

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA
ENTRE AS FORMAS *PIPIENS* E *MOLESTUS* DO
MOSQUITO (DIPTERA: CULICIDAE) *CULEX*
PIPIENS L. DA REGIÃO DA COMPORTA,
SETÚBAL, PORTUGAL.**

Ana Rute Côrte-Real Martins

MESTRADO EM BIOLOGIA
(Biologia Humana e Ambiente)

2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA
ENTRE AS FORMAS *PIPIENS* E *MOLESTUS* DO
MOSQUITO (DIPTERA: CULICIDAE) *CULEX*
PIPIENS L. DA REGIÃO DA COMPORTA,
SETÚBAL, PORTUGAL.**

Ana Rute Côrte-Real Martins

Dissertação orientada pelo Doutor João Pedro Soares da Silva Pinto (CMDT.LA) e pela Professora Doutora Maria Teresa Ferreira Ramos Nabais Oliveira Rebelo (FCUL-DBA)

Local de realização do trabalho: Laboratório Associado Centro de Malária e outras Doenças Tropicais (CMDT.LA), Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

MESTRADO EM BIOLOGIA
(Biologia Humana e Ambiente)

2008

Resumo

O complexo de espécies *Culex pipiens* compreende alguns dos mais importantes mosquitos vectores com distribuição global. Os membros deste complexo são vectores de doenças humanas, como a filaríase linfática, a febre do Nilo e a encefalite de St. Louis.

Culex pipiens Linnaeus, 1758 é a espécie do complexo *Culex pipiens* mais ubíqua em regiões temperadas. Nesta espécie estão descritas duas formas biológicas distintas que apresentam características fisiológicas e comportamentais particulares, a forma *molestus* e a forma *pipiens*. A maioria dos estudos em *Culex pipiens* L. que abordaram níveis de diferenciação genética entre estas formas tem incidido principalmente em populações do Norte da Europa, onde a forma *pipiens* predomina em habitats de superfície e a forma *molestus* ocorre quase exclusivamente em habitats subterrâneos. Esta separação física tem sido considerada um factor determinante para o isolamento genético entre as duas formas, consideradas por alguns autores como espécies incipientes. Contudo, no Sul da Europa, populações simpátricas de *pipiens* e *molestus* ocorrem em habitats de superfície, proporcionando assim a oportunidade de surgirem híbridos. Estes híbridos poderão servir como vectores-ponte na transmissão de vírus entre as aves (reservatório natural) e o homem.

Neste trabalho determinou-se a variação morfológica entre as duas formas biológicas (*pipiens* e *molestus*) e estimou-se o nível de diferenciação genética entre as mesmas (com base na análise de ADN microssatélite), utilizando-se amostras provenientes da região da Comporta, Setúbal, Portugal.

Tanto a análise morfológica (com especial ênfase para os caracteres “comprimento das antenas” e “índice sinfonal” das larvas e o carácter “razão D/V” da genitália dos machos adultos) e a análise genética concordam na demonstração da existência de duas subpopulações distintas de mosquitos na região em estudo, correspondentes às formas *pipiens* e *molestus*. Verificou-se ainda a presença de um número considerável de híbridos, sendo estes mais próximos da forma *molestus*. Os resultados são discutidos com base em aspectos evolutivos e epidemiológicos associados a esta espécie.

Palavras-chave:

Culex pipiens L., sistemática de mosquitos, morfologia, microssatélites

Abstract

The *Culex pipiens* complex is a group of sibling species that includes vectors of several diseases such as St. Louis encephalitis, lymphatic filariasis and West Nile Fever. One of these species, *Culex pipiens* Linnaeus 1758, is the most ubiquitous mosquito in temperate regions. It presents two distinct biological forms with different behaviour and ecology: *pipiens* and *molestus*.

In northern Europe, the *molestus* form is found in underground habitats whereas the *pipiens* form occurs at the surface. In southern Europe, both *molestus* and *pipiens* forms occur in sympatry in surface habitats. In northern Europe the physical discontinuity between forms (underground versus surface) may reduce gene flow and thus promote isolation between the forms. The same does not necessarily hold for sympatric populations of southern Europe, where the absence of physical barriers to gene flow may extend the opportunity for hybridisation. Hybrids between the two forms have been reported, the occurrence of which is a major concern for public health. Hybrids may readily feed upon both mammals and birds and therefore have the potential to act as bridge vectors, incidentally transmitting arboviruses to humans from their natural avian reservoirs.

Morphological and genetic (microsatellite) variation was determined in samples of *pipiens* and *molestus* forms, identified by molecular and bio-ecological approaches, from Comporta, Setúbal, Portugal.

Both morphological data (with emphasis for the “sinfonal index” and the “length of antennae” in larvae and the “D/V ratio” in adult male genitalias) and genetic data provided evidence for the occurrence of two distinct populations corresponding to the *molestus* and *pipiens* forms of *Culex pipiens* L.. Hybrids between forms were detected and found to be genetically and morphologically related to the *molestus* form. Results are discussed regarding evolutionary and epidemiological aspects of this species.

Keywords:

Culex pipiens L., mosquito systematics, morphology, microsatellites

Agradecimentos

O meu agradecimento sincero ao Doutor João Pinto e à Professora Teresa Rebelo pela supervisão deste trabalho; os seus ensinamentos, sugestões e críticas, a sua disponibilidade e apoio constantes foram decisivos para a sua concretização.

A todas as outras pessoas e instituições que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho apresento também os meus agradecimentos; em especial, sublinho o meu reconhecimento:

Ao Prof. Dr. Paulo Almeida, UEI Entomologia Médica, pela sua orientação na realização dos estudos morfológicos. À Prof. Dr.^a Carla Sousa e à Dr.^a Teresa Novo pela ajuda nas questões relacionadas com a Entomologia Médica.

Ao Prof. Dr. Virgílio Rosário, pelo apoio prestado como Director da Unidade de Ensino e Investigação de Malária, onde decorreram as análises moleculares deste trabalho, e pela receptividade que demonstrou aquando do meu contacto no sentido de realizar o trabalho conducente a esta dissertação no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais.

Ao Prof. Dr. António Grácio, director da Unidade de Ensino e Investigação de Entomologia Médica, por me ter recebido na sua unidade durante alguns períodos do último ano.

Aos investigadores, colegas e amigos do IHMT, em particular ao Bruno Gomes, José Vicente e Ferdinando Freitas pelo apoio directo à realização deste trabalho. À Patrícia Salgueiro, pelos seus ensinamentos na área da genética populacional.

Ao Laboratório Associado Centro de Malária outras e Doenças Tropicais e ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical por me terem acolhido e pelos apoios concedidos.

Aos meus pais e ao David, à família e aos amigos, que me deram todo o seu apoio na realização desta tese.

Índice de conteúdos

Resumo.....	1
Abstract	2
Agradecimentos	3
Índice de Tabelas	5
Índice de Figuras.....	6
Lista de abreviaturas	7
1. Introdução.....	8
2. Posicionamento do problema	9
2.1. Doenças transmitidas por Artrópodes	9
2.2. Influência de alterações ambientais na (re-)emergência de doenças transmitidas por vectores	10
2.3. O complexo <i>Culex pipiens</i>	11
2.3.1. Posição sistemática e ciclo de vida.....	11
2.3.2. Espécies do complexo <i>Culex pipiens</i>	13
2.4. Formas biológicas de <i>Culex pipiens</i>	14
2.4.1. Importância do estudo das formas <i>pipiens</i> e <i>molestus</i>	15
2.4.2. Diferenciação das formas.....	15
2.5. <i>Culex pipiens</i> em Portugal.....	17
3. Materiais e Métodos.....	18
3.1. Material biológico	18
3.2. Extracção do ADN	19
3.3. Identificação molecular	19
3.4. Grupos de comparação	20
3.5. Estudo morfológico.....	20
3.6. Microssatélites	22
3.6.1. Descrição dos <i>loci</i> e reacção de PCR.....	22
3.6.2. Genotipagem em sequenciador automático	22
3.7. Análise dos dados.....	23
3.7.1. Morfologia.....	23
3.7.2. Genética populacional.....	24
3.7.3. Nível de significância de testes estatísticos	25
4. Resultados	27
4.1. Morfologia	27
4.1.1. Dados morfológicos em relação à autogenia e à estenogamia.....	27
4.1.2. Dados morfológicos em relação à forma molecular	28
4.2. Microssatélites	32
4.2.1. Diversidade genética.....	32
4.2.2. Diferenciação genética.....	33
5. Discussão e considerações finais.....	36
Bibliografia.....	38

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais vectores e doenças que transmitem.....	9
Tabela 2 - Factores que influenciam a (re-)emergência de doenças transmitidas por vectores	10
Tabela 3 - Bio-ecologia das formas pipiens e molestus.....	14
Tabela 4 - Descrição dos <i>loci</i> dos microssatélites	22
Tabela 5 - Análise morfológica de <i>Culex pipiens</i> : comparação entre indivíduos AU e NA e entre indivíduos ES e NS.	27
Tabela 6 - Análise morfológica de <i>Culex pipiens</i> : comparação entre formas M e P.....	28
Tabela 7 - Componentes principais extraídos pela técnica de ACP a partir das características morfológicas analisadas nas larvas.	31
Tabela 8 – Riqueza alélica (R_s), heterozigotia esperada (H_e) e coeficiente de <i>inbreeding</i> (F_{IS}).	32
Tabela 9 – Estimativas de diferenciação genética (F_{ST} e R_{ST}) entre as amostras MP, M e P.....	33
Tabela 10 – Análise de <i>clusters</i> pelo programa STRUCTURE: proporção de indivíduos M, P e MP atribuídos aos <i>clusters molestus</i> e <i>pipiens</i>	35

Índice de Figuras

Figura 1 – Mortes no ano de 2002 associadas a doenças transmitidas por vectores	9
Figura 2 - Doenças emergentes e re-emergentes, 1996-2004	10
Figura 3 - Ciclo de vida do mosquito <i>Culex pipiens</i>	12
Figura 4 - Distribuição dos membros do complexo <i>C. pipiens</i> e espécies próximas	13
Figura 5 - Detalhes da morfologia da larva do mosquito <i>Culex pipiens</i>	16
Figura 6 - Falossoma de machos do complexo <i>Culex pipiens</i>	16
Figura 7 - Caracteres morfológicos estudados	21
Figura 8 - Falossoma da genitália do macho <i>Culex pipiens</i>	21
Figura 9 - Comprimento das antenas em função do índice sinfonal. Comparação entre indivíduos autogénicos e não autogénicos.	29
Figura 10 - Comprimento das antenas em função do índice sinfonal. Comparação entre indivíduos estenogâmicos e não estenogâmicos.....	30
Figura 11 - Comprimento das antenas em função do índice sinfonal. Comparação entre indivíduos das formas M, MP e P.....	30
Figura 12 - Gráfico de dispersão: valores da componente principal 1 (PC1) vs. valores da componente principal 2 (PC2) para as formas <i>molestus</i> (M), híbridos (MP) e <i>pipiens</i> (P).....	31
Figura 13 - Análise Factorial de Correspondência.	34
Figura 14 Análise de <i>clusters</i>	34

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

CMDT.LA – Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Laboratório Associado

ddH₂O – Água bi-destilada, autoclavada

dNTPs – 3'-deoxinucleósido – 5'-trifosfatos

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

pb – Pares de bases nucleotídicas

PCR – Polymerase Chain Reaction

SDS – Doedecil Sulfato de Sódio

UV – Luz ultravioleta

1. Introdução

O presente trabalho insere-se no projecto de investigação científica *Sistemática e evolução de Culex pipiens em Portugal e em ilhas da Macaronésia* (POCI/BIA-BDE/57650/2004) levado a cabo por uma equipa de investigação do CMDT.LA liderada pelo Dr. João Pinto. Este projecto tem como finalidade estudar os padrões de estrutura genética de populações do complexo *Culex pipiens* do sudoeste Europeu e de ilhas da Macaronésia, com vista a uma clarificação das relações filogenéticas e do estatuto taxonómico dos membros deste complexo. Os objectivos específicos são: i) identificar as diferentes espécies e formas comportamentais do complexo *Culex pipiens* em Portugal continental e nas ilhas da Madeira e de Cabo Verde por métodos bioecológicos e moleculares; ii) avaliar os níveis de diferenciação genética inter e intra-específica em áreas de simpatria e de alopatria; iii) contribuir para uma clarificação do estatuto taxonómico das formas *pipiens* e *molestus* em populações meridionais de *Culex pipiens* com base numa abordagem de genética populacional.

A maioria dos estudos em *Culex pipiens* que abordaram níveis de diferenciação genética entre estas formas têm incidido principalmente em populações do Norte da Europa, onde a forma *pipiens* predomina em habitats de superfície e a forma *molestus* ocorre quase exclusivamente em habitats subterrâneos. Esta separação física tem sido considerada um factor determinante para o isolamento genético entre estas formas, consideradas como espécies incipientes. Contudo, no Sul da Europa, populações simpátricas de *pipiens* e *molestus* coexistem em habitats de superfície, proporcionando assim a oportunidade de ocorrer hibridação.

Este trabalho pretende contribuir para uma melhor caracterização das formas *molestus* e *pipiens*, bem como determinar o seu grau de isolamento, em populações de superfície do Sul da Europa. Para tal, utilizou-se uma combinação entre marcadores moleculares e morfológicos na análise de amostras das formas *pipiens* e *molestus* de *Culex pipiens*, provenientes da região da Comporta, Setúbal, Portugal.

Os objectivos centrais desta tese consistem em:

- Determinar a variação morfológica entre as duas formas biológicas (*pipiens* e *molestus*).
- Estimar os níveis de diferenciação genética entre estas formas com base na análise de ADN microssatélite.

Enquadrado o tema desta dissertação e definidos os seus objectivos, apresenta-se a seguir a sua estruturação.

No capítulo 2 é feito o posicionamento do problema. Apresentam-se as principais doenças transmitidas pelos artrópodes, realçando algumas das suas consequências. É descrito o complexo *Culex pipiens* e são apresentadas as formas biológicas da espécie *Culex pipiens* L. (forma *molestus* e forma *pipiens*).

O capítulo 3 descreve os objectos em estudo, quais os materiais empregues e apresenta de uma forma sucinta as técnicas e os métodos utilizados para a obtenção, tratamento e análise de dados.

Os resultados adquiridos pela aplicação dos métodos e técnicas descritos no capítulo 3 são expostos no capítulo 4.

Termina-se com a apresentação das conclusões obtidas com a realização deste trabalho e são identificados alguns dos problemas em aberto que perspectivam linhas de desenvolvimento futuro.

2. Posicionamento do problema

2.1. Doenças transmitidas por Artrópodes

As doenças transmitidas por Artrópodes são um importante problema de saúde pública. Estas doenças são provocadas por agentes patogénicos (*e.g.* vírus, bactérias, protozoários, helmintas, rickettsias) que desenvolvem parte do seu ciclo de vida num artrópode (vector da doença), sendo transmitidos para os humanos e outros animais durante a alimentação sanguínea do vector. De entre os vários Artrópodes vectores de doenças humanas (Tabela 1), os mosquitos são extremamente importantes, sendo responsáveis pela transmissão de doenças tão nefastas para a população humana como a Malária e as arboviroses Dengue, Filaríase Linfática e Febre do Nilo (vírus West Nile) [22].

Tabela 1 - Principais vectores e doenças que transmitem (adaptado de [60]).

Vectores	Doenças
mosquitos	malária, filariase linfática (elefantíase), encefalite japonesa, febre amarela, dengue, vírus West Nile
glossinas (mosca tsé-tsé)	doença do sono (tripanossomíase africana)
triatomídeos	doença de chagas (tripanossomíase americana)
flébotomos	leishmaniose
simúlios (<i>Simulium damnosum</i>)	oncocercose (cegueira dos rios)
pulgas	tifo, peste bubónica
pioelhos	tifo, febre das trincheiras, febre recorrente
carraças	rickettsioses, doença de Lyme, febre recorrente
ácaros	sarna humana (escabiose)

As doenças transmitidas por Artrópodes têm um enorme impacto tanto a nível de saúde pública (Figura 1) como em termos económicos e de desenvolvimento. Afectam particularmente as regiões tropicais do globo, com particular ênfase nos países em desenvolvimento, onde as condições médicas e sanitárias não permitem fazer frente à propagação destas doenças e a implementação de programas de controlo vectorial é muitas vezes ineficaz [22].

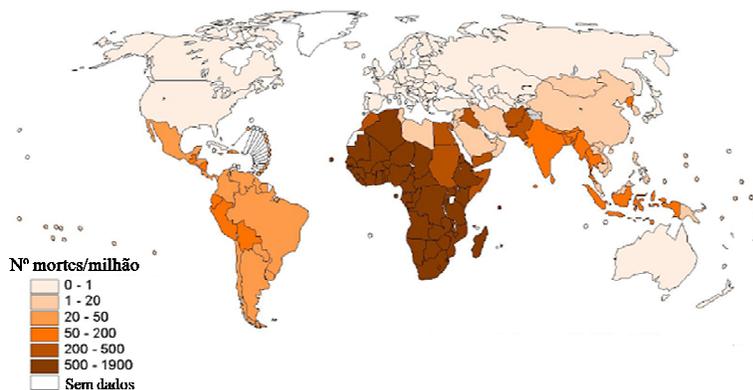


Figura 1 – Mortes no ano de 2002 associadas a doenças transmitidas por vectores (adaptado de [60]).

2.2. Influência de alterações ambientais na (re-)emergência de doenças transmitidas por vectores

Devido essencialmente às alterações climáticas que estão a ocorrer no nosso planeta, mas também às mudanças no comportamento e demografia das populações humanas, tem havido uma crescente preocupação relativamente à emergência ou re-emergência de doenças transmitidas por vectores (Tabela 2).

Tabela 2 - Factores que influenciam a (re-)emergência de doenças transmitidas por vectores (adaptado de [42]).

Factor	Doenças
Aumento da temperatura	Desenvolvimento mais rápido de vectores e agentes patogénicos, alterações na sua distribuição.
Aumento de eventos de grande precipitação	Alteração no padrão de reprodução de mosquitos.
Urbanização	Aumento da taxa de transmissão para uma mesma densidade do vector, aumento de locais de reprodução de vectores. Aumento do contacto entre humanos e vectores em áreas florestais peri-urbanas.
Aumento da mobilidade de pessoas e bens	Aumento da transferência de agentes patogénicos e de vectores de regiões endémicas para regiões sem ocorrência de doença. Aumento da exposição de viajantes a zonas endémicas.

Doenças (re-)emergentes definem-se como doenças que recentemente aumentaram em incidência ou em área geográfica, colonizaram novas populações de hospedeiros ou ainda que são causadas por novos agentes patogénicos [11]. Na Figura 2 apresenta-se um mapa do mundo com as principais doenças (re-)emergentes humanas. A (re-)emergência de doenças transmitidas por artrópodes está intimamente ligada a mudanças na relação hospedeiro/vector – agente patogénico. Um dos pontos-chave na abordagem do problema das doenças transmitidas por artrópodes é o estudo do vector [11].

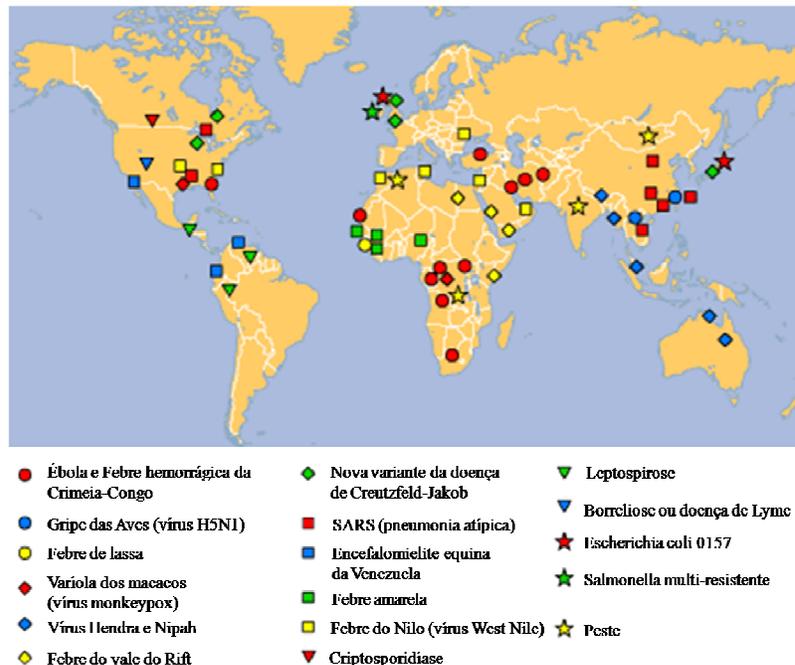


Figura 2 - Doenças emergentes e re-emergentes, 1996-2004 (adaptado de [60]).

Estudos bio-ecológicos e genéticos de populações de artrópodes vectores são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controlo. Em particular, a genética populacional desempenha um papel importante nos estudos epidemiológicos. A genética populacional permite estimar o grau de fluxo genético dentro de uma mesma população e entre diferentes populações de forma a determinar barreiras geográficas, ecológicas e comportamentais [15].

2.3. O complexo *Culex pipiens*

2.3.1. Posição sistemática e ciclo de vida

Os mosquitos (Díptera: Culicidae) são Artrópodes pertencentes à classe Insecta que se caracterizam por possuírem um aparelho bucal do tipo picador-sugador alongado, denominado probóscis, constituído por vários estiletes protegidos por uma bainha comum, antenas formadas por 2 segmentos basais e um flagelo de 13 segmentos subiguais e asas com 3 nervuras bifurcadas na metade distal, com escamas em pelo menos algumas das nervuras. A família Culicidae encontra-se dividida em 3 sub-famílias: Toxorhynquitinae, Anophelinae e Culicinae. O complexo *Culex pipiens* pertence ao género *Culex* da sub-família Culicinae [30].

O ciclo de vida dos culicíneos é semelhante ao dos restantes mosquitos, sendo constituído por uma fase aquática que engloba todos os estados imaturos (ovo, larva e pupa) e uma fase aérea correspondente ao estado adulto (Figura 3).

Os mosquitos fêmea fazem posturas de 50 a 500 ovos em habitats aquáticos cujas características variam consoante as espécies. Assim, a fase aquática pode ocorrer em pântanos, campos de arroz, poças de água, orifícios em árvores e estruturas feitas pelo homem, como poços, pneus e recipientes abandonados. Os ovos dos culicíneos não possuem flutuadores e no caso do género *Culex* são postos em grupos formando “jangadas” que flutuam à superfície da água. Nos trópicos os ovos eclodem 2 a 3 dias após a oviposição, mas em regiões temperadas podem eclodir após 7 a 14 dias [48].

As larvas dos mosquitos caracterizam-se por não possuírem apêndices locomotores e pelo tórax ser mais largo que a cabeça e abdómen (Figura 3). A fase larvar compreende quatro estados, ocorrendo uma muda sempre que se passa de um estado para o seguinte, de forma a permitir o aumento de tamanho (por cada muda é libertado o exoesqueleto quitinoso ou exúvia). As larvas respiram oxigénio atmosférico. A respiração faz-se à superfície da água através de um par de espiráculos situados dorsalmente no VIII segmento abdominal. Os espiráculos estão situados no ápice de um tubo, o sifão, o que permite às larvas ficarem posicionadas obliquamente à superfície da água para respirar (Figura 3) [48].

As pupas têm forma de “vírgula” e tal como as larvas são aquáticas (Figura 3). O tegumento (cutícula) é semi-rígido, servindo de protecção para o desenvolvimento das estruturas do adulto. A cabeça e o tórax estão fundidos (cefalotórax) e a região dorsal apresenta um par de trompetas respiratórias. Apesar de activas, as pupas não se alimentam. A duração do estado de pupa é determinada pela espécie em causa e pela temperatura. Nas zonas tropicais este período demora, em regra, entre 2 e 3 dias podendo, no entanto, decorrer apenas durante 26 horas quando a temperatura média ronda os 30°C. Nas regiões temperadas, a fase de pupa pode durar até uma semana [48].

Os mosquitos adultos emergem das pupas e apresentam um corpo alongado dividido em cabeça, tórax e abdómen. A cabeça possui dois olhos compostos e um par de antenas, plumosas nos machos e pilosas nas fêmeas (Figura 3). A armadura bucal dos mosquitos evoluiu para formar um probóscis adaptado à perfuração e sucção (Figura 3).

Nas fêmeas das sub-famílias Anophelinae e Culicinae, o probóscis é utilizado para perfurar a pele e sugar o sangue dos vasos sanguíneos de animais vertebrados [48].

O tórax é constituído pelo protórax, mesotórax e metatórax. Cada um destes segmentos tem um par de patas. O par de asas funcional insere-se no mesotórax e no metatórax existe um par de asas modificadas designadas por halteres ou balanceiros. O abdómen é constituído por 10 segmentos, dos quais os 2 últimos estão modificados para o desempenho de funções reprodutoras (Figura 3) [48].

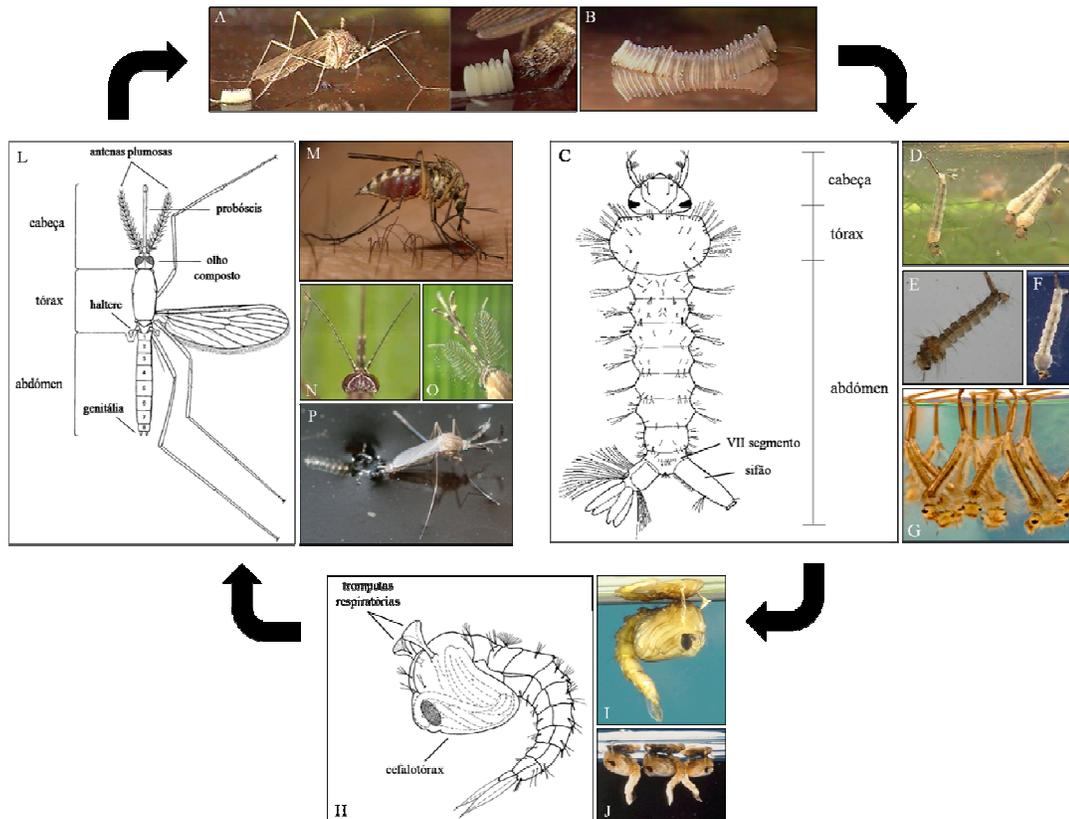


Figura 3 - Ciclo de vida do mosquito *Culex pipiens* (adaptado de [4,5,13,1]). A – oviposição; B – “jangada” de ovos; C – morfologia da larva; D, E, F, G – larvas no estado L4; H – morfologia da pupa; I, J – pupas à superfície da água; L – morfologia do macho adulto; M – fêmea durante alimentação sanguínea; N – antenas pilosas das fêmeas; O – antenas plumosas dos machos; P – macho a emergir da pupa.

No processo de acasalamento dos mosquitos estão envolvidos estímulos visuais, químicos e auditivos. Em algumas espécies o acasalamento pode ser limitado pelo espaço. Espécies caracterizadas por necessitarem de amplos espaços para efectuarem cópula são denominadas de eurigâmicas. As espécies que têm a capacidade de acasalar em espaços reduzidos ($< 0,1m^3$) são denominadas de estenogâmicas. A fêmea, em regra, necessita apenas de uma cópula para ser inseminada para toda a vida, pois durante o acasalamento armazena (nas espermatecas) esperma suficiente para várias posturas [48].

Após a cópula as fêmeas dos mosquitos iniciam o ciclo gonotrófico que corresponde ao desenvolvimento dos ovos. Este começa com a realização de uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado, prossegue com a digestão do sangue e maturação de oócitos, dando origem aos ovos, e termina com a oviposição. A maturação dos oócitos contempla 5 estados definidos com base na morfologia dos folículos ovários (estados de Christopher) [48].

Na maioria das espécies a fêmea necessita de efectuar pelo menos uma refeição sanguínea de modo a obter as proteínas necessárias à maturação dos ovos. Fêmeas que não necessitam de refeição sanguínea para efectuarem posturas denominam-se autogénicas. Clements [9] define autogenia como a produção de ovos ou o desenvolvimento gonotrófico até ao estado III de Christopher, sem que haja ingestão de proteínas pelo adulto. Por outro lado consideram-se como anautogénicas as fêmeas que necessitam obrigatoriamente da ingestão de refeição sanguínea para que a fêmea atinja o estado III de Christopher.

Para realizar uma refeição sanguínea, as fêmeas são atraídas para o hospedeiro através de estímulos como o odor corporal, dióxido de carbono e calor, tendo os estímulos visuais alguma importância em certas espécies. De uma forma geral, todas as espécies demonstram preferência por um determinado tipo de hospedeiro, sendo algumas específicas quanto à escolha da refeição sanguínea. As espécies que se alimentam preferencialmente em hospedeiros humanos são denominadas antropofílicas, enquanto as espécies que se alimentam preferencialmente em outros hospedeiros vertebrados que não o homem, denominam-se de zoofílicas.

Os mosquitos adultos de zonas temperadas e subárticas vivem entre 4 a 5 semanas enquanto em zonas tropicais a longevidade é limitada a cerca de 2 semanas [48]. Por outro lado, as fêmeas que hibernam vivem mais tempo (*e.g. Culex pipiens* na Europa podem sobreviver de Agosto até Maio do ano seguinte). Estas fêmeas são denominadas de heterodinâmicas, visto apresentarem um período de interrupção reprodutivo (diapausa) de forma a resistir aos meses mais frios. Fêmeas que se reproduzem durante todo o ano e não fazem diapausa são classificadas como homodinâmicas [48].

2.3.2. Espécies do complexo *Culex pipiens*

Existe alguma controvérsia relativamente à taxonomia dos membros do complexo *Culex pipiens*. Para além das espécies gémeas descritas - *Culex (Culex) pipiens* Linnaeus, 1758; *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823; *Culex (Culex) pallens* Coquillett, 1898 e *Culex (Culex) australicus* Dobrotworsky & Drummond, 1953 [54] - o complexo é constituído por várias formas, raças, variantes fisiológicas ou biótopos. Geralmente populações de regiões tropicais pertencem a *Culex quinquefasciatus* (Say) e populações de regiões temperadas são representadas por *Culex pipiens* (Linnaeus) [57]. Existem ainda duas espécies próximas - *Culex (Culex) torrentium* Martini, 1925 e *Culex (Culex) pervigilans* Von Bergroth, 1889 - em relação às quais não existe total consenso sobre se devem ou não ser incluídas no complexo (Figura 4) [54].

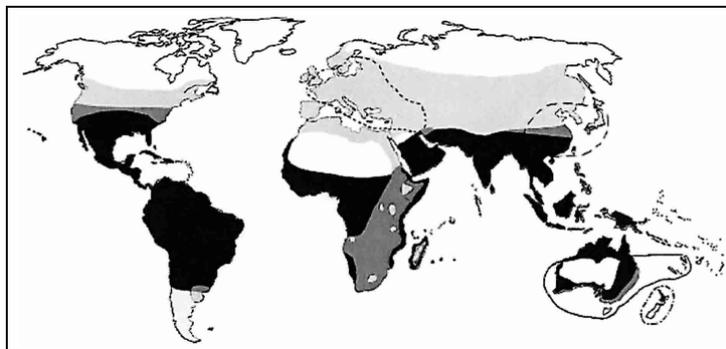


Figura 4 - Distribuição dos membros do complexo *Culex pipiens* e espécies próximas [54]. Cinzento claro - *Culex pipiens*; Preto - *Culex quinquefasciatus*; Cinzento escuro - *Culex pipiens* + *Culex quinquefasciatus*; Linha pontilhada - *Culex torrentium*; Linha tracejada - *Culex pallens*; Linha fechada - *Culex australicus*; Linha pontilhada e tracejada (Nova Zelândia) - *Culex pervigilans*.

Os mosquitos deste complexo são vetores de algumas doenças humanas importantes tais como a febre do Nilo (vírus West Nile), a encefalite de St. Louis e a filaríase linfática.

2.4. Formas biológicas de *Culex pipiens*

Culex pipiens Linnaeus, 1758 apresenta duas formas biológicas com características fisiológicas e comportamentais distintas. A forma *molestus* é estenogâmica, autogénica, mamofílica /antropofílica (alimenta-se em mamíferos, principalmente em humanos) e homodinâmica. A forma *pipiens*, por outro lado, é eurigâmica, anautogénica, ornitofílica (alimenta-se em aves) e heterodinâmica (Tabela 3) [26,27,56].

Tabela 3 - Bio-ecologia das formas *pipiens* e *molestus* [7].

Característica	<i>molestus</i>	<i>pipiens</i>
Produção de ovos	Autogénico (não necessita de refeição sanguínea)	Anautogénico (necessita de refeição sanguínea)
Preferência hemática	Mamofílico (alimenta-se em mamíferos)	Ornitofílico (alimenta-se em aves)
Acasalamento	Estenogâmico (ocorre em espaços confinados)	Eurigâmico (não ocorre em espaços confinados)
Ciclo de vida	Homodinâmico (não efectua diapausa)	Heterodinâmico (efectua diapausa no Inverno)
Local de postura	Hipógeo (subterrâneo)	Epígeo (superfície)

Ambas as formas biológicas têm distribuição geográfica semelhante. No entanto, no norte da Europa e Rússia estas possuem habitats distintos: *molestus* habita locais subterrâneos (túneis de metro, caves e outras construções subterrâneas) enquanto a forma *pipiens* vive à superfície. Neste caso as diferenças entre as formas podem ser interpretadas como adaptações ao habitat subterrâneo. No subsolo, a capacidade de acasalamento em espaço confinado é um pré-requisito, a temperatura é superior (o que leva a que não seja necessário diapausa no inverno) e os nutrientes são adquiridos com maior facilidade no estado larvar. As refeições sanguíneas são mais facilmente obtidas a partir de mamíferos do que a partir de aves. Estas diferenças poderão ser hereditárias, e presumivelmente desvantajosas para populações de superfície [3,7]. O fluxo genético entre populações do subsolo (*molestus*) e de superfície (*pipiens*) é dificultado pela separação física dos dois habitats. Assim, no norte da Europa e Rússia a diferença entre *pipiens* e *molestus* é mais acentuada. Nas regiões mais a Sul, ambas as formas cohabitam à superfície e o carácter que melhor as diferencia é a autogenia [3,7].

O estatuto taxonómico destas formas é um tema sujeito a grande controvérsia. Alguns autores sugerem que a forma *molestus* reflecte apenas a plasticidade adaptativa da espécie, tendo derivado de populações *pipiens* de superfície, através da adaptação local a habitats subterrâneos [27]. Outros defendem que a ocorrência destas formas no Norte da Europa corresponde a um fenómeno de especiação incipiente e estudos recentes de estrutura populacional com base em isoenzimas e ADN microsatélite suportam esta última hipótese [19,7]. Neste cenário Fonseca *et al.* [19] sugerem que as populações que colonizaram os habitats subterrâneos a Norte da Europa derivam de populações autogénicas do Sul da Europa e Norte de África. No Sul da Europa, Norte de África e Estados Unidos da América, populações autogénicas e anautogénicas coexistem nos mesmos habitats, estando associada a autogenia à preferência alimentar em mamíferos e ao grau de antropofilia. A antropofilia foi o carácter que originalmente levou à descrição de uma espécie *Culex molestus* por Forskal em 1775, a partir de espécimes provenientes do Egipto [19]. Apesar das marcadas diferenças bio-ecológicas,

esta espécie foi considerada sinónima de *Culex pipiens* devido à falta de caracteres morfológicos diagnosticantes, bem como à ausência de barreiras reprodutoras pós-copulatórias [19,49]. Para além disso, são encontradas formas intermédias com características biológicas e ecológicas variáveis, o que sugere a ocorrência de hibridação entre populações naturais *molestus* e *pipiens* e a existência de fluxo genético entre elas [7].

2.4.1. Importância do estudo das formas *pipiens* e *molestus*

As formas biológicas *pipiens* e *molestus* apresentam diferentes capacidades vectoriais, facto que estará sem dúvida associado às suas diferentes preferências alimentares. É de particular importância saber se, em situações de simpatria, *pipiens* e *molestus* apresentam isolamento reprodutor e representam populações distintas. O estudo do isolamento genético entre as formas biológicas de *Culex pipiens* é fundamental, na medida em que híbridos entre *pipiens* e *molestus* poderão manifestar a capacidade de realizar refeições sanguíneas tanto em humanos como em aves. Híbridos *pipiens-molestus* podem assim constituir vectores-ponte na transmissão de vírus entre as aves (reservatório natural) e o homem. No caso do vírus West Nile, os vectores-ponte são cruciais para a transmissão da doença uma vez que os humanos e outros mamíferos não desenvolvem normalmente virémia suficientemente elevada para infectar mosquitos que neles se alimentem [19].

Uma das questões essenciais para este tipo de estudo é a possibilidade de traçar cenários epidemiológicos. Por outro lado, conhecendo-se a ocorrência e distribuição da forma *molestus* bem como as suas diferenças relativamente a *pipiens* torna-se possível desenvolver estratégias de controlo mais eficientes [3].

Para além das questões relacionadas com a saúde humana e animal, as relações entre os membros do complexo *Culex pipiens*, e em particular entre as formas *pipiens* e *molestus*, representam um fascinante objecto para estudos relacionados com especiação e evolução de sistemas de espécies gémeas.

2.4.2. Diferenciação das formas

A distinção entre as formas *pipiens* e *molestus* tem sido efectuada através da avaliação dos parâmetros bio-ecológicos que caracterizam cada forma. Isto implica experiências em insectário, nas quais se determinam essencialmente os parâmetros autogenia e estenogamia a partir da progenia de fêmeas capturadas no campo. Estas experiências não só são bastante demoradas como também implicam uma enorme logística [11]. Actualmente aposta-se em três áreas para a obtenção de métodos mais rápidos, práticos e eficientes para a diferenciação das duas formas biológicas de *Culex pipiens*: estudos morfológicos, identificação molecular e estudos genéticos [2,3,19,56].

Estudos morfológicos

A morfologia desempenha um papel crucial na Sistemática e Evolução. Apesar dos recentes avanços em ferramentas moleculares, o uso de caracteres morfológicos e fenéticos ainda constitui um elemento crucial na classificação e identificação de espécies [45].

Apesar da enorme semelhança morfológica entre *pipiens* e *molestus*, estudos feitos com populações dos EUA, Norte da Europa e Rússia evidenciam algumas características morfológicas importantes para a distinção entre as duas formas. No

estado larvar, são indicados o índice sinfonal, o comprimento das antenas, o número de dentes do pente do sifão e o número de ramos da seda da sela (Figura 5) [6,44,57].

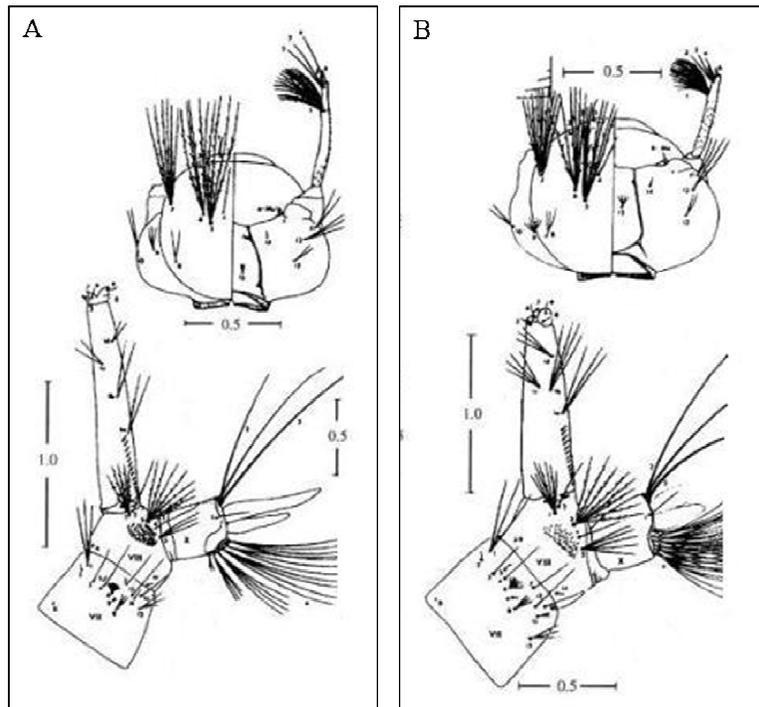


Figura 5 - Detalhes da morfologia da larva do mosquito *Culex pipiens* (estado L4) [57]. A – cabeça e sifão de larva da forma *pipiens*; B - cabeça e sifão de larva da forma *molestus*. Escala em milímetros.

No estado adulto são referidos os palpos e asas das fêmeas. Para a diferenciação entre outros membros do complexo são bastante utilizadas diferenças morfológicas na genitália dos machos (Figura 6) [6,44,57].

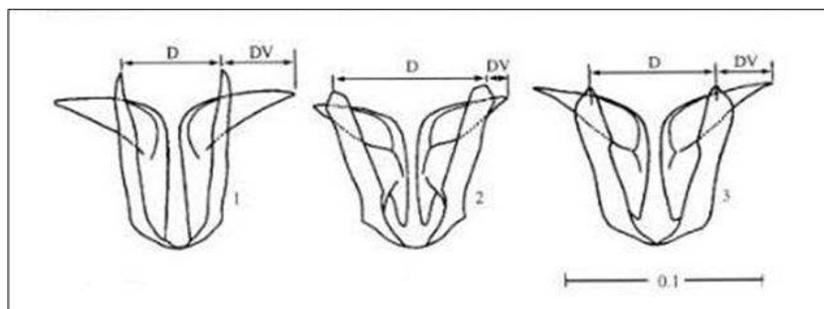


Figura 6 - Falossoma de machos do complexo *Culex pipiens* [57]. 1 – *Culex quinquefasciatus*; 2 – *Culex pipiens*; 3 – Híbrido entre as duas espécies. Escala em milímetros.

Existem, no entanto, alguns problemas com este tipo de identificação. Por exemplo, a possibilidade da degradação do material conduz à adulteração de resultados. Por outro lado, as espécies gémeas, sendo muito semelhantes morfológicamente, tornam a sua distinção com base no fenótipo uma tarefa difícil pois a maioria dos caracteres morfométricos apresentam uma grande sobreposição.

Identificação molecular

Uma das técnicas de identificação molecular que permite a distinção entre *pipiens* e *molestus* é a electroforese de proteínas. Verificou-se que os genes que codificam as enzimas Manosefosfato desidrogenase (MPI), Fosfoglicomutase (PGM), Adenilato cinase (AK-1, AK-2), Hexocinase (HK-1, HK-2, HK-3) e Esterases (EST-1, EST-2, EST-3) apresentam diferenças nas frequências alélicas entre formas [3].

Bahnck & Fonseca [2] desenvolveram uma técnica baseada na variação presente nas regiões flanqueadoras de um dos microssatélites isolados para o complexo *Culex pipiens*, o microssatélite CQ11. Geralmente os microssatélites sofrem mutações a uma taxa bastante superior à de outras regiões do ADN nuclear e normalmente são regiões hiper-polimórficas. Isto pode explicar porque é que a região flanqueadora do locus CQ11 apresenta polimorfismos nas duas formas biológicas. Esta técnica tem por base a presença de deleções (até 18pb) na região flanqueadora do locus CQ11, deleções essas específicas da forma *pipiens* e da forma *molestus* [2]. Estes polimorfismos podem ser facilmente detectados através de ensaios baseados na reacção em cadeia da polimerase (PCR).

Microssatélites e estudos de genética populacional

Os microssatélites são actualmente dos marcadores genéticos mais utilizados em estudos evolutivos e ecológicos. A sua popularidade deve-se à sua ubiquidade no genoma de eucariotas, elevado grau de polimorfismo, co-dominância e facilidade de detecção e visualização. Para além disso são suficientes pequenas quantidades de ADN para a genotipagem destes marcadores, com base em reacções de PCR [37].

Fonseca *et al.* [19] utilizaram um conjunto de oito microssatélites desenvolvidos para espécies do complexo *Culex pipiens*, para analisar populações *Culex pipiens* autogénicas e anautogénicas da Europa e EUA. Os autores demonstraram que no Norte da Europa as formas *pipiens* e *molestus* apresentam elevados níveis de diferenciação genética nos microssatélites analisados, sem evidência de fluxo genético entre elas. No entanto, nos Estados Unidos existe bastante hibridação entre *pipiens* e *molestus* o que poderá ter estado na origem das relativamente recentes epidemias do vírus West Nile na América do Norte.

2.5. *Culex pipiens* em Portugal

Em Portugal, *Culex pipiens* é o mosquito mais abundante e com maior dispersão [16]. Esta espécie foi implicada na transmissão do vírus West Nile, mas não existe informação sobre qual das formas biológicas estaria envolvida [1,16]. Recentemente, estudos bio-ecológicos conduzidos na região da Comporta (distrito de Setúbal, Portugal) confirmaram a presença de populações simpátricas de *pipiens* e *molestus* nessa zona [12,21]. Interessa assim caracterizar a variação genética e morfológica destas formas bem como determinar o grau de hibridação entre elas, de modo a melhor compreender a taxonomia da espécie *Culex pipiens* e a avaliar o potencial estabelecimento de ciclos de transmissão de infecções arbovirais na região em estudo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material biológico

Para a elaboração desta tese foram utilizadas mosquitos *Culex pipiens* previamente capturados na região da Comporta e analisados para os parâmetros autogenia e estenogamia através de experiências realizadas no insectário do IHMT [21].

As colheitas entomológicas foram realizadas entre Maio de 2005 e Setembro de 2006 [21] na região da Comporta. A área do estudo apresenta cerca de 170 km² e 3000 habitantes distribuídos pelas freguesias da Comporta (Concelho de Alcácer do Sal) e Carvalhal (Concelho de Grândola), pertencentes ao distrito de Setúbal, Portugal. Trata-se de uma área de reduzida altitude (0-60m), que se estende até à costa marítima a oeste e onde existem vários campos agrícolas, montados de sobro e pinhais. A norte e noroeste são encontrados sapais, salinas e cerca de 450 hectares de arrozal, sendo estas zonas de particular interesse uma vez que representam potenciais áreas de criação de mosquitos. O clima é temperado com a temperatura média diária oscilando entre os 10°C em Janeiro e os 21°C em Agosto. A precipitação média mensal apresenta valores entre os 45 e os 80 mm, ao longo do ano, excepto na estação seca (Junho a Setembro) em que os níveis de precipitação rondam os 20 mm por mês [21].

As experiências realizadas em insectário foram efectuadas com temperatura média de 27±2°C e humidade relativa de 75±5%.

As fêmeas capturadas (fêmeas parentais) foram mantidas em insectário em gaiolas individuais, até efectuarem postura, morrerem ou, no máximo, durante 30 dias. Após a experiência as fêmeas foram conservadas à temperatura ambiente para futura análise molecular em tubos de 0.5ml contendo sílica gel e algodão.

As posturas (geração F1) provenientes de cada fêmea parental foram criadas individualmente. De cada uma das 4 fases larvares e do estado pupa retiraram-se duas larvas/pupas ou respectivas exúvias (quando o número de exemplares era reduzido) sendo conservadas em álcool (70%) com 4% de glicerina para futuros estudos morfológicos.

A partir do aparecimento da 1ª pupa, as tinas de criação foram transferidas individualmente para gaiolas cúbicas com 20cm de lado. Durante o período de emergência dos adultos e até 2 dias após a emergência do último, uma solução de frutose (10%) constituiu o único alimento disponível. Foi diariamente observado o possível aparecimento de posturas F2 (descendentes da geração F1). As famílias em que ocorreu postura sem alimentação sanguínea foram classificadas como autogénicas. Para as famílias em que não houve postura autogénica dividiram-se os mosquitos em duas gaiolas com rácio sexual 1:1. Uma das gaiolas serviu como controlo para o aparecimento tardio de posturas autogénicas, tendo sido mantida apenas com frutose (10%). Os mosquitos da outra gaiola foram alimentados para determinar a ocorrência de posturas não autogénicas/anautogénicas, de acordo com o procedimento descrito em Freitas [21]. Após 10 dias de disponibilização de refeição sanguínea, mantiveram-se as F1 nas gaiolas por mais 10 dias apenas com frutose (10%), de modo a observar a ocorrência de posturas tardias, tendo em conta possíveis variações na duração do ciclo gonotrófico.

Após este período, sacrificou-se cada família F1 por hipotermia e retiraram-se dois ou três indivíduos de ambos os sexos para futuros estudos morfológicos. Os machos restantes foram conservados em tubos com sílica gel comuns a cada família enquanto as fêmeas foram dissecadas, de modo a avaliar a inseminação e paridade (fecundação). A

dissecção permitiu a determinação do estado de desenvolvimento dos ovários, segundo Christopher [48], das fêmeas F1. O estado de inseminação de cada fêmea foi determinado pela observação microscópica das espermatecas para a detecção de esperma. A cabeça e o tórax de cada exemplar dissecado foram acondicionados em tubos de 0,5ml com sílica gel e algodão, e conservados à temperatura ambiente para posteriores estudos moleculares.

3.2. Extração do ADN

Procedeu-se à extração do ADN das fêmeas F1 através de um protocolo derivado do método descrito por Collins *et al.* [38].

Homogeneizou-se cada indivíduo (utilizando homogeneizador plástico) em 100µl de tampão de lise (Tris-HCl 0.1M pH 8.0, NaCl 0.08M, EDTA 0.06M pH 8.0, SDS 0.5%, sacarose 0.16M em ddH_2O), em tubos de 1.5ml. Seguiu-se uma incubação a 65°C durante 30 minutos. Precipitaram-se as proteínas com 14µl de uma solução de acetato de potássio 8M e incubaram-se em gelo durante 30 minutos. Após centrifugação a 12000xg durante 10 minutos transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Procedeu-se à precipitação do ADN com 200µl de etanol absoluto seguindo-se uma incubação a -20°C durante 1 hora. Efectuou-se centrifugação a 12000xg durante 15 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Cada *pellet* de ADN foi lavado com 200µl de etanol a 70%, seguindo-se centrifugação a 12000xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e os resíduos de etanol evaporados em liofilizador durante cerca de 30 minutos. Por fim eluiu-se o ADN com 100µl de ddH_2O e 100µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0). Na extração de ADN foram utilizados controlos negativos (*i.e.* sem material biológico) de modo a avaliar possíveis contaminações.

3.3. Identificação molecular

As formas biológicas *pipiens* e *molestus* foram identificadas a partir de um método descrito por Fonseca *et al.* [2]. Este método consiste na utilização de uma técnica de PCR para a detecção de um polimorfismo dialélico na região flanqueadora 5' do microssatélite CQ11, cujos alelos alternativos permitem a distinção molecular entre as formas *pipiens* (200pb) e *molestus* (250pb).

A mistura de reacção utilizada consistiu em 7.8µl de ddH_2O , 4µl de Tampão PCR 5x contendo BSA a uma concentração de 150µg/ml, 2µl de $MgCl_2$ 25mM, 2µl de dNTPs 2mM, 1µl de *primer* CQ11F2 3µM, 1µl de *primer* pipCQ11R 2µM, 1µl de *primer* molCQ11R 3µM e 0.2µl de *Taq* ADN polimerase 5U/µl, perfazendo um total de 19µl por amostra, ao qual se juntou 1µl de ADN “molde”.

O programa de PCR incluiu uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 54°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 40 segundos. Após os 40 ciclos ocorreu uma extensão final a 72°C durante 5 minutos, a seguir à qual a reacção foi interrompida a 4°C.

Os produtos da amplificação foram conservados a 4°C até à separação por electroforese em gel de agarose a 2% (Promega) corado com brometo de etídeo numa concentração de 10mg/ml (Sigma) em TBE 1x. As amostras foram carregadas com 4µl de tampão de arrastamento 5x (Fermentas) e aplicados 20µl no gel. Utilizaram-se 5µl de marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas). A electroforese decorreu a 120V, 500A durante uma hora. A visualização das bandas foi efectuada num transiluminador com luz UV e o gel foi fotografado num sistema UVIDOC®.

3.4. Grupos de comparação

Com base nas experiências em insectário e dissecação dos ovários das fêmeas, para determinação da autogenia, classificaram-se os indivíduos em 2 grupos:

- AU - autogénico (pode ocorrer postura sem alimentação sanguínea).
- NA – anautogénico (não ocorre postura sem alimentação sanguínea).

As taxas de inseminação (*i.e.* proporção de fêmeas fecundadas), estimadas em cada família por observação das espermatecas levaram à classificação dos indivíduos em 2 grupos:

- ES – estenogâmico (taxa de inseminação da família $\geq 80\%$).
- NS – não estenogâmico (taxa de inseminação da família $< 80\%$).

A partir do protocolo experimental para a determinação da forma molecular classificaram-se os indivíduos em 3 grupos:

- P - *pipiens* (200/200pb).
- M – *molestus* (250/250pb).
- MP – híbridos entre as duas formas (200/250pb).

Considerou-se que todos os indivíduos da geração F1 têm a mesma classificação que a das suas irmãs em que foram testados os parâmetros autogenia, estenogamia e forma molecular.

3.5. Estudo morfológico

Para a realização do estudo morfológico utilizaram-se indivíduos das famílias obtidas em insectário (geração F1), no estado larvar (larvas em estado L4 e respectivas exúvias larvares) e no estado adulto (machos adultos). Tanto as larvas e exúvias larvares como as genitálias dos machos, foram montadas entre lâmina e lamela em meio H. Ribeiro (PCFF, [43]) e observadas ao microscópio.

Nos indivíduos de estado larvar foram medidas 12 características morfológicas descritas na Figura 7. Todos os caracteres morfológicos estudados consistem em variáveis discretas, excepto o comprimento das antenas e o índice sinfonal que são variáveis contínuas. O comprimento das antenas e o comprimento e largura do sifão foram determinados através de medição com ocular micrométrica e posterior correspondência das unidades da ocular a unidades micrométricas.

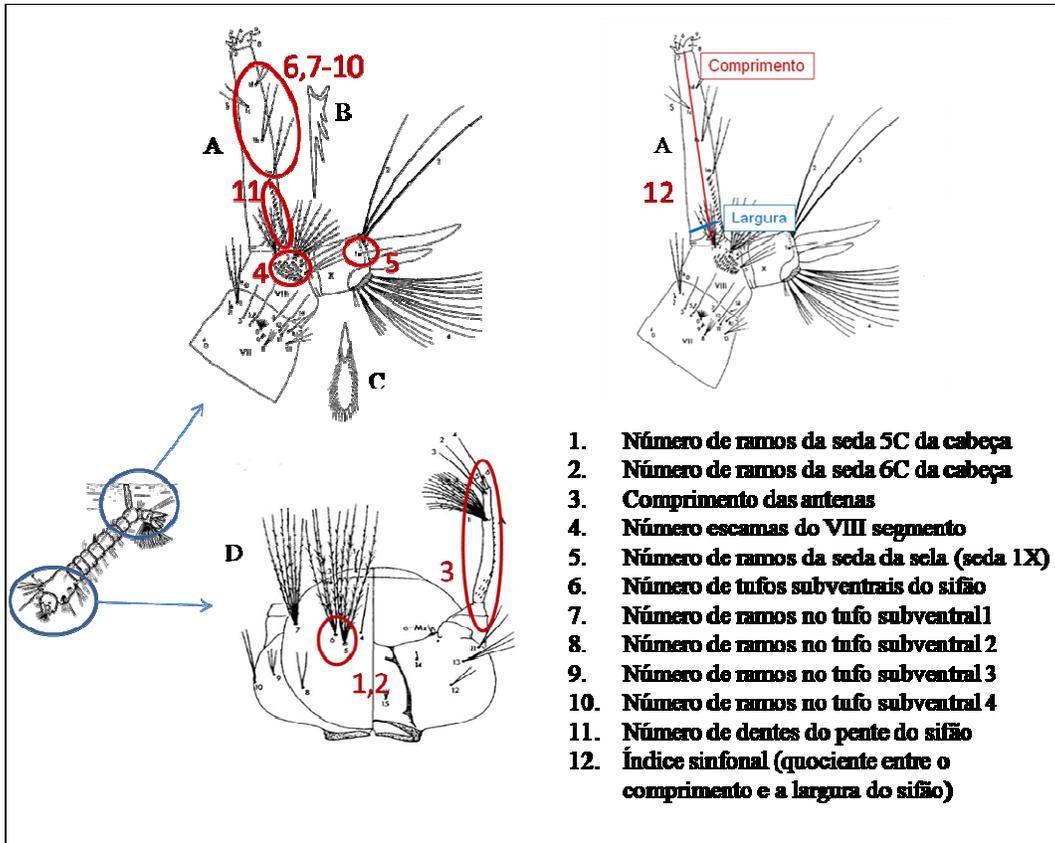


Figura 7 - Caracteres morfológicos estudados (adaptado de [56]). A – sifão; B – dente do pente do sifão; C – escama do segmento VIII do abdómen; D – cabeça.

Nos indivíduos de estado adulto foram determinados 2 índices morfológicos na genitália dos machos, as razões DV/D e D/V (Figura 8). Estes índices apresentam valores contínuos.

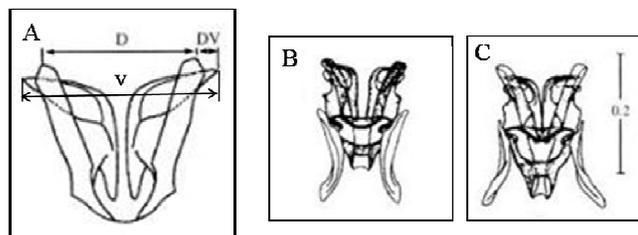


Figura 8 - Falossoma da genitália do macho *Culex pipiens* (adaptado de [56]). A – medições efectuadas (D, V e DV); B - forma *pipiens*; C – forma *molestus*. Escala em milímetros.

3.6. Microssatélites

3.6.1. Descrição dos *loci* e reacção de PCR

Foram utilizados 14 microssatélites descritos para o complexo *C. pipiens* (Tabela 4).

Tabela 4 - Descrição dos *loci* dos microssatélites

<i>Locus</i>	Repetição	<i>Primers</i>	T _A	REF
CQ11	(GT) ₂ ACTTC(GT) ₉	GATCCTAGCAAGCGAGAAC 6-fam -GAGCGCCAAATATTGAGAC	54	1, 3
CQ26	(GTGTGTAT) ₂ +(GT) ₁₀ +(GT) ₅	TCCGACATGGGAAGAGCGCA 6-fam -ACGCGCCCTTCTTCTGCAAC	56	1
CQ41	(GT) ₁₂	CTGCCACTGCCTGACTGAAA Hex -ACCACTCAGCAACATCCGGC	56	1
CxpGT4	(GT) ₅ (GTTT) ₂ GC(GT) ₂ CT(GT) ₅	GTCGTCGCTAACCCCTTGTT Ned -CGCGATAGTCGGTAATCGT	54	2
CxpGT9	(GT) ₁₃	AATCTCCCCGTATAATTGTG Ned -TATAAGACCAGTGAAGCCAG	52	2
CxpGT12	(TG) ₁₄	AACGTGAGCGTGATTGCTC 6-fam -CAGCTGTTGCACCAATGTC	54	2
CxpGT20	(TG) ₁₅	CAACCGCTAAATTGCCTCA Ned -GCAAACCCGATACCGAAT	54	2
CxpGT40	(GT) ₁₅	CATCATCTGTCCACGATCC Hex -TTATGCAGTTGCTGTCATATCC	52	2
CxpGT46	(TG) ₁₅	Hex -CCGACACCGTGTCAAAGAG TGACGACGACGGTACAAGAG	52	2
CxpGT51	(TG) ₄ CG(TG) ₁₅	GAGTATCGCTCGTTGGAGATT Hex -ACCCTCTTTTCTTCTATGTCTGT	54	2
CxpGT53	(TG) ₂₂	6-fam -GTCCCGTTTGGTTGGTTG CCATCTCCTCCTGAATCCTG	52	2
CxQGT4	(GT) ₁₂	ATAGAACTTGTTCCGCGTCTC 6-fam -TCTAAACACGACCACGTACA	54	3
CxQGT6b	(CA) ₈	CAACCAGCAAAAACCCCTCATC Ned -TAGCCGGGCAGATTCATTAC	54	3
CxQTri4	(TGC) ₇	Hex -CTAGCCCGGTATTTACAAGAAC AACGCCAGTAGTCTCAGCAG	54	3

T_A - Temperatura de hibridação, REF – referência bibliográfica: 1 - Fonseca *et al.* [18], 2 - Keyghobadi *et al.* [32], 3 - Smith *et al.* [55].

A mistura de reacção utilizada consistiu em 8.5µl (8.0µl no caso dos *loci* GT46 e CxpGT53) de ddH₂O, 4µl de Tampão PCR 5x, 0.4µl de BSA 10mM, 2µl de MgCl₂ 25mM, 2µl de dNTPs 2mM (2.5µl no caso dos *loci* GT46 e CxpGT53), 1µl de *primer forward* 4µM, 1µl de *primer reverse* 2µM, 0,1µl de *Taq* ADN polimerase 5U/µl e 1µl de ADN molde, perfazendo um total de 20µl por amostra. Utilizaram-se *primers* marcados com os fluorocromos *NED*, *HEX* e *6-FAM* conforme indicado na Tabela 4.

O programa de PCR incluiu uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação com temperatura de 52°C, 54°C ou 56°C consoante o *locus* (Tabela 4) durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. Após os 30 ciclos ocorreu uma extensão final a 72°C durante 5 minutos, a seguir à qual a reacção foi interrompida a 4°C.

3.6.2. Genotipagem em sequenciador automático

Para a genotipagem dos 14 *loci* de microssatélites foram realizados agrupamentos dos *loci* por indivíduo, de acordo com o intervalo de tamanho dos alelos e a marcação fluorescente. Assim, foram aliquoteados 0.5µl de cada produto amplificado aos quais se juntaram 10µl de Formamida *Hi-Di* e 0.5µl do marcador interno *GeneScan-ROX500* (*Applied Biosystems*). As misturas foram efectuadas em placas de 96 poços, que foram

seladas, identificadas e enviadas para uma empresa de sequenciação (*Yale DNA Analysis Facility, EUA*) para análise de fragmentos num sequenciador automático ABI3730 (*Applied Biosystems*).

Após a corrida das amostras no sequenciador automático, uma imagem digital da electroforese é criada. O marcador interno *ROX500* é indicado a vermelho enquanto os produtos amplificados são visíveis a amarelo para o marcador *NED*, a verde para o *HEX* e a azul para o *6-FAM*. O tamanho dos alelos foi determinado tendo como referência o tamanho padrão do marcador interno. Esta imagem foi tratada pelo software *GeneScan* (*Applied Biosystems*) produzindo-se electroferogramas para cada amostra. O tamanho dos alelos (em pares de base) foi determinado a partir dos electroferogramas com auxílio do programa *GeneMarker 1.4* (*SoftGenetics*).

3.7. Análise dos dados

3.7.1. Morfologia

Para determinar quais os caracteres que apresentaram médias estatisticamente diferentes entre os grupos determinados nas análises bio-ecológicas (*vide* ponto 3.1) e moleculares (*vide* ponto 3.3) utilizaram-se vários testes estatísticos que se descrevem a seguir.

O teste T de Student permite testar hipóteses sobre médias de uma variável de nível quantitativo em dois grupos, formados a partir de uma variável qualitativa [39]. Este teste quando aplicado em amostras de dimensão inferior a 30 exige que os grupos tenham distribuição normal. A verificação da normalidade foi efectuada através do teste de aderência de Kolmogorov-Smirnov [39]. Para a aplicação do teste T é necessário que se verifique a homogeneidade das variâncias, pressuposto que foi testado através do teste de Levene [40].

O teste de Mann-Whitney é um teste não paramétrico que serve de alternativa ao teste T quando as suas condições de aplicabilidade não são verificadas. Um teste não paramétrico, tal como o nome sugere, é um teste onde as entidades em estudo não são os parâmetros de uma população. No teste Mann-Whitney as hipóteses a testar são: as duas amostras são provenientes de populações com a mesma distribuição *versus* as duas amostras são provenientes de populações com distribuições distintas [39].

Procedeu-se também a uma análise de componentes principais (ACP) para melhor compreender a diferenciação morfológica entre as formas *pipiens* e *molestus* quando considerados todos os caracteres estudados.

A análise estatística multivariada incide sobre dados com várias dimensões (diferentes características em estudo) relativos ao mesmo indivíduo. A origem comum de cada observação individual leva geralmente a uma dependência ou correlação entre as dimensões [20]. A análise de componentes principais é uma das técnicas da análise estatística multivariada que permite transformar um conjunto de variáveis iniciais correlacionadas entre si, noutra conjunto com um menor número de variáveis não correlacionadas e designadas por componentes principais, que resultam de combinações lineares das variáveis iniciais. O seu objectivo é a redução da dimensão do problema [50]. Os coeficientes que definem cada uma das novas variáveis são escolhidos de modo a que as variáveis derivadas (componentes principais) expliquem a variação máxima nos dados originais e não estejam correlacionadas entre si. A primeira componente principal é construída de forma a explicar a máxima variância dos dados, a segunda componente principal é construída de maneira a ser tão “diferente” da primeira quanto possível e a explicar a máxima variância ainda não explicada pela primeira, e assim sucessivamente [20].

Toda a análise estatística dos dados morfológicos foi realizada com recurso aos *packages* de *software* estatístico SPSS 16.0.1 (SPSS Inc.), MiniTab® 15 (Minitab Inc.) e Microsoft® Office Excel (2003).

3.7.2. Genética populacional

Com base nos genótipos obtidos para os 14 microssatélites para cada grupo analisado, calcularam-se várias estimativas de variabilidade e diferenciação genética que se descrevem a seguir.

A riqueza alélica (R_s) é uma estimativa do número de alelos por *locus* ajustada pelo tamanho da amostra de menor dimensão, o que permite comparações entre amostras de diferentes tamanhos. Estas estimativas foram obtidas pelo algoritmo de El Mousadik & Petit [14], disponível no programa FSTAT 2.9.3.2 [24].

A heterozigotia esperada (H_e) é a proporção esperada de genótipos heterozigóticos na população, assumindo as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estas estimativas foram calculadas no programa FSTAT, de acordo com Nei [36].

O princípio de Hardy-Weinberg traduz a transposição da primeira lei de Mendel do nível familiar para o nível populacional, sendo a expressão da noção de uma população em “equilíbrio genético” [51]. O equilíbrio de Hardy-Weinberg assume uma população hipotética de tamanho teoricamente infinito (ou suficientemente grande de modo a minimizar o efeito da deriva genética), constituída por indivíduos diplóides que acasalam ao acaso, onde a migração, a mutação e a selecção natural são negligenciáveis. Dados estes pressupostos, os genótipos de uma população e as suas frequências alélicas manter-se-ão inalteráveis durante sucessivas gerações e a população será considerada em equilíbrio de Hardy-Weinberg [28]. Os desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg podem resultar de acontecimentos *locus*-específicos (*i.e.* afectam apenas determinados *loci*), tal como a selecção, a presença de alelos nulos ou o acasalamento preferencial entre indivíduos que partilham um determinado fenótipo (*assortative mating*); ou de acontecimentos que afectam todo o genoma, tal como a consanguinidade (*inbreeding*) e a subdivisão da população (efeito de Wahlund) [36]. Para a detecção de desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi seguido o procedimento descrito por Guo e Thompson [25] que utiliza um teste análogo ao teste exacto de Fisher para tabelas de contingência, disponível no programa ARLEQUIN 3.01 [47]. Para cada *locus* microssatélite testou-se a hipótese nula H_0 = união aleatória de gâmetas, com uma hipótese alternativa de défice de heterozigóticos.

O coeficiente de *inbreeding* (F_{IS}) representa a medida da redução da heterozigotia de um indivíduo devido a acasalamentos não aleatórios na população. Quando não existe *inbreeding* ($F_{IS}=0$), as frequências genótípicas encontram-se em proporções de Hardy-Weinberg. A presença de *inbreeding* completo ($F_{IS}=1$) resulta numa população com acasalamentos não aleatórios composta inteiramente por organismos homozigóticos. A determinação do coeficiente de *inbreeding* de cada *locus* foi levada a cabo pelo programa FSTAT. Para avaliar a significância das estimativas de F_{IS} foram efectuados testes de randomização (*i.e.* troca de alelos entre indivíduos), em que o valor p corresponde à proporção de randomizações (em 1000) que apresentaram um valor de F_{IS} superior ao observado.

O desequilíbrio de *linkage* é um termo utilizado para a associação não aleatória de alelos em dois ou mais *loci*, não necessariamente no mesmo cromossoma, e constitui também um indicador de subdivisão populacional [29]. O desequilíbrio de *linkage* descreve a situação na qual algumas combinações de alelos ou de marcadores genéticos ocorrem mais ou menos frequentemente numa população do que o que seria esperado da

formação aleatória de haplótipos a partir de alelos, baseados nas suas frequências [38]. De modo a avaliar a independência dos *loci* microssatélite em estudo, foram executados testes de desequilíbrio de *linkage* genotípico para todos os pares de *loci* através dos testes exactos de Fisher para tabelas de contingência [52], disponíveis no programa ARLEQUIN. Foi usada como hipótese nula os genótipos de um *locus* serem independentes do genótipo de outro *locus*.

O efeito principal da subestrutura das populações é uma diminuição da heterozigotia média entre subpopulações, relativamente à heterozigotia esperada se ocorressem acasalamentos aleatórios numa hipotética população total [29]. Wright [61] propôs a medição dos desvios das frequências genotípicas em termos do parâmetro índice de fixação ou F_{ST} . O F_{ST} mede os efeitos da subdivisão da população e a redução da heterozigotia de uma subpopulação devido à deriva genética. Os métodos que definem a estatística-F baseiam-se em suposições do modelo dos alelos infinitos (IAM), no qual cada alelo idêntico em estado é por definição idêntico por descendência (*i.e.* não existe homoplasia). F_{ST} significativamente diferentes de zero indicam que a deriva genética se faz sentir mais do que o fluxo genético entre populações. Os acasalamentos dentro da mesma população são mais prováveis, mas é necessário apenas um pequeno fluxo genético para contrapor os efeitos da deriva genética [33]. Segundo Wright [62], um F_{ST} maior ou igual a 0.05 é significativo para que ocorra divergência evolutiva entre populações. As estimativas de F_{ST} foram calculadas segundo Weir & Cockerham [58] através do programa FSTAT. A significância dos valores de F_{ST} obtidos (*i.e.* se significativamente diferentes de zero) foi determinada por testes de permutação (*i.e.* permutação de alelos entre amostras) disponíveis no mesmo programa.

Stalkin [53] desenvolveu a estatística, R_{ST} , análoga a F_{ST} , que tem em conta as elevadas taxas de mutação dos microssatélites e a dependência do tamanho do alelo mutante relativa ao tamanho do alelo mutado, baseado no modelo de mutações *stepwise* (SMM). As estimativas de R_{ST} , calculadas segundo Michalakis & Excoffier [35], bem como testes de permutação associados, foram calculadas pelo programa ARLEQUIN.

Foi ainda efectuada uma análise factorial de correspondência (AFC) de modo a visualizar graficamente as distâncias genéticas relativas entre indivíduos. Esta análise permite uma hierarquização da informação disponível por ordem decrescente do grau de explicação do fenómeno em estudo e permite ainda produzir variáveis compósitas que resumem as relações existentes entre as categorias dos atributos observados [40]. Neste estudo, a AFC teve por base estimativas de F_{ST} entre pares de indivíduos. Esta análise foi realizada utilizando o programa GENETIX 4.03.

Com o programa STRUCTURE 2.2 [41] determinou-se o número de clusters (K) existentes nos dados sem informação *a priori* da forma molecular dos indivíduos. Admitiu-se que as frequências alélicas estavam correlacionadas dentro das populações e que o genótipo dos indivíduos poderia resultar de uma combinação de genes de mais do que uma população. Foram efectuadas 10 corridas independentes para cada valor de K (com K de 1 a 4), sendo utilizado o método de Evanno *et al.* [17] para determinar qual o K mais provável. Em seguida realizou-se o mesmo procedimento incluindo informação sobre a forma molecular dos indivíduos.

3.7.3. Nível de significância de testes estatísticos

As estatísticas utilizadas foram testadas a dois níveis de significância para a rejeição da hipótese nula: o nível nominal de significância ($\alpha=0,05$) foi utilizado para testes singulares. Para testes múltiplos, este valor foi corrigido de acordo com o método sequencial de Bonferroni [31], de modo a serem evitados erros do tipo I (falsa rejeição).

A correcção de Bonferroni é uma correcção para comparações múltiplas utilizada quando vários testes estatísticos, dependentes ou independentes, estão a ser realizados simultaneamente. A fim de evitar falsos positivos, é necessário diminuir o nível de significância (α) para ter em conta o número n de comparações a ser realizadas [59].

4. Resultados

4.1. Morfologia

4.1.1. Dados morfológicos em relação à autogenia e à estenogamia

Na Tabela 5 indicam-se os caracteres morfológicos e testes utilizados para a comparação entre as médias dos indivíduos AU e NA e dos indivíduos ES e NS, apresentando-se os valores *p* associados.

Tabela 5 - Análise morfológica de *Culex pipiens*: comparação entre indivíduos autogênicos (AU) e não autogênicos (NA) e entre indivíduos estenogâmicos (ES) e não estenogâmicos (NS).

Característica	AU		NA		<i>p-value</i>	ES		NS		Valor <i>p</i>
	Média DP	N	Média DP	N		Média DP	N	Média DP	N	
Número de ramos da seda 5C	5,41 0,91	210	5,24 0,72	99	MW: 0,049	5,37 1,10	190	5,20 0,81	122	MW: 0,023
Número de ramos da seda 6C	4,57 0,80	218	4,52 0,66	111	MW: 0,807	4,59 0,77	192	4,50 0,72	137	T: 0,247
Comprimento das antenas (µm)	471,07 38,07	234	487,77 28,16	108	T: 0,000	473,01 28,40	200	481,04 44,34	142	MW: 0,000
Número de escamas do VIII segmento	42,49 6,26	142	41,45 5,14	78	T: 0,212	42,51 5,57	125	41,60 6,29	95	T: 0,256
Número de ramos da seda 1X	1,10 0,31	215	1,01 0,10	99	MW: 0,007	1,06 0,27	187	1,08 0,27	127	T: 0,637
Número de tufos subventrais do sifão	4,01 0,26	232	4,11 0,37	111	MW: 0,006	4,01 0,26	197	4,09 0,35	146	MW: 0,014
Número de ramos no tufo subventral 1	3,29 0,90	197	2,82 0,71	92	MW: 0,000	3,36 0,89	175	2,80 0,72	114	MW: 0,000
Número de ramos no tufo subventral 2	3,23 0,90	212	2,92 0,75	95	MW: 0,009	3,28 0,90	189	2,91 0,76	118	MW: 0,001
Número de ramos no tufo subventral 3	2,97 0,79	207	2,79 0,72	105	T: 0,050	2,97 0,78	179	2,83 0,74	133	T: 0,099
Número de ramos no tufo subventral 4	3,03 0,73	217	2,94 0,71	108	T: 0,303	3,05 0,70	183	2,94 0,75	142	T: 0,192
Número de dentes do pente do sifão	14,24 1,95	222	14,10 2,24	113	T: 0,538	14,04 3,01	193	13,82 2,40	148	T: 0,458
Índice sinfonal	3,49 0,47	221	3,95 0,48	113	T: 0,000	3,49 0,43	186	3,84 0,56	148	MW: 0,000
Razão DV/D genitália machos	0,22 0,12	63	0,17 0,15	139	T: 0,004	0,22 0,13	54	0,17 0,14	54	T: 0,035
Razão D/V genitália machos	1,32 0,20	63	1,23 0,19	139	T: 0,015	1,31 0,20	148	1,24 0,19	148	T: 0,020

N – número de indivíduos analisados, DP – desvio padrão, MW – teste Mann-Whitney, T – teste T de Student. Os valores a negrito representam testes significativos depois do ajuste do nível de significância para testes múltiplos, através do método sequencial de Bonferroni.

As características cujas médias são estatisticamente diferentes entre os grupos definidos a partir do parâmetro autogenia são o comprimento das antenas, o número de

ramos da seda da sela (seda 1X), o número de tufos subventrais do sifão, o número de ramos no tufo subventral 1, o índice sinfonal e as razões DV/D e D/V da genitália dos machos.

As características cujas médias são estatisticamente diferentes entre os grupos definidos através do parâmetro estenogamia são o comprimento das antenas, o número de ramos nos tufos subventrais 1 e 2, o índice sinfonal e a razão D/V da genitália dos machos.

As características cujas médias são estatisticamente diferentes em ambas as comparações são o comprimento das antenas, o número de ramos no tufo subventral 1, o índice sinfonal e a razão D/V da genitália dos machos.

4.1.2. Dados morfológicos em relação à forma molecular

Na Tabela 6 indicam-se os testes utilizados para a comparação entre as médias das formas M e P e apresentam-se os valores *p* associados.

Tabela 6 - Análise morfológica de *Culex pipiens*: comparação entre as formas M e P.

Característica	M		P		<i>p-value</i>
	Média DP	N	Média DP	N	
Número de ramos da seda 5C	5,49 0,96	94	5,41 0,77	95	T: 0,533
Número de ramos da seda 6C	4,67 0,75	95	4,64 0,69	107	T: 0,707
Comprimento das antenas (µm)	472,63 26,48	97	486,8 24,97	102	T: 0,000
Número de escamas do VIII segmento	42,17 6,35	63	41,34 5,02	74	MW: 0,807
Número de ramos da seda 1X	1,04 0,25	91	1,03 0,18	95	MW: 0,687
Número de tufos subventrais do sifão	3,97 0,23	96	4,09 0,34	104	MW: 0,005
Número de ramos no tufo subventral 1	3,35 0,8	89	3 0,9	90	T: 0,007
Número de ramos no tufo subventral 2	3,36 0,81	92	3,02 0,88	93	MW: 0,005
Número de ramos no tufo subventral 3	2,99 0,68	90	2,77 0,72	90	MW: 0,030
Número de ramos no tufo subventral 4	3,11 0,76	92	2,88 0,74	91	T: 0,041
Número de dentes do pente do sifão	14,22 3,02	99	13,83 2,1	95	T: 0,298
Índice sinfonal	3,48 0,44	95	4,04 0,47	95	T: 0,000
Razão DV/D genitália machos	0,25 0,11	24	0,17 0,14	127	T: 0,010
Razão D/V genitália machos	1,36 0,21	24	1,23 0,19	127	T: 0,003

N – número de indivíduos analisados, DP – desvio padrão, MW – teste Mann-Whitney, T – teste T de Student. Os valores a negrito representam testes significativos depois do ajuste do nível de significância para testes múltiplos, através do método sequencial de Bonferroni.

As características cujas médias são estatisticamente diferentes entre os grupos definidos a partir do parâmetro forma molecular são o comprimento das antenas, o

número de tufos subventrais do sifão, o número de ramos no tufo subventral 2, o índice sinfonal e as razões DV/D e D/V da genitália dos machos.

De uma análise conjunta das tabelas 5 e 6 pode verificar-se que existem três características que apresentam médias significativamente diferentes em todas as comparações efectuadas: o comprimento das antenas, o índice sinfonal e a razão D/V da genitália dos machos.

No que respeita aos machos adultos, machos com características *molestus* (*i.e.* autogenia, estenogamia e padrão molecular M) apresentam índices D/V em regra superiores aos da forma *pipiens* (tabelas 5 e 6).

Apresentam-se a seguir gráficos de dispersão entre as variáveis medidas no estado larvar (*i.e.* comprimento das antenas e índice sinfonal), em que é possível verificar alguma diferenciação entre os grupos estudados. A Figura 9 sugere que os indivíduos autogénicos possuem um menor índice sinfonal e um menor comprimento de antenas comparativamente aos indivíduos não autogénicos. A Figura 10 sugere que os indivíduos estenogâmicos possuem um menor índice sinfonal e um menor comprimento de antenas comparativamente aos indivíduos não estenogâmicos. A Figura 11 sugere que os indivíduos da forma molecular P (*pipiens*) possuem um maior índice sinfonal e um maior comprimento de antenas comparativamente aos indivíduos da forma M (*molestus*), sendo que os indivíduos híbridos (MP) encontram-se mais próximo da forma M (*molestus*).

Em síntese, indivíduos com características da forma *pipiens* (*i.e.* não autogénicos, não estenogâmicos e com padrão molecular P) apresentam valores de índice sinfonal e de comprimento das antenas em regra superiores aos indivíduos da forma *molestus*.

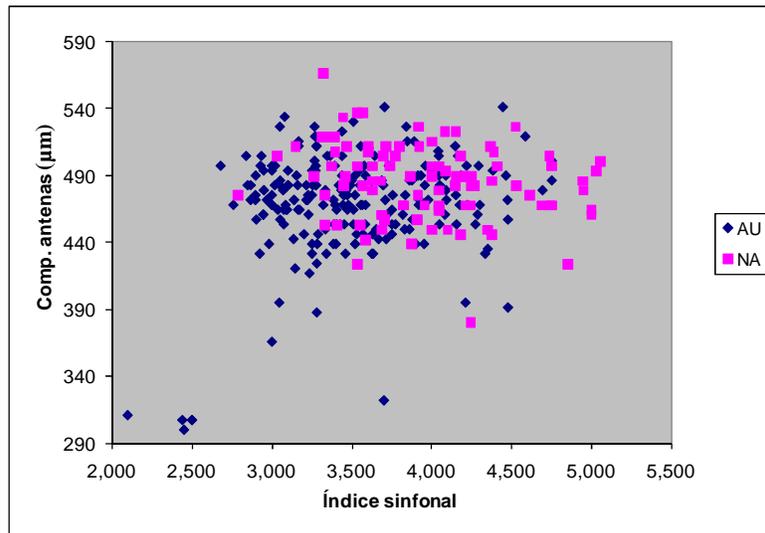


Figura 9 - Comprimento das antenas em função do índice sinfonal. Comparação entre indivíduos autogénicos (AU) e não autogénicos (NA).

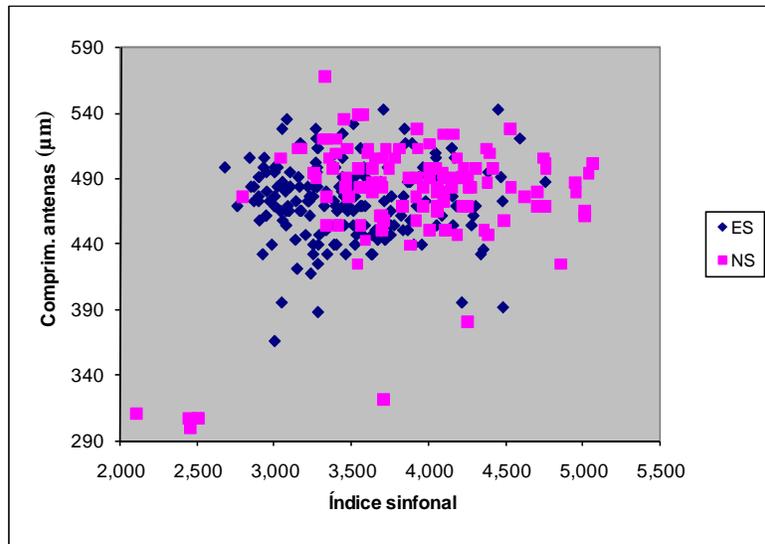


Figura 10 - Comprimento das antenas em função do índice sinfonal. Comparação entre indivíduos estenogâmicos (ES) e não estenogâmicos (NS).

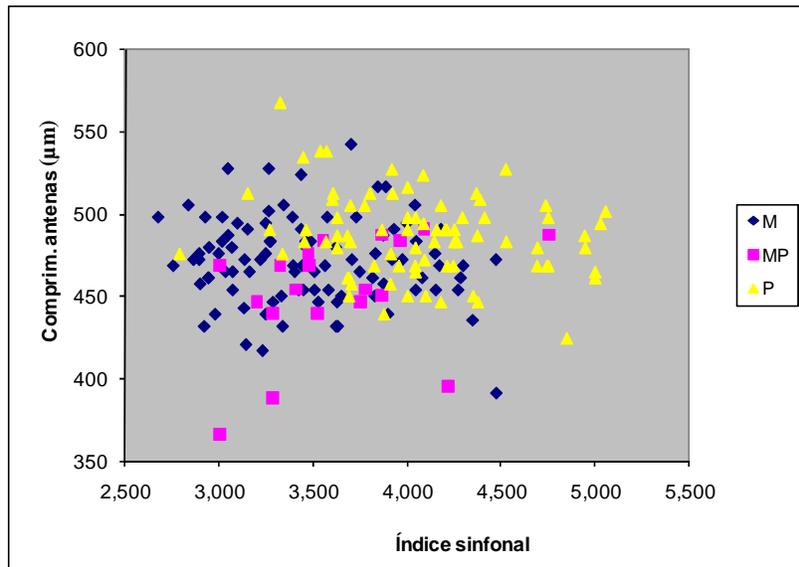


Figura 11 - Comprimento das antenas em função do índice sinfonal. Comparação entre indivíduos das formas M, MP e P.

Após se terem analisado as características morfológicas individualmente, e dada a enorme quantidade de informação disponível, aplicou-se a técnica da análise das componentes principais. Esta análise teve como base os agrupamentos obtidos pela identificação molecular (*i.e.* M, P e MP). A Tabela 7 apresenta os valores próprios associados às primeiras seis componentes principais que explicam cerca de 70% da informação. A abordagem utilizada tratou cada variável como tendo a mesma importância.

Tabela 8 - Componentes principais (PC) extraídos pela técnica de ACP a partir das 12 características morfológicas analisadas nas larvas.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
Valores próprios	2,208	1,648	1,249	1,219	1,057	0,965
Proporção	18,4	13,7	10,4	10,2	8,8	8,1
Cumulativa	18,4	32,1	42,5	52,7	61,5	69,6
Número de ramos da seda 5C	0,286	-0,45	-0,236	0,308	0,058	-0,033
Número de ramos da seda 6C	0,116	-0,371	-0,352	-0,093	-0,201	0,5
Comprimento das antenas	0,117	-0,396	0,409	0,006	-0,253	-0,231
Número de escamas do VIII segmento	0,18	0,019	-0,611	-0,112	0,143	-0,011
Número de ramos da seda 1X	-0,11	-0,117	0,29	0,003	0,741	0,307
Número de tufos subventrais do sifão	-0,219	0,109	-0,256	-0,402	-0,011	-0,539
Número de ramos no tufo subventral 1	0,471	0,298	-0,07	-0,053	0,024	0,145
Número de ramos no tufo subventral 2	0,458	0,236	-0,018	-0,016	0,243	-0,204
Número de ramos no tufo subventral 3	0,415	-0,18	0,154	-0,319	0,317	-0,213
Número de ramos no tufo subventral 4	0,368	-0,143	0,264	-0,302	-0,333	0,022
Número de dentes do pente do sifão	0,131	-0,039	-0,058	0,701	0,032	-0,376
Índice sinfonal	-0,208	-0,527	-0,166	-0,187	0,222	-0,245

PC – componente principal; Proporção – quantidade de variação explicada por cada componente (em %); Cumulativa – proporção acumulada

A partir da análise das contribuições de cada variável para as componentes 1 e 2 (PC1 e PC2) é possível interpretar a Figura 12. Para o factor principal 1 contribuem positivamente o nº de ramos subventrais do sifão e negativamente o índice sinfonal e o número de tufos do sifão. Assim indivíduos com valores positivos de PC1 possuem sifões mais pequenos e menor número de tufos no sifão mas maior número de ramos em cada tufo (*molestus*) enquanto indivíduos que apresentam valores negativos de PC1 possuem sifões maiores e com mais tufos subventrais mas com menos ramos em cada tufo (*pipiens*). O factor principal 2 é influenciado principalmente pelo comprimento das antenas e o índice sinfonal. Indivíduos que apresentam valores positivos de PC2 possuem antenas mais curtas e sifões menos compridos (*molestus*), indivíduos com valores negativos têm sifões e antenas mais compridos (*pipiens*).

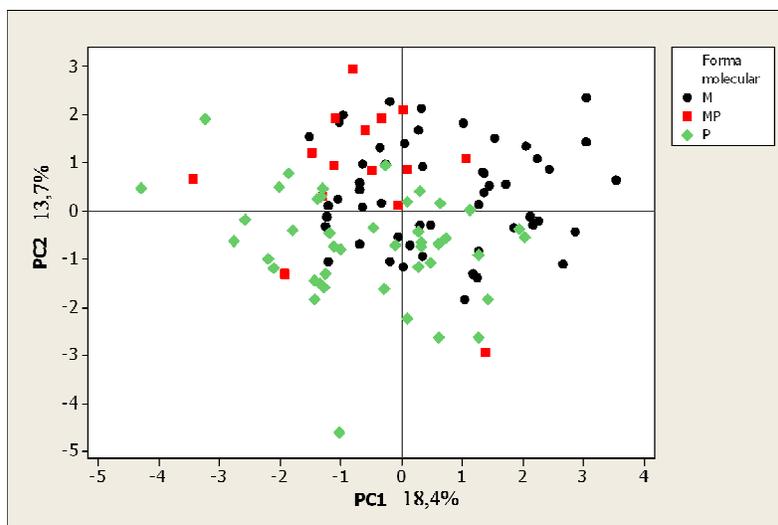


Figura 12 - Gráfico de dispersão: valores da componente principal 1 (PC1) vs. valores da componente principal 2 (PC2) para as formas *molestus* (M), híbridos (MP) e *pipiens* (P).

4.2. Microsatélites

Para o estudo genético foram feitas comparações entre os grupos determinados através da análise molecular (*i.e.* formas moleculares M, MP e P) uma vez que se verificou existir uma forte correlação entre os dados bio-ecológicos e os dados moleculares [23].

4.2.1. Diversidade genética

As estimativas de riqueza alélica, heterozigotia esperada e coeficiente de *inbreeding* encontram-se na Tabela 9. Estas estimativas foram calculadas para cada uma das 3 amostras correspondentes às formas M, MP e P, e também para o conjunto de todos os indivíduos considerado, como uma única população.

Tabela 9 – Riqueza alélica (R_s), heterozigotia esperada (H_e) e coeficiente de *inbreeding* (F_{IS}).

<i>Locus</i>		M (N=78)	MP (N=25)	P (N=42)	Total formas moleculares
GT6B	R_s	3	4	7	8
	H_e	0,635	0,688	0,754	0,681
	F_{IS}	0,079	-0,166	0,006	0,017
CQ11	R_s	2	5	8	9
	H_e	0,031	0,631	0,801	0,606
	F_{IS}	-0,004	-0,536	0,181	0,346
QGT4	R_s	2	3	2	3
	H_e	0,038	0,079	0,047	0,047
	F_{IS}	-0,013	-0,011	-0,012	-0,018
CQ41	R_s	9	9	12	17
	H_e	0,788	0,788	0,831	0,812
	F_{IS}	0,144	0,088	0,262	0,179
GT40	R_s	7	7	10	13
	H_e	0,805	0,731	0,717	0,814
	F_{IS}	0,038	0,238	0,185	0,166
GT09	R_s	6	10	10	14
	H_e	0,740	0,845	0,843	0,816
	F_{IS}	0,521	0,491	0,366	0,482
CQ26	R_s	7	7	10	12
	H_e	0,752	0,815	0,862	0,833
	F_{IS}	0,537	0,579	0,001	0,396
GT53	R_s	14	13	22	28
	H_e	0,892	0,888	0,953	0,914
	F_{IS}	0,186	0,009	0,106	0,134
TRI4	R_s	3	3	4	4
	H_e	0,301	0,316	0,533	0,380
	F_{IS}	0,105	0,116	0,153	0,148
GT04	R_s	4	9	12	14
	H_e	0,637	0,736	0,874	0,748
	F_{IS}	0,092	-0,090	0,052	0,077
GT12	R_s	4	5	7	9
	H_e	0,379	0,483	0,756	0,544
	F_{IS}	0,184	0,193	0,120	0,213
GT51	R_s	12	14	18	26
	H_e	0,866	0,892	0,928	0,890
	F_{IS}	0,131	0,014	0,055	0,089
GT46	R_s	5	9	10	13
	H_e	0,667	0,776	0,851	0,748
	F_{IS}	0,110	0,034	0,194	0,131
GT20	R_s	11	13	17	23
	H_e	0,867	0,893	0,915	0,895
	F_{IS}	0,135	-0,075	0,117	0,104

Na Tabela 9 os valores a negrito representam testes de Hardy-Weinberg significativos depois do ajuste do nível de significância para testes múltiplos, através do método sequencial de Bonferroni.

A forma *pipiens* apresentou uma riqueza alélica média por *locus* mais elevada (11), seguida da forma híbrida (8) e por último a forma *molestus* (6). Analisando os 14 *loci* separadamente, verificou-se que o *locus* com maior riqueza alélica é o GT53 (28) e o de menor é o QGT4 (3).

Em relação aos testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg verifica-se que 10 dos 14 *loci* analisados apresentam déficit de heterozigóticos para a amostra total. No entanto, quando analisadas as amostras individualmente, apenas existem 3 *loci* em desequilíbrio de Hardy-Weinberg para a amostra *molestus*, 3 para a amostra de híbridos e 2 para a amostra *pipiens*. Estes resultados sugerem a existência de subdivisão populacional, isto é, que os indivíduos amostrados pertencem a *pools* genéticos distintos (efeito de Wahlund).

O *locus* GT09 apresentou testes significativos de Hardy-Weinberg e elevados coeficientes de *inbreeding*, indicando fortes défices de heterozigóticos, não só para a população total como para todas as formas moleculares. Tal poderá reflectir um efeito *locus*-específico, tal como a presença de alelos nulos ou de pressões selectivas na região genómica deste *locus*. Assim, o *locus* GT09 foi retirado de análises subsequentes de diferenciação genética, em que a neutralidade dos marcadores genéticos é um requisito.

Foram realizados testes de desequilíbrio de *linkage* para cada par de *loci*. Num total de 273 testes, 60 foram significativos para a amostra total, 8 foram significativos para a amostra *molestus*, 4 foram significativos para a amostra *pipiens* e 1 foi significativo para a amostra híbrida.

4.2.2. Diferenciação genética

Os valores de F_{ST} e R_{ST} calculados para cada par de amostras indicam a existência de diferenciação genética entre as amostras *molestus*, *pipiens* e híbridos (Tabela 10). Para ambos os estimadores, a maior diferenciação é verificada entre *pipiens* e *molestus*. A amostra dos híbridos encontra-se mais diferenciada da amostra *pipiens* do que da amostra *molestus*.

Tabela 10 – Estimativas de diferenciação genética (F_{ST} e R_{ST}) entre amostras MP, M e P.

F_{ST} \ R_{ST}	MP	M	P
MP	-	0,041	0,097
M	0,015	-	0,230
P	0,045	0,104	-

Os valores a negrito representam índices de diferenciação significativamente diferentes de zero, estimados por testes de permutação.

A Figura 13 apresenta os resultados da análise factorial de correspondência efectuada com base em estimativas de F_{ST} entre pares de indivíduos.

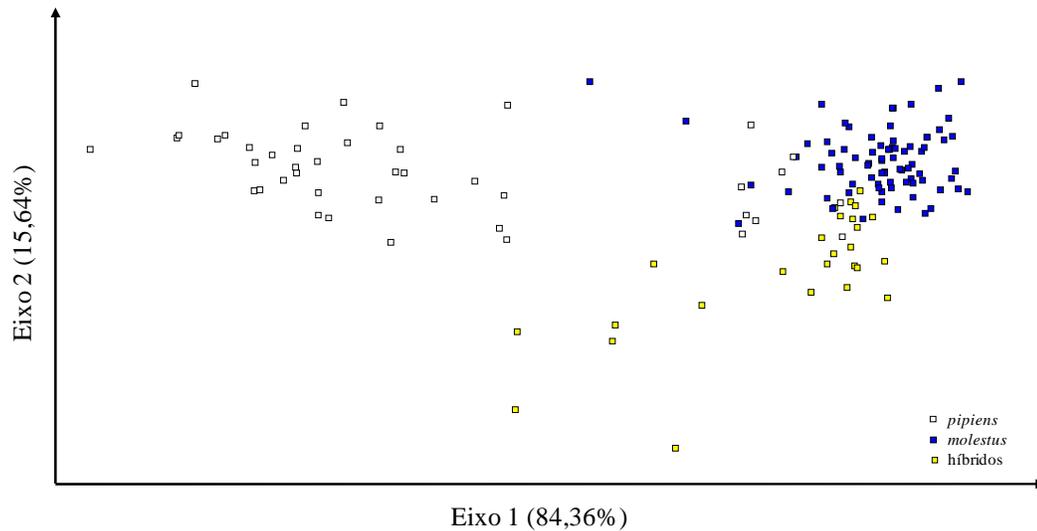


Figura 13 - Análise Factorial de Correspondência.

Esta figura ilustra uma diferenciação nítida entre as formas *pipiens* e *molestus* com base nas distâncias genéticas. Verifica-se que a forma *molestus* é mais homogênea uma vez que os indivíduos desta forma apresentam menores distâncias entre si do que os indivíduos da forma *pipiens*. Os híbridos encontram-se mais próximos da forma *molestus* do que da forma *pipiens*.

Para avaliar a presença de estruturação populacional, realizaram-se duas análises no programa STRUCTURE. Na primeira, não foi dada informação *a priori* sobre a associação de cada indivíduo às formas moleculares M, MP e P. Esta análise permitiu determinar que o melhor número de *clusters* de agrupamento de indivíduos foi $K=2$. Este número corresponde ao agrupamento dos indivíduos em duas populações geneticamente distintas (Figura 14).

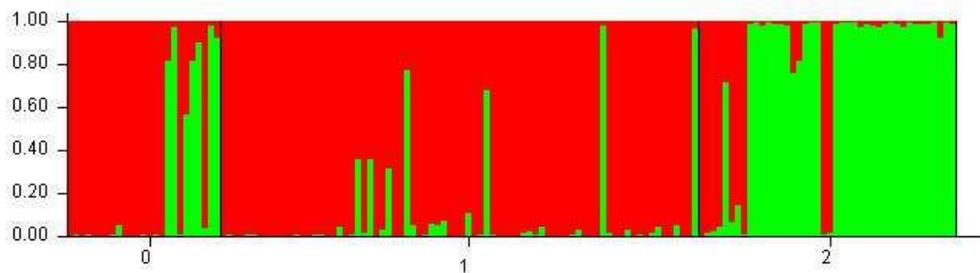


Figura 14 Análise de clusters pelo programa STRUCTURE. Cada coluna corresponde a um indivíduo (eixo horizontal). 0 – híbridos (MP), 1 – *molestus* (M), 2 – *pipiens* (P). No eixo vertical encontram-se as probabilidades de agrupamento a um dos dois clusters ($K=2$), diferenciados a vermelho (*cluster molestus*) e verde (*cluster pipiens*).

Seguidamente, repetiu-se a análise mas com informação sobre a forma molecular a que cada indivíduo pertencia, de modo a confirmar se os dois clusters correspondiam às formas *molestus* e *pipiens*. De igual modo, o melhor número de clusters foi $K=2$. Num dos clusters foram incluídos cerca de 95% dos indivíduos de genótipo *molestus* (M), no outro cluster foram incluídos cerca de 79% dos indivíduos de genótipo *pipiens* (P).

Cerca de 72% dos indivíduos de genótipo híbrido (MP) foram agrupados no *cluster* que agrupou a maioria dos indivíduos *molestus*.

Tabela 11 – Análise de *clusters* pelo programa STRUCTURE: proporção de indivíduos M, P e MP atribuídos aos *clusters molestus* e *pipiens*.

Forma molecular	Cluster 1 (<i>molestus</i>)	P mínimo	Cluster 2 (<i>pipiens</i>)	P mínimo	N
M	94,87	0,639	5,13	0,685	78
MP	72,00	0,943	28,00	0,571	25
P	21,43	0,855	78,57	0,719	42

P mínimo - probabilidade mínima de pertencer ao referido cluster, N – número de indivíduos analisados.

5. Discussão e considerações finais

Neste trabalho, utilizou-se uma combinação entre marcadores morfológicos e moleculares na análise de amostras das formas *pipiens* e *molestus* de *Culex pipiens* L., provenientes da região da Comporta, Setúbal, Portugal. Os objectivos centrais definidos para esta tese consistiram em determinar a variação morfológica entre as duas formas biológicas (*pipiens* e *molestus*) e estimar os níveis de diferenciação genética entre estas com base na análise de ADN microssatélite.

A nível morfológico, demonstrou-se que alguns caracteres podem ser encarados como indicadores de diferenciação entre formas. De facto, concluiu-se que, para esses caracteres, existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias. Tal como já tinha sido descrito por alguns autores [6,44,56,57], este trabalho confirma a relevância dos caracteres “comprimento das antenas” e “índice sinfonal” para a distinção entre as formas *pipiens* e *molestus* no estado larvar. Os indivíduos da forma *pipiens* possuem antenas mais compridas e um índice sinfonal superior relativamente aos indivíduos da forma *molestus*. Deve-se salientar que a maioria dos trabalhos anteriores baseou-se na comparação de amostras *molestus* e *pipiens* provenientes de habitats subterrâneos e de superfície, respectivamente. Neste estudo, as diferenças morfológicas significativas resultaram da comparação de amostras *pipiens* e *molestus* colhidas ambas em habitats de superfície.

Nos adultos, as genitálias dos machos são utilizadas com bastante êxito para a distinção das duas espécies principais deste complexo, *Culex pipiens* e *Culex quinquefasciatus* [46]. No entanto, a nível infra-específico, uma abordagem deste tipo ainda não tinha sido bem sucedida. Uma contribuição original deste trabalho consistiu na verificação de alguma diferenciação no falossoma das genitálias dos machos *pipiens* e *molestus*, estimada a partir da razão D/V.

No entanto, e devido a uma elevada sobreposição dos valores obtidos para as características morfológicas (tanto nas larvas como nos machos adultos), dificilmente estas poderão ser utilizadas como ferramentas para identificar de modo inequívoco indivíduos *C. pipiens* como sendo da forma *molestus* ou *pipiens*.

A análise de componentes principais, apesar das limitações encontradas na sua aplicação (*i.e.* foram necessários 6 componentes principais para explicar 70% da variação), foi concordante com os resultados obtidos quando cada carácter morfológico foi analisado independentemente. Ao serem incluídos na análise os indivíduos híbridos, observou-se uma maior proximidade destes à forma *molestus*, sendo o índice sinfonal o carácter que melhor ilustra esta situação.

A diferenciação morfológica observada entre as formas *pipiens* e *molestus*, bem como a aparente maior proximidade entre híbridos e a forma *molestus* foi igualmente evidenciada pelos dados genéticos. Tanto as análises de variação genética intra-populacional como os índices de diferenciação genética apontam para uma diferenciação significativa entre *pipiens* e *molestus*. Assim, estas duas formas biológicas representam *pools* genéticos distintos, que poderão corresponder a unidades reprodutivas parcialmente isoladas.

Nas estimativas de F_{ST} e R_{ST} , o grupo de híbridos apresentou sempre valores de diferenciação intermédios (quando comparados com os valores entre *pipiens* e *molestus*) mas sempre mais baixos quando as comparações envolveram a forma *molestus*. Esta maior proximidade entre híbridos e a forma *molestus* foi confirmada pela análise factorial de correspondência e pela análise de *clusters*. De notar que na análise de *clusters* 72% dos indivíduos com genótipo híbrido (MP) foram incluídos no grupo *molestus*.

Do que acabou de ser exposto, pode concluir-se que a análise morfológica e a análise genética concordam na demonstração da ocorrência de duas subpopulações de *C. pipiens* distintas, *molestus* e *pipiens*, na região em estudo. A divergência genética associada a uma diferenciação morfológica sugere que o isolamento genético/reprodutivo entre estas formas não será recente. É de esperar que seja necessário maior tempo de isolamento para subpopulações acumularem diferenças morfológicas; é necessário menor tempo para a acumulação de diferenças genéticas [34]. Contudo, este isolamento não é total. Os dados obtidos apontam para a presença de uma fracção importante de híbridos entre *molestus* e *pipiens* na região.

A ocorrência de híbridos entre as formas biológicas de *C. pipiens* é considerada de grande importância a nível epidemiológico. Os híbridos poderão apresentar comportamentos tróficos mais oportunistas, que em termos práticos se traduzem numa apetência para picar tanto em mamíferos quanto em aves [19]. Estas fracções híbridas terão um papel relevante como vectores-ponte, promovendo assim a transmissão de arbovírus entre aves (reservatório natural) e humanos. Neste contexto, as evidências de uma maior proximidade (genética e morfológica) entre híbridos e a forma *molestus* merecem particular atenção. Esta proximidade poderá ser explicada por uma tendência para indivíduos híbridos acasalarem preferencialmente com indivíduos *molestus*. Tal poderá implicar que a forma *molestus* esteja sujeita a um maior nível de introgressão de genes da forma *pipiens*. A verificar-se esta hipótese, a forma *molestus* poderá adquirir uma tendência trófica mais oportunista, com o conseqüente aumento do seu potencial como vector-ponte.

Este trabalho contribuiu para uma melhor caracterização das formas *molestus* e *pipiens* de *C. pipiens*, em populações de superfície do Sul da Europa. A ocorrência das duas formas biológicas, bem como de híbridos, em simpatria levanta questões importantes não só relativamente à evolução desta espécie, mas também ao nível do seu impacto na saúde pública. Analisar se o padrão de diferenciação genética entre as formas é resultado de uma divergência evolutiva a partir de um ancestral comum, ou se corresponde a uma convergência entre duas subpopulações previamente isoladas, resultante de um contacto posterior, é uma questão que merece estudos posteriores. A nível epidemiológico, será de grande relevância efectuarem-se novos estudos entomológicos na região, de modo a avaliar a capacidade vectorial de cada uma das subpopulações (*i.e.* *pipiens*, *molestus* e híbridos). Neste contexto, a análise das preferências hemáticas, de cada forma e da fracção híbrida, poderá contribuir para um conhecimento mais detalhado sobre o papel relativo de cada forma na transmissão de arbovírus na região da Comporta.

Bibliografia

1. Almeida, A.P.G.; Galão, R.P.; Sousa, C.A.; Novo, M.T.; Parreira, R.; Pinto, J.; Rodrigues, J.C.; Piedade, J.; Esteves, A. (2005) Survey for adult mosquitoes in Portugal: distribution, abundance and arboviral infection. *Proceedings 4th International SOVE Congress*, Reno, Nevada, USA.
2. Bahnck, C.M.; Fonseca, D.M. (2006) Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 251-255.
3. Becker, N.; Jöst, A.; Storch, V.; Weitzel, T. (1999) Exploiting the biology of urban mosquitoes for their control. *Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pests*.
4. Biological library - <http://www.biolib.cz/>, consultado a 10/09/2008.
5. BugGuide - <http://bugguide.net>, consultado a 25/08/2008.
6. Burbutis, P.P.; Jobbins, D.M. (1963) Notes on certain Characteristics of two populations of *Culex pipiens* Linn. in New Jersey. *Proceedings of Fiftieth Annual Meeting, New Jersey Mosquito Extermination*.
7. Byrne, K.; Nichols, R. (1999) *Culex pipiens* in London underground tunnels: differentiation between surface and subterranean populations. *Heredity*, 82: 7-15.
8. Centers for Disease Control and Prevention - <http://www.cdc.gov/>, consultado a 25/08/2008.
9. Clements, A.N. (1992) *The Biology of Mosquitoes. Volume 1. Development, Nutrition and Reproduction*. London, Chapman and Hall, 509 pp.
10. Collins, F.H.; Mehaffey, P.C.; Rasmussen, M.O. *et al.* (1988) Comparison of DNA-probe and isoenzyme methods for differentiating *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* (Diptera Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 25: 116-120.
11. Daszak, P.; Cunningham, A.A.; Hyatt, A.D. (2001) Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, 78: 103-116.
12. Diaz, S.; Novo, M.T.; Sousa, C.A.; Alves, R.; Almeida, A.P.G.; Pinto, J. (2006) A biological study of the *Culex pipiens* complex in Comporta, Portugal. *Proceedings 15th European SOVE Meeting*, Serres, Greece.
13. Diptera.info - <http://www.diptera.info>, consultado a 19/08/2008.
14. El Mousadik A.; Petit, R.J. (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 832-839.
15. Eldridge, B. F.; Edman, J. D. (2004) *Medical Entomology: A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods*. Ed. Springer, 659 pp.
16. Esteves, A.; Almeida, A.P.G.; Galão, R.P.; Parreira, R.; Piedade, J.; Rodrigues, J.C.; Sousa, A.C.; Novo, M.T. (2005) West Nile in Southern Portugal. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*, 5: 410-413.
17. Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
18. Fonseca, D.M.; Atkinson, C.T.; Fleischer, R.C. (1998) Microsatellite primers for *Culex pipiens quinquefasciatus*, the vector of avian malaria in Hawaii. *Molecular Ecology*, 7: 1617-1619.

19. Fonseca, D.M.; Keyghobadi, N.; Malcolm, C.; Mehmet, C.; Mogi, M.; Schaffner, F.; Fleischer, R.C.; Wilkerson, R.C. (2004). Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science*, 303: 1535-1538.
20. Fowler, J.; Cohen, L.; Jarvis, P. (1999) *Practical Statistics for Field Biology*. 2nd ed., John Wiley & Sons, 259 pp.
21. Freitas, F.B. (2006) Tese de Licenciatura: *Estudos bio-ecológicos e genéticos do complexo Culex pipiens na região da Comporta, Portugal*, 47 pp.
22. Goddard, J. (1999) *Infectious diseases and arthropods: Their Identification, Biology, and Control*. Ed. Humana Press, 231 pp.
23. Gomes, B.; Novo, M.T.; Sousa, C.A.; Freitas, F.; Alves, R.; Salgueiro, P.; Almeida, P.; Pinto, J. (2008) Diferenciação genética das formas *pipiens* e *molestus* da espécie *Culex pipiens* na região da Comporta (Portugal). *XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Porto Alegre RS, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40 Suppl. I (DAAP023, p. 46)*.
24. Goudet, J. (1995) FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
25. Guo, S.W.; Thompson, E.A. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48 (2): 361-372.
26. Harbach, R.E.; Dahl, C.; White, G.B. (1985) *Culex (Culex) pipiens* Lin. (Diptera, Culicidae): concepts, type, designation and description. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 87: 1-24.
27. Harbach, R.E.; Harrison, B.A.; Gad A.M. (1984) *Culex (Culex) molestus* Forskal (Diptera, Culicidae): neotype designation, description, variation, and taxonomic status. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 86 (3): 521-542.
28. Hartl, D.L. (2000) *A Primer of Population Genetics*. 3rd ed, U.S.A. Sinauer, 221pp.
29. Hartl, D.L.; Clarck, A.G. (2007) *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, 652 pp.
30. Hickman, C. P. *et al.* (2005) *Integrated Principles of Zoology*. McGraw-Hill Higher Education, 872 pp.
31. Holm, S. (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6: 65-70.
32. Keyghobadi, N.; Matrone, M.A.; Ebel, G.; Kramer, L.D.; Fonseca, D.M. (2004) Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. *Molecular Ecology Notes*, 4: 20-22.
33. Krafur, E.S.; Endsley, M.A. (2002) Microsatellite diversities and gene flow in the tsetse fly, *Glossina morsitans s.l.*. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 292-300.
34. Mayr, E. (1970) *Populations, Species, and Evolution: An Abridgment of Animal Species and Evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, 453 pp.
35. Michalakis Y.; Excoffier, L. (1996) A generic estimation of subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, 142 (3): 1061-1604.
36. Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Colombia University Press, New York, 512 pp.
37. Oosterhout, C.V.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
38. Ohta, T. (1982) Linkage disequilibrium due to random genetic drift in finite subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 79: 1940-1944.

39. Pestana, D.D.; Velosa, S.F. (2002) *Introdução à Probabilidade e Estatística, Volume I*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1157 pp.
40. Pestana, M.H.; Gageiro, J.N. (1998) *Análise de dados para Ciências Sociais - A complementaridade do SPSS*. Edições Sílabo, 478pp.
41. Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
42. R. W. Sutherst (2004) Global Change and Human Vulnerability to Vector-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (1): 136-173.
43. Ribeiro, H. (1962) Un nouveau milieu de montage pour microscopie avec l'alcool vinylique polymérisé. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 37: 677-81.
44. Ribeiro, H.; Ramos, H.C. (1999) Identification Keys of the mosquitos (Diptera: Culicidae) of Continental Portugal, Açores and Madeira. *European Mosquito Bulletin*, January 1999.
45. Ridley, M. (2004) *Evolution*. Blackwell Publishing, 751 pp.
46. Sundaraman, S. (1949) Biometrical studies on intergradation in the genitalia of certain populations of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* in the United States. *The American Journal of Hygiene*, 50 (3): 307-314.
47. Schneider, S.; Laval, L.G.; Excoffier, L. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
48. Service, M. W. (2004) *Medical Entomology for Students*. Cambridge University Press, 302 pp.
49. Service, W.M. (1993) Mosquitos (Culicidae) In: *Chapter Five Medical Insects and Arachnids*, eds. Lane, R.; Crosskey, R.W., Chapman & Hall, London, 120-221.
50. Sharma, S. (1996) *Applied Multivariate Techniques*. John Wiley & Sons, 493 pp.
51. Silva, P.J.N. (2004) *Genética Populacional*, 3ª edição, Lisboa, Secção de Folhas, 157 pp.
52. Slatkin, M. (1994) Linkage Disequilibrium in Growing and Stable Populations. *Genetics Society of America*, 137: 391-336.
53. Slatkin, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
54. Smith, J.L.; Fonseca, D.M. (2004) Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids and other sibling species (Diptera: Culicidae) *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70 (4): 339-345.
55. Smith, J.L.; Keyghobadi, N.; Matrone, M.A.; Escher, R.L.; Fonseca, D.M. (2005) Cross-species comparison of microsatellite loci in the *Culex pipiens* complex and beyond. *Molecular Ecology Notes* 5: 697-700.
56. Vinogradova, E.; Shaikovich, E.V. (2007) Morphometric, physiological and molecular characteristics of underground populations of the urban mosquito *Culex pipiens* Linnaeus f. *molestus* Forskål (Diptera: Culicidae) from several areas of Russia. *European Mosquito Bulletin*, 22: 17-24.
57. Vinogradova, E.B. (2000) *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow, 250 pp.
58. Weir, B.S.; Cockerham, C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (6): 1358-1370.
59. Weisstein, E.W. "Bonferroni Correction." From MathWorld - A Wolfram Web Resource: <http://mathworld.wolfram.com/BonferroniCorrection.html>, consultado a 20/09/2008.
60. World Health Organization - <http://www.who.int/en/>, consultado a 10/08/2008.

61. Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.
62. Wright, S. (1978) *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, 592 pp.