estruturas bucais das larvas, foi muito semelhante. Os autores analisaram as relações filogenéticas de dezoito espécies pertencentes a oito gêneros da tribo

Culicini, incluindo as espécies *Culex quinquefasciatus*, *Cx. dolosus*, *Cx. nigripalpus* e *Cx. coronator* pertencentes ao subgênero *Culex*. No clado do subgênero *Culex*, *Culex quinquefasciatus* formou grupo-irmão ao clado composto pelas outras três espécies, corroborando a topologia obtida com ITS2.

De maneira geral, exceto pelos casos de *Lutzia* e *Phenacomyia*, na topologia de NJ apresentada, os agrupamentos das sequências das diferentes espécies de *Culex* corroboraram a classificação atual. No entanto, a variabilidade intragenômica, intra-específica e interespecífica dos clones impediu a realização de uma análise filogenética, pois prejudicou etapa fundamental para a fidedignidade de qualquer análise evolutiva, o alinhamento das sequências.

Na reconstrução de qualquer filogenia, a preocupação primordial é a homologia, ou seja, apenas caracteres homólogos (com mesma origem/ancestral) devem ser comparados entre as diferentes espécies. Entretanto, em termos moleculares os genes ou sequências não codificadoras homólogas podem ser geradas por dois processos: pela duplicação e pela divergência genética. No caso das sequências geradas por duplicação, caso das sequências do DNAr, elas são chamadas parálogas. Já as sequências que passam a ter histórias evolutivas independentes a partir de um evento de especiação, são chamadas de ortólogas. Assim, sequências parálogas são ideais para estudar eventos de duplicação genética em famílias de genes, enquanto sequências ortólogas são apropriadas para reconstrução filogenética de grupos taxonômicos (RUSSO, 2001).

Apesar disso, o espaçador ITS2 mesmo apresentando cópias parálogas, é amplamente utilizado em estudos de distinção de espécies e de filogenia. Na família Culicidae a maior parte desses estudos é realizada com os mosquitos do gênero *Anopheles* (MARINUCCI et al., 1999; MARRELLI et al., 2005, 2006; ALAM et al., 2007b; HWANG, 2007; CALADO et al., 2008). Esse fato só é possível devido ao fenômeno da “evolução em concerto”, que

embora ainda não seja completamente compreendido, tende a homogeneizar as múltiplas cópias do ITS2 dentro de cada indivíduo.

Contudo, recentes estudos têm demonstrado diferentes níveis de homogeneização das sequências dentro dos indivíduos, sugerindo que altos níveis de divergência prejudicam as análises filogenéticas (BEEB et al., 1999; Li e WILKERSON, 2007; BEZZHONOVA e GORYACHEVA, 2008; BOWER et al., 2009).

MILLER et al. (1996) conduziram uma análise filogenética com 14 espécies do gênero *Culex* a partir dos marcadores ITS1 e ITS2, utilizando o método de Máxima Parcimônia e análise de distância pelo método de NJ com o modelo Kimura 2-parâmetros. Os resultados também mostraram heterogeneidade entre as sequências de um mesmo indivíduo, em alguns casos. Ao analisarem separadamente as relações entre as populações do complexo *Culex pipiens* por uma árvore de NJ não enraizada, verificaram certa concordância entre os agrupamentos e reconhecimento dos táxons *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. pipiens*. Porém, algumas divergências em relação à interpretação clássica sobre o complexo foram observadas. Por exemplo, clones de um mesmo indivíduo de *Cx. pipiens* da população da Virgínia ficaram posicionados no clado predominantemente referente à *Cx. quinquefasciatus*. Além disso, um clone do mesmo espécime de *Cx. quinquefasciatus* de Belize ficou posicionado no clado de *Cx. pipiens* da Virgínia, enquanto o outro clone do mesmo indivíduo se agrupou no clado com *Cx. quinquefasciatus* da Flórida. Desta forma, os autores sugeriram que o polifiletismo das sequências de ITS clonadas dos espécimes do complexo *pipiens* analisados, contraria a teoria da evolução em concerto invalidando o uso do marcador ITS para análises filogenéticas de táxons que apresentam heterogeneidades. Apesar disso tudo, de maneira geral as árvores produzidas pelos autores corroboraram a taxonomia tradicional, da mesma forma como foi relatado neste estudo.

7. CONCLUSÕES

- ♦ O posicionamento do gênero *Lutzia* dentro do agrupamento formado por espécies do gênero *Culex* na topologia de NJ sugere que o atual *status* genérico do táxon não foi sustentado pelas análises do ITS2.
- ♦ A separação das espécies dos subgêneros *Melanoconion*, *Microculex* e *Culex* corrobora a atual classificação ao nível subgenérico.
- ♦ Apesar da variabilidade intragenômica e intra-específica, no subgênero *Culex* os agrupamentos obtidos corroboram a similaridade morfológica entre as diferentes espécies.
- ♦ Os resultados das análises do ITS2 demonstraram que a presença de variabilidade intragenômica dificulta o uso do marcador em estudos filogenéticos e de genética de populações, pois impede o estabelecimento de homologias.
- ♦ *Culex (Mcx.) imitator* e *Cx. (Mel.) dyius* apresentaram os maiores valores de divergência intra-específica. No caso de *Culex imitator*, isso pode indicar que os exemplares coletados no Espírito Santo e em São Paulo pertencem a táxons distintos de um complexo de espécies.
- ♦ Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, conclui-se que estudos mais aprofundados utilizando outros marcadores moleculares, serão fundamentais para a busca de respostas sobre as incertezas quanto à identificação, classificação e evolução do gênero *Culex*.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a topologia de NJ gerada possa apresentar alguma distorção devido à heterogeneidade das sequências, por motivos ainda não totalmente esclarecidos, os dados apresentados aqui não foram muito discrepantes quanto à classificação atual do grupo.

Pelo caráter descritivo do trabalho, uma vez que a grande maioria das espécies analisadas nunca havia sido estudada molecularmente, os táxons que levantaram dúvidas significativas quanto à identificação e posicionamento na topologia indicam um caminho para futuros estudos morfológicos e moleculares.

Por fim, cabe ressaltar que as informações de diversas áreas do conhecimento (taxonomia, sistemática, ecologia, biologia e biogeografia), devem ser confrontadas e consideradas na busca por uma classificação mais natural do grupo em estudo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M. T.; DAS, M. K.; DEV, V.; ANSARI, M. A. & SHARMA, Y. D. 2007a. Identification of two cryptic species in the *Anopheles (Cellia) annularis* complex using ribosomal DNA PCR-RFLP. **Parasitology Research** 100: 943-948.
- ALAM, M. T.; DAS MANOJ, K.; DEV, V.; ANSARI, M. A. & SHARMA, Y. D. 2007b. PCR-RFLP method for the identification of four members of the *Anopheles annularis* group of mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 101: 239-244.
- AYRES, C. F. J.; MELO-SANTOS, M. A. V.; SOLÉ-CAVA, A. M. & FURTADO, A. F. 2003. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. **Journal of Medical Entomology** 40(3): 000-000.
- BAHNCK, C. & FONSECA, D. M. 2006. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 75(2): 251-255.
- BEEBE, N. W.; ELLIS, J. T.; COOPER, R. D. & SAUL, A. 1999. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. **Insect Molecular Biology** 8: 381-390.
- BELKIN, J. N. 1962. The mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). vol. 1; University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- BESANSKY, N. J. & COLLINS, F. H. 1992. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. **Parasitology Today** 8 (6): 186-192.
- BESANSKY, N. J.; POWELL, J. R.; CACCONI, A.; HAMM, D. M.; SCOTT, J. A. & COLLINS, F. H. 1994. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae*

complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** (91):6885-6888.

BESANSKY, N. J. & FAHEY, G. T. 1997. Utility of the *white* gene in estimating phylogenetic relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Molecular Biology and Evolution** 14(4): 442-454.

BEZZHONOVA, O. V. & GORYACHEVA, I. I. 2008. Intragenomic heterogeneity of rDNA internal transcribed spacer 2 in *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology** 45(3): 337-341.

BLACK, W. C. IV. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. **Insect Molecular Biology**, 2: 1-6.

BOWER, J. E.; COOPER, R. D & BEEB, N. W. 2009. Internal repetition and intraindividual variation in the rDNA ITS1 of the *Anopheles punctulatus* group (Diptera: Culicidae): multiple units and rates of turnover. **Journal of Molecular Evolution** 68: 66-79.

BRAM, R. A. 1967. Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera: Culicidae). **Proceedings of the United States National Museum** 120(3557): 1-122.

BRITO, A. C.; WILLIAMS, P.; FONTES, G. & ROCHA, E. M. M. 1997. A comparison of two Brazilian populations of *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) from endemic and non-endemic areas to infection with *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 92(1): 33-36.

CALADO, D. C.; FOSTER, P. G.; BERGO, E. S.; dos SANTOS, C. L. S.; GALARDO, A. K. R. & SALLUM, M. A. 2008. Resurrection of *Anopheles goeldii* from synonymy with *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) and a new record for *Anopheles dunhami* in Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Adolfo Lutz** 103 (8): 791-799.

- COLLINS, F. H & PASKEWITZ, S. M. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. **Insect Molecular Biology** 5(1): 1-9.
- CONSOLI, R. A. G. B. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, 1998.
- COOK, S.; DIALLO, M.; SALL, A. A.; COOPER, A. & HOLMES, E. C. 2005. Mitochondrial markers for molecular identification of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae) involved in transmission of arboviral disease in West Africa. **Journal of Medical Entomology** 42(1):19-28.
- DIJADID, N. D.; GHOLIZADEH, S.; TAFSIRI, E.; ROMI, R.; GORGEEV, M. & ZAKERI, S. 2007. Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in northern Iran. **Malaria Journal** 17: 6.
- DORN, P. L.; CALDERON, C.; MELGAR, S.; MOGUEL, B.; SOLORZANO, E.; DUMONTEIL, E.; RODAS, A.; de la RUA, N.; GARNICA, R. & MONROY, C. 2009. Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and Mexico. **PLoS Biology** 3 (3):e393.
- DURET, J. P. 1953. Las especies argentinas de *Culex* (*Melanoconion*) (Diptera: Culicidae). **Rev. Soc. Argent.** 16: 99-121.
- EDWARDS, F. W. 1932. Genera insectorum. Diptera. Fam. Culicidae. Fascicle 194. Desmet-Verteneuil, Brussels.
- FOLEY, D. H.; WILKERSON, R. C.; COOPER, R. D.; VOLOVSEK, M. E. & BRYAN J. H. 2007. A molecular phylogeny of *Anopheles annulipes* (Diptera:Culicidae) sensu lato: The most species-rich anopheline complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 43: 283-297.
- FONTES, G.; BRITO, E. M. M. R. & ANTUNES, C. M. F. 1998. Lymphatic filariasis in Brazilian urban área (Maceió, Alagoas). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 93(6): 705-710.

- FONTES, G.; BRAUN, R. F.; FRAIHA-NETO, H.; VIEIRA, J. B. F.; PADILHA, S. S.; ROCHA, R. C. & ROCHA, E. M. M. 2005. Filariose linfática em Belém, estado do Pará, Norte do Brasil e a perspectiva de eliminação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38(2): 131-136.
- FORATTINI, O. P.; SALLUM, M. A. M.; KAKITANI, I.; MASSAD, E. & MARUCCI, D. 1995. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 8- Survey of adult behaviour of Spissipes Section species of *Culex (Melanoconion)* in South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública** 29(2): 100-107.
- FORATTINI, O. P. 1996. *Culicidologia Médica*. v.1; São Paulo, Edusp.
- FORATTINI, O. P. 1998. Mosquitos Culicidae como vetores emergentes de infecções. **Revista de Saúde Pública** 32(6): 497-502.
- FORATTINI, O. P. 2002. *Culicidologia Médica: identificação, biologia e epidemiologia*. v.2; São Paulo, Edusp.
- GORAB, E. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. In: Matioli, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto; Holos; 2001. p. 64-69.
- HAJIBABAEI, M.; JANZEN, D. H.; BURNS, J. M.; HALLWACHS, W. & HEBERT, P. D. N. 2006. From the cover: DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103(4): 968-971.
- HARBACH, R. E. & PEYTON, E. L. 1992. A new subgenus of *Culex* in the Neotropical region (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics** 24(3): 242-252.
- HARBACH, R. E. & KITCHING, I. J. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic Entomology** 23: 327-370.
- HARBACH, R. E. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa** 1668: 591-638.

- HARBACH, R. E. 2009. Mosquito taxonomic inventory. Culicidae classification. Natural History Museum, London, UK. [acesso em 8 de ago de 2009]. Disponível em:
<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/en/taxonomy/term/6045>
- HASAN, A. U.; SUGURI, S.; FUJIMOTO, C. ITAKI, R. L.; HARADA, M.; KAWABATA, M. BUGORO, H & ALBINO, B. 2008. Genetic diversity in two sibling species of the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes on Guadalcanal in the Solomon Islands. **BMC Evolutionary Biology** 8:318
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. & DEWAARD, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. London** 270: 313-321.
- HILL, S. M. & CRAMPTON, J. M. 1994. DNA-based methods for the identification of insect vectors. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 88(3): 227-250.
- HWANG, U. W. 2007. Revisited ITS2 phylogeny of *Anopheles (Anopheles)* Hyrcanus group mosquitoes: reexamination of unidentified and misidentified ITS2 sequences. **Parasitology Research** 101: 885-894.
- KAMBHAMPATI, S; RAI, K. S. & VERLEY, D. M. 1992a. Frequencies of mitochondrial DNA haplotypes in laboratory cage populations of the mosquito, *Aedes albopictus*. **Genetics** 132: 205-209.
- KAMBHAMPATI, S.; BLACK, W. C. IV & RAI, K. S. 1992b. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. **Journal of Medical Entomology**, 29(6): 939-945.
- KASAI, S.; KOMAGATA, O.; TOMITA, T.; SAWABE, K.; TSUDA, Y.; KURAHASHI, H.; ISHIKAWA, T.; MOTOKI, M.; TAKAHASHI, T.; YOSHIDA, M.; SHINJO, G.; HASHIMOTO, T.; HIGA, Y. & KOBAYASHI, M. 2008. PCR-

based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases** 61: 184-191.

KELLER, A.; SCHLEIDER, T.; SCHULTZ, J.; MÜLLER, T.; DANDEKAR, T. & WOLF, M. 2009. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. **Gene** 430: 50-57.

LABRUNA, M. B.; MARRELLI, M. T.; HEINEMANN, M. B.; FAVA, A. B.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; RICHIZENHAIN, L. J.; MARINOTTI, O. & SCHUMAKER, T. T. S. 2002. Taxonomic status of *Ixodes didelphidis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology** 39(1): 133-142.

LANE, J. 1953. Neotropical Culicidae. Vol. 1; São Paulo, Brasil.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WIL, A.; LOPEZ, R., THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics** 23: 2947-2948.

LI, C. & WILKERSON, R. C. 2007. Intragenomic rDNA ITS2 variation in the Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). **Journal of Heredity** 98(1): 51-59.

LIAO, D. 1999. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. **American Journal of Human Genetics** 64:24-30.

LINTON, Y. M.; SAMANIDOU-VOYADJOGLOU, A. & HARBACH, R. E. 2002. Ribosomal ITS2 sequence data for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in Northern Greece, with a critical assessment of previously published sequences. **Insect Molecular Biology** 11(4): 379-383.

LUNA, E. J. A.; PEREIRA, L. E. & de SOUZA, R. P. 2003. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? **Epidemiologia e Serviços de Saúde** 12(1): 7-19.

- McLAIN, D. K. & COLLINS, F. H. 1989. Structure of rDNA in the mosquito *Anopheles gambiae* and rDNA sequence variation within and between species of the *A. gambiae* complex. **Heredity** 62: 233-242.
- MADDISON D. R. & MADDISON, W. P. 2000. MacClade 4. Analysis of phylogeny and character evolution. Sinauer, Sunderland, MA.
- MARINUCCI, M.; ROMI, R.; MANCINI, P.; Di LUCA, M. & SEVERINI, C. 1999. Phylogenetic relationships of seven paleartic members of the *maculipennis* complex inferred from ITS2 sequence analysis. **Insect Molecular Biology** 8(4): 469-480.
- MARRELLI, M. T.; FLOETER-WINTER, L. M.; MALAFRONTA, R. S.; TADEI, W. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FLORES_MENDOZA, C. & MARINOTTI, O. 2005. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. **Medical and Veterinary Entomology** 19(2): 208-18.
- MARRELLI, T. M.; SALLUM, M. A. M. & MARINOTTI, O. 2006. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as tool for Latin American anopheline taxonomy – A critical review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101(8): 817-832.
- MARRELLI, M. T.; SOUZA, I. F.; MARQUES, R. C.; LABRUNA, M. B.; MATIOLI, S. R.; TONON, A. P.; RIBOLLA, P. E. M.; MARINOTTI, O. & SCHUMAKER, T. T. S. 2007. Taxonomic and phylogenetic relationships between Neotropical species of ticks from genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) inferred from second internal transcribed spacer sequences of rDNA. **Journal of Medical Entomology** 44(2): 222-228.
- MATSON, R.; RIOS, C. T.; CHAVEZ, C. B.; GILMAN, R. H.; FLORIN, D.; SIFUENTES, V. L.; GREFFA, R. C.; YORI, P. P.; FERNANDEZ, R.; PORTOCARRERO, D. V.; VINETZ, J. M. & KOSEK, M. 2008. Improved molecular technique for the differentiation of Neotropical Anopheline species. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 78(3): 492-498.

- MAYR, E. & ASHLOCK, P. D. 1991. Principles of systematic zoology. Second edition. New York, McGraw-Hill Book Co.
- MILLER, B. R.; CRABTREE, M. B. & SAVAGE, H. M. 1996. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Insect Molecular Biology** 5: 93-107.
- MIRABELLO, L. & CONN, J. E. 2008. Population analysis using the nuclear white gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. **Medical and Veterinary Entomology** 22: 109-119.
- NATAI, D. & UENO, H. M. 2004. Vírus do Nilo Ocidental: características da transmissão e implicações vetorais.
- NAVARRO, J. C.; & LIRIA, J. 2000. Phylogenetic relationships among eighteen Neotropical Culicini species. **Journal of the American Mosquito Control Association** 16(2): 75-85.
- NAVARRO, J. C. & WEAVER, S. C. 2004. Molecular Phylogeny of the Vomerifer and Pedroi Groups in the Spissipes Section of the Sungenus *Culex* (Melanoconion). **Journal of Medical Entomology** 41(4): 575-581.
- PASKEWITZ, S. M.; WESSON, D. M. & COLLINS, F. H. 1993. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. **Insect Molecular Biology** 2(4): 247-257.
- PAVAN, M. G. & MONTEIRO, F. A. 2007. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). **Tropical Medicine and International Health** 12(6): 751-758.
- PECOR, J. E.; MALLAMPALLI, V. L.; HARBACH, R. E. & PEYTON, E. L. 1992. Catalog and illustrated review of the subgenus *Melanoconion* of *Culex*

- (Diptera: Culicidae). **Contributions of the American Entomological Institute** 27(2): 1-228.
- PHUC, H. K.; BALL, A. J.; SON, L.; TU, N. D.; LIEN, N. G.; VERARDI, A. & TOWNSON, H. 2003. Multiplex PCR assay for malaria vector *Anopheles minimus* and four related species in the Myzomyia Series from Southeast Asia. **Medical and Veterinary Entomology** 17: 423-428.
- ROSS, H. H. 1951. Conflict with *Culex*. **Mosquito News** 11(3): 128-132.
- ROZEBOOM, L. E. 1950. A review of the species of *Culex* of the subgenus *Melanoconion* (Diptera: Culicidae). **Annals of the Entomological Society of América** 43(1): 75-114.
- RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: Matioli, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto; Holos; 2001. p. 130-136.
- SAITOU, N., & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution** 4: 406-25.
- SALLUM, M. A. M. & FORATTINI, O. P. 1996. Revision of the spissipes section of *Culex* (*Melanoconion*) (Diptera: Culicidae). **Journal of the American Mosquito Control Association** 12(3): 517-600.
- SALLUM, M. A. M.; SCHULTZ, T. R.; FOSTER, P. G.; ARONSTEIN, K.; WIRTZ, R. A. & WILKERSON, R. C. 2002. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. **Systematic Entomology** 27: 361-382.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. & MANIATIS, T. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHULTZ, J.; MÜLLER, T.; ACHTZIGER, M.; SEIBEL, P. N.; DANDEKAR, T. & WOLF, M. 2006. The internal transcribed spacer 2 database a web server for

(not only) low level phylogenetic analyses. **Nucleic Acids Research** 34: W704-707.

SELIG, C.; WOLF, M.; MÜLLER, T.; DANDEKAR, T. & SCHULTZ, J. 2008. The ITS2 Database II: homology modeling RNA structure for molecular systematics. **Nucleic Acids Research** 36: D377-380.

SERVICE, M. W. 1991. Agricultural development and arthropod-borne diseases: a review. **Revista de Saúde Pública** 25(3): 165-178.

SEVERINI, C.; SILVESTRINI, F.; MANCINI, P.; La ROSA, G. & MARINUCCI, M. 1996. Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Insect Molecular Biology** 5(3): 181-186.

SIRIVANAKARN, S. 1983. A review of the systematics and proposed scheme of internal classification of the New World subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics* 14(4): 265-333.

STAGE, D. E. & EICKBUSH, T. H. 2007. Sequence variation within the rRNA gene loci of 12 *Drosophila* species. **Genome Research** 17(12): 1888-1897.

SWOFFORD, D. L. 2003. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.01b, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TANAKA, K. MIZUSAWA, K. & SAUGSTAD, E. S. 1979. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). **Contributions of the American Entomological Institute (Ann Arbor)**, 16, vii + 1-987.

TANAKA K. 2003. Studies on the pupal mosquitoes of Japan - Genus *Lutzia*, with establishment of two subgenera, *Metalutzia* and *Insulutzia*. **Japanese Journal of Systematic Entomology** 9: 159-169.

- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** 24: 1596-1599.
- THEOBALD, F. V. 1903. A monograph of the Culicidae or mosquitoes. Vol. 3, xv + 359pp. British Museum (Natural History), London.
- TURELL, M. J.; O'GUINN, M. L.; DOHN, D. J. & JONES, JW. 2001. Vector competence of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus. **Journal of Medical Entomology** 38(2): 130-134.
- VASCONCELOS, P. F. C.; ROSA, J. T.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A. P. A.; DÉGALLIER, N.; PINHEIRO, F. P. & SÁ-FILHO, G. C. 1991. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na Amazônia brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 33: 465-476.
- WALTON, C.; SHARPE, R. G.; PRITCHARD, S. J.; THELWELL, N. J. & BUTLIN, R. K. 1999. Molecular identification of mosquito species. **Biological Journal of the Linnean Society** 68: 241-256.
- WEAVER, S. C.; FERRO, C.; BARRERA, R; BOSHELL, J. & NAVARRO, J. C. 2004. Venezuelan Equine Encephalitis. **Annu. Rev. Entomol.** 49: 141-74.
- WILKERSON, R. C.; PARSONS, T. J., ALBRIGHT, D. G.; KLEIN, T. A. & BRAUM, M. J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). **Insect Molecular Biology** 1(4): 205-211.
- WOLF, M.; ACHTZIGER, M.; SCHULTZ, J.; DANDEKAR, T. & MÜLLER, T. 2005. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures. **RNA** 11: 1616-1623.
- WRIGHT, J.W. & PAL, R. Genetics of insect vectors of disease. Amsterdam, Elsevier, 1967.

- YOUNG I. & COLEMAN, A. W. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 30: 236-242.
- ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L. & MILLER, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **J Comput Biol** 7(1-2): 203-14.
- ZUKER, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31(13): 3406-15.

ANEXO 1

Template: 5a_chid_VP

Model	Transfer	Energy	Name
high quality model	/100/100/100/	-78.32	<u>5a_chid VP</u>
high quality model	/81/91/77/	-10.95	<u>A6 coro CJ</u>
high quality model	/90/100/75/	-28.53	<u>N3 dolo VP</u>
high quality model	/90/100/79/	-25.52	<u>U3 bidenVP</u>
high quality model	/90/100/77/	-25.22	<u>U2 bidenVP</u>
high quality model	/90/100/84/	-51.62	<u>O1 nigr SP</u>
high quality model	/100/100/98/	-74.22	<u>5c chid VP</u>
high quality model	/81/100/75/	-0.76	<u>Q2 quin SP</u>
high quality model	/81/91/77/	-10.95	<u>A2 coro CJ</u>
high quality model	/81/100/81/	-21.67	<u>C5 coro VP</u>
high quality model	/81/100/77/	-24.96	<u>M5 dolo VP</u>
high quality model	/90/100/75/	-28.53	<u>N2 dolo VP</u>
high quality model	/90/100/86/	-57.42	<u>O3 nigr SP</u>
high quality model	/81/100/77/	-22.15	<u>I5 moll SP</u>
high quality model	/100/100/100/	-78.32	<u>5e chid VP</u>
high quality model	/90/100/83/	-22.76	<u>Q1 quin SP</u>
high quality model	/81/100/77/	-22.15	<u>I2 moll SP</u>
high quality model	/81/100/81/	-24.66	<u>M2 dolo VP</u>
high quality model	/81/91/81/	-16.77	<u>C2 coro VP</u>
high quality model	/90/100/83/	-54.74	<u>O4 nigr SP</u>
high quality model	/81/91/77/	-10.95	<u>A1 coro CJ</u>
high quality model	/90/100/86/	-57.72	<u>O2 nigr SP</u>
high quality model	/90/100/100/	-73.92	<u>5b chid VP</u>
high quality model	/90/100/79/	-22.90	<u>I4 moll SP</u>
high quality model	/81/100/79/	-18.81	<u>A3 coro CJ</u>
high quality model	/81/100/77/	-24.96	<u>M4 dolo VP</u>
high quality model	/81/100/77/	-15.37	<u>C3 coro VP</u>
high quality model	/81/91/79/	-13.81	<u>B3 coro ES</u>
high quality model	/90/100/77/	-25.22	<u>U1 bidenVP</u>
high quality model	/90/100/79/	-25.52	<u>U4 bidenVP</u>
high quality model	/90/100/83/	-22.76	<u>Q4 quin SP</u>
high quality model	/81/100/75/	-21.82	<u>N4 dolo VP</u>
high quality model	/81/91/81/	-16.57	<u>A4 coro CJ</u>
high quality model	/90/100/75/	-28.53	<u>N1 dolo VP</u>
high quality model	/81/91/81/	-17.47	<u>B1 coro ES</u>
high quality model	/81/91/79/	-13.81	<u>B2 coro ES</u>
high quality model	/81/91/77/	-10.05	<u>A5 coro CJ</u>
high quality model	/90/100/79/	-23.05	<u>I3 moll SP</u>

high quality model	/81/100/81/	-24.66	<u>M3 dolo VP</u>
high quality model	/90/100/83/	-22.76	<u>Q3 quin SP</u>
high quality model	/100/100/100/	-78.32	<u>5d chid VP</u>
high quality model	/81/91/75/	-7.51	<u>C4 coro VP</u>
high quality model	/90/100/79/	-23.05	<u>L1 moll SP</u>
high quality model	/81/100/75/	-21.82	<u>N5 dolo VP</u>
high quality model	/81/100/81/	-21.67	<u>C1 coro VP</u>
high quality model	/81/100/75/	-21.82	<u>N7 dolo VP</u>
high quality model	/90/100/83/	-22.76	<u>Q5 quin SP</u>
high quality model	/90/100/81/	-54.13	<u>O5 nigr SP</u>
high quality model	/81/100/81/	-24.66	<u>M1 dolo VP</u>
high quality model	/81/100/84/	-32.71	<u>L1 bigotPR</u>
high quality model	/90/100/75/	-24.22	<u>Y2 decl SP</u>
high quality model	/100/100/79/	-24.50	<u>J5 moll SP</u>
high quality model	/81/100/84/	-31.01	<u>K3 bigotSP</u>
high quality model	/81/100/79/	-4.02	<u>S1 quin RS</u>
high quality model	/90/100/81/	-16.41	<u>T1 quin RS</u>
high quality model	/81/100/75/	-0.76	<u>T3 quin RS</u>
high quality model	/100/100/79/	-24.50	<u>J3 moll SP</u>
high quality model	/90/100/81/	-16.27	<u>R1 quin SP</u>
high quality model	/90/100/81/	-16.27	<u>R2 quin SP</u>
high quality model	/100/100/79/	-24.50	<u>J4 moll SP</u>
high quality model	/81/100/79/	-2.04	<u>R4 quin SP</u>
high quality model	/90/91/81/	-7.80	<u>S3 quin RS</u>
high quality model	/90/100/81/	-16.27	<u>R3 quin SP</u>
high quality model	/81/91/75/	-3.85	<u>4d usquaSP</u>
high quality model	/90/100/81/	-16.41	<u>T5 quin RS</u>
high quality model	/81/91/83/	-17.20	<u>3c usquaSP</u>
high quality model	/81/100/77/	-22.53	<u>Y3 decl SP</u>
high quality model	/81/91/81/	-15.50	<u>4b usquaSP</u>
high quality model	/90/100/79/	-24.90	<u>2c corniSP</u>
high quality model	/81/100/75/	-0.76	<u>T4 quin RS</u>
high quality model	/81/100/79/	-4.02	<u>S6 quin RS</u>
high quality model	/81/100/84/	-32.71	<u>L3 bigotPR</u>
high quality model	/81/100/84/	-34.11	<u>K2 bigotSP</u>
high quality model	/81/100/83/	-28.81	<u>L2 bigotPR</u>
high quality model	/90/100/77/	-23.60	<u>1a corniSP</u>
high quality model	/81/100/77/	-11.29	<u>S2 quin RS</u>
high quality model	/81/91/81/	-15.73	<u>3b usquaSP</u>
high quality model	/81/91/81/	-15.73	<u>3e usquaSP</u>
high quality model	/90/100/77/	-23.60	<u>1e corniSP</u>
high quality model	/90/100/86/	-57.72	<u>P3 nigr SP</u>
high quality model	/90/100/86/	-57.72	<u>P5 nigr SP</u>
high quality model	/81/100/75/	-0.76	<u>S4 quin RS</u>
high quality model	/100/100/79/	-24.50	<u>J1 moll SP</u>
high quality model	/81/100/79/	-4.02	<u>S5 quin RS</u>

high quality model	/81/91/81/	-15.50	<u>4a usquaSP</u>
high quality model	/90/100/86/	-57.72	<u>P1 nigr SP</u>
high quality model	/81/100/75/	-0.76	<u>T2 quin RS</u>
high quality model	/90/100/77/	-23.60	<u>1c corniSP</u>
high quality model	/90/100/79/	-22.00	<u>2a corniSP</u>
high quality model	/100/100/79/	-24.50	<u>J2 moll SP</u>
high quality model	/81/91/81/	-22.63	<u>3a usquaSP</u>
high quality model	/90/91/79/	-20.70	<u>2b corniSP</u>
high quality model	/90/100/77/	-23.60	<u>1b corniSP</u>
high quality model	/81/91/81/	-15.73	<u>3d usquaSP</u>
high quality model	/90/100/86/	-57.72	<u>P2 nigr SP</u>
high quality model	/81/91/81/	-15.50	<u>4c usquaSP</u>
high quality model	/90/100/86/	-57.72	<u>P4 nigr SP</u>
high quality model	/81/100/77/	-22.53	<u>Y1 decl SP</u>
high quality model	/81/91/81/	-15.50	<u>4e usquaSP</u>
high quality model	/81/100/84/	-34.11	<u>K4 bigotSP</u>
high quality model	/81/100/84/	-31.01	<u>K1 bigotSP</u>
No high quality model	/54/83/15/		<u>F2 zete SP</u>
No high quality model	/81/66/20/		<u>E4 imit VP</u>
No high quality model	/81/66/20/		<u>E1 imit VP</u>
No high quality model	/54/83/20/		<u>F3 zete SP</u>
No high quality model	/54/83/20/		<u>F1 zete SP</u>
No high quality model	/54/83/15/		<u>F5 zete SP</u>
No high quality model	/72/100/75/		<u>N6 dolo VP</u>
No high quality model	/81/58/5/		<u>D3 imit ES</u>
No high quality model	/72/91/24/		<u>G1 dyiusSP</u>
No high quality model	/72/58/9/		<u>D2 imit ES</u>
No high quality model	/81/66/20/		<u>E3 imit VP</u>
No high quality model	/72/58/9/		<u>D1 imit ES</u>
No high quality model	/81/58/0/		<u>D4 imit ES</u>
No high quality model	/81/58/5/		<u>D5 imit ES</u>
No high quality model	/72/91/26/		<u>G2 dyiusSP</u>
No high quality model	/54/83/20/		<u>F4 zete SP</u>
No high quality model	/81/66/20/		<u>E2 imit VP</u>
No high quality model	/72/91/30/		<u>G3 dyiusSP</u>
No high quality model	/81/66/20/		<u>E5 imit VP</u>
No high quality model	/54/91/9/		<u>H4 dyiusES</u>
No high quality model	/90/100/73/		<u>1d corniSP</u>
No high quality model	/81/91/22/		<u>Ps ferox</u>
No high quality model	/90/100/73/		<u>W5 decl SP</u>
No high quality model	/81/91/28/		<u>Z3 ybar ES</u>
No high quality model	/90/91/73/		<u>W1 decl SP</u>
No high quality model	/90/100/73/		<u>W3 decl SP</u>
No high quality model	/54/91/13/		<u>V5 caud SP</u>
No high quality model	/54/91/9/		<u>H5 dyiusES</u>
No high quality model	/81/91/15/		<u>Z2 ybar ES</u>

No high quality model	/90/100/73/	<u>W2 decl SP</u>
No high quality model	/90/100/73/	<u>W4 decl SP</u>
No high quality model	/54/91/13/	<u>V4 caud SP</u>
No high quality model	/54/91/9/	<u>H3 dyiusES</u>
No high quality model	/54/91/9/	<u>H1 dyiusES</u>
No high quality model	/72/91/15/	<u>V2 caud SP</u>
No high quality model	/54/91/13/	<u>V1 caud SP</u>
No high quality model	/72/91/15/	<u>X4 caud SP</u>
No high quality model	/54/91/13/	<u>X2 caud SP</u>
No high quality model	/72/91/15/	<u>X3 caud SP</u>
No high quality model	/54/91/15/	<u>X1 caud SP</u>
No high quality model	/63/91/22/	<u>Ae aegypti</u>
No high quality model	/54/91/9/	<u>H2 dyiusES</u>
No high quality model	/90/83/24/	<u>Ae vexans</u>
No high quality model	/72/91/15/	<u>X5 caud SP</u>
No high quality model	/72/91/15/	<u>V3 caud SP</u>
No high quality model	/81/91/15/	<u>Z1 ybar ES</u>

ANEXO 2

Template: F4_zete_SP

Model	Transfer	Energy	Name
high quality model	/100/100/100/100/	-62.00	<u>F4 zete SP</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-30.00	<u>X2 caud SP</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-30.00	<u>V1 caud SP</u>
high quality model	/100/100/82/100/	-33.10	<u>X4 caud SP</u>
high quality model	/100/100/82/100/	-33.10	<u>V2 caud SP</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-32.60	<u>H1 dyiusES</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-30.00	<u>V4 caud SP</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-33.90	<u>H3 dyiusES</u>
high quality model	/100/100/88/100/	-26.90	<u>Z1 ybar ES</u>
high quality model	/100/100/82/100/	-33.10	<u>V3 caud SP</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-21.30	<u>G3 dyiusSP</u>
high quality model	/100/100/82/100/	-16.10	<u>G1 dyiusSP</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-30.00	<u>V5 caud SP</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-32.60	<u>H5 dyiusES</u>
high quality model	/100/100/88/100/	-26.90	<u>Z2 ybar ES</u>
high quality model	/100/100/82/100/	-15.80	<u>G2 dyiusSP</u>
high quality model	/100/100/82/100/	-33.10	<u>X5 caud SP</u>
high quality model	/100/100/100/100/	-53.40	<u>F5 zete SP</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-32.60	<u>H2 dyiusES</u>
high quality model	/100/100/80/100/	-10.60	<u>Z3 ybar ES</u>
high quality model	/100/100/100/100/	-59.90	<u>F1 zete SP</u>
high quality model	/100/100/100/100/	-59.90	<u>F3 zete SP</u>
high quality model	/100/100/82/100/	-33.10	<u>X3 caud SP</u>
high quality model	/100/100/85/100/	-33.90	<u>H4 dyiusES</u>
high quality model	/100/100/100/100/	-53.40	<u>F2 zete SP</u>
No high quality model	/100/70/62/66/		<u>D4 imit ES</u>
No high quality model	/100/100/68/66/		<u>E1 imit VP</u>
No high quality model	/100/100/60/33/		<u>E4 imit VP</u>
No high quality model	/100/100/85/66/		<u>X1 caud SP</u>
No high quality model	/100/70/62/66/		<u>D5 imit ES</u>
No high quality model	/100/70/62/66/		<u>D3 imit ES</u>
No high quality model	/100/100/68/66/		<u>E2 imit VP</u>
No high quality model	/83/80/65/0/		<u>D2 imit ES</u>
No high quality model	/100/100/60/33/		<u>E3 imit VP</u>
No high quality model	/100/100/68/66/		<u>E5 imit VP</u>
No high quality model	/83/80/65/0/		<u>D1 imit ES</u>



Mauro Toledo Marrelli

Professor Doutor do Depto. de Epidemiologia da FSP-USP (desde 2009). Possui Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Mackenzie (1990). Aperfeiçoamento em Protozoologia pelo Instituto de Medicina Tropical (FM-USP, 1992). Mestrado em Parasitologia, pelo ICB, Universidade de São Paulo (1995) e doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) (ICB-USP, 2000). Pós-doutorado pela Case Western Reserve University (Cleveland-OH) (2002), e pela Johns Hopkins School of Public Health (Johns Hopkins University) (Baltimore-MD) (2005). Tem experiência na área de Parasitologia e Epidemiologia de doenças transmitidas por vetores, atuando principalmente nos seguintes temas: malária, vetores, mosquitos transgênicos, fitness, marcadores moleculares.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 26/05/2009

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/6872138193111416>

Dados Pessoais

Nome	Mauro Toledo Marrelli
Nome em citações bibliográficas	MARRELLI, M. T.
Sexo	masculino
Filiação	Sergio Cruz Marrelli e Edir de Toledo Marrelli
Nascimento	04/09/1965 - Sao Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade	13163320 SSP - SP - 18/12/1978
CPF	09369019855
Endereço residencial	Av. Angélica 1132, apt. 51 Sta. Cecília - Sao Paulo 01228-100, SP - Brasil Telefone: 11 36676438 URL da home page: http://
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública Av. Dr. Arnaldo 715 Cerqueira César - Sao Paulo 01246-904, SP - Brasil Telefone: 11 30617731 URL da home page: http://www.jhu.edu
Endereço eletrônico	e-mail para contato : mmarelli@usp.br e-mail alternativo : mmarelli@usp.br

Formação Acadêmica/Titulação

2000 - 2002	Pós-Doutorado. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo <i>Áreas do conhecimento : Bioquímica, Genética, Parasitologia</i>
2002 - 2003	Pós-Doutorado. Case Western Reserve University, CWRU, Estados Unidos <i>Áreas do conhecimento : Bioquímica, Genética, Parasitologia</i>
2003 - 2005	Pós-Doutorado. Johns Hopkins University, JHU, Baltimore, Estados Unidos Bolsista do(a): Johns Hopkins University <i>Áreas do conhecimento : Parasitologia, Genética, Bioquímica</i>
2005	Pós-Doutorado. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
1996 - 2000	Doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Título: Anopheles oswaldi (Diptera, Culicidae): Análise do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico e da susceptibilidade à infecção com Plasmodium vivax, Ano de obtenção: 2000 Orientador: Osvaldo Marinotti Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo



Fabiana Tavares Vesgueiro

possui graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade de Mogi das Cruzes (2002). Atualmente cursa o Mestrado pela Faculdade de Saúde Pública da USP, na área de concentração de Epidemiologia. Participou do Programa de Aperfeiçoamento Profissional da Secretaria de Estado da Saúde, com bolsa FUNDAP (2004 - 2006), na Superintendência de Controle de Endemias - São Paulo.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 29/08/2008

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/2142196725291973>



Dados pessoais

Nome Fabiana Tavares Vesgueiro

Nome em citações bibliográficas VESGUEIRO, F. T.

Sexo Feminino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
Av. Dr. Arnaldo, 715 - Departamento de Epidemiologia
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
URL da Homepage: www.fsp.usp.br

Formação acadêmica/Titulação

- 2007** Mestrado em andamento em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Estudo das relações taxonômicas e filogenéticas de mosquitos do gênero Culex utilizando marcadores moleculares., *Orientador:* Mauro Toledo Marrelli.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: Culex; marcadores moleculares; filogenia; ITS2; gene white.
- 2004 - 2006** Aperfeiçoamento em Controle de vetores - Entomologia Médica (3.840h).
Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brasil.
Título: Bioecologia de mosquitos Culicidae de interesse médico.. Ano de finalização: 2006.
Orientador: Rosa Maria Tubaki.
Bolsista do(a): Fundação do Desenvolvimento Administrativo, FUNDAP, Brasil.
- 1999 - 2002** Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.
Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil.
- 1999 - 2001** Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.
Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil.

Formação complementar

- 2008 - 2008** Extensão universitária em Ferramentas genéticas p/ a detecção de espécies.. (Carga horária: 12h).
Sociedade Brasileira de Zoologia, SBZ, Brasil.
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Ferramentas Imunológicas na Entomologia.. (Carga horária: 8h).
Sociedade Paulista de Parasitologia, SPP, Brasil.
- 2003 - 2004** Estágio em Bioecologia de Culicidae (465h).
Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brasil.
- 2003 - 2003** Extensão universitária em Monitoramento de pragas e vetores. (Carga horária: 16h).
Instituto Biológico, IB, Brasil.
- 2002 - 2002** Extensão universitária em Animais peçonhentos.. (Carga horária: 3h).
Instituto Butantan, IBU, Brasil.
- 2002 - 2002** Extensão universitária em Anfíbios - Biologia, Taxonomia e Venenos.. (Carga horária: 12h).
Instituto Butantan, IBU, Brasil.
- 2001 - 2001** Extensão universitária em Educação Ambiental em Áreas Naturais Protegidas.. (Carga horária: 16h).
Centro de Monitoramento Ambiental da Serra do Itapety - Mogi das Cruzes, CEMASI, Brasil.
- 2001 - 2001** Extensão universitária em Introdução à Espeleologia..
Organização Bio-Bras, BIO-BRAS, Brasil.
- 2001 - 2001** Extensão universitária em Noções sobre Oceanografia.. (Carga horária: 24h).
Instituto Oceanográfico da USP, IO/USP, Brasil.
- 2001 - 2001** Extensão universitária em Biologia e Ecologia do Boto-cinza.. (Carga horária: 12h).