CAMILA LORENZ

Caracterização molecular e morfológica de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus* (Diptera; Culicidae) da Mata Atlântica do Estado de São Paulo

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno–Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Suesdek

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

RESUMO

Lorenz C. Caracterização molecular e morfológica de *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus* (Diptera; Culicidae) da Mata Atlântica do estado de São Paulo. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Registros de casos autóctones de malária têm sido reportados na Mata Atlântica do sudeste brasileiro. Na região litorânea do Estado de São Paulo, *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) homunculus* são, respectivamente, vetores principal e secundário de *Plasmodium sp*. Essas duas espécies de anofelinos são de difícil identificação taxonômica, sobretudo as fêmeas. Tal dificuldade tem possivelmente levado à subestimação da importância vetorial de *An. homunculus*. Ambas têm ciclos de vida associados a coleções hídricas de bromélias. Esses anofelinos, embora habitem um largo intervalo altitudinal (entre 5 e 263 metros), apresentam afinidades diferenciais aos microambientes da mata atlântica. Devido a esse contexto, o objetivo do trabalho foi obter diagnose alar para *An. cruzii* e *An. homunculus* além de caracterizar morfológica e geneticamente as populações em perspectiva sazonal, temporal e microambiental. Utilizando a morfometria geométrica foi possível distinguir as espécies *An. cruzii* e *An. homunculus*. Há também acentuado dimorfismo sexual de forma alar nas duas espécies. As populações de *An. cruzii* analisadas em perspectiva sazonal apresentaram diferenciação no formato alar. O gene CO-I mostrou-se altamente polimórfico com apenas dois compartilhamentos entre essas populações, porém com baixo nível de divergência genética (Fst=0,003, Φst=0,007). Populações de *An. homunculus* do inverno também apresentaram alta diferenciação no formato e tamanho alar em relação às do verão. Entretanto nesta espécie o gene CO-I parece estar mais conservado do que em *An. cruzii.* As populações de *An. cruzii* do morro e planície também apresentaram variação no formato alar. O tamanho do centróide nos indivíduos do morro foi ligeiramente maior em todas as comparações. Houve compartilhamento de apenas um haplótipo entre populações do morro e planície. Há evidência de alguma estruturação populacional (Fst= 0,125, Φst=0,121) e baixo número de migrantes (Nm= 1,67) entre os esses microambientes altitudinais em Julho/2012. As comparações temporais tanto em *An. cruzii* como em *An. homunculus* mostraram evidente diferenciação morfológica, ou seja, os caracteres das asas são acusativos de microevolução. Houve altos valores de diferenciação genética intrapopulacional em todos os grupos amostrados (79,6% a 99,3%) e a diversidade haplotípica foi acima de 0,97 em todas as populações de *An. cruzii* analisadas, com poucos haplótipos compartilhados entre as amostras sazonais e geográficas. Os marcadores morfológicos e moleculares utilizados neste estudo parecem evoluir em velocidades diferentes, pois os valores Qst são maiores que os Fst em todas as populações. Os resultados sugerem que existe regionalismo associado à paisagem nas populações de *An. cruzii* do morro e planície, embora sejam geograficamente próximas. Há substituição populacional em curto período de tempo, demonstrado pelo alto número de haplótipos diferentes e formato alar entre inverno e verão.

Palavras-chave: Morfometria geométrica alar. Microevolução. Gene mitocondrial. Microambientes. Sazonalidade. Culicidae.

ABSTRACT

Lorenz C. Morphological and molecular characterization of *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus* (Diptera; Culicidae) in the Atlantic Forest of São Paulo state. [Masters thesis (Biology of Host-Pathogen Relationship)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Records of autochthonous malaria cases have been reported in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. In the coastal region of the state of São Paulo, *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* and *Anopheles* (*Kerteszia*) *homunculus* are, respectively, the primary and secondary vectors of *Plasmodium sp*. These two species are difficult of taxonomic identification, especially females. This difficulty has possibly led to underestimation of the importance of vector *Anopheles homunculus*. Both have life cycles associated with water collections of bromeliads. These anophelines, although inhabit a wide altitudinal range (from 5 to 263 meters), exhibit differential affinities to the microenvironments of the Atlantic Forest. Due to this context, the aim of this research was to obtain wing diagnosis for *An. cruzii* and *An. homunculus,* besides morphological and genetically characterize the populations in seasonal, temporal and microenvironmental perspectives. Using geometric morphometrics was possible to distinguish between species *An. cruzii* and *An. homunculus*. There is also pronounced sexual dimorphism of wing shape in both species. Populations of *An. cruzii* analyzed presented differentiation in wing shape. The CO-I gene was highly polymorphic with only two shares between these populations, but with low level of genetic divergence (Fst = 0,003; Φst = 0,007). Populations of *An. homunculus* of winter also showed high differentiation alar in shape and size to those of the summer. However, in this species, CO-I gene appears to be more conserved than *An. cruzii*. Populations of *An. cruzii* of hill and plain also showed variation in wing shape. The centroid size among individuals of the hill was slightly higher in all comparisons. There was only one haplotype sharing between specimens of hill and plain. There is some evidence of population subdivision (Fst = 0,125; Φst = 0,121) and low number of migrants (Nm = 1,67) between the microenvironments analyzed in July 2012. The temporal comparisons in both *An. cruzii* and *An. homunculus* shown apparent morphological differentiation; the characters of the wings are accusatives of microevolution. There were high values of genetic differentiation within populations sampled in all groups (79,6% to 99,3%), and haplotype diversity was high in all *An. cruzii* populations analyzed with few shared haplotypes among seasonal and geographical samples. The morphological and molecular markers used in this study seem to evolve at different speeds, because the values of Qst are greater than Fst in all populations. The results suggest that regionalism is associated with the landscape in populations of *An. cruzii* of hill and plain, although they are geographically close. There is a significant population replacement in a short period of time, demonstrated by the high number of different haplotypes and wing shape between winter and summer.

Keywords: Morphometric geometrics. Microevolution. Mitochondrial gene. Microenvironments. Seasonality. Culicidae.

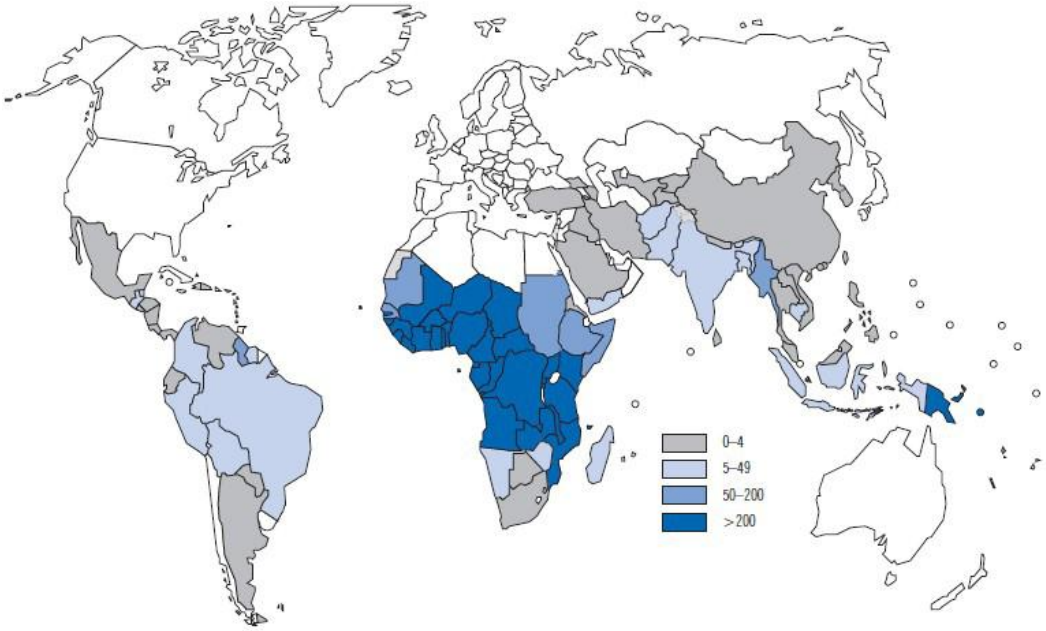
1 INTRODUÇÃO

1.1 A malária e seus vetores

A malária é uma doença parasitária conhecida desde tempos remotos e vem atingindo a humanidade presumivelmente há milhares de anos. Tem maior ocorrência em áreas tropicais e subtropicais, entretanto causa mais prejuízos nos países em desenvolvimento. A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida ao hospedeiro vertebrado pela picada da fêmea infectada do mosquito culicídeo do gênero *Anopheles* (Lima, 2010). A enfermidade caracteriza-se por acessos febris de 24, 48 ou 72 horas, causando problemas no fígado e um quadro de anemia nesse hospedeiro vertebrado (Service, 1996).

Estima-se que mais de 40% da população mundial corre o risco de adquirir a malária (Figura 1). Em apenas um ano, há aproximadamente 300 milhões de novos casos e um milhão de mortes em todo o mundo (Brasil, 2010). No Brasil, o quadro epidemiológico dessa doença é preocupante, porque o número de casos foi superior a 300.000 no ano de 2009. Deste número, 99,9% ocorreram na região amazônica (Brasil, 2010).

Figura 1 - Incidência de casos de malária a cada 1000 habitantes (2006)



(Fonte: *World Malaria Report*, WHO, 2008)

Atualmente são conhecidas aproximadamente 500 espécies da subfamília Anophelinae, mas apenas 70 delas são vetoras do *Plasmodium*. Destas, somente cerca de 20 são envolvidas com malária humana (Service, 1996). Para que um mosquito seja considerado um vetor importante de malária humana, é preciso que ele se alimente preferencialmente de sangue humano (antropofilia) e que seu ciclo de vida seja cronologicamente compatível com a história natural do parasita (Marrelli, 2000). A densidade demográfica de uma população e a proporção de picadas infectantes sobre os humanos também são fatores considerados para determinar a capacidade vetorial de um mosquito numa determinada região (Dye, 1986). As espécies do gênero *Anopheles* de uma forma geral apresentam ampla distribuição geográfica (Consoli, Lourenço-de-Oliveira, 1994). Com o aumento das populações humanas que vem ocorrendo nas áreas endêmicas aliado a fatores como desmatamento e exploração de minerais, essa distribuição pode ser afetada favorecendo o aumento dos índices de malária (Walsh et al., 1993).

Há duas categorias para designar a eficiência de um vetor na transmissão de *Plasmodium:* vetor principal (ou primário), que são as espécies responsáveis pelas transmissões em zonas endêmicas, e vetores auxiliares (ou secundários), os quais apresentam a capacidade de transmissão do plasmódio apenas em determinadas circunstâncias, como o aumento significativo de sua população em uma respectiva área (Forattini, 2002). Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) designam as características de vetores secundários: hábitos exofílicos e zoofílicos, mas que na ausência de hospedeiros preferenciais ou em épocas de elevada densidade podem se alimentar com sangue humano e, ocasionalmente, participam da transmissão da doença (Moutinho, 2010). Também é possível verificar se uma mesma espécie é vetorialmente designada primária e auxiliar, conforme a área de estudo analisada: o *An. rangeli*, por exemplo, que no Brasil é considerado um vetor auxiliar, tem no entanto um importante papel na transmissão da malária em outros países da América do Sul (Quinõnes et al*.,* 2006).

No Brasil, as principais espécies anofelinas envolvidas com a transmissão de malária pertencem à família Culicidae, divididas em dois subgêneros: *Nyssorhynchus (Anopheles darlingi, An aquasalis, An. nuneztovari, An. oswaldoi, An. triannulatus* e complexo *An. albitarsis*) (Marrelli et al*.,* 1999; Tadei, Dutary-Tatcher, 2000) e *Kerteszia (An. cruzii e An. bellator*) (Ramirez, Dessen, 1994), sendo que *An.*

cruzii e *An. darlingi* são considerados vetores primários da doença (Ferreira, Luz, 2003).

Estratégias para o controle dos vetores da malária e de outros culicídeos têm sido desenvolvidas há décadas, como os métodos químicos (inseticidas) e biológico como por exemplo a introdução de predadores ou mosquitos geneticamente modificados (Forattini, 2002). No entanto, a eficiência desses métodos depende, em parte, de um fator intrínseco, particular de cada espécie: sua microevolução. Entende-se por "microevolução" o conjunto de mudanças evolutivas ocorridas em níveis taxonômicos intraespecíficos, ou seja, envolvendo populações (Futuyma, 1997; Ridley, 2003). Os processos microevolutivos ocorrem de forma dinâmica nas populações como resultado da combinação de fatores abióticos e bióticos. Os padrões genotípicos, fenotípicos e cariotípicos resultantes desses processos irão depender da atuação da seleção natural ou da deriva genética. Tudo isso é influenciado pelo fluxo gênico entre as populações e pode culminar numa diferenciação ou convergência de algum caráter nos indivíduos envolvidos (Futuyma, 1997; Ridley, 2003). Visto isso, pode-se compreender que a mobilidade geográfica das populações de anofelinos interfere em seu fluxo gênico e, consequentemente, é uma questão muito importante na sua evolução.

Com a sucessão das várias gerações de mosquitos, pode ocorrer a fixação de caracteres, resultando em resistência a inseticidas, aumento da antropofilia, alterações da capacidade vetorial, tolerância a poluentes ou qualquer outra adaptação favorável ao aumento da população. Consequentemente, faz-se necessário estudar esses processos e padrões de microevolução em Culicidae para auxiliar os mecanismos de controle.

1.2 O subgênero *Kerteszia*

O gênero *Anopheles,* pertencente à família Culicidae, possui espécies que se encontram amplamente distribuídas por toda a região sul-americana, a leste dos Andes, na Colômbia, Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai, Argentina, Brasil e nas Guianas (Consoli, Lourenço-de-Oliveira, 1994). Sua distribuição ocorre em regiões de baixas altitudes, geralmente associada aos cursos d'água e florestas do interior, mas há também presença no litoral. A transmissão autóctone da malária que ocorre

fora da região amazônica se faz principalmente nas regiões de serra do mar, com mata atlântica. Essa situação acontece devido à forte presença de mosquitos do subgênero *Kerteszia* nessas áreas, grupo de anofelinos que obtêm seu desenvolvimento nas águas acumuladas em axilas de bromélias (com exceção de *An. bambusicolus* que se desenvolve nos internódios do bambu) (Sallum et al., 2008).

Os indivíduos agrupados no subgênero *Kerteszia* possuem algumas peculiaridades que os separam dos demais anofelinos, como seus hábitos "bromelícolos" (Figura 2). As condições atmosféricas são fundamentais para a constância da sua ocorrência, seus habitats são extremamente específicos e dependentes do biótopo.

Figura 2 - Bromélias do gênero *Vriesia* (esquerda) e *Nidularium* (direita) utilizadas para oviposição de anofelinos do subgênero *Kerteszia.*

(Fonte: Karl Slatner, 2012)

Os três habitats preferencialmente ocupados pelas três espécies principais desse subgênero (*An. cruzii, An. homunculus e An. bellator*) para oviposição são: bromeliáceas encontradas na mata estabelecida em planície quaternária, no qual se encontra *An. cruzii*; as grandes áreas montanhosas do maciço atlântico, principalmente nos biótopos das comunidades situadas nos vales, encontra-se a espécie *An. homunculus*; e nas bromeliáceas de restinga e rupestres predomina o *An. bellator* (Veloso et al*.,* 1956).

A transmissão autóctone de malária extra-amazônica ocorre em vários estados brasileiros, principalmente naqueles associados ao sistema de Serra do Mar e coincide com a distribuição geográfica de *An. cruzii.* Ele é o principal vetor de

malária no sudeste do país (Arruda et al., 1986) por isso faz-se necessário o estudo mais aprofundado dessa espécie.

1.3 As espécies *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus*

1.3.1 Aspectos taxonômicos e variabilidade morfológica

Indivíduos adultos, principalmente fêmeas, e pupas de *An. cruzii* e *An. homunculus* são muito parecidos morfologicamente, sendo difícil a identificação mediante características taxonômicas tradicionais (Calado, Navarro-Silva, 2005). Alguns autores ainda consideram a hipótese de ambas pertencerem a um grupo de espécies morfologicamente e filogeneticamente próximas (Rosa-Freitas et al*.,* 1998). De acordo com estudos recentes desenvolvidos por Peixoto et al. (2009), utilizando análises genéticas, *An. cruzii* é na verdade um complexo de pelo menos duas espécies crípticas, onde uma ocorre na Bahia e outra na região sudeste do Brasil. Na literatura, alguns registros de ocorrência de *An. cruzii* são duvidosos e podem ter sido confundidos com outras espécies do subgênero *Kerteszia*, justamente por esse problema na identificação (Calado, Navarro-Silva, 2005). As duas espécies ocorrem em simpatria no estado de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Calado, Navarro-Silva, 2005).

De acordo com Wilkerson e Peyton (1991), as fêmeas dessas espécies podem ser diferenciadas morfologicamente através dos caracteres presentes nos palpos maxilares. Martins (1958) ainda aponta que as fêmeas de *An. cruzii* possuem tegumento abdominal com coloração vermelha uniforme ou vermelha com regiões mais claras; enquanto que *An. homunculus* apresenta esse tegumento com manchas escuras e claras, mas nunca avermelhadas. Para a diferenciação de larvas, Lima (1952) constata que em *An. cruzii* o segmento anal é pouco quitinizado e o tegumento possui cor amarelada ou avermelhada. Por outro lado, as larvas de *An. homunculus* apresentam segmento anal com alto grau de quitinização e coloração do tegumento escura (Figura 3) (Calado, Navarro-Silva, 2005).

Figura 3 - Vista dorsal de uma larva de *Anopheles cruzii* (esquerda) e *An. homunculus* (direita).

Entretanto, todas essas características morfológicas citadas são de difícil interpretação e muito subjetivas. A identificação externa é também muitas vezes prejudicada pelo alto grau de variabilidade observada nesses caracteres diagnósticos e pela perda ou danificação das partes do corpo do inseto na hora da captura (Calado, Navarro-Silva, 2005). Por isso é útil abordar simultaneamente vários parâmetros de identificação, não só os morfológicos, mas também os moleculares e genéticos. Dessa forma, a possibilidade de correlacionar os dados fenotípicos e genotípicos também estará aumentada.

1.3.2 Ciclo de vida e tempo de sobrevivência

As espécies do gênero *Anopheles* possuem ovos que medem cerca de 0.5 mm de comprimento e são dotados de flutuadores laterais que permitem sua permanência na superfície da água (Calado, 2005). Em condições de laboratório uma fêmea de *An. cruzii* pode por, em média, 30 ovos em cada postura (Kakitani, 1992). Em ambiente natural foi observado um pequeno número de larvas de uma mesma espécie por criadouro (Forattini et al., 1961), o que sugere que as fêmeas ovopositam em pequenas quantidades como possível estratégia para evitar a competição por recursos (Calado, 2005).

As condições ambientais determinam o período de desenvolvimento dos mosquitos, podendo variar bastante dependendo da época do ano. Em laboratório foi observado que o tempo de duração do ovo ao adulto é de aproximadamente 35

dias para *An. cruzii* (Wilkerson, Peyton, 1991). Os fatores ambientais, como temperatura e umidade, também podem alterar a taxa de sobrevivência de várias espécies de anofelinos. No ambiente natural, foi observado que o período de sobrevivência das fêmeas de *An. cruzii* varia de 35 a 56 dias (Ferreira et al., 1969a).

Do ponto de vista epidemiológico, o tempo de sobrevida dos mosquitos vetores e sua densidade populacional são fatores importantes a serem considerados, visto que estão intimamente relacionados com a transmissão de doenças (Bona, 2008). Devido as suas peculiaridades biológicas, os anofelinos *Kerteszia* têm sua densidade populacional aumentada no período de chuvas e temperaturas elevadas (Calado, 2005; Forattini et al., 1996; Forattini, 2002; Guimarães et al., 2000a)

1.3.3 Aspectos bioecológicos

As fêmeas de *An. cruzii* realizam a hematofagia preferencialmente durante os crepúsculos matutino e vespertino e nas primeiras horas da noite, mas também podem picar durante o dia (Coutinho et al., 1943). Essa espécie é exofílica, e possui maior frequência dentro da mata (Guimarães et al., 2000), no entanto podem invadir domicílios em algumas áreas. O repasto sanguíneo é realizado em ambiente antrópico, porém após efetuá-lo as fêmeas abandonam o ambiente à procura de abrigo no ambiente natural circundante (Calado, 2005; Consolim et al., 1979; Forattini et al., 2000). Em relação à escolha do hospedeiro *An. cruzii* apresenta bastante ecletismo, podendo alimentar-se do homem, outros mamíferos e aves (Deane, 1986).

No município de Guaratuba (PR), estudos de Ferreira et al. (1969b) comprovaram a capacidade de dispersão de até 1000m em *An. cruzii*. Esse dado é muito importante do ponto de vista epidemiológico, já que o alcance de vôo dos mosquitos vetores está diretamente relacionado com seu potencial de dispersão, ampliando o território sujeito à ocorrência de doenças em humanos ou animais (Bona, 2008).

An. cruzii possui um grande ecletismo vertical na mata, e movimenta-se do dossel para o solo e vice-versa com grande facilidade, porém apresenta diferentes graus de acrodendrofilia nas regiões do Brasil. Por exemplo, na Floresta da

Cantareira (SP) essa espécie apresenta comportamento tipicamente acrodendrófilo, enquanto em Joinville (SC) é eclética, obtendo alimento próximo ao solo e em diversos níveis da mata (Deane et al., 1984; Deane, 1992). Essas peculiaridades levantam suspeitas em relação ao status taxonômico dessas populações.

As formas larvárias de *An. cruzii* são observadas em vários habitats diferentes, desde o nível do mar até 600m de altitude, e em bromélias com diferentes capacidades hídricas que variam desde 5ml até mais de 2 litros, presentes tanto no solo até o nível das mais altas árvores do dossel (Veloso et al., 1956).

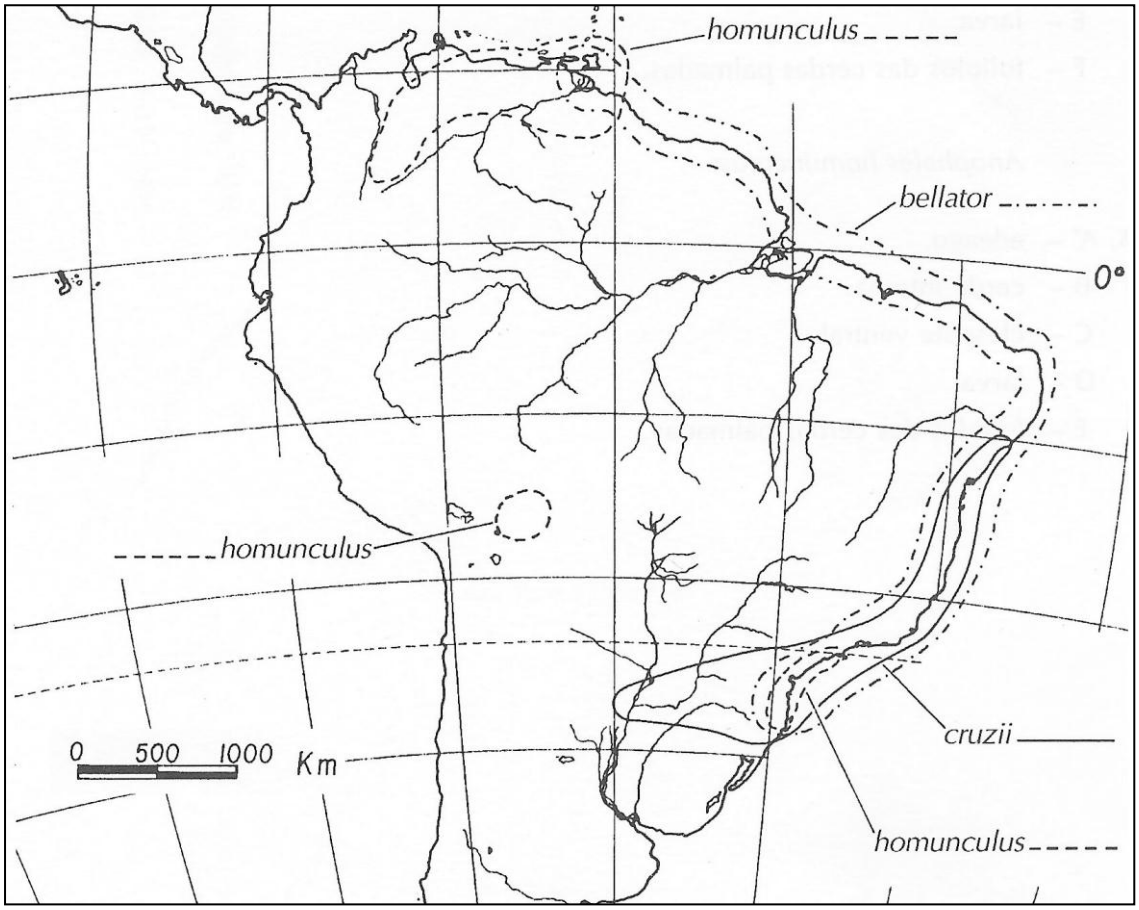
Ainda pouco se sabe sobre a ecologia de *An. homunculus*, já que a espécie possivelmente foi subestimada devido aos erros em sua identificação. No entanto, sabe-se que *An. homunculus* é comumente encontrado nas regiões mais úmidas e inferiores da mata, tendo sua condição ótima somente em biótopos situados abaixo de 5m de altura, e geralmente em bromélias com pequeno volume de água (Veloso et al., 1956).

1.3.4 Distribuição geográfica

A distribuição atual de *An. cruzii* limita-se ao sistema montanhoso que caracteriza a Mata Atlântica, desde o estado de Sergipe até a região sul do Brasil, incluindo parte da região argentina representada pelas províncias de Chaco e Missiones (Figura 4) (Forattini, 2002).

O primeiro registro de *An. homunculus* foi em Santa Catarina em 1943 (Forattini et al., 1970). Em 2008, Sallum et al. notificaram a presença desta espécie no estado do Espírito Santo. Seto (1992) também reportou a existência de *An. homunculus* em Peruíbe, mas a baixa frequência nas coletas indica que ela seja rara nessa região. A existência de poucos registros de *An. homunculus* no Brasil pode ser devido à sua difícil identificação (Sallum et al., 2008), já que as fêmeas adultas dessa espécie se confundem com as de *An. cruzii*. O diagnóstico diferencial entre essas duas espécies era realizado somente por caracteres da genitália externa do macho (Lima, 1952).

Figura 4 - Mapa reproduzido de Forattini (2002) mostrando a distribuição geográfica das principais espécies de *Kerteszia* encontradas no Brasil.



1.3.5 Importância epidemiológica

An. cruzii é vetor primário de *Plasmodium spp*. nos litorais sul e sudeste do Brasil, principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, sendo encontrado diversas vezes infectado por oocistos e esporozoítos (Amaral, 1942; Coutinho et al. 1943; Rachou, Ferreira, 1966b). Ele também está envolvido com a manutenção de malária assintomática em áreas de Mata Atlântica do estado de São Paulo e Rio de Janeiro (Branquinho et al., 1997; Carvalho et al., 1998). Nos estudos de Branquinho et al. (1997) foi verificado que as amostras de *An. cruzii* dos municípios de Juquitiba e São Vicente (SP) apresentavam infecção por *Plasmodium vivax* clássico (0.149%), *Plasmodium vivax* VK247 (0.086%) e por *Plasmodium brasilianum-malariae*. De acordo com esses autores, embora os índices de infecção encontrados tenham sido considerados baixos, a alta densidade de mosquitos e sua

voracidade podem compensar esse fato. Além da malária humana, *An. cruzii* é considerado vetor de *Plasmodium simium* e *Plasmodium brasilianum*, ambos agentes causadores de malária simiana (Calado, 2005; Deane, 1992). *An. homunculus* também é um importante transmissor de plasmódios humanos em áreas do sudeste brasileiro e em Trinidad (Forattini, 1962), sendo considerado vetor secundário da malária nessas regiões (Rezende et al., 2009).

1.4 Problemas biológicos a serem abordados

Como *An. cruzii* e *An. homunculus* são morfologicamente semelhantes é possível que os registros referidos à primeira espécie possam estar contemplando indivíduos da segunda espécie que foram identificados de forma equivocada. Obviamente, a identificação correta das espécies é fundamental tanto para o reconhecimento dos vetores envolvidos na transmissão de patógenos como para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle (Sallum et al*.,* 2008). Faz-se necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais simples, rápidos e que estejam ao alcance do maior número de profissionais da saúde para diferenciar essas duas espécies anofelinas, visto que *An. cruzii* é um importante vetor de malária no sudeste.

Além da questão da diagnose específica, outro problema biológico envolvendo essas espécies desperta atenção. Nas áreas de Mata Atlântica do sul e do sudeste brasileiro, Ramírez e Dessen (1994, 2000a, b) analisaram populações de seis localidades e as dividiram em *An. cruzii* A, B e C. Esta denominação baseou-se nos padrões diferentes de bandas do cromossomo politênico X. De acordo com as autoras, o padrão A foi o único encontrado em Aldeia dos Índios (Peruíbe, SP) e o B, em São Francisco do Sul (SC). Os padrões A e B ocorreram em simpatria nas regiões de Guaratuba (SP) e Cananéia (SP). Em Juquitiba (SP) e Boracéia (SP), foram registrados os padrões A e C. Adicionalmente, as autoras afirmam haver uma clara relação entre altitude e as diferentes formas cromossômicas. *An. cruzii* B foi predominante nas regiões planas de Mata Atlântica, próximas ao nível do mar, enquanto que a forma A, em região com elevação de 200 metros (Aldeia dos Índios). De acordo com o exposto, podemos levantar a hipótese de que as populações de

An. cruzii da planície e do morro, no município de Cananéia, possam também apresentar diferenças genéticas em sua composição.

No município de Cananéia (Estado de São Paulo), onde *An. cruzii* e *An. homunculus* ocorrem em simpatria, estudos de Marques (2012) demonstram que elas possuem preferências diferenciais quanto à altitude de seu habitat na Mata Atlântica. Naqueles estudos, foram amostrados três microambientes do local definidos pela altitude (planície, encosta e morro) com acompanhamento mensal ao longo de um ano. Considerando-se que cada espécie tem preferência por uma faixa de altitude ao invés de outra, é possível que o fluxo gênico intrapopulacional de cada espécie não seja equitativamente distribuído ao longo desse transecto altitudinal. A elucidação desta questão poderia ser muito informativa para o entendimento da dinâmica de transmissão de *Plasmodium sp*. no local. É possível ainda que os padrões de fluxo gênico sejam diferenciais ao longo do ano ou que as populações sofram alterações ou substituições demográficas nesse ínterim. A estabilidade da variabilidade genética nas populações dessas espécies não é conhecida ainda, mas quando for, poderá auxiliar na compreensão epidemiológica da malária na região.

1.5 Métodos para caracterização populacional em Culicidae

1.5.1 Morfometria Geométrica alar

Quando se trata de insetos, a caracterização morfológica de estruturas complexas e de variabilidade individual é difícil e sujeita à subjetividade. Nesses casos é útil ter-se um método que permita a percepção e a quantificação dessas variações entre indivíduos, como a morfometria. Trata-se de uma formalização matemática das diferenças entre as formas geométricas de objetos.

A morfometria geométrica, em especial, permite um estudo estatístico multivariado das estruturas biológicas (Monteiro, Reis, 1999), ou seja, considera simultaneamente várias características de uma estrutura corporal complexa. Nos insetos, a principal estrutura-alvo dessa análise são as asas, pois possuem uma estrutura bidimensional e as nervuras alares se cruzam formando pontos, ideais para uma comparação morfométrica. Há estudos na literatura que indicam ser possível separar espécies dentro de complexos através da morfometria geométrica,

assim como também seria possível distinguir indivíduos da mesma espécie em diferentes populações (Dujardin 2008; Jirakanjanakit, Dujardin, 2005; Vidal et al*.,* 2011). Variações morfológicas clinais e geográficas podem também ser descritas quantitativamente a partir de dados morfométricos das asas, como recentemente efetuado no culicídeo *Culex quinquefasciatus* (Morais et al*.,* 2010)

Para a análise da forma alar, geralmente faz-se uma sobreposição de Procrustes e posterior estudo de componentes principais ("relative warps"), que excluem a variação do tamanho isométrico e definem a variação populacional dos formatos nas asas. Para a descrição de tamanho alar utiliza-se o vetor tamanho do centróide, que formalmente é a raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada ponto anatômico do centróide na configuração total (Rohlf, 1993). É uma estratégia para sintetizar o tamanho da asa numa única variável (Dujardin, 2008).

Em Culicidae, futuramente os caracteres morfométricos alares poderão eventualmente auxiliar em estudos comportamentais, visto que as características das asas geralmente estão relacionadas a outras particularidades biológicas do mosquito, como eficiência no vôo, produção de sons alares de corte pré-cópula e até fecundidade (Brogdon, 1994). Além disso, a morfometria alar é um método rápido, barato e os dados provenientes de sua análise podem ser utilizados por outros profissionais da saúde em vigilância sanitária epidemiológica (Dujardin, 2008).

1.5.2 Marcadores mitocondriais - citocromo oxidase subunidade I (COI)

O DNA mitocondrial vem sendo cada vez mais utilizado como marcador em estudos de filogeografia e diagnose de espécies crípticas. Isso ocorre porque ele possui rápida taxa evolutiva, apresenta herança exclusivamente materna e raramente sofre recombinação (Matioli, 2001). O gene mitocondrial COI, que codifica a subunidade I da enzima citocromo oxidase, está presente em centenas de cópias por células e têm pouca variação intraespecífica (Cywiska et al., 2006), sendo um bom marcador para populações. Esse gene tem sido apontado também como indicador taxonômico, havendo autores que defendem seu emprego como fiel diagnóstico de espécies, a chamada iniciativa "barcodes" ou código de barras (Moritz, Cicero, 2004).

Alguns estudos como o de Lehr et al. (2005) revelam que a partir do gene mitocondrial COI foi possível distinguir espécies crípticas do complexo *An. albitarsis*, por exemplo. Já foram analisadas 32 espécies de Anophelinae neotropicais e a partir do gene COI pode-se distinguir indivíduos até o nível de espécie (Sallum et al., 2002). Recentes estudos acusaram a existência de 21 haplótipos (Devicari, 2010) de COI com variabilidade intra e interpopulacional em *Aedes scapularis*. Aqueles resultados indicam que tal gene pode apresentar-se diverso em culicídeos e reforça a ideia de que este é um bom marcador genético populacional.

Com isso, é muito provável que seja possível diferenciar genética e morfologicamente as populações aqui amostradas, já que os marcadores foram validados em vários outros estudos populacionais com Culicidae.

6 CONCLUSÕES

- É possível diferenciar *Anopheles cruzii* de *An. homunculus* utilizando somente morfometria geométrica alar.

- Há dimorfismo sexual de forma para todas as populações analisadas de *An. cruzii* e *An. homunculus*.

- Populações de *An. cruzii* do inverno e do verão apresentaram diferenciação no formato alar. O gene CO-I mostrou-se altamente polimórfico com apenas dois compartilhamentos entre as populações, porém com baixo nível de divergência genética (Fst=0,003, Φst=0,007).

- Houve altos valores de diferenciação genéticas intrapopulacional em todos os grupos amostrados (79,6% a 99,3%)

- Populações de *An. homunculus* do inverno também apresentaram alta diferenciação no formato alar em relação às do verão. Nesta espécie o gene CO-I parece estar mais conservado do que em *An. cruzii*, pois há reduzido número de haplótipos e baixa diversidade nucleotídica (π= 0,005).

- Populações de *An. homunculus* do inverno apresentam tamanho alar significativamente maior de que aquelas do verão.

- As populações de *An. cruzii* do morro e planície também apresentaram variação no formato alar. O tamanho do centróide nos indivíduos do morro foi ligeiramente maior em todas as comparações.

- Houve compartilhamento de apenas um haplótipo entre populações de *An. cruzii* do morro e planície. Há evidência de alguma estruturação populacional (Fst= 0,125; Φst=0,121) e baixo número de migrantes (Nm= 1,67) entre os microambientes analisados em Julho/2012.

- As informações derivadas da morfologia e genética foram concordantes para morro e planície, o que atesta que a geometria alar pode ser empregada como indicador de microevolução também nessas espécies.

- As comparações temporais tanto em *An. cruzii* como em *An. homunculus* mostraram evidente diferenciação morfológica, ou seja, os caracteres das asas são acusativos de microevolução.

- A diversidade haplotípica foi alta em todas as populações de *An. cruzii* analisadas, com poucos haplótipos compartilhados entre as amostras temporais e geográficas.

- Os marcadores morfológicos e moleculares utilizados neste estudo parecem evoluir em velocidades diferentes, pois os valores Qst são maiores que os Fst em todas as populações. Podem estar ocorrendo diferentes pressões seletivas na asa e no gene CO-I.

REFERÊNCIAS*

Amaral J. Infecção natural de *Nyssorhynchus (Kerteszia) cruzii* e *bellator* (Diptera, Culicidae). A Folha Médica. 1942;28(15):1-9.

Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Maracic M, Ferreira AW, Cochrane AH. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1986;35:873-81.

Aytekin S, Aytekin M, Alten B. Effect of different larval rearing temperatures on the productivity (Ro) and morphology of the malaria vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) using geometric morphometrics. Journal of Vector Ecology. 2009;34:32-42.

Bernasconi MV, Valsangiacomo C, Piffaretti JC and Ward PI. Phylogenetic relationships among Muscoidea (Diptera: Calyptratae) based on mitochondrial DNA sequences. Insect Mol Biol. 2000;9:67-74.

Bona ACD. Culicidae (Diptera) em Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas e Análise da idade fisiológica, sobrevivência diária e duração do ciclo gonotrófico da população de Anopheles (Kerteszia) cruzii Dyar & Knab, 1908. [dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2008. 78 f.

Branquinho MS, Marrelli MT, Curado I, Natal D, Barata JMS, Tubaki R, Carréri-Bruno GC, Menezes RT, Kloetzel JK. Infecção do Anopheles (Kerteszia) cruzii por Plasmodium vivax e Plasmodium vivax variante VK247 nos Municípios de São Vicente e Juquitiba, São Paulo. Rev Panam Salud Publica. 1997;2:122-34.

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. SVS Malária. Brasília; 2010. 48 p.

Brogdon WG. Measurement of flight tone differences between female Aedes aegypti and A. albopictus (Diptera: Culicidae) J Med Entomol. 1994;31(5):700-3

Bublii O, Imasheva AG, LAZEBNY OE. Variation of a set of wing characters in natural populations of Drosophila melanogaster. Genetika. 1996;32:1513-20.

Calado DC, Navarro-Silva MA. Identificação de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab e *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera, Culicidae, Anophelinae) através de marcadores moleculares (RAPD e RFLP). Revista Brasileira de Zoologia. 2005;22:1127–33.

---

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [update 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org.

Calado DC. Polimorfismos em *Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908 detectados através de marcadores moleculares (RAPD e RFLP) e comparação com *Anopheles bellator* Dyar & Knab, 1906 e *Anopheles homunculus* Komp, 1937 (Diptera, Culicidae, Anophelinae). [tese (Doutorado em Ciências Biológicas)] Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005. 132 f.

Carvalho ME, Glasser CM, Ciaravolo RMC, Etzel A, Santos LA, Ferreira CS. Sorologia da malária *vivax* no foco Aldeia dos Índios, município de Peruíbe, São Paulo, de 1984 a 1986. Cadernos de Saúde Pública. 1998;4:276-92.

Cavicchi S, Giorgi G, Natali V, Guerra D. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster* III. Fourier and centroid analysis of wing shape and relationship between shape variationand fitness. J. Evol. Biol. 1991;4:141-59.

Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas aplicadas à Agricultura (CEPAGRI) [homepage na internet]. Campinas: Meteorologia Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Disponível em: http://cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_113.html [2012 out. 17].

Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO) [homepage na internet]. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo. Disponível em http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Listagens/BH/LBalancoHidricoLocal.asp [2012 out. 17].

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

Collucci E, Sallum MAM. Phylogenetic analysis of the subgenus Kerteszia of *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological characters. Insect Syst Evol. 2003;34(4):361-72.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz Press; 1994. 228 p.

Consolim J, Luz E, Vieira AM, Borba AM. Alguns aspectos epidemiológicos sobre a persistência de transmissão de malária no litoral paranaense. III. Entrada e permanência de *Anopheles cruzii* na habitação humana (Diptera, Culicidae). Arquivos de Biologia e Tecnologia. 1979;22(2):173-9.

Coutinho JO, Rachou R, Ricciardi I. Contribuição para o conhecimento dos transmissores de malária no Brasil . *A. (K.) cruzi* e *A. (K) bellator.* Arquivos de Higiene. 1943;13(2):115-27.

Cywinska A, Hunter F, Hebert P. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Medical and Veterinary Entomology. 2006;20:413–24.

Davidson G. The five mating-types in the *Anopheles gambiae* complex. Riv Malariol. 1964;43:167.

Deane LM, Ferreira-Neto JA, MOURA LM. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a forest in Southern Brazil suggests that human cases of malaria of simian origin might be expected. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1984;79:461-3.

Deane LM. Malaria vectors in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1986;81(2):5-14.

Deane LM. Simian malaria in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1992;87(3):1-20.

Demirci B, Lee Y, Lanzaro GC, Alten B. Altitudinal Genetic And Morphometric Variation among populations of *Culex theileri* Theobald (Diptera: Culicidae) from Northeastern Turkey. Journal of Vector Ecology. 2011;37(1):197-209.

Devicari M. Estudo genético-morfológico de populações de *Aedes scapularis* (Dipetra: Culicidae). [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010. 65 f.

Dujardin JP, Costa J, Bustamante D, Jaramillo N, Catalá S. Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. Acta Tropica. 2009;110:101–11.

Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol. 2008;8:(6):875-90.

Dye C. Vectorial capacity: Must be measured all its components? Parasitology Today. 1986;2:203-9.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online. 2005;1:47-50.

Ferreira E, Castro-Filho J, Tomich A, Sá FT. Estudo da longevidade do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e do *Anopheles (Kerteszia) bellator* em condições naturais. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 1969a;21:823-8.

Ferreira E, Castro-Filho J, Tomich A, Sá FT. Estudo sobre o raio de vôo do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e do *Anopheles (Kerteszia) bellator* em Guaratuba, litoral do Estado do Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Malariologia e Doencas Tropicais. 1969b;21:819-22.

Ferreira SR, Luz N. Malária no estado do Paraná – aspectos históricos e prognose. Acta Biol Par. 2003;32(3):129-56.

Forattini OP, Gomes AC, Natal D, Santos JLF. Observações sobre a atividade de mosquitos Culicidae em matas primitivas da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. Revista de Saúde Pública. 1986;20:178–203.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitões (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 11 – Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles* (*Kerteszia*) in South-Eastern Brazil. Rev Saúde Pública. 1996;30(2):107-14.

Forattini OP, Marques GRAM. Nota sobre o encontro de *Ae. Aegypti* em bromélias. Rev Saúde Pública. 2000;34:543-4.

Forattini OP, Rabello EX, Cotrim MD. Catálogo das Coleções Entomológicas da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (1ª Série) Culicidae. Rev Saúde Pública. 1970;4:1-100.

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

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

Gidaszewski N, Baylac M, Klingenberg C. Evolution of dimorphism of wing shape in the Drosophila melanogaster subgroup. BMC Evolutionary Biology. 2009;9:110-27.

Gilchrist AS, Partridge L. The contrasting genetic architecture of wing size and shape in Drosophila melanogaster. Hereditary. 2001;86:144-52

Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Mello RP. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. II-Habitat distribution. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2000;95(1):17-28.

Haas HL, Tolley KA. Geographic variation of wing morphology in three Eurasian populations of the fruit fly *Drosophila lummei*. J Zool. 1998;245:197-203.

Henry A, Thongsripong P, Fonseca-Gonzalez I, Jaramillo-Ocampo N, Dujardin JP. Wing shape of dengue vectors from around the world. Infect Genet Evol. 2010;10(2):207–14.

Holsinger KE, Weir BS. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting $F_{ST.}$ Nature Reviews Genetics. 2009;10:639-50.

Huey RB, Gilchrist GW, Carlson ML, Berrigan D, Serra L. Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. Science. 2000;287:308-9.

Hurst GDD, Jiggins FM. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. Proc R Soc B. 2005;272:1525-34.

Jacobs LF. The Economy of Winter: Phenotypic Plasticity in Behavior and Brain Structure. Biol Bull. 1996;191:92-100.

Jirakanjanakit N, Dujardin JP. Discrimination of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) laboratory lines based on wing geometry. Trop Med Public Health. 2005;36(6):858-61.

Jowett T. 1986. Preparation of Nucleic Acids. In: *Drosophila*, a practical approach. Oxford, U.K. 389 p.

Kakitani I. Observações preliminares sobre a paridade de *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii.* [dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1992. 78 f.

Klingenberg CP. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. Nature. 2010;(11):623-35.

Kuclu O, Aldemir A, Demirci B. Altitudinal variation in the morphometric characteristics of *Aedes vexans* Meigen from northeastern Turkey. Journal of Vector Ecology. 2011;(36)30-41.

Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn JE. Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between RAPD-PCR identification and analysis of mtDNA COI gene sequences. Ann Ent Soc Am. 2005;98(6):908-17.

Lima GN. Isolamento, caracterização de locos microssatélites e análise da variabilidade genética de duas populações de *Anopheles (N.) darlingi* (Diptera: Culicidae) do estado do Amazonas. [dissertação (Mestrado em Genética)]. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; 2010. 126 f.

Lima MM. Do diagnóstico diferencial entre o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e o *Anopheles (Kerteszia) homunculus* na fase larvária. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 1952;4:401-11.

Lozovei AL, Silva MAN. Análise comparativa entre métodos alternativo e convencional para amostras de mosquitos obtidos a partir de habitats fitotélmicos (Bromeliaceae) na Floresta Atlântica, Serra do mar, Paraná, Brasil. Rev Bras Zool. 1999;16:957-66.

Maddison WP. Gene Trees in Species Trees. Syst Biol. 1997;46(3):523-36.

Marques TC, Bourke BP, Laporta GZ, Sallum MAM. Mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages associated with Nidularium and Vriesia bromeliads in Serra do mar, Atlantic Forest, Brazil. Parasite & Vectors. 2012;5:41.

Marques TC. Culicídeos associados às bromélias na Mata Atlântica do município de Cananéia, São Paulo, Brasil. [dissertação (Mestrado em Saúde Pública)]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, Universidade de São Paulo; 2010. 114 f.

Marrelli MT, Malafronte RS, Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R, Kloetzel JK, Marinotti O. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer (ITS2) of 23 ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). Journal Med Entomol. 1999;36:679-84.

Marrelli MT. *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae): Análise do Segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico e da susceptibilidade à infecção com *Plasmodium vivax*. [tese (Doutorado em Ciências)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2000. 67 f.

Martins CM. Do diagnóstico diferencial específico entre o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e o *Anopheles (Kerteszia) homunculus* pelos caracteres dos adultos fêmeas (Diptera, Culicidae). Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 1958;10:429-30.

Matioli SR. Biologia Molecular e Evolução. São Paulo: Holos Editora Press; 2001. 202 p.

Mirabello L, Conn JE. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. Heredity. 2006;96:311-21.

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

Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marreli MT. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. Mem Instituto Oswaldo Cruz. 2010;105(5):1-5.

Moratore C. Padrões genético-morfológicos em populações de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). [dissertação (Mestrado em Ciências)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009. 84 f.

Moritz C, Cícero C. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. PLoS Biol. 2004;2(10):354-63.

Motoki MT. Caracterização de populações de Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae) do Brasil por estruturas da morfologica externa dos ovos, das asas e por sequências gênicas. [tese (Doutorado em Saúde Pública)]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de são Paulo; 2012. 127 f.

Moutinho PR. Dinâmica e estrutura populacional do *Anopheles darlingi* em um assentamento rural na floresta amazônica, Acre, Brasil. [dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)] Botucatu: Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista; 2010. 64 f.

Nagylaki T. Fixation indices in subdivided populations. Genetics. 1998;148:1325–32.

Nichols R. Genetrees and speciestrees are not the same. Trends in Ecology and Evolution. 2001;16(7):358-64.

Oshagui MA, Shemshad KH, Yaghobi-Ershadi MR, Pedram M, Vatandoost H, Abaie MR, Akbarzadeh K, Mohtarami F. Genetic structure of the malaria vector *Anopheles superpictus* in Iran using mitochondrial cytochrome oxidase (COI and COII) and morphologic markers: A new species complex? Acta Tropica. 2006;101:241-8.

Patsoula E, Samanidou-Voyadjoglou A, Spanakos G, Kremastinou J, Nasioulas G, Vakalis C. Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. Medical and Veterinary Entomology. 2007;21:36-43.

Peixoto AA, Ronal LDP, Carvalho-Pinto CJ, Gentile C, Grisard EC. Assessing the molecular divergence between *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* populations from Brazil using the *timeless* gene: further evidence of a species complex. Malaria Journal. 2009;8:60. doi:10.1186/1475-2875-8-60.

Peruzin MCJ. Análises comparativas populacionais de *Culex quinquefasciatus* em dois locais do Estado de São Paulo. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009. 96 f.

Peyton EL. A new classification for *Leucophyrus* group of *Anopheles (Cellia).* Mosquito Systematics. 1990;21:197-205.

Quiñones ML, Ruiz F, Calle DA, Harbach RE, Erazo HF, Linton Y. Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of Plasmodium vivax in Southern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(6):617-23.

Rachou RG, Ferreira MO. As *Kerteszias* como grandes responsáveis pela malária no litoral do estado de Santa Catarina. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 1966b;18(3):691-97.

Ramírez CCL, Dessen BEM. Chromosome differentiated populations of Anopheles cruzii: evidence for a third sibling species. Genetica. 2000a;108:73-80.

Ramírez CCL, Dessen EMB. Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles cruzii*. Genome. 2000b;43:143-51.

Ramirez CCL, Dessen EMB. Cytogenetic analysis of a natural population of *Anopheles cruzii.* Revista Brasileira de Genética. 1994;17:41-6.

Reeve MW, Fowler K, Partridge J. Increased body size confers greater fitness at lower experimental temperature in male *Drosophila melanogaster.* J Evol Biol. 2000;13:836-44.

Rezende HR, Soares RM, Cerutti-Junior C, Alves IC, Natal D, Urbinatti PR, Yamasaki T, Falqueto A, Malafronte RS. Caracterização entomológica e infecção natural de anofelinos em área de Mata Atlântica, com casos autóctones de malária, em regiões montanhosas do Espírito Santo. Neotrop. Entomol. 2009;38(2):127-31.

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

Ridley M. Evolution. Oxford: Blackwell Scientific Publications Press; 1993. 768 p.

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

Roderick GK. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. Annu. Rev. Entomol. 1996;41:325-52.

Rohlf FJ. Relative warp analysis and example of its application to mosquito wings. Contributions to morphometrics. Monografias, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. 1993;135-59.

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

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

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

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

Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Gentile C, Grisard EC, Peixoto AA. Assessing the molecular divergence between *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* populations from Brazil using the timeless gene: further evidence of a species complex. Malar J. 2009;8:60.

Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Mazzoni CJ, Peixoto AA. Estimation of divergence time between two sibling species of the Anopheles (Kerteszia) cruzii complex using a multilocus approach. BMC Evol Biol. 2010a;10:91.

Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Peixoto AA. Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the Anopheles (Kerteszia) cruzii complex in South-east Brazil. Malar J. 2010b;9:33.

Rosa-Freitas MG, Lourenco-de-Oliveira R, Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission Source. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 1998;93(5):651-55.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphisms analyses by the coalescente and other Methods. Bioinformatics Application Note. 2003;19(18):2496-97.

Sallum MAM, Bergo ES, Flores DC, Forattini OP. Systematic studies on *Anopheles galvaoi* Causey, Deane & Deane from the subgenus *Nysssorhynchus blanchard* (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(8):1177-89.

Sallum MAM, Urbinatti PR, Malafronte RS, Resende HR, Cerutti-Junior C, Natal D. Primeiro registro de *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera, Culicidae) no Estado do Espírito Santo, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia. 2008;52(4):671-73.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Londres. Springs Harbor Laboratory Press; 1989. 65 p.

São Paulo. Prefeitura Municipal da Estância de Cananéia. Mapa de Cananéia. Disponível em: http://www.cananeia.sp.gov.br/index.php?exibir=secoes&ID=50 [2012 set. 17].

Scarpassa VM, Cardoza TB, Cardoso RP. Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2008;78(6):895–903.

Service MW. Medical Entomology. London: Chapman & Hall Press. 1996. 165 p.

Seto MI. Ocorrência de mosquitos (Diptera: Culicidae) em bromélias da localidade de Aldeia dos Índios, área endêmica de malária no município de Peruíbe (SP), no período de julho de 1985 a julho de 1987 [dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1992. 105 f.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am. 1994;87:651-701.

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

Stark J, Bonacum J, Remsen J, DeSalle R. The evolution and development of Dipteran wing veins: A Systematic Approach. Annual Review of Entomology. 1999;44:97-129

StatSoft, Inc. Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc;. Available from: http://www.statsoft.com. 2004. [2010 ago 13].

Stegnii VN. Genetic adaptation and speciation in sibling species of the Eurasian maculipennis complex. Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors. 1982;(3)454-64.

Tadei WP, Dutary-Thatcher B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. Revista Inst Med Tropical. 2000;42(2):87-94.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 5.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 5.0. Molecular Biology and Evolution. 2007;24:1596-99.

Taylor CE, Toure YT, Coluzii M, Petrarca V. Effective population size and persistence of *Anopheles arabiensis* during the dry season in West Africa. Medical and Veterinary Entomology. 1993;7(4):351-57.

Templeton AR. Genética de populações e teoria microevolutiva. Ribeirão Preto, SP: Holos; 2011. 705 p.

Veloso HP, Moura JV, Klein RM. Delimitação Ecológica dos anofelinos do subgênero *Kerteszia* na região costeira do sul do Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.1956;54(3):517-20.

Veloso HP. Considerações Gerais sobre os Biótopos e Habitats dos Anofelinos do Subgênero *Kerteszia*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1958;56:165-79.

Vezzani D, Velásquez SM, Schweigmann N. Seasonal Pattern of Abundance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires City, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(4):351-56.

Vidal PO, Rocha LS, Peruzin MCJ. Wing diagnostic characters for mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera; Culicidae). Revista Brasileira de Entomologia. 2011;55:132-42.

Vidal PO, Carvalho E, Suesdek L. Temporal variation on wing geometry of *Aedes albopictus.* Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012. In press.

Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH. Deforestation: effects on vector-borne disease. Parasitology. 1993;196:55-75.

Wekesa JW, Brogdon WG, Hawley WA, Besansky NJ. Flight tone of field collected populations of *Anopheles gambie* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae). Physiol Entomol. 1998;23(3):289-94.

White GB. Malaria vectors ecology and genetics. British Medical Bulletin. 1982;38:207-12.

World Health Organization (WHO) [homepage on the internet]. Malaria Media Center. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html). [2012 Sep 17].

Wilkerson RC, Peyton EL. The brazilian malaria vector *Anopheles (Kerteszia) cruzii*: life stages and biology (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics. 1991;23(2):110-22.

Wooton RJ. Functional morphology of insects wings. Annu. Rev Entomol. 1992; 37:113-40.

Wright S. Evolution and genetics of populations. Chicago: University of Chicago Press; 1978. 511 p.

Zavortink TJ. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. Contribution of the American Entomological Institute. 1973;9:1–54.

Zhang DX, Hewitt E. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. Insect Molecular Biology. 1996;6:143-50.