

Maria Cristina Jurcovichi Peruzin

Análises comparativas populacionais de *Culex quinquefasciatus* em dois locais do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

São Paulo
2009

Maria Cristina Jurcovichi Peruzin

Análises comparativas populacionais de *Culex quinquefasciatus* em dois locais do Estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof^o Dr^o Lincoln Suesdek Rocha

São Paulo
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Peruzin, Maria Cristina Jurcovichi.

Análises comparativas populacionais de *Culex quinquefasciatus* de dois locais do Estado de São Paulo / Maria Cristina Jurcovichi Peruzin. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Lincoln Suesdek Rocha.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Culicídeos de interesse médico.

Versão do título para o inglês: Comparative populational analyses of *Culex quinquefasciatus* of two places of State of São Paulo.

Descritores: 1. *Culex quinquefasciatus* 2. Insetos Vetores 3. Culicidae 4. Evolução 5. Morfometria 6. Genética I. Rocha, Lincoln Suesdek II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia III. Título.

ICB/SBIB49/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria Cristina Jurcovichi Peruzin.

Título da Dissertação: Análises comparativas populacionais de *Culex quinquefasciatus* de dois locais do Estado de São Paulo.

Orientador(a): Lincoln Suesdek Rocha.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 217/07, referente ao projeto intitulado: "*Caracterização populacional de Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae): aspectos moleculares, cariotípicos e morfométricos*" sob a responsabilidade de **Maria Cristina Jurcovichi Peruzin**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 13 de junho de 2007.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coodenador da CEPsh - ICB/USP

A meus pais
Mauro e Neuza, eterno fundamento de cada
passo meu.
Ao Bruno, companheiro e cúmplice no
aprendizado da vida.
À Estela, razão do meu brilho no olhar.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Lincoln Suesdek Rocha, pela confiança de me aceitar no seu laboratório, pela disponibilidade, paciência e ensinamentos durante todo o curso de mestrado.

À Dra. Toshie Kawano, por sempre proporcionar um ambiente acolhedor.

À Dra. Maria Anice Mureb Sallum, pela identificação dos mosquitos, por viabilizar as coletas em Pariquera-Açu e colaborar com a doação de exemplares.

Às equipes da Dr^a. Iná Kakitani e do Dr. Delsio Natal, que contribuíram com a coleta de espécimes.

À Sumire Hibi, do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo, pela doação de *Cx. quinquefasciatus* coletados no Rio Pinheiros.

Ao Enéas de Carvalho, José Salvatore Leister Patané e Roberto Mitsuo Takata pelas valiosas recomendações para o exame de qualificação.

À Camila Moratore e Mariana Devicari, pela amizade e ajuda em vários momentos da execução deste trabalho e por proporcionar momentos de alegre descontração.

Aos mais novos membros do grupo, Paloma de Oliveira Vidal e Fábio de Almeida.

Aos demais colegas, funcionários e pesquisadores do departamento de Parasitologia e Malacologia do Instituto Butantan, pela boa convivência.

Aos funcionários do departamento de Parasitologia do ICB.

À Silvia Geurgas, pela amizade e boas conversas.

À Cida, por compartilhar histórias de vida que me encorajaram e confortaram.

À minha família, em especial meus pais, pelo apoio incondicional e ajuda irrestrita.

À FAPESP pelo financiamento.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e que não estão citados aqui.

“Eu estava dormindo e me acordaram
E me encontrei, assim, num mundo estranho e
louco...
E quando eu começava a compreendê-lo
Um pouco,
Já eram horas de dormir de novo!”

Mário Quintana

“Se procurar bem você acaba encontrando.
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Peruzin MCJ. Análises comparativas populacionais de *Culex quinquefasciatus* de dois locais do Estado de São Paulo [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O mosquito *Culex quinquefasciatus* tem grande importância médica no mundo devido à sua habilidade como vetor de arboviroses e filarioses. O principal fator limitante dos métodos de controle populacional para *Cx. quinquefasciatus* é a microevolução dessa espécie, fenômeno que frequentemente resulta em aumento da sua resistência a inseticidas e da sua tolerância à poluição. No Estado de São Paulo existem duas populações vivendo sob diferentes condições ambientais. Uma delas, próxima ao Rio Pinheiros (PIN), está sujeita à alta poluição e aplicações de piretróides e outra, em Pariquera-Açu (PAR), vive em local semi-rural na ausência de inseticidas. O objetivo deste trabalho foi investigar se essas populações provenientes de ambientes distintos possuem polimorfismos genético-morfológicos e se a população PIN apresenta variações morfológicas ao longo do tempo. Os parâmetros utilizados nas comparações foram morfometria geométrica alar, análises do DNA ribossômico (DNAr) e de cromossomos politênicos. Não obtivemos sucesso na caracterização cariotípica devido a pouca nitidez das bandas e interbandas. A morfometria geométrica de 286 asas de PIN, amostras coletadas em 2004 (PIN04) e 2007 (PIN07), e 150 asas de PARI, amostras coletadas em 2008 demonstrou variações morfológicas. As duas populações PIN04 e PIN07 revelaram alto dimorfismo sexual de forma e tamanho, sendo asas de fêmeas maiores que asas de machos em ambas as populações. A assimetria bilateral não é significativa para tamanho e é tênue para forma, sendo ligeiramente mais pronunciada em machos e em PIN07. Os espécimes de PIN07 são maiores e mais assimétricos que PARI, fenômenos possivelmente relacionados à maior disponibilidade de alimento e à contínua exposição a altos níveis de inseticida, respectivamente. Análises de DNAr revelaram padrões equivalentes para PIN07 e PARI. Em suma, supomos que o fluxo gênico entre as populações geográficas pode ter ocorrido até recentemente. Este estudo mostrou que é possível ocorrer variação de tamanho e forma de asas em Culicidae em um intervalo de tempo de três anos. O próximo passo poderia ser uma investigação aprofundada a respeito da relação entre variação geográfica-temporal e algumas de suas possíveis causas tais como poluição e inseticida.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*; Morfometria geométrica alar; DNAr; Microevolução; Culicidae; Pariquera-Açu; Rio Pinheiros.

ABSTRACT

Peruzin MCJ. Comparative populational analyses of *Culex quinquefasciatus* of two places of State of São Paulo. [Master Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The mosquito *Culex quinquefasciatus* has medical importance due to its ability of vectoring arboviruses and filariases. Microevolution resulting in insecticide resistance is a remarkable limiting factor for populational control of this species. In the State of São Paulo there are two populations under different environmental conditions. One, near Rio Pinheiros (PIN), is subjected to pollution and pyrethroids applications and another, in Pariquera-Açu (PAR), lives in a semi-rural place in the absence of insecticides. The objective of this work was to investigate if these populations from different environments have genetic-morphological polymorphisms and if PIN population exhibits morphological variations during the time. Parameters used in the comparisons were wing geometric morphometrics, ribosomal DNA (rDNA), and polytene chromosomes. Karyotypic characterization was unsuccessful due to the poor definition of bands and interbands. Morphometrical analyses of 286 wings of PIN, collected in 2004 (PIN04) and 2007 (PIN07), and 150 wings of PARI, collected in 2008, demonstrate morphological variations. The two populations PIN04 and PIN07 revealed strong intrapopulational sexual dimorphism concerning shape and size, being the wings of females larger than those of males in both populations. The wing asymmetry is non-significant for size and tenuous for shape, being slightly more conspicuous in males and in PIN07. The specimens of PIN07 are larger and more bilaterally asymmetric than PARI, possibly due to higher food availability and to continuous exposition to high level of insecticide, respectively. Analysis of rDNA revealed restriction patterns equivalent for PIN07 and PARI populations. Thus, one may suppose that gene flow may have occurred until recently. This study showed that it is possible to occur size and shape variation of wings in Culicidae in time intervals as short as three years. The next step would be to evaluate in depth the relationship between geographical-temporal variation and some of possible causes like pollution and insecticides.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*; Wing geometric morphometrics; rDNA; Microevolution; Culicidae; Pariquera-Açu; Rio Pinheiros.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CP	cromossomos politênicos
DNAr	DNA ribossômico
FD	asas direitas de fêmeas
FE	asas esquerdas de fêmeas
MD	asas direitas de machos
ME	asas esquerdas de machos
MG	morfometria geométrica
PARI	população de Pariquera-Açu
PIN04	população do Rio Pinheiros – coleta em 2004
PIN07	população do Rio Pinheiros – coleta em 2007
PIN08	população do Rio Pinheiros – coleta em 2008
VC	variável canônica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do estado de São Paulo.....	30
Figura 2 - Imagens dos locais de coleta.....	31
Figura 3 - <i>Culex quinquefasciatus</i> em estágio larval quatro	33
Figura 4 - <i>Culex quinquefasciatus</i> fêmea adulta.	33
Figura 5 - Foto da asa de <i>Culex quinquefasciatus</i> com os pontos anatômicos.....	34
Figura 6 – Comparação interpopulacional de tamanho alar de PIN04, PIN07 e PARI	45
Figura 7 - Assimetria de tamanho alar das três populações, representada em box-plot.....	46
Figura 8 - Assimetria de forma alar nas fêmeas de PIN04, representada em histograma múltiplo e diagramas de grades	51
Figura 9 - Assimetria bilateral de forma alar nos machos de PIN04.....	52
Figura 10 - Assimetria bilateral de forma alar nas fêmeas de PIN07.....	53
Figura 11 - Assimetria bilateral de forma alar nos machos de PIN07.....	54
Figura 12 - Assimetria bilateral de forma alar nas fêmeas de PARI.....	55
Figura 13 - Assimetria bilateral de forma alar nos machos de PARI.....	56
Figura 14 – Dimorfismo sexual de forma em asas direitas de PIN04, representado em histograma múltiplo e diagramas de grades	57

Figura 15 - Dimorfismo sexual de forma em asas esquerdas de PIN04.....	58
Figura 16 - Dimorfismo sexual de forma em asas direitas de PIN07.....	59
Figura 17 - Dimorfismo sexual de forma em asas esquerdas de PIN07.....	60
Figura 18 - Dimorfismo sexual de forma em asas direitas de PARI.....	61
Figura 19 - Dimorfismo sexual de forma em asas esquerdas de PARI.....	62
Figura 20 – Comparação interpopulacional de forma alar entre PIN04 e PIN07, somente fêmeas, representada em histograma múltiplo e diagramas de grades.....	63
Figura 21 – Comparação interpopulacional de forma alar entre PIN04 e PIN07, somente machos, representada em histograma múltiplo e diagramas de grades.....	64
Figura 22 - Comparação interpopulacional de forma alar entre fêmeas de PIN07 e PARI, representada em histograma múltiplo e diagramas de grades.....	65
Figura 23 - Comparação interpopulacional de forma alar entre machos de PIN07 e PARI, representada em histograma múltiplo e diagramas de grades.....	66
Figura 24 - Teste de diferença temporal-geográfica entre Pinheiros e Pariquera-Açu e as Distâncias de Mahalanobis para cada comparação.....	67
Figura 25 - Comparação interpopulacional de forma alar entre fêmeas de PIN04, PIN07 e PARI, representada em gráfico bidimensional de dispersão e diagramas de grades.....	68
Figura 26- Comparação interpopulacional de forma alar entre machos de PIN04, PIN07 e PARI, representada em gráfico bidimensional de dispersão e diagramas de grades.....	69

Figura 27 - Dendrograma de distância entre as populações.....	70
Figura 28 - Cromossomos politênicos de PIN08.....	74
Figura 29 - Membrana de southern-blot com DNA de <i>Cx. quinquefasciatus</i> clivado com <i>EcoRI</i> e hibridado com a sonda <i>Dm238</i> : PIN07 e PARI.....	75
Figura 30 - Membrana de southern-blot com DNA de <i>Cx. quinquefasciatus</i> clivado com <i>EcoRI</i> e hibridado com a sonda <i>Dm238</i> : indivíduos de PARI	76
Figura 31 - Membrana de southern-blot com DNA de <i>Cx. quinquefasciatus</i> clivado com <i>EcoRI</i> e hibridado com a sonda <i>Dm238</i> : PIN07 e PARI.....	77
Figura 32 - Membrana de southern-blot com DNA de <i>Cx. quinquefasciatus</i> clivado com <i>EcoRI</i> e hibridado com a sonda <i>Dm238</i> : 21 indivíduos de PIN08	78
Figura 33 - Gel de agarose e membrana com DNA de <i>Cx. quinquefasciatus</i> clivado com <i>RsaI</i> e <i>DraI</i> e hibridado com a sonda <i>Dm238</i> : indivíduos e pools de PARI e PIN08.....	79
Figura 34 - Gel de agarose e membrana com DNA de <i>Cx. quinquefasciatus</i> clivado com <i>AluI</i> e <i>HindIII</i> e hibridado com a sonda <i>Dm238</i> : indivíduos e pools de PARI e PIN08.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de coleta das amostras populacionais de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	32
Tabela 2 - Tamanhos de centróide de cada espécime em milímetros.....	42
Tabela 3 - Teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, para tamanhos de centróide: dimorfismo sexual e comparação interpopulacional.....	43
Tabela 4 - Teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, para tamanhos de centróide: assimetria bilateral.....	44
Tabela 5 - Estatística descritiva com valores de média, mínimo, máximo e desvio padrão para tamanhos de centróide	47
Tabela 6 - Reclassificação das comparações interpopulacionais	71
Tabela 7 - “Relative warps” gerados no programa TpsRelw	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 A Família Culicidae	16
1.2 Microevolução em Culicidae	17
1.3 Abordagens múltiplas para caracterização populacional em Culicidae	19
1.3.1 Morfometria geométrica de asas	20
1.3.2 Estudos do DNA ribossômico	22
1.3.3 Análise de Cromossomos Politênicos	24
1.4 A espécie <i>Culex quinquefasciatus</i>	25
1.5 A situação de <i>Cx. quinquefasciatus</i> em dois municípios do estado de São Paulo...	27
2 OBJETIVO	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Coleta e armazenamento dos exemplares.....	30
3.2 Análise morfométrica de asas	34
3.2.1 Tamanhos de Centróide	35
3.2.2 Variáveis Canônicas	35
3.2.2.1 Teste de diferença temporal-geográfica	36
3.2.3 Distâncias de Mahalanobis	36
3.3 Análise do DNA ribossômico	37
3.3.1 Extração de DNA genômico.....	37
3.3.2 Eletroforese de DNA.....	38
3.3.3 Obtenção e marcação da sonda heteroespecífica.....	38
3.3.4 Clivagem com endonuclease, Southern-blot e hibridação	39
3.4 Análise cromossômica	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Morfometria Geométrica Alar	41
4.1.1 Tamanho.....	41
4.1.1.1 Comparações Intrapopulacionais de Tamanho	41
4.1.1.1 Comparações Interpopulacionais de Tamanho	41
4.1.2 Forma Alar	48
4.1.2.1 Comparações Intrapopulacionais de Forma.....	48
4.1.2.2 Comparações Interpopulacionais de Forma	49
4.1.2.2.1 Teste de diferença temporal – geográfica.....	50
4.2 Cromossomos Politênicos.....	73
4.3 DNA ribossômico	73
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Família Culicidae

Os culicídeos, popularmente conhecidos como “mosquitos”, abrangem espécies tais como *Culex* sp, *Anopheles* sp, e *Aedes* sp, que são responsáveis pela transmissão de muitos agentes etiológicos de doenças infecciosas, como vírus, protozoários ou até metazoários. Esses insetos estão entre os que causam maior impacto à saúde pública no Brasil e em muitos países (Forattini, 2002). No mundo, já foram descritas mais de 3.200 espécies de culicídeos, dentre as quais dezenas estão envolvidas na transmissão de infecções ou têm relevância médico-veterinária (Ward, 1992; Munstermann e Conn, 1997), tais como malária, dengue, febre amarela e filarioses, entre outras.

As fêmeas das espécies vetoras de parasitas em geral são anautógenas, ou seja, dependem de complementos alimentares de aminoácidos e outras substâncias para desenvolvimento de seus ovariolos e ovócitos para reprodução. Para tal, praticam hematofagia, sugando através de picadas o sangue de animais, entre eles o homem. Ao picar animais infectados por parasitas, o mosquito ingere sangue contaminado e passa a hospedar esses parasitas, os quais, freqüentemente, possuem a capacidade de sobreviver no interior do mosquito. No caso de mosquitos transmissores de arbovírus, é ainda possível que esses vetores adquiram os parasitas a partir de sua progenitora, através de transmissão transovariana (Rosen, *et al.*, 1983). Uma vez que os mosquitos contaminados venham a picar outro animal, os parasitas poderão ser transferidos pelas peças do aparelho bucal para esse novo doador do sangue (Rey, 2001).

Além do grande número de doenças transmitidas por mosquitos, muitas delas em condições de endemias, freqüentemente surgem epidemias drásticas que em parte são devidas à grande densidade populacional e velocidade de reprodução e de dispersão desses insetos vetores. Dada essa realidade, estratégias para controle dos culicídeos têm sido desenvolvidas e aplicadas há décadas. Como principais estratégias, podemos citar: o controle ambiental, que visa, por exemplo, eliminação de criadouros para mosquitos (Forattini, 2002); o controle químico, que emprega substâncias químicas inseticidas como organofosforados, carbamatos, piretróides e derivados de *Bacillus thuringiensis* (Forattini, 2002; Gill *et al.*, 1992); e o controle biológico, que utiliza predadores e parasitóides dos mosquitos além de culicídeos

estéreis ou transgênicos (Benedict e Robinson, 2003; Marrelli, *et al.*, 2006; Sperança e Capurro, 2007).

1.2 Microevolução em Culicidae

Os métodos de controle dos culicídeos apresentam eficácias diversas dependendo da situação em que são empregados, e freqüentemente enfrentam como fator limitante a microevolução dos mosquitos. Entende-se por “microevolução” o conjunto de alterações evolutivas ocorridas em níveis taxonômicos infra-específicos, como por exemplo, em populações (Futuyma, 1997; Ridley, 2003). Processos microevolutivos sofridos pelas populações de mosquitos podem, em poucas gerações, promover fixação de caracteres que lhes conferem adaptações, como resistência a inseticidas, aumento da tolerância à poluição, etc. (Hemmingway e Karunaratne, 1988; Lenormand, *et al.*, 2000; Donnelly, *et al.*, 2002). Por tal razão, o estudo aprofundado de padrões e processos microevolutivos é uma questão central para o aprimoramento de estratégias de controle de mosquitos.

Processos microevolutivos geralmente compreendem fenômenos como variações alélicas quantitativas ou qualitativas, ampliações gênicas e rearranjos cromossômicos, os quais ocorrem dinamicamente em populações como resultado da conjunção de fatores bióticos e abióticos. Esses processos produzem padrões genotípicos, fenotípicos e cariotípicos, cuja manutenção depende da atuação da seleção natural e da deriva genética. Ao longo do tempo evolutivo, influenciados também pela atuação do fluxo gênico, tais processos podem culminar em diferenciação ou convergência desses padrões nas entidades biológicas envolvidas (Futuyma, 1997; Ridley, 2003).

A dinâmica evolutiva das populações de Culicidae é peculiar devido a diversas características biológicas deste grupo, como comentado a seguir. Culicídeos em geral apresentam flutuações populacionais amplas e freqüentes, e seu ciclo de vida é influenciado por condições ambientais instáveis como temperatura, regime pluviométrico, disponibilidade de coleções hídricas e pela presença humana (Hayes, 1975; Kovats, 2000; Forattini, 2002; Ahumada, *et al.*, 2004). Soma-se a isso o fato de reproduzirem-se em gerações rápidas, podendo completar um ciclo de vida em poucos dias. Essas propriedades em conjunto resultam freqüentemente em rápida evolução de suas populações.

Um exemplo que ilustra tal velocidade evolutiva é a espécie *Cx. quinquefasciatus*, que mostrou-se capaz de ampliar significativamente sua resistência a inseticidas em poucos anos

(Wirth e Georghiou, 1999; Yebakima, *et al.*, 2004). Esse tipo de resistência está bem documentada, como mostra, por exemplo, o trabalho de Labbé, *et al.* (2007), onde foi feita uma revisão dos últimos 40 anos da evolução da resistência a inseticidas em *Cx. pipiens*. Ainda nessa espécie, há casos em que variações alélicas de isozimas foram detectadas ao longo de apenas oito meses, como ocorreu com populações no Estado da Flórida, Estados Unidos (Nayar, *et al.*, 2003).

Algumas alternativas ao uso de inseticidas no controle populacional dessa e de outras espécies de culicídeos têm sido testadas nos últimos anos. Uma alternativa recente de controle populacional de *Cx. quinquefasciatus* é o uso de ninfas de odonata para predação das larvas desse culicídeo, conforme descrito por Mandal, *et al.* (2008). Wilke (2008) estudou o uso do sistema RIDL (Liberação de Insetos Carregando Gene Letal Dominante) para controle de *Cx. quinquefasciatus*. Além do manejo das populações de culicídeos, outras estratégias de controle de doenças veiculadas por esses insetos têm sido estudadas com ênfase no agente causador, abordando a interferência no desenvolvimento do parasita e formas de interação com o mosquito vetor (Maciel, *et al.*, 2008; Ghosh, *et al.*, 2009).

Outra questão importante na evolução de populações de mosquitos é a diferenciação de populações geograficamente isoladas. É comum encontrar variações geográficas entre populações de culicídeos cuja distribuição geográfica é ampla e descontínua a ponto de constituir barreiras ao intenso fluxo gênico. Um exemplo de tal situação é a variabilidade genética encontrada nas diversas populações de *Aedes aegypti* ao redor do mundo (Powell, *et al.*, 1980). Outro exemplo de diferenciação populacional correlata com descontinuidade distribucional geográfica é o caso de duas populações de *Cx. pipiens* na cidade de Londres, Inglaterra, uma delas habitante dos túneis subterrâneos do metrô e a outra habitante da superfície, sendo que ambas guardam significativas divergências genéticas (Byrne e Nichols, 1999).

Para estudo da microevolução, em geral adota-se como passo inicial a caracterização de populações, as quais são descritas quanto a padrões genéticos, morfológicos, comportamentais, e comparadas ao longo de transectos geográficos ou temporais. Em um primeiro momento, o conjunto de dados permite o reconhecimento de padrões microevolutivos, enquanto que com o acúmulo de informações ao longo dos anos, existe a possibilidade de observar processos microevolutivos. Uma vez que a velocidade de espalhamento das variações genéticas é altamente influenciada pela reprodução

interpopulacional efetiva, estudos geralmente incluem estimativa de fluxo gênico entre populações, mesmo que semi-quantitativa (Roderick, 1996). É importante ressaltar que tais estudos requerem cautela, já que nem todas as variações genóticas e fenotípicas detectadas possuem significância evolutiva, pois muitas delas devem-se a variações fisiológicas ou genéticas somáticas não-herdáveis.

A caracterização populacional pode revelar populações tão diferenciadas a ponto de serem consideradas espécies distintas. Tal interpretação pode ocorrer mesmo em casos especiais, em que a diferenciação biológica é desacompanhada de diferenciação morfológica (Mayr, 1948). Nesses casos, tratar-se-á de um complexo de espécies crípticas (do grego “kryptos”: escondido, não-evidente). A existência de espécies crípticas tem uma problemática especial em entomologia médica, já que tais espécies, a despeito das semelhanças morfológicas, podem apresentar capacidades vetorais e tolerância a inseticidas distintas.

1.3 Abordagens múltiplas para caracterização populacional em Culicidae

Em uma caracterização populacional, a abordagem simultânea de múltiplos parâmetros comparativos pode fornecer maior robustez aos testes de hipóteses, tanto para descrição de padrões e processos microevolutivos, como para detecção de espécies crípticas. Uma vez que os caracteres em uma espécie evoluem em taxas e velocidades diversas, a utilização de múltiplos parâmetros permite o encontro do marcador cujo nível de resolução é próximo do desejado, aumentando as chances de serem detectadas variações fenotípicas e genóticas (Sene, *et al.*, 1988; Reinert, *et al.*, 1997; Rocha, 2005).

Além disso, abordagens múltiplas geram maior base de dados, o que amplia as possibilidades de detectarem-se correlações entre dados fenéticos, fisiológicos, ecológicos, etc. Um exemplo recente de como a múltipla abordagem pode enriquecer a caracterização populacional de dípteros, foi realizado com *Anastrepha sorocula* (Tephritidae), uma praga da fruticultura brasileira (Rocha, 2005). Há exemplos também em entomologia médica, como é o caso de populações de *An. darlingi* na América do Sul, que foram caracterizadas por isozimas, RAPD, ITS2 e morfologia de ovos (Manguin, *et al.*, 1999). Pode-se ainda citar o complexo *An. quadrimaculatus*, cujos estudos envolveram caracteres morfológicos, cromossômicos, genéticos, bioquímicos e ecológicos (Reinert, *et al.*, 1997).

Existem inúmeros parâmetros que podem ser utilizados como marcadores em estudos de caracterização populacional, entre eles dados moleculares (DNAm, DNAr, *introns* de

genes nucleares, microssatélites, isozimas), dados cromossômicos diversos (número, rearranjos, localização de genes *in situ*) e dados morfológicos não-notáveis (morfometria tradicional ou geométrica de asas, ovos, etc.). Tais parâmetros devem ser empregados preferencialmente em conjunto quando utilizados em caracterizações populacionais de culicídeos, de forma a diversificar a base de dados e favorecer a correlação entre os parâmetros. Dentre eles, alguns são particularmente úteis em Diptera e serão detalhados a seguir: (1.3.1.) morfometria geométrica de asas, (1.3.2.) DNA ribossômico e (1.3.3.) cromossomos politênicos.

1.3.1 Morfometria geométrica de asas

Populações podem eventualmente apresentar variações morfológicas não-notáveis à observação direta, como variações na razão entre múltiplas dimensões de uma determinada estrutura corporal. Nesses casos, para detecção e quantificação de tais variações torna-se necessário recorrer a abordagens alternativas, como as análises morfométricas. A morfometria é a formalização matemática das dissimilaridades entre formas geométricas de objetos.

Um dos ramos da morfometria, a recentemente criada “morfometria geométrica”, é uma ferramenta de alto poder de resolução que permite a comparação de padrões corporais a partir de caracteres multivariados, ou seja, considerando-se simultaneamente várias características de uma estrutura corporal complexa (Rohlf, 1993; Monteiro e Reis, 1999). Na coleta de dados para a morfometria geométrica são usados “pontos anatômicos”, que são pontos de referência da estrutura corporal em estudo, em geral pontos extremos ou de justaposição de órgãos e tecidos. São tomadas então as suas coordenadas posicionais sobre um plano cartesiano imaginário que circunscreve a estrutura corporal, as quais são posteriormente ordenadas em tabelas de dados. A partir desses dados podem-se efetuar estudos estatísticos da variação morfométrica, comparar a magnitude das variações, entre outras abordagens (Bookstein, 1997; Rohlf, 1993; Monteiro e Reis, 1999).

Dentre os possíveis testes estatísticos, a análise das variáveis canônicas (VCs) fornece uma descrição das diferenças de forma entre grupos especificados *a priori* (populações p. ex.), utilizando um conjunto de dados multivariados. Nessa análise, há redução da dimensionalidade dos dados, que passam a ser expressos como variáveis latentes representadas em gráficos bidimensionais. As variáveis canônicas sumarizam de modo decrescente a magnitude das diferenças de forma entre os grupos em relação às existentes

dentro dos grupos, ou seja a VC1 apresenta maior resolução de discriminação amostral que a VC2, e assim por diante (Monteiro e Reis, 1999).

Outro teste possível é o do tamanho do centróide que permite detecção de dissimilaridade não-alométrica de tamanho de estruturas. O centróide é o ponto imaginário que representa o centro geométrico da asa e é determinado pela média dos valores posicionais no plano cartesiano de todos os pontos anatômicos de uma mesma asa. O tamanho do centróide é um vetor que sintetiza todos os valores posicionais considerados no cômputo do centróide. Formalmente, tamanho do centróide é a raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada ponto anatômico ao centróide. Na ausência de alometria, essa é a única medida de tamanho que não se correlaciona com as variáveis de forma. O tamanho do centróide, portanto varia com o tamanho da asa e é uma forma de sumarizar o tamanho dessa estrutura em uma única variável.

Em suma, as principais propriedades da morfometria geométrica são a possibilidade de análises multivariadas, com múltiplas variáveis simultaneamente e a possibilidade de recuperar informações de forma e tamanho independentemente. Conseqüentemente seu poder de resolução é alto e permite gerar diversos marcadores taxonômicos ou populacionais.

Em geral, em insetos as asas têm sido as principais estruturas-alvo de estudos morfométricos, pois se prestam adequadamente a isso devido à sua forma predominantemente bidimensional e o seu grande número de caracteres: os pontos determinados pelo encontro de nervuras alares. A morfometria geométrica permitiu, ao lado de outros marcadores, caracterizar populações da mosca-das-frutas *Anastrepha sororcula* a partir de caracteres das asas desses insetos (Rocha, 2005), as quais são indistinguíveis quando observadas diretamente. Entre os insetos de interesse médico, há o exemplo do hemíptero *Triatoma infestans*, que revelou possuir uma estruturação populacional complexa, de acordo com caracteres morfométricos alares (Schachter-Broide, *et al.*, 2004).

Para Culicidae, o uso das asas em estudos morfométricos é particularmente interessante, pois características das asas freqüentemente correlacionam-se com outras características biológicas dos mosquitos ligadas à sua importância médica, como capacidade de vôo, produção de sons alares de corte pré-cópula, e até fecundidade (Brogdon, 1994, 1998).

A morfometria geométrica alar, que até recentemente não havia sido utilizada como ferramenta taxonômica em Culicidae, foi pioneiramente empregada por um grupo de

pesquisadores da Tailândia, que publicaram dois estudos utilizando essa ferramenta, em que foi demonstrada variação temporal (Jirakanjanakit, *et al.*, 2008) e variação de forma e tamanho (Jirakanjanakit, *et al.*, 2007) em asas de *Aedes aegypti*. Esse tipo de ferramenta tem se mostrado útil tanto para o trabalho aqui apresentado quanto para o grupo Tailandês, e talvez possa se tornar uma tendência em culicidologia.

Culex quinquefasciatus, uma espécie de ampla distribuição geográfica e capaz de explorar distintos ambientes, também tem sido um bom modelo de aplicação de morfometria geométrica alar neste trabalho. Isso é evidenciado pelos resultados obtidos com o uso deste parâmetro em populações de *Cx. quinquefasciatus* do estado de São Paulo (ver Resultados).

O emprego da morfometria geométrica alar em Culicidae tem permitido diversas investigações, tais como: comparação entre populações geográficas e espécies crípticas, avaliação de dimorfismo sexual alar, estudo de variações temporais em cativeiro e na natureza, investigação de assimetria alar, pesquisa de efeitos morfológicos da presença/ausência de inseticidas, descoberta de caracteres diagnósticos de espécies, entre outros (Jirakanjanakit, *et al.*, 2007, 2008; Moratore e Suesdek, 2008). Algumas dessas abordagens foram feitas no presente trabalho (Resultados).

1.3.2 Estudos do DNA ribossômico

Estudos do DNA ribossômico (DNAr) constituem outra importante ferramenta de diagnóstico para espécies crípticas e populações divergentes, devido às peculiaridades desse complexo gênico (Hillis e Dixon, 1991; Roderick, 1996). As diferentes regiões do DNAr, como os genes ribossomais, os espaçadores internos (ITS) e os espaçadores intergênicos (IGS) dispõem-se intercaladas e apresentam-se em centenas de cópias no genoma. Essas regiões evoluem em diferentes velocidades e, devido a essa diversidade de taxas evolutivas, podem revelar relações filogenéticas em diversos níveis taxonômicos (espécies, famílias, filos) dependendo da região estudada (Hillis e Dixon, 1991).

Embora os genes ribossomais sejam altamente conservados, ou seja, evoluem lentamente em muitos *taxa*, os espaçadores internos ITS e os externos IGSs evoluem rapidamente e podem apresentar-se divergentes entre espécies ou populações. Apesar da alta velocidade de variação dos espaçadores ITS e IGS, as suas múltiplas cópias *in tandem* tendem a evoluir de forma semelhante dentro de uma mesma população, devido à ação de mecanismos conhecidos como “evolução em concerto” (Dover, 1982).

O efeito da evolução em concerto em homogeneizar as múltiplas cópias dos espaçadores de DNAr intrapopulacionalmente, associado com a tendência à rápida divergência de suas seqüências entre populações, conferem a esses espaçadores a propriedade de bons marcadores moleculares espécie-específicos ou população-específicos. Uma vez que a intensidade de fluxo gênico é diretamente proporcional à similaridade dos espaçadores entre as populações, o estudo populacional comparativo desses marcadores pode acusar ausência de fluxo gênico, um fato importante na identificação de processos de divergência populacional ou até de especiação.

Os espaçadores de DNAr podem ser caracterizados por análise de restrição por endonucleases. Quando polimorfismos do DNA ribossômico abrangem sítios reconhecidos por endonucleases de restrição, os fragmentos de restrição são polimórficos, e podem ser evidenciados por hibridação e “Southern-blot” com sondas de DNAr 45S, como demonstrado para populações da mosca-das-frutas *Anastrepha sororcula* (Rocha, 2005) e do complexo *An. gambiae s.l.* (McLain e Collins, 1989).

Além disso, análise de espaçadores de DNAr por seqüenciamento de DNA tem sido largamente usada em diversos estudos envolvendo culicídeos. Em anofelinos, os espaçadores mais utilizados para seqüenciamento são o ITS2, o qual tem se mostrado útil também na detecção de espécies crípticas (Rosa-Freitas, *et al.*, 1998; Marrelli, *et al.*, 1999; Collins e Paskewitz, 1996; Gentile, *et al.*, 2001; Marrelli, *et al.*, 2005; Malafronte, *et al.*, 2007) e o ITS1 (Bower, *et al.*, 2008, 2009).

Em vista da grande utilidade dos caracteres do DNAr em estudos populacionais de *Anopheles*, é primordial a extensão dessa abordagem também a outros gêneros com representantes de interesse médico no Brasil, como *Culex*, *Aedes*, etc. Algumas espécies que carecem deste tipo de estudo molecular estão presentes nos centros urbanos do Estado de São Paulo e estão sujeitas a grandes pressões seletivas que possivelmente interferem no curso de sua evolução, como poluição e inseticidas, como é o caso de *Cx. quinquefasciatus*. Essa espécie já foi submetida a alguns estudos de DNAr em outras regiões, como África e América do Norte (Severini, *et al.*, 1996), porém apenas recentemente populações do Estado de São Paulo têm sido incluídas em estudos semelhantes empregando seqüenciamento do ITS2 (Marrelli, 2006) (comunicação pessoal)¹.

¹ Dr. Mauro Toledo Marrelli, departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, 2006.

1.3.3 Análise de Cromossomos Politênicos

Cromossomos politênicos são tradicionais objetos de estudos em Diptera, principalmente em anofelinos. Tais cromossomos podem ser encontrados em glândulas salivares e túbulos de Malpighi, sendo que a obtenção de boas preparações de politênicos em alguns *Culex* e *Aedes* não é tão simples como em *Anopheles* ou nas tradicionais espécies de moscas do gênero *Drosophila*.

Nos cromossomos são analisadas as bandas e as interbandas, que são faixas transversais conspícuas compostas pela justaposição de cromômeros e são distribuídas em padrões de arranjo numérico e posicional específicos para cada cromossomo (McAbee *et al.*, 2007). Padrões de bandamento dos politênicos quando polimórficos entre populações podem correlacionar-se com diversos fatores bióticos e abióticos, como latitude, longitude, altitude, clima. Populações podem apresentar-se distintas quanto a polimorfismos de inversões cromossômicas em curtos espaços de tempo, como estações climáticas do ano (Dia, *et al.*, 2000), e em distâncias geográficas pequenas e até simpátricas, como ocorre em *Anopheles gambiae s.s.* em Mali na África (Touré, *et al.*, 1994; Della-Torre, *et al.*, 2002; Slotman, *et al.*, 2006).

Caracteres dos cromossomos politênicos podem também acusar resistências a inseticidas e condições ambientais adversas. Algumas inversões cromossômicas em *Anopheles* englobam genes que conferem resistência aos inseticidas Dieldrin² (organoclorado) e DDT (Brooke, *et al.*, 2002) e contribuem para a manutenção de seus alelos em heterozigose, principalmente quando há vantagens adaptativas do heterozigoto. Outro exemplo é o de alguns genes de resistência a inseticidas que se apresentam sob a forma de “pufes” de DNA amplificado em que seu transcrito é superexpresso, como no caso das esterases que conferem resistência a organofosforados em *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens* (Nance, *et al.*, 1990; Tomita, *et al.*, 1996).

Embora seja uma técnica tradicional no estudo de insetos, para algumas espécies como *Culex quinquefasciatus*, são raros os estudos de cromossomos politênicos devido à grande dificuldade de obtenção. Alguns poucos exemplos de preparações foram realizadas por Achary (1994), Zambetaki, *et al.* (1998) e Campos *et al.* (2003a, 2003b).

² inseticida da classe dos organoclorados.

1.4 A espécie *Culex quinquefasciatus*

A espécie *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823 pertence à Subfamília Culicinae, Família Culicidae, Ordem Diptera, Classe Insecta, Filo Arthropoda. Esse mosquito é uma das espécies integrantes do Complexo *pipiens* e ocorre nas regiões tropicais e subtropicais sendo considerado como culicídeo cosmotropical (Consoli e Oliveira, 1994; Forattini, 2002). Tem hábitos sinantrópicos, pode reproduzir-se em criadouros artificiais e as fêmeas são hematófagas antropofílicas, e eventualmente ornitofílicas. Seus adultos e larvas podem desenvolver-se tanto próximo ao homem em ambientes rurais como em ambientes poluídos dos centros urbanos (Forattini, 2002). Outra característica marcante de *Cx. quinquefasciatus* é a sua capacidade de desenvolver resistência a inseticidas (Forattini, 2002; Nayar, *et al.*, 2003; Yebakima, *et al.*, 2004).

Segundo Merritt, *et al.* (1992), as larvas de *Cx. quinquefasciatus* possuem o modo de alimentação do tipo coletor-filtrador (*collecting-filtering*). Essa via de alimentação apresenta um mecanismo de filtração bem desenvolvido, com adaptações principalmente nos músculos da faringe, tendo, após a ingestão, um seletivo e pequeno conteúdo no estômago, mesmo com o meio externo sobrecarregado de substâncias alimentares (Clements, 1999). Essa característica permite a sobrevivência da espécie em meios aquáticos poluídos. Tudo isso adicionado ao fato de que a alimentação dos imaturos de *Cx. quinquefasciatus* se faz na coluna d'água, próxima à superfície do meio líquido, o que facilita a permanência destes em ambiente anóxico.

Dentre as várias espécies de Culicidae de interesse médico no Brasil que requerem estudos de caracterização populacional mais aprofundados, pode-se destacar *Cx. quinquefasciatus*. Essa espécie é a principal vetora de filariose bancroftiana na região Neotropical, causada por nematóides dos gêneros *Wuchereria* e *Brugia*, e pode transmitir arbovírus entre animais e humanos, como o vírus do Nilo Ocidental (WNV), o agente etiológico de uma severa encefalite.

Em estudo recente foram encontrados indivíduos infectados com o WNV na Califórnia (EUA) indicando que essa espécie ainda tem competência vetora (Reisen, *et al.*, 2008). No Estado da Flórida (EUA) foi realizado um estudo monitorando a presença dos vírus WNV e SLEV (Saint Louis Virus) em mosquitos e sua subsequente transmissão pelos mosquitos. Naquele estudo, o WNV foi detectado em *Cx. nigripalpus*, porém o SLEV não (Vitek, *et al.*, 2008).

Cx. nigripalpus é uma espécie que merece atenção, pois aqui no Brasil também está associado ao *Cx. quinquefasciatus*, ocupando muitas vezes o mesmo nicho ecológico e compartilhando diversas características usadas para identificação taxonômica. Em Vidal, *et al.* (2008), manuscrito submetido à Zootaxa³ fizemos um estudo comparativo de caracteres alares de *Cx. nigripalpus* e *Cx. quinquefasciatus* possibilitando a definição de novos marcadores diagnósticos para essas espécies, evitando que ambas sejam confundidas. Existe uma preocupação de que *Cx. quinquefasciatus* possa vir a transmitir o vírus WNV entre aves e humanos aqui no Brasil, já que este país tem recebido aves migrantes de regiões com presença de WNV e que são potencialmente hospedeiras desse vírus (Luna, *et al.*, 2003; Pauvolid-Corrêa e Varella, 2008).

A ocorrência de *Cx. quinquefasciatus* nas regiões biogeográficas é geralmente ampla, descontínua e correlata à ocupação humana além de suas populações sofrerem variações demográficas sazonais (Hayes, 1975; Lopes, 1997; Gakhar e Vandana, 1996; Guimarães, *et al.*, 2000; Forattini, 2002; Ahumada, *et al.*, 2004). No Estado de São Paulo, assim como em outras regiões biogeográficas, suas populações podem ser encontradas em grande parte dos municípios vivendo sob diversas condições ambientais. Tais características distribucionais são típicas de espécies que apresentam variação interpopulacional, o que evidencia a necessidade de estudos direcionados a esse táxon.

Devido a essas propriedades biológicas, *Cx. quinquefasciatus* tem sido estudada em diversas partes do mundo quanto à resistência a inseticidas, estrutura genética populacional, e diferenciação populacional (Nayar, *et al.*, 2003; Corbel, *et al.*, 2004; Yebakima, *et al.*, 2004; Daaboub, *et al.*, 2008; Swain, *et al.*, 2009). No entanto, apesar deste cenário, na América do Sul os estudos populacionais envolvendo *Cx. quinquefasciatus* ainda são escassos. Há um estudo em andamento com essa espécie, cujas populações estão sendo caracterizadas quanto à variabilidade do ITS2 (Marrelli, 2006) (comunicação pessoal)⁴. Neste laboratório, um dos estudos em andamento analisa populações de *Cx. quinquefasciatus* quanto a caracteres alares e de ovos (Moratore, 2009) (em fase de elaboração)⁵.

³ Vidal PO, Peruzin MCJ, Suesdek L. New diagnostic characters for mosquitoes of medical interest: *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae). Manuscrito submetido à Zootaxa, 2008.

⁴ Dr. Mauro Toledo Marrelli, departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, 2006.

⁵ Camila Moratore, Mestranda no Depto. de Parasitologia do Instituto Butantan, 2009.

1.5 A situação de *Cx. quinquefasciatus* em dois municípios do estado de São Paulo

No município de São Paulo, a espécie é muito abundante e responsável por grande incômodo ao homem. Nesta cidade há populações do mosquito em área urbana próxima ao rio Pinheiros (Zona Oeste da cidade) que estão sujeitas à poluição intensa e a aplicações periódicas de larvicidas (temefós – até junho de 2003 -, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis*) e adulticidas (lambdacialotrina – até dezembro de 2002 – e cipermetrina) feitas pelo Centro de Controle de Zoonoses da prefeitura (Bracco, *et al.*, 1997; Hibi, 2006 (comunicação pessoal)⁶; Parodi, 2008 (comunicação pessoal)⁷). Ainda no Estado de São Paulo, há populações no município de Pariquera-Açu (Vale do Ribeira, Sul do Estado, a 150 km da capital) vivendo em ambiente semi-rural (transicional entre rural-urbano) e em condições de ausência de inseticidas (Forattini, *et al.*, 1987).

Na região do Vale do Ribeira, onde se situa o município de Pariquera-Açu, as características climáticas, topográficas e de cobertura vegetal da região possibilitam a existência e sobrevivência de uma densa e variada população de Culicidae nas áreas habitadas pelo homem. (Forattini, *et al.*, 1978). Nas áreas com elevada alteração de origem antrópica, *Cx. quinquefasciatus*, encontra-se entre as espécies mais frequentes, próximo a habitações humanas (Forattini, *et al.*, 1987). O Vale do Ribeira registrou a ocorrência de surtos de encefalite a partir dos primeiros meses de 1975 até 1978. Segundo Forattini, *et al.* (1978) admitindo-se a hipótese de que esse surto tenha sido causado por uma arbovirose, deve ser considerada a responsabilidade vetora de mosquitos Culicidae.

Já no município de São Paulo, o rio Pinheiros constitui um criadouro fértil de *Culex quinquefasciatus* e representa um enorme desafio ao CCZ da prefeitura local (Natal, *et al.*, 2004). Segundo o Boletim Técnico da Secretaria do Meio Ambiente, do Estado de São Paulo (SMA, 2002), as águas do rio Pinheiros possuem níveis elevados de temperatura e sais minerais, como resultado da decomposição da matéria orgânica e industrial constantemente despejada no seu leito. Como consequência, os dados de qualidade da água do rio apontam ausência de oxigênio dissolvido, o que as caracterizam como sendo anóxicas. A estagnação das águas do rio Pinheiros o torna ainda mais poluído e seu leito mais raso, permitindo a rápida proliferação de mosquitos adaptados a esse tipo de ambiente, como *Cx. quinquefasciatus*.

⁶ Sumire Hibi, Centro de Controle de Zoonoses, São Paulo, 2006.

⁷ Eunice Santos M. Parodi, Centro de Controle de Zoonoses, São Paulo, 2008.

Durante décadas, o leito e as margens do rio Pinheiros passaram por uma série de aplicações de produtos químicos para o controle da população de mosquitos. A partir da década de 40, foram aplicados inicialmente produtos da classe dos organoclorados e a seguir os organofosforados e piretróides (Bracco, *et al.*, 1997). Atualmente, o controle desse mosquito tem sido feito com base em inseticidas químicos e biológicos. Segundo informações coletadas no CCZ (Parodi, 2008, comunicação pessoal)⁸, no ano de 2002 usava-se o larvicida organofosforado temefós até meados de 2003, quando se iniciou a aplicação de *Bacillus sphaericus* granulado para controle de larvas, utilizado até hoje. No período de novembro 2005 a março 2006 foi feita a rotação com *Bacillus thuringiensis* para evitar resistência. Os inseticidas usados no Rio Pinheiros de 2002 a 2008 incluem os piretróides lambdacialotrina, até dezembro de 2002, e cipermetrina.

Segundo dados do Relatório de qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo (CETESB, 2007), os índices de qualidade dos principais rios metropolitanos em 2007 mostraram-se comprometidos pelos lançamentos de esgotos sanitários acima de sua capacidade de suporte. No entanto, a avaliação temporal dos últimos dez anos da DBO⁹ indicou sua diminuição em trechos do Rio Pinheiros, devido a ações de controle de carga poluidora executadas em conjunto pela CETESB, SABESP e prefeitura de São Paulo.

Não se sabe a magnitude da diferenciação genético-morfológica ou se há fluxo gênico entre as populações de Pinheiros e Pariquera-Açu. Também não se sabe se a população de Pinheiros, submetida à grande stress ambiental sofreu modificações morfológicas durante o tempo e nem se essas populações possuem variações morfológicas intrapopulacionais. O que foi desenvolvido no presente trabalho é um estudo de caracterização populacional de *Cx. quinquefasciatus* nesses dois municípios do Estado de São Paulo.

⁸ Eunice Santos M. Parodi, Centro de Controle de Zoonoses, São Paulo, 2008.

⁹ Demanda Bioquímica de Oxigênio

2 OBJETIVO

Comparação de populações de *Cx. quinquefasciatus* visando responder as seguintes perguntas:

1. Existe diferenciação genético-morfológica entre a população urbana sujeita à alta poluição e a aplicações de inseticidas (Pinheiros) e a população de ambiente semi-rural menos poluído e livre de inseticidas (Pariquera-Açu)?
2. Existe variação intrapopulacional nessas populações?
3. Existe variação morfológica temporal entre duas populações de Pinheiros coletadas no mesmo local, porém com diferença de três anos (entre 2004 e 2007)?

Parâmetros biológicos para comparação populacional de *Cx. quinquefasciatus*:

- Morfometria geométrica das asas.
- DNA ribossômico – variabilidade de sítios de restrição.
- Cromossomos politênicos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e armazenamento dos exemplares

Exemplares de *Cx. quinquefasciatus* foram coletados em dois locais : I- no município de São Paulo, em uma área urbana na região do Rio Pinheiros, próximo à Usina Elevatória de Traição (23° 35' S, 46° 41' W) e II- no município de Pariquera-Açu (24° 30' S, 47° 50' W), em uma área semi-rural (Fig. 1 e 2). Os dados de coleta estão listados na tabela 1. Algumas amostras já haviam sido coletadas antes do início deste projeto (ver A6T1 na tabela 1). O esforço de coleta foi realizado pelas equipes da Dr^a. Iná Kakitani, do Dr. Delsio Natal e da Dr^a. Maria Anice Mureb Sallum, professores da Faculdade de Saúde Pública da USP, e pela bióloga Sumire Hibi, do Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo.



Figura 1 - Mapa do estado de São Paulo, com as cidades de Pariquera-Açu e São Paulo destacadas em vermelho. Localização do estado no país indicada no canto inferior esquerdo da figura. Modificado de: <http://www.igc.sp.gov.br/>



Figura 2 - Imagens dos locais de coleta. Acima, imagens de Pariquera-Açu: à esquerda foto aérea da cidade (Fonte: <http://www.pariquera.com.br>) e à direita imagem capturada de uma vala onde são lançados esgotos domésticos, local típico de reprodução de *Culex quinquefasciatus* (Fonte: http://www.cprm.gov.br/gestao/ppga_valedoribeira). Abaixo, imagens do Rio Pinheiros: à esquerda foto aérea do Canal Pinheiros (Fonte: <http://www.emae.sp.gov.br/canais.htm>) e à direita imagem com mais detalhes da margem do rio, próximo à estação Hebraica-Rebouças (Fonte: <http://www.estacoesferroviarias.com.br/>).

Tabela 1 - Siglas e dados de coleta das amostras populacionais de *Cx. quinquefasciatus* e seu respectivo uso. MG = Morfometria geométrica, CP = Cromossomos politênicos, DNAr = DNA ribossômico. * = machos ou fêmeas

Sigla	Registro de coleta	Data coleta	Procedência	N ^o de espécimes		Uso
				♂	♀	
PIN04	A6T1	MARÇO/2004	RIO PINHEIROS	35	35	MG
PIN07	A23T1-T3	MAIO/2007		100	100	MG/ CP/ DNA r
PIN08	A38T1	MARÇO/2008		15*		CP
	A45T1	AGOSTO/2008		40*		DNA r
PARI	A33T1-T3	DEZ/2007		150*		MG
	A34T1-T2		40*		CP	
	A22T1-T3	ABRIL/2007	150	150	CP/ DNA r	
	A36T1	FEV/2008	3	13	MG	
	A40T3	ABRIL/2008	0	30		

As larvas (Fig. 3) foram coletadas diretamente nas coleções hídricas, trazidas vivas em recipientes com água e mantidas a 20 °C com fotoperíodo natural, até transformarem-se em larvas de 4^o ínstar e/ou pupas. Para análise cromossômica, foram utilizadas essas larvas e pupas, frescas ou conservadas em líquido fixador Carnoy (3 partes de etanol absoluto / 1 parte de ácido acético).

Mosquitos adultos machos e fêmeas (Fig. 4) foram capturados com aspiradores entomológicos. Parte desse material foi armazenado em nitrogênio líquido (-190 °C) e outra parte foi conservada em ambiente seco com naftalina. Esses adultos conservados foram usados respectivamente para as análises do DNA ribossômico e para morfometria geométrica alar.

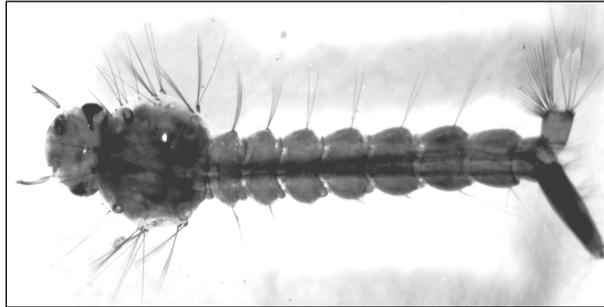


Figura 3 - *Culex quinquefasciatus* em estágio larval 4.



Figura 4 - *Culex quinquefasciatus* fêmea adulta.

3.2 Análise morfométrica de asas

Os métodos de morfometria geométrica seguiram em linhas gerais os empregados por Rocha (2005). As asas direita e esquerda de machos e fêmeas foram montadas com resina sintética Entellan entre lâmina-lamínula para análise morfométrica. Imagens dessas asas foram capturadas através de câmera fotográfica digital Leica 320 acoplada a um microscópio estereoscópico Leica S6. Foram analisados ao menos 64 indivíduos (32 machos e 32 fêmeas) de cada população, PIN04, PIN07 e PARI (Tab. 1), sendo metade fêmeas e metade machos, com exceção da amostra PIN07, que apresentou menos de 32 fêmeas. Para este grupo específico foram utilizados 26 exemplares de fêmeas.

Sobre essas imagens, e com o auxílio do “software” TpsDig v. 2 (Rohlf, 2005), foram tomadas as coordenadas posicionais de cada um dos 18 pontos anatômicos sobre um plano cartesiano (Fig. 5). Sobre esse dados foram computados os tamanhos de centróide e as variáveis canônicas e as distâncias de Mahalanobis, com o auxílio dos programas de computador TpsUtil 1.26 (Rohlf, 2004), TpsRelw 1.36 (Rohlf, 2003a), TpsRegr 1.28 (Rohlf, 2003b) e Statistica 7.0 (StatSoft, 2004).

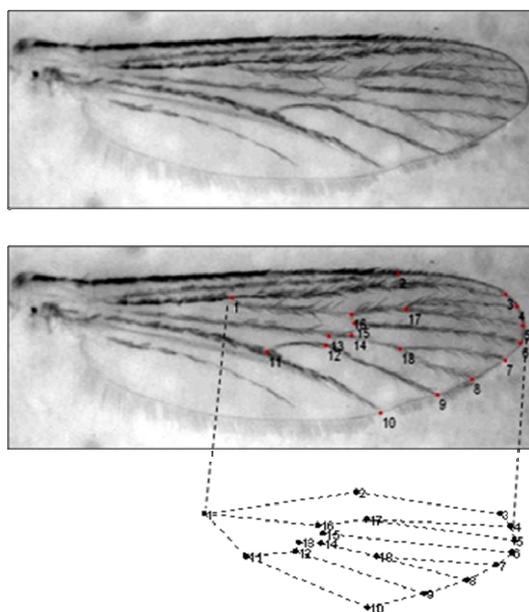


Figura 5 - Acima, foto da asa de um exemplar de *Culex quinquefasciatus*. No meio, asa digitalizada com 18 pontos de encontro das nervuras marcados em vermelho e numerados. Abaixo, conformação alar obtida com a ligação dos pontos.

3.2.1 Tamanhos de Centróide

Os tamanhos de centróides e a construção dos gráficos descritores dos centróides foram obtidos com o auxílio dos programas de computador TpsRelw 1.36 (Rohlf, 2004) e Statistica 7.0 (StatSoft, 2004), e utilizados nas comparações intra e interpopulacionais das amostras. Com o auxílio do programa de computador Graph Pad InsStat, análises estatísticas bicaudais ao nível de rejeição 0,05 foram utilizadas nas comparações baseadas nos tamanhos dos centróides.

Para testar a normalidade das distribuições amostrais foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov e, para as amostras de distribuição normal e variâncias não homogêneas, utilizou-se o Teste T paramétrico com correção de Welch, que é o adequado para esse tipo de distribuição. Para comparações múltiplas de tamanhos de centróide foi utilizada a análise de variância ANOVA e teste post-hoc de Tukey-Kramer.

3.2.2 Variáveis Canônicas

As variáveis canônicas foram obtidas com o auxílio dos programas tpsRelw 1.36 e Statistica 7.0 e empregadas em comparações intra e interpopulacionais. Tabelas de “relative warps” (Rohlf, 2003a), que são valores posicionais dos pontos anatômicos, foram geradas no programa tpsRelw para cada comparação e utilizadas no programa Statistica para a análise canônica. Dentre as variáveis canônicas geradas em cada comparação, apenas a primeira e segunda (VC1 e VC2) foram consideradas para interpretação, já que essas são, por definição, as mais informativas (Monteiro e Reis, 1999).

Diagramas de deformação alar em grades foram construídos com a regressão dos componentes de forma sobre os valores da variável canônica da respectiva comparação pareada, com o auxílio do programa tpsRegr (Rohlf, 2003). Agregados a esses diagramas de grades, para representar a distribuição dos indivíduos em função da variável canônica, foram feitos gráficos de dispersão de pontos ou histogramas. Estes gráficos ou histogramas ilustram as características biológicas avaliadas: assimetria alar bilateral, dimorfismo sexual e diferenciação populacional.

3.2.2.1 Teste de diferença temporal-geográfica

Como as amostras PARI e PIN07 utilizadas para análises morfométricas foram coletadas em estações climáticas e em anos diferentes (ver Tab. 1), foi realizado um teste probatório considerando as variáveis de forma alar, para poder legitimar a análise do resultado dessa comparação. O objetivo do teste foi verificar se a variável “tempo” é mais importante do que a geográfica para diferenciar essas populacionais.

O teste comparativo foi feito em três etapas. Primeiramente foi realizada uma comparação entre amostras populacionais de Pinheiros (A23T2) e de Pariquera-Açu (A40T3), coletadas em maio de 2007 e abril de 2008, respectivamente. Em seguida, à amostra A23T2 foram adicionadas cinco asas de espécimes provenientes de Pinheiros com data de coleta em agosto de 2008 (A45T1). Esse conjunto amostral foi identificado como A23T2+A45T1, e foi comparado com a amostra A40T3. A última etapa desse teste foi incluir os espécimes de A45T1 dentro da amostra de Pariquera-Açu (A40T3), grupo nomeado A40T3+A45T1, e comparar esse grupo com A23T2. Foi inserido propositamente indivíduos de Pinheiros no conjunto amostral de Pariquera para verificar se os dois grupos a serem comparados se aproximavam um do outro, indicando assim a maior afinidade entre os espécimes de Pinheiros, mesmo de épocas diferentes. Essa última comparação teve portanto, o objetivo de verificar a importância da diferenciação geográfica em contraposição à diferenciação temporal, já que as amostras de Pinheiros (A23T2 e A45T1) tinham entre si 15 meses de diferença e a amostra de Pariquera-Açu (A40T3) tinha diferença de 11 meses para A23T2 e 4 meses pra A45T1. Para cada comparação foi construído um histograma múltiplo e a distância de Mahalanobis foi calculada.

3.2.3 Distâncias de Mahalanobis

Foram efetuadas comparações entre as amostras mediante o cálculo das distâncias de Mahalanobis seguindo o método de Ligação Completa, através do programa Statistica 7.0, conforme empregado por Nascimento (2005) e Rocha (2005). Distâncias de Mahalanobis entre as amostras populacionais foram organizadas em tabelas e por sua vez convertidas em fenogramas de ligação simples expressos em distâncias Euclidianas. Essa forma de análise é em geral adequada para comparações múltiplas, pois embora seja uma distância linear, semelhante à distância Euclideana, é medida entre pontos num espaço multidimensional.

3.3 Análise do DNA ribossômico

3.3.1 Extração de DNA genômico

Adultos e larvas das amostras populacionais A23T1 (Rio Pinheiros) e A22T2 (Pariquera-Açu) foram utilizados para extração de DNA genômico e análises de DNA ribossômico. A extração de DNA foi feita isoladamente para cada indivíduo, segundo o método de Jowett (1986), com modificações, como descrito a seguir.

Os indivíduos conservados em nitrogênio líquido foram macerados em solução de homogeneização [Tris-HCl 10 mM (pH= 7,5), NaCl 60 mM, EDTA 50 mM]. Aos homogeneizados foi adicionada a solução de lise [SDS 1,25%, Tris-HCl 0,3 M (pH = 9,0), EDTA 0,1 M, sacarose 5%, proteinase K a 100 µg/ml]. A mistura foi incubada a 65 °C por 1 hora para “lise” das células e clivagem das proteínas em peptídeos menores pela proteinase K.

Prosseguiu-se com uma incubação a 4 °C por 45 min. e logo após uma centrifugação a 12.000 g a 4 °C. Após a centrifugação formaram-se duas fases na mistura. O precipitado, que contém peptídeos, foi descartado e o sobrenadante contendo ácidos nucleicos e sais foi transferido para outro microtubo e misturado com o dobro de seu volume (2 volumes) de etanol 100% para a precipitação do DNA. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g à temperatura ambiente, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 ml de etanol 70%, e assim as amostras foram submetidas a uma última centrifugação à temperatura ambiente e 12.000 g por 5 minutos.

O precipitado foi seco e ressuspendido em 20 µl de H₂O milli-Q (Millipore) para cada amostra, que foram então armazenadas a -20 °C. Para eliminar o RNA, as amostras de DNA recém-extraído foram tratadas com RNAase (Ribonuclease A, Sigma) a uma concentração final 100 µg/ml por 1 hora a 37 °C.

3.3.2 Eletroforese de DNA

Eletroforeses de DNA foram realizadas para conferir a eficiência das extrações de DNA e após a digestão com endonuclease de restrição. Foram utilizadas cubas horizontais com solução TAE 1X como tampão de corrida, que foi de aproximadamente 30 minutos sob tensão elétrica de 60 V e corrente de 60 mA constantes, conforme recomendado por (Sambrook, *et al.*, 1989). A cada amostra de DNA aplicada em gel, foi adicionado como tampão de amostra uma solução contendo 0,015% azul de bromofenol, 0,015% de xilenocianol e 30% de glicerol a uma concentração final de 20%. Os géis foram corados com SyBr safe (Life Technologies) a concentração 1X e foram fotografados em fotodocumentador digital UVP sob irradiação Ultravioleta de 300 nm.

3.3.3 Obtenção e marcação da sonda heteroespecífica

O fragmento de DNAr “*Dm238*” foi usado como sonda na etapa de hibridação após “Southern-blot” em membrana, assim como utilizado em Rocha (2005). Este fragmento representa uma unidade repetitiva completa do DNAr 45S de *D. melanogaster*, a qual apresenta a seguinte seqüência de genes e espaçadores no sentido 5’-3’: 18S - ITS1 - 5.8S - ITS2 - 2S - ITS3 - 28S – NTS.

A unidade *Dm238* tem sua seqüência de bases descrita no banco mundial de dados genéticos GenBank (www.ncbi.nih.gov), sob o código de acesso M21017 e está clonada sob a forma do plasmídeo *pDm238* inserido em células de *Escherichia coli* DH5 α , conforme descrito por Tautz, *et al.* (1988). Estoques de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo *pDm238* utilizadas neste trabalho estão armazenados em 50% de glicerol à temperatura de –80 °C.

Culturas de *E. coli* DH5 α contendo *pDm238* foram estabelecidas a partir de amostras de 10 μ l da suspensão-estoque e inoculadas em frascos contendo 3 ml de meio de cultura LB sob seleção de antibiótico ampicilina (10 μ g/ml), que foram incubados a 37 °C por 15 horas sob agitação constante, segundo procedimento-padrão de clonagem (Sambrook, *et al.*, 1989).

Após a incubação, os plasmídeos *pDm238* foram extraídos das células DH5 α com o “kit de miniprep” Concert Plasmid Preparation (Invitrogen, USA). O plasmídeo *pDm238* foi submetido à clivagem com a endonuclease *EcoRI*, o que permitiu a liberação do inserto *Dm238*, de tamanho aproximado de 12 kb. A mistura de reação de restrição contendo inserto e

plasmídeo separados foi submetida à eletroforese em gel de agarose para recuperação do inserto, que foi eluído de gel através do “kit” Concert Gel Extraction (Invitrogen, USA).

A sonda para hibridações foi marcada com biotina através da utilização de “primers” randômicos (“kit Bioprime DNA labelling system” - Life Technologies). Para obtenção de cada amostra de 2,0 µg de sonda biotinilada, cerca de 50 ng de inserto *Dm238* foram utilizados e ao final a sonda foi armazenada em solução aquosa à temperatura de -20 °C.

3.3.4 Clivagem com endonuclease, Southern-blot e hibridação

Nos experimentos de “Southern blot” amostras de DNA de *Cx. quinquefasciatus* (A23T1 e A22T2) foram utilizados como DNA-alvo. DNA genômico destas espécies foi clivado com *EcoRI*, *AluI*, *HindIII* e *RsaI* separadamente e foi submetido à eletroforese. Após a eletroforese, o DNA do gel foi desnaturado através da imersão do gel em solução NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 N, logo após foi neutralizado em solução Tris HCl 1M (pH 7,4), NaCl 1,5 M e por fim foi transferido para uma membrana de “nylon” (Pall) conforme a metodologia “Southern blot” de transferência capilar em condições neutras (Sambrook, *et al.*, 1989). A fixação do DNA à membrana foi feita por aquecimento no forno microondas durante 1 a 2 minutos.

Os procedimentos de pré-hibridação, hibridação e detecção foram feitos, com algumas modificações, conforme recomendado pelo fabricante do sistema de detecção de sinal de hibridação em membranas por reação de fosfatase alcalina seguida de detecção por colorimetria kit K0661 (Fermentas).

Os passos que incluíam hibridações, incubações e lavagens da membrana foram realizados em garrafas de hibridação “Schott”. A pré-hibridação foi feita por 2 horas a 42 °C e para cada cm² de membrana foram usados 0,1 ml de solução de pré-hibridação, composta de formamida a 50%, SSPE 6X, solução de “Denhardt” 5X, 1% SDS, DNA de esperma de salmão a 20 µg/ml desnaturado por aquecimento em banho Maria a 70 °C.

A hibridação foi feita de 10 a 18h, a 42 °C, e foram utilizados 100 ng de sonda *Dm238* para cada 1 ml de solução de hibridação. A sonda foi desnaturada na própria solução de hibridação por aquecimento em banho Maria a 68 °C. Para cada cm² de membrana foram utilizados 0,1 ml de solução de hibridação, cuja formulação é: dextrana-sulfato a 10%, formamida a 50%, SSPE 6X, solução de “Denhardt” 5X, 1% SDS, DNA de esperma de salmão a 20 µg/ml.

As temperaturas e concentrações das soluções utilizadas nas lavagens pós-hibridação foram realizadas em condições de alta estringência, recomendadas para hibridações DNA-DNA em que é prevista similaridade alta entre as seqüências da sonda e do DNA alvo (Sambrook, *et al.*, 1989). Em cada lavagem, para cada cm² de membrana foram usados 1,5 ml de solução de lavagem, conforme descrito a seguir: 1^a e 2^a lavagens, SSC 2X e SDS 0,1% (temp. ambiente por 10 min.); 3^a e 4^a lavagens, SSC 0,1X e SDS 0,1% (65 °C por 20 min.). Alguns testes foram feitos em menor estringência nas 3^a e 4^a lavagens tendo sido SSC 0,5X e SDS 0,1% (65 °C por 20 min.).

3.4 Análise cromossômica

Pupas jovens com tórax transparentes e larvas de 4^o instar foram dissecadas em solução Ringer, quando frescas, e seus túbulos de Malpighi foram removidos. Preparações de cromossomos politênicos de túbulos de Malpighi de *Cx. quinquefasciatus* foram obtidas com base no método de Campos, *et al.* (2003a), com modificações como descrito a seguir. Túbulos de Malpighi foram transferidos para lamínula siliconizada e macerados com gota de água destilada e logo após corado com aceto-orceína a 2% por 2-5 min. As células do túbulo de Malpighi foram dissociadas em mistura de ácido láctico a 85% e ácido acético a 100% (proporção 1:1) por 10 minutos. Então ao final, foi realizado esmagamento entre lâmina-lamínula.

Alternativamente, pupas e larvas de 4^o instar armazenadas em fixador Carnoy a 4 °C por até 6 meses foram utilizadas para obtenção de cromossomos politênicos. O mesmo método descrito acima foi utilizado também nesse caso, porém substituindo-se Ringer por H₂O destilada.

As preparações de cromossomos foram analisadas sob fotomicroscópio de luz Nikon acoplado a uma câmera digital Leica 320. Foram realizadas e analisadas aproximadamente 80 preparações.

4 RESULTADOS

4.1 Morfometria Geométrica Alar

4.1.1 Tamanho

Os tamanhos de centróide de cada espécime encontram-se listados na tabela 2. Resultados de testes estatísticos estão nas tabelas 3 e 4. Descrições estatísticas da distribuição dos tamanhos de centróides como valores médios, desvios-padrão e valores extremos encontram-se nas figuras 6 e 7 e na tabela 5.

4.1.1.1 Comparações Intrapopulacionais de Tamanho

Existe dimorfismo sexual significativo de tamanho alar. As asas de fêmeas são maiores que as asas de machos nas três populações e essa diferença de tamanho é significativa segundo análise de variância ANOVA e teste post-hoc de Tukey-Kramer ($p < 0,001$) (Tab. 3 e Fig. 6). O valor médio do tamanho de centróide para machos variou de 2,48 mm em Pariquera-Açu a 2,81 mm em Pinheiros 2007. Para fêmeas a média variou de 2,85 mm em Pariquera-Açu a 3,54 mm em Pinheiros 2007 (Tab. 5).

Os estudos de assimetria bilateral de tamanho alar, através da análise do tamanho de centróide, mostraram não haver diferença significativa entre asas direitas e esquerdas de machos e fêmeas das três populações amostradas. (Fig. 7 e Tab. 4).

4.1.1.2 Comparações Interpopulacionais de Tamanho

As comparações interpopulacionais de tamanho revelou que a população PIN07 possui maior tamanho médio alar que as outras duas populações, tanto entre as fêmeas como entre os machos (Fig. 6). Os maiores valores registrados para tamanho de centróide em um espécime foi em PIN07, sendo de 3,83 mm em uma fêmeas e de 3,06 mm em um macho. A amostra PARI possui o menor tamanho alar, com valores médios de 2,85 mm para as fêmeas e 2,51 mm para os machos, asas direitas (Tab. 5). A amostra PIN04 possui tamanho médio alar intermediário entre PIN07 e PARI. Nota-se com essa comparação que a população da região de Pinheiros registrou um aumento de tamanho dos espécimes em um intervalo de três anos (Fig. 6). Diferença de tamanho é significativa ($p < 0,01$) em quaisquer comparações interpopulacionais dois a dois, separadas por sexo (Tab. 3).

Tabela 2 - Tamanhos de centróide de cada espécime em milímetros. Todas as populações com machos, fêmeas, asas direitas e asas esquerdas amostradas separadamente.

PIN04 FD	PIN04 FE	PIN04 MD	PIN04 ME	PIN07 FD	PIN07 FE	PIN07 MD	PIN07 ME	PARI FD	PARI FE	PARI MD	PARI ME
3,01	3,00	2,38	2,42	3,30	3,28	2,56	2,50	2,46	2,50	2,15	2,16
3,06	3,07	2,50	2,48	3,38	3,30	2,62	2,58	2,49	2,51	2,31	2,18
3,17	3,11	2,51	2,51	3,40	3,38	2,62	2,59	2,69	2,72	2,34	2,28
3,18	3,16	2,53	2,53	3,43	3,40	2,63	2,62	2,72	2,73	2,37	2,29
3,20	3,18	2,53	2,54	3,43	3,40	2,67	2,64	2,72	2,73	2,39	2,29
3,20	3,20	2,55	2,57	3,43	3,42	2,68	2,64	2,72	2,73	2,39	2,30
3,20	3,20	2,55	2,57	3,45	3,42	2,69	2,67	2,73	2,73	2,41	2,36
3,20	3,21	2,56	2,58	3,47	3,45	2,72	2,68	2,76	2,74	2,41	2,37
3,21	3,23	2,57	2,58	3,50	3,45	2,74	2,71	2,79	2,77	2,44	2,37
3,21	3,24	2,57	2,58	3,51	3,45	2,74	2,71	2,79	2,80	2,45	2,37
3,21	3,24	2,58	2,59	3,52	3,48	2,75	2,71	2,80	2,81	2,45	2,37
3,23	3,25	2,58	2,59	3,53	3,49	2,76	2,73	2,81	2,81	2,45	2,39
3,23	3,26	2,58	2,59	3,53	3,52	2,77	2,75	2,82	2,81	2,47	2,40
3,24	3,27	2,59	2,59	3,56	3,53	2,77	2,75	2,82	2,82	2,47	2,43
3,25	3,27	2,59	2,59	3,57	3,54	2,77	2,77	2,83	2,82	2,48	2,44
3,25	3,27	2,60	2,60	3,57	3,54	2,79	2,77	2,83	2,82	2,49	2,45
3,25	3,28	2,60	2,60	3,57	3,54	2,80	2,77	2,84	2,82	2,50	2,46
3,26	3,28	2,61	2,61	3,57	3,56	2,80	2,77	2,85	2,82	2,50	2,47
3,26	3,28	2,61	2,62	3,58	3,56	2,82	2,77	2,85	2,83	2,52	2,47
3,26	3,29	2,61	2,62	3,59	3,56	2,82	2,79	2,86	2,84	2,53	2,48
3,27	3,30	2,62	2,62	3,62	3,56	2,83	2,80	2,86	2,86	2,54	2,49
3,28	3,31	2,62	2,63	3,65	3,59	2,83	2,81	2,87	2,86	2,55	2,50
3,29	3,34	2,63	2,63	3,66	3,63	2,85	2,82	2,87	2,86	2,57	2,50
3,29	3,34	2,63	2,64	3,70	3,66	2,85	2,82	2,89	2,88	2,59	2,52
3,30	3,35	2,63	2,64	3,77	3,71	2,86	2,82	2,90	2,88	2,59	2,54
3,30	3,37	2,64	2,65	3,83	3,79	2,87	2,83	2,90	2,89	2,59	2,54
3,31	3,37	2,64	2,66			2,87	2,83	2,90	2,90	2,60	2,56
3,33	3,38	2,65	2,66			2,87	2,84	2,91	2,90	2,61	2,57
3,33	3,40	2,65	2,66			2,87	2,85	2,95	2,91	2,61	2,57
3,35	3,42	2,66	2,66			2,88	2,87	2,96	2,94	2,63	2,60
3,36	3,42	2,67	2,67			2,89	2,87	2,96	2,94	2,63	2,60
3,37	3,44	2,69	2,67			2,92	2,87	2,97	2,95	2,69	2,60
3,38	3,46	2,72	2,68			2,93	2,87	2,98	2,96	2,73	2,60
3,39	3,46	2,75	2,69			2,93	2,89	2,98	2,96	2,78	2,63
3,41	3,47	2,75	2,72			2,94	2,90	3,01	2,98		2,65
3,41		2,78	2,72			2,94	2,90	3,01	2,99		2,75
3,42			2,75			2,99	2,91	3,01	2,99		2,76
3,42			2,76			3,00	2,91	3,03	3,00		2,79
3,45			2,80				2,92		3,02		
3,64							2,93		3,03		
							2,94				
							2,95				
							2,99				
							3,00				
							3,03				
							3,06				

Tabela 3 - Resultados da aplicação de Teste de comparações múltiplas post-hoc de Tukey-Kramer, para tamanhos de centróide, após análise de variância ANOVA (Fig. 6). Somente asas direitas nessa análise. Quando $p < 0,05$, a variação entre as médias populacionais é significativa. Valor de p: *** = extremamente significativo, ** = muito significativo.

Comparações de tamanho alar: dimorfismo sexual			Valor de p	
PIN04 FD	x	PIN04 MD	***	P<0,001
PIN07 FD	x	PIN07 MD	***	P<0,001
PARI FD	x	PARI MD	***	P<0,001

Comparações de tamanho alar: interpopulacional			Valor de p	
PIN04 FD	x	PIN07 FD	***	P<0,001
PIN04 FD	x	PARI FD	***	P<0,001
PIN04 MD	x	PIN07 MD	***	P<0,001
PIN04 MD	x	PARI MD	**	P<0,01
PIN07 FD	x	PARI FD	***	P<0,001
PIN07 MD	x	PARI MD	***	P<0,001

Tabela 4 - Resultados da aplicação de Teste de comparações múltiplas post-hoc de Tukey-Kramer, para tamanhos de centróide, após análise de variância ANOVA (Fig. 7). Comparação entre asas direita e esquerda. Acima, comparações entre asas de fêmeas. Abaixo, comparações entre asas de machos. Quando $p > 0,05$, a variação entre as médias populacionais não é significativa.

Assimetria bilateral de tamanho alar

Comparações de tamanho alar			Valor de p	
Asas de Fêmeas				
PIN04 FD	x	PIN04 FE	ns	$P > 0,05$
PIN07 FD	x	PIN07 FE	ns	$p > 0,05$
PARI FD	x	PARI FE	ns	$p > 0,05$
Asas de Machos				
PIN04 MD	x	PIN04 ME	ns	$p > 0,05$
PIN07 MD	x	PIN07 ME	ns	$p > 0,05$
PARI MD	x	PARI ME	ns	$p > 0,05$

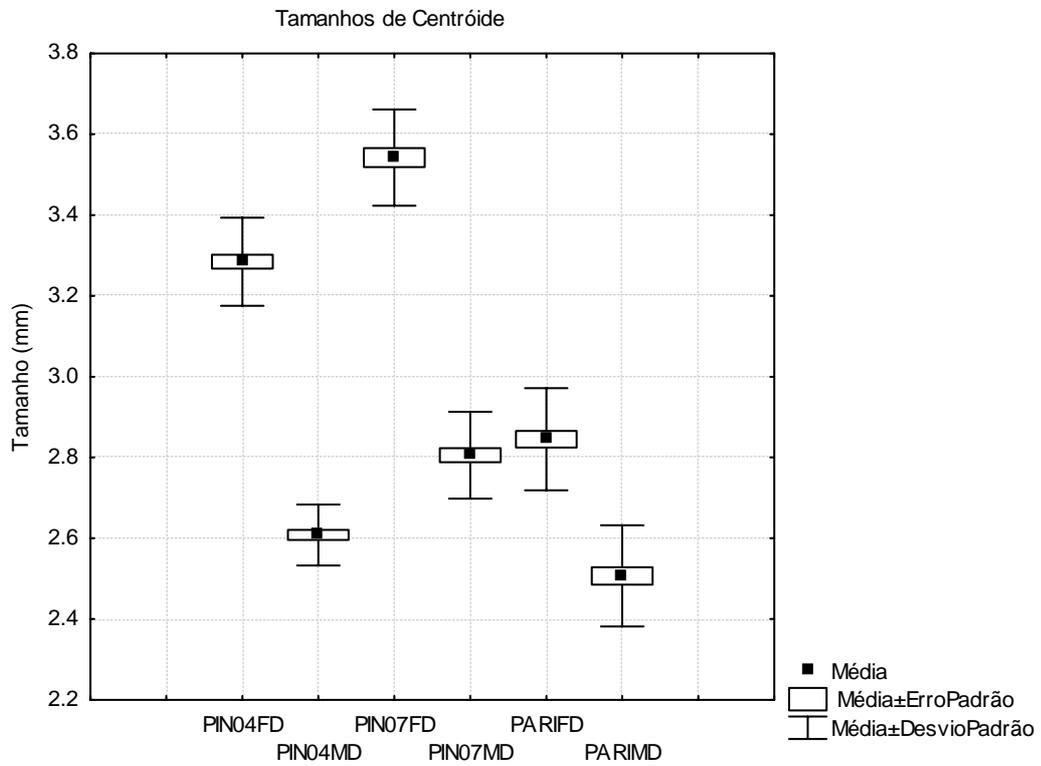


Figura 6 - Tamanhos de centróide das três populações com machos e fêmeas indicados separadamente. Somente asas direitas. FD= fêmeas asas direitas, MD= machos asas direitas. Análise de variância ANOVA: $p < 0,0001$, extremamente significativo. Teste post-hoc de Tukey-kramer: $p < 0,01$, diferença significativa para os pares de comparações com significado biológico (ver tabela 3).

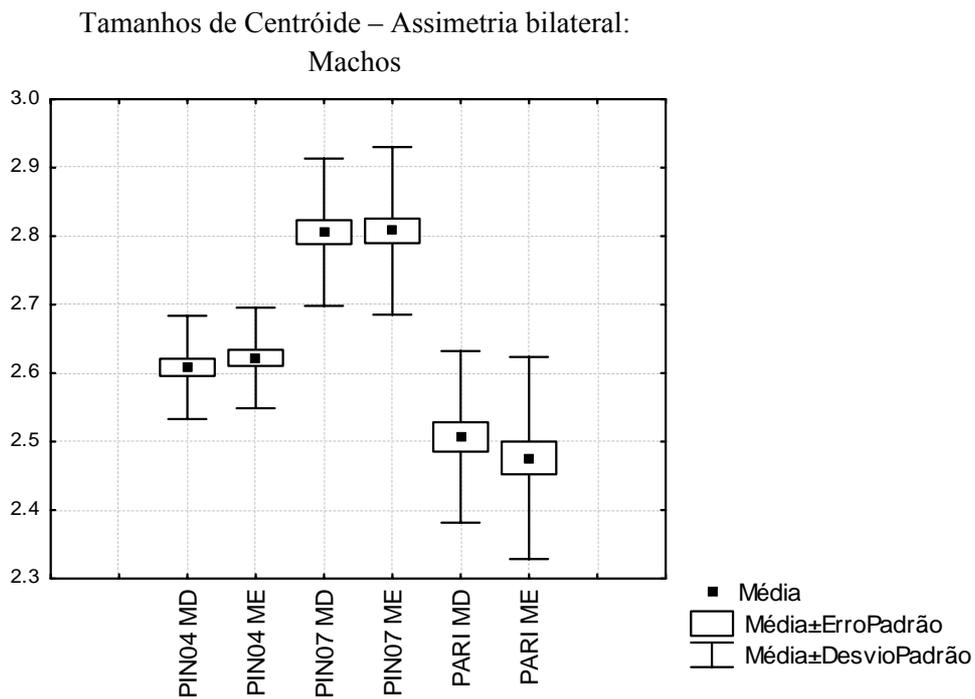
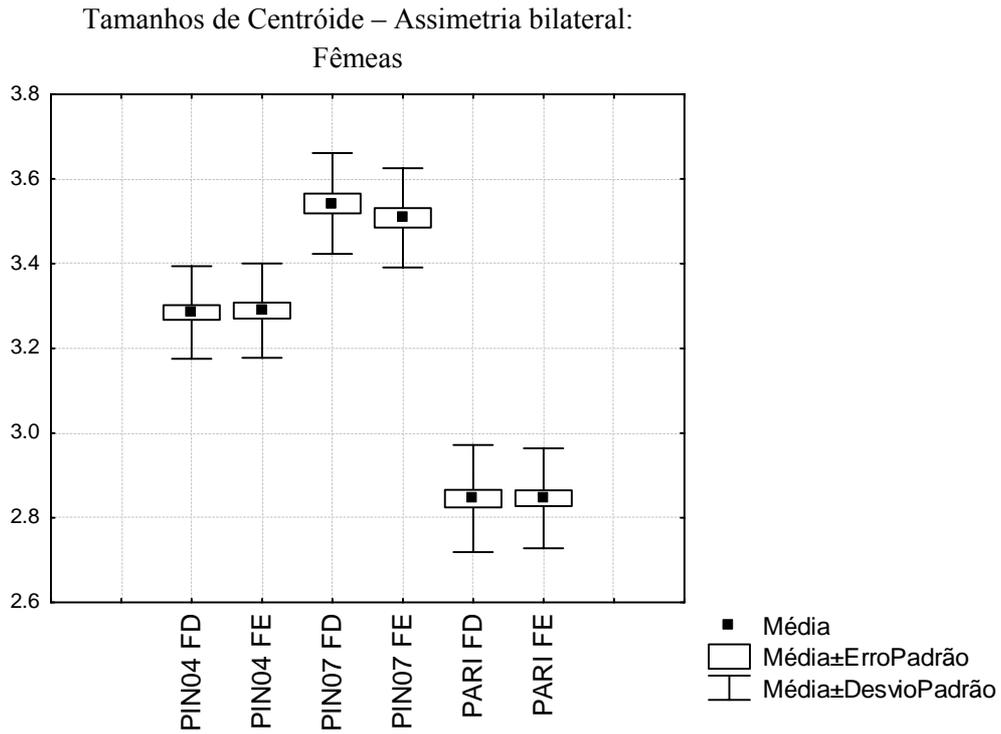


Figura 7 - Assimetria bilateral de tamanho alar das três populações. Acima, representadas as asas de fêmeas. Abaixo, as asas de machos. FD= fêmeas asas direitas, FE= fêmeas asas esquerdas, MD= machos asas direitas, ME= machos asas esquerdas. Teste post-hoc de Tukey-kramer: $p > 0,05$, diferença não significativa para os pares de comparações com significado biológico (ver tabela 3).

Tabela 5 - Estatística descritiva com valores de média, mínimo, máximo e desvio padrão para tamanhos de centróide de cada conjunto amostral indicado.

Amostra	N	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão
PIN04 FD	40,00	3,28	3,01	3,64	0,11
PIN04 FE	35,00	3,29	3,00	3,47	0,11
PIN04 MD	36,00	2,61	2,38	2,78	0,08
PIN04 ME	39,00	2,62	2,42	2,80	0,07
PIN07 FD	26,00	3,54	3,30	3,83	0,12
PIN07 FE	26,00	3,51	3,28	3,79	0,12
PIN07 MD	38,00	2,81	2,56	3,00	0,11
PIN07 ME	46,00	2,81	2,50	3,06	0,12
PARI FD	38,00	2,85	2,46	3,03	0,13
PARI FE	40,00	2,85	2,50	3,03	0,12
PARI MD	34,00	2,51	2,15	2,78	0,13
PARI ME	38,00	2,48	2,16	2,79	0,15

4.1.2 Forma Alar

As comparações multivariadas de forma nas três populações geraram variáveis canônicas com as quais foram construídos histogramas e diagramas de deformações alares para comparações pareadas (Fig. 8-24); gráficos de dispersão e dendrogramas de distância para comparações entre três ou mais amostras populacionais (Fig. 25-27). Resultados dos testes de reclassificação referentes às figuras 25 e 26 estão na tabela 6. As comparações de forma foram subdivididas em intrapopulacionais e interpopulacionais.

4.1.2.1 Comparações Intrapopulacionais de Forma

As comparações intrapopulacionais encontram-se representadas nos gráficos das figuras 8-19. Análises de assimetria bilateral e dimorfismo sexual revelaram algumas dissimilaridades descritas a seguir.

A análise da assimetria bilateral de forma alar revelou baixa assimetria para machos e fêmeas em todas as populações analisadas: PIN04, PIN07 e PARI (histogramas das figuras 8-13). As dissimilaridades de forma entre asas esquerdas e direitas para cada população estão representadas nos diagramas de grades associados aos respectivos histogramas.

O alto dimorfismo sexual encontrado nas três populações está representado nos histogramas e nos diagramas de grades das figuras 14-19. Não houve sobreposição amostral de histogramas de machos e fêmeas. Através da análise de regressão foram detectadas dissimilaridades inconfundíveis entre as asas de machos e fêmeas nas três populações. Nos diagramas de grades, observamos nas três populações que a distância entre os pontos 16-17 é menor nas fêmeas que nos machos, tanto em asas direitas (Fig. 14, 16 e 18), como em asas esquerdas (Fig. 15, 17 e 19).

4.1.2.2 Comparações Interpopulacionais de Forma

As comparações interpopulacionais estão demonstradas nas figuras 20-27. As análises revelaram significantes diferenças populacionais.

A comparação de forma alar entre PIN04 x PIN07, amostras coletadas no mesmo local com diferença de três anos, revelou alta dissimilaridade. Essa diferença populacional é mais acentuada nas fêmeas que nos machos. O histograma múltiplo de comparação entre os machos revela algum grau de sobreposição entre PIN04 e PIN07 enquanto que nas fêmeas não há sobreposição. O diagrama de grades revela as principais diferenças na forma alar, sendo as asas de Pinheiros 2007 mais longilíneas que as de Pinheiros 2004 tanto para fêmeas como para os machos (Fig. 20 e 21). Na tabela 7 estão apresentados os “relative warps” (Rohlf, 2003a), que são dados intermediários na análise de forma, criados a partir da comparação entre PIN04-FD e PIN07-FD e que foram utilizados para gerar a variável canônica que discrimina essas duas populações.

A análise da variável canônica extraída da comparação entre PIN07 e PARI revela alta dissimilaridade entre essas formas alares. Não há sobreposição no histograma comparativo de fêmeas (Fig. 22) e há pequena sobreposição no histograma de machos (Fig. 23). A principal diferença populacional observada nos diagramas de grades é o formato mais alongado das asas de PIN07 tanto de fêmeas como de machos (Fig. 22 e 23).

A comparação das três amostras revelada em gráfico bidimensional de dispersão, e realizada separadamente para machos e fêmeas, mostra presença de dissimilaridades. Embora haja grande área de sobreposição é possível visualizar a tendência de deformação alar nos diagramas de deformação nos diagramas de grades (Fig. 25 e 26). A asa da amostra populacional PIN07, nas duas comparações (entre machos e entre fêmeas), possui formato mais alongado que as asas das outras duas amostras. Testes de reclassificação resultaram em no mínimo 80% de certeza nesta comparação (Tab. 6).

O grau de proximidade entre uma população e outra se dá diferentemente quando são considerados machos ou fêmeas (Fig. 27). A população PIN07 é mais próxima de PIN04 somente para as fêmeas. Já os machos de PIN07 situam-se mais próximos dos machos de PARI. A figura 27 mostra que o dimorfismo sexual é tão alto comparado com as diferenças populacionais que a distância de Mahalanobis foi maior entre machos e fêmeas da mesma população do que entre cada amostra populacional. Nessa análise nota-se também assimetria bilateral mais pronunciada em amostras provenientes do Rio Pinheiros (PIN04 e PIN07).

4.1.2.2.1 Teste de diferença temporal – geográfica

A figura 24 mostra os histogramas resultantes dos testes comparativos entre Pinheiros e Pariquera e as Distâncias de Mahalanobis para cada comparação. Tanto a comparação A23T2 x A40T3 como a A23T2+A45T1 x A40T3 resultaram em distribuições amostrais sem nenhuma sobreposição entre as curvas dos histogramas múltiplos, indicando total separação entre o conjunto amostral de Pinheiros e de Pariquera, sendo as distâncias de Mahalanobis igual a 33,04 e 30,98, respectivamente. Já na comparação A23T2 x A40T3+A45T1, na qual inserimos amostras provenientes de Pinheiros no conjunto amostral de Pariquera, as curvas dos dois histogramas de distribuição ficam ligeiramente sobrepostas, indicando maior proximidade entre esses dois conjuntos amostrais, o que pode ser confirmado pelo valor da Distância de Mahalanobis (16,74 nesta última comparação), conforme visto na figura 24. Esse resultado indica a maior importância da variação geográfica sobre a variação temporal das amostras populacionais de *Cx. quinquefasciatus*.

4.1.3 Repetibilidade das medidas utilizadas na coleta de dados para análise morfométrica

Acrescentamos aqui uma análise de repetibilidade das medidas da coleta de dados para análise morfométrica alar. Foram realizadas seis repetições de marcação de pontos anatômicos, a única parte dessa análise que envolve interferência manual.

Para isso, uma única asa foi escolhida e foram marcados dois pontos anatômicos em cada repetição. Os pontos escolhidos foram o 2 e o 5 (ver Fig. 5), sendo o primeiro de mais dificuldade de marcação correta devido às volumosas cerdas ao redor dele. A análise de repetibilidade foi feita no programa Statistica 7.0.

Resultado do teste de repetibilidade:

A análise de repetibilidade resultou em mais de 90% de confiança nas medidas realizadas, que de acordo com ASQC/AIAG (1991) p. 127, indica que o desempenho do sistema de medidas aqui utilizado é aceitável.

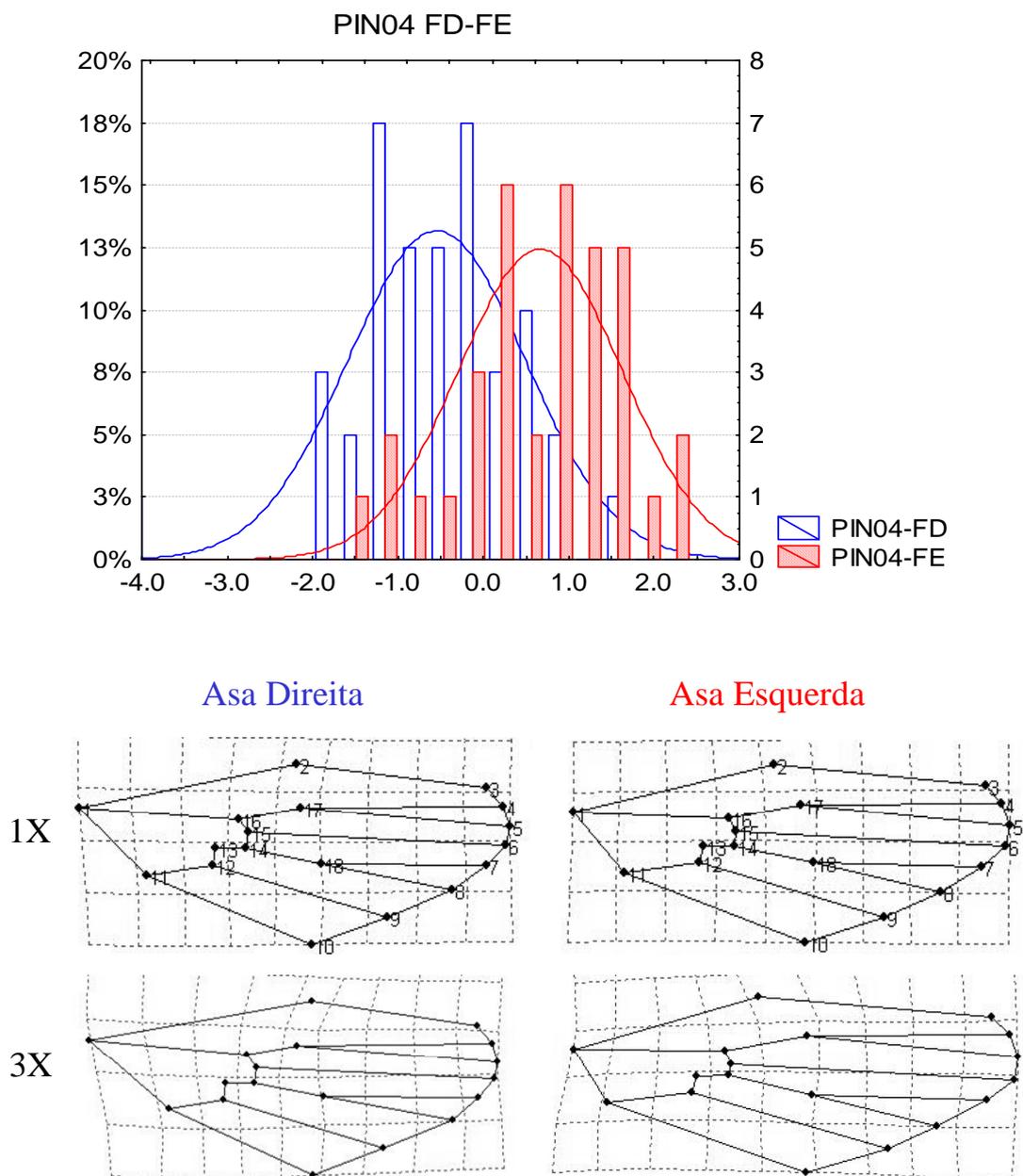


Figura 8 - Análise de assimetria bilateral alar nas fêmeas da população de Pinheiros 2004: comparação entre asas esquerdas e direitas. Acima, histograma múltiplo apresenta sobreposição entre os dois conjuntos amostrais evidenciando pequena assimetria bilateral. A distribuição amostral corresponde à esperada curva normal. Eixo X: variável canônica extraída da comparação entre as múltiplas variáveis de cada conjunto amostral. Eixo Y: À direita, número de amostras e à esquerda, seu respectivo percentual. Abaixo, diagramas de grades obtidos a partir da regressão dos componentes de forma sobre os “scores” canônicos. Conformações alares representando as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica (eixo X). 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes para melhor distinção visual.

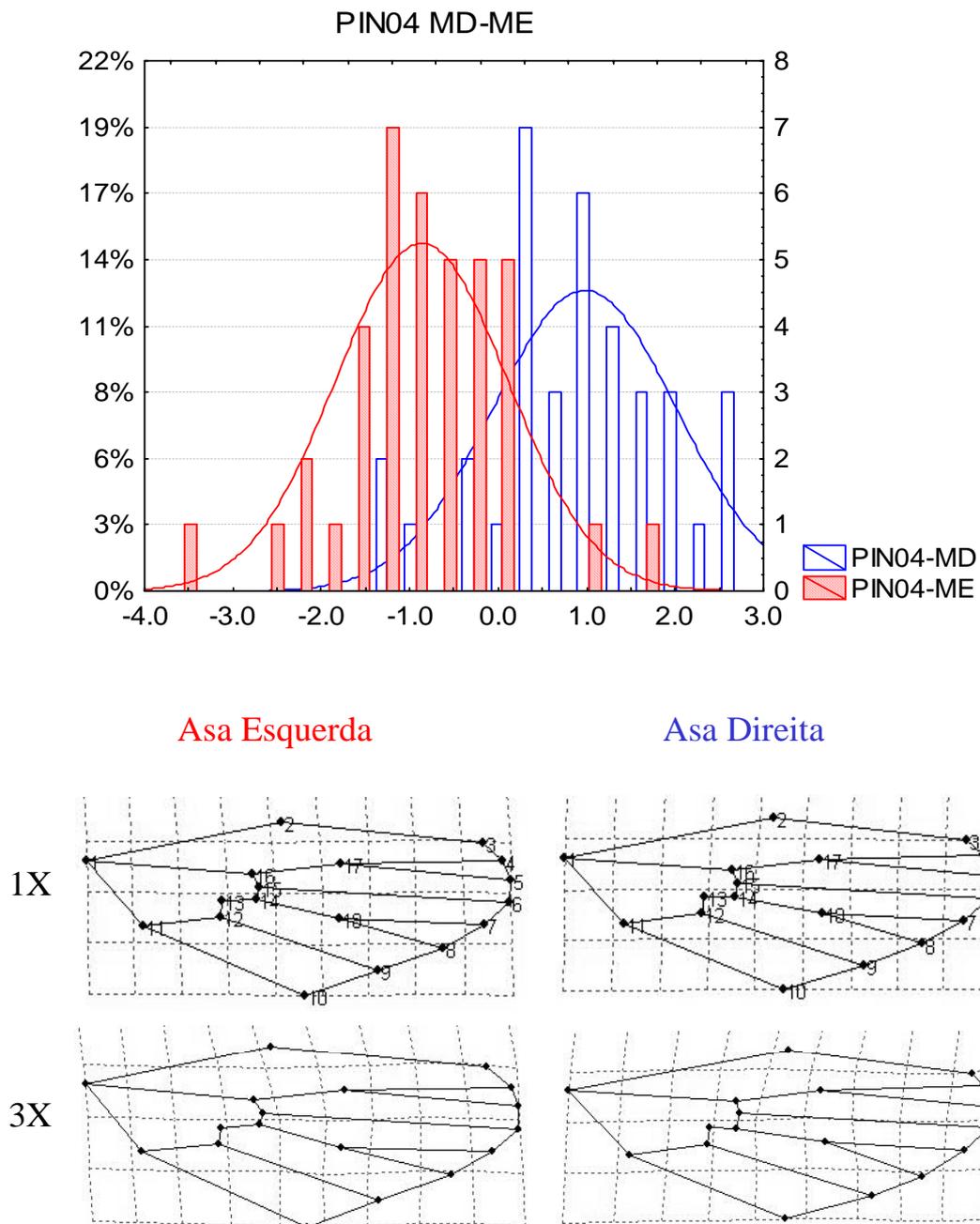


Figura 9 - Análise de assimetria bilateral alar nos machos da população de Pinheiros 2004. Acima, histograma múltiplo apresenta sobreposição e evidencia pequena assimetria. Eixo X = variável canônica. Eixo Y = número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares que representam as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.

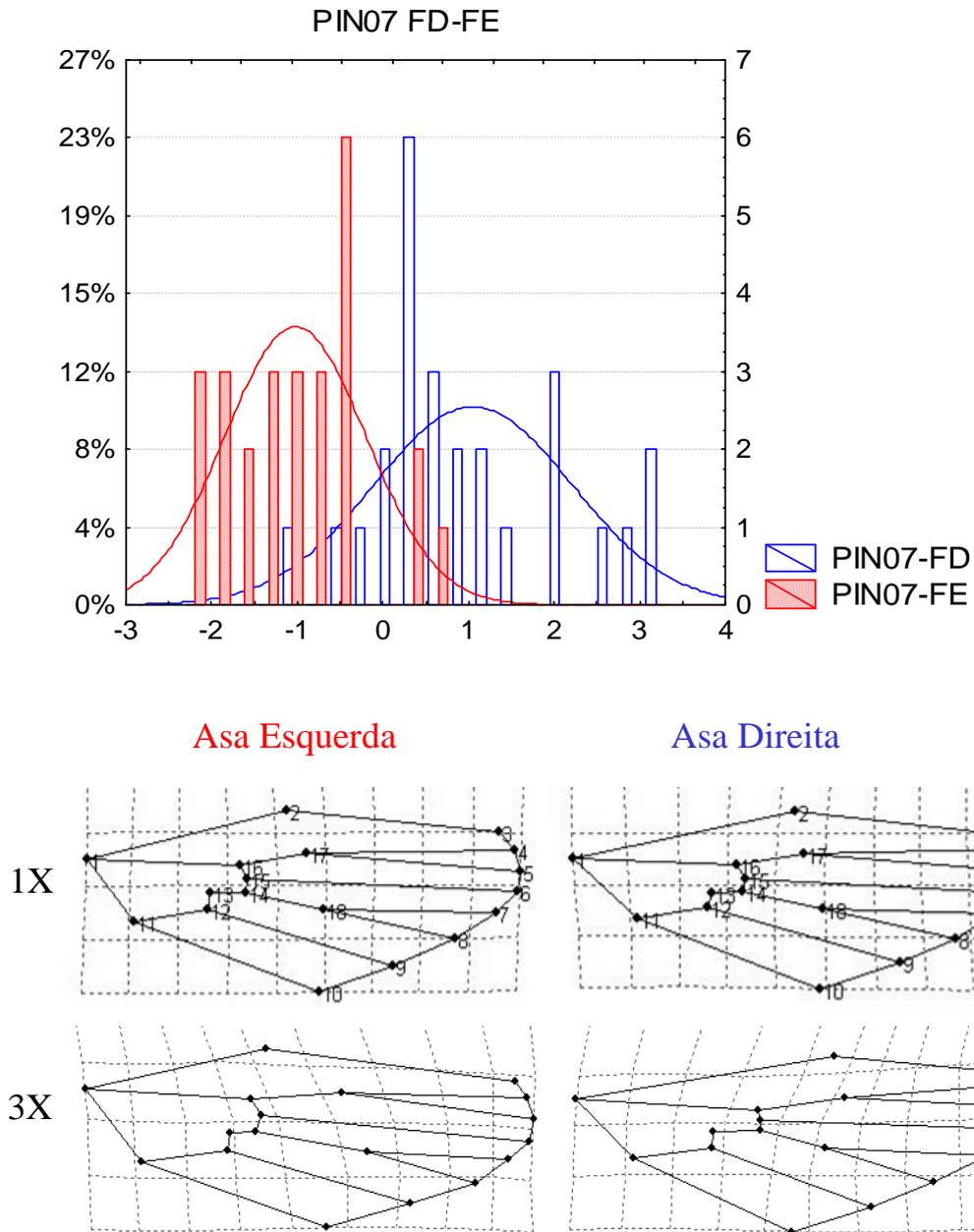
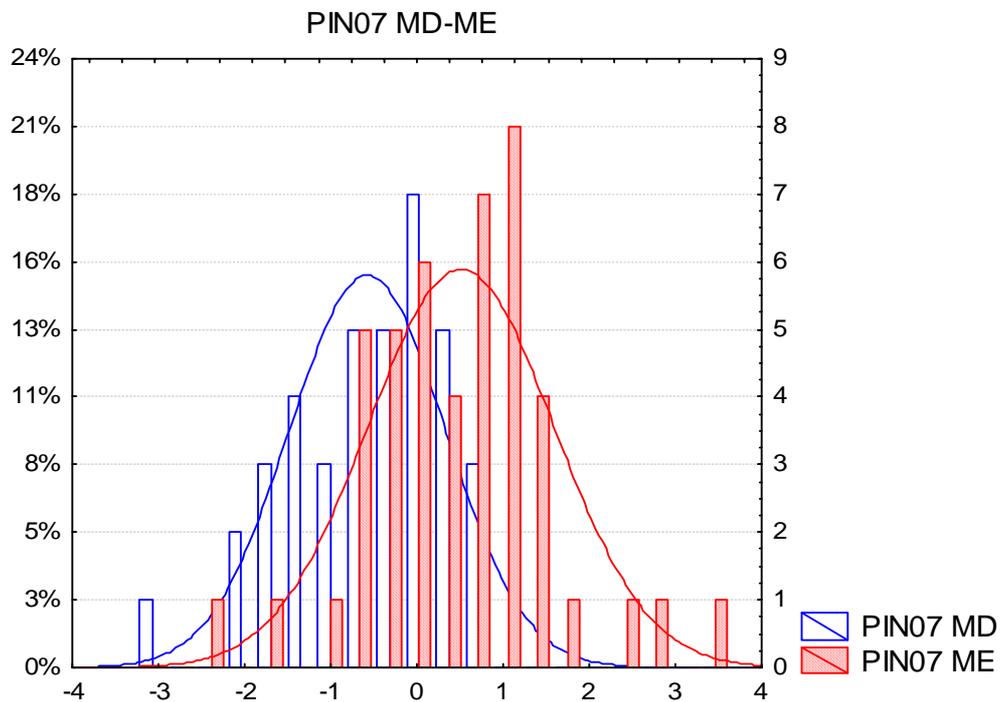


Figura 10 - Análise de assimetria bilateral alar nas fêmeas da população de Pinheiros 2007. Acima, histograma múltiplo evidencia pequena assimetria bilateral. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares que representam as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.



Asa Direita

Asa Esquerda

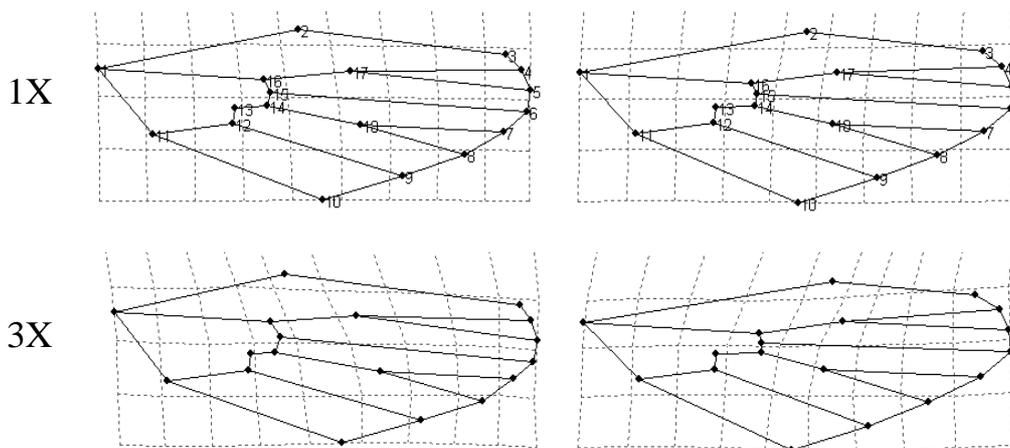
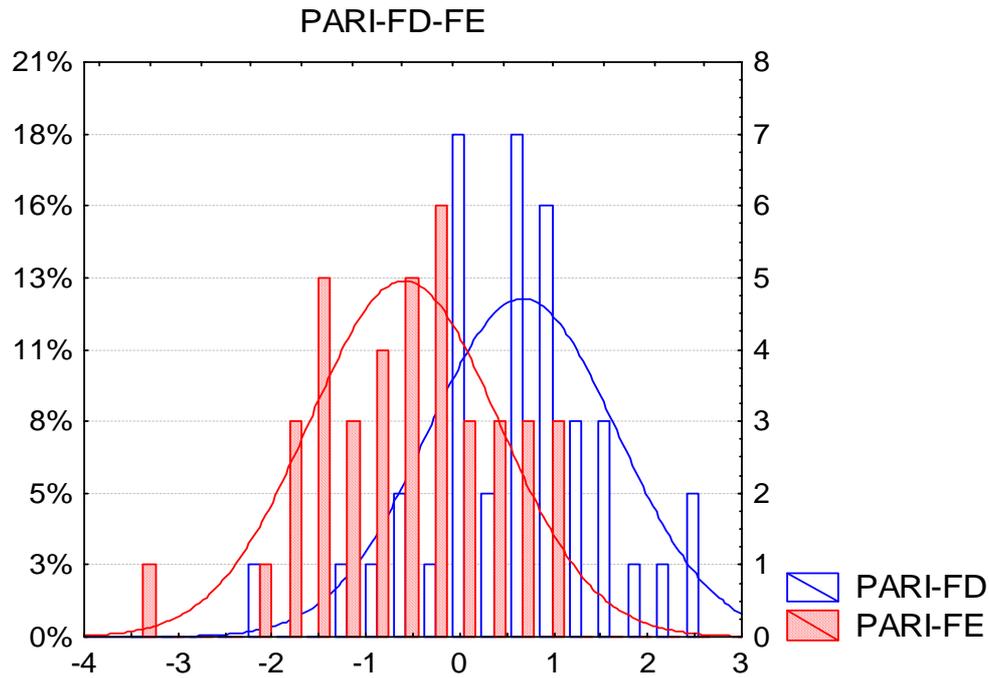


Figura 11 - Análise de assimetria bilateral alar nos machos da população de Pinheiros 2007. Acima, histograma múltiplo evidencia pequena assimetria bilateral. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares que representam as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.



Asa Esquerda

Asa Direita

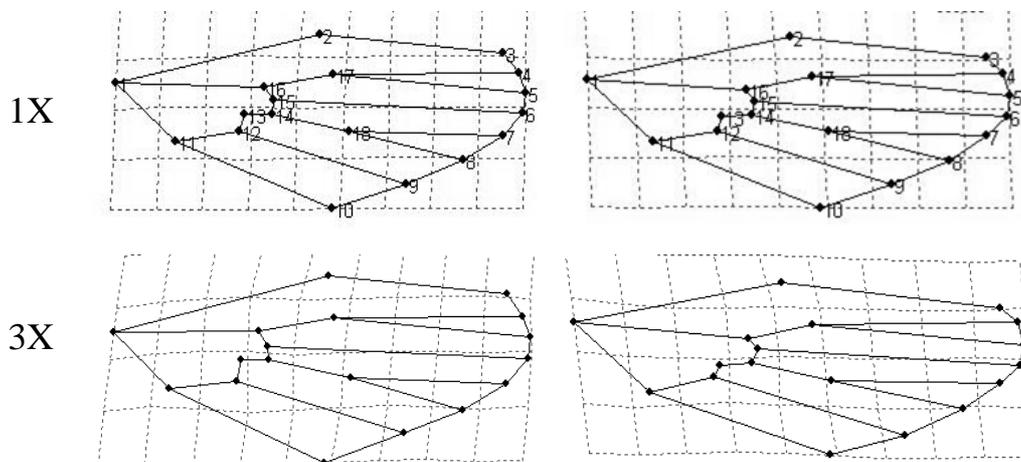


Figura 12 - Análise de assimetria bilateral alar nas fêmeas da população de Pariquera-Açú. Acima, histograma múltiplo evidencia pequena assimetria bilateral. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares que representam as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.

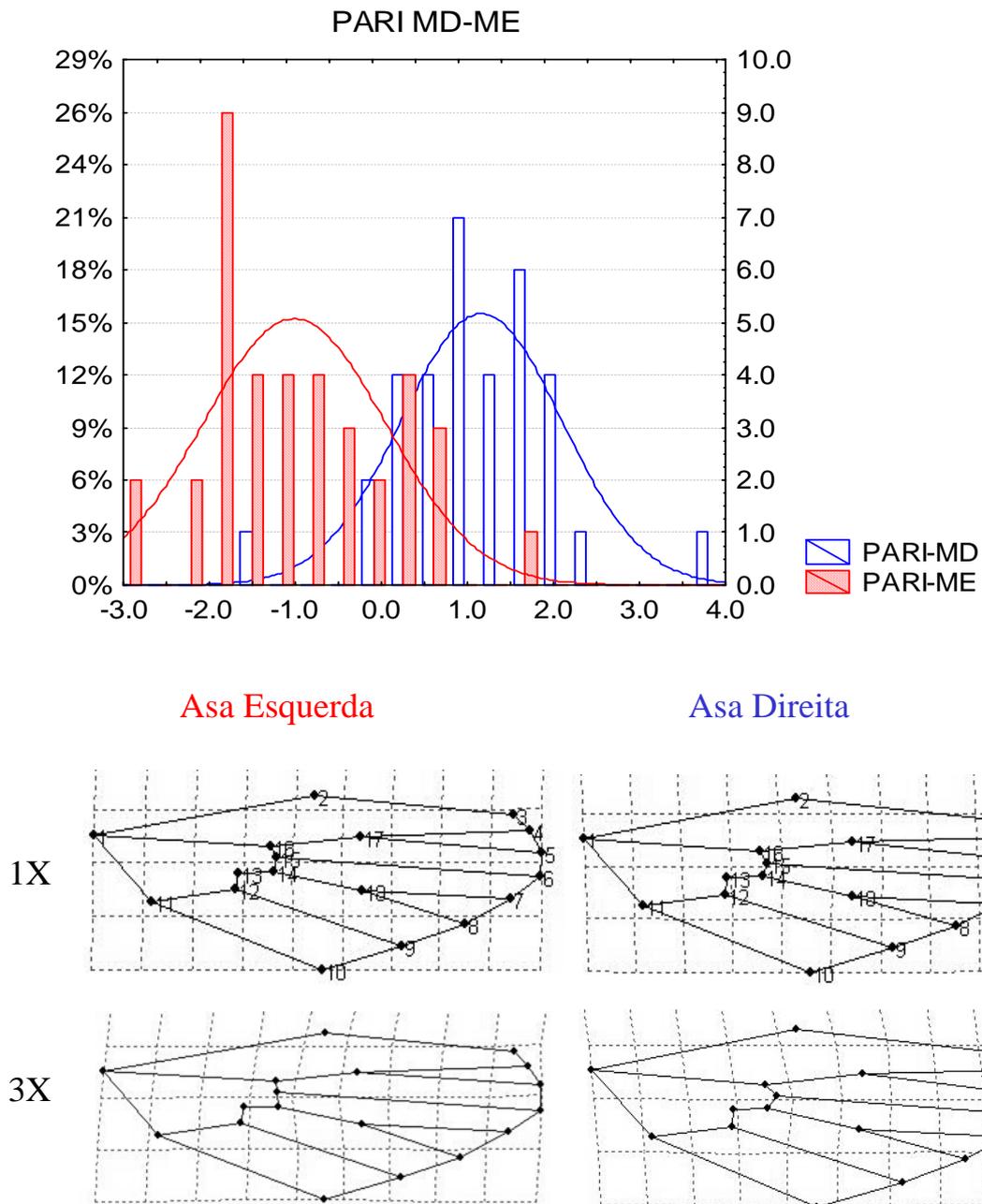
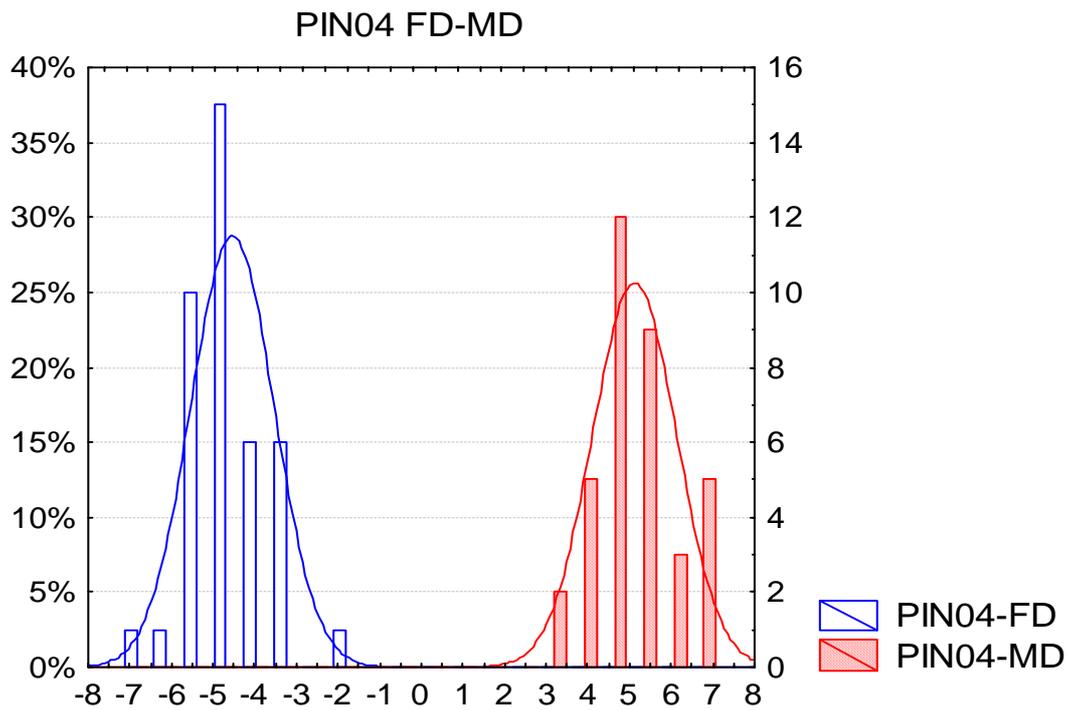


Figura 13 - Análise de assimetria bilateral alar nos machos da população de Pariquera-Açú. Acima, histograma múltiplo apresenta pequena assimetria bilateral. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares que representam as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.



Fêmeas

Machos

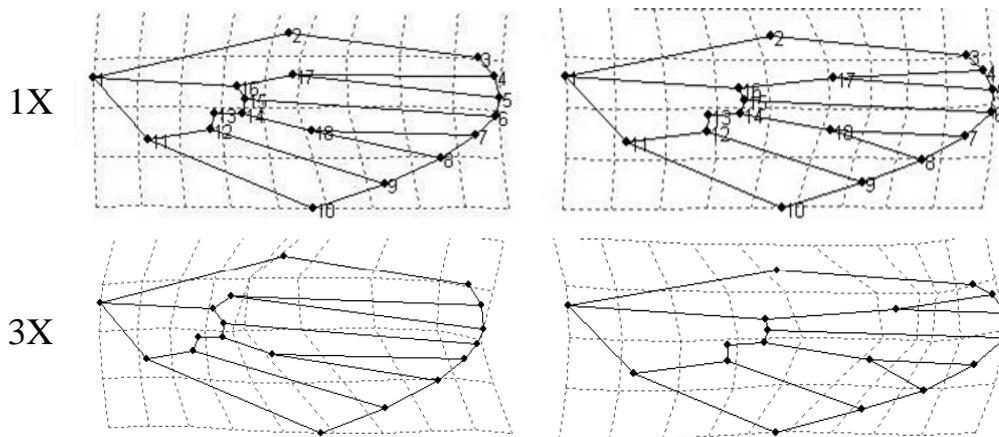


Figura 14 - Análise de dimorfismo sexual alar na população de Pinheiros 2004: comparação entre machos e fêmeas. Somente asas direitas. Acima, histograma múltiplo não apresenta sobreposição demonstrando alto dimorfismo sexual. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares que representam as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.

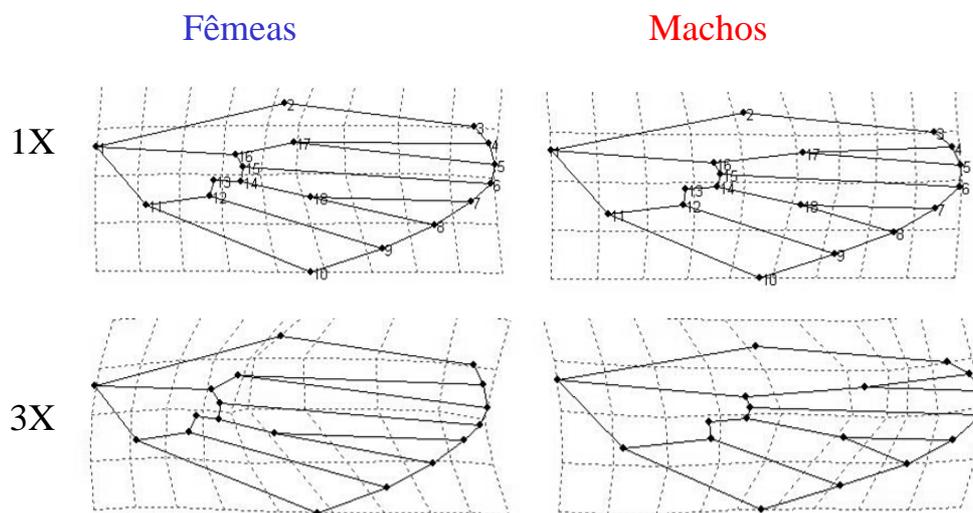
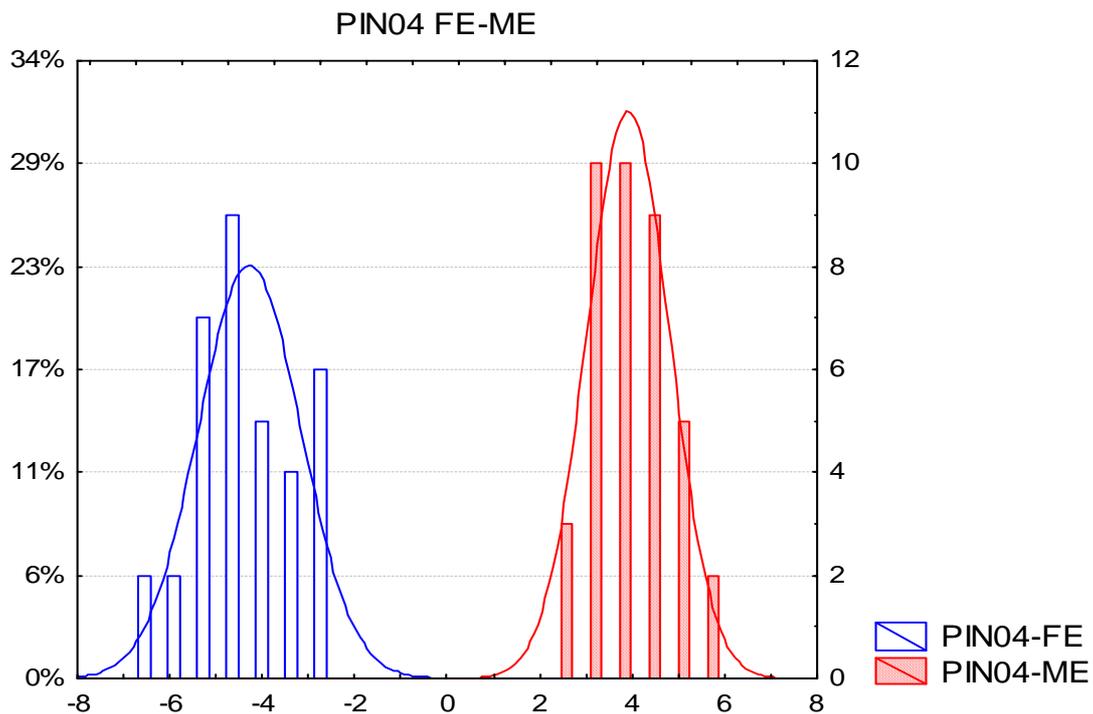


Figura 15 - Análise de dimorfismo sexual alar na população de Pinheiros 2004. Somente asas esquerdas. Acima, histograma múltiplo mostra alto dimorfismo. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares que representam as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.

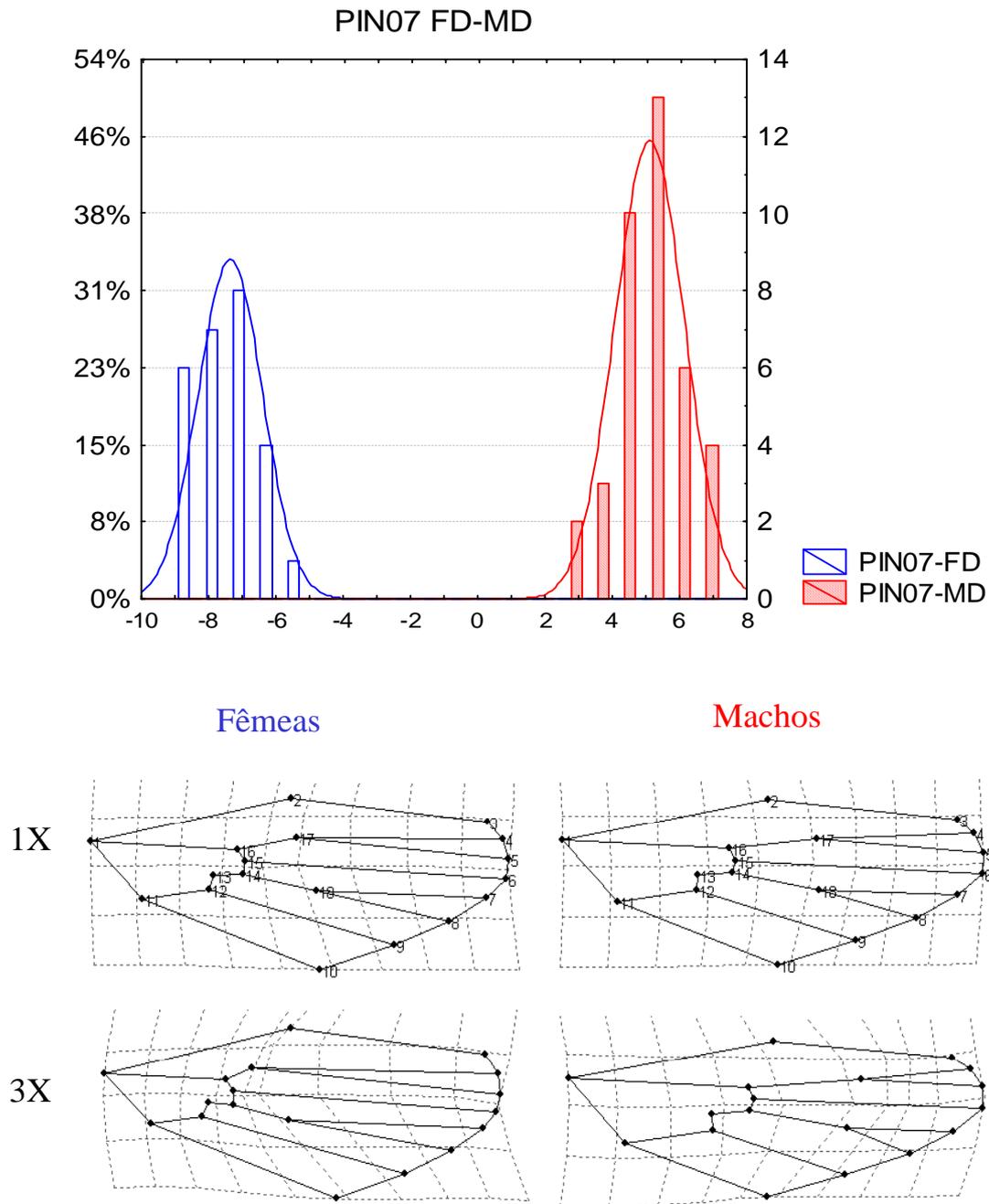
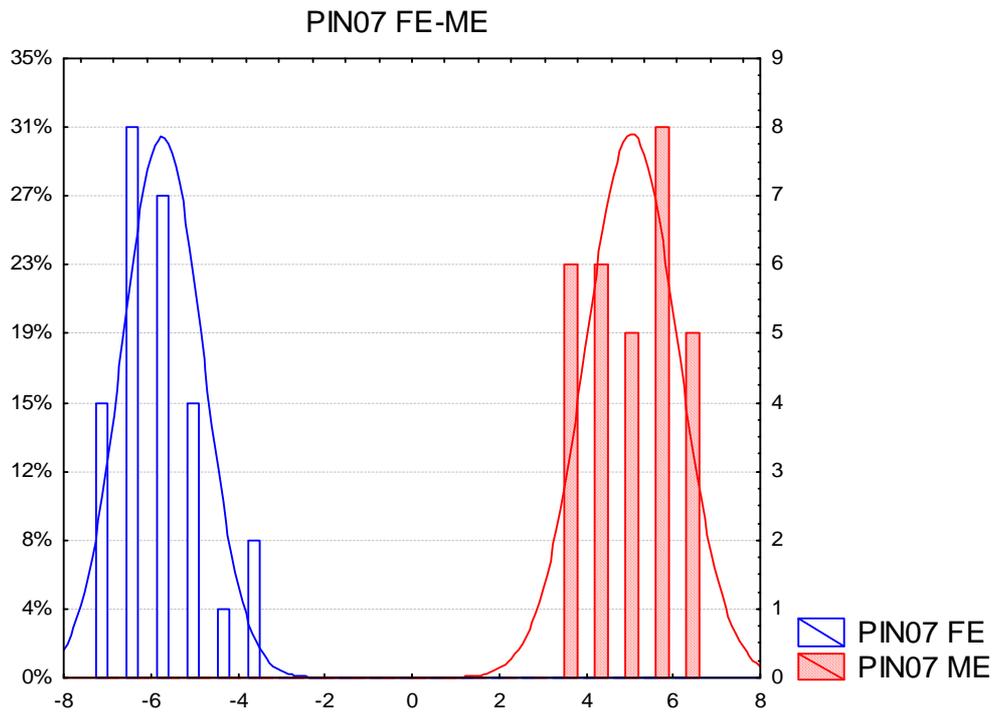


Figura 16 - Análise de dimorfismo sexual alar na população de Pinheiros 2007. Somente asas direitas. Acima, histograma múltiplo demonstrando a existência de alto dimorfismo sexual. Eixo X: variável canônica. Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares representando as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.



Fêmeas

Machos

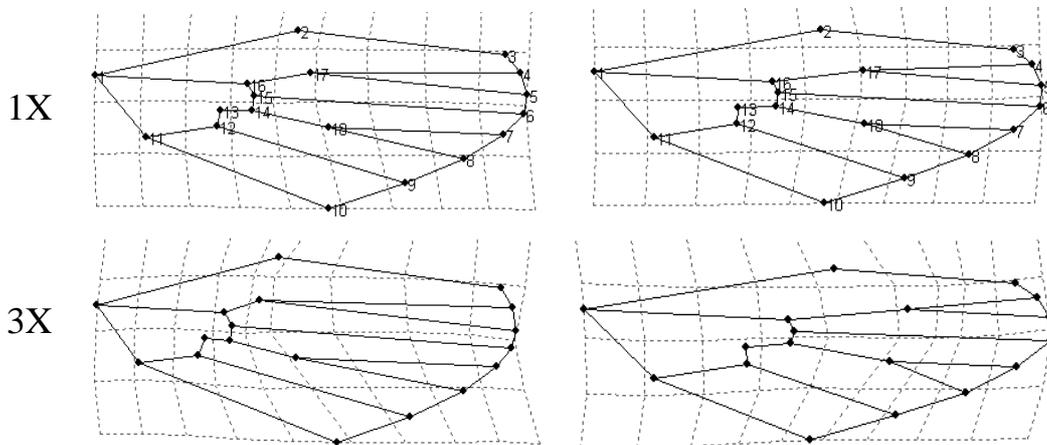


Figura 17 - Análise de dimorfismo sexual alar na população de Pinheiros 2007. Somente asas esquerdas. Acima, histograma múltiplo demonstra alto dimorfismo sexual. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares que representam as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.

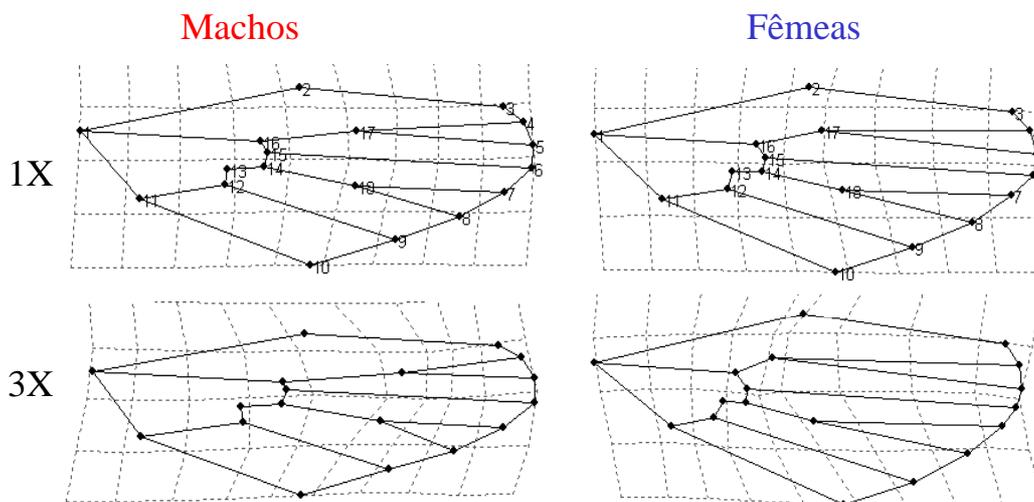
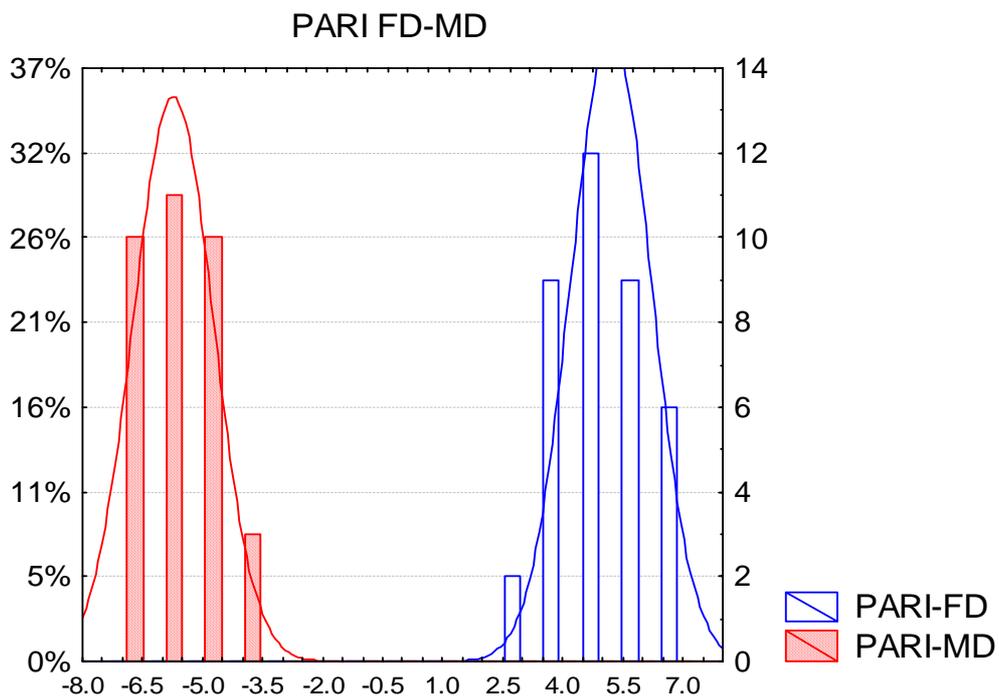
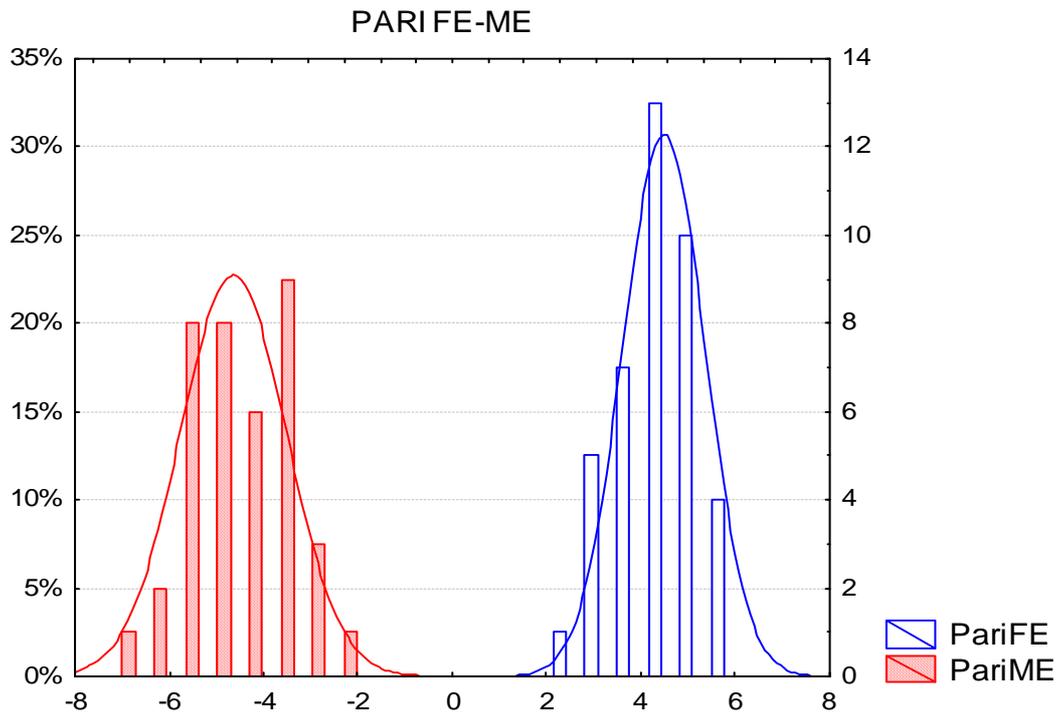


Figura 18 - Análise de dimorfismo sexual alar na população de Pariquera-Açú. Somente asas direitas. Acima, histograma múltiplo demonstra alto dimorfismo. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares representando as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.



Machos

Fêmeas

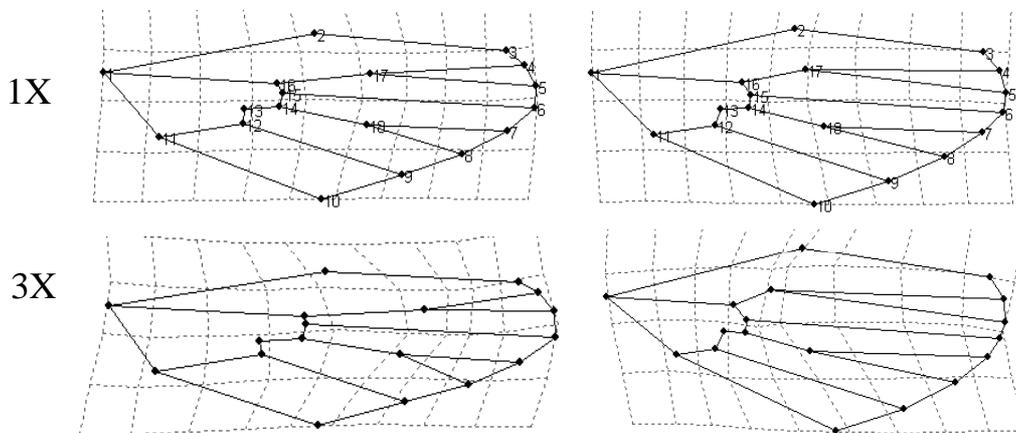
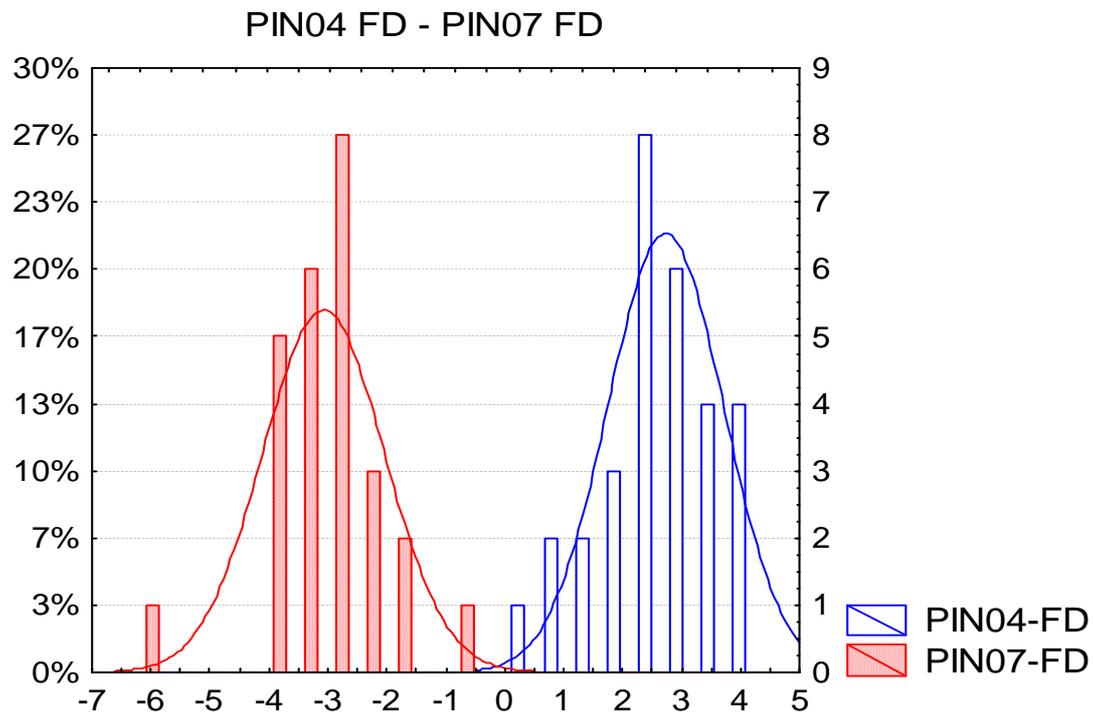


Figura 19 - Análise de dimorfismo sexual alar na população de Pariquera-Açú. Somente asas esquerdas. Acima, histograma múltiplo demonstrando alto dimorfismo. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares representando as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.



Pinheiros 2007 - fêmeas

Pinheiros 2004 - fêmeas

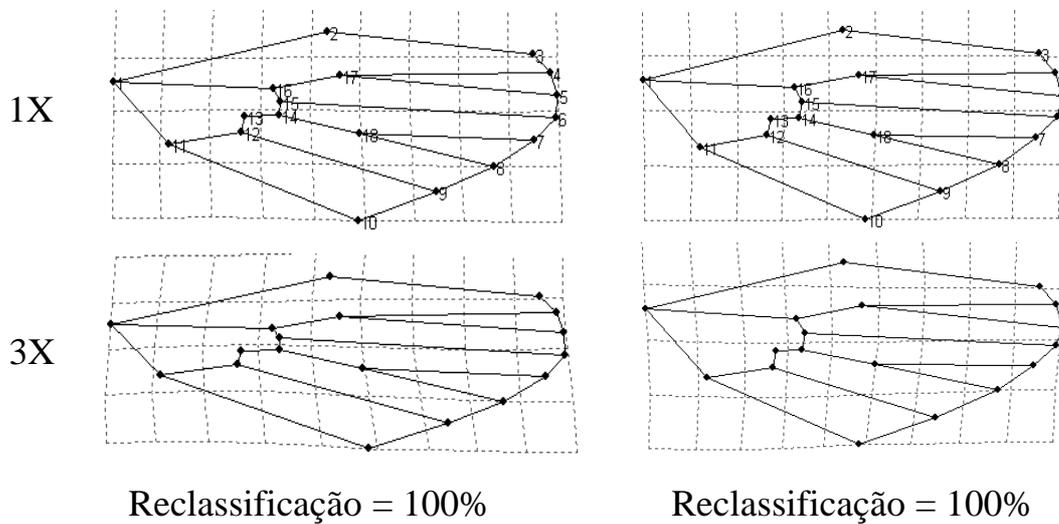
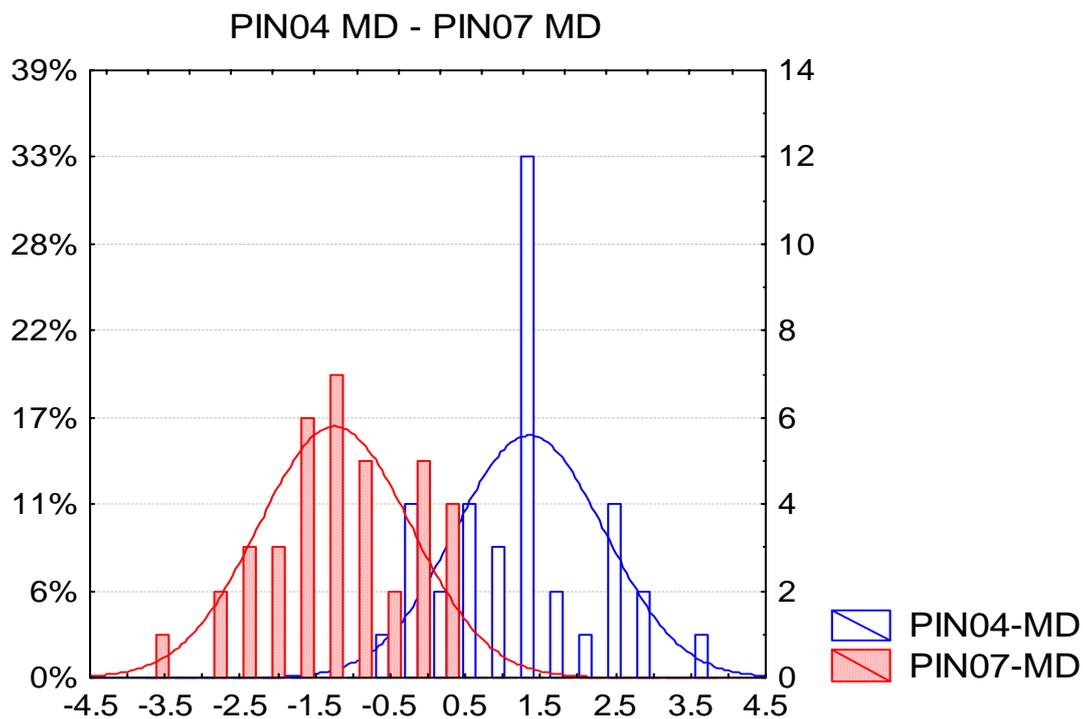


Figura 20 - Comparação interpopulacional – temporal nesse caso específico – entre fêmeas das populações de Pinheiros 2004 e Pinheiros 2007. Somente asas direitas. Acima, histograma múltiplo acusa alta diferenciação temporal. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares representando as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes. Testes de reclassificação com 100% de acerto.



Pinheiros 2007 - machos

Pinheiros 2004 - machos

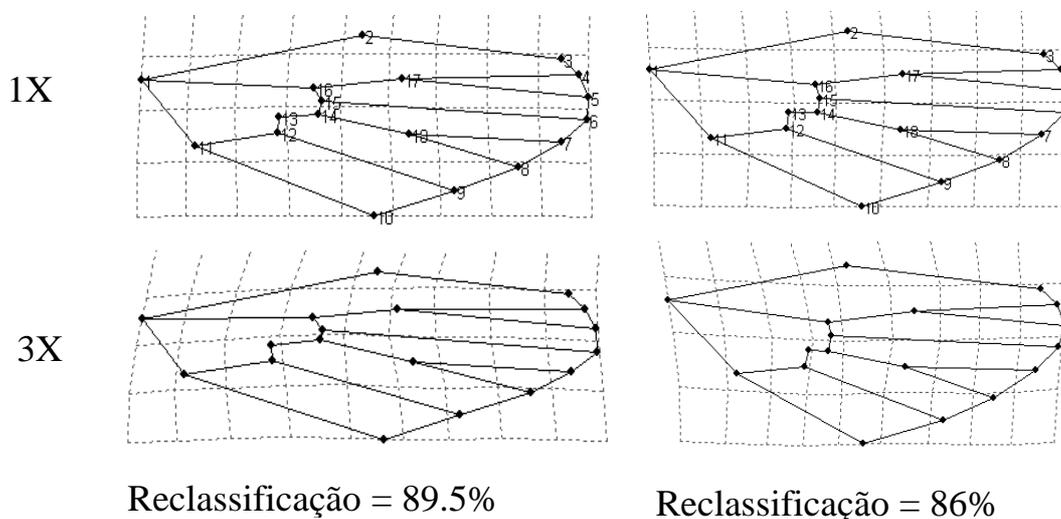
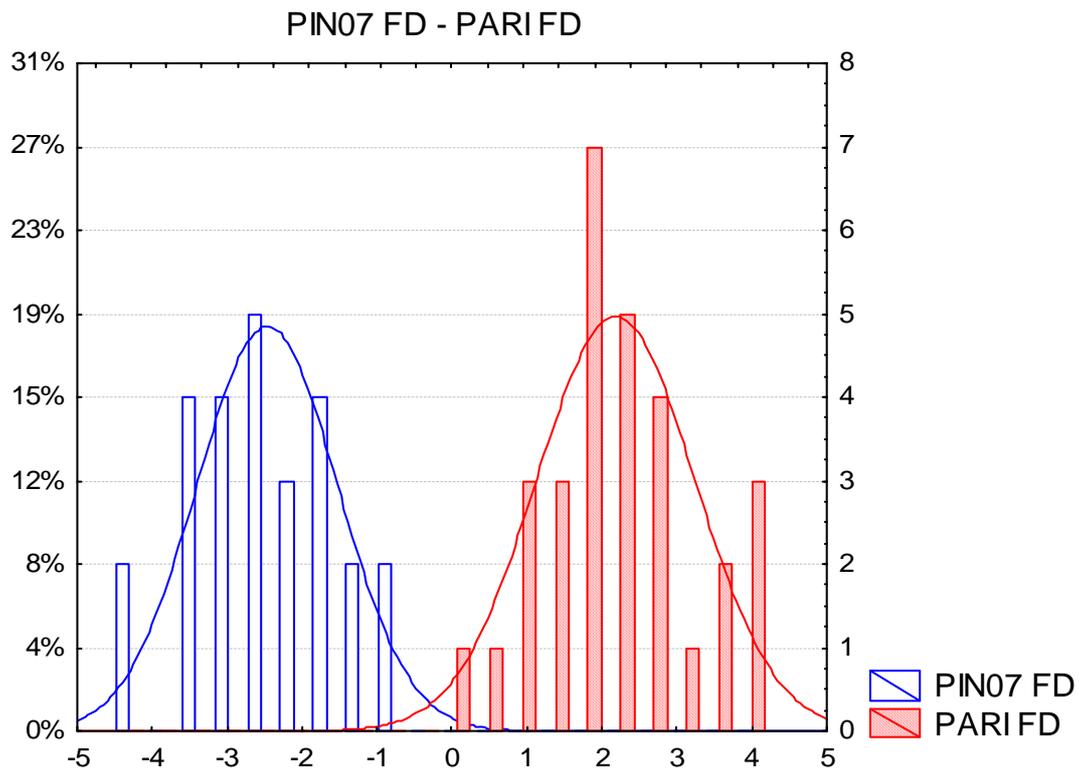


Figura 21 - Comparação interpopulacional – temporal nesse caso específico – entre machos das populações de Pinheiros 2004 e Pinheiros 2007. Somente asas direitas. Acima, histograma múltiplo com pequena sobreposição entre as curvas acusa diferenciação temporal. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares representando as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.



Pinheiros 2007 - fêmeas

Pariquera - fêmeas

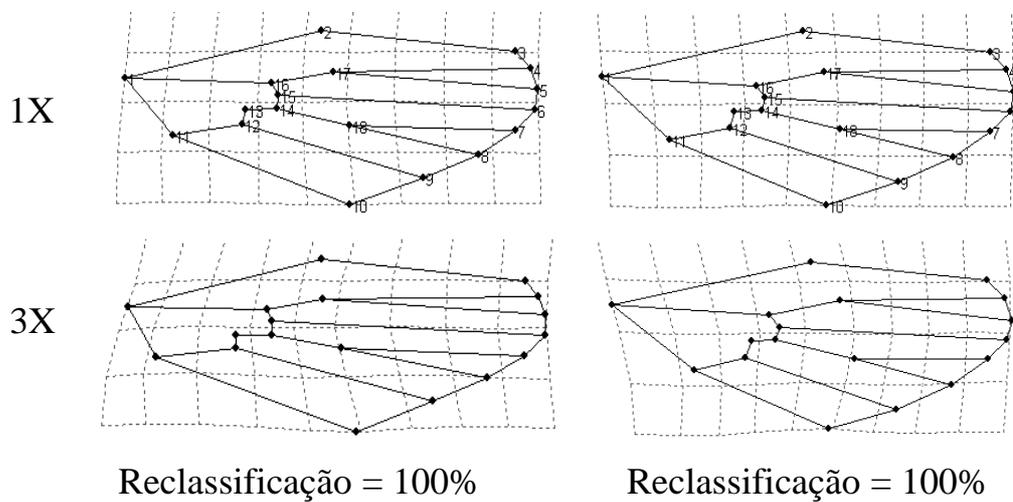
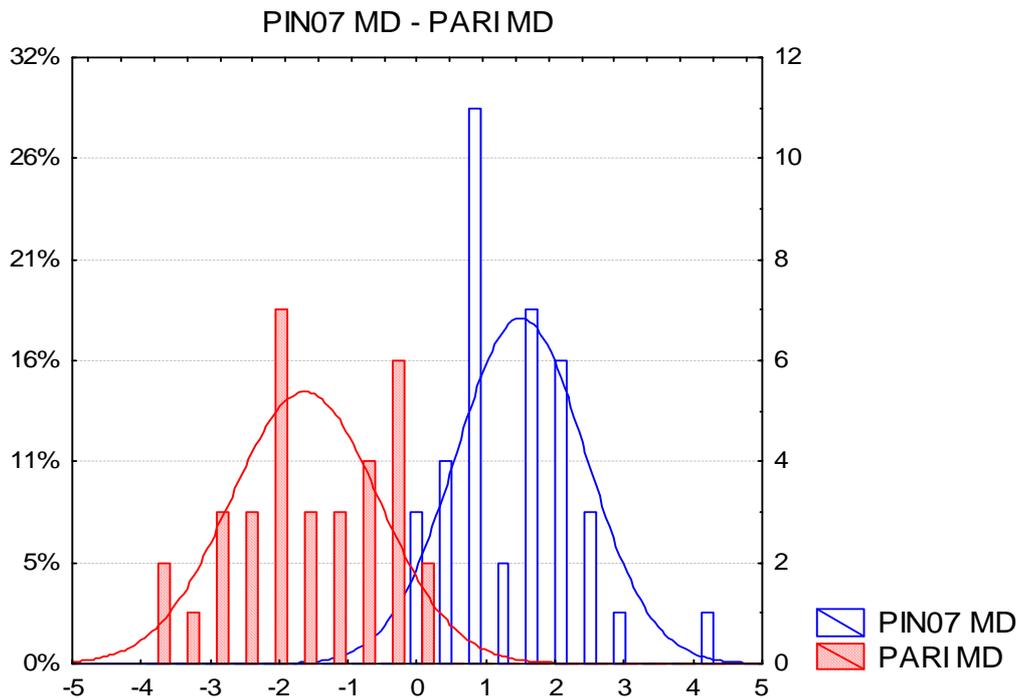


Figura 22 - Comparação interpopulacional entre fêmeas das populações de Pinheiros 2007 e Pariquera-Açú. Somente asas direitas. Acima, histograma múltiplo acusa alta diferenciação interpopulacional. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares representando as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.



Pariquera - machos

Pinheiros 2007 - machos

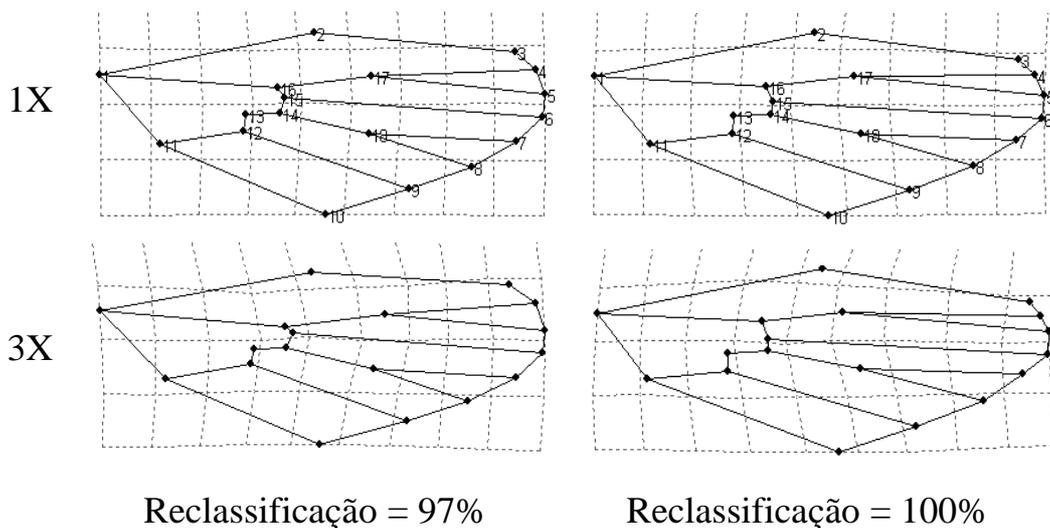
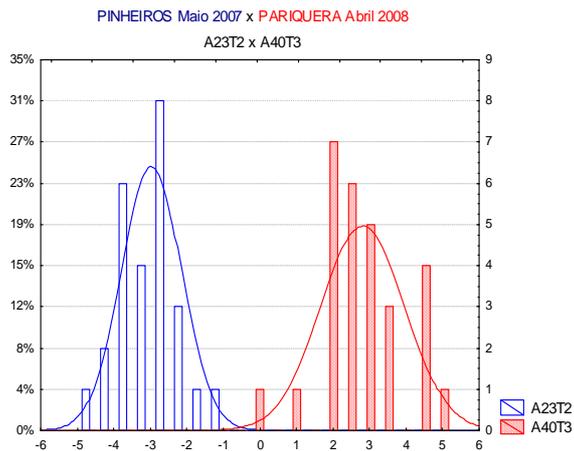
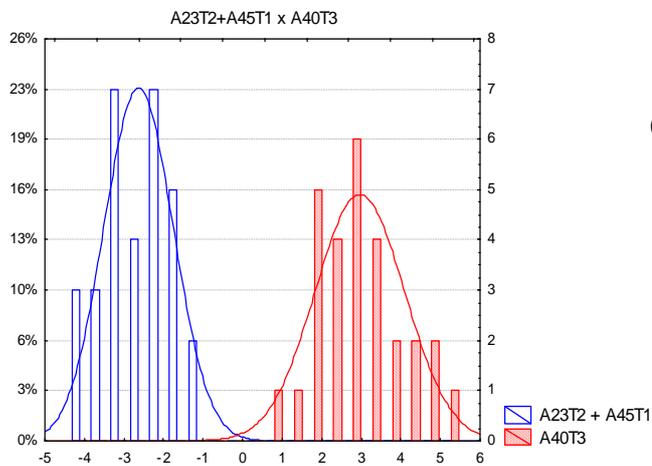


Figura 23 - Comparação interpopulacional entre machos das populações de Pinheiros 2007 e Pariquera-Açú. Somente asas direitas. Acima, histograma múltiplo com pequena sobreposição acusa diferenciação interpopulacional. Eixo X: variável canônica. Eixo Y: número de amostras e seu percentual. Abaixo, diagramas de grades com as conformações alares que representam as variações máximas associadas aos extremos negativo e positivo da variável canônica. 1X = variação observada, 3X = variação aumentada em 3 vezes.



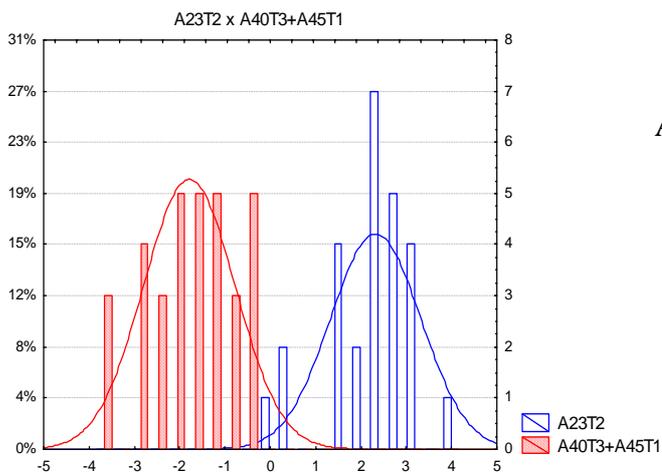
Distância de Mahalanobis:
 $A23T2 \times A40T3 = 33,04$

PINHEIROS Maio/2007 + PINHEIROS Agosto/2008 x PARIQUERA
Abril/2008



Distância de Mahalanobis :
 $(A23T2+A45T1) \times A40T3 = 30,98$

PINHEIROS Maio/2007 x PARIQUERA Abril/2008 + PINHEIROS
Agosto/2008



Distância de Mahalanobis :
 $A23T2 \times (A40T3+A45T1) = 16,74$

Figura 24 - Teste de diferença temporal-geográfica entre Pinheiros e Pariquera-Açu de diferentes épocas de coleta. Ao lado, as Distâncias de Mahalanobis para cada comparação.

Comparação Interpopulacional - Fêmeas

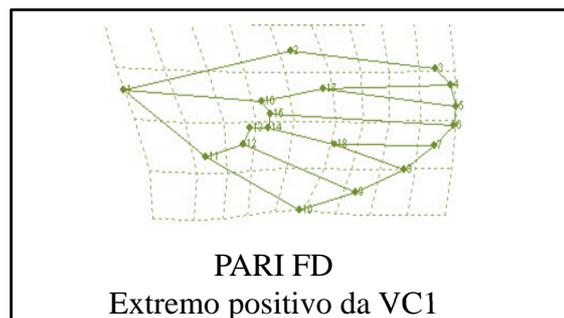
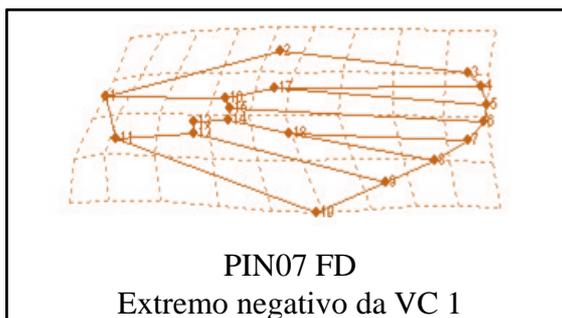
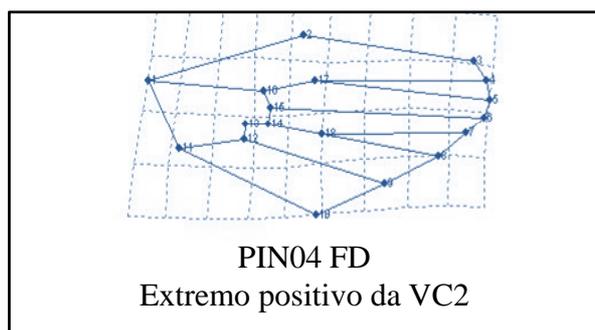
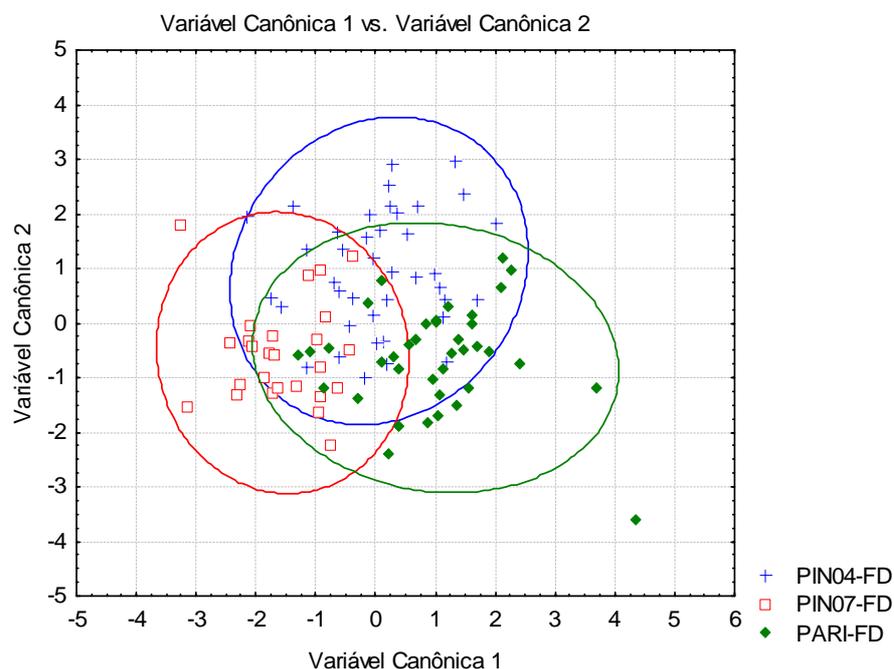


Figura 25 - Dispersão dos indivíduos fêmeas amostrados em gráfico bidimensional formado pelas variáveis canônicas obtidas na comparação das 3 amostras populacionais de *Cx. quinquefasciatus* indicadas na legenda. As elipses indicam intervalo de 95% de confiança. Eixo X = variável canônica 1 (principal). Eixo Y = variável canônica 2. Abaixo, diagramas de grades de deformação alar representando a variação máxima sobre cada eixo, aumentada em três vezes. FD = Fêmea asa direita; VC= Variável Canônica.

Comparação Interpopulacional - Machos

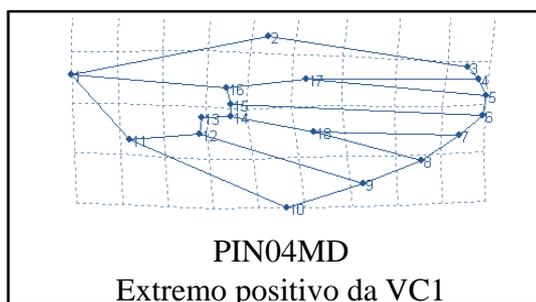
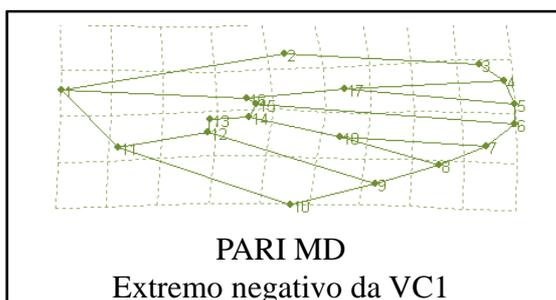
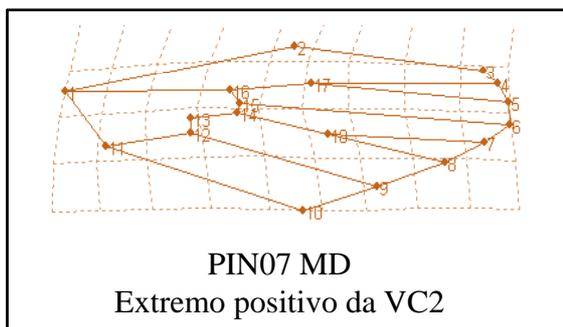
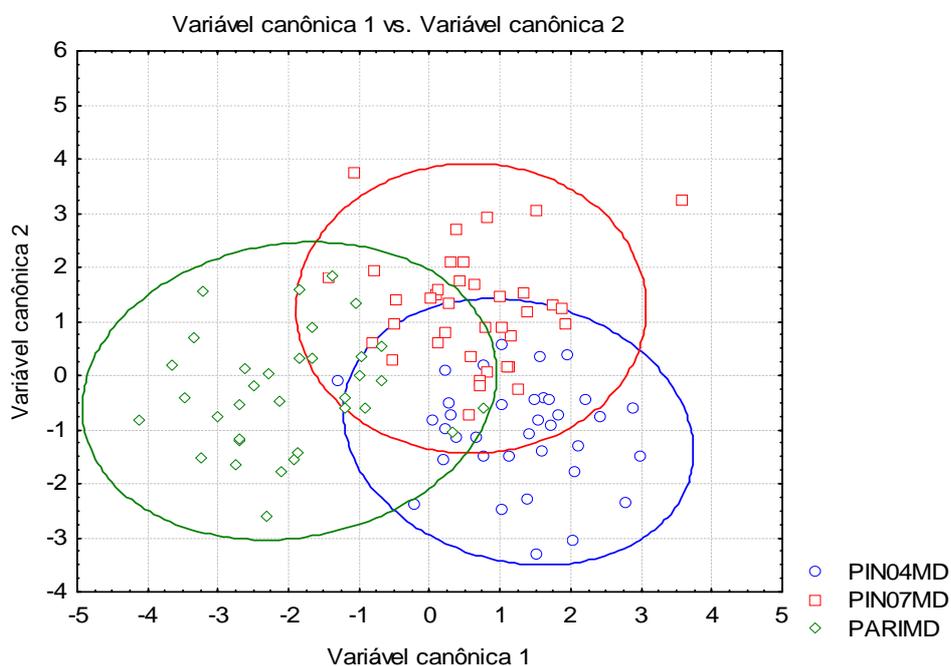


Figura 26 - Dispersão dos indivíduos machos amostrados em gráfico bidimensional formado pelas variáveis canônicas obtidas na comparação das 3 amostras populacionais de *Cx. quinquefasciatus* indicadas na legenda. As elipses indicam intervalo de 95% de confiança. Eixo X = variável canônica 1 (principal). Eixo Y = variável canônica 2. Abaixo, diagramas de grades de deformação alar representando a variação máxima sobre cada eixo, aumentada em três vezes. MD = Macho asa direita; VC= Variável Canônica.

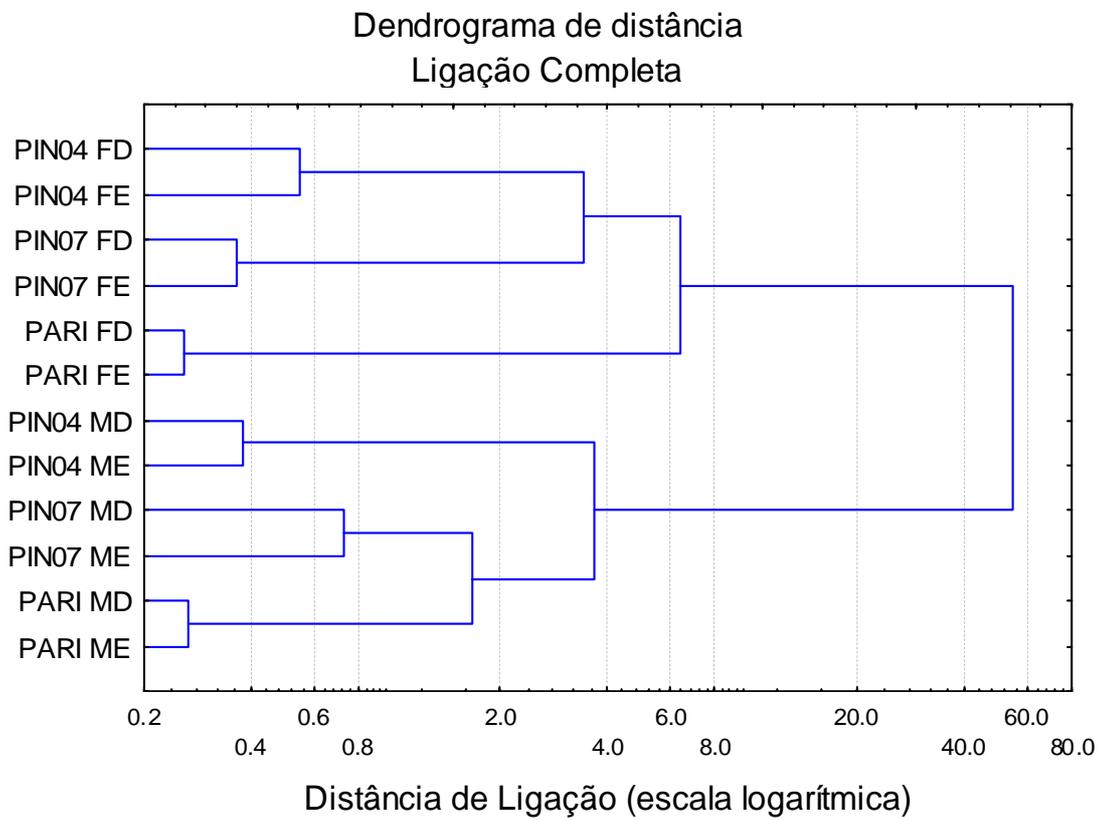


Figura 27 - Dendrograma feito a partir de matriz de dissimilaridades com valores de distância de Mahalanobis entre as populações. São consideradas asas direitas e esquerdas.

Tabela 6 - Reclassificação das comparações interpopulacionais das três populações simultaneamente. Machos e fêmeas separadamente (Figuras 25 e 26).

Matriz de classificação para as fêmeas: classificações preditas na reclassificação

	Porcentagem correta	Número de indivíduos classificados		
		PIN04 FD	PIN07 FD	PARI FD
PIN04 FD	80,00	32	3	5
PIN07 FD	88,46	3	23	0
PARI FD	92,10	1	2	35
Total	86,53	36	28	40

Matriz de classificação para os machos: classificações preditas na reclassificação

	Porcentagem correta	Número de indivíduos classificados		
		PIN04 MD	PIN07 MD	PARI MD
PIN04 MD	86,11	31	4	1
PIN07 MD	89,47	4	34	0
PARI MD	85,29	2	3	29
Total	87,03	37	41	30

Tabela 7 - “Relative warps” gerados no programa TpsRelw e utilizados para a análise canônica feita no Statistica. Comparação interpopulacional entre PIN04-FD e PIN07-FD.

Var1	Var2	Var3	Var4	Var5	Var6	Var7	Var8	...	Var27	Var28	Var29	Var30	Var31	Va32	Var33
PIN04-FD	-1E-02	1E-02	-2E-03	-5E-03	-9E-03	-1E-03	-7E-04	...	1E-03	-7E-05	-5E-04	-2E-04	5E-05	-3E-04	-2E-05
PIN04-FD	2E-02	2E-02	-5E-03	-9E-03	-2E-03	-1E-02	-7E-03	...	2E-03	1E-03	6E-05	3E-04	-3E-04	-2E-04	2E-04
PIN04-FD	2E-02	-3E-03	-1E-02	4E-03	-6E-03	-5E-03	6E-04	...	-6E-04	-5E-04	-3E-04	1E-03	3E-05	-6E-04	-5E-04
PIN04-FD	1E-02	-1E-03	1E-03	-2E-02	-1E-02	-5E-03	-9E-03	...	8E-04	8E-04	6E-04	-5E-04	8E-04	-6E-04	-3E-04
PIN04-FD	5E-03	3E-02	-2E-02	1E-02	4E-04	-1E-03	2E-03	...	-3E-04	-6E-04	4E-04	-4E-04	-7E-04	-1E-04	-6E-04
PIN04-FD	-1E-02	-2E-02	1E-02	-4E-03	-5E-03	6E-03	1E-03	...	-1E-03	-8E-04	-9E-04	3E-04	-9E-04	5E-04	-6E-04
PIN04-FD	-2E-02	1E-02	-8E-03	6E-03	-6E-03	-3E-04	-2E-03	...	-1E-03	6E-04	3E-06	-6E-06	4E-04	3E-05	-1E-03
PIN04-FD	2E-04	-2E-03	6E-03	-1E-02	-5E-03	-1E-03	-2E-03	...	4E-04	-1E-04	1E-04	9E-04	-8E-04	1E-04	1E-03
PIN04-FD	2E-02	5E-03	-2E-03	-6E-03	1E-03	9E-03	-2E-03	...	-1E-03	4E-04	-1E-03	9E-04	6E-04	-2E-04	4E-04
PIN04-FD	-1E-02	6E-03	-7E-03	1E-02	-3E-04	2E-04	-2E-02	...	-6E-04	-5E-04	-6E-04	7E-04	5E-04	-1E-04	5E-04
PIN04-FD	-5E-04	-1E-02	-3E-03	-7E-03	-2E-03	-5E-03	1E-03	...	1E-03	7E-04	-1E-03	-9E-04	9E-04	-8E-05	8E-05
PIN04-FD	-7E-03	-4E-03	2E-02	2E-02	-8E-03	-1E-02	-1E-03	...	-1E-03	1E-03	-9E-04	-1E-04	-7E-04	-6E-04	-8E-04
PIN04-FD	-2E-02	1E-02	-6E-03	-1E-03	-1E-03	-4E-03	-6E-03	...	2E-04	-5E-04	-4E-04	-7E-04	5E-04	6E-04	-1E-04
PIN04-FD	-4E-03	-1E-02	1E-02	7E-03	-4E-03	4E-03	-4E-03	...	9E-04	-3E-04	-4E-07	-8E-05	-2E-03	4E-04	-2E-04
PIN04-FD	1E-02	-2E-02	-2E-02	7E-04	-5E-03	-8E-03	-1E-03	...	3E-04	-1E-03	5E-04	9E-04	6E-04	-3E-04	2E-04
PIN04-FD	1E-02	3E-03	-1E-02	4E-03	4E-03	-5E-03	-9E-03	...	6E-04	1E-03	-3E-04	9E-04	-3E-04	6E-04	8E-05
PIN04-FD	7E-03	2E-02	-5E-03	9E-03	-8E-03	3E-03	-6E-04	...	-3E-04	-2E-03	-7E-04	4E-04	-7E-04	9E-05	6E-04
PIN04-FD	3E-02	-2E-02	8E-03	8E-04	-3E-03	3E-03	4E-03	...	-4E-04	2E-03	-3E-04	-8E-04	-5E-04	1E-03	3E-05
PIN04-FD	4E-02	-9E-04	-9E-03	2E-03	-8E-03	-8E-04	1E-02	...	-2E-03	7E-04	-9E-05	5E-04	1E-04	3E-04	8E-04
PIN04-FD	1E-02	6E-03	3E-02	-1E-02	-8E-04	-2E-03	-8E-03	...	-1E-03	-9E-04	-2E-04	6E-04	-5E-04	-1E-04	-9E-04
PIN04-FD	1E-02	2E-02	2E-02	-1E-02	3E-03	-6E-03	5E-03	...	6E-04	-2E-03	1E-03	-2E-03	-5E-04	-1E-03	7E-05
PIN04-FD	8E-03	-1E-02	2E-02	-1E-03	7E-04	-4E-03	1E-02	...	1E-04	6E-04	3E-04	-3E-04	-7E-04	-1E-03	4E-04
PIN04-FD	1E-02	2E-02	1E-02	2E-03	1E-02	-1E-04	-2E-03	...	-7E-05	1E-03	-4E-04	-1E-03	-7E-04	-1E-04	1E-03
PIN04-FD	-2E-02	-4E-03	8E-03	3E-03	-6E-03	-7E-04	-6E-03	...	-3E-04	3E-04	7E-04	5E-04	-2E-03	9E-04	3E-04
PIN04-FD	3E-02	2E-03	-2E-02	-2E-02	7E-03	4E-03	2E-03	...	-2E-04	6E-04	-6E-04	-3E-04	3E-04	-5E-04	5E-04
PIN04-FD	-1E-02	3E-02	-5E-03	-3E-03	4E-04	-2E-03	2E-02	...	2E-03	1E-03	-8E-05	2E-03	9E-05	6E-05	-2E-04
PIN04-FD	1E-02	1E-02	-4E-03	7E-03	-1E-02	1E-02	-6E-03	...	1E-03	9E-04	1E-03	3E-04	2E-04	-1E-04	3E-04
PIN04-FD	2E-02	2E-02	3E-02	2E-02	3E-03	1E-03	1E-03	...	-4E-05	-2E-03	-2E-04	3E-04	2E-03	4E-04	2E-04
PIN04-FD	-3E-02	2E-02	3E-02	-2E-02	-9E-03	1E-02	2E-03	...	-8E-04	1E-03	1E-03	1E-03	6E-04	-4E-04	-2E-04
PIN04-FD	4E-02	2E-02	3E-03	6E-03	8E-03	-2E-03	-3E-03	...	-5E-05	-2E-04	-5E-04	-3E-04	-2E-04	6E-04	-9E-04
PIN07-FD	-5E-03	-2E-02	-2E-02	-3E-03	-8E-03	2E-03	-1E-03	...	-1E-03	-2E-03	-1E-03	-4E-04	2E-04	-6E-04	-2E-04
PIN07-FD	-2E-03	-2E-02	1E-02	8E-03	1E-02	4E-04	-4E-03	...	3E-04	-1E-04	7E-04	7E-04	5E-04	2E-04	8E-04
PIN07-FD	-1E-02	2E-02	-3E-03	-2E-02	4E-03	-2E-03	-7E-03	...	8E-05	-7E-05	-5E-04	-1E-03	8E-04	7E-04	3E-04
PIN07-FD	-2E-02	4E-04	-8E-03	-6E-03	6E-03	-1E-02	6E-03	...	-1E-03	-1E-03	3E-04	1E-03	6E-05	1E-03	9E-04
PIN07-FD	-9E-03	-9E-03	-2E-03	7E-03	1E-03	1E-02	-3E-03	...	2E-04	-1E-03	-3E-04	-5E-04	-3E-04	-4E-04	8E-04
PIN07-FD	2E-02	4E-03	-7E-03	6E-03	-6E-03	3E-03	3E-03	...	-3E-04	5E-04	1E-03	-1E-03	2E-04	8E-04	-5E-04
PIN07-FD	-2E-02	-2E-02	-2E-02	-2E-02	6E-04	2E-03	4E-03	...	1E-03	-1E-04	-3E-04	-5E-04	-2E-04	1E-03	-1E-04
PIN07-FD	-1E-02	-1E-03	4E-03	-1E-02	1E-02	3E-03	2E-03	...	4E-04	-2E-03	3E-05	-1E-04	-5E-04	-7E-04	-4E-04
PIN07-FD	-9E-03	-1E-02	-8E-03	1E-02	-1E-02	2E-03	-3E-03	...	7E-04	1E-04	1E-03	-3E-04	2E-07	-6E-04	1E-03
PIN07-FD	5E-05	-3E-02	-1E-02	2E-04	-2E-04	2E-03	2E-03	...	8E-04	6E-04	-1E-03	-2E-04	5E-04	-5E-04	1E-05
PIN07-FD	-2E-02	2E-02	2E-03	5E-03	-2E-03	2E-02	5E-03	...	2E-04	2E-04	1E-04	-1E-03	8E-04	6E-04	-3E-04
PIN07-FD	6E-03	-3E-02	1E-02	1E-02	3E-03	-2E-03	4E-03	...	2E-03	-7E-04	3E-03	3E-04	4E-04	2E-04	-5E-04
PIN07-FD	5E-03	1E-02	-2E-02	-1E-02	-2E-03	5E-03	5E-03	...	1E-03	-9E-04	1E-04	-4E-04	-8E-04	2E-04	-5E-04
PIN07-FD	-1E-02	3E-03	6E-03	1E-02	2E-03	-1E-02	-4E-03	...	1E-03	-3E-04	-3E-04	-9E-04	8E-04	1E-03	3E-04
PIN07-FD	-2E-02	1E-03	9E-03	-1E-03	-9E-04	-7E-03	3E-03	...	-1E-03	-3E-05	-4E-04	-5E-04	-2E-04	-4E-04	6E-04
PIN07-FD	5E-03	-2E-02	1E-02	-1E-02	7E-03	-6E-03	-6E-04	...	-1E-03	2E-04	8E-04	-1E-04	4E-04	5E-04	-2E-04
PIN07-FD	-1E-02	-2E-02	-4E-03	-1E-02	-3E-05	-1E-03	-6E-04	...	-3E-04	3E-04	6E-04	-8E-04	-1E-04	3E-04	-2E-04
PIN07-FD	-8E-03	-4E-03	7E-03	-1E-03	5E-03	2E-03	8E-03	...	-3E-04	5E-04	3E-04	5E-04	6E-05	3E-04	4E-04
PIN07-FD	6E-03	-1E-02	-1E-02	-5E-03	7E-03	6E-03	-3E-03	...	-2E-04	-1E-03	9E-04	1E-03	1E-03	-4E-04	-6E-04
PIN07-FD	-2E-02	4E-03	-1E-02	6E-04	1E-02	-1E-02	-2E-03	...	-2E-03	2E-03	1E-03	-1E-05	2E-04	-9E-04	-4E-04
PIN07-FD	6E-03	-2E-02	2E-02	2E-03	9E-04	1E-02	-3E-03	...	-4E-04	7E-04	-5E-04	-6E-04	9E-04	-2E-04	-2E-04
PIN07-FD	-1E-02	-1E-02	2E-03	2E-02	-1E-03	-8E-03	1E-02	...	5E-04	5E-04	-6E-04	-3E-04	2E-04	-7E-05	-6E-04
PIN07-FD	8E-03	7E-03	-2E-02	2E-03	1E-02	7E-03	-7E-03	...	-9E-04	5E-04	1E-03	1E-04	-1E-03	6E-04	-6E-04
PIN07-FD	-4E-03	-4E-03	1E-02	4E-03	8E-03	3E-03	1E-03	...	3E-03	5E-04	-2E-03	2E-03	-2E-04	-1E-04	-6E-04
PIN07-FD	-2E-02	-5E-04	-1E-02	1E-02	1E-02	8E-03	-9E-04	...	1E-04	1E-03	8E-05	-2E-04	-5E-04	-2E-03	3E-04
PIN07-FD	-2E-03	1E-02	-9E-03	6E-03	2E-04	9E-04	1E-02	...	-9E-04	-4E-04	-3E-04	-8E-04	4E-04	-6E-06	4E-05

4.2 Cromossomos Politênicos

As 77 preparações cromossômicas de larvas e pupas de *Cx. quinquefasciatus*, resultaram em poucas lâminas com cromossomos politênicos visíveis e distinguíveis. A eficiência nessa obtenção foi de 2%. Boas preparações de cromossomos politênicos das amostras de *Cx. quinquefasciatus* são realmente de difícil obtenção, conforme reportado pela literatura e previsto desde o início do projeto. Uma das preparações obtidas de larva de 4^o instar conservada durante duas semanas em Carnoy mostrou cromossomos razoavelmente íntegros (Figura 28). A Figura 28 mostra todos os cromossomos politênicos encontrados em um núcleo de célula de PIN08 e uma parte de um dos três cromossomos. Não foi possível identificá-lo devido à grande dissimilaridade em relação aos mapas politênicos disponíveis e pouca nitidez das bandas e dos mapas.

4.3 DNA ribossômico

Os experimentos de Southern Blot para análise do DNA ribossômico foram realizados com êxito. O produto da extração de DNA de cada indivíduo resultou em uma banda de aproximadamente 30 Kb de DNA, o qual foi submetido à clivagem. As digestões com as endonucleases *EcoRI*, *RsaI*, *AluI*, *HindIII* e *DraI* foram adequadamente obtidas e o método de hibridação e detecção funcionaram conforme esperado.

Os experimentos de Southern Blot geraram melhor sinal de hibridação com as amostras de *Cx. quinquefasciatus* quando a lavagem pós-hibridação foi feita com alta estringência (SSC 0,1X/ SDS 0,1% a 65 °C por 20 minutos). Com todas as enzimas testadas (*EcoRI*, *DraI*, *HindIII*, *RsaI* e *AluI*) o padrão de restrição aparentou ser semelhante nas duas populações e não evidenciou presença de dimorfismo sexual. Com a enzima *EcoRI*, apareceram bandas de aproximadamente 11.500 pb, 9.000 pb e 6.200 pb e uma tênue banda de aproximadamente 1.500 pb no DNA das amostras PIN07, PIN08 e PARI (Fig. 29- 32). Nas figuras 29 e 32, bandas maiores são aparentemente resultado de digestão incompleta.

Para as outras enzimas testadas, tanto o “pool” de DNA realizado com machos e fêmeas da mesma população, como as amostras individuais não geraram padrões polimórficos. As enzimas *RsaI* e *AluI* não produziram nenhum sinal de hibridação. Já as enzimas *DraI* e *HindIII* geraram cada uma somente uma banda não demonstrando polimorfismos entre populações ou entre os sexos (Fig. 33 e 34).

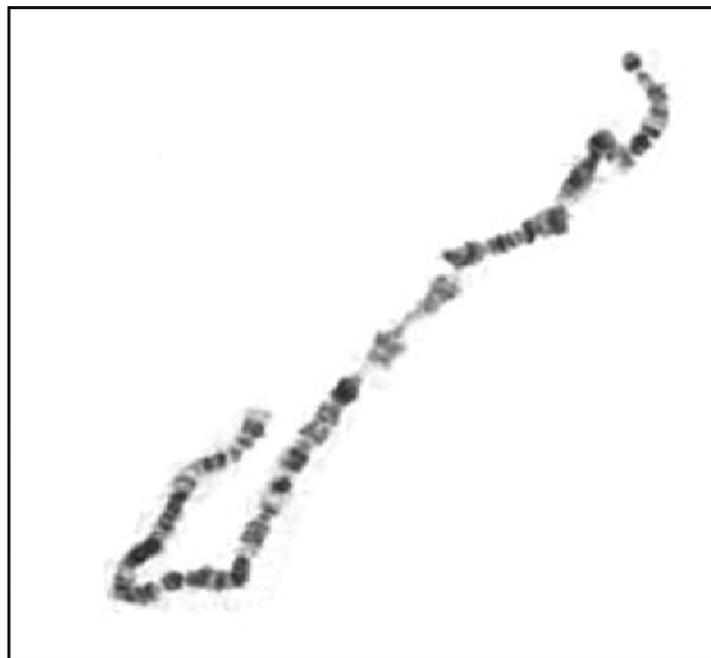
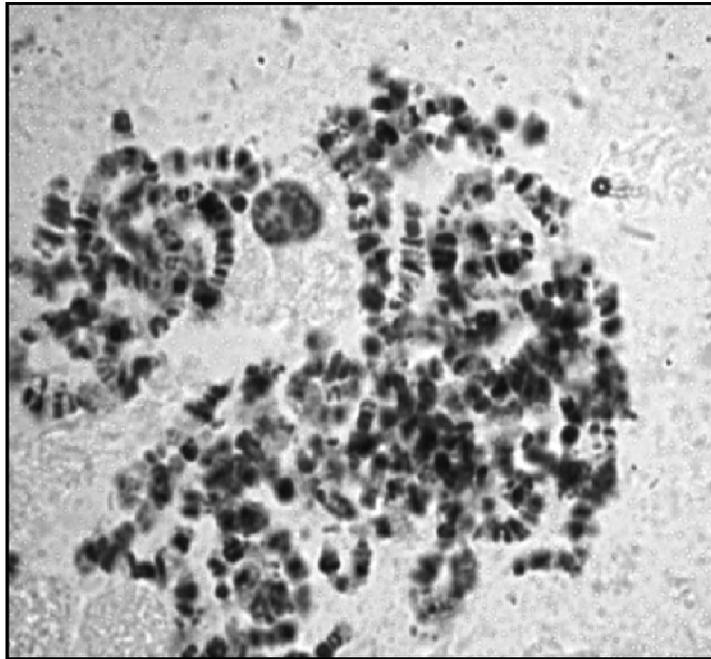


Figura 28 - Cromossomos politênicos de PIN08. Acima: Visualização de conjunto cromossômico.
Abaixo: Cromossomo politênico não determinado.

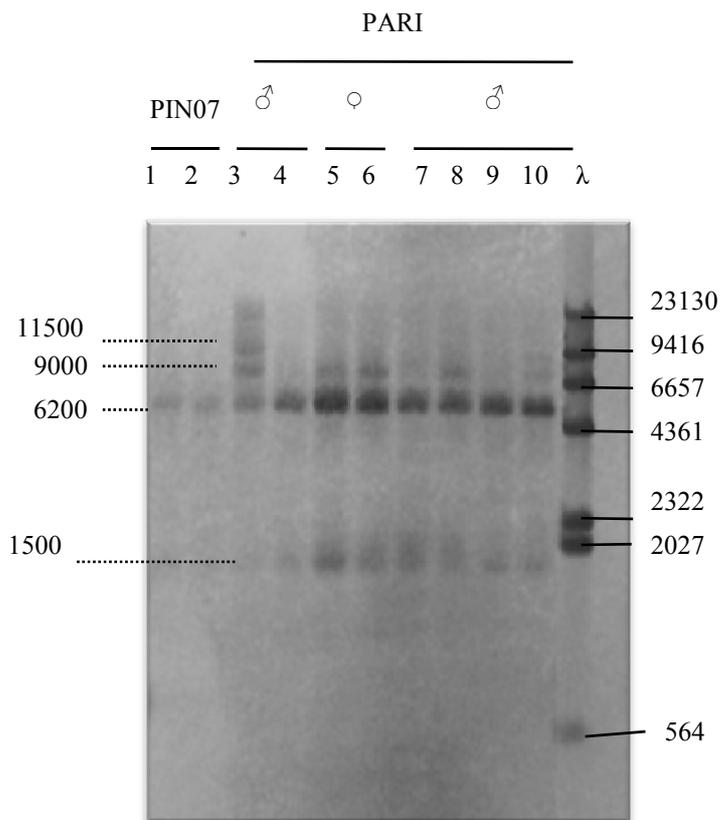


Figura 29 - Southern blot mostrando sinais de hibridação da sonda *Dm238* com DNA de *Cx. quinquefasciatus* clivado com *EcoRI*. Raias 1 e 2: larvas do Rio Pinheiros. Raias 3 a 10 adultos de Pariquera-Açú. Há três sinais de tamanhos aproximados de 11500 pb, 9000 pb e 6200 pb e 1500 pb aproximadamente. Raia λ = marcador de peso molecular λ*HindIII* biotilado, cujos tamanhos em pb estão indicados ao lado direito. Na raia 3, possivelmente ocorreu digestão parcial do DNA.

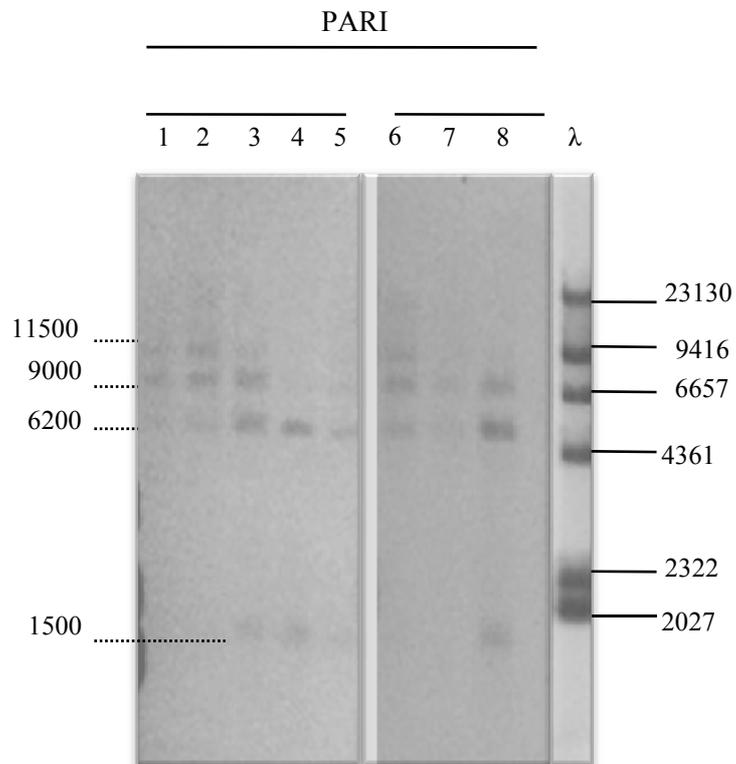


Figura 30 - Southern blot mostrando sinais de hibridação da sonda *Dm238* com DNA clivado com *EcoRI* de indivíduos de Pariquera-Açú. Há três sinais de tamanhos aproximados de 11500 pb, 9000 pb e 6200 pb, e um tênue sinal de tamanho 1500 pb aproximadamente. Raia λ = marcador de peso molecular λ *HindIII* biotilado, cujos tamanhos em pb estão indicados ao lado direito.

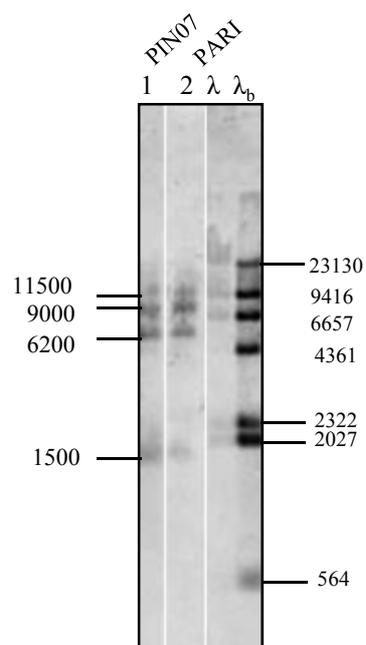


Figura 31 - Southern blot mostrando fragmentos de DNA de *Cx. quinquefasciatus* clivado com *EcoRI* e hibridados com sonda *Dm238*. Raia 1: larva com sexo não identificado do Rio Pinheiros. Raia 2: Adulto fêmea de Pariquera-Açú. Raia λ : marcador de peso molecular λ *HindIII*, raia λ_b : marcador de peso molecular λ *HindIII* biotilado, com os tamanhos indicados em pb ao lado direito. Os indivíduos exibiram padrões de restrição semelhantes, aparecendo sinais de hibridação de tamanhos aproximadamente iguais a 11500 pb, 9000 pb e 6200 pb e 1500pb, indicados ao lado esquerdo.

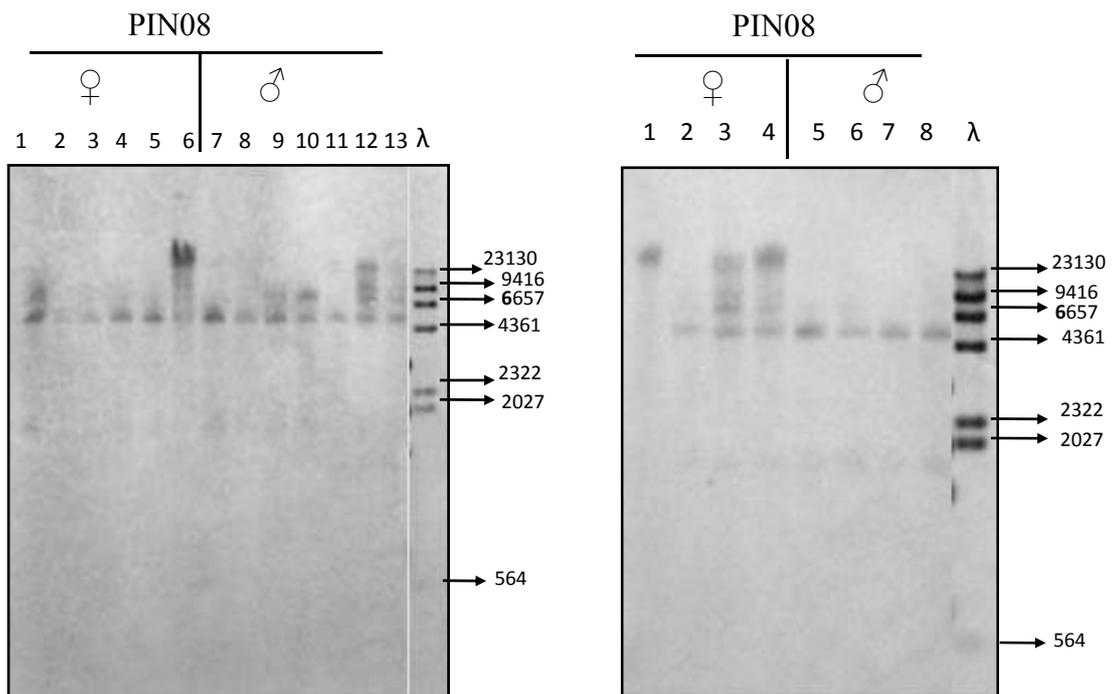


Figura 32 - Southern blot com *EcoRI*. Amostras individuais do Rio Pinheiros. Raia λ = marcador de peso molecular λ *HindIII* biotilado, cujos tamanhos das bandas em pb estão indicados ao lado da figura. À esquerda, raias 1 a 6: fêmeas, e raias 7 a 13: machos. À direita, raias 1 a 4, fêmeas e raias 5 e 6, machos. Todos os indivíduos exibiram padrões de restrição semelhantes, aparecendo sinais de hibridação de tamanhos aproximadamente iguais a 11500 pb, 9000 pb e 6200 pb e 1500pb. Bandas maiores em algumas raias aparentemente são resultado de digestão incompleta.

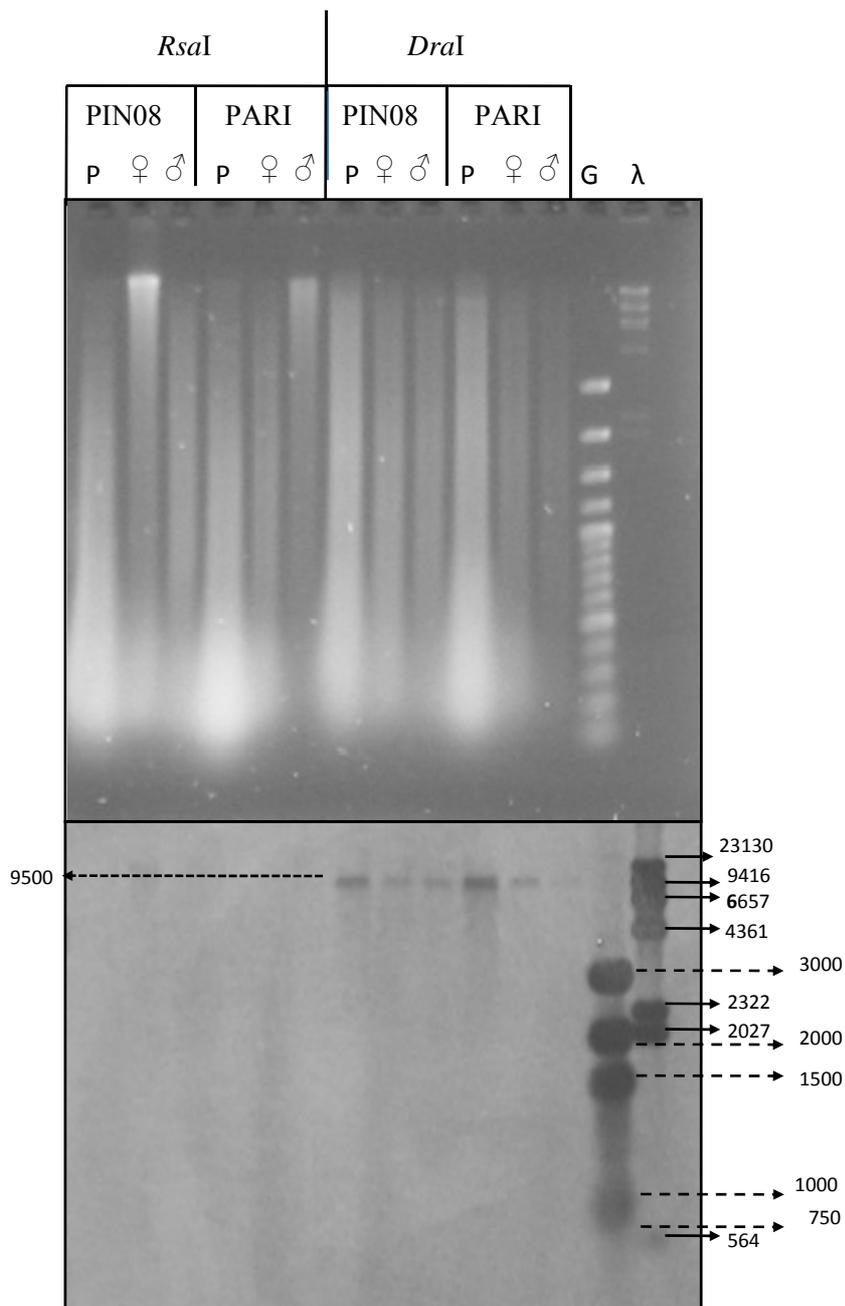


Figura 33 - Acima, gel de agarose 1,5% com amostras individuais e pools de DNA clivados com *RsaI* e *DraI*. Abaixo, o respectivo Southern blot. A clivagem com *RsaI* não mostrou sinais de hibridação. A clivagem com *DraI* resultou em padrões de restrição semelhantes, com o aparecimento de uma banda de aproximadamente 9.500 pb. Raias P = pool de DNA com fêmeas e machos juntos, sendo P de PIN08 com 9 indivíduos e P de PARI com 12 indivíduos. Raia G e raia λ = marcadores de peso molecular Gene Ruler 1kb (Fermentas) e λ *HindIII* biotinizado, respectivamente. Tamanhos das bandas indicados.

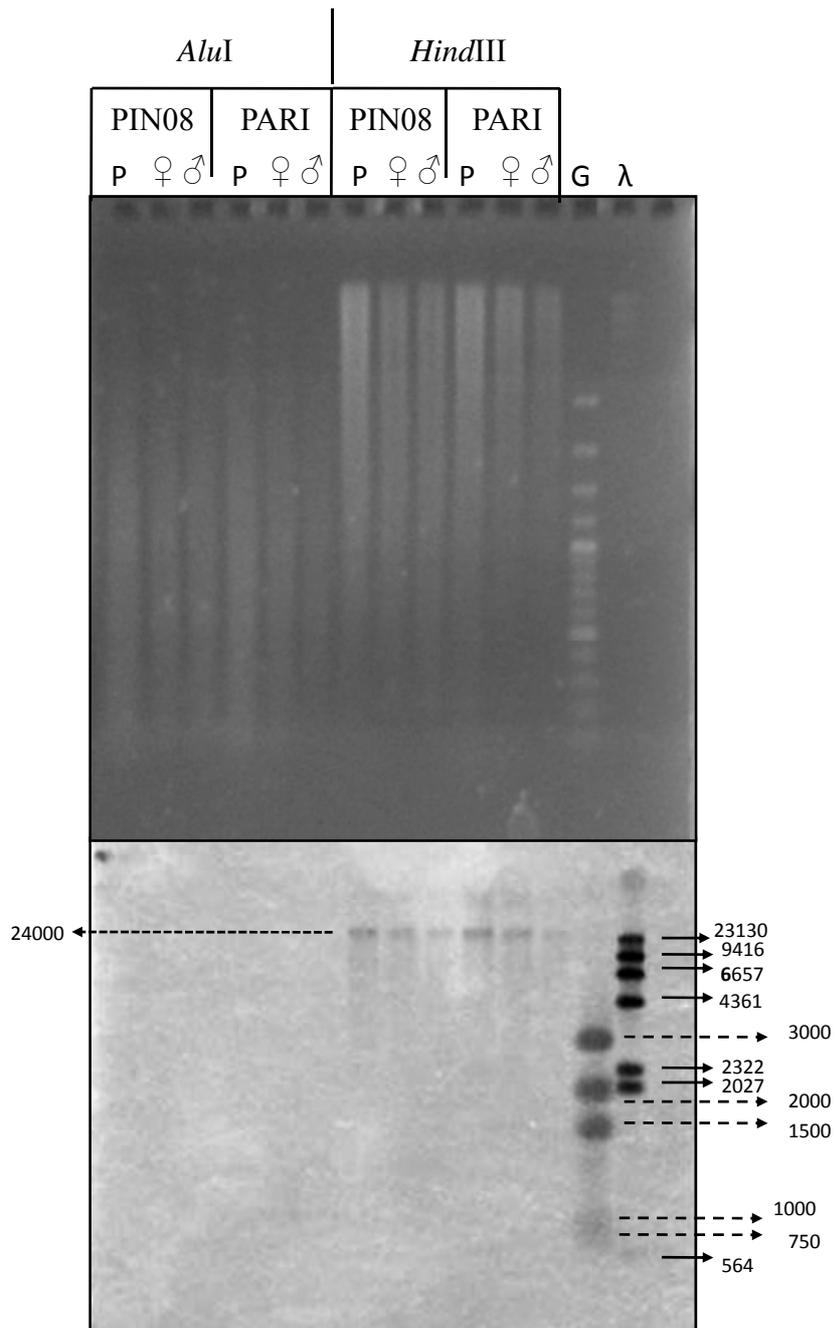


Figura 34 - Acima, gel de agarose 1,5% com amostras individuais e pools de DNA clivados com *AluI* e *HindIII*. Abaixo, o respectivo Southern blot. A clivagem com *AluI* não mostrou sinais de hibridação. Para a clivagem com *HindIII*, todos os indivíduos exibiram somente uma banda de aproximadamente 24.000 pb. Raias P = pool de DNA com fêmeas e machos juntos, sendo P de PIN08 com 9 indivíduos e P de PARI com 12 indivíduos. Raia G e raia λ = marcadores de peso molecular Gene Ruler 1kb (Fermentas) e λ *HindIII* biotilado, respectivamente. Tamanhos das bandas indicados.

5 DISCUSSÃO

Um dos objetivos no início do projeto foi obter boas preparações de cromossomos politênicos a partir de amostras de *Cx. quinquefasciatus* conservadas em líquido Carnoy. Mas, a eficiência foi baixa apesar do grande número de indivíduos testados. A maioria dos espécimes testados estava conservada em Carnoy há mais de seis meses. É possível que o tempo de preservação em Carnoy seja crucial para a obtenção de boas preparações além da dificuldade já intrínseca ao método, uma vez que uma das únicas preparações obtidas com cromossomos politênicos razoavelmente íntegros foi de uma amostra preservada por apenas duas semanas em Carnoy (Fig. 28).

Campos, *et al.* (2003a, 2003b) e Zambetaki, *et al.* (1998) já haviam reportado a baixa eficiência de obtenção de cromossomos politênicos e a dificuldade em reconhecer homologia de fragmentos sintênicos em *Culex quinquefasciatus*. Nesses trabalhos manteve-se uma colônia de indivíduos em cativeiro onde, além da possibilidade de se dispor de grande número de espécimes, se controlava as condições de crescimento (velocidade, quantidade, sincronia) para a melhoria visual dos politênicos, tornando tal análise viável. No presente trabalho, a necessidade de se utilizar indivíduos recém-coletados para verificação da variabilidade genética natural, somada à dificuldade intrínseca da análise de politênicos inviabilizou a reprodutibilidade dos dados.

Os resultados obtidos com os experimentos de Southern blot do DNA ribossômico demonstram alta similaridade entre as amostras analisadas (Fig. 29-34). O padrão de bandas obtido não exibiu polimorfismos fixos nas populações. A hipótese levantada anteriormente, de que os polimorfismos do DNAr não estavam sendo evidenciados por não abranger os sítios de restrição reconhecidos pela enzima *EcoRI*, foi eliminada quando os testes feitos com as novas enzimas também não demonstraram polimorfismos.

Uma hipótese pode ser levantada para explicar porque não houve aparecimento de bandas com as enzimas *RsaI* e *AluI* (Fig. 33 e 34). Realizando uma busca no GenBank por seqüências de DNA ribossômico de *Culex* spp. identificamos vários sítios para *RsaI*. Portanto, *RsaI* muito provavelmente fragmentou excessivamente o DNAr pulverizando-o. Já a busca por sítios de *AluI* no DNA ribossômico de *Culex* spp. encontrou somente uma ou duas correspondências dentro da seqüência. Porém, as seqüências de DNA ribossômico disponíveis no GenBank são parciais, geralmente sem conter o NTS. Provavelmente no NTS existem

mais sítios para *AluI* e a explicação para o resultado aqui apresentado com essa enzima possa ser a mesma já dada para *RsaI*.

A partir dos dados de DNAr obtidos no presente estudo não é possível afirmar a presença nem ausência de fluxo gênico. Talvez a análise do DNAr pela metodologia aqui utilizada não seja a mais apropriada para acusar diferenças populacionais nessa espécie.

Caso algum polimorfismo venha a ser algum dia detectado em *Cx. quinquefasciatus*, poderá ser muito útil, a exemplo do que tem ocorrido em estudos filogenéticos (Miller, 1996; Severini, 1996; Navarro, 2004) e taxonômicos de culicídeos (Debrunner-Vossbrinck, *et al.*, 1996; Crabtree, *et al.*, 1995).

As análises morfométricas realizadas revelaram polimorfismos intrapopulacionais e interpopulacionais. Dentro das comparações intrapopulacionais, a assimetria bilateral, embora tênue, existe em todas as populações aqui estudadas e é maior nas populações do Rio Pinheiros, como observamos pelo estudo das distâncias de Mahalanobis. Esse resultado concorda com as observações de muitos autores de que condições de stress ambiental estão associadas com o aumento da assimetria bilateral em várias espécies de insetos como já foi observado em *Culex quinquefasciatus* (Mpho, *et al.*, 2001), *Culex pipiens* (Mpho, *et al.*, 2002), *Drosophila melanogaster* (Woods, *et al.*, 1999) e no complexo *Anastrepha fraterculus* (Souza, *et al.*, 2007).

Interessante notar que os níveis de assimetria bilateral diferem quanto ao sexo. Esse fato evidencia que padrões corporais estão associados ao desempenho das funções diferenciadas de cada sexo (Wekesa, *et al.*, 1998; Forattini, 2002). Ainda quanto à assimetria alar, Mpho, *et al.* (2001) observaram que fêmeas e machos respondem de forma diferenciada ao stress ambiental, sendo fêmeas mais responsivas ao aumento da temperatura e machos mais influenciados pela presença de organofosforados.

O dimorfismo sexual alar conspícuo detectado na análise de forma e de tamanho está de acordo com a suspeita levantada em estudos taxonômicos tradicionais realizados em culicídeos (Lien, 1968) e com outras observações de diversos autores sobre as funções distintas que as asas podem assumir para ambos os sexos. Os machos podem usá-las na produção de sons de corte sexual e as fêmeas para vôos precisos durante busca de alimento, dispersão apetente e oviposição (Wekesa, *et al.*, 1998; Forattini, 2002).

As comparações interpopulacionais e a comparação temporal revelaram divergências na forma e no tamanho alar. Consideramos previamente nesse estudo que a população do Rio

Pinheiros coletada em 2007 consiste em uma população diferente da coletada no mesmo ponto geográfico, mas três anos antes, em 2004. E a comparação entre elas confirmou que realmente se trata de duas populações diferentes. Tanto os machos, como as fêmeas diferenciaram-se nesse período distinguindo-se quanto à forma e quanto ao tamanho alar.

Nas populações de Pinheiros observamos que ocorreu um aumento do tamanho alar em três anos, similarmente ao observado por Jirakanjanakit, *et al.* (2008), que detectaram uma tendência de aumento da asas em 15 gerações de *Ae. aegypti* em cativeiro. Portanto, supomos que ciclos de aumento/diminuição de tamanho possam durar alguns anos. Variação de tamanho alar também está relacionada com perturbação de ambiente como observado por Mpho, *et al.* (2001). Variação temporal de caracteres alares é um fato e deve ser levado em consideração quando asas são usadas em taxonomia. Diagnoses de espécies baseadas em caracteres alares como usualmente feito para o complexo *Culex pipiens* (Linam e Nielsen, 1962), devem ser cuidadosamente reconsideradas.

Na comparação geográfica nota-se que PARI e PIN07 são duas populações distintas quanto à forma a quanto ao tamanho, comportando-se como se não fosse um mesmo grupo panmítico. Na comparação entre as três populações, observa-se nas Fig. 25 e 26, que mesmo com a sobreposição parcial das elipses, existe uma divergência populacional. O resultado encontrado pelo cálculo das Distâncias de Mahalanobis reforça a idéia sugerida na análise do dimorfismo sexual de assimetria alar, de que a microevolução afeta diferencialmente machos e fêmeas. Nas fêmeas, a maior distância da população de Pariquera em relação às outras duas de Pinheiros é coerente com a hipótese de que ocorre diferenciação populacional entre locais sujeitos a muita poluição/inseticidas e locais menos submetidos a esses fatores. Porém, o mesmo não ocorre para os machos de Pariquera, os quais se situam mais próximos à população PIN07 do que esta a PIN04 (Fig. 27).

Como amostras populacionais coletadas em diferentes épocas e mesma localização foram unidas em um único conjunto amostral para a realização de comparações geográficas, foi realizado um teste temporal-geográfico com as amostras A23T2, A45T1 e A40T3. Esse teste serviu para dar mais consistência à discussão realizada aqui, uma vez que, pelo resultado obtido pudemos considerar que a variação geográfica é mais importante que a temporal para diferenciar populações de *Culex quinquefasciatus*.

Com base nessas observações, imagina-se que não há fluxo gênico entre as populações de Pariquera e Pinheiros. Não sabemos ao certo quais são as bases genéticas determinantes

desses caracteres alares e essas comparações não são estimativa precisa de fluxo gênico, mas ainda assim é um indicativo válido de que existe alguma diferenciação. Também não se pode descartar totalmente a hipótese de que as diferenciações populacionais possam ser resultado de plasticidade de caracteres morfométricos ou ainda outros fatores desconhecidos.

Em suma, os resultados de morfometria alar podem significar diferenciação genética populacional ou uma plasticidade relacionada ao tipo de ambiente, já que as populações estudadas vivem sob diferentes condições ambientais. Porém, como observado em outros trabalhos já publicados sobre Culicidae, a variação de forma alar está mais correlacionada a fatores genéticos do que ambientais. (Jirakanjanakit, *et al.*, 2008; Dujardin, 2008).

Em uma tentativa de estimar o fluxo gênico interpopulacional a partir dos presentes resultados de DNAr e de morfometria geométrica alar, duas hipóteses são levantadas. Em uma delas, é possível que essas populações estejam em processo incipiente de diferenciação genética. Neste caso, a diferenciação embora não acusada por DNAr, estaria pronunciando-se através dos caracteres alares. Noutra hipótese, essas populações teriam anteriormente um reduzido fluxo gênico, o qual atualmente foi restabelecido devido a um novo contato entre elas. Isso explicaria porque os caracteres alares são típicos de uma ou outra população, enquanto o DNAr mostrou-se homogêneo.

A presença de fluxo gênico entre essas populações tão distantes geograficamente, pode significar que há ampla dispersão desses mosquitos no Estado de São Paulo. Esse fato teria implicações diretas na transmissão de eventuais doenças veiculadas por esses insetos, os quais são importantes vetores de filarioses e arboviroses.

Este trabalho teve natureza exploratória, de forma que a possibilidade de aplicação prática das informações aqui geradas ainda é incerta. Entretanto, esses resultados indicaram novos caminhos para investigações aprofundadas acerca dos culicídeos-vetores.

6 CONCLUSÕES

1. A espécie *Cx. quinquefasciatus* é polimórfica quanto a caracteres alares.
2. O polimorfismo é geográfico, sendo específico para cada região.
3. Existe diferenciação populacional de forma e tamanho alar.
4. Não há evidência de fluxo gênico interrompido, apesar da existência de polimorfismos geográficos.
5. Possivelmente a velocidade de evolução dos caracteres alares e das porções variáveis do DNAr são diferentes.
6. Há acentuado dimorfismo sexual alar.
7. Fêmeas sofreram alterações alares ao longo do tempo de forma mais pronunciada que os machos.
8. Assimetria bilateral foi mais acentuada no local em que o ambiente é mais hostil.
9. Morfometria geométrica alar poderá ser empregada no estudo de microevolução de Culicidae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Achary PMR. Simple technique for the preparation of polytene chromosomes from *Culex quinquefasciatus*. J Am Mosq Control Ass. 1994; 10(1):112-114.

Ahumada JA, Lapointe D, Samuel MD. Modeling the population dynamics of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), along an elevational gradient in Hawaii. J Med Entomol. 2004; 41(6):1157-70.

ASQC/AIAG Task Force. Fundamental Process Control, Reference Manual, published by the Automotive Division of the American Society for Quality Control Supplier Quality Requirements Task Force, in collaboration with the Automotive Industry Action Group. 1991.

Benedict MQ, Robinson AS. The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. Trends Parasitol. 2003; 19(8):349-55.

Bookstein FL. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge: Cambridge University press; 1997. 455 p.

Bower JE, Cooper RD, Beebe NW. Internal Repetition and Intraindividual Variation in the rDNA ITS1 of the *Anopheles punctulatus* Group (Diptera: Culicidae): Multiple Units and Rates of Turnover. J Mol Evol. 2009; 68(1):66-79.

Bower JE, Downton M, Cooper RD, Beebe NW. Intraspecific concerted evolution of the rDNA ITS1 in *Anopheles farauti sensu stricto* (Diptera: Culicidae) reveals recent patterns of population structure. J Mol Evol. 2008; 67(4):397-411.

Bracco JE, Dalbon M, Marinotti O, Barata JMS. Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. Rev Saúde Pública. 1997; 31(2):182-183.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Brogdon WG. Measurement of flight tone differences between female *Aedes aegypti* and *A. albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1994; 31(5):700-703.

Brogdon WG. Measurement of flight tone differentiates among members of the *Anopheles gambiae* species complex (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1998; 35(5):681-684.

Brooke BD, Hunt RH, Chandre F, Carnevale P, Coetzee M. Stable Chromosomal Inversion Polymorphisms and Insecticide Resistance in the Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2002; 39(4):568-573.

Byrne K, Nichols RA. *Culex pipiens* in London Underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. Heredity. 1999; 82(1):7-15.

Campos J, Andrade CF, Recco-Pimentel SM. Malpighian tubule polytene chromosomes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicinae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003a; 98(3):383-386.

Campos J, Andrade CF, Recco-Pimentel SM. A technique for preparing polytene chromosomes from *Aedes aegypti* (Diptera, Culicinae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003b; 98(3):387-90.

CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo 2006. São Paulo: CETESB, 2007.

Clements AN. The biology of mosquitoes: sensory reception and behavior. Vol 2. Wallingford: CABI; 1999. 740 p.

Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. Insect Mol Biol. 1996; 5(1):1-9.

Consoli RAGB, Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994. 225 p.

Corbel V, Raymond M, Chandre F, Darriet F, Hougard JM. Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates. Pest Manag Sci. 2004; 60(4):375-80.

Crabtree MB, Savage HM, Miller BR. Development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay for the identification of *Culex* vectors of St. Louis encephalitis virus based on interspecies sequence variation in ribosomal DNA spacers. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53(1):105-9.

Daaboub J, Ben Cheikh R, Lamari A, Ben Jha I, Feriani M, Boubaker C, Ben Cheikh H. Resistance to pyrethroid insecticides in *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) from Tunisia. *Acta Trop.* 2008; 107(1):30-6.

Debrunner-Vossbrinck BA, Vossbrinck CR, Vodkin MH, Novak RJ. Restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region of *Culex restuans* and mosquitoes in the *Culex pipiens* complex. *J Am Mosq Control Assoc.* 1996; 12(3):477-82.

Della-Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR, Coluzzi M. Speciation within *Anopheles gambiae*: the glass is half full. *Science.* 2002; 298: 115-117.

Dia I, Lochouarn L, Boccolini D, Costantini C, Fontenille D. Spatial and temporal variations of the chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* in Senegal. *Parasite.* 2000; 7(3):179-84.

Donnelly MJ, Simard F, Lehmann T. Evolutionary studies of malaria vectors. *Trends Parasitol.* 2002; 18(2):75-80.

Dover G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature.* 1982; 299: 111-117.

Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. *Inf Gen Evol* 2008; 8(6):875-890.

Forattini OP. *Culicidologia Médica*. São Paulo: EDUSP; 2002. 864 p.

Forattini OP, Gomes AC, Natal D, Kakitani I, Marucci D. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1987; 21:171-87.

Forattini OP, Gomes AC, Galati EAB, Rabello EX, Iversson LB. Estudos ecológicos sobre mosquitos Culicidae no sistema da Serra do Mar, Brasil: 1 - Observações no ambiente extradomiciliar. Rev Saúde Pública. 1978; 12(3):297-325.

Futuyma DJ. Evolutionary Biology. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates; 1997. 763 p.

Gakhar SK, Vandana. Seasonal variations of culicinae mosquitoes in district Rohtak. J Commun Dis. 1996; 28(3):199-205.

Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR, Cacconel A. Attempts to molecularly distinguish cryptic *taxa* in *Anopheles gambiae* s.s. Insect Mol Biol. 2001; 10: 25-32.

Ghosh AK, Devenport M, Jethwaney D, Kalume DE, Pandey A, *et al.* Malaria Parasite Invasion of the Mosquito Salivary Gland Requires Interaction between the Plasmodium TRAP and the Anopheles Saglin Proteins. PLoS Pathog. 2009; 5(1): e1000265. doi:10.1371/journal.ppat.1000265.

Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV. The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Endotoxins. Annu Rev Entomol. 1992; 37: 615-634.

Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Mello RP. Ecology of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. II - Habitat Distribution. Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). 2000; 95(1):17-28.

Hayes J. Seasonal changes in population structure of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): study of an isolated population. J Med Entomol. 1975; 12(2):167-78.

Hemingway J, Karunaratne SH. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. Med Vet Entomol. 1998; 12(1):1-12.

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. (The Quarterly). Rev Biol. 1991; 66:441-453.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP. The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. Inf Gen Evol. 2008; 8: 414-421.

Jirakanjanakit NS, Leemingsawat S, Thongrungrat C, Apiwathnasorn S, Singhaniyom C, Bellec, Dujardin JP. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. Trop Med Int Health. 2007; 12(11):1354–60.

Jowett T. Preparation of Nucleic Acids. In: Drosophila, a practical approach. Oxford: Roberts DB, editor; 1986. 389 p.

Kovats RS. El Nino and human health. Bull World Health Organ. 2000; 78(9):1127-35.

Labbé P, Berticat C, Berthomieu A, Unal S, Bernard C, Weill M, Lenormand T. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. PLoS Genet. 2007; 3 (11): 205.

Lenormand T, Raymond M. Analysis of Clines with Variable Selection and Variable Migration. Am Nat. 2000; 155(1):70-82.

Lien JC. New Species of Mosquitoes from Taiwan (Diptera : Culicidae) Part V. Three New Subspecies of *Aedes* and Seven New Species of *Culex*. Trop Med. 1968; 10(4):217-262.

Linam JH, Nielsen LT. Notes on the taxonomic separation of adult females of *Culex pipiens* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. Mosq News. 1962; 22:390-93.

Lopes J. Mosquito (Diptera: Culicidae) ecology of natural and artificial rural breeding places in northern Paraná, Brazil. V. Larvae captured in artificial reservoirs installed in ciliary forest. Rev Saúde Pública. 1997; 31(4):370-377.

Luna EJA, Pereira LE, Souza RP. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? Epidemiol Serv Saúde (Brasília). 2003; 12(1):7-19.

Maciel C, de Oliveira Junior VX, Fázio MA, Nacif-Pimenta R, Miranda A, Pimenta PFP, Capurro MR. Anti-*Plasmodium* Activity of Angiotensin II and Related Synthetic Peptides. PLoS ONE. 2008; 3(9):e3296. doi:10.1371/journal.pone.0003296.

Malafrente C, Achilli F. Stem cells mobilization in acute myocardial infarction (stem-AMI trial): preliminary data of a perspective, randomized, single blind trial. Minerva Cardioangiol. 2007; 55(6):721-31.

Mandal SK, Ghosh A, Bhattacharjee I, Chandra G. Biocontrol efficiency of odonate nymphs against larvae of the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. *Acta Trop*. 2008; 106(2):109-14.

Manguin S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio-Palis Y, Danoff-Burg JA, Roberts DR. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60(3):364-76.

Marrelli MT, Floeter-Winter LM, Malafronte RS, Tadei WP, Flores-Mendoza C, Lourenço-De-Oliveira R, Marinotti, O. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. *Med Vet Entomol*. 2005; 19:208-218.

Marrelli MT, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Kloetzel JK, Marinotti O. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1999; 36:679-684.

Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M. Mosquito transgenesis: what is the fitness cost? *Trends Parasitol*. 2006; 22: 197-202.

Mayr E. The Bearing of The New Systematics On Genetical Problems The Nature Of Species. *Adv Genet Incorp Molec Genetic Med*. 1948; 2:205-237.

McAbee RD, Christiansen JA, Cornel AJ. A detailed larval salivary gland polytene chromosome photomap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Johannesburg, South Africa. *J Med Entomol*. 2007; 44(2):229-37.

McLain DK, Collins FH. Structure of rDNA in the mosquito *Anopheles gambiae* and rDNA sequence variation within and between species of the *A. gambiae* complex. *Heredity*. 1989; 62:233-42.

Merritt RW, Dadd RH, Walker ED. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annu Rev Entomol*. 1992; 37:349-76.

Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol Biol*. 1996; 5(2):93-107.

Monteiro LR, Reis SF. Princípios de morfometria geométrica. Ribeirão Preto: Holos; 1999. 189 p.

Moratore C, Suesdek L. Novos caracteres diagnósticos para mosquitos de interesse médico: *Culex quinquefasciatus* e *Culex corniger* (Diptera; Culicidae). Rev Univap. 2008; 15.

Mpho M, Holloway GJ, Callaghan A. A comparison of the effects of organophosphate insecticide exposure and temperature stress on fluctuating asymmetry and life history traits in *Culex quinquefasciatus*. Chemosphere. 2001; 45(6-7):713-20.

Mpho M, Callaghan A, Holloway GJ. Temperature and genotypic effects on life history and fluctuating asymmetry in a field strain of *Culex pipiens* Heredity. 2002; 88:307–312.

Munstermann LE, Conn JE. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera, Culicidae): impact of molecular biology and cladistic analysis. Annu Rev Entomol. 1997; 42:351-69.

Nance E, Heyse D, Britton-Davidian J, Pasteur N. Chromosomal organization of the amplified esterase B1 gene in organophosphate-resistant *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae). Genome. 1990; 33(1):148-52.

Nascimento FM. Morfometria geométrica aplicada ao estudo de variações alares em espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) [Tese (doutorado)]. São Paulo: Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2005.

Natal D, Araújo FAA, Vianna RST, Pereira LE, Ueno HM. O mosquito das águas poluídas. Rev Saneas (São Paulo). 2004; 2(19):26-31.

Navarro JC, Weaver SC. Molecular phylogeny of the Vomerifer and Pedroi Groups in the Spissipes Section of the subgenus *Culex* (*Melanoconion*). J Med Entomol. 2004; 41(4):575-81.

Nayar JK, Knight JW, Munstermann LE. Temporal and geographic genetic variation in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2003; 40(6):882-889.

Pauvolid-Corrêa A, Varella RB. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo. Rev. Bras Epidemiol. 2008; 11(3):463- 72.

Powell JR, Tabachnick WJ, Arnold J. Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. *Science*. 1980; 208(4450):1385-1387.

Reinert JF, Kaiser PE, Seawright JA. Analysis of the *Anopheles (Anopheles) quadrimaculatus* complex of sibling species (Diptera: Culicidae) using morphological, cytological, molecular, genetic, biochemical, and ecological techniques in an integrated approach. *J Am Mosq Control Assoc*. 1997; 13:1-102.

Reisen WK, Lothrop HD, Wheeler SS, Kennington M, Gutierrez A, Fang Y, Garcia S, Lothrop B. Persistent West Nile virus transmission and the apparent displacement St. Louis encephalitis virus in southeastern California, 2003-2006. *J Med Entomol*. 2008; 45(3): 494-508.

Rey L. *Parasitologia* 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 856 p.

Ridley M. *Evolution*. Boston: Blackwell Scientific; 2003. 768 p.

Rocha LS. Caracterização de populações de *Anastrepha sororcula* Zucchi 1979 (Diptera: Tephritidae) por análises cromossômicas, morfométricas e moleculares [Tese (Doutorado)]. São Paulo: Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo; 2005. 127 p.

Roderick GK. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu Rev Entom*. 1996; 41: 325-352.

Rohlf F J. Relative warp analysis and example of its application to mosquito wings. In: Marcus, LF, Bello, E, Garcia-Valdecasas, editors. *Contributions to morphometrics*. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales; 1993. p. 135-159. Monografia.

Rohlf FJ. TpsRelw, relative warps analysis [Computer program]. Version 1.36. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2003a.

Rohlf FJ. TpsRegr, shape regression [Computer program]. Version 1.28. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2003b.

Rohlf FJ. TpsUtil, file utility program [Computer program]. Version 1.26. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2004.

Rohlf FJ. TpsDig, digitize landmarks and outlines [Computer program]. Version 2.05. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. Stony Brook; 2005.

Rosa-Freitas MG, Lourenco-de-Oliveira R, de Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission Source. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93(5):651-655.

Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB, Freier JE, Lien JC. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg. 1983; 32(5):1108-19.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. 1659 p.

Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U, Gurtler RE. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. J Med Entomol. 2004; 41(4):643-9.

Sene FM, Pereira MAQR, Vilela CR. Contrasting Patterns of Differentiation Inferred from Traditional Genetic Markers in the Process of Speciation. Pac Sci. 1988; 42:81-88.

Severini C, Silvestrini F, Mancini P, La Rosa G, Marinucci M. Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Insect Mol Biol. 1996; 5(3):181-6.

Slotman MA, Mendez MM, Della-Torre A, Dolo G, Toure YT, Caccone A. Genetic differentiation between the Bamako and Savanna chromosomal forms of *Anopheles gambiae* as indicated by amplified fragment length polymorphism analysis. Am J Trop Med Hyg. 2006; 74 (4): 641-648.

Secretaria do Estado do Meio Ambiente. Informações básicas para o planejamento ambiental. São Paulo: Coordenadoria de Planejamento Ambiental; 2002. 84 p.

Souza JMG, Gouveia M, Perondini ALP, Selivon D. Asymmetry of frontal bristles and postocular setae in species and hybrids of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). Gen Mol Biol. 2007; 30:145-151.

Sperança MA, Capurro ML. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 (4): 425-433.

StatSoft, Inc. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc; 2004. Available from: <http://www.statsoft.com>.

Swain V, Seth RK, Raghavendra K, Mohanty SS. Characterization of biochemical based insecticide resistance mechanism by thermal bioassay and the variation of esterase activity in *Culex quinquefasciatus*. Parasitol Res. Jan. 2009. (Online)

Tomita T, Kono Y, Shimada T. Chromosomal localization of amplified esterase genes in insecticide resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol. 1996; 26:853-857.

Touré YT, Petrarca V, Traore SF, Coulibaly A, Maiga HM, Sankare O, Sow M, Di Deco MA, Coluzzi M. Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s.str. in Mali, west Africa. Genetica. 1994; 94(2-3):213-23.

Vitek CJ, Richards SL, Mores CN, Day JF, Lord CC. Arbovirus transmission by *Culex nigripalpus* in Florida, 2005. J Med Entomol. 2008; 45(3):483-93.

Ward RA. Third supplement to “A catalog of the mosquitoes of the world” (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1992; 24:177–230.

Wekesa JW, Brogdon WG, Hawley WA, Besansky NJ. Flight tone of field collected populations of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae). Physiol Entomol. 1998; 23 (3):289–294.

Wilke ABB. Controle Genético de Mosquitos *Culex quinquefasciatus* [Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2008.

Wirth MC, Georghiou GP. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. J Am Mosq Control Assoc. 1999; 15(3):315-20.

Woods RE, Sgro CM, Hercus MJ, Hoffmann AA. The association between fluctuating asymmetry, trait variability, trait heritability, and stress: a multiply replicated experiment on combined stresses in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 1999; 53:493–505.

Yebakima A, Marquine M, Rosine J, Yp-Tcha MM, Pasteur N. Evolution of Resistance Under Insecticide Selection Pressure in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) from Martinique. *J Med Entomol*. 2004; 41(4):718-725.

Zambetaki A, Pasteur N, Mavragani-Tsipidou P. Cytogenetic analysis of the Malpighian tubule polytene chromosomes of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Genome*. 1998; 41:751-755.