CAMILA LORENZ

Emprego de técnicas morfométricas, espectrometria MALDI-TOF e sequenciamento genético para classificação e filogenia de Culicidae (Diptera)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

CAMILA LORENZ

Emprego de técnicas morfométricas, espectrometria MALDI-TOF e sequenciamento genético para classificação e filogenia de Culicidae (Diptera)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor 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
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lorenz, Camila
Emprego de técnicas morfométricas, espectrometria MALDI-TOF e sequenciamento genético para classificação e filogenia de Culicidae (Diptera) / Camila Lorenz; orientador Lincoln Suesdek. -- São Paulo, 2017.
147 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Mosquito. 2. Evolução. 3. Morfometria Geométrica Alar. 4. Genoma Mitocondrial. 5. Perfil Proteico. I. Suesdek, Lincoln, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a):

Título da Tese:

Orientador (a):

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **608/13** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização de padrões macroevolutivos em Culicidae (Diptera) mediante morfometria geométrica, sequenciamento genético e espectrometria de massa*" sob a responsabilidade de **Camila Lorenz,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH-COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 12 de junho de 2013.

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

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

Dedico este trabalho

aos meus queridos pais Domingos e Solange com todo amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Domingos e Solange, pelo constante incentivo, pelo auxílio financeiro, pela preocupação, pelos cuidados e, sobretudo, pelo carinho e amor incondicional. Por sempre estarem ao meu lado, em toda e qualquer situação com palavras de incentivo e coragem. E pelos puxões de orelha quando necessários.

Ao meu orientador Prof. Dr. Lincoln Suesdek, por acolher-me como orientanda e por acreditar em meu trabalho, pela imensa contribuição na minha formação acadêmica, profissional e humana. Pelo apoio, orientação e amizade durante os mais de seis anos de convivência em que estive no laboratório.

À Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum pela contribuição, pelas valiosas sugestões durante o desenvolvimento da tese e por acreditar no meu potencial para realizar estágio no exterior.

Ao Prof. Dr. João Marcelo Pereira Alves pela imensa ajuda nas montagens dos genomas mitocondriais. Muito obrigada pela paciência e disposição em me ajudar.

Ao Prof. Dr. Peter Gordon Foster pelos ensinamentos de programação e montagem de genomas mitocondriais. Por me receber no Museu de História Natural de Londres.

Aos membros da minha banca de qualificação: Prof. Dr. Sérgio Russo Matioli, Prof. Dr. João Marcelo Pereira Alves e Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum pelas sugestões.

Ao biólogo Aristides Fernandes pela identificação dos espécimes e ao Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta pela ajuda com o preparo das amostras para espectrometria MALDI-TOF.

Aos doutores Jean-Pierre Dujardin e Leandro Rabelo Monteiro pelos ensinamentos de morfometria geométrica.

À Fernanda Almeida, pela dissecação e montagem das lâminas de asas dos mosquitos.

Ao meu primeiro aluno de iniciação científica Enrico Breviglieri por contribuir na minha formação como futura orientadora.

À equipe da USP em Pariquera-Açu: Décio Wach, Jair Donizete da Silva, Francisco Alves dos Santos, Rui de Lima e Luiz Carlos de Oliveira, cuja assistência foi essencial para realização das coletas de campo.

Ao programa de Pós-Graduação Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, pela ajuda nas preparações de materiais e por resolver as dúvidas sobre o programa.

Ao laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan onde o trabalho foi desenvolvido.

Aos colegas da Faculdade de Saúde Pública Denise Sant'ana, Ivy Luizi de Sá, Sandra Nagaki e Bruna Demari pela companhia em congressos e pela amizade.

Aos colegas, funcionários e pesquisadores do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan pela troca de experiências, ajuda, convívio e descontração.

Aos amigos da Faculdade de Saúde Pública Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti-Neto e Breno Aguiar pelas colaborações científicas e pela amizade.

Aos amigos do Lab: Paloma, Cidoca, Fer, Flá, Carol, Stella, Fábio e Aurélio pela amizade, pelos momentos de aprendizado e descontração e por me proporcionarem um ambiente super agradável para trabalhar. Obrigada!

À técnica Tatiane Porangaba de Oliveira, pela imensa ajuda no meu trabalho, paciência e disponibilidade para me ensinar técnicas genéticas.

Ao Christiano, pela compreensão, apoio, carinho, pela companhia constante e por me fazer tão bem.

A meus familiares que, de diferentes maneiras, ajudaram-me ao longo desses anos de estudos, ou que simplesmente me proporcionaram o prazer de sua companhia em momentos de descanso.

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

A todos vocês: MUITO OBRIGADA!

Agradeço à FAPESP, pelo auxílio financeiro na bolsa regular de doutorado (processo 2013/05521-9) e na bolsa de estágio no exterior BEPE (processo 2015/12784-1), que foram importantíssimos para o desenvolvimento desta pesquisa.

“Freedom of thought is best promoted by the gradual illumination of men’s minds, which follows from the advance of science.”

Charles Robert Darwin

RESUMO

LORENZ, C. **Emprego de técnicas morfométricas, espectrometria MALDI-TOF e sequenciamento genético para classificação e filogenia de Culicidae (Diptera)**. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Os mosquitos (Culicidae; Diptera) compreendem um grupo monofilético, mas algumas relações dentro da família ainda não estão totalmente resolvidas. Existem lacunas significativas no conhecimento do grupo, principalmente para gêneros Neotropicais. O objetivo deste trabalho foi elaborar uma hipótese filogenética para os gêneros de Culicidae baseada nos já tradicionais caracteres de variabilidade genética e nos recém-agregados caracteres de perfil proteico evidenciados por espectrometria de massa (MALDI-TOF). Além disso, foi analisado como a forma da asa evoluiu ao longo do tempo nesses grupos. Foram analisadas 1.429 asas de 76 espécies diferentes abrangendo 20 gêneros. Para análises genéticas, foram utilizadas sequências de oito genes nucleares e genomas mitocondriais de 21 espécies. A Análise de Variáveis Canônicas agrupou todas as espécies do gênero *Anopheles* em um único conjunto; o mesmo foi observado para os representantes da tribo Sabethini. O formato alar mostrou-se um bom marcador taxonômico, já que as análises em cada tribo ou gênero foram capazes de revelar agrupamentos naturais. O *landmark* #1 (situado entre as veias R1 e RS da asa) foi o mais variável entre todos os gêneros de Culicidae. A magnitude da divergência morfológica parece seguir um padrão hierárquico, onde: subfamília > tribo > gênero > subgênero > espécie > população. Análises de MP, ML e AB usando genes nucleares convergiram para a mesma árvore, em que Anophelinae aparece como grupo irmão de todos os outros Culicinae. Em relação aos genomas mitocondriais, a topologia construída com esses dados revelou grupos bem suportados, sendo que alguns foram discordantes da filogenia atual da família. Os genomas mitocondriais em geral seguiram a mesma ordem gênica, exceto nos representantes da tribo Sabethini, onde houve uma translocação de dois RNAs transportadores; esse fato é inédito em Culicidae até o momento. Os genes CO1, NAD2 e NAD6 apresentaram alta diversidade nucleotídica, podendo ser empregados como marcadores para outros estudos. A razão entre mutações não-sinônimas e sinônimas revelou que o genoma mitocondrial dos Culicidae está sob forte seleção purificadora. Através da espectrometria MALDI-TOF foram identificados 24 biomarcadores nas espécies analisadas; a topologia fenética construída utilizando esses perfis proteicos não apresentou congruência com outros marcadores, mas podem ter potencial na identificação taxonômica das espécies. A tribo Sabethini apresentou agrupamento único tanto nas análises genéticas quanto morfológicas. De um modo geral a morfologia, a genética e os perfis proteicos não foram concordantes, e isso pode estar ocorrendo devido a (a) taxas evolutivas distintas entre eles, (b) algum marcador utilizado estar sob seleção positiva ou (c) canalização genética. Foi encontrado grande suporte para alguns grupos dentro de Culicidae, como Anophelinae e tribo Sabethini, sendo que o genoma mitocondrial mostrou ser uma ferramenta útil na reconstrução da história evolutiva dos mosquitos.

Palavras-chave: Mosquitos. Morfometria Geométrica Alar. Genoma Mitocondrial. Evolução. Perfil Proteico. Translocação. Seleção Purificadora.

ABSTRACT

LORENZ, C. **Use of morphometric techniques, MALDI-TOF spectrometry and genetic sequencing for classification and phylogeny of Culicidae (Diptera).** [Ph. D. Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Mosquitoes (Culicidae; Diptera) comprise a monophyletic group, but some relationships within the family are not fully resolved. There are significant gaps in group knowledge, especially for Neotropical genera. The aim of this study was to elaborate a phylogenetic hypothesis for the Culicidae family based on the already traditional characters of genetic variability and in the newly added protein profile characters evidenced by mass spectrometry (MALDI-TOF). In addition, it was analyzed how wing shape evolved over time in these groups. We analyzed 1,429 wings of 76 different species covering 20 genera. For genetic analysis, sequences from eight nuclear genes and mitochondrial genomes from 21 species were used. The Canonical Variate Analysis grouped all the species of the genus *Anopheles* into a single cluster; the same was observed for representatives of the Sabethini tribe. The wing shape proved to be a good taxonomic marker, because the analyzes in each tribe or genus were able to reveal natural clusters. The landmark #1 (located between the wing veins R1 and RS) was the most variable among all Culicidae genera. The magnitude of the morphological divergence seems to follow a hierarchical pattern, where: subfamily > tribe > genus > subgenus > species > population. Analyzes of MP, ML and AB using nuclear genes converged to the same tree, where Anophelinae appears as the sibling group of all other Culicinae. Regarding the mitochondrial genomes, the topology constructed with these data revealed well supported groups, and some were discordant to the current phylogeny of the family. Mitochondrial genomes generally followed the same genus order, except in the representatives of the Sabethini tribe, where there was a translocation of two transporter RNAs; this fact is unprecedented in Culicidae so far. The genes CO1, NAD2 and NAD6 presented high nucleotide diversity and could be used as markers for other studies. The ratio between non-synonymous and synonymous mutations revealed that the mitochondrial genome of the Culicidae is under strong purifying selection. Through MALDI-TOF spectrometry, 24 biomarkers were identified in the analyzed species; the phenetic topology constructed using these protein profiles did not show congruence with other markers, but may have potential in the taxonomic identification of the species. The Sabethini tribe presented a unique grouping in both genetic and morphological analyzes. In general, morphology, genetics and protein profiles were inconsistent, and this may be occurring due to (a) distinct evolutionary rates between them, (b) any marker used to be under positive selection or (c) genetic canalization. Great support was found for some groups within Culicidae, such as Anophelinae and Sabethini tribe, and the mitochondrial genome proved to be a useful tool in the reconstruction of the evolutionary history of mosquitoes

Keywords: Mosquitoes. Wing Geometric Morphometry. Mitochondrial Genome. Evolution. Protein Profile. Translocation. Purifying Selection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diversidade dentro da família Culicidae 20

Figura 2 - Árvore filogenética de inferência bayesiana 21

Figura 3 - Mapa do Brasil evidenciando os seis locais de coleta 32

Figura 4 – Asa de *Anopheles* com os marcos anatômicos utilizados 34

Figura 5 – Larvas coletadas para as análises 47

Figura 6 – Número de espécies coletadas 47

Figura 7 – Análise de Componentes Principais dos gêneros amostrados 48

Figura 8 – Análise de Componentes Principais utilizando o pacote *Mclust* 49

Figura 9 – Análise de Variáveis Canônicas dos gêneros 50

Figura 10 – PCA e CVA dos quatro subgêneros amostrados de *Anopheles* 50

Figura 11 – PCA e CVA dos quatro subgêneros amostrados de *Culex* 51

Figura 12 – PCA e CVA dos quatro gêneros amostrados da tribo Aedini 51

Figura 13 – PCA e CVA dos seis gêneros amostrados da tribo Sabethini 51

Figura 14 - Consensos alares após sobreposição de Procrustes 52

Figura 15 – Fenograma baseado na distância de Procrustes 53

Figura 16 – *Likelihood-mapping* dos genes nucleares 55

Figura 17 – Árvores de cada um dos oito genes nucleares analisados.....57

Figura 18 – Topologia da melhor árvore usando genes nucleares.....59

Figura 19 – Arranjo e ordem gênica dos genomas mitocondriais dos Culicidae 62

Figura 20 – Diferença entre genoma mitocondrial dos Culicidae e dos representantes da tribo Sabethini 64

Figura 21 – *Sliding Window Scale* do genoma mitocondrial dos Culicidae 65

Figura 22 – Melhor árvore de análise bayesiana com genes mitocondriais 68

Figura 23 – Perfil proteico de *Aedes aegypti* em cinco condições distintas 69

Figura 24 – Perfis proteicos evidenciados por espectrometria MALDI-TOF.....71

Figura 25 – Fenograma baseado em perfis proteicos 73

Figura 26 – Comparação entre as topologias genéticas e morfológicas 74

Figura 27 – Tamanho do centroide X árvore dos genes nucleares 74

Figura 28 – Tamanho do centroide X árvore dos genes mitocondriais.....75

Figura 29 – Morfoespaço de Componentes Principais da asa relacionado com a topologia genética obtida com os genes nucleares.....75

Figura 30 – Morfoespaço de Componentes Principais da asa relacionado com a topologia genética obtida com os genes mitocondriais 76

Figura 31 - Árvore gerada com as sequências dos genes nucleares X fenograma dos biomarcadores proteicos com MALDI-TOF 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Temperatura de *annealing* utilizada no PCR das espécies.....38

Tabela 2 - Descrição das espécies coletadas.....43

Tabela 3 – Relação dos genes nucleares utilizados.....54

Tabela 4 – Informações das sequências dos genes nucleares 56

Tabela 5 – Conteúdo GC e heterogeneidade nas posições dos códons nos gêneros analisados 56

Tabela 6 – Melhor esquema de particionamento para análises de supermatrix e o melhor modelo evolutivo escolhido para cada partição.....58

Tabela 7 – Melhor esquema de particionamento para análises de *species tree* e o melhor modelo evolutivo escolhido para cada partição.....58

Tabela 8 – Valores de *bootstrap* ou probabilidade posterior inferidos pelas análises de MP, ML e AB 60

Tabela 9 – Comparação entre os três algoritmos de montagem: Mira, IDBA_UD e Newbler 61

Tabela 10 – Comprimento e composição AT dos genomas mitocondriais 63

Tabela 11 – Informações sobre as sequências dos genes mitocondriais codificantes de proteínas analisados 64

Tabela 12 – Média da divergência nucleotídica calculada por *Maximum Composite Likelihood* dos genes mitocondriais codificantes de proteínas.....66

Tabela 13 – Melhor esquema de particionamento para análises de *supermatrix* e o melhor modelo evolutivo escolhido para cada gene mitocondrial 67

Tabela 14 – Matriz com os 24 *biomarkers* encontrados através do MALDI-TOF para cada espécie 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
pb	pares de base de DNA ou RNA
18S	subunidade menor do RNA presente no núcleo
12S	subunidade menor do RNA presente na mitocôndria
16S	subunidade maior do RNA presente na mitocôndria
CO1	citocromo oxidase subunidade 1
CO2	citocromo oxidase subunidade 2
CO3	citocromo oxidase subunidade 3
CYTB	citocromo B
NAD1	NADH-desidrogenase subunidade 1
NAD2	NADH-desidrogenase subunidade 2
NAD3	NADH-desidrogenase subunidade 3
NAD4	NADH-desidrogenase subunidade 4
NAD5	NADH-desidrogenase subunidade 5
NAD6	NADH-desidrogenase subunidade 6
ATP6	ATP-sintase subunidade 6
ATP8	ATP-sintase subunidade 8
ITS2	do inglês *internal transcribed spacer*
CAD	enzima carbamoil-fosfato-sintase
PCR	reação de polimerização em cadeia
GC	bases guanina e citosina
AT	bases adenina e tirosina
PCG	genes codificantes de proteínas
tRNA	RNA transportador
rRNA	RNA ribossomal
MALDI-TOF	tipo de espectrometria de massa por tempo de voo

ANOVA	análise de variância
PCA	análise de componentes principais
CVA	análise de variáveis canônicas
AIC	do inglês *Akaike Information Criterion*
dN	taxa de mutações não-sinônimas
dS	taxa de mutações sinônimas
kDa	kilodalton, unidade de massa para medir moléculas
SA	ácido sinapínico
π	índice de diversidade nucleotídica
MP	análise de máxima parcimônia
ML	análise de máxima verossimilhança
AB	análise bayesiana
ST	do inglês *species-tree*
SM	análise de supermatrix
TAE	solução tampão de Tris-acetato-EDTA
EDTA	do inglês *ethylene diamine tetra acetic acid*
NaCl	cloreto de sódio
SDS	dodecil sulfato de sódio
RPM	rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 A Família Culicidae 19
1.2 Histórico da Taxonomia do Grupo 20
1.3 Cenário Atual 21
1.4 Classificação dos Culicidae 23
1.5 Sequenciamento de Genes 24
1.5.1 Genes mitocondriais 26
1.6 Morfometria Geométrica Alar 27
1.7 Espectrometria de Massa – MALDI-TOF 28
1.8 Problema Biológico 29
2 OBJETIVOS 31
2.1 Objetivos gerais 31
2.2 Objetivos específicos 31
3 MATERIAL E MÉTODOS 32
3.1 Coleta e Identificação dos Espécimes 32
3.2 Morfometria Geométrica Alar 33
3.2.1 Tamanho do Centroide 35
3.2.2 Variáveis Canônicas 35
3.2.3 Comparação com a topologia genética 36
3.3 Busca de sequências no GenBank 36
3.4 Genomas Mitocondriais 37
3.4.1 Extração do DNA genômico 37
3.4.2 Amplificação e Purificação do DNA mitocondrial 38
3.4.3 Eletroforese em gel de agarose 39
3.4.4 Sequenciamento com Plataforma Illumina 39
3.4.5 Montagem e assembly dos reads 39
3.5 Análises Filogenéticas 40
3.6 Espectrometria MALDI-TOF 41
4 RESULTADOS 42
4.1 Coleta de Espécimes 42
4.2 Variação Morfológica Alar 48

4.3 Análises Genéticas 53
4.3.1 Genes Nucleares 53
4.3.1.1 Busca no GenBank 53
4.3.1.2 Teste do Sinal Filogenético 55
4.3.1.3 Informações das Sequências e Construção de Árvores 55
4.3.2 Genomas Mitocondriais 60
4.3.2.1 Organização e Características das Sequências 60
4.3.2.2 Análises Filogenéticas 67
4.4 Espectrometria MALDI-TOF 69
4.5 Comparação entre os métodos genéticos e morfológicos 73
5 DISCUSSÃO 78
5.1 Morfometria Geométrica Alar 78
5.2 Genes nucleares 81
5.3 Genes mitocondriais 85
5.4 Espectrometria MALDI-TOF 89
5.5 Comparação entre os Métodos: Asa X DNA X MALDI-TOF 92
6 CONCLUSÕES 95
REFERÊNCIAS 97
APÊNDICE 113
A – Artigos publicados em periódicos durante o doutorado 114
ANEXO 144
A - Termo SISBIO de autorização para coleta 145

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família Culicidae

Os culicídeos, conhecidos popularmente como mosquitos ou pernilongos, compreendem um grupo monofilético (Wood, Borkent, 1989; Miller et al., 1997; Harbach, Kitching, 1998) e pertencem à ordem Diptera. São insetos nematóceros – apresentam antenas longas com mais de seis segmentos articulados - distinguíveis dos demais da ordem pela presença de escamas nas veias alares, caráter que não se encontra nem mesmo nas famílias Chaoboridae e Dixidae, que lhes são próximas (Forattini, 2002). São facilmente reconhecidos pela longa probóscide e pela presença de escamas na maioria das partes do corpo. Encontram-se distribuídos pelas regiões tropicais e temperadas, inclusive no Círculo Ártico (Harbach, 2007). A área Neotropical detém o maior nível de biodiversidade e endemicidade, já que 27% dos culicídeos são restritos a essa região biogeográfica (Ward, 1982; Forattini, 2002).

Atualmente são reconhecidas 3.555 espécies (Mosquito Taxonomic Inventory, 2017), mas pode existir um número três vezes maior do que este, já que muitos mosquitos podem ser membros de complexos ou formas isomórficas de outras espécies, além daqueles ainda desconhecidos pela ciência (Figura 1). Apenas cerca de 200 culicídeos, principalmente dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* são vetores de patógenos que causam doenças em humanos, incluindo vírus (arboviroses), filárias (helmintíases) e protozoários. Essa relação entre mosquitos e saúde pública tem direcionado a maioria das pesquisas, com foco principalmente nas espécies com interesse médico (Reidenbach et al., 2009).

A família Culicidae tem origem antiga, provavelmente no período Jurássico (Edwards, 1932; Bertone et al., 2008), comprovado pelo registro fóssil de seu grupo-irmão Chaoboridae (Borkent, 1993). Mas infelizmente os poucos achados fósseis não solucionam as relações evolutivas dentro da família (Reidenbach et al., 2009). Devido a sua importância médica, Culicidae é um dos grupos mais estudados entre os insetos. Ironicamente, apesar dos inúmeros estudos morfológicos e moleculares, pouco progresso foi feito em relação ao entendimento da história evolutiva da família (Harbach, 2007).

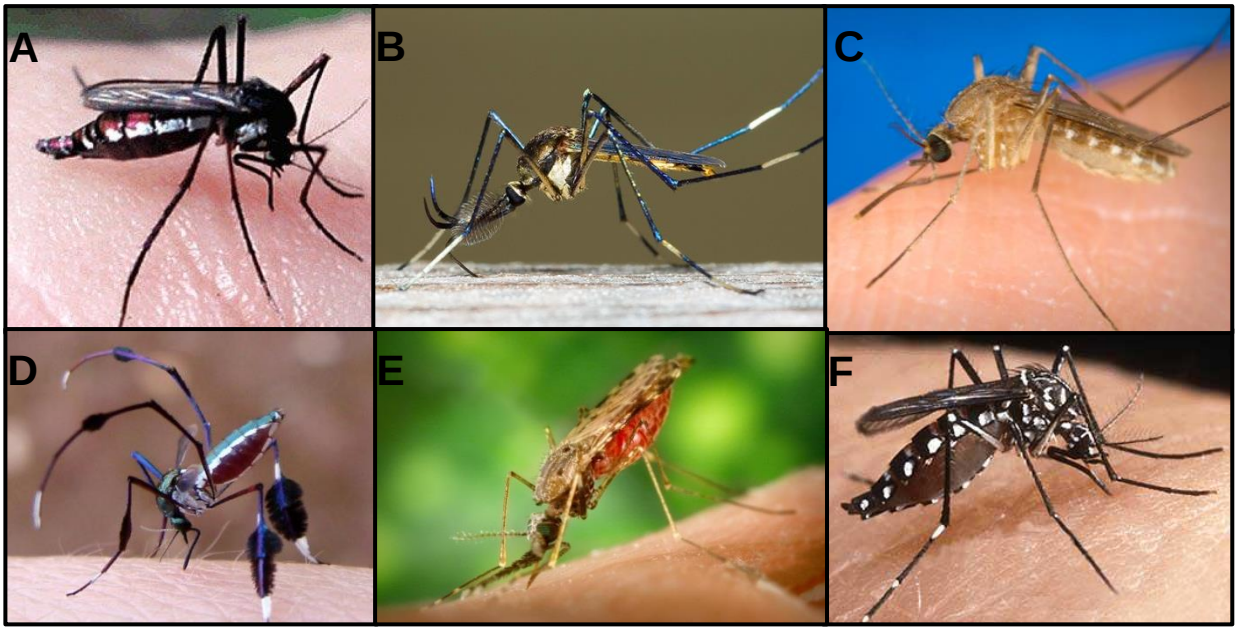


Figura 1 – Exemplos da diversidade dentro da família Culicidae. **(A)** *Haemagogus janthinomys* (Foto: Dr. Nicolas Dégallier); **(B)** *Toxorhynchites* spp. (Foto: Narelle Power); **(C)** *Culex quinquefasciatus* (Foto: James Gathany); **(D)** *Sabethes* spp. (Foto: S. Drechsel); **(E)** *Anopheles albimanus* (Foto: James Gathany); **(F)** *Aedes aegypti* (Foto: Muhammad Mahdi).

1.2 Histórico da taxonomia da família

A classificação tradicional dos Culicidae é morfológica e predominantemente gradista, sendo baseada nos estudos de Edwards (1932). Desse modo, os níveis taxonômicos conhecidos são grupos arbitrários baseados na interpretação subjetiva das similaridades morfológicas, sendo a grande maioria parafiléticos ou polifiléticos (Harbach, 2007).

Havia uma dúvida quanto ao monofiletismo do grupo Culicidae (Wood, Borkent, 1989; Miller et al., 1997; Harbach, Kitching, 1998). Entretanto, três sinapomorfias anatômicas dos mosquitos adultos suportam o monofiletismo da família: presença de escamas eretas na cabeça (com várias perdas e reduções), aparelho bucal desenvolvido numa longa probóscide única e a presença de cerdas pré-alares (perdido em *Hodgesia, Malaya* e *Sabethes*) (Forattini, 2002).

Os gêneros existentes dentro de Culicidae raramente são revisados por completo, então também existem várias questões não resolvidas sobre o status taxonômico de muitas espécies, principalmente com aquelas dos gêneros: *Aedes, Armigeres, Coquillettidia, Culex, Mansonia, Mimomyia, Ochlerotatus, Psorophora,* e *Wyeomyia*. Tratam-se de gêneros que abrigam espécies extremamente variáveis e

difíceis de identificar, justamente pelo compartilhamento de características morfológicas (Harbach, 2007).

1.3 Cenário Atual

Os métodos contemporâneos de classificação têm incorporado revisões importantes de grande parte dos gêneros e tribos baseados tanto na morfologia quanto em dados moleculares. A classificação atual divide a família Culicidae em duas subfamílias (Anophelinae e Culicinae), 11 tribos e no mínimo 44 gêneros (Reinert et al., 2006, 2009; Harbach, 2007). A Figura 2 foi retirada e modificada de Reidenbach et al. (2009) e representa uma das filogenias atuais mais abrangentes, utilizando seis genes nucleares e 81 caracteres morfológicos em 25 gêneros de Culicidae. Entretanto, a maioria dos estudos atuais com culicídeos é limitada a poucos gênero ou grupos de espécies particulares de determinado país ou região. Existem lacunas significativas no conhecimento da taxonomia de Culicidae, pois se trata de um grupo muito extenso com uma quantidade enorme de espécies, inclusive algumas ainda não descritas.

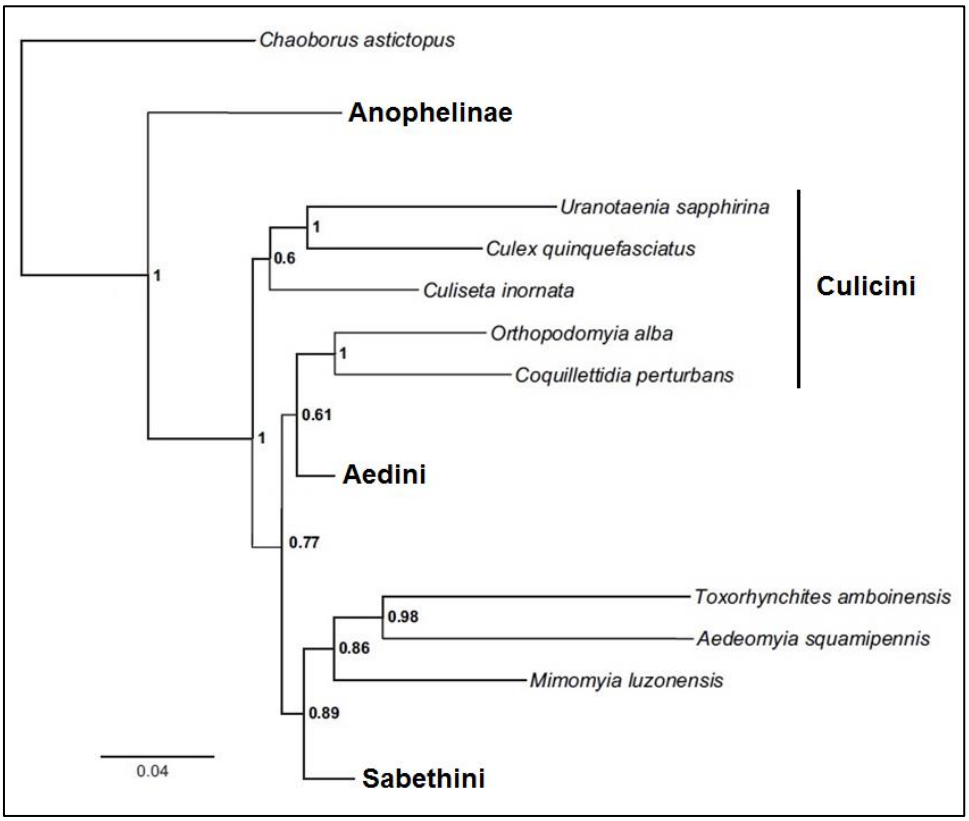


Figura 2 - Árvore filogenética de inferência bayesiana construída com dados dos aminoácidos de seis genes e 81 caracteres morfológicos, amostrando 25 gêneros de Culicidae (modificado de *Reidenbach et al., 2009*).

Até os dias de hoje existem poucos estudos de filogenia molecular de Culicidae ao nível de gênero; a maioria é focada em níveis específicos. Todos esses estudos genéricos foram capazes de demonstrar, de acordo com a filogenia morfológica, que *Anopheles* é grupo-irmão dos outros gêneros amostrados (Besansky, Fahey, 1997; Miller et al., 1997; Mitchell et al., 2002; Shepard et al., 2006). Um estudo abrangente foi o de Shepard et al. (2006) baseado na subunidade 18S do DNA ribossomal de 39 espécies representando nove gêneros. Entretanto não foi possível resolver relações filogenéticas infra-genéricas com aquelas análises. Besansky e Fahey (1997) utilizaram o gene da proteína nuclear (*white*) para desvendar essas relações, que incluiu 13 espécies representando nove gêneros. Dessa forma, eles confirmaram a linhagem basal de Anophelinae e revelaram que Sabethini, Culicini e Aedini são grupos monofiléticos, demonstrando o potencial das sequências codificantes para reconstrução de relações filogenéticas dentro de Culicidae (Reidenbach et al., 2009).

Estudos de Sallum et al. (2000), Harbach e Kitching (2005) e Collucci e Sallum (2007) demonstraram os efeitos causados por diferentes interpretações das homologias, codificação dos caracteres e amostragem taxonômica sobre o resultado de uma reconstrução filogenética. Do mesmo modo, a escolha de fragmentos de DNA, interpretações da estrutura do gene, homologias, alinhamento, bem como erros no sequenciamento e escolha do método também têm efeitos importantes nas filogenias. Como ressaltado por Stevens e Schofield (2003), os genes podem ter histórias evolutivas distintas das dos organismos e por isso nem sempre a evolução dos marcadores moleculares é congruente com a evolução das espécies. É importante ressaltar que a diversidade encontrada em Culicidae deve ser muito antiga no tempo evolutivo; estudos de Reidenbach et al. (2009) demonstram que alguns gêneros como *Culex*, por exemplo, divergiram há pelo menos 150 milhões de anos. Além disso, existem evidências de uma irradiação rápida em alguns táxons, como é o caso dos anofelinos do subgênero *Kerteszia* (Lorenz et al., 2015). Ambas as questões criam problemas para a reconstrução filogenética, tanto com base em morfologia como em genética.

1.4 Classificação dos Culicidae

A subfamília Anophelinae inclui 476 espécies formalmente descritas. Muitas espécies pertencem a complexos e esperam por nomenclaturas formais. A tradicional classificação desta subfamília inclui três gêneros: *Anopheles* (cosmopolita), *Bironella* (Australásia) e *Chagasia* (Neotropical). Análises filogenéticas com dados morfológicos e sequências de DNA mitocondrial, ribossômico e nuclear suportam fortemente o monofiletismo desta subfamília, e classificam *Chagasia* como ancestral de todos os outros anofelinos (Besansky, Fahey, 1997; Foley et al., 1998; Harbach, Kitching, 1998, 2005; Sallum et al., 2000, 2002; Krzywinski et al., 2001a,b; Harbach, 2007).

Aedini é a maior tribo da família Culicidae, com cerca de 1.240 espécies reconhecidas. Belkin (1962) classificou essa tribo como grupo natural, mas notou que alguns membros também apresentavam afinidades com outros táxons mais superiores dentro de Culicidae. Espécies dessa tribo são polimórficas e muito difíceis de identificar o gênero, já que há grande compartilhamento de características. Dessa forma, combinações de várias características são necessárias para definir a maioria dos gêneros, subgêneros e espécies.

O monofiletismo da tribo Culicini nunca foi contestado. Ela inclui 789 espécies classificadas em quatro gêneros: *Culex* (cosmopolita), *Deinocerites* (Neotropical), *Galindomyia* (Neotropical) e *Lutzia* (ausente no Paleártico ocidental e regiões Neárticas). A tribo Sabethini inclui 417 espécies distribuídas em 14 gêneros, principalmente Neotropicais, Orientais e regiões da Australásia.

Como síntese das principais informações sobre mosquitos que atualmente são adotadas, de acordo com Harbach (2007), pode-se citar:

¬ A família Culicidae é monofilética, mas as relações entre os gêneros não estão resolvidas;

¬ A subfamília Anophelinae é uma linhagem monofilética basal irmã dos demais Culicidae;

¬ O gênero *Anopheles* não pode ser monofilético se considerado juntamente com o gênero *Bironella*;

¬ As tribos Aedini, Culicini e Sabethini são monofiléticas;

¬ Os gêneros *Aedes* e *Ochlerotatus* são tradicionalmente definidos como polifiléticos;

¬ O monofiletismo das demais tribos, gêneros, subgêneros e grupos de espécies de Culicidae ainda não foi testado, e suas relações filogenéticas são incertas;

Apesar da importância médica e do longo histórico de pesquisas, a taxonomia dos Culicidae está longe de estar completa e o sistema de classificação existente não segue completamente sua história evolutiva (Belkin, 1962; Judd, 1996; Harbach, Kitching, 1998; Reinert et al., 2004, 2006; Harbach, 2007). A aplicação de métodos moleculares nas análises filogenéticas está revelando a limitação da classificação tradicional dos mosquitos baseada somente em características morfológicas. O principal problema não está em reconhecer grupos monofiléticos, mas sim em decidir qual é seu status taxonômico em relação aos outros táxons (Harbach, 2007).

A seguir serão descritos alguns dos métodos atualmente utilizados para identificação de insetos, e que possuem particular utilidade nos casos de escassez ou pouca evidência de caracteres diagnósticos. Os métodos a seguir também têm aplicabilidade filogenética, como será esclarecido adiante.

1.5 Sequenciamento de Genes

A sistemática molecular de insetos tem complementado e reforçado os dados morfológicos e ecológicos, fazendo contribuições significativas para o entendimento dos processos evolutivos em insetos (Caterino et al., 2000). Entretanto, há várias controvérsias entre os sistematas na escolha de marcadores genéticos para construção de filogenias, o que explica o grande número de trabalhos usando genes diferentes. Essa situação problemática não é predominante em outros grupos, como vertebrados e plantas. Para ambos os grupos, geralmente há um reduzido grupo de marcadores aceitos como padrão, sendo usados globalmente para todos os táxons com o intuito de acumular dados similares (Caterino et al., 2000; GenBank, 2017).

A análise filogenética de um *loco* particular produz uma *gene-tree* ("árvore do gene") que pode ou não concordar com a filogenia dos táxons (Avise, 1994; Doyle, 1997; Maddison, 1997). A incongruência entre as *gene-trees* e *species-tree* pode ser esperada sob certas circunstâncias, como: seleção diversificadora, transferência horizontal (incluindo hibridização), *lineage sorting* (coalescência antiga – manutenção de polimorfismo ancestral) e duplicação do gene seguido de extinção (Doyle, 1992; Maddison, 1997). Métodos específicos têm sido propostos para

resolver esses problemas, como utilizar múltiplas *gene-trees* para inferir a filogenia verdadeira das espécies (Page, 1998).

A importância de se amostrar diversos genes nas reconstruções filogenéticas é bem reconhecida (Rannala, Yang, 2008). O DNA mitocondrial e o ribossomal nuclear são alvos convenientes devido aos sítios de ligação conservados para os primers e à facilidade de amplificação baseada em seu número de cópias elevado. Entretanto, ambos podem ser problemáticos para resolver relações filogenéticas profundas: o DNA mitocondrial pode apresentar uma taxa elevada de mutações em alguns genes ou até mesmo ser modificado por bactérias simbiontes do organismo (Lin, Danforth, 2004; Hurst, Jiggins, 2005; Morais et al., 2012); o DNA ribossomal pode ser difícil de alinhar. Devido à crescente disponibilidade de genomas completos de mosquitos, os genes nucleares codificadores de proteínas representam uma alternativa viável, além de rica fonte de recursos largamente inexplorados (Reidenbach et al., 2009).

Genes nucleares ribossômicos e genes codificantes de proteínas diferem pouco nos padrões de substituição nucleotídica. É recomendado combinar ambos os marcadores, pois cada um possui vantagens distintas (Danforth et al., 2005). Os primeiros são os mais comumente utilizados em filogenias superiores de insetos (Whiting et al., 1997; Wiegmann et al., 2000; Dietrich et al., 2001; Giribet et al., 2001; Kjer et al., 2001; Wheeler et al., 2001; Belshaw, Quicke, 2002), mas em alguns casos eles podem apresentar problemas no alinhamento entre as sequências (Hickson et al., 2000). Genes nucleares codificadores de proteínas podem ser uma boa escolha para análises filogenéticas em insetos. As regiões codificantes desses genes são geralmente alinhadas com facilidade e sem ambiguidade. Baseado no genoma completo de *Drosophila melanogaster*, foram encontrados 13.379 genes codificantes para proteínas (Adams et al., 2000). Eles apresentam variadas taxas de substituição, que podem evoluir rapidamente – sendo boas escolhas para estudos de divergências recentes (ex: gene *period,* Regier et al., 1998) – ou serem mais estáveis – sendo boas escolhas para análises de divergências antigas (ex: RNA polimerase II, Shultz e Regier, 2000). Atualmente há poucos estudos combinando genes ribossomais com genes codificantes de proteínas para efetuar uma análise mais detalhada nos vários níveis filogenéticos em Culicidae (Danforth et al., 2005).

1.5.1 Genes mitocondriais

Atualmente, os genomas mitocondriais completos estão ganhando popularidade na resolução de filogenias principalmente pela facilidade em sequenciar o genoma inteiro e pela habilidade em resolver relações filogenéticas mais basais do que outros genes (Saccone et al., 1999; Nardi et al., 2003; Cameron et al., 2004). Contendo 37 genes – 13 codificantes de proteínas, dois RNAs ribossomais e 22 RNAs de transferência – o típico genoma mitocondrial dos metazoários é circular e possui aproximadamente 15,000 bp, que pode ser facilmente amplificado por PCR utilizando uma combinação de *primers* universais (Cameron et al., 2012). Além disso, vários estudos recentes têm demonstrado que o genoma mitocondrial é um dos marcadores mais informativos para resolver relações filogenéticas em insetos, incluindo Phasmatodea (Komoto et al., 2011), Orthoptera (Fenn et al., 2008), Hemiptera (Hua et al., 2008, 2009), Hymenoptera (Cameron et al., 2008; Dowton et al., 2009), Coleoptera (Song et al. 2010; Timmermans et al., 2010), Diptera (Cameron et al., 2007) e Lepidoptera (Kim et al., 2011).

Além dos dados de sequência nucleotídica, outras informações filogenéticas úteis também podem ser extraídas dos genomas mitocondriais, como variabilidade no tamanho gênico e intergênico (Schneider, Ebert, 2004), eventos de inserção e deleção (Rokas, Holland, 2000), e rearranjo de genes (Boore, Brown, 1998). A mitocôndria constitui um modelo ideal para estudar a evolução justamente devido a esse rearranjo no genoma, onde a ordem dos genes pode reter traços de relações filogenéticas (Boore et al., 1998). Além disso, o número de genes existente dentro do genoma mitocondrial (37 genes) é conveniente para estudos filogenéticos, já que não necessita de um tempo computacional muito grande para rodar as análises e permite conclusões estatisticamente confiáveis (Sankoff et al., 1992).

Outro argumento que favorece o uso do genoma mitocondrial para reconstruções filogenéticas é que o tamanho efetivo populacional desse marcador é menor quando comparado a um nuclear, por exemplo (cerca de 25% devido à sua haploidia e herança materna). Quanto menor for o tamanho efetivo populacional, maior é a probabilidade de a árvore do gene ser congruente com a árvore da espécie (Moore, 1995). Ao analisar 34 espécies de aves, Moore (1995) constatou esse fato principalmente em ramos filogenéticos longos, onde a probabilidade de a árvore-mitocondrial ser compatível com a árvore da espécie é cerca de 95%, contra

apenas 62% quando um gene nuclear é utilizado. Ele também observou que esse fato está diretamente relacionado com o grau de profundidade filogenética entre os organismos.

1.6 Morfometria Geométrica Alar

Como citado anteriormente, a caracterização morfológica de estruturas complexas e de variabilidade individual é difícil e sujeita à subjetividade, muitas vezes prejudicando as análises filogenéticas. 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 um modelo matemático descritivo das dissimilaridades 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 comparações morfométricas. Há estudos na literatura que indicam ser possível separar espécies através da morfometria geométrica (Calle et al., 2002; Vidal et al., 2011; Lorenz et al., 2012), o que nos leva a crer que também seria possível distinguir gêneros dentro de uma mesma tribo ou família.

Para a análise da forma alar, geralmente faz-se uma sobreposição de Procrustes e posterior estudo de componentes principais (*relative warps*) e variáveis canônicas, que excluem a variação do tamanho isométrico e definem a variação real dos formatos nas asas (Monteiro, Reis, 1999). E para a descrição de tamanho alar utiliza-se o vetor tamanho do centroide, definido pela a raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada ponto anatômico do centroide 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 voo, 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).

Existem estudos na literatura que utilizam dados morfométricos para construção de filogenias (Zelditch et al., 1995, 1998; Swiderski et al., 2000; Guerrero et al., 2003), codificando características quantitativas em estados discretos. Isso é possível se houver um forte sinal filogenético (Cole, 2002) nos dados morfométricos, ou seja, se os táxons mais próximos apresentarem forma mais semelhante entre si do que os outros não-relacionados. A força desse sinal filogenético é refletida no grau de congruência entre o fenograma morfométrico e a árvore filogenética conhecida daquele táxon (MacLeod, Forey, 2002).

1.7 Espectrometria de Massa – MALDI-TOF

Outra abordagem que atualmente tem sido empregada para identificação de espécies é o perfil proteico total das espécies, principalmente evidenciado pela espectrometria de massa tipo MALDI-TOF. Inicialmente, a análise dos perfis proteicos era empregada para caracterização de colônias de bactérias. Na última década, ela tornou-se um método rotineiro para identificação desses microrganismos em laboratórios de diagnóstico (Sauer, Kliem, 2010). Em dois trabalhos pioneiros, o perfil proteico total também tem sido avaliado quanto ao seu potencial para identificar insetos. Campbell (2005) demonstrou que através de análises com MALDI-TOF é possível de distinguir espécies crípticas de *Drosophila melanogaster*. Da mesma forma, perfis proteicos espécie-específicos foram identificados em três espécies de gêneros diferentes de pulgões (Perera et al., 2005). Em um estudo recente, Feltens et al. (2010) também utilizou uma abordagem proteica para estabelecer relações filogenéticas entre 13 espécies de moscas *Drosophila*. Finalmente, Kaufmann et al. (2011) utilizou o MALDI-TOF para caracterização de *Culicoides*, obtendo resultados informativos.

Todos esses estudos comprovam o potencial do uso de perfis proteicos evidenciados por MALDI-TOF para identificação de espécies/gêneros. Além de ser uma técnica rápida, simples e confiável, ela também tem um ótimo custo-benefício se comparada a outras técnicas de identificação proteica (Kaufmann et al., 2011). A utilização do MALDI-TOF para identificação de táxons resolveria problemas básicos da taxonomia, como exemplares degradados pelo tempo e características

taxonômicas muito subjetivas ou de difícil interpretação (Carpenter et al., 2008; Meiswinkel et al., 2008; Kaufmann et al., 2011).

A técnica de espectrometria de massas é considerada uma das mais precisas da atualidade e serve para analisar as moléculas de maneira quantitativa e qualitativa. É possível obter com facilidade 5 ou 6 algarismos significativos na massa molar, com erros que chegam a apenas 0,001% em equipamentos de alta resolução (Ross et al., 1998). Durante os anos 80 foram desenvolvidos novos mecanismos de ionização em espectrômetros de massa para moléculas grandes e polares, como peptídeos e proteínas, o que permitiu que muitos problemas bioquímicos pudessem ser esclarecidos.

Um espectrômetro de massa é formado basicamente de duas partes: o sistema de ionização das moléculas, responsável por vaporiza-las e carrega-las eletricamente, e o analisador de massa – o espectrômetro de massa propriamente dito – que separa os íons resultantes de acordo com a massa.

A técnica de ionização MALDI (sigla em inglês para *matrix-assisted laser desorption ionization*) baseia-se na dessorção a laser das moléculas. O analisador de massa TOF (sigla em inglês para time-of-flight) lança as moléculas ionizadas e aceleradas em um tubo sob vácuo e sem campo elétrico para medida do seu tempo de “vôo” até um detector. Esse tempo de “vôo” é proporcional à massa molar da molécula; sendo assim, esse caracter pode ter significado evolutivo e consequentemente possibilidade de emprego na filogenia dos grupos.

1.8 Problema Biológico

A filogenia dos Culicidae ainda não está totalmente compreendida. Existem lacunas significativas no conhecimento do grupo, principalmente para espécies/gêneros Neotropicais. Os caracteres morfológicos utilizados em taxonomia muitas vezes são subjetivos ou de difícil interpretação, prejudicando a análise de homologias em estudos filogenéticos. É desejável, portanto, que filogenias agreguem também dados moleculares, no intuito de minimizar esses problemas. Podemos obter benefícios da grande quantidade de sequências gênicas e da disponibilidade atual de espectrômetros de massa que permitem fina caracterização de moléculas espécie-específicas. Dessa forma propomos aqui elaborar uma hipótese filogenética para os gêneros de Culicidae baseada nos já tradicionais

caracteres de variabilidade genética, nos genomas mitocondriais e nos recém-agregados caracteres de “perfil proteico” evidenciados por espectrometria de massa (MALDI-TOF). O resultado será comparado ao fenograma de morfometria geométrica alar com intuito de entender a evolução do formato da asa dentro do grupo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

¬ Elaborar hipótese filogenética para os principais gêneros de Culicidae Neotropicais baseando-se em perfis proteicos totais evidenciados por MALDI-TOF e sequências genéticas (nucleares e mitocondriais);

¬ Entender a evolução da asa entre os gêneros de Culicidae por meio da morfometria geométrica, amostrando a diversidade encontrada na família;

2.2 Objetivos específicos:

¬ Comparar os métodos morfológicos e moleculares entre si, verificando incongruências e compatibilidades;

¬ Comparar os resultados gerados aqui com a literatura mais aceita atualmente, com destaque para a posição filogenética dos principais gêneros Neotropicais;

¬ Avaliar o potencial dos marcadores genéticos, morfológicos e proteicos na identificação e filogenia dos Culicidae;

¬ Reunir dados genéticos existentes no GenBank dos gêneros da família Culicidae;

¬ Montar e analisar o genoma mitocondrial dos principais gêneros Neotropicais de Culicidae com finalidade taxonômica e filogenética;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e Identificação dos Espécimes

Foram realizadas seis coletas em seis cidades brasileiras: Manaus/AM (3º05' S, 60º00' W), Monte Negro/RO (10º15' S, 63º18' W), Rio de Janeiro/RJ (22º55' S, 43º12' W), Frutal/MG (20º02' S, 48º56' W), Pariquera-Açu/SP (24°53' S / 47°51' W) e Campos do Jordão/SP (22º44' S, 45º35' W) (Figura 3). Em Manaus/AM e no Rio de Janeiro/RJ as coletas foram realizadas dentro da Reserva Florestal Adolpho Ducke e do Parque Nacional da Tijuca, respectivamente, mediante apresentação do termo de autorização SISBIO (Ministério do Meio Ambiente) número 38983-1 (Anexo 1).

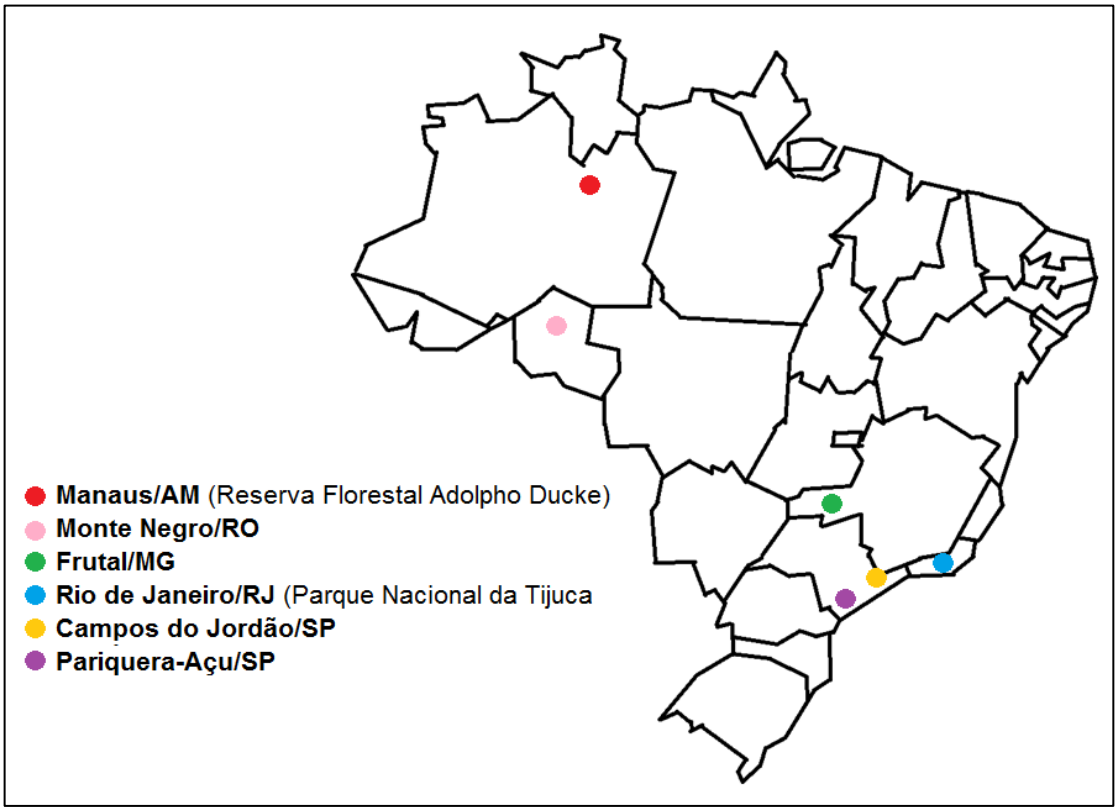


Figura 3 - Mapa do Brasil evidenciando os seis locais de coleta. Modificado de Instituto Geográfico Cartográfico, 2014.

Os locais de coleta foram escolhidos por representarem a localidade-tipo das espécies amostradas, ou seja, localidades em que elas foram descritas pela primeira vez. Quando isso não foi possível, optou-se por escolher as localidades geograficamente mais próximas a essas regiões. As coletas foram realizadas entre os anos de 2013 e 2014, fazendo sempre o monitoramento pelo Instituto Nacional de

Meteorologia (INMET) para saber qual a época mais propícia para encontrar alta densidade de mosquitos nas regiões amostradas. Foram coletadas formas imaturas (larvas e pupas) no ambiente silvestre com a utilização de pipetas de plástico e bombas de sucção manual como proposta por Lozovei e Silva (1999). As formas imaturas foram armazenadas em potes plásticos contendo a água do local em que foram encontradas. As capturas dos adultos foram diurnas e crepusculares, visando amostrar o máximo da fauna local, com a utilização de aspiradores entomológicos e armadilhas de Shannon.

No laboratório, as larvas foram mantidas em recipiente com água destilada, sendo alimentadas com ração de peixe (Tetramin ®) até atingir a fase de pupa. Nesse período todos os indivíduos ficaram submetidos à temperatura média de 25 ºC e 80% de umidade relativa do ar, com fotoperíodo natural. Após emergir, os adultos eram identificados ao nível de espécie e quanto ao sexo com auxílio de chaves taxonômicas do livro do Forattini (2002) e Harbach (2007). Optou-se por seguir essa classificação de Culicidae proposta já que a maioria da literatura existente também segue tal classificação, e um dos objetivos do presente estudo é justamente comparar os resultados com essa literatura. Os mosquitos identificados foram mantidos secos em freezer a -80 °C. As asas direitas dos exemplares fêmeas foram retiradas e armazenadas para posterior montagem em lâminas de microscopia.

3.2 Morfometria Geométrica Alar

Foram utilizados os métodos descritos por Lorenz et al. (2012) para as análises de morfometria geométrica alar. As asas das espécies de *Anopheles* e *Aedeomyia* foram coradas com fucsina ácida, pois apresentavam muitas manchas e as nervuras eram muito claras, dificultando a marcação dos pontos. Para as demais espécies coletadas foi utilizado apenas um pincel com álcool para auxiliar na remoção das escamas da asa. Foram utilizadas asas de indivíduos fêmeas e apenas uma asa por indivíduo (preferencialmente a direita, mas quando esta estava danificada utilizava-se a esquerda, já que não houve assimetria em testes realizados *a priori*). A seguir as asas foram montadas entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá.

As imagens foram capturadas pela câmera fotográfica digital Leica 320 acoplada a um microscópio estereoscópico Leica S6. Com o auxílio do *software* TpsDig v.2 (Rohlf, 2005) foram tomadas as coordenadas posicionais de cada um dos 18 pontos anatômicos sobre um plano cartesiano (Figura 4). Sobre esses dados foram calculados os componentes principais (PCA), as variáveis canônicas (CVA) e o tamanho do centroide utilizando os programas TpsUtil 1.26 (Rohlf, 2004a), TpsRelw 1.36 (Rohlf, 2003) e MorphoJ 1.06 (Klingenberg, 2011). Para representar a distribuição dos indivíduos no morfoespaço foram plotados gráficos de dispersão de pontos ou histogramas utilizando o software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

Para verificar o grau de similaridade entre as espécies, distâncias de Mahalanobis e de Procrustes foram calculadas utilizando o programa Morpho J 1.06. As distâncias geradas entre as amostras foram organizadas em tabelas e em seguida convertidas em fenogramas construídos pelo algoritmo de *neighbour-joining* com o auxílio do software Phylip (Felsenstein, 1995). Além disso, o pacote *Mclust* do software R foi utilizado para classificar os grupos de acordo com o Modelo de Mistura de Gaussianas, sem classificação *a priori*.

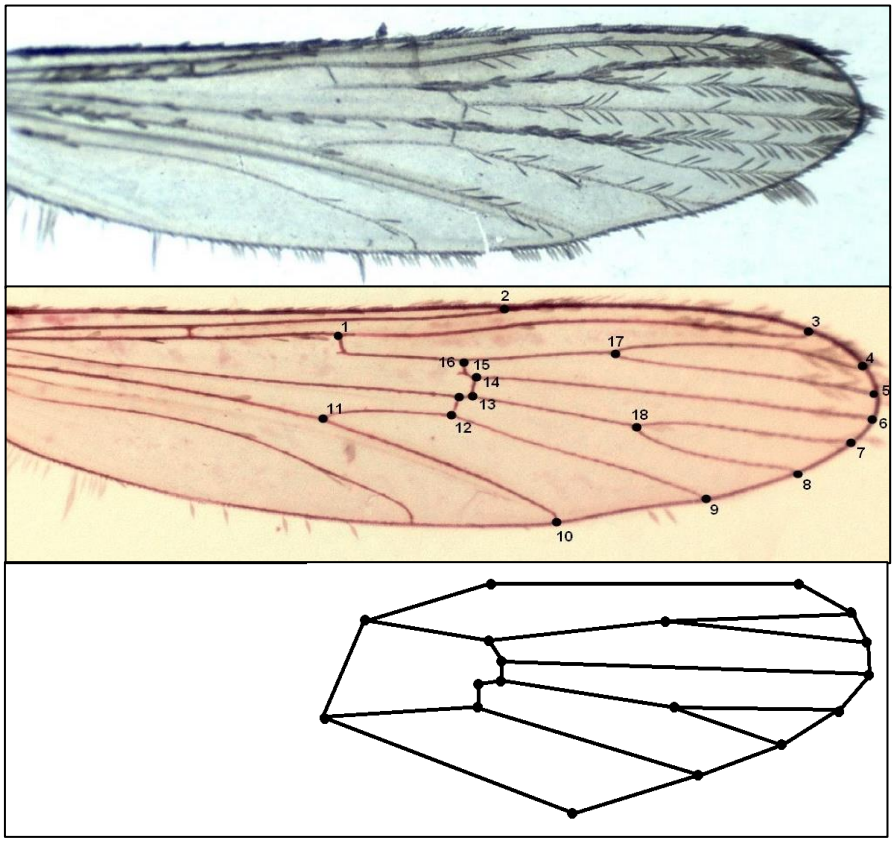


Figura 4 - Acima, foto da asa de um exemplar de *Anopheles*. No meio, asa após coloração com fucsina ácida, evidenciando os marcos anatômicos utilizados. Abaixo, diagrama alar obtido com a ligação dos 18 pontos para as análises morfométricas.

3.2.1 Tamanho do Centroide

Os tamanhos dos centroides e a construção dos gráficos descritores dos centroides foram obtidos a partir dos *softwares* TpsRelw 1.36 (Rohlf, 2004b) e Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004), sendo utilizados nas comparações intra e interpopulacionais e interespecíficas das amostras. Para testar a normalidade das distribuições amostrais foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov; e para comparações múltiplas dos tamanhos dos centroides utilizou-se a análise de variância ANOVA e teste *post-hoc* de Tukey-Kramer.

3.2.2 Variáveis Canônicas

Por definição, as variáveis canônicas são variáveis latentes que sumarizam as diferenças entre as amostras classificadas *a priori*, sob uma perspectiva multivariada (Monteiro, Reis, 1999). Elas foram obtidas com os *softwares* MorphoJ 1.02 e Statistica 7.0. Tabelas de *relative warps* (Rohlf, 2003) foram geradas no programa TpsRelw para cada comparação e utilizadas no Statistica para as análises canônicas. Entre as variáveis canônicas obtidas em cada comparação, foram consideradas para interpretação apenas a primeira e a segunda (VC1 e VC2), pois segundo Monteiro e Reis (1999) elas são as mais informativas. Para representar a distribuição dos indivíduos no morfoespaço de variáveis canônicas, foram plotados gráficos de dispersão de pontos ou histogramas.

Derivadas dessas análises, as distâncias de Mahalanobis foram calculadas através do software MorphoJ 1.02 para avaliar o grau de similaridade relativo entre as amostras. Testes de reclassificação também foram realizados para todas as comparações realizadas utilizando o programa MorphoJ. Nesse tipo de teste cada espécime é retirado da análise, uma nova classificação é realizada com os indivíduos restantes e em seguida esse espécime é reinserido para averiguar em qual grupo ele é classificado; trata-se de um teste com validação (*cross-validated*). A confiabilidade da reclassificação é representada com um valor percentual.

3.2.3 Comparação com a topologia genética

Para comparar as abordagens genéticas e morfológicas, as informações de forma alar provenientes dos 18 *landmarks* foram extraídas em componentes principais, sendo que foram considerados apenas os dois primeiros - aqueles responsáveis pela maior quantidade de variação. Posteriormente foi plotado no morfoespaço a média da variação alar encontrada para cada gênero amostrado; em seguida a filogenia construída com dados genéticos foi combinada com essas informações no espaço da forma. Desse modo é possível avaliar se os ramos da topologia genética se posicionam no mesmo espaço em que a forma alar é mais semelhante entre os gêneros.

3.3 Busca de sequências no GenBank

A obtenção *in silico* das sequências de DNA dos genes ribossomais e codificantes de proteínas de Culicidae foi realizada a partir de busca no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências de DNA obtidas foram alinhadas e editadas com o programa MEGA 5.0 (Tamura et al., 2007). Para testar preliminarmente o sinal filogenético de cada gene, foi utilizado o método *likelihood-mapping* (Strimmer, Haeseler, 1997) com o software Tree Puzzle 5.2. Trata-se de um método gráfico para visualizar o conteúdo filogenético de um grupo de sequências alinhadas. Esse método baseia-se na análise, através da verossimilhança, de três topologias bem resolvidas que podem ser obtidas a partir de quatro sequências. Essas três topologias estão representadas nas pontas de um triângulo equilátero. Esse triângulo é particionado em várias regiões, sendo que as regiões das extremidades representam filogenias bem resolvidas. Se n sequências são analisadas, tal que $n > 4$, então cada subgrupo de quatro sequências é mapeado dentro do triângulo. O resultado dessa distribuição de pontos mostra se os dados são adequados para uma reconstrução filogenética ou não.

Com o intuito de evitar adquirir sequências de DNA pouco confiáveis existentes no GenBank, já que trata-se de um banco de dados não-curado, optou-se por selecionar apenas aquelas relacionadas com algum artigo científico já publicado no PubMed (2017).

Como o objetivo principal do trabalho é resolver relações filogenéticas entre os gêneros de Culicidae, foram selecionadas sequências de apenas uma espécie representativa para cada respectivo gênero. Essa seleção foi feita priorizando as sequências com mais pares de base e foram resgatados apenas aqueles genes que já haviam disso sequenciados para quatro ou mais gêneros distintos.

3.4 Genomas Mitocondriais

3.4.1 Extração do DNA genômico

Foram utilizados 20 exemplares adultos conservados em freezer -80 °C para extração de DNA genômico e análises de DNA mitocondrial das seguintes espécies: *Culex quinquefasciatus, Wyeomyia confusa, Psorophora saeva, Psorophora ferox, Ochlerotatus vigilax, Aedes aegypti, Aedes albopictus, Limatus flavisetosus, Mansonia amazonensis, Coquillettidia chrysonotum, Trichoprosopon pallidoventer, Uranotaenia geometrica, Haemagogus janthinomys, Anopheles cruzii, Anopheles darlingi, Toxorhynchites sp., Aedes fulvus, Sabethes undosus, Runchomyia reversa* e *Aedeomyia squamipennis* (de acordo com a classificação proposta por Harbach, 2017). A extração de DNA foi feita individualmente para cada mosquito, de acordo com o método descrito a seguir:

Aquelas amostras conservadas em freezer -80 °C foram maceradas em solução de homogeneização [Tris-HCl 10 mM (pH=7,5), NaCl 60 mM, EDTA 50 mM]. Aos homogeneizados foi adicionada a solução de lise [SDS 1,25%, Tris-HCl 0,3 M (ph=9,0), EDTA 0,1 M, sacarose 5%, proteinase K a 100 µg/ml]. Toda essa mistura foi incubada a 65 ºC durante 1 hora, para “lise” das células e para a ação da proteinase K (clivar as proteínas em peptídeos menores).

Prossegue-se com uma incubação a 4 ºC durante 45 minutos e logo após uma centrifugação a 12.000 g a 4 ºC. Posteriormente, se formaram duas fases na mistura. O precipitado (peptídeos) foi descartado, e o sobrenadante (ácidos nucléicos e sais) foi transferido para outro microtubo e misturado com 2 volumes de etanol 100%, visando a precipitação do DNA. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g à temperatura ambiente, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 ml de etanol 70% ao precipitado, submetendo a mistura a uma última

centrifugação à temperatura ambiente e 12.000 g por 5 minutos. O precipitado final foi seco e ressuspendido em 20 µl de H2O milli-Q (Millipore) para cada amostra, que foram armazenadas a -20 ºC.

3.4.2 Amplificação e Purificação do DNA mitocondrial

O genoma mitocondrial de cada indivíduo foi amplificado utilizando o método de PCR (*polymerase chain reaction*) longa (Hwang et al., 2011). As reações foram preparadas utilizando as seguintes concentrações finais das soluções: 25 µl de GoTaq Long PCR Master Mix 2x (Promega, WI), 0,3 µM de cada um dos iniciadores (*forward* e *reverse*), 1-2 µl de DNA extraído e água estéril para completar o volume final de 50 µl de reação para cada tubo de 0,2 ml. Os iniciadores (*primers*) usados na amplificação do genoma mitocondrial foram publicados por Hwang et al. (2011): HPK16Saa: 5' ATGCTACCTTTGCACRGTCAAGATACYGCGGC 3' para a fita *forward* e HPK16Sbb: 5' CTTATCGAYAAAAAAGWTTGCGACCTCGATGTTG 3' para a fita *reverse*. O tamanho do fragmento final amplificado foi de aproximadamente 15.300 pb. O ciclo de amplificação geral do DNA se constituiu de: desnaturação inicial de 94 ºC durante 2 min, seguidos por 39 ciclos de 94 ºC durante 15 s, 65 ºC por 20 s (*annealing*) e 65 ºC durante 15 min e um ciclo de extensão final de 72 ºC por 10 min. A única etapa que variou bastante de acordo com a espécie foi a temperatura de *annealing*, conforme observado na Tabela 1. Os amplicons de PCR foram purificados utilizando o kit comercial DNA Clean & Concentrator (Zymo Research, CA) e quantificados pelo fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies, OR).

Tabela 1 – Temperatura de *annealing* utilizada no PCR de cada espécie analisada.

Espécie	**Temperatura de *annealing* da PCR**
Culex quinquefasciatus, Wyeomyia confusa, Psorophora saeva, Anopheles cruzii, Anopheles darlingi, Psorophora ferox, Ochlerotatus vigilax, Aedes aegypti, Aedes albopictus, Haemagogus janthinomys, Coquillettidia crysonotum, Trichoprosopon pallidoventer	65 ºC
Limatus flavisetosus, Mansonia amazonenses, Uranotaenia geometrica	62 ºC
Aedes fulvus, Toxorhynchites sp	60 ºC
Sabethes undosus, Runchomyia reversa, *Aedeomyia squamipennis*	55 ºC

3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

As extrações de DNA e as amplificações do genoma mitocondrial foram conferidas qualitativamente através de uma eletroforese em agarose, seguindo descrição de Sambrook et al. (1989). Ela foi realizada numa cuba transversal a 8V por cm de gel em TAE 1X como tampão de corrida, utilizando 2 µl do material amplificado, 1 µl de azul de bromofenol e 1 µl de gel *red* 1X. Um marcador de massa molecular (1 µl) foi usado como padrão de comparação. Os géis foram visualizados através de um foto-documentador digital UVP sob radiação ultravioleta de 300nm.

3.4.4 Sequenciamento com Plataforma Illumina

Foi utilizado um sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*) para obter os genomas mitocondriais dos mosquitos analisados. As bibliotecas foram construídas utilizando os produtos amplificados de PCR e o kit comercial Nextera XT DNA Sample Preparation (Illumina, IL). Para as reações de tagmentação, as amostras foram diluídas até atingir o volume final de 5 µl contendo 0,2 ng/µl (ou seja, 1 ng de DNA total). Para normalização do processo, foi realizada uma quantificação do DNA por PCR *Real Time* utilizando o reagente KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit – Illumina/Universal). Por fim, as bibliotecas preparadas foram aplicadas e sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq com o método *paired-end* 250 pb.

3.4.5 Montagem e assembly dos reads

Primeiramente, antes de começar a montagem propriamente dita, é necessário checar a qualidade dos *reads*. Para isso foi utilizado o software FASTQC (Andrews, 2010). Depois disso, as sequências dos genomas mitocondriais foram montadas utilizando os softwares Mira v4 (Chevreux, 2007), IDBA-UD (Peng et al., 2012) e Newbler (Margulies et al., 2005). Para visualização foi usado o software Tablet (Milne et al., 2010) e para anotação dos genes mitocondriais foi utilizado o servidor online MITOS (Bernt et al., 2013). Os mapas circulares do DNA mitocondrial

foram desenhados utilizando o software MacVector v.14.0.3 (MacVector, NC) e editados com o Adobe Photoshop (Team, 2009).

3.5 Análises Filogenéticas

Em relação às análises filogenéticas, uma espécie da família Chaoboridae foi utilizada como *outgroup* devido à sua proximidade com os Culicidae: *Chaoborus astictopus.* Optou-se por utilizar essa espécie por similaridade ao estudo de Reidenbach et al. (2009), que utilizaram a mesma. Foram selecionadas as maiores sequências para serem representativas da espécie, e se houve mais de uma sequência com o mesmo tamanho, uma delas foi escolhida uma ao acaso. O alinhamento para cada gene foi obtido utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson et al., 2002) dentro da interface MEGA 6.0, com parâmetros pré-definidos (alinhamento par a par = alinhamento múltiplo = *gap opening penalty* = 15 e *gap extension penalty* = 6,66). A concatenação de todos os genes foi feita com o SequenceMatrix 1.7.8 (Vaidya et al., 2001). A melhor estratégia de particionamento dos dados (ou seja, se é melhor assumir uma única partição, particionar pela posição do códon ou por gene) foi inferida pelo software PartitionFinder v.1.1.1 (Lanfear et al., 2012). As análises filogenéticas foram realizadas de duas formas: (1) usando o alinhamento concatenado descrito (SM = análises de supermatrix) por máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e análise bayesiana (AB); e (2) estimando uma árvore de espécies que engloba os genes analisados maximizando suas probabilidades (ST= *species-tree*) de acordo com uma análise bayesiana. A SM foi construída por MP com 1000 *bootstraps* no MEGA 6.0 e por ML com 1000 *bootstraps* no IQTree v 9.6 (Mihn et al., 2013), utilizando a melhor estratégia de particionamento e respectivos modelos reversíveis selecionados pelo PartitionFinder. A SM também foi construída por AB utilizando o software BEAST v 1.8.0. Nesse último caso, foi utilizado o mesmo particionamento e modelos de ML, assumindo uma distribuição lognormal e taxas entre os ramos fixadas arbitrariamente a 1,0 (ucld.mean = 1,0). Para construção da ST, foi realizada uma nova execução do PartitionFinder no qual cada região gênica não-ligada foi separada. Depois do particionamento e seleção dos modelos, a ST foi confeccionada pelo BEAST v 1.8.0 com os parâmetros mais apropriados encontrados. Todas as corridas foram realizadas para 100.000.000

gerações duas vezes para verificar se houve repetibilidade e convergência entre as amostras.

3.6 Espectrometria MALDI-TOF

A preparação das amostras seguiu basicamente o protocolo de Kaufmann et al. (2011). O tórax dos exemplares foi mecanicamente removido com o auxílio de pinças e de uma lupa estereoscópica, já que a utilização do abdômen poderia gerar artefatos nos perfis proteicos, conforme descrito adiante. Para a extração de proteínas os mosquitos foram transferidos para tubos de 1,5 ml e macerados com pistilos autoclavados em 50µl de ácido fórmico 10%. Depois de uma centrifugação a 4 ºC durante 15min, os sobrenadantes foram recuperados e submetidos a dois passos consecutivos de centrifugação a 14.000 rpm para remoção de detritos insolúveis. As proteínas foram purificadas a partir de 10 µl do sobrenadante utilizando o kit comercial ZipTipC18 ® (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante.

Alíquotas de 1 µl das soluções proteicas foram aplicadas numa placa de aço MALDI (Bruker Daltonics) e misturadas com 1 µl da matriz de ácido sinapínico (SA) diretamente na placa. A solução-matriz MALDI foi preparada com SA saturado 50% em acetonitrilo (ACN) e 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). As amostras foram desidratadas por alguns minutos antes de serem realizadas as análises com MALDI-TOF; todas elas tiveram triplicatas para assegurar sua confiabilidade. Os perfis proteicos foram obtidos em um espectrômetro MALDI-TOF/TOF (Bruker, modelo Ultraflextreme™) e visualizados com o auxílio do software Launchpad 2.9 (Shimadzu Biotech). Os dados do perfil proteico de cada espécie foram inseridos numa matrix de similaridade (presença/ausência dos biomarcadores) para construção de um fenograma, utilizando o software TNT (Goloboff et al., 2000) e o algoritmo *neighbour-joining*.

4 RESULTADOS

4.1 Coleta de Espécimes

As larvas e pupas foram coletadas principalmente em bromélias, tronco de árvores, pequenos córregos, poças temporárias e alagadiços em pastos. Alguns exemplos de larvas coletadas estão na Figura 5. Em relação aos adultos, a maioria foi coletada com armadilha de Shannon em períodos crepusculares na borda da mata. Em cada cidade amostrada foram realizadas buscas exploratórias para encontrar o maior número possível de criadouros, visando sempre amostrar o máximo da fauna de Culicidae da região.

Além do material obtido das coletas também foram empregados nas análises alguns exemplares de mosquitos provenientes das coleções do Instituto Butantan e da Faculdade de Saúde Pública. No total foram analisados 1.429 indivíduos, representando 76 espécies dentro de 20 gêneros distintos. Detalhes de cada coleta encontram-se na Tabela 2. Todos os exemplares foram identificados pelo biólogo Aristides Fernandes, utilizando características da larva ou do adulto e seguindo chaves de classificação propostas por Forattini (2002) e Wilkerson (2006). As coletas em Manaus/AM e Rio de Janeiro/RJ não forneceram muitos exemplares porque grande parte dos imaturos não sobreviveu ao transporte. As larvas, principalmente aquelas em estágio mais jovem (L1 e L2) são muito sensíveis a mudanças de temperatura e choques mecânicos (Forattini, 2002), e talvez seja por isso que muitas não sobreviveram.

Tabela 2 – Descrição das espécies analisadas. Foram utilizadas 76 espécies representando 20 gêneros de Culicidae existentes, de acordo com a classificação de Harbach (2007). Os indivíduos utilizados em todas as análises foram fêmeas. MG = morfometria geométrica, DNA = genoma mitocondrial e EM = espectrometria de massas MALDI-TOF.

GÊNERO	SUBGÊNERO	ESPÉCIE	LOCAL DE COLETA	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	IDENTIFICAÇÃO	N (MG)	N (DNA)	N (EM)
Anopheles	*Nyssorhynchus*	*Anopheles darlingi*	Exemplares doados pelo Instituto Butantan (Coletados em São Paulo)	23º34'S/46º43'W	Adulto	28	1	-
		Anopheles aquasalis			Adulto	36	-	-
		Anopheles cruzii			Adulto	24	1	3
	Kerteszia	*Anopheles homunculus*			Adulto	24	-	-
		Anopheles bellator			Adulto	36	-	-
Culex	*Melanoconion*	*Culex sacchettae*			Adulto	9	-	-
	Culex	*Culex quinquefasciatus*			Adulto	16	1	-
	Phenacomyia	*Culex corniger*			Adulto	27	-	-
Aedes	*Stegomyia*	*Aedes aegypti*			Adulto	35	1	3
		Aedes albopictus			Adulto	35	1	-
Coquillettidia	*Rhynchotaenia*	*Coquillettidia chrysonotum*			Adulto	30	1	-
Chagasia	---	*Chagasia fajardi*	Exemplares doados pela FSP-USP (Coletados no Acre)	9º39'S/69º33'W	Adulto	1	-	-
Lutzia	*Lutzia*	*Lutzia bigoti*			Adulto	17	-	-
Culex	*Melanoconion*	*Culex corentynensis*	Manaus/AM	3º05'S/60º00'W	Larva/Adulto	5	-	-
		Culex spissipes			Adulto	2	-	-
	Culex	*Culex nigripalpus*			Adulto	19	-	3
		Culex coronator			Adulto	16	-	-
Trichoprosopon	---	*Trichoprosopon pallidoventer*			Adulto	2	1	-
Psorophora	*Janthinosoma*	*Psorophora albigenu*			Adulto	2	-	-
Haemagogus	*Haemagogus*	*Haemagogus capricornii*			Adulto	1	1	-
Johnbelkinia	---	*Johnbelkinia longipes*			Adulto	10	-	-

		Culex aphylactus			Larva	3	-	-
Culex	*Microculex*		Rio de Janeiro/RJ	22º55'S/43º12'W				
		Culex pleuristriatus			Larva	3	-	-
		Culex carioca			Larva	6	-	-
Wyomyia	*Phoniomyia*	*Wyomyia pilicauda*			Larva	7	-	-
Toxorhynchites	*Lynchiella*	*Toxorhynchites portoricensis*			Adulto	3	1	-
		Anopheles albitarsis			Adulto	18	-	-
Anopheles	*Nyssorhynchus*	*Anopheles deaneorum*			Larva/Adulto	11	-	-
		Anopheles strodei			Adulto	14	-	-
		Anopheles triannulatus			Adulto	23	-	-
Aedeomyia	*Aedeomyia*	*Aedeomyia squamipennis*	Frutal/MG	20º02'S/48º56'W	Adulto	13	1	-
		Culex zeteki			Larva/Adulto	2	-	-
Culex	*Melanoconion*	*Culex vaxus*			Larva/Adulto	12	-	-
		Culex rabelloi			Larva	2	-	-
Uranotaenia	*Uranotaenia*	*Uranotaenia pulcherrima*			Adulto	1	-	-
Ochlerotatus	*Chrysoconops*	*Ochlerotatus fulvus*	Monte Negro/RO	10º15'S/63º18'W	Adulto	2	1	-
Uranotaenia	*Uranotaenia*	*Uranotaenia geometrica*			Adulto	2	1	-
Anopheles	*Kerteszia*	*Anopheles laneanus*	Campos do Jordão/SP	22º44'S/45º35'W	Adulto	8	-	-

Anopheles	*Nyssorhynchus*	*Anopheles oswaldoi*			Adulto	8	-	3
		Anopheles evansae			Adulto	1	-	-
	Anopheles	*Anopheles intermedius*			Adulto	1	-	-
		Anopheles fluminensis			Adulto	2	-	-
Coquillettidia	*Rhynchotaenia*	*Coquillettidia venezuelensis*	Cananéia/SP	24º53'S/47º51'W	Adulto	17	-	-
		Coquillettidia albicosta			Adulto	4	-	-
		Coquillettidia albifera			Adulto	23	-	-
		Coquillettidia hermanoi			Adulto	6	-	-
Culex	*Melanoconion*	*Culex ribeirensis*			Larva	15	-	-
		Culex atratus			Larva	10	-	-
		Culex palaciosi			Larva	22	-	-
		Culex oedipus			Larva	2	-	-
		Culex pilosus			Larva	2	-	-
		Culex bastagarius			Larva	2	-	-
	Culex	*Culex usquatus*			Larva	17	-	-
		Culex declarator			Larva	16	-	-
		Culex mollis			Larva	10	-	-
		Culex ensiformis			Larva	7	-	-
	Microculex	*Culex imitator*			Larva	6	-	-

Culex	---	*Culex ocellatus*			Larva/Adulto	2	-	-
Ochlerotatus	*Ochlerotatus*	*Ochlerotatus serratus*			Adulto	19	-	3
		Ochlerotatus scapularis	Cananéia/SP	24º53'S/47º51'W	Adulto	25	1	-
Psorophora	*Grabhamia*	*Psorophora cingulata*			Adulto	6	-	3
	Janthinosoma	*Psorophora lutzii*			Adulto	23	-	-
		Psorophora ferox			Adulto	18	1	3
Psorophora	*Psorophora*	*Psorophora albipes*			Adulto	20	-	-
		Psorophora saeva			Adulto	4	1	-
Haemagogus	*Conopostegus*	*Haemagogus leucocelaenus*			Adulto	2	-	-
Limatus	---	*Limatus durhamii*			Adulto	12	-	-
	---	*Limatus flavisetosus*			Adulto	11	1	3
Mansonia	*Mansonia*	*Mansonia wilsoni*			Larva/Adulto	2	-	-
		Mansonia amazonensis			Adulto	1	1	-
	---	*Mansonia titillans*			Adulto	7	-	-
Sabethes	*Peytonulus*	*Sabethes undosus*			Adulto	9	1	3
Sallumia	---	*Sallumia hortator*			Adulto	6	-	-
Runchomyia	*Runchomyia*	*Runchomyia reversa*			Adulto	1	1	1
Wyeomyia	*Prosopolepis*	*Wyeomyia confusa*			Larva/Adulto	17	1	3
	Triamyia	*Wyeomyia aporonoma*			Larva/Adulto	5	-	-

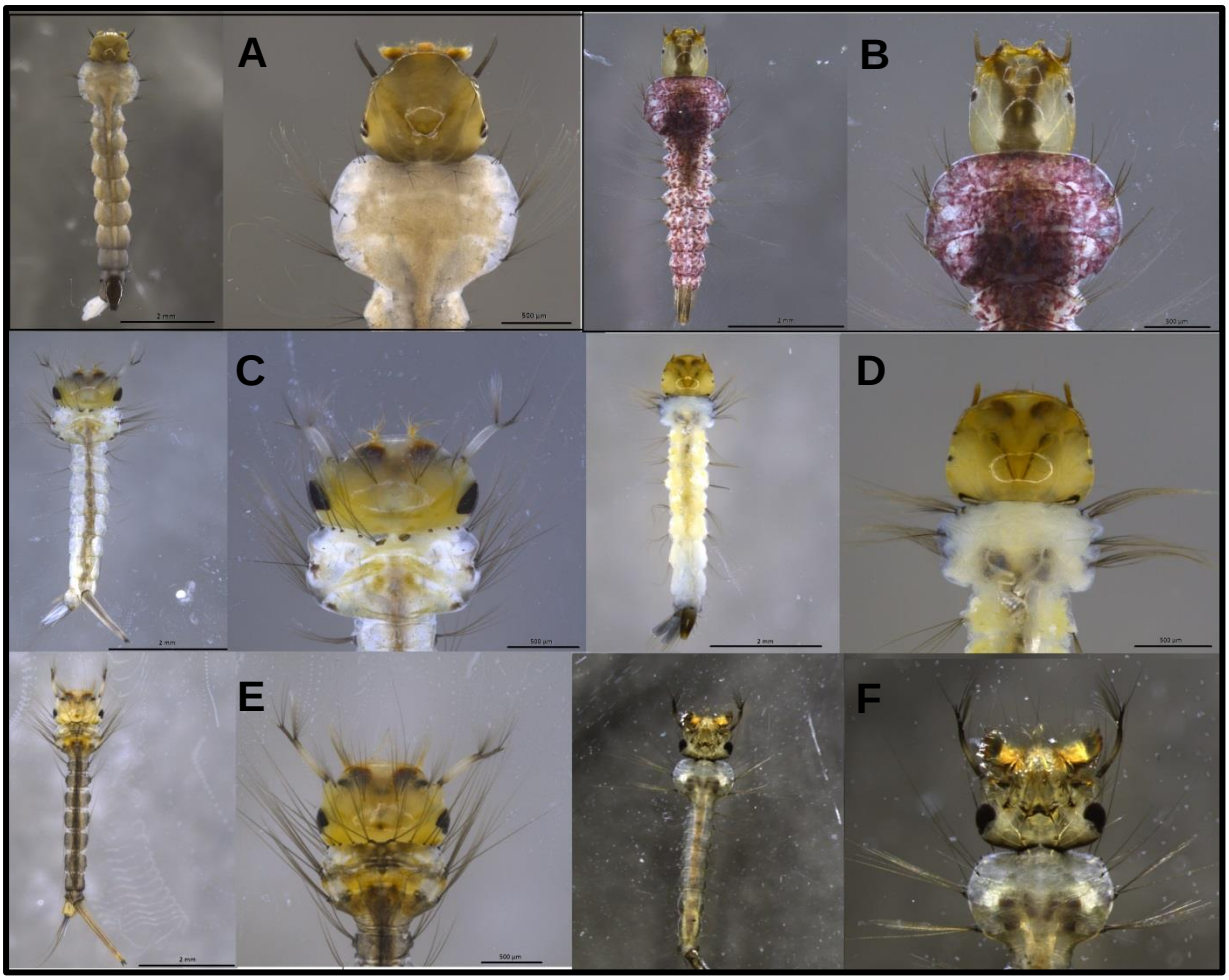


Figura 5 – Algumas das larvas coletadas para as análises, com detalhe para as estruturas presentes na cabeça. (A) *Aedes* sp., (B) *Toxorhynchites* sp., (D) *Limatus* sp. e (C), (E), (F) *Culex* sp. (Fotos: André Marsola Giroti)

Analisando os gêneros das espécies coletadas é possível observar que a grande maioria corresponde a *Culex*, sendo que para alguns gêneros houve somente um representante de cada espécie (Figura 6). Os métodos de coleta utilizados e a sazonalidade podem ter influenciado o número reduzido de alguns gêneros encontrados.

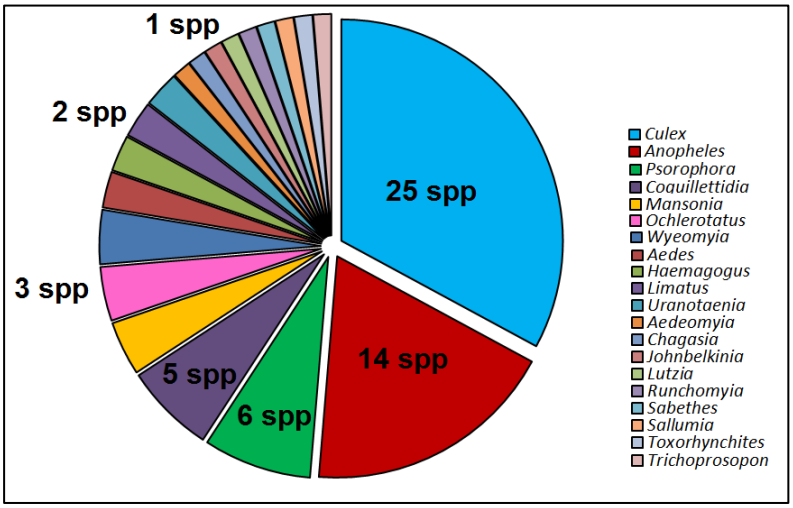


Figura 6 – Número de espécies coletadas para cada gênero. Os nomes estão de acordo com a classificação proposta por Harbach (2017).

4.2 Variação Morfológica Alar

A primeira análise exploratória com os dados de formato alar foi a de Componentes Principais (Figura 7): nesta análise, é possível identificar a relação entre as características mais relevantes extraídas dos dados. Aqui foi possível agrupar alguns indivíduos de acordo com suas afinidades no formato da asa. As amostras foram separadas por gênero, e o primeiro componente principal foi responsável por 45,74% da variação encontrada. É possível observar dois grupos principais no morfoespaço: do lado esquerdo estão os *Anopheles*, *Limatus* e *Wyeomyia* e do lado direito estão o restante das espécies. Nota-se que no canto superior esquerdo estão alguns gêneros bem distintos dos demais. Trata-se de *Toxorhynchites*, *Haemagogus* e *Uranotaenia*.

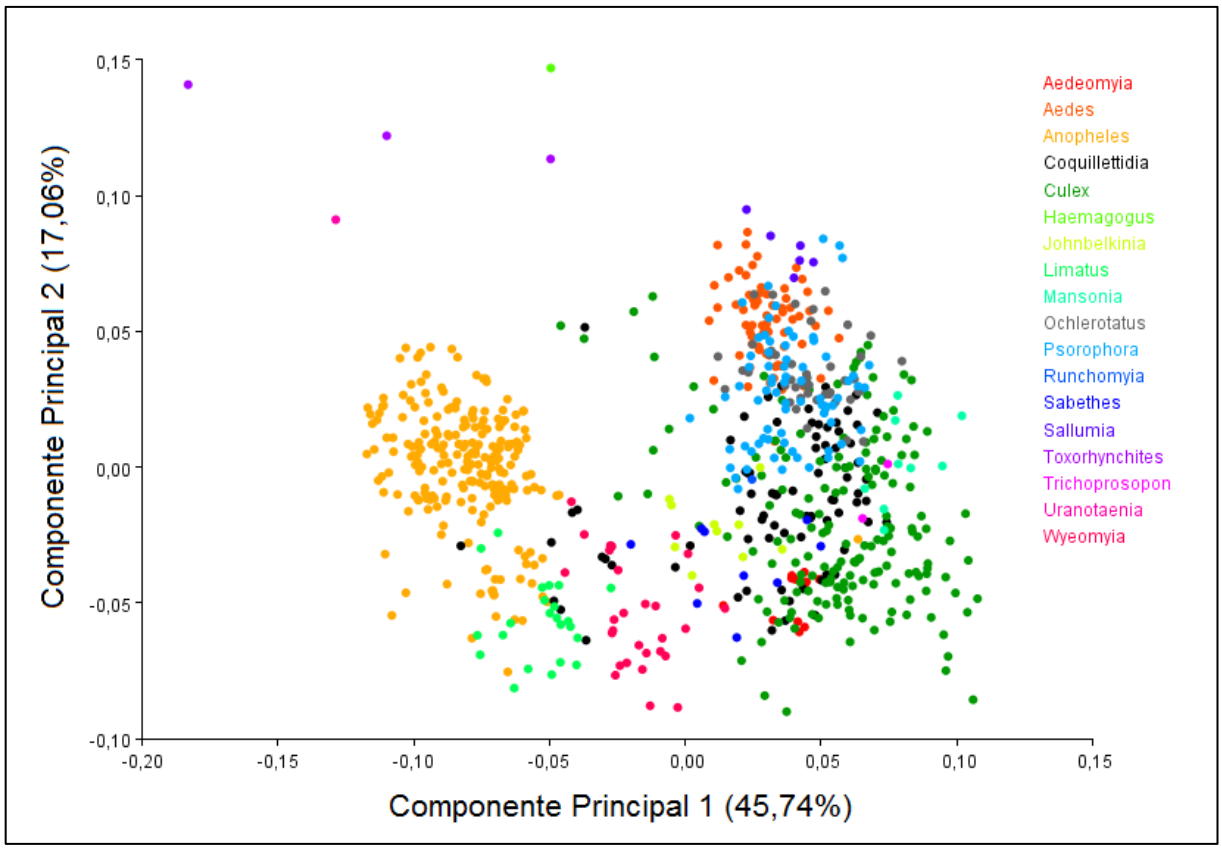


Figura 7 – Análise de Componentes Principais dos 20 gêneros amostrados, utilizando 18 *landmarks* das asas. Os números entre parênteses representam a porcentagem de variação de cada componente.

Posteriormente também foi realizado um agrupamento utilizando o pacote *Mclust* do R de acordo com o Modelo de Mistura de Gaussianas, estimando quais são os grupos mais prováveis que aparecem naquela amostra (Figura 8).

Similarmente à PCA, essa análise identifica uma organização dos padrões existentes em um conjunto de dados, encontra similaridades ou diferenças entre os padrões existentes e assim, deriva conclusões úteis a respeito dos dados. Foram encontrados oito grupos prováveis compondo a amostra, mas eles não têm relação com o real número de gêneros, subgêneros ou qualquer outro agrupamento taxonômico que compõe o total da amostra (20 gêneros).

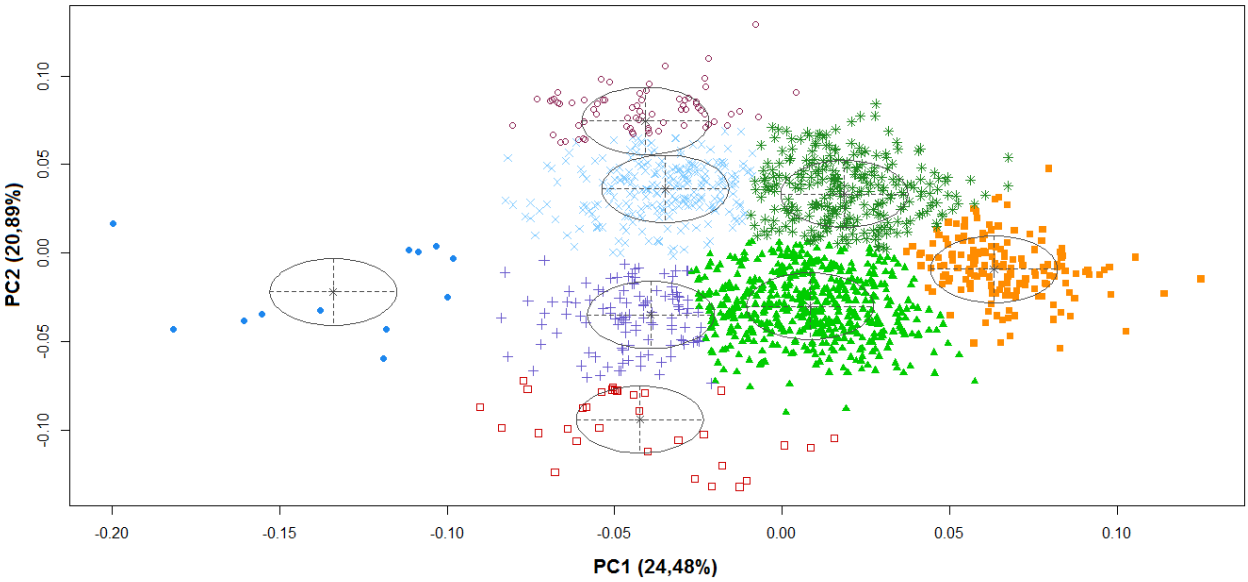


Figura 8 – Modelo de Mistura de Gaussianas utilizando o pacote *Mclust*. As elipses representam os grupos prováveis detectados nessa amostra (cores diferentes).

Também foram realizadas análises de Variáveis Canônicas (CVA) para descobrir um melhor padrão de agrupamento entre os gêneros (Figura 9). Ela leva em consideração as diferenças no formato alar intra e intergrupos, que são subdivididos *a priori* em gêneros distintos (ao contrário da Análise de Componentes Principais). Por isso há uma separação mais nítida dos conjuntos.

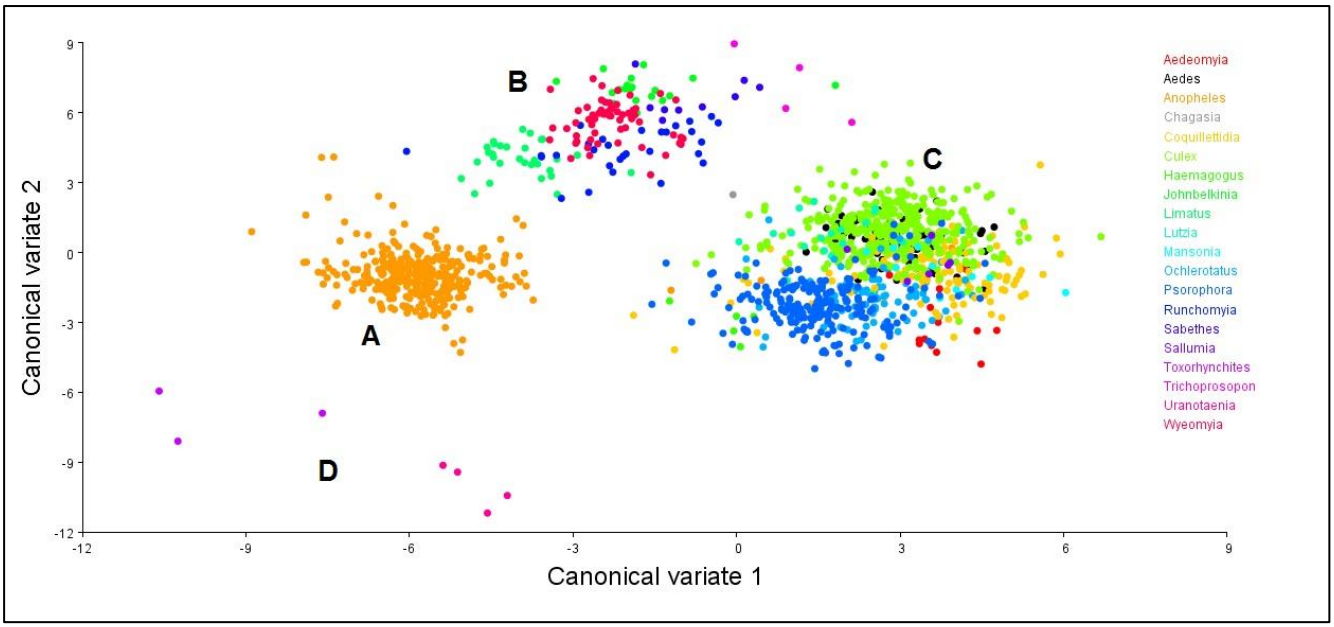


Figura 9 – Análise de Variáveis Canônicas dos 20 gêneros analisados evidenciando quatro grupos: (A) Subfamília Anophelinae, (B) Tribo Sabethini; (C) Tribos Culicini, Aedini, Mansoniini e Aedeomyiini e (D) Gêneros *Toxorhynchites* e *Uranotaenia*.

Para verificar se a variação do formato alar é evidente dentro de cada gênero ou tribo, foram feitas análises de PCA e CVA separadamente para cada grupo (Figuras 10, 11, 12 e 13). Em todas as análises realizadas, os gêneros ou subgêneros apresentaram grande diferença no formato alar, ficando evidente a separação em grupos distintos no morfoespaço de variáveis canônicas.

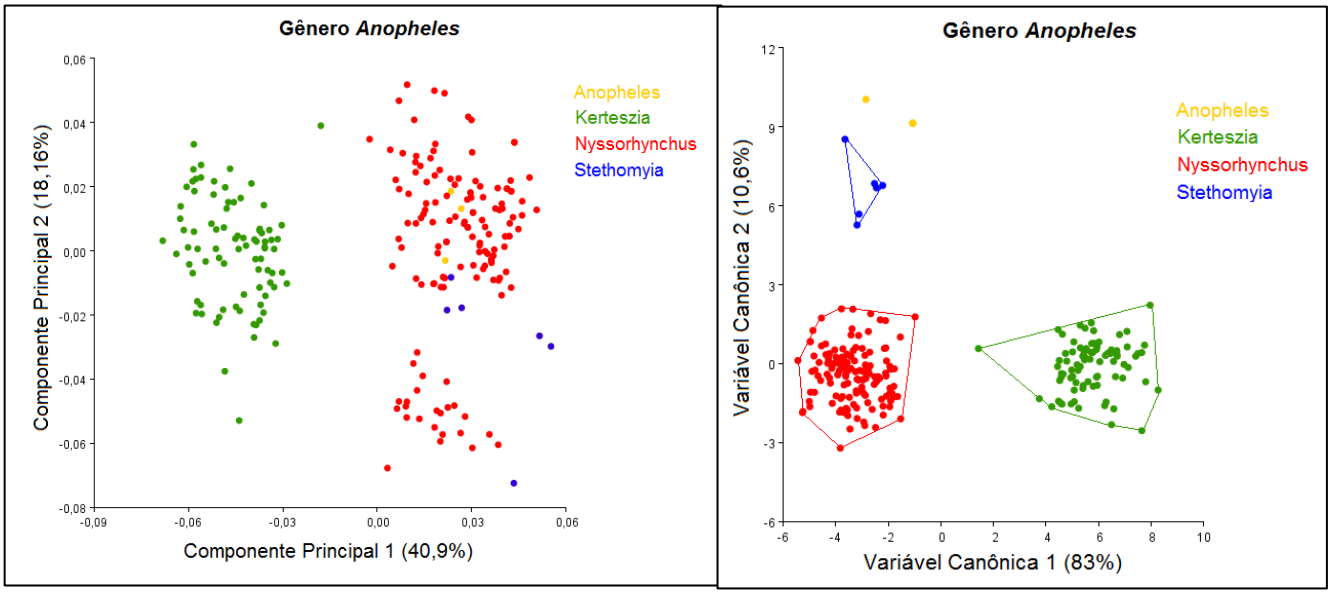


Figura 10 – PCA e CVA dos quatro subgêneros amostrados de *Anopheles.*

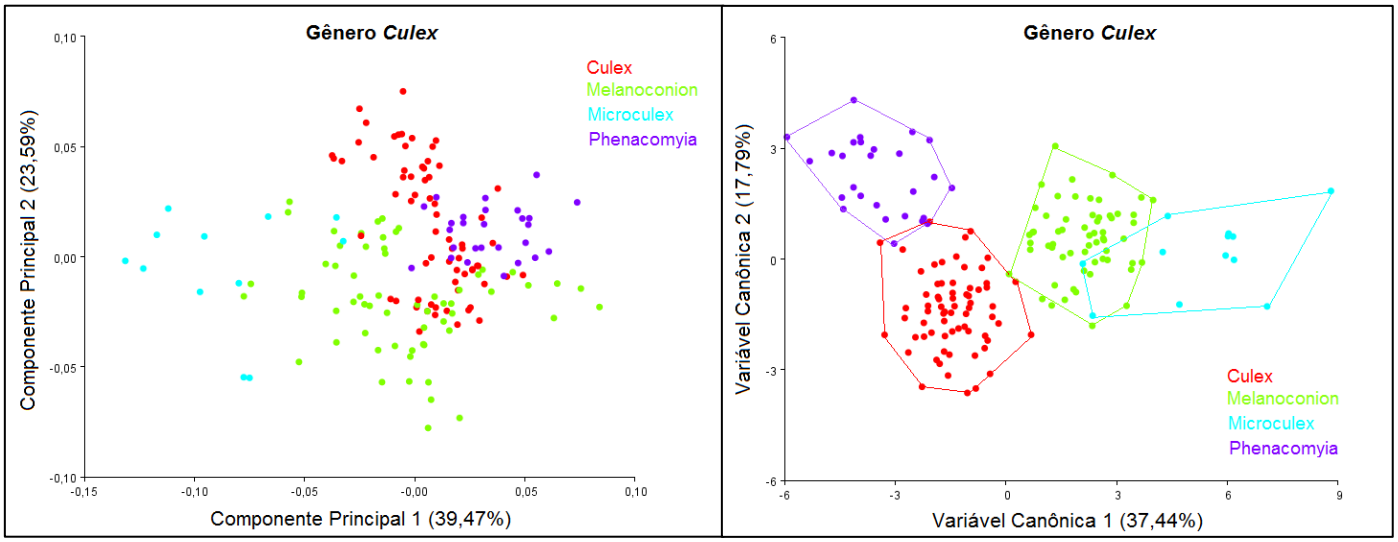


Figura 11 – PCA e CVA dos quatro subgêneros amostrados de Culicini.

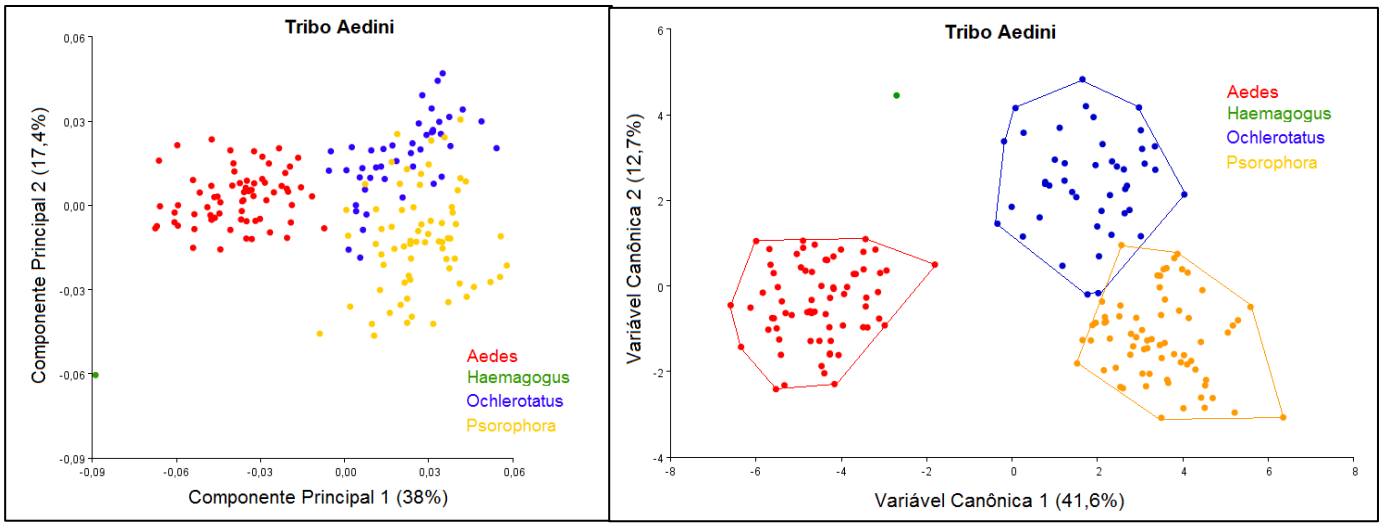


Figura 12 – PCA e CVA dos quatro gêneros amostrados da tribo Aedini.

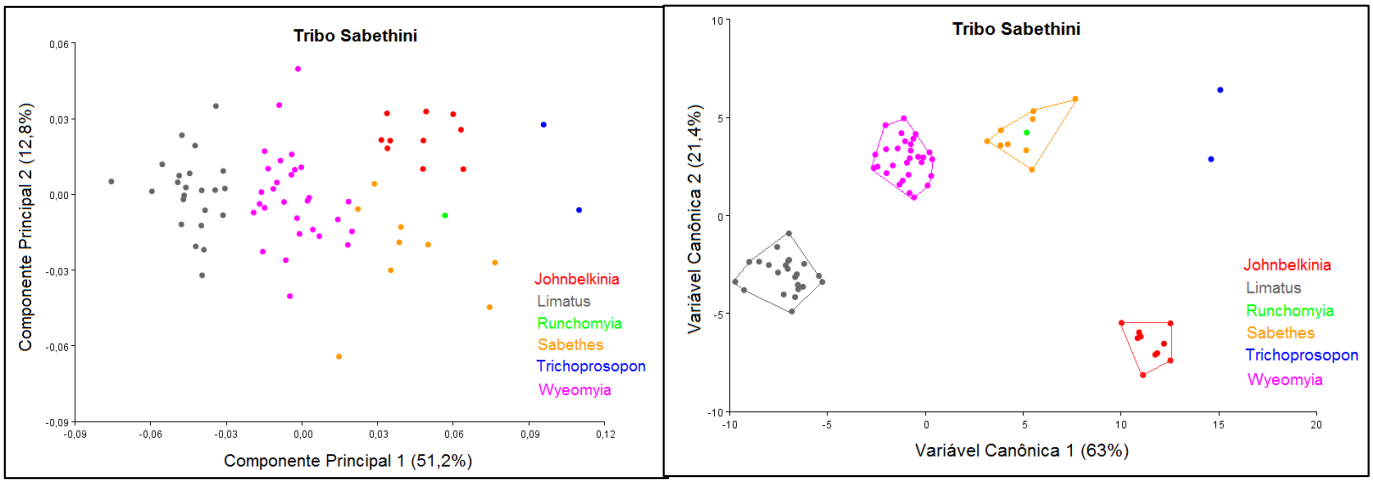


Figura 13 – PCA e CVA dos seis gêneros amostrados da tribo Sabethini.

Após a sobreposição de Procrustes, foi realizado um alinhamento entre os extremos de diferenciação no formato alar entre todos os gêneros (Figura 14). Nota-se que o *landmark* #1, situado entre as veias R1 e RS do rádio setorial da asa, é o mais variável entre todas as 76 espécies analisadas.

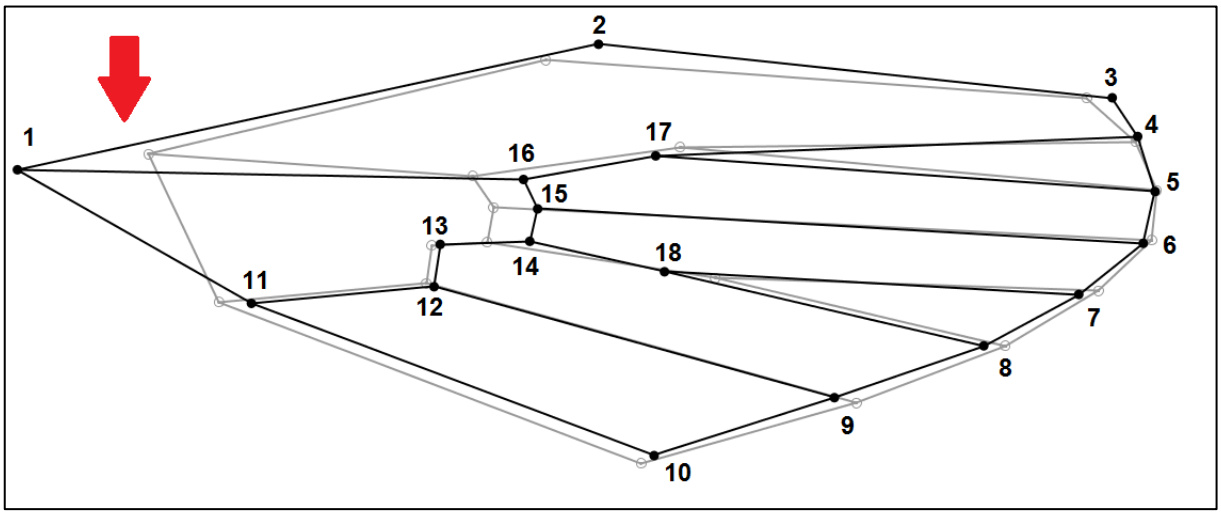


Figura 14 - Consensos alares alinhados após sobreposição de Procrustes mostrando os extremos de diferenciação entre os 20 gêneros amostrados. A seta indica o *landmark* #1, ponto com maior variação.

Para verificar a similaridade entre todos os grupos também foi construído um fenograma baseado nas distâncias de Procrustes, que leva em consideração as variações intra e interespecífica (Figura 15). Utilizando todos os 1.429 exemplares de Culicidae a tribo Sabethini aparece como grupo monofilético.

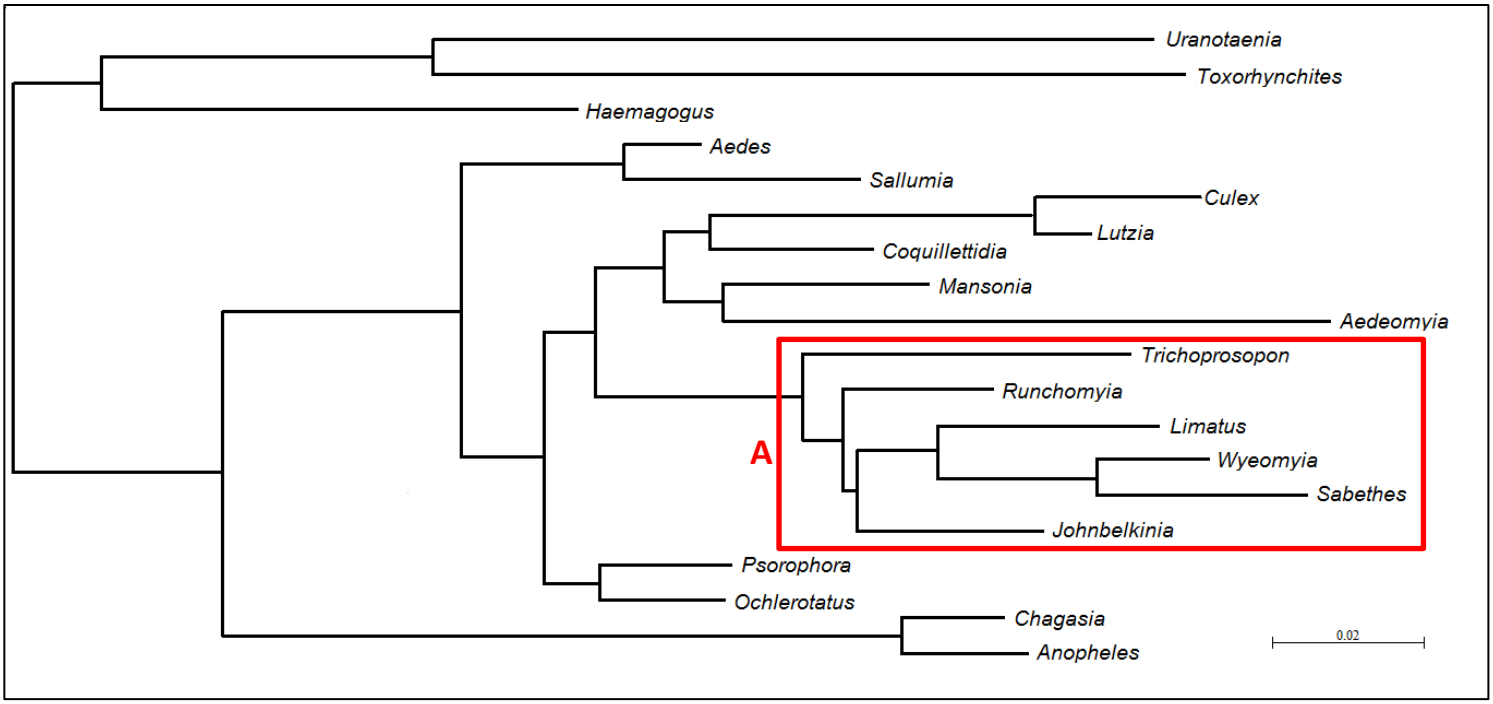


Figura 15 – Fenograma baseado na distância de Procrustes entre os 20 gêneros analisados. O grupo monofilético A representa a tribo Sabethini.

O formato alar dessas espécies pertencentes a tribo Sabethini está muito relacionado, e nesse caso, o padrão de venação alar parece ter um sinal filogenético (Cole et al., 2002). Para os outros gêneros, não houve correlação com as filogenias existentes, mas foi possível conhecer as relações de parentesco dos gêneros *Johnbelkinia*, *Runchomyia* e *Sallumia*, raramente estudados.

4.3 Análises Genéticas

4.3.1 Genes Nucleares

4.3.1.1 Busca no GenBank

No total foram obtidas 95 sequências representando 16 gêneros de Culicidae, para oito genes nucleares distintos, entre eles: dois ribossomais (ITS2 e 28S) e seis codificantes de proteínas (*arginine-kinase*, CAD, *catalase*, *enolase*, *hunchback* e *white*). Todas as sequências estão relacionadas a algum estudo já publicado e não foram produzidas neste presente estudo. Detalhes de cada sequência estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Relação de todos os genes nucleares analisados representando 16 gêneros de Culicidae amostrados. Os números representam o código de acesso no GenBank. Para cada gene foram utilizadas sequências da mesma espécie.

Genes / Gênero	ITS2	28S	*Arginine-K*	CAD	*Catalase*	*Enolase*	*Hunchback*	*White*
Aedeomyia		AF417834	GQ906806	GQ906830	GQ906855	GQ906879	GQ906902	AF318199
Aedes	AB548801	XM001653803	XM001657339	XM001660061	DQ440117	XM001653700	XM001651581	U73826
Anopheles	U36780	AF417805	GQ906807	KC167238	DQ986315	GQ906880	GQ906903	GQ906927
Chagasia		AF311247						AF318194
Coquillettidia			GQ906810	GQ906835	GQ906859	GQ906883	GQ906907	
Culex	EU847224	HM807289	XM001849602	XM001848657	XM001848521	XM001842566	XM001863205	U73831
Haemagogus			GQ906812	GQ906837	GQ906861	GQ906885	GQ906909	U73834
Limatus			GQ906813	GQ906838	GQ906862	GQ906886	GQ906910	GQ906930
Lutzia	GU299699							
Ochlerotatus		HM150790	GQ906817	GQ906842	GQ906866	GQ906890	GQ906914	U73827
Psorophora	M95129		GQ906820	GQ906845	GQ906869	GQ906893	GQ906917	GQ906935
Sabethes			GQ906821	GQ906846	GQ906870		GQ906918	U73835
Toxorhynchites		AF417832	GQ906823	GQ906848	GQ906872	GQ906895	GQ906920	AF318193
Trichoprosopon			GQ906824	GQ906849	GQ906873	GQ906896	GQ906921	GQ906937
Uranotaenia			GQ906826	GQ906851	GQ906875	GQ906898	GQ906923	AF318209
Wyeomyia			GQ906827	GQ906852	GQ906876	GQ906899	GQ906924	AY055811

4.3.1.2 Teste do Sinal Filogenético

Para verificar se os genes que obtivemos são adequados para uma reconstrução filogenética utilizamos o método *likelihood-mapping* (Strimmer, Haeseler, 1997). Trata-se de um método visual para verificar o conteúdo filogenético das sequências: quanto maior for a porcentagem nas pontas do triângulo significa que aquelas terão maior probabilidade de servir para gerar uma topologia bem resolvida. O triângulo é um gradiente de qualidade em que há três polos de excelência (vértices). Na Figura 16 observa-se que todos os genes testados tiveram uma alta porcentagem nas pontas em relação ao centro do triângulo; logo, possuem um sinal filogenético e em princípio poderão ser usadas nas reconstruções.

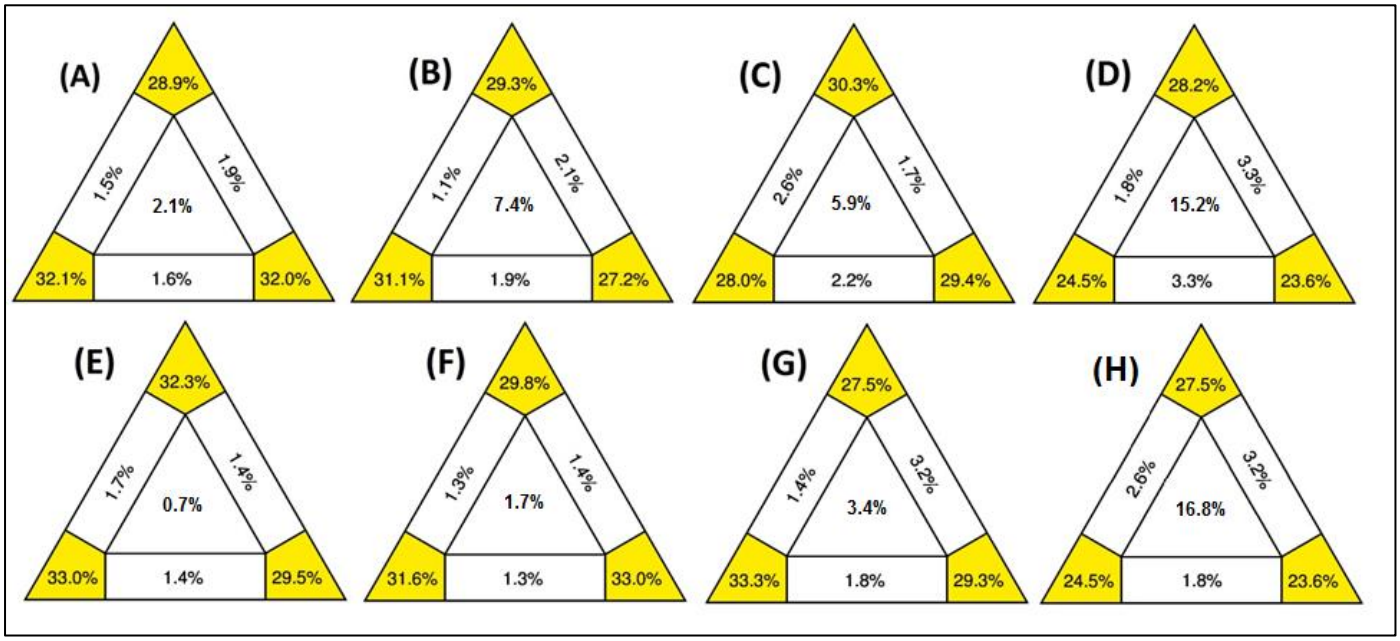


Figura 16 – *Likelihood-mapping* dos genes **(A)** *Arginine-kinase*, **(B)** CAD, **(C)** Catalase, **(D)** 28S, **(E)** Enolase, **(F)** *Hunchback,* **(G)** *White* e **(H)** ITS2. Nota-se que, em todos os casos, os valores das pontas dos triângulos sempre são muito maiores que os valores do centro.

4.3.1.3 Informações das Sequências e Construção de Árvores

Os alinhamentos construídos com os oito genes analisados consistiram em 7.359 caracteres totais, sendo que 3.389 foram variáveis e 1.992 foram parcimoniamente informativos (Tabela 4). Como esperado, a terceira posição do códon foi a mais variável entre todas. Análises sobre o teor de bases GC na composição dos genes combinados revelaram desvios significantes na

homogeneidade da terceira posição do códon, observados nos gêneros *Anopheles, Chagasia, Culex* e *Psorophora* (Tabela 5).

Tabela 4 – Informações das sequências dos oito genes nucleares utilizados nas análises.

Gene	Alinhamento	Sítios Variáveis	Sítios Parcimoniamente Informativos
28S	562	233	48
CAD	1.452	645	510
catalase	1.077	501	292
enolase	702	232	165
hunchback	957	452	333
ITS2	351	320	104
white	1.409	604	383
arginine-K	849	402	157
TOTAL	**7.359**	**3.389**	**1.992**

Tabela 5 – Conteúdo GC (%) e heterogeneidade na primeira (#1), segunda (#2) e terceira (#3) posição do códon nos gêneros analisados. Os gêneros destacados em vermelho apresentaram desvio no conteúdo GC na terceira posição do códon. Para o gênero *Lutzia* foi analisado apenas o gene ribossomal ITS2. * p < 0,01

Gênero	Total	#1	#2	#3
Aedeomyia	54,0	53,7	40,7	67,9
Aedes	50,1	51,9	39,6	59,0
*Anopheles**	60,7	56,2	41,2	84,8*
Chagasia	60,4	67,7	44,5	69,1*
Coquillettidia	51,5	53,0	39,1	62,4
*Culex**	57,1	53,6	39,7	77,8*
Haemagogus	51,6	52,7	39,3	63,2
Limatus	50,8	51,4	39,5	62,3
Lutzia	56,1	-	-	-
Ochlerotatus	52,4	53,1	38,9	65,4
*Psorophora**	53,8	53,0	39,1	70,3*
Sabethes	48,5	51,4	38,7	55,7
Toxorhynchites	50,2	52,5	39,5	58,9
Trichoprosopon	48,4	51,1	39,4	54,7
Uranotaenia	53,1	52,5	40,6	66,3
Wyeomyia	48,9	50,8	39,9	55,9

Foi construída uma árvore para cada gene nuclear analisado (*gene trees*), totalizando oito árvores. A topologia dessas árvores pode ser visualizada na Figura 17, onde é possível perceber que a maioria delas revela um agrupamento diferente. Apenas o grupo *Ochlerotatus* + *Haemagogus* e a tribo Sabethini permaneceram juntos na maioria das topologias.

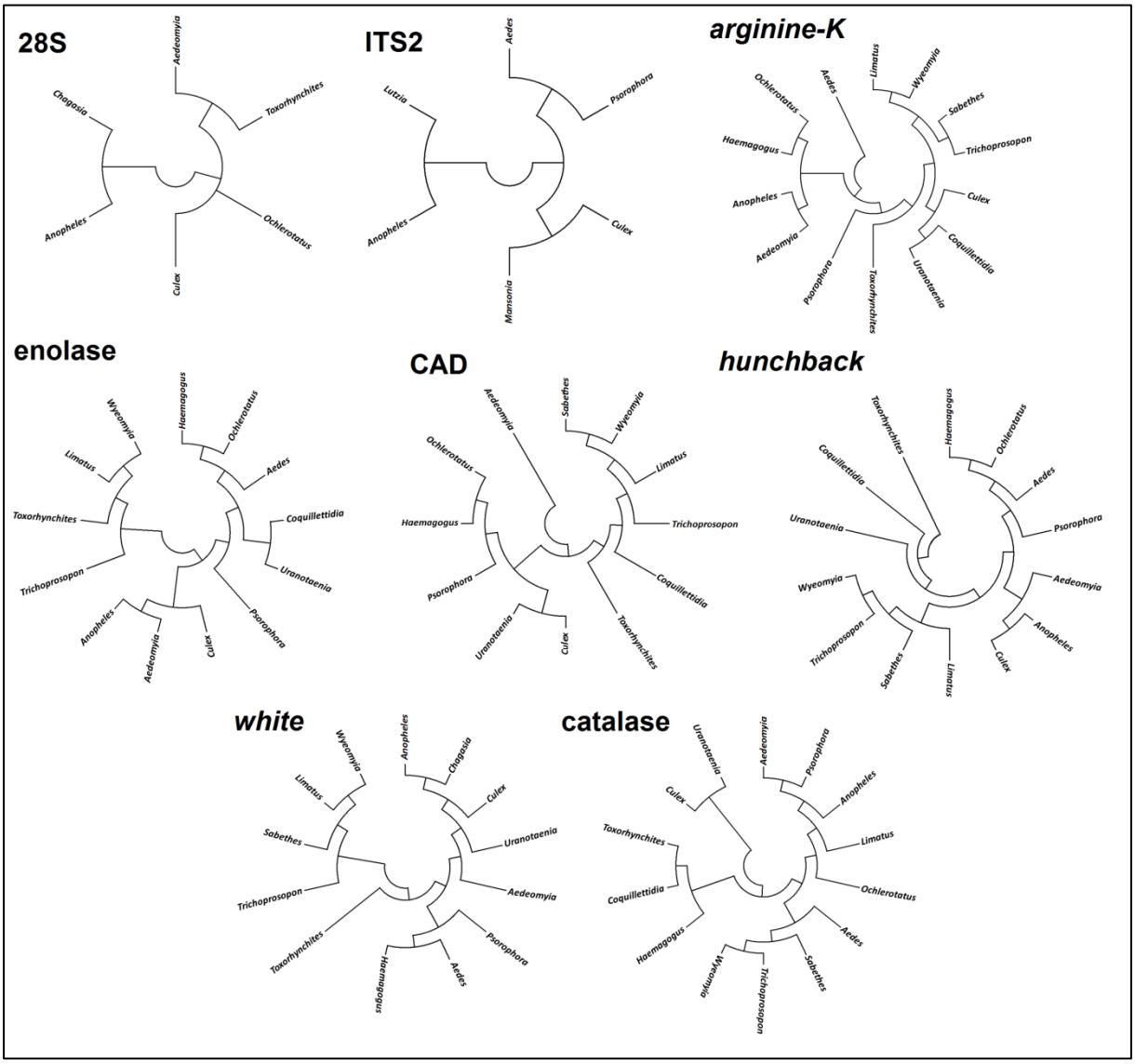


Figura 17 – Árvores de cada um dos oito genes nucleares analisados.

Para as análises filogenéticas concatenadas, os melhores esquemas de particionamento para SM e ST e modelos evolutivos escolhidos para cada partição estão descritos nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Eles foram escolhidos com base no critério AIC (Akaike Information Criterion) (Hu, 2007). Entretanto, quando o

modelo mais apropriado não estava disponível no software MrBayes (ex: TvM), foi utilizado aquele mais similar disponível (ex: GTR).

Tabela 6 – Melhor esquema de particionamento para análises de supermatrix (SM) e o melhor modelo evolutivo escolhido para cada partição.

Genes	Modelo
ITS2, 28S	HKY+G
CAD_1st, *white*_1st, *arginine-K*_1st, catalase_1st, enolase_1st, *hunchback*_1st	TrN-I
CAD_2nd, *white*_2nd, *arginine-K*_2nd, catalase_2nd, enolase_2nd, *hunchback*_2nd	F81
CAD_3rd	HKY+G
*white*_3rd, *arginine-K*_3rd, catalase_3rd, enolase_3rd, *hunchback*_3rd	HKY

Tabela 7 – Melhor esquema de particionamento para análises de *species tree* (ST) e o melhor modelo evolutivo escolhido para cada partição.

Genes	Modelo
28S	HKY
ITS2	HKY+G
white_1st, *arginine-K*_1st	K80
white_2nd, *arginine-K*_2nd	F81
white_3rd, *arginine-K*_3rd	HKY
CAD	GTR+G
hunchback	HKY
enolase	TvM+G
catalase_1st, catalase_2nd	F81
catalase_3rd	HKY+G

Os três algoritmos utilizados, MP, ML e AB, convergiram para a mesma árvore (Figura 18), onde Anophelinae aparece como grupo irmão de todos os outros Culicinae. O monofiletismo da família Culicidae, da subfamília Anophelinae e da tribo Sabethini tiveram suporte robusto em todas as análises distintas (Tabela 8).

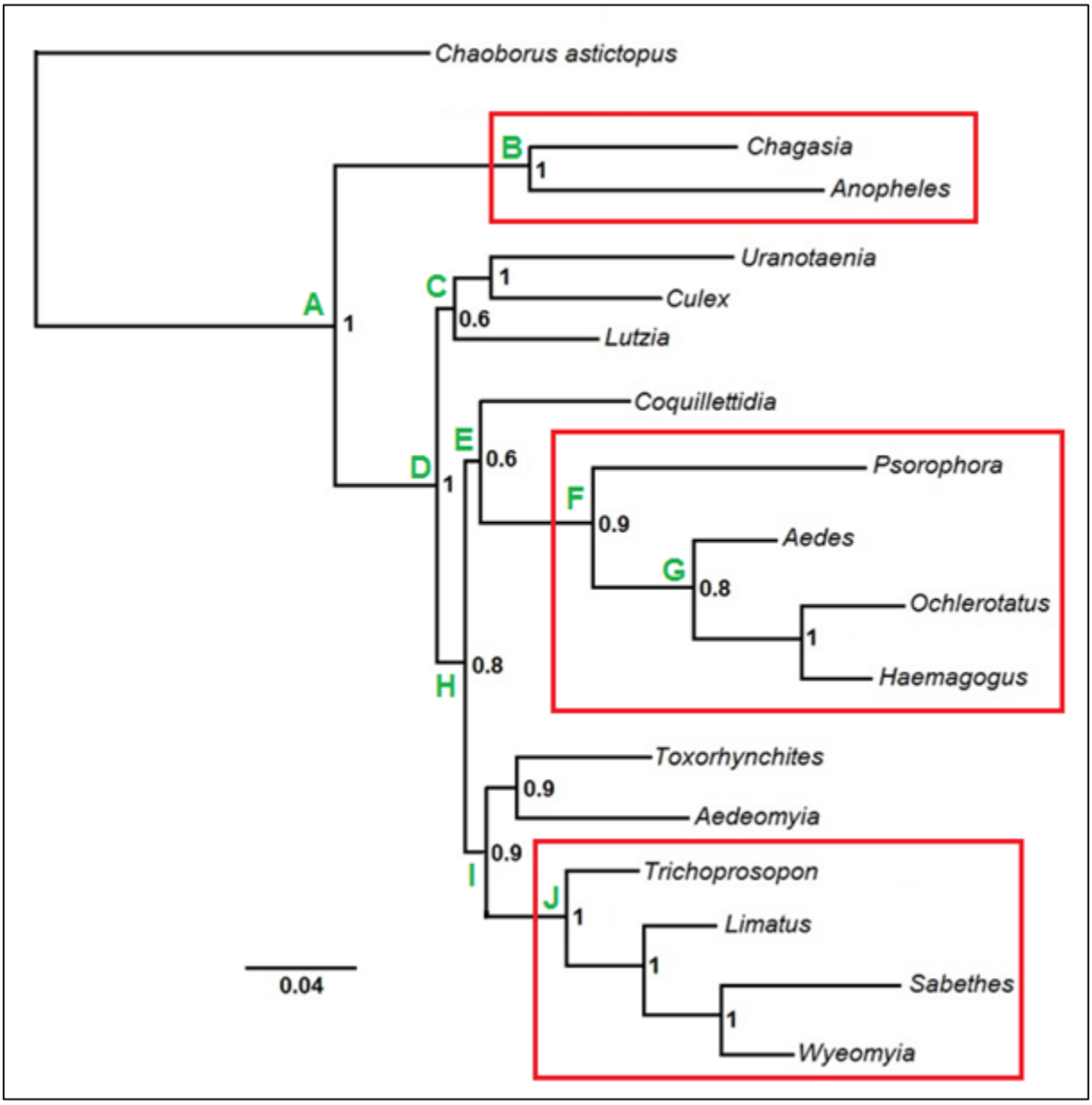


Figura 18 – Topologia da melhor árvore inferida por análise bayesiana (AB) mostrando as relações entre 16 gêneros de Culicidae. Neste caso análises de SM e a ST resultaram na mesma topologia. Foram utilizados oito genes nucleares concatenados: ITS2, 28S, *arginine*-K, CAD, *catalase*, *enolase*, *hunckback* e *white.* Os retângulos destacados em vermelho representam (de cima pra baixo): subgênero Anophelinae, tribo Aedini e tribo Sabethini. Os números associados a cada nó representam os valores de probabilidade posterior bayesiana. As letras associadas a cada nó estão descritas na Tabela 8, e representam os suportes *bootstraps* de MP e ML. A quantidade de alterações nos caracteres é representada pela barra de escala.

Tabela 8 – Valores de *bootstrap* ou probabilidade posterior inferidos pelas análises de MP, ML e AB dentro da família Culicidae, combinando oito genes nucleares e considerando ou não a terceira posição do códon (-3 e +3). As letras dos nós se referem à Figura 18.

Nó	Máxima Parcimônia (MP)		Máxima Verossimilhança (ML)		Análise Bayesiana (AB)		
	-3	**+3**	**-3**	**+3**	**-3**	**+3**	**AA**
A	100	100	100	100	1.0	1.0	1.0
B	100	100	100	100	1.0	1.0	1.0
C	45	57	55	60	0.5	0.6	0.6
D	83	88	98	100	0.9	1.0	0.99
E	49	55	49	57	0.6	0.6	0.59
F	87	88	93	93	0.8	0.9	0.9
G	81	80	80	83	0.8	0.8	0.8
H	70	80	75	76	0.7	0.8	0.8
I	80	83	85	91	0.9	0.9	0.89
J	100	100	100	100	1.0	1.0	1.0

4.3.2 Genomas Mitocondriais

4.3.2.1 Organização e Características das Sequências

Para montagem dos genomas foram utilizados três softwares diferentes: Mira v4 (Chevreux, 2007), IDBA-UD (Peng et al., 2012) e Newbler (Margulies et al., 2005). Com isso foi possível comparar a eficiência de cada um deles. A maioria dos genomas foi montada com o Newbler, já que o Mira não conseguiu obter um comprimento muito extenso das sequências com análises *De Novo*; quando havia um genoma de referência as montagens foram satisfatórias e todas convergiram para o mesmo tamanho (Tabela 9). Foram montados e anotados 20 genomas mitocondriais representando 16 gêneros diferentes de Culicidae. Também foi incluído nas análises um genoma mitocondrial de *Culex pipiens* proveniente do GenBank (número de acesso HQ724616), com 14.856 pb de comprimento.

Tabela 9 – Comparação entre os três algoritmos de montagem: Mira, IDBA_UD e Newbler para as 20 espécies analisadas. REF significa montagem utilizando um genoma de referência.

Espécie	Tipo de montagem	Mira	IDBA_UD	Newbler
Aedeomyia squamipennis	*De Novo*	7.821	10.515	14.570
Aedes aegypti	REF	16.655	16.655	16.655
Aedes albopictus	REF	16.660	16.660	16.660
Aedes fulvus	*De Novo*	7.625	11.129	17.130
Anopheles cruzii	REF	15.450	15.450	15.450
Anopheles darlingi	REF	15.385	15.385	15.385
Coquillettidia crysonotum	*De Novo*	6.210	11.212	15.859
Culex quinquefasciatus	REF	15.579	15.579	15.579
Haemagogus janthinomys	REF	15.698	15.698	15.698
Limatus flavisetosus	*De Novo*	5.717	15.258	15.797
Mansonia amazonenses	*De Novo*	5.948	11.628	15.792
Ochlerotatus vigilax	REF	15.887	15.887	15.887
Psorophora ferox	*De Novo*	8.651	10.921	16.119
Psorophora saeva	*De Novo*	6.137	11.555	16.168
Runchomyia reversa	*De Novo*	5.660	9.450	14.537
Sabethes undosus	*De Novo*	5.577	9.153	14.928
Toxorhynchites sp.	*De Novo*	8.667	10.916	16.365
Trichoprosopon pallidoventer	*De Novo*	6.628	9.758	15.056
Uranotaenia geometrica	*De Novo*	6.341	11.304	15.784
Wyeomyia confusa	*De Novo*	8.158	10.124	14.993

Os genomas mitocondriais de todas as espécies analisadas de Culicidae consistiram em 37 genes funcionais no total: 22 RNAs transportadores, 13 genes codificantes de proteínas, 2 RNAs ribossomais (12S RNA ou "*small* RNA" e 16S RNA ou "*large* RNA") e uma região controle rica em AT. O esquema geral representando o genoma mitocondrial das espécies pode ser observado na Figura 19. A região controle AT mostrou bastante variação no seu comprimento entre as espécies, entretanto os demais genes permaneceram com o comprimento estável (Tabela 10). Os genes estão localizados tanto na cadeia H quanto na L, e houve sobreposição em alguns frames de leitura. A região controle AT está localizada entre os genes 12S ribossomal e o RNA transportador de isoleucina (I = Ile).

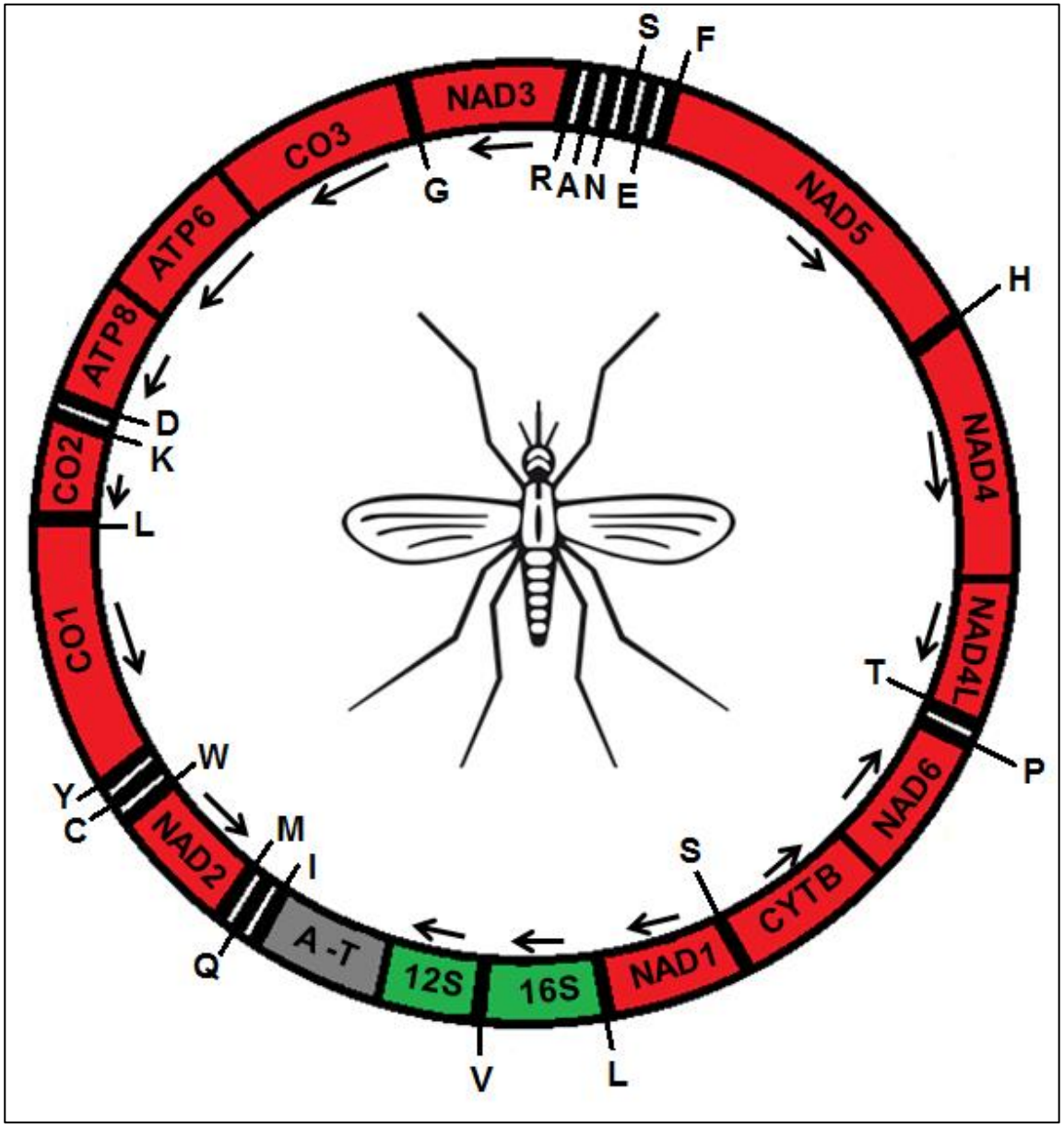


Figura 19 – Representação gráfica do arranjo e ordem gênica da maioria dos genomas mitocondriais dos Culicidae. Os RNAs transportadores estão indicados por letras de acordo com a abreviação da IUPAC_IUB para aminoácidos. A direção da transcrição dos genes está indicada pelas setas. Os genes em vermelho representam os codificantes de proteínas; em verde estão os ribossomais (subunidade menor e maior) e em cinza está representada a região controle rica em A-T.

Tabela 10 – Comprimento e composição AT dos genomas mitocondriais analisados. PCG: genes codificantes de proteínas; tRNA: RNA transportador; rRNA: RNA ribossomal. *A porcentagem de AT total considera apenas os genes codificantes de proteínas, os tRNAs e o rRNAs.

Espécie	Comprimento					% AT Total
	Total	PCG	tRNA	rRNA	Controle A-T	
Aedeomyia squamipennis	14.570	10.911	1.489	2.159	755	76,5
Aedes aegypti	16.655	10.968	1.491	2.147	1.708	79,1
Aedes albopictus	16.660	10.995	1.482	2.148	1.699	79,9
Aedes fulvus	17.130	10.950	1.488	2.175	2.234	78,0
Anopheles cruzii	15.450	11.238	1.477	2.160	699	78,5
Anopheles darlingi	15.385	10.977	1.477	2.148	715	78,1
Coquillettidia crysonotum	15.859	10.962	1.478	2.158	753	78,0
Culex pipiens	14.856	10.980	1.481	2.137	707	77,7
Culex quinquefasciatus	15.579	10.971	1.481	2.146	693	78,2
Haemagogus janthinomys	15.698	10.899	1.485	2.159	715	79,8
Limatus flavisetosus	15.797	10.899	1.488	2.140	765	80,3
Mansonia amazonenses	15.792	10.860	1.482	2.140	795	77,9
Ochlerotatus vigilax	15.887	10.938	1.489	2.158	957	79,6
Psorophora ferox	16.119	10.950	1.493	2.158	1.565	78,0
Psorophora saeva	16.168	10.950	1.482	2.140	1.662	79,0
Runchomyia reversa	14.537	10.632	1.488	2.158	699	77,5
Sabethes undosus	14.928	10.879	1.479	2.140	718	79,0
Toxorhynchites sp	16.365	10.841	1.491	2.158	725	78,7
Trichoprosopon pallidoventer	15.056	10.839	1.485	2.160	751	78,8
Uranotaenia geometrica	15.784	10.983	1.482	2.157	780	80,0
Wyeomyia confusa	14.993	10.899	1.489	2.143	712	78,8

A ordem gênica foi a mesma para a maioria das 20 espécies de Culicidae analisadas, exceto para os representantes da tribo Sabethini (*Limatus, Trichoprosopon, Runchomyia, Wyeomyia* e *Sabethes*). Nesse caso, os RNAs transportadores de tirosina (GTA) e cisteína (GCA) aparecem em outro lugar, como demonstrado na Figura 20, sugerindo que ocorreu uma translocação desses genes dentro da mitocôndria. No genoma mitocondrial ancestral (*Anopheles*), esses tRNAs aparecem entre os genes CO1 e o tRNA-W (tca); no genoma dos Sabethini eles se encontram entre o tRNA-I (gat) e a região controle AT.

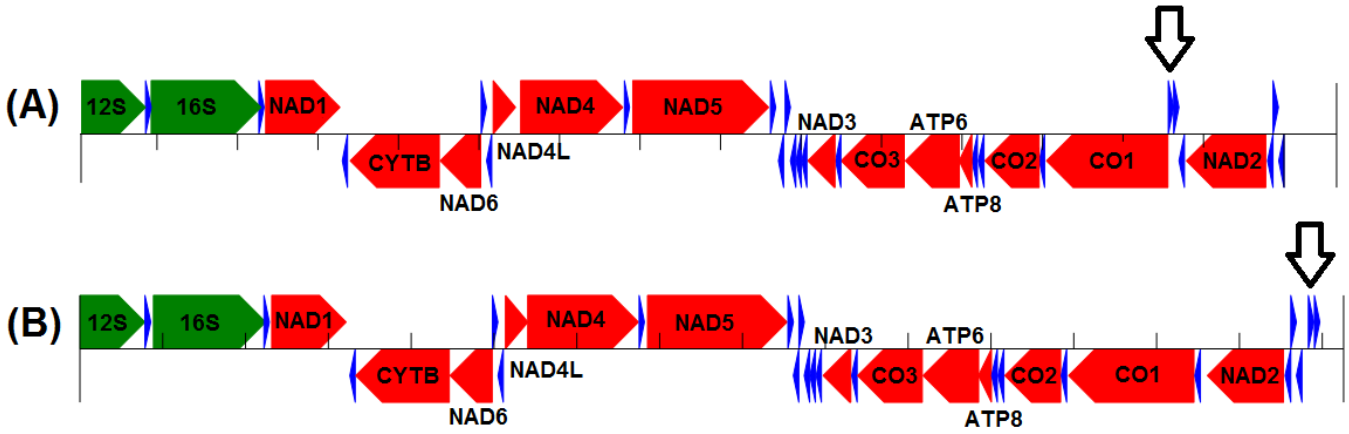


Figura 20 – Esquema mostrando a posição e orientação dos genes mitocondriais: **(A)** maioria dos Culicidae analisados aqui e **(B)** representantes da tribo Sabethini (*Sabethes, Limatus, Wyeomyia* e *Trichoprosopon*. As setas indicam o local da mudança dos tRNAs de cisteína (C) e tirosina (Y). A região controle AT foi omitida da representação.

Os 13 genes codificantes de proteínas não apresentaram íntrons e estavam dispostos nos dois sentidos: a cadeia H apresentou os genes NAD2, NAD3, NAD6, CO1, CO2, CO3, ATP6, ATP8 e CYTB; a cadeia L exibiu o NAD1, NAD4, NAD4L e NAD5. Analisando somente esses 13 genes, que serão empregados para as reconstruções filogenéticas, foi possível notar que os genes CO1, NAD2 e NAD6 apresentaram alta diversidade nucleotídica em relação aos outros (Tabela 11). Conforme esperado, a terceira posição do códon foi a mais variável. Também foi calculada a razão entre as substituições não-sinônimas e sinônimas (*dN/dS)* para verificar a ocorrência de seleção positiva nos genes.

Tabela 11 – Informações sobre as sequências dos 13 genes mitocondriais codificantes de proteínas analisados, diversidade nucleotídica (π) e média da razão *dN/dS* para cada gene. Os genes destacados em vermelho apresentaram alta diversidade nucleotídica em relação aos outros.

Gene	Alinhamento	Sítios Variáveis	Sítios Informativos para Parcimônia	π	*dN/dS*
CO1	1.521	568	455	0,191	0,086
CO2	681	291	218	0,132	0,171
CO3	786	350	253	0,145	0,154
ATP6	672	313	229	0,149	0,155
ATP8	162	101	79	0,129	0,561
CYTB	1.131	467	362	0,134	0,139
NAD1	933	358	252	0,120	0,205
NAD2	987	501	351	0,241	0,362
NAD3	351	159	126	0,148	0,218
NAD4	1.338	660	462	0,137	0,392
NAD4L	288	129	94	0,130	0,325
NAD5	1.731	812	562	0,133	0,351
NAD6	516	319	246	0,175	0,387

A diversidade nucleotídica também variou bastante dentro de cada gene das espécies analisadas (Figura 21). Os maiores níveis de polimorfismo foram encontrados na região controle A-T e os menores foram encontrados nos RNAs ribossomais. Também foi calculada a distância par-a-par entre as sequências de cada uma das 21 espécies analisadas (distâncias interespecíficas, portanto), pelo método de *Maximum Composite Likelihood* (Tabela 12). A maior distância (16%) foi verificada entre os gêneros [*Anopheles* x *Aedeomyia*] e [*Coquillettidia* x *Aedeomyia*]; a menor distância foi entre as espécies do gênero *Culex* (*Culex pipiens* x *Culex quinquefasciatus*) que não apresentaram divergências significativas nas sequências.

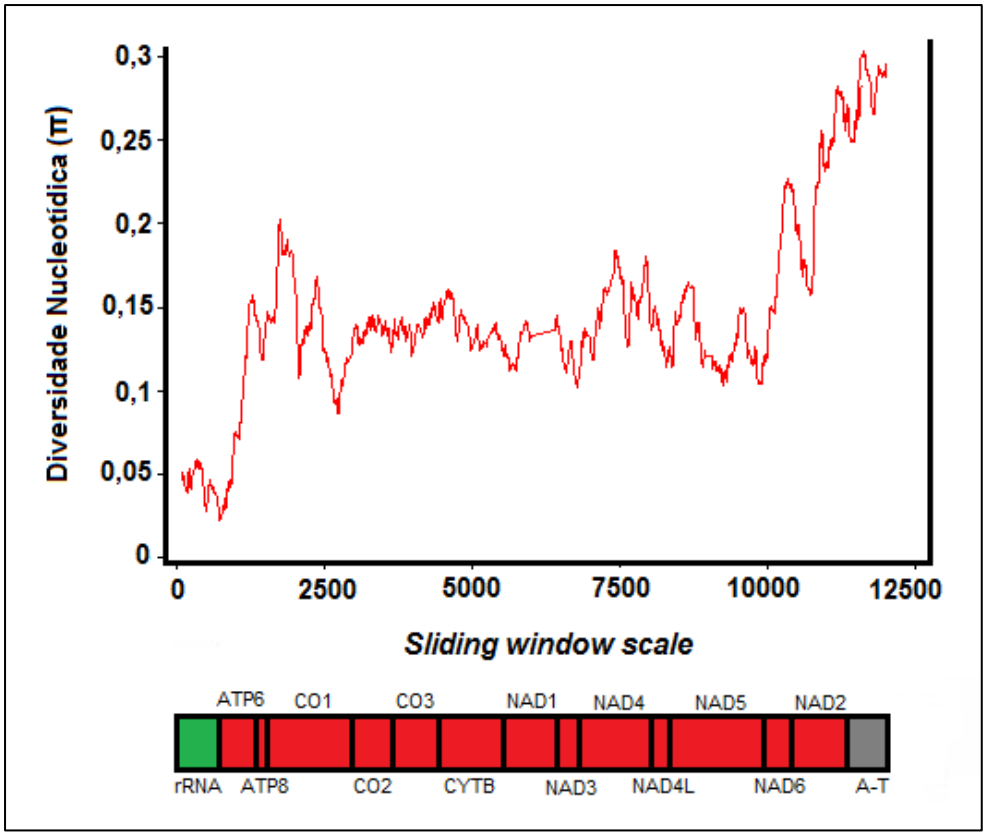


Figura 21 – Diversidade Nucleotídica ao longo do genoma mitocondrial dos Culicidae calculada utilizando a técnica de *sliding window scale* (janela de 300pb com cada passo de 10pb). Os genes estão representados no retângulo abaixo, onde a cor vermelha representa os codificantes de proteína, a verde representa os ribossomais e a cinza mostra a região controle A-T.

Tabela 12 – Média da divergência nucleotídica calculada por *Maximum Composite Likelihood* dos 13 genes mitocondriais codificantes de proteínas para as 21 espécies analisadas (comparação interespecífica). Os valores estão em porcentagem.

Espécie	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**
1. *Aedeomyia*																					
2. *Aedes aegypti*	14																				
3. *Aedes albopictus*	14	8																			
4. *Aedes fulvus*	14	8	8																		
5. *Anopheles cruzii*	16	13	13	12																	
6. *Anopheles darlingi*	16	12	12	12	10																
7. *Coquillettidia*	16	14	14	14	15	15															
8. *Culex pipiens*	14	10	10	9	12	12	14														
9. *Culex quinquefasciatus*	14	10	10	9	12	12	14	0													
10. *Haemagogus*	13	8	8	7	12	12	13	9	9												
11. *Limatus*	14	12	12	11	13	14	14	12	12	11											
12. *Mansonia*	15	12	12	12	14	14	14	12	12	11	13										
13. *Ochlerotatus*	14	8	8	6	12	12	14	8	8	7	11	11									
14. *Psorophora ferox*	14	9	9	8	13	12	14	10	10	9	12	12	8								
15. *Psorophora saeva*	14	9	9	8	12	12	14	9	9	8	11	11	8	6							
16. *Runchomyia*	15	13	12	12	14	14	14	12	12	12	10	13	12	13	12						
17. *Sabethes*	15	13	13	12	14	14	15	13	13	12	9	13	12	13	12	11					
18. *Toxorhynchites*	15	13	13	13	14	15	15	12	12	12	12	14	12	13	12	13	13				
19. *Trichoprosopon*	14	12	12	12	14	14	15	12	12	11	10	13	11	12	12	9	10	13			
20. *Uranotaenia*	14	12	10	10	12	12	14	10	10	10	11	12	10	11	10	12	12	13	12		
21. *Wyeomyia*	15	13	12	12	14	14	14	12	12	12	9	13	12	13	11	11	10	13	10	12	

4.3.2.2 Análises Filogenéticas

Foram realizadas análises filogenéticas com os 13 genes mitocondriais codificantes de proteínas, já que mostraram ser bem variáveis e informativos para parcimônia. Os melhores modelos evolutivos escolhidos para cada gene estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 – Melhor esquema de particionamento para análises de *supermatrix* (SM) e o melhor modelo evolutivo escolhido para cada gene mitocondrial.

Genes	Modelo
CO1	TpM+I+G
CO2	HKY
CO3	TvM+G
ATP6	TpM+G
ATP8	HKY+G
CYTB	GTR
NAD1	GTR+G
NAD2	TiM+G
NAD3	TpM
NAD4	TvM+G
NAD4L	TpM+G
NAD5	TiM+G
NAD6	HKY

Foram realizadas análises de supermatrix, ou seja, com todos os 13 genes concatenados e particionados de acordo com o melhor modelo evolutivo. A topologia da árvore gerada por Análise Bayesiana pode ser observada na Figura 22. Todos os ramos tiveram alta probabilidade posterior, variando entre 0,959 e 1. Nesta filogenia os representantes das principais tribos ficaram agrupados: *Coquillettidia* e *Mansonia* (tribo Mansoniini); *Aedes, Haemagogus, Ochlerotatus* e *Psorophora* (tribo Aedini); e *Limatus, Sabethes, Wyeomyia, Runchomyia* e *Trichoprosopon* (tribo Sabethini). A subfamília Anophelinae aparece como monofilética e grupo-irmão de Culicinae, assim como na topologia construídas com os genes nucleares. A família Culicidae também aparece como grupo monofilético.

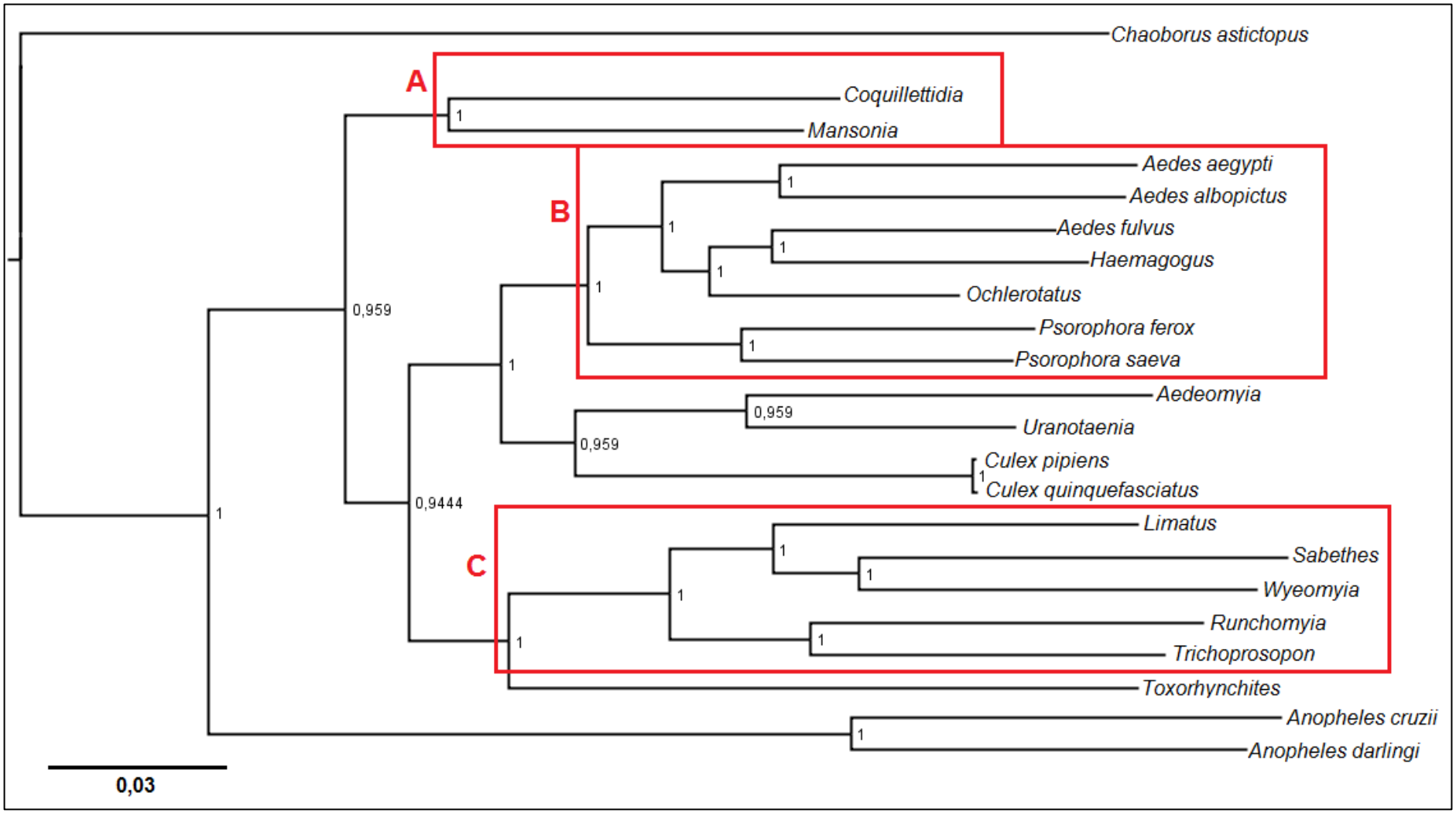


Figura 22 – Topologia da melhor árvore inferida por análise bayesiana (AB) mostrando as relações entre as 21 espécies de Culicidae. Foram utilizados nucleotídeos de 13 genes mitocondriais concatenados: CO1, CO2, CO3, CYTB, NAD1, NAD2, NAD3, NAD4, NAD4L, NAD5, NAD6, ATP6 e ATP8. Os retângulos destacados em vermelho representam (A) tribo Mansoniini, (B) tribo Aedini e (C) tribo Sabethini. Os números associados a cada nó representam os valores de probabilidade posterior bayesiana. A quantidade de alterações nos caracteres é representada pela barra de escala.

4.4 Espectrometria MALDI-TOF

Com o objetivo de verificar se o sexo, tempo ou tipo de armazenamento dos exemplares coletados influencia nas análises de espectrometria MALDI-TOF, foi realizada uma padronização. Foram utilizados indivíduos de *Aedes aegypti* provenientes da colônia do Instituto Butantan/SP em cinco situações diferentes: (A) fêmea armazenada em álcool 70% por 24 h; (B) macho armazenado em álcool 70% por 24 h; (C) fêmea armazenada em álcool 70% por 30 dias; (D) fêmea armazenada a seco em freezer -80 ºC por 24 h; (E) fêmea alimentada com sangue e utilizada inteira para extração proteica.

O intuito era saber se fatores extrínsecos à análise poderiam influenciar no perfil proteico das espécies. A hipótese era de que diferentes tipos de armazenamento alterariam as proteínas presentes na amostra produzindo artefatos e, consequentemente, o padrão de picos observados no espectrograma. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 23.

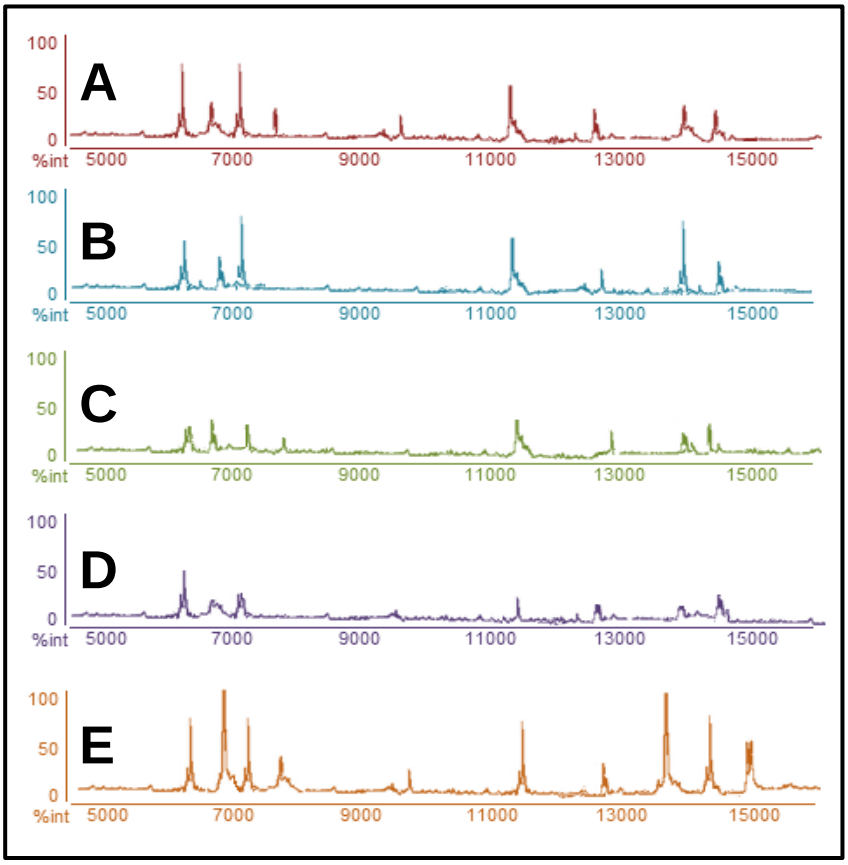


Figura 23 – Perfil proteico de *Aedes aegypti* em cinco condições distintas: (A) fêmea armazenada em álcool 70% por 24h; (B) macho armazenado em álcool 70% por 24h; (C) fêmea armazenada em álcool 70% por 30 dias; (D) fêmea armazenada a seco em freezer -80 ºC por 24h; (E) fêmea alimentada com sangue e utilizada inteira para extração proteica.

É possível notar que o tempo e tipo de armazenagens diferentes alteram a intensidade dos picos, mas o padrão proteico dos indivíduos permanece equivalente. Isso é particularmente importante porque grande parte dos exemplares coletados está armazenada no álcool e em freezer -80 ºC. O sexo também não influenciou tanto esse perfil, já que os picos mais importantes evidenciados nas fêmeas também estão presentes nos machos. A única situação em que o padrão de picos mudou totalmente foi quando utilizamos o abdômen da fêmea alimentada com sangue para as análises (E).

Desse modo, utilizou-se apenas o tórax de indivíduos fêmeas adultos para as análises seguintes. Foram analisadas dez espécies distintas englobando oito gêneros e todos eles produziram perfis proteicos diferentes entre si, confirmando identidade específica. Na Figura 24 podem-se observar os vários picos com massas (eixo x) e intensidades (eixo y) distintas representando os biomarcadores (*biomarkers*) encontrados para cada indivíduo.

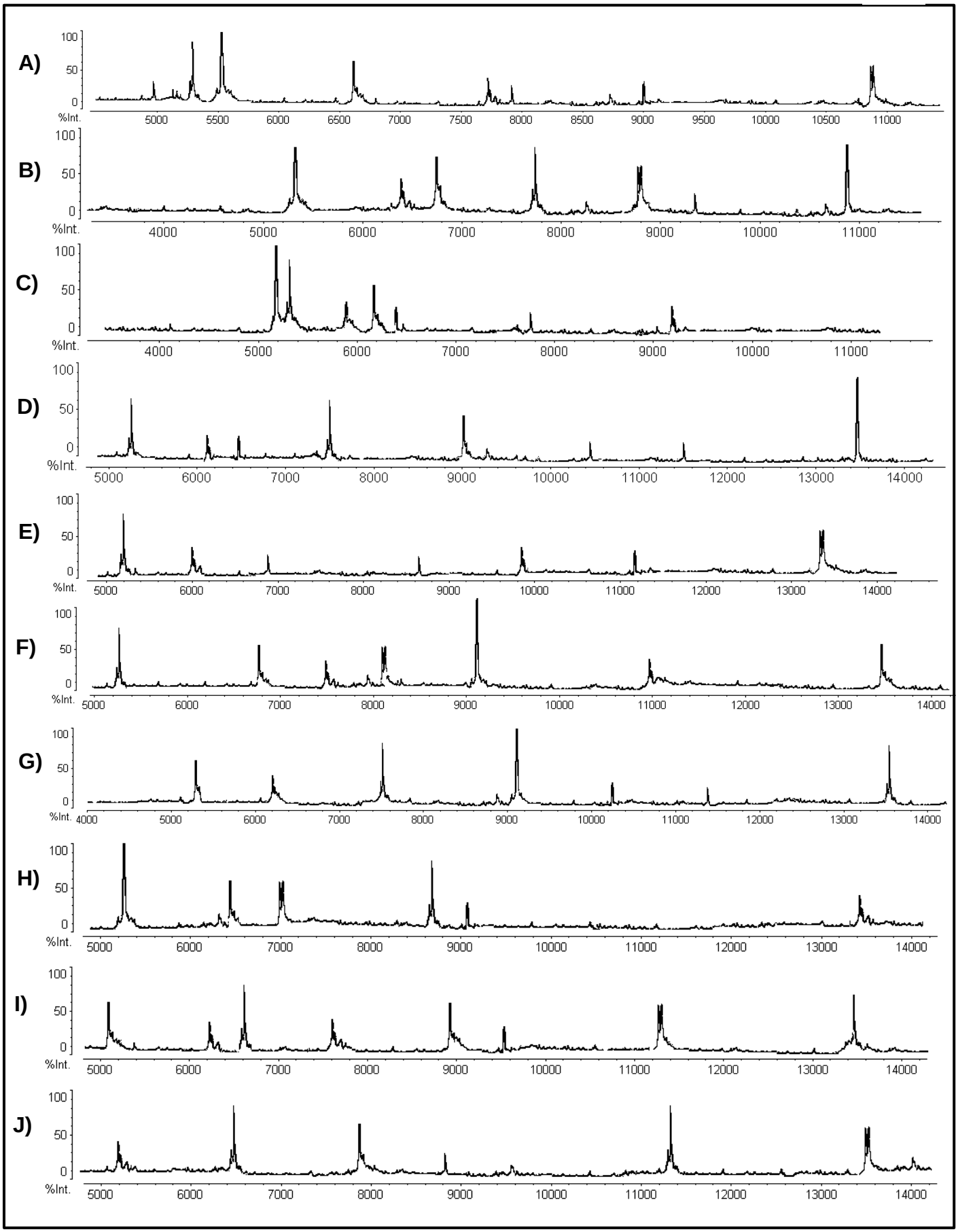


Figura 24 – Perfis proteicos evidenciados por espectrometria MALDI-TOF. (A) *Wyeomyia confusa*, (B) *Sabethes undosus*, (C) *Anopheles cruzii*, (D) *Ochlerotatus serratus*, (E) *Psorophora cingulata*, (F) *Culex nigripalpus*, (G) *Psorophora ferox*, (H) *Anopheles oswaldoi*, (I) *Runchomyia reversa* e (J) *Limatus flavisetosus*.

Posteriormente foi construída uma matriz de presença/ausência com os 24 *biomarkers* encontrados para cada espécie (Tabela 14).

Tabela 14 – Matriz com os 24 *biomarkers* encontrados através do MALDI-TOF para cada espécie.

Biomarkers	*Wy. confusa*	*Sa. undosus*	*An. cruzii*	*Oc. serratus*	*Ps. cingulata*	*Cx. nigripalpus*	*Ps. ferox*	*An. oswaldoi*	*Ru. reversa*	*Li. flaviseriosus*
5038	X								X	
5305	X	X	X	X	X	X	X	X		X
5481	X		X							
5916			X		X					
6106				X						
6398		X	X				X	X	X	
6675	X	X		X					X	X
6807						X				
7040					X			X		
7676				X		X	X			
7768	X	X	X						X	
7918	X									X
8191						X				
8769		X			X			X		
8975	X			X					X	X
9146			X			X	X	X		
9574		X							X	
9851					X					
10198							X			
10305				X						
10900	X	X				X				
11360					X		X		X	X
11668				X						
13587				X	X	X	X	X	X	X

E, finalmente, através da matriz foi possível construir um fenograma de similaridade entre os perfis (Figura 25). A relação observada entre as espécies não tem nenhuma relação com a filogenia ou fenograma gerados pelos dados genéticos nem morfológicos.

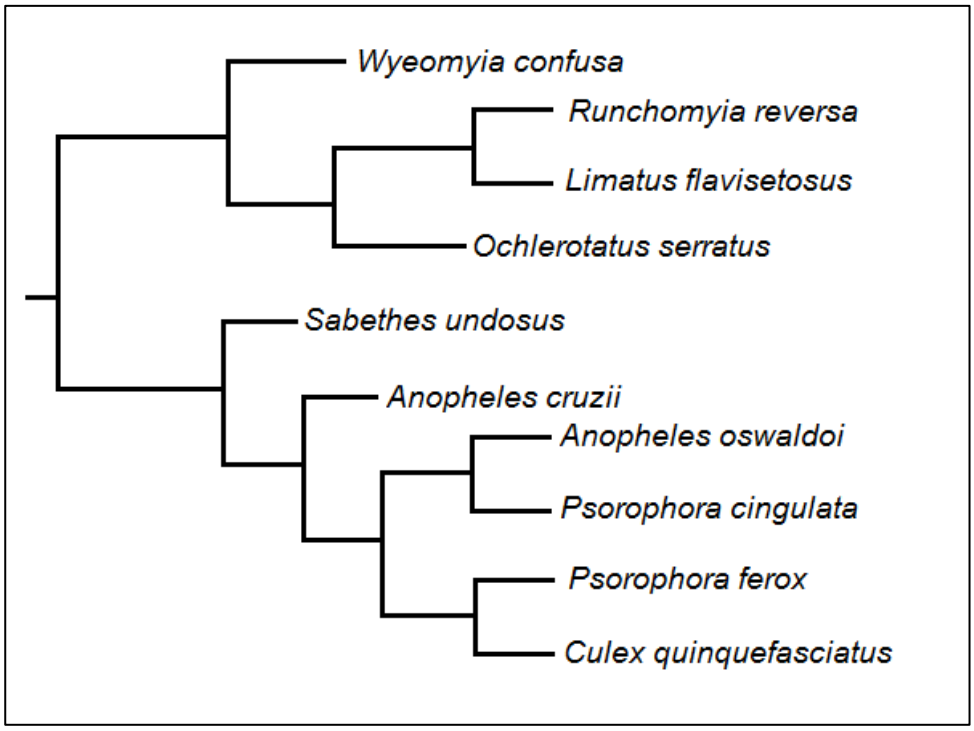


Figura 25 – Fenograma *neighbour-joining* evidenciando as relações entre dez espécies de Culicidae. Foram utilizados dados de perfis proteicos (24 *biomarkers*) obtidos através de espectrometria MALDI-TOF.

4.5 Comparação entre os métodos genéticos e morfológicos

Feitas as análises morfométricas e genéticas, foi possível comparar ambas as abordagens com o objetivo de encontrar divergências e congruências. Primeiramente foram relacionados o fenograma alar e a topologia encontrada com os genes nucleares (Figura 26). Porém, para torná-los comparáveis, foram retirados os gêneros *Johnbelkinia*, *Mansonia*, *Runchomyia* e *Sallumia* do fenograma morfológico, já que não há dados genéticos para compará-los. Comparando as duas topologias, observa-se pouca congruência na relação entre os grupos; apenas os gêneros *Limatus*, *Wyeomyia* e *Sabethes* (tribo Sabethini) aparecem juntos em ambas.

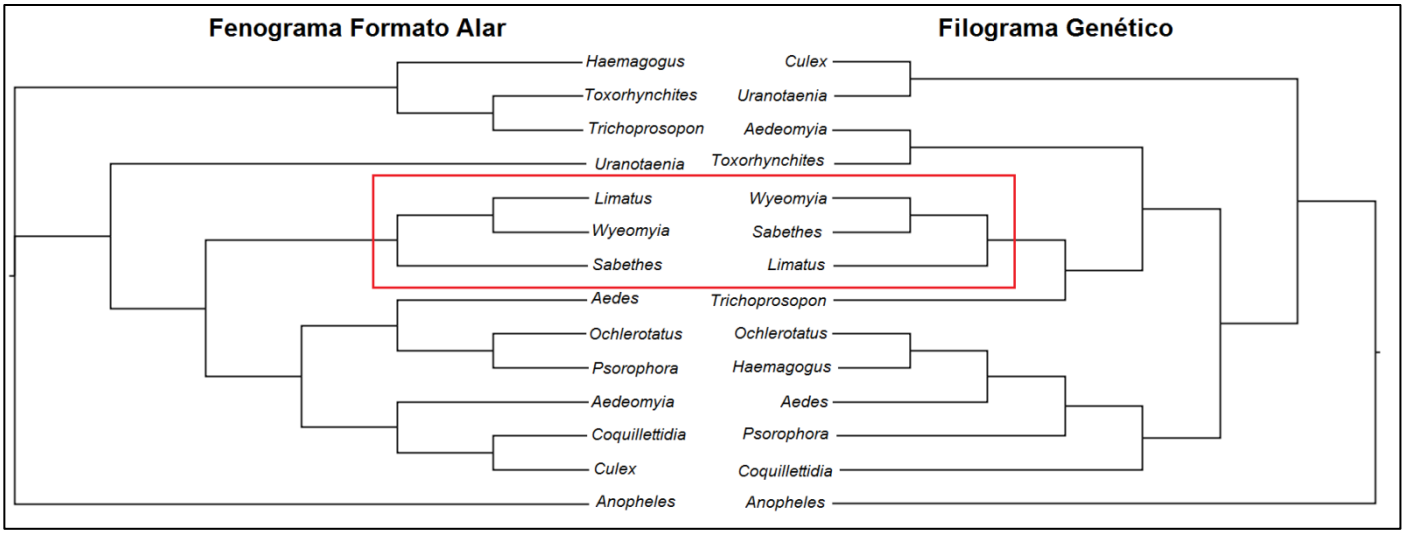


Figura 26 – Comparação entre o fenograma obtido com as distâncias de Procrustes do formato alar e a árvore gerada com as sequências dos genes nucleares. Grupo em evidência são gêneros da tribo Sabethini.

Foi verificado também se o tamanho das asas dos mosquitos está relacionado com sua filogenia. Para isso, foi calculado o vetor tamanho do centroide, que estima a variação métrica na asa, e esses valores foram plotados num gráfico com a topologia encontrada usando genes nucleares (Figura 27) e mitocondriais (Figura 28).

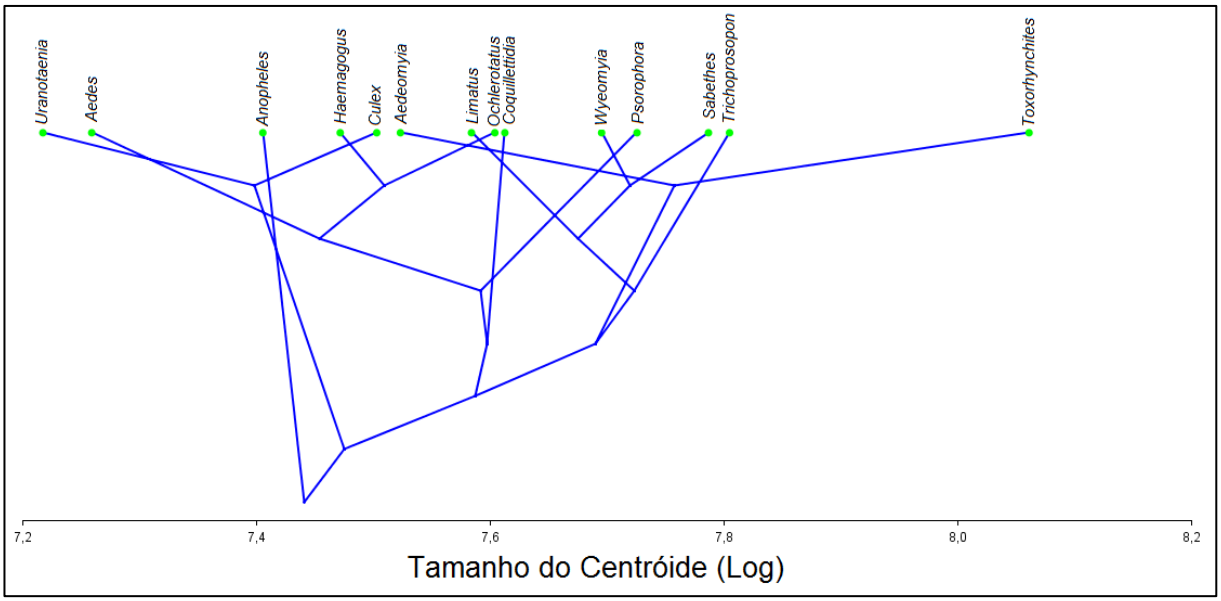


Figura 27 – Tamanho do centroide (em logaritmo) dos gêneros analisados relacionado com a árvore dos genes nucleares.

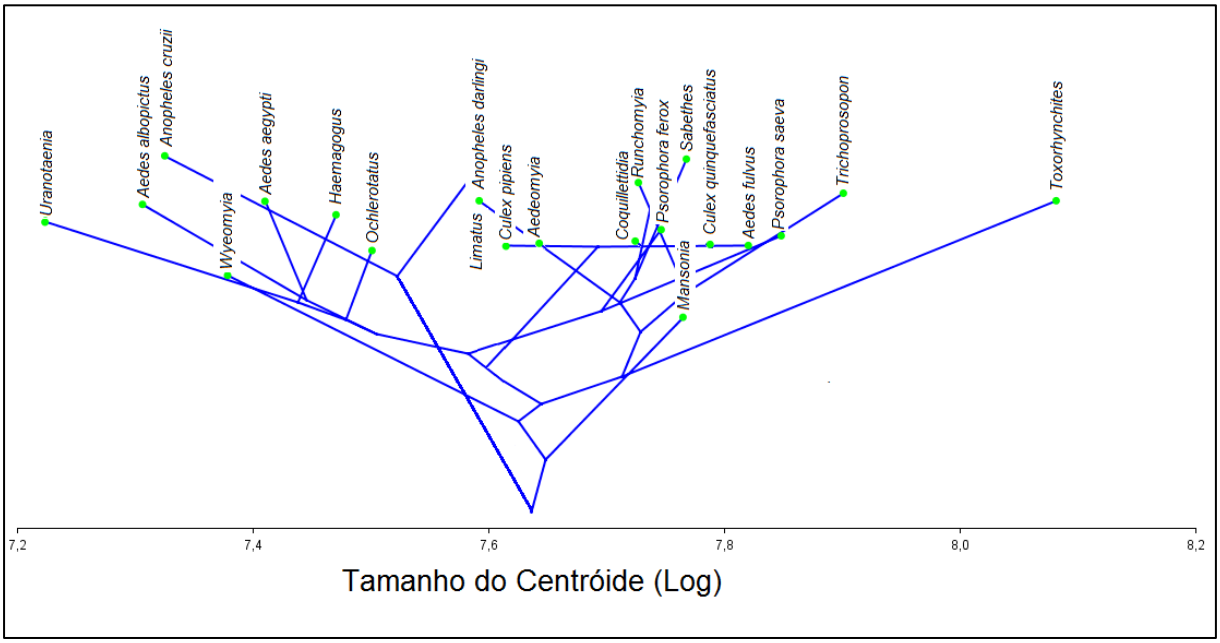


Figura 28 – Tamanho do centroide (em logaritmo) dos gêneros analisados relacionado com a árvore dos genes mitocondriais.

O resultado foi que não há correlação do tamanho da asa com a filogenia dos mosquitos, já que espécies grandes e pequenas apresentam relações de parentesco próximas (como *Toxorhynchites* e *Aedeomyia*, por exemplo). Por fim, as topologias genéticas aqui encontradas, tanto usando dados de genes nucleares quanto mitocondriais, foram plotadas no gráfico de Componentes Principais da asa, para relacionar as duas análises (Figuras 29 e 30).

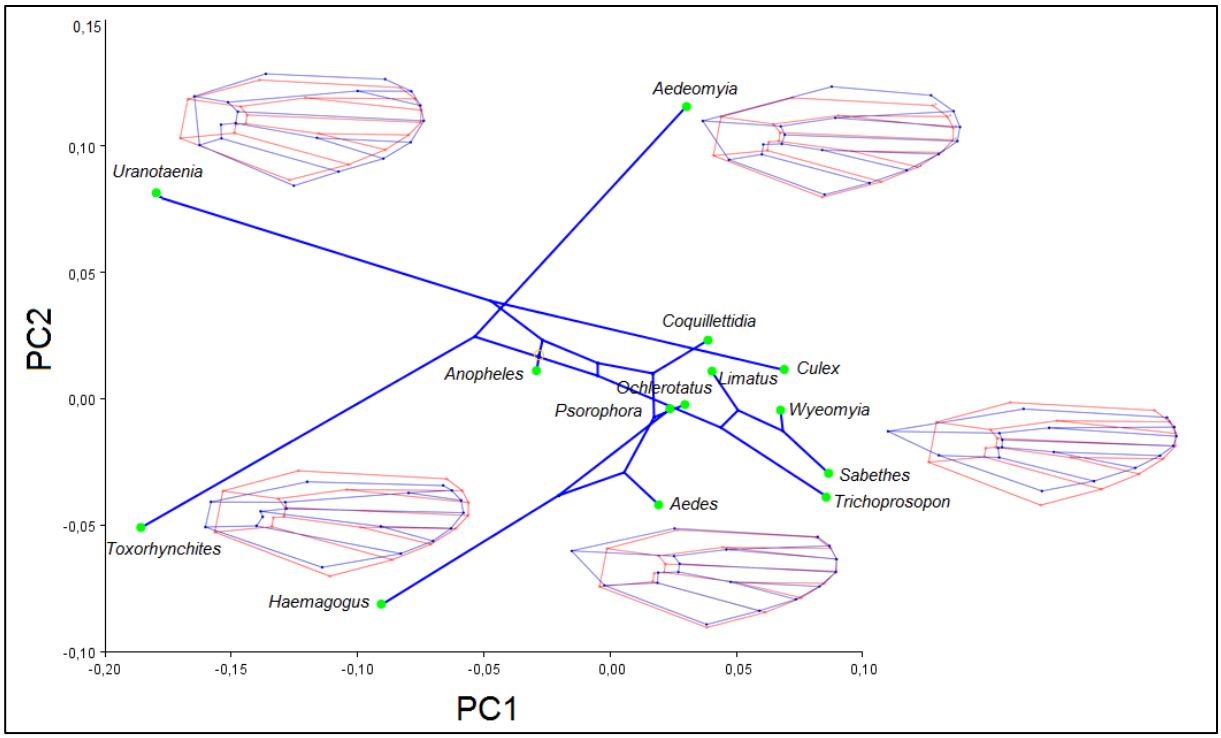


Figura 29 – Morfoespaço de Componentes Principais da asa relacionado com a topologia genética obtida com os genes nucleares. Os contornos da asa em vermelho representam o ancestral (*Anopheles*) e o azul representa cada gênero comparado.

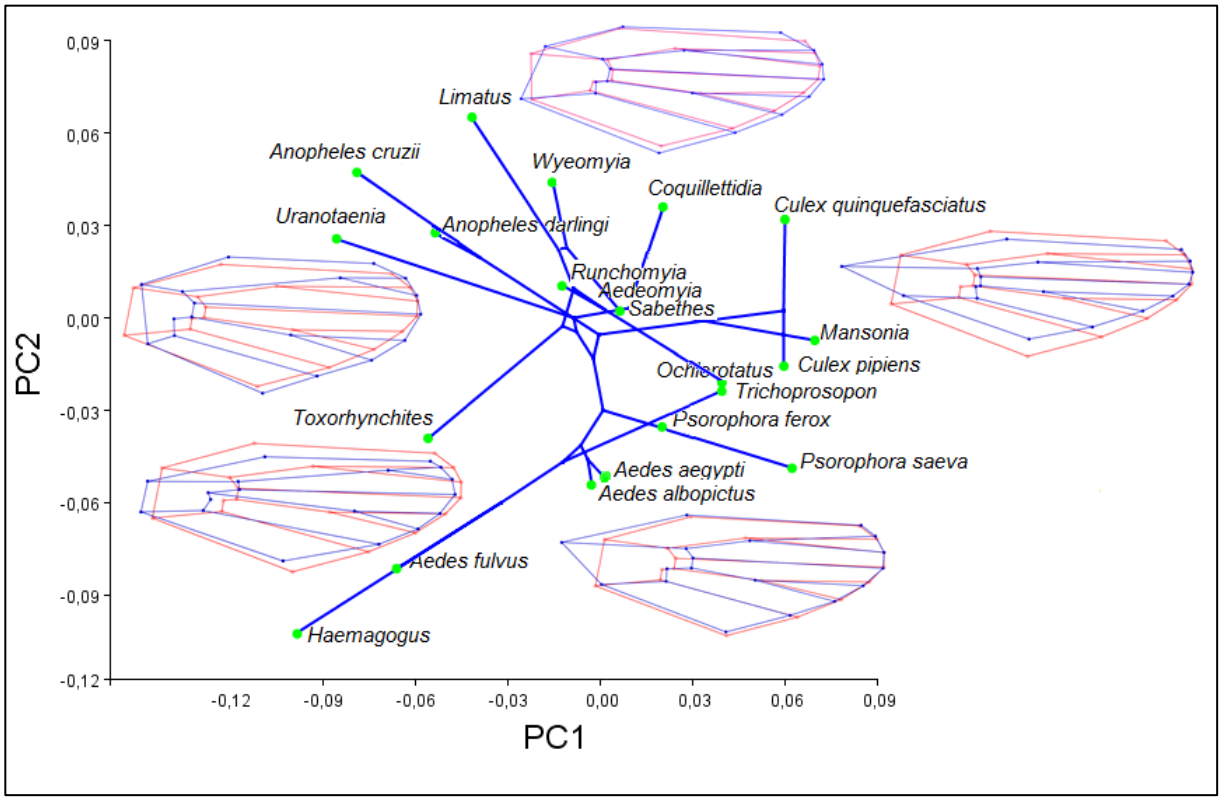


Figura 30 – Morfoespaço de Componentes Principais da asa relacionado com a topologia genética obtida com os genes mitocondriais. Os contornos da asa em vermelho representam o ancestral (*Anopheles*) e o azul representa cada gênero comparado.

Analisando esses gráficos nota-se que há muita variação no formato alar em Culicidae, e fica evidente quando fazemos a sobreposição do formato alar ancestral (*Anopheles*) com os outros grupos. O *landmark* #1 é nitidamente o mais variável, sendo uma característica importante para distinguir os gêneros. As topologias genéticas não tiveram correlação com os Componentes Principais da asa de cada gênero, já que a árvore ficou totalmente distorcida em relação ao morfoespaço.

Por fim, a topologia gerada com os dados de MALDI-TOF foi comparada com a topologia genética (Figura 31), e o resultado foi a total incompatibilidade entre elas. Esses marcadores parecem contar histórias evolutivas bem diferentes.

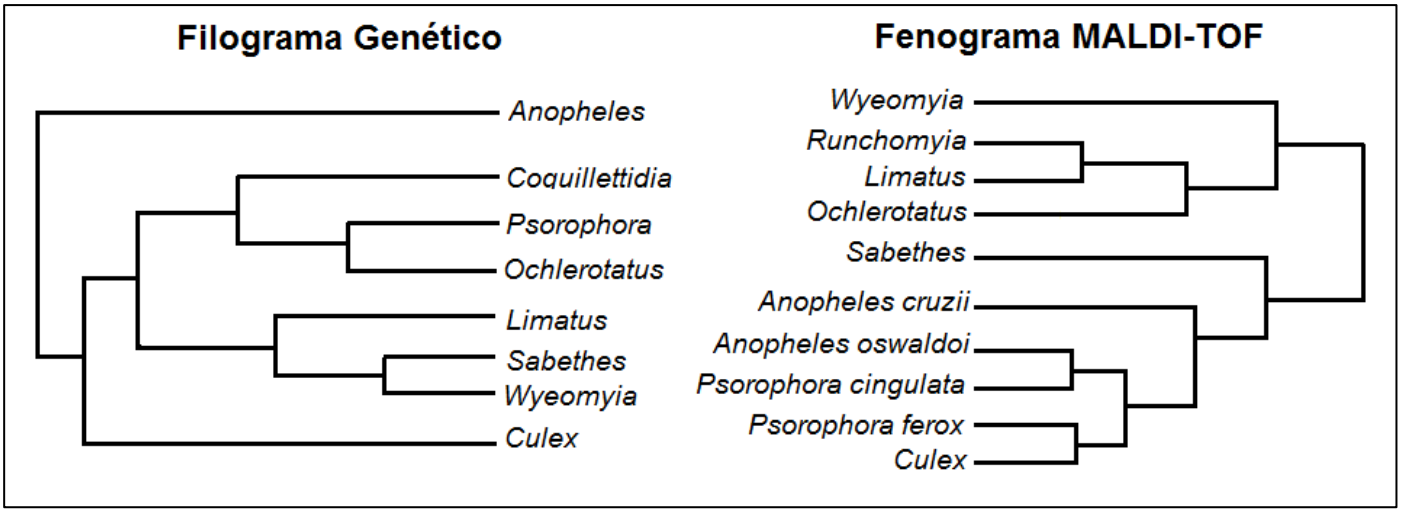


Figura 31 - Comparação entre a árvore gerada com as sequências dos genes nucleares e o fenograma obtido dos biomarcadores proteicos com MALDI-TOF. Não houve nenhuma congruência entre elas.

5 DISCUSSÃO

A coleta e amostragem das espécies foram satisfatórias para representar os principais grupos Neotropicais. De acordo com Harbach (2007), existem 44 gêneros de Culicidae distribuídos no mundo, sendo que 24 deles estão presentes na região Neotropical. A coleta deste trabalho abrangeu 20 gêneros no total, representando 84% da diversidade presente nesta região biogeográfica. Alguns dos gêneros coletados são exclusivamente Neotropicais, como *Chagasia, Johnbelkinia, Limatus, Runchomyia, Sabethes* e *Trichoprosopon* (Harbach, 2007). Tratam-se de gêneros raramente estudados, já que são silvestres e seu potencial epidemiológico é pouco conhecido. Analisando os gêneros das 76 espécies coletadas, é possível observar que a grande maioria é *Culex*, sendo que para alguns gêneros houve somente um representante de cada espécie. Isso está de acordo com a literatura, já que o gênero *Culex* é cosmopolita e abriga o maior número de espécies entre os Culicidae, cerca de 770 (Harbach, 2007).

5.1 Morfometria Geométrica Alar

Em todas as análises realizadas, os gêneros ou subgêneros apresentaram grande diferença no formato alar, ficando clara a separação em grupos distintos no morfoespaço de Variáveis Canônicas. Até mesmo nas análises de Componentes Principais, onde só é possível identificar um padrão nos indivíduos quando ele é muito evidente, as subfamílias Anophelinae e Culicinae ficaram segregadas. Elas divergiram há cerca de 200 milhões de anos (Reidenbach et al., 2009), e ao que tudo indica, seu formato alar acompanhou essa diferenciação. Sendo assim, a morfometria geométrica se mostrou uma ferramenta útil na detecção de variações interespecíficas, e o formato alar também se mostrou um bom marcador para revelar padrões evolutivos mais basais, como separação de subfamílias, subgêneros e tribos. Outros estudos utilizaram essa técnica e foram capazes de separar espécies similares, muitas vezes filogeneticamente próximas (Calle et al., 2002; Henry et al., 2010; Lorenz et al., 2012, 2015). Análises multivariadas, como a morfometria geométrica aqui empregada, geralmente revelam padrões e tendências não perceptíveis em outros tipos de análises.

Nas análises de Variáveis Canônicas houve a formação de quatro grupos principais: (1) Anophelinae, (2) Sabethini, (3) *Toxorhynchites/Uranotaenia* e (4) todos os outros gêneros restantes. Isso quer dizer que o formato alar desses agrupamentos são mais semelhantes entre si. A asa geralmente é usada como marcador de processos microevolutivos (Dujardin, 2008; Vidal et al., 2011; Gómez et al., 2014; Lorenz et al., 2014); entretanto, como observado aqui, ela também parece ser um bom indicador de macroevolução nos grupos. Apesar disso, quando analisamos cada gênero ou subgênero separadamente (Figuras 10, 11, 12 e 13), podemos notar que há sobreposição dos grupos em alguns casos, como nos subgêneros *Melanoconion* e *Microculex* de *Culex*. Há várias explicações possíveis para tal fenômeno, como: (1) conservação do fenótipo alar entre os subgêneros devido à seleção natural, limitação evolutiva e/ou evolução correlacionada entre eles (Smith et al., 2011); (2) mecanismos de canalização que conservam o fenótipo de estruturas anatômicas importantes (Gibson, Wagner 2000; Debat, David 2001) ou (3) número amostral insuficiente para detectar algum padrão de variação. Essa última explicação parece ser menos provável, já que a grande maioria dos espécimes coletados foi do gênero *Culex*, e vários gêneros coletados estão bem representados. Sendo assim, a magnitude da divergência morfológica parece seguir um padrão hierárquico, onde: subfamília > tribo > gênero > subgênero > espécie > população. Ou seja, para discriminar indivíduos de tribos distintas a geometria da asa é mais eficiente do que para separar populações de uma mesma espécie, por exemplo.

De um modo geral, as análises do formato alar revelaram um padrão específico de venação que pode ser atribuído às histórias evolutivas diferentes de cada grupo. Isso é suportado pelo alto índice de herdabilidade desse caráter. Vários estudos examinaram a herdabilidade da forma alar em Diptera e concluíram que pode chegar a 60% ou mais (Roff, Mousseau, 1987; Bitner-Mathé, Klaczko, 1999; Gilchrist, Partridge, 2001; Hoffman, Shirriffs, 2002; Jirakanjanakit et al., 2007), sendo que estudos genéticos quantitativos recentes forneceram evidências de forte determinismo genético para esse caráter (Iriarte et al., 2003; Breuker et al., 2006; Patterson, Klingenberg, 2007). Alguns *landmarks* foram mais variáveis que outros, e consequentemente mais úteis na identificação das espécies ou gêneros. A comparação do consenso alar após a sobreposição de Procrustes revelou que o *landmark* mais variável foi o #1, localizado na borda da asa entre as veias RS e R1. Esse marco anatômico é importante principalmente na diferenciação entre as

subfamílias Anophelinae e Culicinae. De acordo com Dujardin (2008), os *landmarks* da asa dos mosquitos são diferentemente afetados pelo mesmo estímulo, e a borda posterior pode sofrer alterações morfológicas dependendo da influência de fatores externos. Outros *landmarks* também apresentaram grande variação entre os grupos, principalmente o #14, #15 e #16, situados no centro da asa (Figura 14). Para algumas espécies, como do gênero *Aedes* sp. por exemplo, a asa é um órgão importante não somente para o voo, como também para sinalização sexual (Cator et al., 2010). Ainda é desconhecido se essas variações nos *landmarks* e no padrão de veias alares dentro de cada espécie tem algum papel ecológico ou comportamental, que influencie diretamente no voo ou cópula dos indivíduos. Mas, pelos achados deste trabalho, mesmo se existir alguma canalização funcional, essas variações pelo menos podem ser usadas para identificação dos grupos e subgrupos dentro de Culicidae, com alto índice de precisão.

Para verificar a similaridade entre todos os gêneros foi construído um fenograma baseado nas distâncias de Procrustes, que leva em consideração as variações intra e interespecífica (Figura 15). Utilizando todos os 1.429 exemplares nas análises apenas a tribo Sabethini aparece como grupo aparentado. Esse agrupamento corrobora dados genéticos e morfológicos existentes na literatura (Reidenbach et al., 2009). O formato alar dessas espécies está muito relacionado, e nesse caso, o padrão de venação alar pode apresentar um sinal filogenético (Cole et al., 2002). Esse resultado pode ser interpretado como um tipo de inércia evolutiva, já que as asas dos gêneros dessa tribo são notavelmente semelhantes. Esse fato é bastante surpreendente, dado que a tribo Sabethini divergiu há no mínimo 75 milhões de anos (Reidenbach et al., 2009) o que permitiria grandes divergências na forma alar até mesmo por deriva genética. Os gêneros *Chagasia* e *Anopheles* permaneceram juntos, indicando que suas asas são mais similares entre si, assim como *Psorophora* e *Ochlerotatus*, representando a tribo Aedini. O gênero *Lutzia*, raramente estudado, apresentou o formato alar mais parecido com espécies de Culicini e Aedini; isso tem relação com sua posição filogenética, já que se trata de um gênero pertencente à tribo Culicini (Harbach, 2007). Entretanto, a maioria dos grupos formados não teve correlação com sua filogenia atual conhecida (Reidenbach et al., 2009); por exemplo, os gêneros *Uranotaenia* e *Toxorhynchites* aparecem como grupo-irmão de todos os outros gêneros ao invés de *Anopheles*, já que eles possuem as asas mais distintas entre todos os representantes da família.

Em linhas gerais, o formato alar não tem a acurácia que as abordagens moleculares possuem, mas os resultados aqui apresentados demonstram que ele pode ser uma ferramenta muito útil para detectar padrões macroevolutivos e identificar agrupamentos em Culicidae de forma rápida e barata. Outros estudos na literatura também já comprovaram sua eficácia para resolver questões ecológicas ou taxonômicas (Calle et al., 2002; Lorenz et al., 2012, 2014, 2015; Gómez, Jaramillo, 2013; Gómez, 2014). A identificação correta das espécies é essencial para reconhecer os vetores envolvidos na transmissão de patógenos e ajudar no desenvolvimento de estratégias para o controle (Forattini, 2002). Sendo assim, a morfometria geométrica alar pode ser combinada com outras técnicas ou ser usada em uma triagem inicial para reconhecimento dessas espécies e gêneros. Em relação ao seu uso para inferências filogenéticas é recomendável utilizá-lo com cautela, visto que para a maioria dos grupos abordados aqui ele não apresentou forte sinal filogenético. Nesta análise os dados morfométricos forneceram uma estimativa incongruente para a reconstrução geral da família Culicidae. Vários outros estudos também revelaram incongruências parciais ou completas entre árvores filogenéticas obtidas com dados genéticos e morfométricos (Courant et al., 1997; Marcus et al., 2000; Pretorius, Scholtz, 2001; Cole et al., 2002; Milne, O'Higgins, 2002; Cardini, Elton 2008). Portanto, os dados morfométricos podem não ser indicadores confiáveis da filogenia dos grupos; especificamente em Culicidae, as asas devem ter uma evolução própria que segue parâmetros incompatíveis com outros marcadores.

5.2 Genes nucleares

A utilização de genes nucleares para reconstruções filogenéticas já é bem difundida na literatura, mas geralmente são usados genes codificantes de proteínas (Brower, DeSalle, 1994; Soto-Adames et al., 1994; Besansky, Fahey, 1997). Nesse estudo, além desses genes, empregamos também dois genes ribossomais: o 28S e o ITS2. Devido à sua ubiquidade em todos os tipos celulares e sua constância estrutural, os genes ribossomais são comumente utilizados para construir filogenias em níveis superiores (Hills, Dixon, 1991; Olsen, Woese, 1993). Entretanto, quando testamos o sinal filogenético através do método *likelihood-mapping* (Strimmer, Haeseler, 1997), esses genes ribossomais apresentaram sinal mais fraco quando comparados com aqueles codificantes de proteínas (Figura 16). Isso pode indicar

que esses genes ribossomais evoluem numa taxa mais lenta do que os outros nucleares, que também pode ser observado pelo número de sítios informativos para parcimônia no gene 28S (apenas 48 sítios informativos numa sequência de 562pb). Em *Drosophila*, por exemplo, as espécies-irmãs do grupo melanogaster possuem sequências idênticas de 28S (Linares et al., 1991) mas são claramente distinguíveis utilizando genes codificantes de proteínas como o álcool-desidrogenase (Bodmer, Ashburner, 1984).

No total foram alinhados 7.359 caracteres totais dos genes nucleares, sendo que 3.389 foram variáveis entre os gêneros de Culicidae e 1.992 foram informativos para parcimônia. Esses resultados a respeito de sítios informativos são similares aos encontrados por Reidenbach et al. (2009) que analisaram seis genes nucleares codificantes de proteínas, mas em nosso estudo foram incluídos dois novos gêneros Neotropicais: *Chagasia* e *Lutzia*. O conteúdo GC nas sequências variou entre 48,4% (*Trichoprosopon*) e 60,7% (*Anopheles*), sendo que para alguns gêneros foi observada uma heterogeneidade de bases GC na terceira posição do códon. Grupos-irmãos como *Anopheles* e *Chagasia* apresentaram esse desvio, assim como gêneros não relacionados como *Culex* e *Psorophora*. Na molécula de DNA, o par GC está ligado por três pontes de hidrogênio, enquanto que o par AT está ligado somente por duas; sendo assim, o DNA com alto teor GC tende a ser mais estável que os demais (Yakovchuk et al., 2006). Essa diferença observada nos grupos pode ter sido originada através de seleção, viés mutacional ou sistema de reparo do DNA com recombinação enviesada (Birdsell, 2002). Sabe-se também que essa heterogeneidade na composição das sequências pode confundir os métodos de reconstrução filogenética (Lockhart et al., 1994).

Quando analisamos cada gene separadamente, de um modo geral, não foi possível recuperar inteiramente a filogenia da família Culicidae (Figura 17). A análise filogenética de um *locus* particular produz uma *gene-tree* que pode ou não concordar com a filogenia dos táxons (Avise, 1994; Doyle, 1997; Maddison, 1997). A incongruência entre as *gene-trees* e *species-tree* pode ser esperada sob certas circunstâncias, como: seleção diversificadora, transferência horizontal (incluindo hibridização), *lineage sorting* (coalescência antiga) e duplicação do gene seguido de extinção (Doyle, 1992; Maddison, 1997). Entretanto, cada um deles revelou agrupamentos específicos importantes, como: com o gene 28S foi possível agrupar os gêneros *Anopheles* + *Chagasia* (Anophelinae) e *Aedeomyia* + *Toxorhynchites*;

com o gene ITS2 agrupamos os gêneros *Aedes* + *Psorophora* (Aedini); com os genes arginina-K, enolase, *white* e *hunchback* os táxons *Ochlerotatus* + *Haemagogus* e todos os representantes da tribo Sabethini permaneceram agrupados; com o gene CAD eles também formaram esses agrupamentos, além de *Uranotaenia* + *Culex*; e com o gene catalase os gêneros *Uranotaenia* + *Culex* também ficaram juntos. Isso demonstra a importância de se usar vários genes combinados para recuperar a história evolutiva de um grupo, pois cada um deles pode revelar agrupamentos distintos. Tem sido sugerido que diferentes conjuntos de dados podem ter um sinal filogenético em comum recuperável apenas mediante uma análise em conjunto (Smith, 2000; Lee, 2009); além disso, a combinação de vários genes pode superar o sinal enganoso de um único gene (Wiegmann et al., 2000). Embora a verdadeira história filogenética dos organismos selvagens nunca possa ser totalmente conhecida, sabe-se que diferentes genes e diferentes regiões dentro de um mesmo gene evoluem com taxas distintas, podendo influenciar fortemente as reconstruções (Besansky, Fahey, 1997). Não é recomendado utilizar um único gene para inferir a história do grupo também devido à natureza estocástica da mudança genética, que pode incluir *lineage sorting* incompleto, e por causa dos eventos de seleção natural.

Nas árvores geradas com os genes *hunchback* e *white* o gênero *Toxorhynchites* aparece bem separado dos demais Culicidae. Isso é curioso porque nas classificações mais antigas (Edwards, 1932) esse gênero formava uma nova subfamília dentro de Culicidae: a Toxorhynchitinae, contendo apenas o gênero *Toxorhynchites*. Esse mosquito possui características bem peculiares e diferentes dos demais Culicidae, pois não é hematófago e sua larva é predadora de outras larvas menores (Steffan, Evenhuis, 1985). Apesar disso, vários estudos moleculares recentes suportam fortemente seu lugar dentro de Culicinae (Miller et al., 1997; Harbach, Kitching, 1998; Mitchell et al., 2002), demonstrando que apenas se trata de uma tribo bem especializada que compartilha caracteres com *Aedeomyia* e representantes da tribo Sabethini (Reidenbach et al., 2009).

Quando realizamos análises de ST e SM, utilizando todos os genes, notou-se que os três algoritmos (ML, MP e AB) convergiram para a mesma árvore (Figura 18), sendo que em todas elas: (1) a família Culicidae aparece como grupo monofilético; (2) a subfamília Anophelinae aparece como grupo monofilético e irmão de Culicinae; (3) as tribos Sabethini e Aedini aparecem como agrupamentos

monofiléticos com alto suporte; (4) *Toxorhynchites* + *Aedeomyia*, *Ochlerotatus* + *Haemagogus* e *Uranotaenia* + *Culex* são grupos bem suportados. Esses resultados confirmam as conclusões de Harbach (2007) e Reidenbach et al. (2009) sobre o que já era conhecido a respeito da filogenia dos mosquitos. Estudos envolvendo a subfamília Anophelinae já comprovaram seu caráter monofilético através de características moleculares (Krzywinski et al., 2001a,b) e várias características morfológicas distintas (Sallum et al., 2000). Neste estudo consideramos dois representantes dessa subfamília: *Anopheles* (cosmopolita) e *Chagasia* (Neotropical), que permaneceram juntos em todas as topologias. Outros estudos com caracteres morfológicos e moleculares afirmam que o gênero *Chagasia* é ancestral de todos os outros anofelinos (Foley et al., 1998; Harbach, Kitching, 1999; Sallum et al., 2000, 2002).

O monofiletismo da tribo Sabethini, com seus representantes Neotropicais analisados neste estudo, teve alto suporte em todas as análises, como já observado em outros estudos (Judd, 1996; Harbach, 2000). O gênero *Trichoprosopon* aparece como irmão de *Limatus* + *Sabethes* + *Wyeomyia*, sendo que todas essas relações possuem alto valor de *bootstrap* (MP e ML) ou probabilidade posterior (AB). A tribo Aedini também foi fortemente suportada, sendo que utilizamos os representantes *Psorophora, Aedes, Ochlerotatus* e *Haemagogus*. Ambas as tribos aparentemente surgiram em momentos semelhantes: 115 e 112 milhões de anos atrás, respectivamente (Reidenbach et al., 2009) e foram diversificadas mais recentemente. Isso coincide com o período Cretáceo (145 – 66 milhões de anos atrás) e com o aparecimento das angiospermas, grupo de plantas cujo néctar é explorado como fonte de alimento dos mosquitos (Clements, 1992) e suas partes, quando preenchidas com água da chuva, são os únicos habitats ocupados pelos estágios imaturos de muitos grupos, principalmente da tribo Sabethini (Belkin, 1962; Reidenbach et al., 2009).

Apesar do alto suporte para vários grupos dentro da família Culicidae, as posições dos gêneros *Lutzia* e *Coquillettidia* foram fracamente suportadas pelas análises aqui realizadas. Estudos utilizando o gene ribossomal 18S propuseram *Coquillettidia* como grupo-irmão de *Culex* (Shepard et al., 2006), e outros utilizando genes codificantes de proteínas posicionaram esse gênero mais próximo da tribo Aedini (Reidenbach et al., 2009); entretanto, o suporte para todas essas inferências também foi baixo. Em relação ao gênero *Lutzia*, que aqui aparece como irmão de

Culex + *Uranotaenia*, outros estudos na literatura também discordam sobre sua posição filogenética. Navarro e Liria (2000) analisaram as peças bucais das larvas de sete subgêneros de *Culex* e propuseram que *Lutzia* seria um grupo-irmão mais basal de todos os subgêneros de *Culex*. Entretanto, utilizando marcadores moleculares como os genes CO1 e ITS2, Demari-Silva et al. (2011) e Vesgueiro et al. (2011) não concluíram a posição certa do gênero *Lutzia* entre os demais Culicidae.

Em suma, a utilização de genes nucleares codificantes de proteínas e ribossomais combinados forneceram suportes importantes para definir relações dentro da família Culicidae. Apesar de os nossos dados apresentarem algumas características distintas, como forte viés na composição GC das sequências de alguns gêneros e falta de sinal filogenético robusto em alguns genes (ITS2 e 28S), o resultado final gerou uma topologia bem suportada para a maioria dos grupos, como Anophelinae, tribos Aedini e Sabethini. A história evolutiva dos gêneros dentro de Culicidae recuperada com nossos dados corroborou outros estudos filogenéticos existentes (Harbach, 2007; Reidenbach et al., 2009). Sendo assim, os marcadores moleculares nucleares se mostraram eficientes em recuperar relações filogenéticas mais superiores, como entre gêneros, tribos e subfamílias.

5.3 Genes mitocondriais

O uso de diferentes softwares para montagem dos genomas mitocondriais apresentou diferenças significativas na eficiência, já que o tamanho final das sequências foi diferente (Tabela 9). As montagens realizadas a partir de um genoma de referência foram menos afetadas pelo tipo de algoritmo utilizado, já que todas elas convergiram para o mesmo tamanho. Para o MIRA, uma taxa de cobertura muito alta (acima de 100x) pode ser um problema durante as montagens, já que pode haver formação de quimeras entre os reads ou erros durante o processamento (Chevreux, 2007).

Todos os genomas mitocondriais anotados apresentaram 37 genes funcionais no total, como nos outros Metazoa e espécies de Culicidae já estudados na literatura (Beard et al., 1993; Behura et al., 2011; Krzywinski et al., 2011; Logue et al., 2013). Houve sobreposição desses genes na cadeia H e L da mitocôndria, e a ausência de íntrons comprova que o DNA mitocondrial é bem compacto e funcional

nos insetos. O comprimento total das sequências variou de 14.537pb (*Runchomyia reversa*) até 17.130pb (*Aedes fulvus*), sendo que o comprimento dos genes codificantes de proteínas, rRNAs e tRNAs permaneceram estáveis entre as espécies. Aparentemente, essa tendência é resultante da conservação extrema dos produtos mitocondriais, estabelecida por fortes restrições funcionais (Meyer, 1994). Como a maioria das espécies analisadas aqui nunca havia tido seu DNA mitocondrial sequenciado, não foi possível estabelecer comparações diretas com outros estudos. Entretanto, observamos que o tamanho dos genomas mitocondriais de alguns gêneros encontrados aqui foi semelhante àqueles já existentes na literatura: para *Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus* (Behura et al., 2011), outros gêneros de *Culex* (Demari-Silva et al., 2015) e gêneros de *Anopheles* (Beard et al., 1993; Krzywinski et al., 2011; Oliveira et al., 2016). A região controle rica em A-T foi aquela que mais variou entre as espécies (693pb a 2.234pb), sendo que apresentou o maior comprimento nos gêneros *Aedes* e *Psorophora* (Tabela 10), ambos pertencentes à tribo Aedini. Apesar da grande variação, essa região nos insetos é conhecida por conter sequências regulatórias responsáveis pela replicação e transcrição do genoma mitocondrial (Saito et al., 2005). Também foi calculada a proporção de bases AT no genoma mitocondrial inteiro: os valores apresentaram viés e variaram de 76,5% (*Aedeomyia squamipennis*) a 80,3% (*Limatus flavisetosus*), como observado em outros estudos com Culicidae (Behura et al., 2011; Krzywinski et al., 2011; Demari-Silva et al., 2015).

A ordem gênica da maioria das espécies analisadas aqui foi idêntica e concordou com outros genomas mitocondriais de mosquitos descritos na literatura (Krzywinski et al., 2011; Oliveira et al., 2016). Entretanto, nas espécies pertencentes à tribo Sabethini (*Limatus, Trichoprosopon, Runchomyia, Wyeomyia* e *Sabethes*), houve uma mudança na ordem gênica tradicional e dois RNAs transportadores apareceram em outro lugar do genoma (Figura 20), sugerindo que ocorreu uma translocação desses genes dentro da mitocôndria. Esse fenômeno nunca foi reportado dentro dos Culicidae até o presente momento, e pode ser um evento evolutivo importante que ocorreu no ancestral dos Sabethini há pelo menos 75 milhões de anos atrás (Reidenbach et al., 2009). Sendo assim, esta característica é mais uma autapomorfia do grupo. Há relatos na literatura de eventos de translocação com RNAs transportadores semelhantes a esse apenas em Hexapoda (Nardi et al., 2001). A grande maioria das translocações gênicas encontradas até

agora nas mitocôndrias dos insetos são úteis para reconstruções filogenéticas superiores (Boore et al., 1998; Boore, Brown, 2000), principalmente por seu caráter autapomórfico (Flook et al., 1995). Apesar disso, os resultados aqui encontrados sugerem que a ordem gênica pode ser importante também para definir relações filogenéticas mais baixas, como tribos dentro de uma mesma família.

A diversidade nucleotídica nos genes codificantes de proteínas variou bastante (0,12 a 0,24), sendo que os maiores valores foram reportados para os genes CO1, NAD2 e NAD6 (Tabela 11). Também houve variação na diversidade dentro dos genes individuais, como pode ser observado nas análises de *sliding window scale* (Figura 21). O gene CO1, amplamente empregado em estudos com Culicidae, é considerado um *barcode* universal para a identificação de espécies (Hebert et al., 2003), e isso explica a grande diversidade encontrada entre os gêneros distintos abordados neste estudo. Por outro lado, o significado funcional das mudanças nos genes NAD2 e NAD6 são desconhecidas. Esses genes codificam proteínas importantes da cadeia respiratória, e as subunidades transcritas a partir do genoma mitocondrial estão relacionadas com a bomba de prótons intramembrana (Brandt, 2006; Walker, 1992). Sendo assim, a princípio, as mutações nesse gene poderiam interferir na eficiência da translocação de prótons no processo. O fato dessas substituições serem toleradas indica restrições seletivas “relaxadas” nos sítios específicos das subunidades (Ingman, Gyllensten, 2007).

Os genes ribossomais da mitocôndria apresentaram diversidade nucleotídica baixa comparado aos outros mitocondriais, consistente com os padrões evolutivos de outros organismos (Pabijan et al., 2008; Montooth et al., 2009). Estudos em *Drosophila* (Cook, 2005) e *Anopheles* (Krzywinski et al., 2006) mostraram padrões de seleção negativa nesses genes ribossomais, já que algumas substituições podem alterar sua estrutura secundária. Desse modo, foi possível concluir que os genes ribossomais presentes na mitocôndria talvez não sejam muito informativos para reconstruções filogenéticas dos grupos.

De um modo geral, o genoma mitocondrial dos Culicidae está sujeito a algum tipo de evolução, seja ela mais lenta ou mais rápida. Para inferir se os genes mitocondriais estão sob algum tipo de seleção foi calculada uma média do índice *dN/dS* por gene, que variou de 0,086 (CO1) a 0,561 (ATP8). Isso sugere que existe uma seleção purificadora em curso nos genes codificantes de proteínas, já que todos os valores de *dN/dS* foram menores que 1. Essa razão *dN/dS* menor que 1

significa que as mutações sinônimas são favorecidas em relação às não-sinônimas, já que provavelmente são deletérias e causam sérios danos ao organismo. As taxas de mudança não foram homogêneas entre os genes, sendo que a força de seleção negativa foi mais acentuada nos genes CO1, CO2 e CYTB.

Em relação à taxa de divergência entre as sequências das espécies analisadas, os valores variaram de 6% a 16% (Tabela 12), sendo que as maiores distâncias foram observadas entre os gêneros [*Anopheles* x *Aedeomyia*] e [*Coquillettidia* x *Aedeomyia*]. Entre *Culex pipiens* e *Culex quinquefasciatus* não foram observadas diferenças significativas nas sequências do genoma mitocondrial. Segundo a classificação de Harbach (2007), o gênero *Aedeomyia* constitui sozinho uma tribo separada dos demais Culicidae: a tribo Aedeomyiini. Seu representante Neotropical é a espécie *Aedeomyia squamipennis*, incluída nas análises aqui realizadas. Ela possui várias diferenças morfológicas em relação aos outros mosquitos (Pereira et al., 2017), incluindo escamas brancas, negras e amarelas nas asas e também apresenta a morfologia dos ovos diferenciada (Petersen, Linley, 2014).

As análises filogenéticas utilizando os 13 genes mitocondriais codificantes de proteínas concatenados apresentaram alto suporte para todos os nós (Figura 22). A probabilidade posterior verificada nas análises bayesianas variou entre 0,959 e 1. Os representantes das principais tribos ficaram agrupados: *Coquillettidia* e *Mansonia* (tribo Mansoniini); *Aedes, Haemagogus, Ochlerotatus* e *Psorophora* (tribo Aedini); e *Limatus, Sabethes, Wyeomyia, Runchomyia* e *Trichoprosopon* (tribo Sabethini). A subfamília Anophelinae apareceu como monofilética e grupo-irmão de Culicinae, assim como na topologia construídas com os genes nucleares. A família Culicidae também apareceu como grupo monofilético. Ao contrário da topologia gerada com dados nucleares, esta reconstrução apresentou: o gênero *Aedeomyia* agrupado com *Uranotaenia* ao invés de *Toxorhynchites*; o gênero *Coquillettidia* aparece mais próximo de *Mansonia*, ambos da tribo Mansoniini, e aparecem como grupo-irmão das demais tribos. Além disso, foi possível conhecer a posição filogenética de gêneros que não haviam sido abordados: *Runchomyia* e *Mansonia*. A espécie *Aedes fulvus* parece ser mais próxima de *Haemagogus* do que dos outros *Aedes*. Especificamente a tribo Aedini, que atualmente conta com 1.254 espécies (Mosquito Taxonomic Inventory, 2017), tem sido objeto de vários estudos para desvendar as relações entre seus representantes baseado em caracteres morfológicos de larvas e

adultos (Reinert et al., 2004, 2006, 2008). Embora esses estudos resultem em mudanças profundas dentro da classificação, a resolução filogenética é limitada. Com os resultados dos genomas mitocondriais foi possível perceber que talvez o gênero *Aedes* não seja monofilético, pela posição da espécie *Aedes fulvus*, ou que na verdade a classificação mais correta para esse táxon seja dentro do gênero *Haemagogus*.

Em suma, as topologias geradas com dados nucleares e mitocondriais apresentaram várias congruências e alguns pontos discordantes, especificamente em relação a algum gênero dentro de uma tribo. Padrões conflitantes entre árvores de genes têm sido amplamente reportados na literatura (Maddison, 1997; Nichols, 2001; Degnan, Rosenberg, 2009), e podem ser atribuídos a vários processos biológicos como seleção natural ou deriva genética (Rieseberg et al., 1996). Diferenças no tamanho efetivo populacional e no tempo de fixação do caracter indicam que o *lineage sorting* incompleto seja mais provável de ocorrer em genomas nucleares do que em genomas mitocondriais (Krzywinski et al., 2011), podendo confundir as topologias. Sequências de genomas mitocondriais completos representando gêneros pouco estudados dentro de Culicidae poderão fornecer novas pistas importantes para o entendimento evolutivo da família. Além disso, o DNA mitocondrial apresentou genes muito variáveis que poderão servir como marcadores informativos para outros tipos de estudos em mosquitos, como estruturação populacional e biogeografia (Lorenz et al., 2014; Petersen et al., 2015).

5.4 Espectrometria MALDI-TOF

Nas análises de espectrometria MALDI-TOF, durante a etapa de padronização, foi possível observar que o tipo e o tempo de armazenamento podem alterar significativamente a intensidade dos picos proteicos, tornando a detecção mais complicada. Esses parecem ser os fatores que mais prejudicaram a qualidade do espectro, apesar de não haver mudança qualitativa no perfil proteico em si (Figura 23). O melhor método de armazenamento varia conforme o estudo; Mathis et al. (2015) observou que espécimes de *Phlebotomus perniciosus* mantidos em nitrogênio líquido conservaram melhor seu espectro de massas do que aquelas amostras armazenadas em álcool 70%. Isso pode limitar muito o valor da espectrometria de massas para identificação dos insetos, visto que o álcool 70% é o

método mais amplamente utilizado pelos laboratórios e museus para armazenamento de exemplares. Outro estudo utilizando MALDI-TOF na identificação de pulgas (Sauer et al., 2008) revelou que o armazenamento das amostras em álcool pode alterar e influenciar os espectros comparados com amostras frescas ou congeladas, prejudicando a confiabilidade da identificação. As amostras proteicas armazenadas durante longos períodos de tempo no álcool podem ser precipitadas e diminuir sua solubilidade, o que pode acarretar na perda qualitativa e quantitativa dos espectros de massa (Feltens et al., 2010; Yssoulf et al., 2015). Apesar disso, alguns estudos afirmam que é possível obter perfis confiáveis de amostras armazenadas em álcool (Englard, Seifter, 1990; Zellner et al., 2005). Desse modo, nota-se que não existe na literatura uma padronização dos métodos, o que torna ainda mais difícil utilizar a espectrometria MALDI-TOF como ferramenta de identificação em insetos.

O segundo parâmetro crucial que deve ser levado em consideração é a escolha das partes anatômicas do inseto que serão utilizadas para análises MALDI-TOF. Os resultados aqui apresentados demonstraram que utilizar uma fêmea alimentada, com o abdômen repleto de sangue, pode influenciar drasticamente o perfil proteico da amostra. Ao contrário da biologia molecular, onde o genoma é o mesmo em todas as células, o repertório proteico dos artrópodes varia muito de acordo com a estrutura corporal (Hoppenheit et al., 2013; Yssoulf et al., 2015). Embora estudos pioneiros tenham utilizado o corpo inteiro do inseto, com os achados deste trabalho e de outros na literatura (Kaufmann et al., 2011; Müller et al., 2013; Dvorak et al., 2014), recomenda-se excluir o abdômen das análises, principalmente pela influência do conteúdo estomacal e intestinal que podem variar bastante de acordo com a dieta de cada indivíduo. Entretanto, quando as análises de MALDI-TOF são realizadas no estágio larval dos mosquitos, a reprodutibilidade é maior utilizando o abdômen comparado ao uso do tórax e cabeça (Dieme et al., 2014). Apesar disso, nesse estudo específico de Dieme et al. (2014), o perfil proteico dos abdomens de *Ae. albopictus* e *An. gambiae* foi altamente distinto, apesar da mesma dieta.

A espectrometria MALDI-TOF foi usada primeiramente para identificar colônias de bactérias (Volz et al., 1999), e uma das preocupações em utilizá-la para organismos multicelulares superiores foi justamente a complexidade e a variação existente entre os indivíduos da mesma espécie. As fontes potenciais dessas

variações podem incluir mudanças no desenvolvimento, organismos comensais ou patógenos presentes no corpo de inseto, dieta e diferenças sexo-específicas. Essa última parece ser menos provável, já que foram testados indivíduos machos e fêmeas neste trabalho e ambos produziram basicamente o mesmo espectro (Figura 23).

Essa técnica detecta principalmente as proteínas e peptídeos com baixo peso molecular, variando de 2 a 20 kDa (Sandrin et al., 2013). Isso está de acordo com os resultados aqui apresentados, já que foram detectados 24 biomarcadores com peso molecular entre 5 e 14 kDa, sendo que cada uma das dez espécies analisadas apresentou um perfil de biomarcadores específico. O conjunto completo de proteínas não pode ser detectado por MALDI-TOF devido a várias razões: (1) o uso de agentes como a ureia durante a extração proteica não garante a solubilização de todas as proteínas presentes; especialmente em insetos, tem sido demonstrado que proteínas relacionadas à quitina podem ser resistentes à extração por métodos convencionais (Tellam et al., 1999; Campbell et al., 2008); (2) devido à seletividade no processo de ionização e aos limites dos detectores de íons, a técnica MALDI-TOF favorece principalmente proteínas menores que 20 kDa, com certa dependência da matriz que está sendo usada (Hortin, 2006); (3) ele possui uma sensibilidade limitada já que detecta apenas as proteínas mais abundantes presentes no organismo (Tyers, 2003; Feltens et al., 2010). Outra fraqueza dessa técnica é que seu algoritmo não leva em consideração a intensidade dos picos; ao invés disso ele transforma os dados de perfil proteico numa matriz binária (presença-ausência). Isso pode resultar na subestimação dos picos mais proeminentes que representam as proteínas mais abundantes dentro do espectro (Feltens et al., 2010). Além disso, há sempre a possibilidade de que as proteínas menores detectadas no espectro na verdade sejam resultado da degradação de proteínas maiores, principalmente no caso de espécimes mal preservados. Sendo assim, em alguns casos, é recomendável utilizar proteínas maiores abundantemente expressas como biomarcadores confiáveis na identificação das espécies (Warscheid et al., 2003).

Em relação ao fenograma construído com os dados dos biomarcadores de cada espécie, não houve correlação com a filogenia dos grupos. As espécies *Anopheles cruzii* e *Anopheles oswaldoi* não se agruparam na mesma região do dendrograma, assim como *Psorophora cingulata* e *Psorophora ferox* ficaram em ramos distantes. Esses resultados indicam que o perfil proteico total das espécies

não parece ser apropriado para recuperar a história evolutiva da família Culicidae, como observado também em outros estudos (Karger et al., 2012; Yssoulf et al., 2013; Dieme et al., 2014). Alguns trabalhos demonstram que a topologia do dendrograma construído com dados de MALDI-TOF na realidade pode refletir as condições de armazenagem dos espécimes ao invés de suas similaridades fenotípicas (Mathis et al., 2015). Apesar disso, outros autores demonstraram ser possível inferir relações filogenéticas usando perfis proteicos em outros insetos, como *Drosophila* (Feltens et al., 2010), *Culicoides* (Kaufmann et al., 2011) e carrapatos (Karger et al., 2012). Entretanto, esses autores utilizaram espécimes provenientes de colônias de laboratórios (exemplar fresco, mesma dieta, etc), sem levar em consideração as variações que podem existir nos espécimes coletados em campo. Sendo assim, recomenda-se cautela para não superestimar os resultados dessas análises utilizando espectros apenas de indivíduos de colônias (Mathis et al., 2015).

Em suma, pode haver muitas razões – biológicas ou técnicas – pelas quais a espectrometria MALDI-TOF não se mostrou uma ferramenta útil para inferir a história evolutiva da família Culicidae. As condições de armazenamento e as estruturas corporais do inseto são fatores importantes que devem ser considerados na realização dessas análises. Apesar disso, os 24 biomarcadores moleculares aqui encontrados poderão servir como marcadores taxonômicos, já que todas as dez espécies analisadas apresentaram perfil proteico único. Isso pode ser resultado de genes diferencialmente expressos devido à evolução particular de cada grupo, ou até mesmo devido ao estado fisiológico do mosquito (Das et al., 2010; Félix et al., 2010). É necessário desenvolver uma padronização na metodologia MALDI-TOF que possa ser utilizado tanto em exemplares de colônias quanto naqueles coletados em campo.

5.5 Comparação entre os Métodos: Asa X DNA X MALDI-TOF

As três abordagens diferentes aqui propostas não foram concordantes e revelaram histórias distintas para a família Culicidae. Comparando os componentes principais de forma alar e a topologia feita com genes nucleares (Figura 29) ou mitocondriais (Figura 30), observamos pouca congruência entre os marcadores já que a topologia aparece distorcida no morfoespaço. Essa falta de sincronia pode

estar ocorrendo devido a (a) taxas evolutivas distintas entre os marcadores moleculares e morfológicos; (b) a asa pode estar sob seleção positiva ou (c) canalização. É possível observar que há muita variação no formato alar em Culicidae, e fica evidente quando fazemos a sobreposição do formato alar ancestral (*Anopheles*) com os outros grupos. O *landmark* #1 é nitidamente o mais variável, sendo uma característica importante para distinguir os gêneros. Apesar das diferenças bem evidentes no formato alar das espécies, o padrão geral de venação alar é comum a toda família Culicidae (Wooton, 1992; Stark et al., 1999). A forma de um modo geral parece ser altamente conservada e possui uma "limitação filogenética" (Gilchrist, Partridge, 2001) para mudanças muito drásticas, isto é, a própria arquitetura gênica das espécies restringe as variações no formato alar.

Quando comparamos o fenograma construído com as distâncias de Procrustes com a topologia genética, apenas os gêneros *Limatus*, *Wyeomyia* e *Sabethes* (tribo Sabethini) aparecem agrupados em ambas. Apenas neste caso, a forma da asa parece ter algum sinal filogenético, assim como visto em outros grupos (David, Laurin, 1996; Lockwood et al., 2004). Existem estudos na literatura que mostram ser possível associar a história evolutiva de um grupo ao formato de suas estruturas corpóreas. Houle et al. (2003) analisou espécies de *Drosophila* e gêneros próximos, encontrando resultados congruentes entre o formato da asa e genes específicos. Entretanto, nos resultados aqui obtidos observa-se pouca compatibilidade entre as duas topologias, já que apenas a tribo Sabethini aparece unida em ambas abordagens. Outros autores também revelaram incongruências parciais ou completas entre fenogramas morfométricos e filogenias moleculares (Courant et al., 1997; Marcus et al., 2000; Pretorius, Scholtz, 2001; Cole et al., 2002; Milne, O'Higgins, 2002; Cardini, 2003; Guill et al., 2003; Cardini, Elton, 2008; Panchetti et al., 2008). Essa divergência entre as árvores pode estar ocorrendo porque as taxas evolutivas dos genes analisados e das asas são diferentes, ou seja, esses marcadores estão evoluindo em velocidades distintas e por isso não revelam o mesmo padrão no cladograma. Mesmo utilizando todos os genes disponíveis no GenBank e todo o genoma mitocondrial, as topologias genéticas e morfológicas não foram convergentes.

Em relação à espectrometria MALDI-TOF, os dados de perfil proteico de cada espécie não seguiram padrões conhecidos, seja de forma alar ou genético, sendo que espécies próximas dentro de um mesmo gênero, como *Anopheles cruzii* e

Anopheles oswaldoi, ficaram bem distantes na topologia construída. As proteínas também parecem evoluir de um modo diferente, não relacionado aos demais marcadores analisados. Trata-se de fenótipos com muitas modificações pós-traducionais que podem desfazer ou confundir o sinal filogenético, se ele existir. Os dados de MALDI-TOF não foram adicionados à matriz juntamente com as sequências genéticas porque apresentaram pouca congruência e seguiram padrões desconhecidos para revelar a história dos grupos; poderiam causar mais ruído nas análises. Ainda assim, espera-se que os perfis descobertos aqui possam ser usados como marcadores taxonômicos para essas espécies, já que cada uma apresentou biomarcadores específicos.

6 CONCLUSÕES

¬ As análises filogenéticas de ML, MP e AB utilizando oito genes nucleares convergiram para a mesma árvore, revelando o monofiletismo da família Culicidae e da tribo Sabethini;

¬ A topologia de arvore filogenética construída com dados nucleares corroborou a literatura mais recente, e continua se mostrando ineficiente para resolver algumas relações dentro de Culicidae;

¬ A topologia de arvore filogenética construída com dados mitocondriais revelou grupos bem suportados, sendo que alguns foram discordantes da filogenia atual da família;

¬ O formato alar mostrou-se um bom marcador taxonômico, já que as análises em cada tribo, gênero ou subgênero foram capazes de revelar agrupamentos naturais;

¬ Para os Culicidae, o formato alar de um modo geral parece não apresentar sinal filogenético congruente com as topologias genéticas, devendo ser usado com cautela para inferir a evolução dos grupos;

¬ A magnitude da divergência morfológica parece seguir um padrão hierárquico, onde: subfamília > tribo > gênero > subgênero > espécie > população;

¬ O *landmark* #1, situado entre as veias R1 e RS do rádio setorial da asa, foi o mais variável entre todos os grupos de Culicidae;

¬ Existe um forte viés A-T nos genomas mitocondriais de Culicidae;

¬ Os genomas mitocondriais em geral seguiram a mesma ordem gênica, exceto nos representantes da tribo Sabethini, onde houve uma translocação de dois RNAs transportadores. Esse fato é inédito entre os culicídeos;

¬ Os genes CO1, NAD2 e NAD6 apresentaram alta diversidade nucleotídica, podendo ser empregados como marcadores informativos;

¬ A razão entre mutações não-sinônimas e sinônimas revelou que o genoma mitocondrial dos Culicidae está sob forte seleção purificadora;

¬ Os gêneros da tribo Sabethini formaram um agrupamento único tanto nas análises genéticas quanto morfológicas, além de apresentarem autapomorfias como translocação de genes mitocondriais;

¬ Foram identificados 24 biomarcadores com significado taxonômico ou de diagnose específica utilizando espectrometria MALDI-TOF nas espécies analisadas;

¬ Os perfis proteicos identificados por espectrometria MALDI-TOF não mostraram congruência com outros marcadores, mas podem ter potencial na identificação taxonômica das espécies;

¬ A morfologia, a genética e os perfis proteicos não foram concordantes, possivelmente devido a (a) taxas evolutivas distintas entre eles, (b) algum marcador utilizado estar possivelmente sob seleção positiva ou (c) canalização genética ou morfológica;

REFERÊNCIAS*

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, George RA. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. 2000; 287(5): 2185-95.

Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.

Avise JC, Moritz C. Molecular Markers Natural History and Evolution. Trends in Ecology and Evolution. 1994; 9(12): 499-499.

Beard CB, Hamm D, Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito Anopheles gambiae: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. Insect Molecular Biology. 1993; 2(2): 103-24.

Behura SK, Lobo NF, Haas B, Lovin DD, Shumway MF, Puiu D, Severson DW. Complete sequences of mitochondria genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2011; 41(10): 770-7.

Belkin JN. The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae), Vol. 2. The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). 1962.

Belshaw R, Quicke DL. Robustness of ancestral state estimates: evolution of life history strategy in ichneumonoid parasitoids. Systematic Biology. 2002; 51(3): 450-77.

Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritzsch G, Stadler PF. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. Molecular phylogenetics and evolution. 2013; 69(2): 313-9.

Bertone MA, Courtney GW, Wiegmann BM. Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta: Diptera) based on multiple nuclear genes. Systematic Entomology. 2008; 33(4): 668-87.

Besansky NJ, Lehmann T, Fahey GT, Fontenille D, Braack LE, Hawley WA, Collins FH. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, Anopheles gambiae and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. Genetics. 1997; 147(4): 1817-28.

---

* 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.

Birdsell JA. Integrating genomics, bioinformatics, and classical genetics to study the effects of recombination on genome evolution. Molecular Biology and Evolution. 2002; 19(7): 1181-97.

Bitner-Mathé BC, Klaczko LB. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. Heredity. 1999; *83*(6): 688-96.

Bodmer M, Ashburner M. Conservation and change in the DNA sequences coding for alcohol dehydrogenase in sibling species of *Drosophila*. Nature. 1984; 309: 425-30.

Boore JL, Brown WM. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. Current Opinion in Genetics & Development. 1998; 8(6): 668-74.

Boore JL, Brown WM. Mitochondrial genomes of Galathealinum, Helobdella, and Platynereis: sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa. Molecular Biology and Evolution. 2000; 17(1): 87-106.

Borkent A. A world catalogue of fossil and extant Corethrellidae and Chaoboridae (Diptera), with a listing of references to keys, bionomic information and descriptions of each known life stage. Insect Systematics & Evolution. 1993; 24(1): 1-24.

Brandt U. Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I). Annu. Rev. Biochem. 2006; 75: 69-92.

Breuker CJ, Debat V, Klingenberg CP. Functional evo-devo. Trends in Ecology & Evolution. 2006; 21(9): 488-92.

Brogdon WG. Measurement of flight tone differences between female *Aedes aegypti* and *A. albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 1994; 31(5): 700-3.

Brower AV, Desalle R. Practical and theoretical considerations for choice of a DNA sequence region in insect molecular systematics, with a short review of published studies using nuclear gene regions. Annals of the Entomological Society of America. 1994; 87(6): 702-16.

Calle L, David A, Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo O. Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002; 97(8): 1191-5.

Cameron SL, Miller KB, D'Haese CA, Whiting MF, Barker SC. Mitochondrial genome data alone are not enough to unambiguously resolve the relationships of Entognatha, Insecta and Crustacea sensu lato (Arthropoda). Cladistics. 2004; 20(6): 534-57.

Cameron SL, Lambkin CL, Barker SC, Whiting MF. A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. Systematic Entomology. 2007; 32(1): 40-59.

Cameron SL, Dowton M, Castro LR, Ruberu K, Whiting MF, Austin AD, Stevens J. Mitochondrial genome organization and phylogeny of two vespid wasps. Genome. 2008; 51(10): 800-8.

Cameron SL, Lo N, Bourguignon T, Svenson GJ, Evans TA. A mitochondrial genome phylogeny of termites (Blattodea: Termitoidae): robust support for interfamilial relationships and molecular synapomorphies define major clades. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2005; 65(1): 163-73.

Campbell PM. Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. Systematic Entomology. 2012; 30(2): 186-90.

Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM. GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. Bioinformatics. 2008; 24(9): 1214-6.

Cardini A. The geometry of the marmot (Rodentia: Sciuridae) mandible: phylogeny and patterns of morphological evolution. Systematic Biology. 2003; 52(2): 186-205.

Cardini A, Elton S. Does the skull carry a phylogenetic signal? Evolution and modularity in the guenons. Biological Journal of the Linnean Society. 2008; 93(4): 813-34.

Carpenter S, Mellor PS, Torr SJ. Control techniques for Culicoides biting midges and their application in the U.K. and northwestern Palaearctic. Medical and Veterinary Entomology. 2008; 22: 175–87.

Caterino MS, Cho S, Sperling FA. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annual Review of Entomology. 2000; 45(1): 1-54.

Cator LJ, Ng'Habi KR, Hoy RR, Harrington LC. Sizing up a mate: variation in production and response to acoustic signals in *Anopheles gambiae*. Behavioral Ecology. 2010; 5: 7-13.

Chevreux B. MIRA: an automated genome and EST assembler. 2017.

Clements AN. The biology of mosquitoes - Transmission of viruses and interactions with bacteria (Vol. 3). 1993.

Cole TM, Lele S, Richtsmeier. A parametric bootstrap approach to the detection of phylogenetic signals in landmarks data. Capítulo 6. Kansas City: School of Medicine, University of Missouri-Kansas City. 2002.

Collucci E, Sallum MAM. Cladistic analysis of the subgenus *Anopheles* (*Anopheles*) *Meigen* (Diptera: Culicidae) based on morphological characters. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2007; 102(3): 277-92.

Cook CE. The complete mitochondrial genome of the stomatopod crustacean *Squilla mantis*. BMC genomics. 2005; 6(1): 105.

Courant F, David B, Laurin B, Chaline J. Quantification of cranial convergences in arvicolids (Rodentia). Biological Journal of the Linnean Society. 1997; 62(4): 505-17.

Danforth BN, Lin CP, Fang J. How do insect nuclear ribosomal genes compare to protein-coding genes in phylogenetic utility and nucleotide substitution patterns?. Systematic Entomology. 2005; 30(4): 549-62.

Das S, Radtke A, Choi YJ, Mendes AM, Valenzuela JG, Dimopoulos G. Transcriptomic and functional analysis of the *Anopheles gambiae* salivary gland in relation to blood feeding. BMC genomics. 2010; 11(1): 566.

David B, Laurin B. Morphometrics and cladistics: measuring phylogeny in the sea urchin Echinocardium. Evolution. 1996; 5: 348-59.

Debat V, David P. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. Trends in Ecology & Evolution. 2001; 16(10): 555-61.

Degnan JH, Rosenberg NA. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. Trends in Ecology & Evolution. 2009; 24(6): 332-40.

Demari-Silva B, Vesgueiro FT, Sallum MAM, Marrelli MT. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. Journal of Medical Entomology. 2011; 48(2): 272-9.

Demari-Silva B, Foster PG, de Oliveira TM, Bergo ES, Sanabani SS, Pessôa R, Sallum MAM. Mitochondrial genomes and comparative analyses of *Culex camposi, Culex coronator, Culex usquatus* and *Culex usquatissimus* (Diptera: Culicidae), members of the coronator group. BMC Genomics. 2015; 16(1): 831.

Dieme C, Yssouf A, Vega-Rúa A, Berenger JM, Failloux AB, Raoult D, Almeras L. Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. Parasites & Vectors. 2014; 7(1): 544.

Dietrich CH, Rakitov RA, Holmes JL, Black WC. Phylogeny of the major lineages of Membracoidea (Insecta: Hemiptera: Cicadomorpha) based on 28S rDNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2001; 18(2): 293-305.

Dowton M, Cameron SL, Dowavic JI, Austin AD, Whiting MF. Characterization of 67 mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. Molecular Biology and Evolution. 2009; 26(7): 1607-17.

Doyle JJ. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. Systematic Botany. 1992; 144-63.

Doyle JJ. Trees within trees: genes and species, molecules and morphology. Systematic Biology. 1997; 46(3): 537-53.

Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infection, Genetics and Evolution. 2008; 8(6): 875-90.

Dvorak V, Halada P, Hlavackova K, Dokianakis E, Antoniou M, Volf P. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Parasites & Vectors. 2014; 7(1): 21.

Edwards FW. Diptera. Fam. Culicidae. Gen. Ins., 194. 1932.

Englard S, Seifter S. Precipitation techniques. Methods in enzymology. 1990; 182: 285-300.

Félix RC, Müller P, Ribeiro V, Ranson H, Silveira H. *Plasmodium* infection alters *Anopheles gambiae* detoxification gene expression. BMC Genomics. 2010; 11(1): 312.

Felsenstein J. PHYLIP (phylogeny inference package) Department of Genetics. University of Washington, Seattle. 1995.

Feltens R, Görner R, Kalkhof S, Gröger-Arndt H, von Bergen M. Discrimination of different species from the genus *Drosophila* by intact protein profiling using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. BMC Evolutionary Biology. 2010; 10(1): 85-95.

Fenn JD, Song H, Cameron SL, Whiting MF. A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera (Insecta) and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2008; 49(1): 59-68.

Flook PK, Rowell CHF, Gellissen G. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. Journal of Molecular Evolution. 1995; 41(6): 928-41.

Foley DH, Bryan JH, Yeates D, Saul A. Evolution and Systematics of *Anopheles*: Insights from a Molecular Phylogeny of Australasian Mosquitoes. Molecular phylogenetics and Evolution. 1998; 9(2): 262-75.

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

GenBank - http://www.ncbi.nlm.nih.gov – [acesso em Jan/2017]

Gibson G, Wagner G. Canalization in evolutionary genetics: a stabilizing theory? BioEssays. 2000; 22(4): 372-80.

Gilchrist AS, Partridge L. The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. Heredity. 2001; 86(2): 144-52.

Giribet G, Edgecombe GD, Wheeler WC. Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. Nature. 2001; 413(6): 157.

Goloboff P, Farris S, Nixon K. TNT (Tree analysis using New Technology). 2000.

Gómez G, Jaramillo L, Correa MM. Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the *Albitarsis* Complex from Colombia. Molecular Ecology Resources. 2013; 13(6): 1082-92.

Gómez GF, Márquez EJ, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM. Geometric morphometric analysis of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) reveals significant effect of environmental factors on wing traits and presence of a metapopulation. Acta Tropica. 2014; 135: 75-85.

Guerrero JA, De Luna E, Sanchéz-Hernandez COR. Morphometrics in the quantification of character state identity for the assessment of primary homology: an analysis of character variation of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). Biological Journal of the Linnean Society. 2003; 80(1): 45-55.

Guill JM, Heins DC, Hood CS. The effect of phylogeny on interspecific body shape variation in darters (Pisces: Percidae). Systematic Biology. 2003; 52(4): 488-500.

Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa. 2007; 1668(1): 538-91.

Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). Systematic Entomology. 1998; 23(4): 327-70.

Harbach, RE, Kitching IJ. Phylogeny of the pyretophorus series of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). Systematic Entomology. 1999; 24(2): 193-205.

Harbach RE, Kitching IJ. Reconsideration of anopheline mosquito phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. Systematics and Biodiversity. 2005; 3(4): 345-74.

Harbach RE, Peyton EL. Systematics of *Onirion*, a new genus of Sabethini (Diptera: Culicidae) from the Neotropical Region. Bulletin of Natural History Museum Entomology Series. 2000; 69(2): 115-70.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 2003; 270(12): 313-21.

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

Hickson RE, Simon C, Perrey SW. The performance of several multiple-sequence alignment programs in relation to secondary-structure features for an rRNA sequence. Molecular Biology and Evolution. 2000; 17(4): 530-9.

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology. 1991; 66(4): 411-53.

Hoffmann AA, Shirriffs J. Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata.* Evolution. 2002; 56(5): 1068-73.

Hoppenheit A, Murugaiyan J, Bauer B, Steuber S, Clausen PH, Roesler U. Identification of Tsetse (*Glossina* spp.) using matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(7): 2305.

Hortin GL. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. Clinical Chemistry. 2006; 52(7): 1223-37.

Houle D, Mezey J, Galpern P, Carter A. Automated measurement of *Drosophila* wings. BMC Evolutionary Biology. 2003; 3(1): 25.

Hu S. Akaike Information Criterion. Center for Research in Computation. 2007.

Hua J, Li M, Dong P, Cui Y, Xie Q, Bu W. Comparative and phylogenomic studies on the mitochondrial genomes of Pentatomomorpha (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). BMC Genomics. 2008; 9(1): 610.

Hua J, Li M, Dong P, Cui Y, Xie Q, Bu W. Phylogenetic analysis of the true water bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha): evidence from mitochondrial genomes. BMC Evolutionary Biology. 2009; 9(1): 134.

Hurst GD, Jiggins FM. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 2005. 272(15), 1525-34.

Hwang UW, Park CJ, Yong TS, Kim W. One-step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2001; 19(3): 345-52.

Ingman M, Gyllensten U. Rate variation between mitochondrial domains and adaptive evolution in humans. Human Molecular Genetics. 2007; 16(19): 2281-7.

Iriarte PF, Céspedes W, Santos M. Quantitative-genetic analysis of wing form and bilateral asymmetry in isochromosomal lines of *Drosophila subobscura* using Procrustes methods. Journal of Genetics. 2003; 82(3): 95-113.

Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrungkiat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, Dujardin JP. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti.* Tropical Medicine & International Health. 2007; 12(11): 1354-60.

Judd D. Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). Systematic Entomology. 1996; 21(2): 129-50.

Karger A, Stock R, Ziller M, Elschner MC, Bettin B, Melzer F, Tomaso H. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric typing. BMC Microbiology. 2012; 12(1): 229.

Kaufmann C, Ziegler D, Schaffner F, Carpenter S, Pflüger V, Mathis A. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. Medical and Veterinary Entomology. 2011; 25(1): 32-8.

Kim MJ, Kang AR, Jeong HC, Kim KG, Kim I. Reconstructing intraordinal relationships in Lepidoptera using mitochondrial genome data with the description of two newly sequenced lycaenids, *Spindasis takanonis* and *Protantigius superans* (Lepidoptera: Lycaenidae). Molecular Phylogenetics and Evolution. 2011; 61(2): 436-45.

Kjer KM, Blahnik RJ, Holzenthal RW. Phylogeny of Trichoptera (caddisflies): characterization of signal and noise within multiple datasets. Systematic Biology. 2001; 50(6): 781-816.

Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Molecular Ecology Resources. 2011; 11(2): 353-7.

Komoto N, Yukuhiro K, Ueda K, Tomita S. Exploring the molecular phylogeny of phasmids with whole mitochondrial genome sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2011; 58(1): 43-52.

Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ. Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and the weight of evidence. Systematic Biology. 2001; 3: 540-56.

Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2001; 18(3): 479-87.

Krzywinski J, Grushko OG, Besansky NJ. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: an improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2006; 39(2): 417-23.

Krzywinski J, Li C, Morris M, Conn JE, Lima JB, Povoa MM, Wilkerson RC. Analysis of the evolutionary forces shaping mitochondrial genomes of a Neotropical malaria vector complex. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2011; 58(3): 469-77.

Lanfear R, Calcott B, Ho SY, Guindon S. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Molecular Biology and Evolution. 2012; 29(6): 1695-1701.

Lee MSY. Hidden support from unpromising data sets strongly unites snakes with anguimorph ‘lizards’. Journal of Evolutionary Biology. 2009; 22(6): 1308-16.

Lin CP, Danforth BN. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2004; 30(3): 686-702.

Linares AR, Hancock JM, Dover GA. Secondary structure constraints on the evolution of Drosophila 28 S ribosomal RNA expansion segments. Journal of Molecular Biology. 1991; 219(3): 381-90.

Lockhart PJ, Howe CJ, Bryant DA, Beanland TJ, Larkum AWD. Substitutional bias confounds inference of cyanelle origins from sequence data. Journal of Molecular Evolution. 1992; 34(2): 153-62.

Lockwood CA, Lynch JM, Kimbel WH. Quantifying temporal bone morphology of great apes and humans: an approach using geometric morphometrics. Journal of Anatomy. 2002; 201(6): 447-64.

Logue K, Chan ER, Phipps T, Small ST, Reimer L, Henry-Halldin C, Serre D. Mitochondrial genome sequences reveal deep divergences among *Anopheles punctulatus* sibling species in Papua New Guinea. Malaria Journal. 2013; 12(1): 64.

Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii, An. homunculus* and *An. bellator*. Parasites & Vectors. 2012; 5(1), 257.

Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). Parasites & Vectors. 2014; 7(1): 581.

Lorenz C, Patané JS, Suesdek L. Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*. Infection, Genetics and Evolution. 2015; 35: 144-52.

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.

MacLeod N, Forey PL. Phylogenetic signals in morphometric data. Morphology, shape and phylogeny. 2002; 100: 138.

Maddison WP. Gene trees in species trees. Systematic Biology. 1997; 46(3): 523-36.

Marcus L, Hingst-Zaher E, Zaher H. Application of landmark morphometrics to skulls representing the orders of living mammals. Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy. 2000; 11(1): 34.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Dewell SB. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature. 2005; 437(7): 376-80.

Mathis A, Depaquit J, Dvořák V, Tuten H, Bañuls AL, Halada P, Volf P. Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems. Parasites & Vectors. 2015; 8(1): 266.

Meiswinkel R, Baldet T, De Deken R, Takken W, Delécolle JC, Mellor PS. The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe — the entomological perspective. Preventive Veterinary Medicine. 2008; 87(1): 55-63.

Meyer A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. Trends in Ecology & Evolution. 1994; 9(8): 278-80.

Minh BQ, Nguyen MAT, von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular biology and evolution*. 2013. 4: 25.

Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogenetic relationships of the Culicomorpha inferred from 18S and 5.8 S ribosomal DNA sequences (Diptera: Nematocera). Insect Molecular Biology. 1997; 6(2): 105-14.

Milne I, Bayer M, Cardle L, Shaw P, Stephen G, Wright F, Marshall D. Tablet—next generation sequence assembly visualization. Bioinformatics. 2010; 26(3): 401-2.

Milne N, O'Higgins P. Inter-specific variation in *Macropus* crania: form, function and phylogeny. Journal of Zoology. 2002; 256(4): 523-35.

Mitchell A, Sperling FA, Hickey DA. Higher-level phylogeny of mosquitoes (Diptera: Culicidae): mtDNA data support a derived placement for *Toxorhynchites*. Insect Systematics & Evolution. 2002; 33(2): 163-74.

Monteiro LR, Reis SFD. Princípios de Morfometria Geométrica. Holos. 1999.

Montooth KL, Abt DN, Hofmann JW, Rand DM. Comparative genomics of *Drosophila* mtDNA: novel features of conservation and change across functional domains and lineages. Journal of Molecular Evolution. 2009; 69(1): 94.

Moore WS. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. Evolution. 1995; 718-26.

Morais SA, Almeida FD, Suesdek L, Marrelli MT. Low genetic diversity in Wolbachia-infected Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2012; 54(6): 325-9.

Mosquito Taxonomic Inventory, 2017 - http://mosquito-taxonomic-inventory.info/ [acesso em Jan/2017]

Müller P, Pflüger V, Wittwer M, Ziegler D, Chandre F, Simard F, Lengeler C. Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. PLoS One. 2013; 8(2): 86.

Nardi F, Carapelli A, Fanciulli PP, Dallai R, Frati F. The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetrodontophora bielanensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations. Molecular Biology and Evolution. 2001; 18(7): 1293-1304.

Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. Insect Molecular Biology. 2003; 12(6): 605-11.

Navarro JC, Liria J. Phylogenetic relationships among eighteen Neotropical Culicini species. Journal of American Mosquito Control Association. 2000; 16(2): 75-85.

Nichols R. Gene trees and species trees are not the same. Trends in Ecology & Evolution. 2001; 16(7): 358-64.

Oliveira TMP, Foster PG, Bergo ES, Nagaki SS, Sanabani SS, Marinotti O, Sallum MAM. Mitochondrial Genomes of *Anopheles* (*Kerteszia*)(Diptera: Culicidae) From the Atlantic Forest, Brazil. Journal of medical entomology. 2016; 1:1-8

Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. The FASEB Journal, 1993; 7(1): 113-23.

Pabijan M, Spolsky C, Uzzell T, Szymura JM. Comparative analysis of mitochondrial genomes in *Bombina* (Anura; Bombinatoridae). Journal of Molecular Evolution. 2008; 67(3), 246-56.

Page RD. GeneTree: comparing gene and species phylogenies using reconciled trees. Bioinformatics. 1998; 14(9): 819-20.

Panchetti F, Scalici M, Carpaneto GM, Gibertini G. Shape and size variations in the cranium of elephant-shrews: a morphometric contribution to a phylogenetic debate. Zoomorphology. 2008; 127(2): 69-82.

Patterson JS, Klingenberg CP. Developmental buffering: how many genes?. Evolution and Development. 2007; 9(6): 525-6.

Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY. IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. Bioinformatics. 2012; 28(11): 1420-8.

Pereira ACN, Pereira Filho AA, Brito GA, Brito GA, Moraes JL, Rebêlo JM. First record of *Aedeomyia squamipennis* (Lynch Arribálzaga, 1878)(Diptera: Culicidae) in the state of Maranhão: epidemiological implications and distribution in Brazil. Check List. 2017; 13(2): 2084.

Perera MR, Vargas RDF, Jones MG. Identification of aphid species using protein profiling and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Entomologia experimentalis et applicata. 2005; 117(3): 243-7.

Petersen V, Devicari M, Suesdek L. High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses. Parasites & Vectors. 2015; 8(1): 128.

Petersen JL, Linley JR. Description of the egg of *Aedeomyia squamipennis* (Diptera: Culicidae). Journal of medical entomology. 1995; 32(6): 888-94.

Pretorius E, Scholtz CH. Geometric morphometrics and the analysis of higher taxa: a case study based on the metendosternite of the Scarabaeoidea (Coleoptera). Biological Journal of the Linnean Society. 2001; 74(1): 35-50.

PubMed – http://www.ncbi.nlm.nih.gov - [acesso em Out/2016]

Rannala B, Yang Z. Phylogenetic inference using whole genomes. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2008; 9: 217-31.

Regier JC, Fang QQ, Mitter C, Peigler RS, Friedlander TP, Solis MA. Evolution and phylogenetic utility of the period gene in Lepidoptera. Molecular Biology and Evolution. 1998; 15(9): 1172-82.

Reidenbach KR, Cook S, Bertone MA, Harbach RE, Wiegmann BM, Besansky NJ. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. BMC Evolutionary Biology. 2009; 9(1): 298.

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. Zoological Journal of the Linnean Society. 2004; 142(3): 289-368.

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of *Finlaya* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. Zoological Journal of the Linnean Society. 2006; 148(1): 1-101.

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of *Ochlerotatus* and allied taxa (Diptera: Culicidae: Aedini) based on morphological data from all life stages. Zoological Journal of the Linnean Society. 2008; 153(1): 29-114.

Rieseberg LH, Whitton J, Linder CR. Molecular marker incongruence in plant hybrid zones and phylogenetic trees. Acta Botanica Neerlandica. 1996; 45(3): 243-62.

Mousseau TA, Roff DA. Natural selection and the heritability of fitness components. Heredity. 1987; 59(2): 181-97.

Rohlf FJ. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito. Contributions to Morphometrics. 1993; 8: 131-60.

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; 2003a.

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

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

Rokas A, Holland PW. Rare genomic changes as a tool for phylogenetics. Trends in Ecology & Evolution. 2000; 15(11): 454-9.

Ross P, Hall L, Smirnov I, Haff L. High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. Nature Biotechnology. 1999; 16(13): 1347-51.

Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G, Reyes A. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. Gene. 1999; 238(1): 195-209.

Saito S, Tamura K, Aotsuka T. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. Genetics. 2005; 171(4): 1695-705.

Sallum MAM, Schultz TR, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera Culicidae) based on morphological characters. Annals of the Entomological Society of America. 2000; 93(4): 745-75.

Sallum MAM, Schultz TR, Foster PG, Aronstein K, Wirtz RA, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. Systematic Entomology. 2002; 27(3): 361-82.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 2). Cold spring harbor laboratory press. 1989.

Sandrin TR, Goldstein JE, Schumaker S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. Mass spectrometry reviews. 2013; 32(3): 188-217.

Sankoff D, Leduc G, Antoine N, Paquin B, Lang BF, Cedergren R. Gene order comparisons for phylogenetic inference: Evolution of the mitochondrial genome. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993; 89(14): 6575-9.

Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PloS one. 2008; 3(7): 43.

Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nature Reviews Microbiology. 2010; 8(1): 74-82.

Schneider A, Ebert D. Covariation of mitochondrial genome size with gene lengths: evidence for gene length reduction during mitochondrial evolution. Journal of Molecular Evolution. 2004; 59(1): 90-6.

Shepard JJ, Andreadis TG, Vossbrinck CR. Molecular phylogeny and evolutionary relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the northeastern United States based on small subunit ribosomal DNA (18S rDNA) sequences. Journal of Medical Entomology. 2006; 43(3): 443-54.

Shultz JW, Regier JC. Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein–encoding genes supports a crustacean+ hexapod clade. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 2000; 267(1447): 1011-9.

Smith KL, Harmon LJ, Shoo LP, Melville J. Evidence of constrained phenotypic evolution in a cryptic species complex of agamid lizards. Evolution. 2011; 65(4): 976-92.

Smith JF. Phylogenetic signal common to three data sets: combining data which initially appear heterogeneous. Plant Systematics and Evolution. 2000; 221(3): 179-98.

Song H, Sheffield NC, Cameron SL, Miller KB, Whiting MF. When phylogenetic assumptions are violated: base compositional heterogeneity and among-site rate variation in beetle mitochondrial phylogenomics. Systematic Entomology. 2010; 35(3): 429-48.

Soto-Adames FN, Robertson HM, Berlocher SH. Phylogenetic utility of partial DNA sequences of G6pdh at different taxonomic levels in Hexapoda with emphasis on Diptera. Annals of the Entomological Society of America. 1994; 87(6): 723-36.

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. [2016 ago 13].

Steffan WA, Evenhuis NL. Classification of the subgenus *Toxorhynchites* (Diptera: Culicidae) I. Australasian, eastern Palaearctic, and Oriental species-groups. Journal of Medical Entomology. 1985; 22(4): 421-46.

Stevens JR, Schofield CJ. Phylogenetics and sequence analysis–some problems for the unwary. Trends in Parasitology. 2003; 19(12): 582-8.

Strimmer K, Von Haeseler A. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997; 94(13): 6815-9.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. 2011; 28(10): 2731-9.

Team AC. Adobe Photoshop CS3 classroom in a book. Bookman Editora.2009.

Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 1999; 29(2): 87-101.

Thompson JD, Gibson T, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Current Protocols in Bioinformatics. 2002; 2-3.

Timmermans MJ, Vogler AP. Phylogenetically informative rearrangements in mitochondrial genomes of Coleoptera, and monophyly of aquatic elateriform beetles (Dryopoidea). Molecular Phylogenetics and Evolution. 2012; 63(2): 299-304.

Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. Nature. 2003; 422(6928): 193-7.

Vaidya G, Lohman DJ, Meier R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics. 2011; 27(2): 171-80.

Vesgueiro FT, Demari-Silva B, Malafronte RDS, Sallum MAM, Marrelli MT. Intragenomic variation in the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA of species of the genera *Culex* and *Lutzia* (Diptera: Culicidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2011; 106(1): 1-8.

Vidal PO, Peruzin MC, Suesdek L. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). Revista Brasileira de Entomologia. 2011; 55(1): 134-7.

Volz K. A test case for structure-based functional assignment: The 1.2 A crystal structure of the yjgF gene product from *Escherichia coli*. Protein Science. 1999; 8(11): 2428-37.

Walker JE. The mitochondrial transporter family. Current Opinion in Structural Biology. 1992; 2(4): 519-26.

Ward RA. Culicidae. Aquatic biota of Mexico, Central America and the West Indies San Diego, CA: San Diego State University. 1982.

Warscheid B, Jackson K, Sutton C, Fenselau C. MALDI analysis of *Bacilli* in spore mixtures by applying a quadrupole ion trap time-of-flight tandem mass spectrometer. Analytical Chemistry. 2003; 75(20): 5608-17.

Wheeler WC, Whiting M, Wheeler QD, Carpenter JM. The phylogeny of the extant hexapod orders. Cladistics. 2001; 17(2): 113-69.

Whiting MF. Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence. Zoologica Scripta. 2002; 31(1): 3-15.

Wiegmann BM, Tsaur SC, Webb DW, Yeates DK, Cassel BK. Monophyly and relationships of the Tabanomorpha (Diptera: Brachycera) based on 28S ribosomal

gene sequences. Annals of the Entomological Society of America. 2000; 93(5): 1031-8.

Wood DM. Phylogeny and classification of the Nematocera. Manual of Nearctic Diptera. 1989; 3: 1333-70.

Wootton RJ. Functional morphology of insect wings. Annual Review of Entomology. 1992; 37(1): 113-40.

Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. Nucleic Acids Research. 2006; 34(2): 564-74.

Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolovschi C, Berenger JM, Parola P. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. Journal of Clinical Microbiology. 2013; 51(2): 522-8.

Yssouf A, Almeras L, Berenger JM, Laroche M, Raoult D, Parola P. Identification of tick species and disseminate pathogen using hemolymph by MALDI-TOF MS. Ticks and Tick-borne Diseases. 2015; 6(5): 579-86.

Zelditch ML, Fink WL, Swiderski DL. Morphometrics, homology, and phylogenetics: quantified characters as synapomorphies. Systematic Biology. 1995; 44(2): 179-89.

Zelditch ML, Fink WL, Swiderski DL, Lundrigan BL. On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny: a reply to Rohlf. Systematic Biology. 1998; 47(1): 159-67.

Zelditch ML, Swiderski DL, Fink WL. Discovery of phylogenetic characters in morphometric data. Phylogenetic Analysis of Morphological Data. Smithsonian Institution Press, Washington. 2000; 37-83.

Zellner M, Winkler W, Hayden H, Diestinger M, Eliasen M, Gesslbauer B, Oehler R. Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. Electrophoresis. 2005; 26(12): 2481-9.

APÊNDICE A

Artigos publicados em periódicos durante o doutorado

Artigo 1: Lorenz C, Patané JS, Suesdek L. Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*. Infection, Genetics and Evolution. 2015. 35, 144-152.

Artigo 2: Lorenz C, Virginio F, Aguiar BS, Suesdek L, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. Malaria Journal. 2015. 14(1), 408.

Artigo 3: Lorenz C, Ferraudo AS, Suesdek L. Artificial Neural Network applied as a methodology of mosquito species identification. Acta Tropica. 2015.*152*, 165-169.

Artigo 4: Breviglieri E, Lorenz C. Biodiversity of Culicidae in a fragment of Atlantic forest, Sao Paulo State, Brazil. International Journal of Mosquito Research. 2017. 4(2): 125-127.

Infection, Genetics and Evolution 35 (2015) 144–152

Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*

Camila Lorenz [a,b,*,1], José S.L. Patané [a,c,1], Lincoln Suesdek [a,b,d]

[a] Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, São Paulo CEP 05509-300, Brazil
[b] Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, São Paulo CEP 05508-000, Brazil
[c] Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748 – sala 911, São Paulo CEP 05508-000, Brazil
[d] Instituto de Medicina Tropical, Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 470, São Paulo CEP 05403-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 May 2015
Received in revised form 11 July 2015
Accepted 5 August 2015
Available online 6 August 2015

Keywords:
Evolution
Morphometrics
Polymorphism
Kerteszia
COI gene
Atlantic Forest

ABSTRACT

The mosquito species *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus* are co-occurring vectors for etiological agents of malaria in southeastern Brazil, a region known to be a major epidemic spot for malaria outside Amazon region. We sought to better understand the biology of these species in order to contribute to future control efforts by (1) improving species identification, which is complicated by the fact that the females are very similar, (2) investigating genetic composition and morphological differences between the species, (3) inferring their phylogenetic histories in comparison with those of other Anophelinae, and (4) dating the evolutionary divergence of the two species. To characterise the species we used wing geometry and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene as morphological and genetic markers, respectively. We also used the genes *white*, 28S, ITS2, Cytb, and COI in our phylogenetic and dating analyses. A comparative analysis of wing thin-plate splines revealed species-specific wing venation patterns, and the species *An. cruzii* showed greater morphological diversity (8.74) than *An. homunculus* (5.58). Concerning the COI gene, *An. cruzii* was more polymorphic and also showed higher haplotype diversity than *An. homunculus*, with many rare haplotypes that were displayed by only a few specimens. Phylogenetic analyses revealed that all tree topologies converged and showed [*Anopheles bellator* + *An. homunculus*] and [*Anopheles laneanus* + *An. cruzii*] as sister clades. Diversification within the subgenus *Kerteszia* occurred 2–14.2 million years ago. The landmark data associated with wing shape were consistent with the molecular phylogeny, indicating that this character can distinguish higher level phylogenetic relationships within the *Anopheles* group. Despite their morphological similarities and co-occurrence, *An. cruzii* and *An. homunculus* show consistent differences. Phylogenetic analysis revealed that the species are not sister-groups but species that recently diverged within the *Kerteszia* group, perhaps concomitantly with the radiation of bromeliads in South America or during the Pleistocene climate oscillations.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The mosquito species *Anopheles cruzii* Dyar & Knab and *Anopheles homunculus* Komp co-occur in southeastern Brazil and are the primary and secondary vectors, respectively, for etiological agents of malaria (*Plasmodium* spp.) in this region (Smith, 1952). There are other examples of sympatric *Anopheles* species that transmit the same disease, such as within the *Anopheles gambiae* complex in Africa (Levine et al., 2004). It is important to correctly identify vector species and distinguish between co-occurring ones in order to implement better control measures and eliminate disease. In Brazil, *An. cruzii* is broadly distributed and occurs in the states of Pernambuco, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul (Forattini, 1962; Wilkerson and Peyton, 1991). *An. homunculus* occurs only in São Paulo, Paraná, and Santa Catarina (Calado and Navarro-Silva, 2005). The two species co-occur in São Paulo Atlantic Forest, an important spot for autochthonous malaria in Brazil (Marrelli et al., 2007; Pina-Costa et al., 2014). According to

* Corresponding author at: Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, São Paulo CEP 05509-300, Brazil.
E-mail addresses: camilalorenz@usp.br (C. Lorenz), jspatane@gmail.com (J.S.L. Patané), lincoln.suesdek@butantan.gov.br (L. Suesdek).
[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.011
1567-1348/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

the Brazilian Ministry of Health (SINAN, 2004), between 1994 and 2004, around 8000 cases of malaria were reported in southeastern Brazil, with the highest number of cases reported in the state of São Paulo (Marrelli et al., 2007). However, despite the epidemiological importance of *Anopheles*, only a few studies have examined the populations of these two species in this area.

Both species belong to the subgenus *Kerteszia* and exploit bromeliad phytotelmata as larval habitats (Downs and Pittendrigh, 1946), a distinctive feature among Anophelinae. The larval colouration (Fig. 1) is diagnostic for these two species (Lima, 1952), but adult females are very similar. Because congeneric females show interspecific similarity, some occurrence records of *An. cruzii* may not be accurate, and some observations may have confused the species with other species belonging to *Kerteszia* (Calado and Navarro-Silva, 2005). In addition to their morphological similarities and use of similar habitat, the two species are closely related phylogenetically. The monophyly of *Kerteszia* is well documented in the literature (Besansky and Fahey, 1997; Sallum et al., 2000, 2002). Some authors believe that *An. cruzii* and *An. homunculus* belong to a group of phylogenetically related species (Rosa-Freitas et al., 1998), but the proposition has never been tested empirically. Although some molecular studies on the phylogenetic positions of *Kerteszia* species have been conducted (Krzywinski et al., 2001; Sallum et al., 2002), no research based on both mitochondrial and nuclear genes has been reported; species divergence times among *An. cruzii*, *An. homunculus*, and other anopheline mosquitoes remain unknown; and an appraisal of their population dynamics is lacking.

Other studies have suggested that *An. cruzii* constitutes a species complex (Ramirez and Dessen, 2000; Rona et al., 2009, 2013), and therefore, different populations could co-exist within the samples analysed. This is not the case for the population examined here (Carvalho-Pinto and Lourenço-de-Oliveira, 2004; Malafronte et al., 2007; Zavortink, 1973). Although there are behavioural differences between the two populations, including preferences for types of bromeliads that grow at different heights in the forest (Veloso et al., 1956) and vectorial status (Rachou et al., 1958; Forattini, 1962, 2002), to date almost no evident morphological or genetic differences have been observed between females. In the present study, we compared a population of *An. cruzii* with one of *An. homunculus* at this important malaria spot. Our goal was to test whether there were measurable differences between the species at the morphological and molecular levels that might contribute to further control measures, as well as to better understand important evolutionary parameters associated with those populations. To achieve this, we: (1) attempted to improve species identification, (2) investigated differences in their genetic composition using COI, a typical molecular marker employed in genetic comparisons, (3) examined differences in morphology using wing geometry, an accepted low-cost method used for studying Culicidae and other insects, (4) estimated their phylogenetic position within other Anophelinae using five genes (three nuclear and two mtDNA), and (5) dated the origin of each species.

2. Material and methods

2.1. Mosquito collection and identification

All specimens were collected in the municipality of Cananeia, Sao Paulo, Brazil (24°53′06 "S/47°51′01" W), situated in the Atlantic Forest biome. This region was selected because it is one of the main autochthonous malaria spots in Brazil (Pina-Costa et al., 2014) and the species *An. cruzii* and *An. homunculus* are sympatric there (Marrelli et al., 2007). The eggs and larvae of *An. cruzii* and *An. homunculus* were obtained from terrestrial, epiphytic, and saxicolous bromeliads using a manual suction pump (Lozovei and Silva, 1999). The great majority of the immature specimens collected were in the early stages of development (eggs or L1). The specimens were taken to the laboratory and raised to adulthood, under standard conditions of temperature and humidity (25 ± 1 °C; 80% ± 10%) (Rúa et al., 2005). Morphological identification was conducted according to Forattini (2002). The adults were sacrificed and stored in a freezer at −80 °C in order to preserve their DNA.

2.2. Morphometric analysis

Geometric morphometrics of the wing were analysed according to the procedure described by Lorenz et al. (2012). We analysed the right wings of 133 *An. cruzii* (66 females and 67 males) and 105 *An. homunculus* (56 females and 49 males). All the specimens were collected in July 2011 and January 2012. Because of their sexual dimorphism, the males and females were analysed separately. Eighteen wing landmarks (Fig. 2) from each individual were digitised using TpsDig v.1.40 (Rohlf, 2006). All specimens were scored by a single experimenter (C.L.). The coordinates were analysed using TpsRelw 1.36 (Rohlf, 2003a) and relative warps analyses (Principal Components) were conducted.

These data were used to calculate the canonical variables and the Mahalanobis distance using TpsUtil 1.26 (Rohlf, 2004), TpsRelw 1.36 (Rohlf, 2003a), TpsRegr 1.28 (Rohlf, 2003b), Statistica 7.0 (StatSoft, 2004), and MorphoJ 1.02 (Klingenberg, 2011) software programs. The allometric effect was removed in all analyses of shape through the regression between the components of shape and size of the centroid. Discriminant analysis and reclassification tests were performed using the Mahalanobis distances as estimators of the metric distance. Morphological diversity based on principal component analysis was estimated according to Petersen et al. (2015). Thin-plate splines were obtained by regression of the canonical scores versus the shape components using TpsRegr 1.28 (Rohlf, 2003b). In order to calculate the most influential landmarks between species, we used the TET and COV programs (MOME, 2010). In order to compare the wing shapes of *An. cruzii* and *An. homunculus* with those of other species, we used wing data from *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator*, *Anopheles* (*Kerteszia*) *laneanus*, *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi*, and *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *aquasalis* obtained from the WingBank (http://wingbank.com.br/) database.

2.3. DNA extraction and mtDNA sequencing

Whole mosquito tissue, except wings, was homogenised according to the procedure described by Jowett (1986) in order to extract genomic DNA. A total of 50 specimens of *An. cruzii* and 31 specimens of *An. homunculus* were used for the genetic analyses. Polymerase chain reaction (PCR) analysis was used to amplify the fragment of the mitochondrial gene COI. The reaction mixture contained 1× buffer stock solution (20 mM Tris–HCl, pH = 8.4), 0.4 mM dNTP, 2.5 mM of $MgCl_2$, 0.5 mM each primer (forward and reverse), 0.5 μl of *Taq* polymerase, 2.5 μl of genomic DNA, and sufficient sterile water to produce a final volume of 20 μl in each 0.2-ml reaction tube. The primers used in the amplification of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene have been published by Zhang and Hewitt (1997) and the sequences have been deposited in GenBank: UEA-7 [5′-TACAGTTGGAATAGA CGTTGATAC-3′] for the forward primer and UEA-10 [5′ TCCAATG CACTAATCTGCCATATTA-3′] for the reverse primer. The anchoring of the primers occurs in the final portion of the COI gene. The PCR program consisted of an initial temperature of 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 40 s, annealing for 40 s (52 °C for *An. cruzii*, 47 °C for *An. homunculus*), and 72 °C for 1 min, with a final extension step of 72 °C for 10 min. The size of

Fig. 1. Immature forms. Larvae of *An. cruzii* (left) and *An. homunculus* (right).

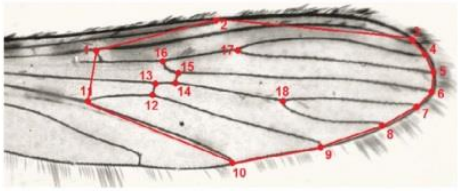


Fig. 2. Wing of *Anopheles*. Location of the 18 wing landmarks used in the morphometric analysis of *Anopheles cruzii* and *An. homunculus*. In red: imaginary geometric diagram representing the portion of wing considered in this study. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the final amplified fragment was approximately 390 bp for *An. cruzii* and 513 bp for *An. homunculus*, and it did not include the barcode region of mitochondrial DNA that is used in species identification (De Azeredo-Espin, 2011; Ruiz-Lopez et al., 2012). The GenBank accession numbers for the sequences obtained are KC992738-KC992770 for *An. cruzii* and KC992783-KC992791 for *An. homunculus*. The PCR product was purified using a commercial kit (PureLinkTM PCR Purification kit; Invitrogen Corporation, Melle, Germany) and following the manufacturer's instructions. The fragment was sequenced in the forward and reverse directions using the commercial kit ABI PRISM dGTP BigDye ® Terminator v.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Samples were precipitated, stored at −20 °C, and sequenced using the Applied Biosystems model 3130xl sequencer.

2.4. Genetic analyses and population dynamics

The DNA sequences were analysed using the Lasergene program suite ® Core (DNAstar) and aligned and edited using the MEGA 6.0 program (Tamura et al., 2013). The minimum spanning network of the *An. cruzii* and *An. homunculus* haplotypes was created using TCS 1.21 (Clement et al., 2000) with the *median-joining* algorithm. To assess the genetic differences between species, the analysis of haplotype diversity and the number of polymorphic sites in the sequences were calculated with MEGA 6.0, using the Kimura-2-Parameter model. Population dynamics was inferred using D statistics (Tajima, 1989), Fs (Fu, 1997), and mismatch distributions from pairwise differences of COI sequences, all calculated in DnaSP v.5 (Rozas et al., 2003).

Estimates of population dynamics from our samples of *An. cruzii* and *An. homunculus* were calculated using BEAST v.1.8.0 (Drummond et al., 2012). We tested four models of population dynamics (constant, expansion, exponential, and logistic) using the stepping-stone method of marginal likelihood estimation (Xie et al., 2010) to infer the model that best described the evolution of such populations. A total of 20 steps were used in the bridge between posterior and prior, and each run was performed twice to check for repeatability.

2.5. Phylogenetic analysis and estimation of divergence time

In addition to analysing the COI sequences of *An. cruzii* and *An. homunculus* obtained in this study, we analysed the COI sequences of all *Kerteszia* species available in GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), as well as those of four other genes (Table 1). *An. darlingi* and *An. aquasalis* formed the outgroup, because those species belong to the subgenus *Nyssorhynchus* (Sallum et al., 2002). We used all available sequences from different individuals of the same species for each gene (i.e., all those sequenced by us or retrieved from GenBank) by maximum parsimony, to test whether different species form reciprocally monophyletic clades. If monophyly is detected for all the genes tested, then intraspecific variability cannot interfere with phylogenetic estimation of the species relationships. Therefore, whenever reciprocally monophyletic clades for a gene were found, we selected the largest sequence for that gene to be representative of the species, or if more than one sequence was equally large, we chose one of them haphazardly. The alignment for each gene was obtained using the Muscle algorithm (Edgar, 2004) within the MEGA 6.0 interface, with default parameters. Concatenation of all gene alignments was done in SequenceMatrix v.1.7.8 (Vaidya et al., 2001). The best data partitioning strategy (i.e., whether it is best to assume a single partition, to partition by codon position, or to partition by gene) was inferred by PartitionFinder v.1.1.1 (Lanfear et al., 2012).

Phylogenetic analyses were performed in two ways: (1) using the concatenated alignment described (supermatrix analysis, SM) by maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), and Bayesian analysis (BA); and (2) estimating a species tree that maximised the probability of encompassing the five different gene trees (species tree analysis, ST) under a Bayesian framework. SM was done by MP with 1000 bootstraps in MEGA and by ML with 1000 bootstraps in IQTree v0.9.6 (Minh et al., 2013), using the best partitioning strategy and respective reversible models selected by PartitionFinder. SM was also performed by BA using BEAST v.1.8.0. In the latter case, we used the same ML partitioning and models, assuming a lognormal distribution of rates among branches with the mean arbitrarily fixed to 1.0 (ucld.mean = 1.0). For ST, a new PartitionFinder run was carried out in which each non-linked genic region was separated to prevent nuclear genes and mtDNA from being present in the same partition. After partitioning and models were selected, ST was conducted in *BEAST v.1.8.0 with the appropriate settings, assuming a Birth–Death

Table 1
Anopheles species used in phylogenetic analyses. The number refers to the sequence obtained from GenBank. Species in grey were used as outgroup.

Species	COI	ITS2	CYTB	28S	*White*
An. cruzii	*KC992738 – KC992770	AF027165	AF311248	AF417810	AF318203
An. homunculus	*KC992783 – KC992791	JQ291248			
An. bellator	AF417704	DQ364652	AF311249	AF311243	AF318201
An. laneanus		DQ364656			
An. neivai			AF311260	AF311244	AF318205
An. darlingi	JX435797	AF051274	NC014275	AF417805	GQ121273
An. aquasalis	AF548902	U92324		AF417804	

*Sequences obtained in this study.

process prior with default parameters, and ucld.mean = 1.0 as above. All BEAST and *BEAST runs were carried out for 100,000,000 generations twice to check for repeatability, with convergence and effective sample size of parameters checked by Tracer v.1.6 (Drummond and Rambaut, 2007). The final ST tree was the topology that showed the maximum *a posteriori* product of clade credibilities, annotated with median branch relative times and posterior node probabilities, obtained by TreeAnnotator v.1.8.0 (Drummond and Rambaut, 2007).

We estimated the age of divergence between the *Kerteszia* and *Nyssorhynchus* lineages by implementing another ST under BEAST, this time using a node calibrated with fossil information, together with an inclusive prior for the lognormal distribution of absolute rates. The absence of well-preserved fossils in Culicidae makes it difficult to estimate the emergence of groups precisely (Besansky and Fahey, 1997); we used the fossil described in Zavortink and Poinar (2000) as a hard minimum bound for the divergence between *Kerteszia* and *Nyssorhynchus*, as it is the oldest known fossil attributed to the latter lineage, with a minimum of 15 MY. A conservative soft upper maximum of 260 MY was used, as it marks the separation of *Drosophila* and *Anopheles* according to Gaunt and Miles (2002) and marks the origin of the Diptera stem group in Wiegmann et al. (2011). The conservative interval 15–260 MY spans recent published estimates (Reidenbach et al., 2009) without using methodological extrapolations that are typical of secondary calibrations (we do not use their new inferred bounds here, in order to avoid such potential biases). As a prior for the rates for each genic partition identified by PartitionFinder, we used an Exponential [0.04] (=0.04 substitution/site/branch/million years), spanning a 95% range of 0.001–0.148 s/s/b/MY, which conservatively encompasses published rates for insect mitochondrial and nuclear genes (Brower, 1994; Papadopoulou et al., 2010). Convergence, repeatability, effective sample sizes, and annotation of the final tree were calculated as described above.

3. Results

3.1. Wing morphology

Discriminant analysis revealed the species are significantly distinct regarding the wing shape (Fig. 3). The multivariate Mahalanobis distance between *An. cruzii* and *An. homunculus* was more pronounced in females ($d = 3.97$) than in males ($d = 3.05$). The accuracy scores after a cross-validated reclassification test were 89.7% for female *An. cruzii* and 94.6% for female *An. homunculus*, compared with only 74.6% for male *An. cruzii* and 90.0% for male *An. homunculus*. Morphological diversity was higher in *An. cruzii* (md = 8.74) than in *An. homunculus* (md = 5.58). Thin-plate splines with pairwise comparison between species showed greater displacement of landmarks #2 and #16 for females and #1 and #2 for males (Fig. 3), calculated by the software program COV.

3.2. Genetic data and population dynamics

For *An. cruzii*, we obtained a 390-bp sequence located at the 3′ end of the COI gene. A total of 33 haplotypes were observed in this population and the degree of similarity among them is depicted in Fig. 4. About 92% of the substitutions (mostly transitions) were located at the third codon position (synonymous).

For *An. homunculus*, a 513-bp sequence of the COI gene was obtained; 87% of the mutations occurred in the third codon position and the majority of them were transition mutations. Among the 31 specimens sampled, there were nine different haplotypes (Fig. 4). Scores of the main genetic parameters (haplotypic and nucleotide diversity), as well as the results of Tajima and Fs tests, are listed in Table 2. In order to compare the haplotypes of species, we used 390-bp sequences for both species. Our analysis revealed that 23 mutational steps separate *An. cruzii* from *An. homunculus* (Fig. 4).

The Fs statistics is largely negative for *An. cruzii*, whilst for *An. homunculus* the signal for expansion is not significant. The stepping-stone tests showed that a model of logistic growth for the *An. cruzii* population is more likely than other models (including constant population size through time), whereas for *An. homunculus* the assumption of a constant population through time cannot be rejected (data not shown). The graphs of mismatch distribution (Fig. 5) also confirm these findings ($p < 0.001$).

3.3. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses for each gene showed that individuals from the same species clustered together. We selected the largest sequence of each gene for each species (or chose one haphazardly among the largest, when more than one sequence was equally large). The best partitioning schemes for SM and ST, and the evolutionary model chosen for each partition, are shown in Supplementary File 1. For ST, a separate model was used for each individual gene. MP, ML, and BA converged to the same tree, in which [*An. bellator* + *An. homunculus*] and [*An. cruzii* + *An. laneanus*] are sister clades (Fig. 6). Furthermore, the clade [*An. bellator* + *An. homunculus*] had significant support in the MP and ML analyses (see Supplementary File 2). Regarding ST, except for the [*An. cruzii* + *An. laneanus*] clade, the ingroup was unresolved. The separation between *Nyssorhynchus* and *Kerteszia* lineages was inferred to be between 15.0 and 40.5 MYA, with all posterior divergences being <15 MY (Fig. 6).

The molecular species tree topology was plotted on the morphospace of Principal Components of female wing shape to relate the two analyses (Fig. 7). The wing shapes of the *Anopheles* in the *Kerteszia* group are more similar to one another than to those belonging to the subgenus *Nyssorhynchus* (*An. darlingi* and *An. aquasalis*).

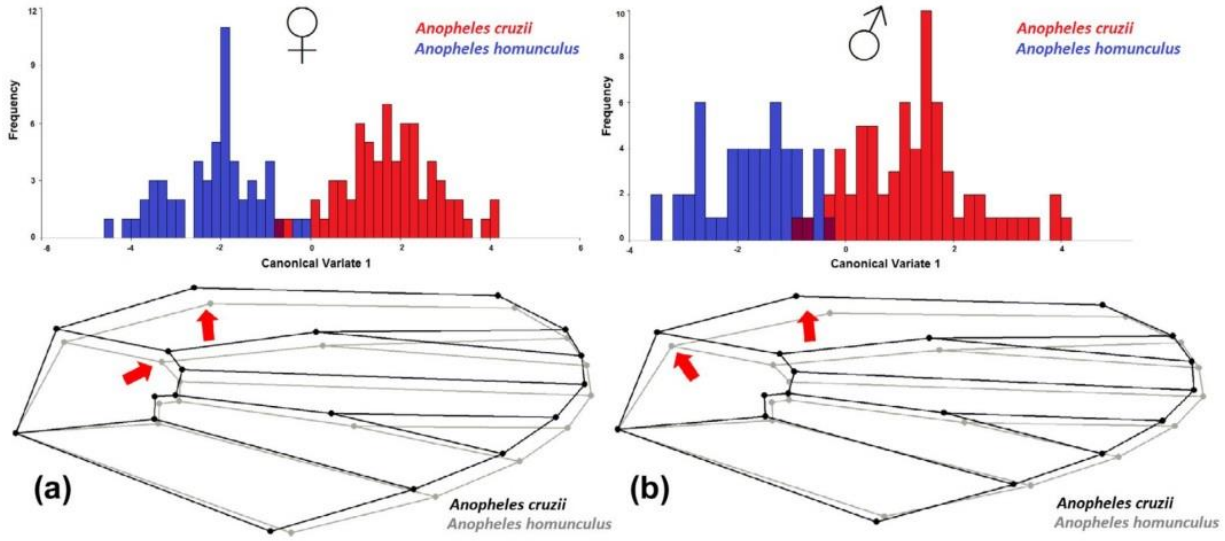


Fig. 3. Geometric morphometrics of *Anopheles cruzii* and *An. homunculus*. Above: Canonical Variate Analysis – comparisons between two species. Below: Thin-plate spline between *An. cruzii* and *An. homunculus* (a) females and (b) males. Arrows indicate the most influential landmarks.

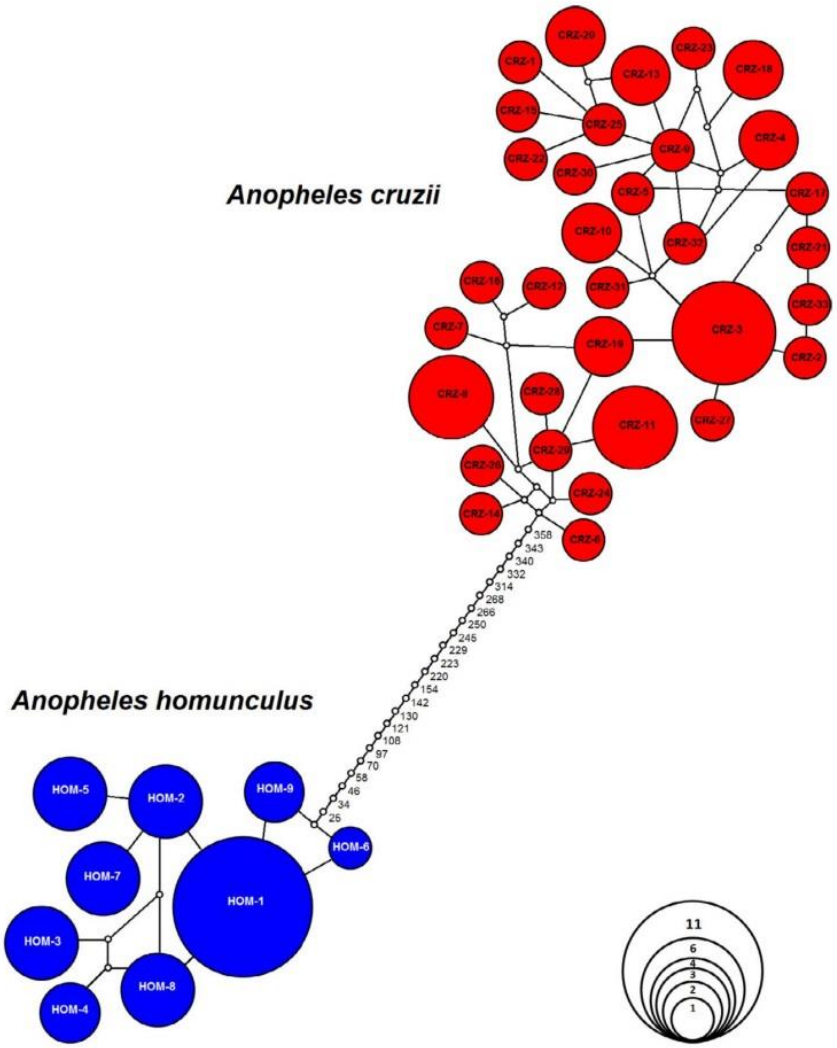


Fig. 4. Haplotype networks of COI gene for *Anopheles cruzii* and *An. homunculus*. Circles sizes correspond to haplotype frequency. Each step represents a single mutational event and the white circles are hypothetical single substitutions in the position indicated by numbers. Size of the circles is proportional to the number of the occurring haplotypes. The number of individuals can be derived from the scale shown.

Table 2
Summary statistics for CO-I data of *Anopheles cruzii* and *An. homunculus*.

Species	*H*/*n*	Number of polymorphic sites	*A–T* content	*h*	π	*DT*	*Fs*
An. cruzii	33/50	29/390	72%	0.97	0.012	−1.06	−26.65*
An. homunculus	9/31	14/513	71.1%	0.84	0.005	−0.76	−0.987

H = number of haplotypes; *n* = individuals sampled; *h* = haplotype diversity; π = nucleotide diversity; *DT* = Tajima's *D* test; *Fs* = Fu's *F* test;
* Shows a significant *p*-value.

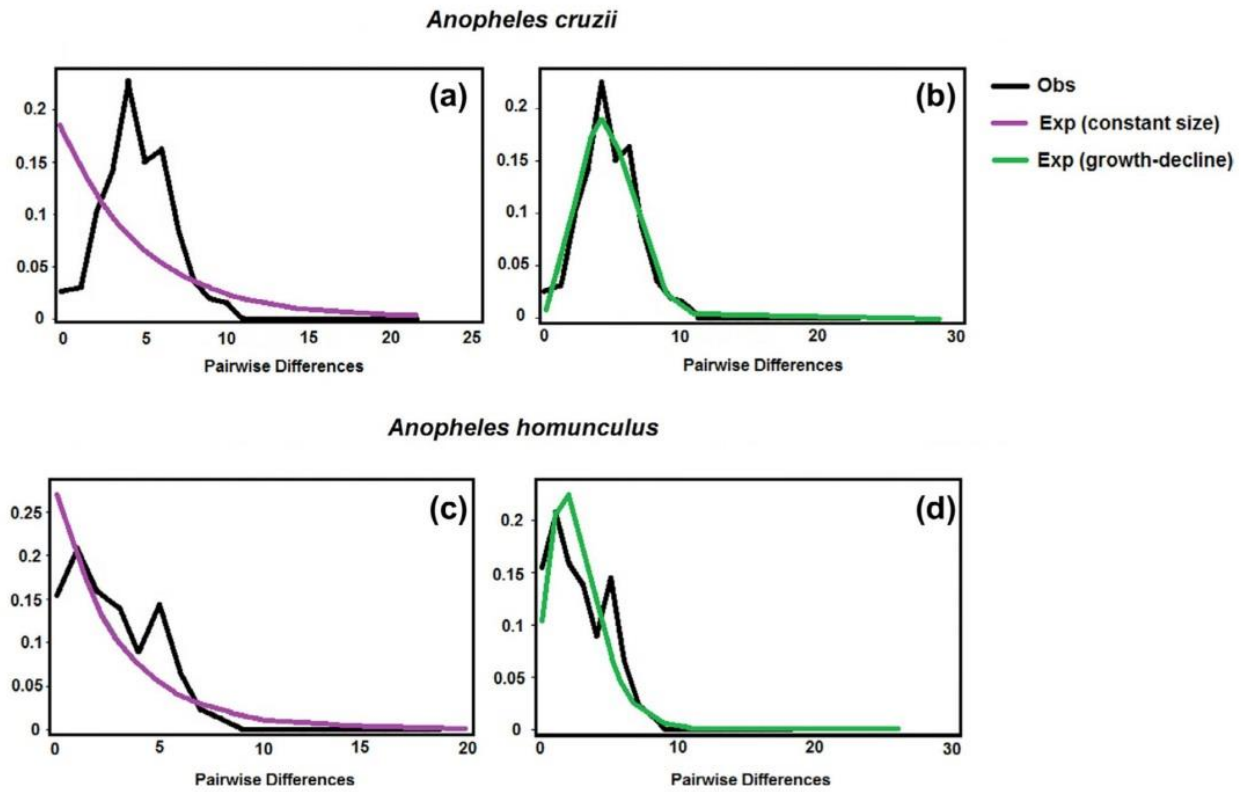


Fig. 5. Population dynamics. Observed mismatch distributions among haplotypes in *An. cruzii* (a and b) and *An. homunculus* (c and d). The population of *An. cruzii* is consistent with a growth-decline model, as shown in b. The green line represents the expected results, which are closest to the observed results (black line) in this case. In *An. homunculus* the graphs are not sufficient for differentiating between the hypotheses of constant population and expansion. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Discussion and conclusions

Information about the genetic and morphological variability of *An. cruzii* and *An. homunculus* are of particular interest because they are sympatric vectors of etiological agents of malaria in southeastern Brazil, one of the main Brazilian regions of concern regarding malaria (Pina-Costa et al., 2014). We begin our discussion with their inferred phylogenetic relationship with other species in the *Kerteszia* group and divergence times, and then, we examine the morphological and genetic differences between them.

It can be concluded that *An. cruzii* and *An. homunculus* are not sister-groups as evidenced by phylogenetic analysis based on five genes and by the (at least) 23 mutational steps that separate the mtDNA haplotypes of the two taxa. All topologies constructed by MP, ML, and BA converged and indicated that *An. bellator* was a sister to *An. homunculus*, while *An. laneanus* was a sister to *An. cruzii*. The subgenus *Kerteszia* is known to be monophyletic within *Anopheles* (Krzywinski et al., 2001; Sallum et al., 2002), but few studies have examined the relationships between the species within this group. In the present study, analyses of five genes of different origin (mitochondrial, nuclear non-coding and nuclear coding) were conducted to improve the accuracy of the topology. Analyses indicate that *Anopheles* emerged during the Cenozoic Era (50 MYA). Estimated divergence time between the subgenus *Nyssorhynchus* and *Kerteszia* was 15–40.5 MYA, which is in reasonable agreement with the results of Reidenbach et al. (2009). Diversification within *Kerteszia* was relatively recent (2–14.2 MYA) and may be related to the spread of bromeliads in South America. Givnish and Barfuss (2011) showed that a major radiation of bromeliads in Brazil occurred in Atlantic Forest and adjacent regions roughly 9.1 MYA. During the last three million years (i.e., during the Pleistocene), major climatic oscillations caused various speciation events, including insect speciation (Hewitt, 2000), and could explain the recent large radiation of *Kerteszia* species. According to Rona et al. (2010), the divergence of species within the *An. cruzii* complex occurred between 1.1 and 3.6 MYA, which agrees with our dating of the appearance of *An. cruzii* being at most 4.8 MYA.

The interspecific similarity between female *An. cruzii*, *An. homunculus*, and other *Kerteszia* species may be attributed to the relatively young evolutionary age of the group compared with other Anophelinae groups. However, the wing shape of each subgenus seems to have followed the evolution of groups, because one pattern of clustering was observed among *Kerteszia* species

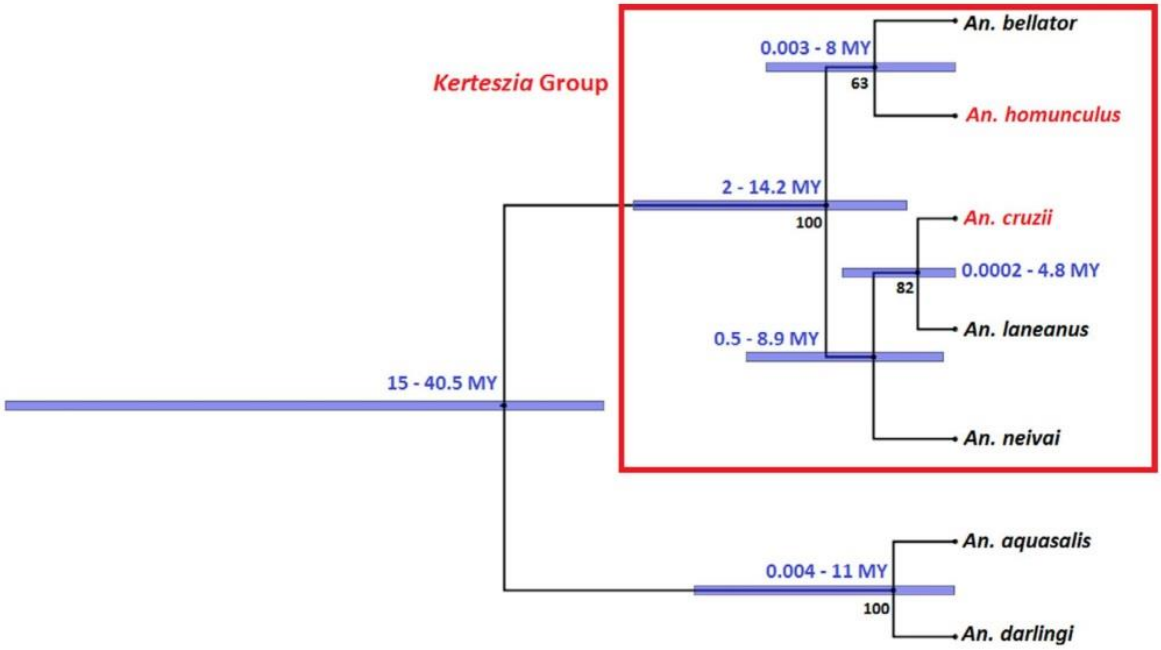


Fig. 6. Species tree and divergence times for *Anopheles*. Species tree of combined mtDNA (CO-I and CYT-B), ribosomal DNA (ITS2 and 28S) and nuclear gene (*white*) data. Node positions indicate divergence times in the maximum clade credibility Bayesian tree, and node bars indicate associated 95% confidence intervals. Number below each branch indicates the posterior probability according to the bayesian species tree analysis.

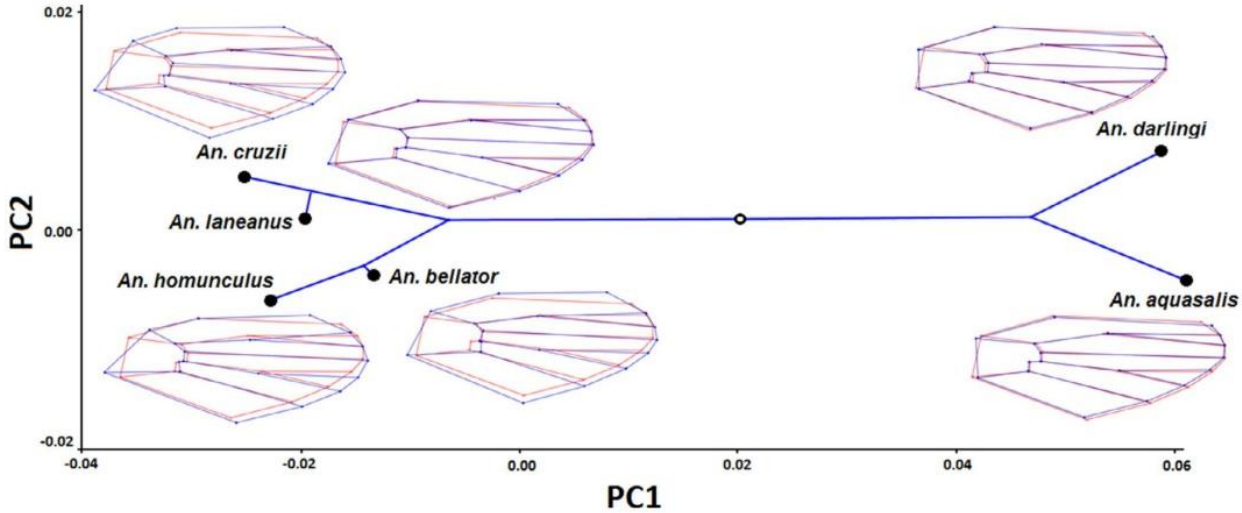


Fig. 7. Reconstruction of evolutionary changes in wing shape of *Anopheles*. The phylogenetic tree has been superimposed onto a plot of the first two principal components of the wing shape. The wings diagrams show the shape change from the reconstructed common ancestor (red contour and empty circle) to the mean shape for the respective species (blue contour and solid dots). *An. neivai* was omitted because there was no wing available. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and another among *Nyssorhynchus* species. The wing is typically used as a marker of microevolutionary processes (Dujardin, 2008; Gómez et al., 2014; Henry et al., 2010); within *Anopheles*, it also appears to be a good indicator of macroevolution. In this case, the landmark data revealed a phylogenetic signal in wing shape, according to the genetic topology found in our study. Other studies in sea urchins and simians also found good agreement between morphometric data and phylogenies that had been estimated from other information (David and Laurin, 1996; Lockwood et al., 2004).

Despite that they share the same habitat and are believed to be morphologically similar, *An. cruzii* and *An. homunculus* showed marked differences, both morphologically and genetically. The wing shape analyses revealed species-specific wing venation patterns that could be attributed to their different evolutionary histories. Both females and males consistently differed in wing shape, also supporting the conclusion that *An. cruzii* and *An. homunculus* are morphologically different. Some of the landmarks in the wings were more variable than others and were consequently more useful in species identification. Lorenz et al. (2012) observed that female *An. cruzii* and *An. homunculus* collected in 2009 could be distinguished by their wing shapes, and that wing shape was a diagnostic characteristic helpful in the taxonomic classification of these species. Here, we extended this previous study and also

demonstrated that the diagnosis based on wing shape was still valid after some years (samples analysed here were collected in 2011–2012).

On analysing the polymorphism of the COI gene we concluded that both species differed significantly, in spite of their overall morphological resemblance. The higher haplotype diversity of *An. cruzii* indicates that the COI gene for this species is less conserved than that of *An. homunculus*. Accordingly, *An. cruzii* was morphologically more distinct (dm = 8.74). Regarding evolutionary population dynamics, *An. cruzii* showed population growth according to the stepping-stone model, whereas the population of *An. homunculus* apparently remained constant over time, agreeing with D and Fs statistics, and also with the mismatch distribution analysis (though the latter analysis was not sufficient to infer constant population for *An. homunculus*).

Overall, these morphological, genetic and population differences may be due to different evolutionary histories or to differences in their ability to disperse. Our findings are consistent with those of Veloso et al. (1956), who studied *An. cruzii* in several habitats across a broad altitude range (0–600 m). They reported that the species breeds in bromeliads with different water capacities, ranging from 5 to 2000 ml, located either on the ground or in the canopy, including in trees up to 25 m tall. *An. cruzii* has the advantage for dispersal by being acrodendrophilic (Ueno et al., 2007); it may fly to the canopy of the forest in search of breeding sites and blood supply (from monkeys and birds). In contrast, *An. homunculus* prefers more humid, lower forest habitats and breeds in small bromeliads located in biotopes that are less than 5 m in height, which are more affected by anthropogenic effects and therefore more susceptible to the impacts of human activities. In the 1940s, malaria control measures were implemented in the Atlantic Forest in Brazil by targeting anopheline *Kerteszia* species associated with bromeliads – to curb 'bromeliad-malaria' (Marrelli et al., 2007). These measures included manual removal of bromeliads and use of chemical insecticides. They resulted in a significant decrease in the mosquito population and, consequently, a reduction in the number of cases of malaria (Deane, 1988). The malaria control efforts could have altered the population structure of *An. homunculus*, causing the population to go through a bottleneck effect that reduced its haplotype diversity.

Furthermore, it is known that the two species also exhibit various behavioural differences (e.g., vector status) which may be correlated with their particular vector-competence and adaptation (Veloso et al., 1956). It is possible that the great variability found in the mtDNA of *An. cruzii* is correlated with intraspecific polymorphism in other genes that can influence biting times, feeding and resting sites, and anthropophily (Lounibos and Conn, 2000). Further genetic studies with this scope would be welcome.

This study focused on two Cananeia sympatric populations and we do not know if all the resulting interpretations can be extended to populations from elsewhere. Nonetheless, it was an important step towards understanding relevant parameters related to the evolution and sympatry of these two species in a known autochthonous region of malaria in Brazil.

Competing interests

The authors declare that they do not have competing interests.

Authors' contributions

C.L., J.S.L.P., and L.S. conceived the study, carried out data analysis, interpreted the results, and wrote the manuscript. C.L. collected data in the field. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

A number of people provided field and laboratory assistance or mosquito samples used in the study. We are especially grateful to Maria Anice Mureb Sallum, Luiz Carlos de Oliveira, Décio Wach, Jair Donizete da Silva, Francisco Alves dos Santos, Rui de Lima, and Solange Schiessl Lorenz. We thank Dr. Paulo Roberto Urbinatti for helping to photograph *Anopheles* larvae. Financial support: CNPq fellowship #140964/2013-4, FAPESP #2013/05521-9 and CAPES Research Grants #23038.005274/2011-24 and #1275/2011.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.011.

References

Besansky, N.J., Fahey, G.T., 1997. Utility of the white gene in estimating phylogenetic relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae). Mol. Biol. Evol. 14, 442–454.
Brower, A.V., 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. 14, 6491–6495.
Calado, D.C., Navarro-Silva, M.A., 2005. Identificação de *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* Dyar & Knab e *Anopheles* (*Kerteszia*) *homunculus* Komp (Diptera, Culicidae, Anophelinae) através de marcadores moleculares (RAPD e RFLP). Rev. Bras. Zool. 22, 1127–1133.
Carvalho-Pinto, C.J.D., Lourenço-de-Oliveira, R., 2004. Isoenzimatic analysis of four *Anopheles* (Kerteszia) *cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 471–475.
Clement, M., Posada, D.C.K.A., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol. 9, 1657–1659.
David, B., Laurin, B., 1996. Morphometrics and cladistics: measuring phylogeny in the sea urchin Echinocardium. Evolution 50, 348–359.
De Azeredo-Espin, A.M.L., 2011. O Código de Barras da Vida baseado no DNA "Barcoding of Life": Considerações e Perspectivas. São Paulo Press.
Deane, L.M., 1988. Malaria studies and control in Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2, 223–230.
Downs, W.G., Pittendrigh, C.S., 1946. Bromeliad malaria in Trinidad, British West Indies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1, 47–66.
Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol. Biol. 7, 214.
Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol. Biol. Evol. 8, 1969–1973.
Dujardin, J.P., 2008. Morphometrics applied to medical entomology. Infect. Genet. Evol. 8 (875), 890.
Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 5, 1792–1797.
Forattini, O.P., 1962. Entomologia Médica, vol. 1. Editora da Faculdade de Higiene e Saúde Pública, São Paulo Press.
Forattini, O.P., 2002. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia. EDUSP, São Paulo Press.
Fu, Y.X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147, 915–925.
Gaunt, M.W., Miles, M.A., 2002. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with paleontological and biogeographic landmarks. Mol. Biol. Evol. 5, 748–761.
Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sytsma, K.J., 2011. Phylogeny, adaptative radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. Am. J. Bot. 5, 872–895.
Gómez, G.F., Márquez, E.J., Gutiérrez, L.A., Conn, J.E., Correa, M.M., 2014. Geometric morphometric analysis of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) reveals significant effect of environmental factors on wing traits and presence of a metapopulation. Acta Trop. 135, 75–85.
Henry, A., Thongsripong, P., Fonseca-Gonzalez, I., Jaramillo-Ocampo, N., Dujardin, J. P., 2010. Wing shape of dengue vectors from around the world. Infect. Genet. Evol. 10, 207–214.
Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405, 907–913.
Jowett, T., 1986. Preparation of nucleic acids. In: Roberts, D.B. (Ed.), Drosophila a Practical Approach. Roberts DB Press, Oxford.
Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Mol. Ecol. Res. 11, 353–357.
Krzywinski, J., Wilkerson, R.C., Besansky, N.J., 2001. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. Mol. Phylogenet. Evol. 3, 479–487.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Mol. Biol. Evol. 6, 1695–1701.
Levine, R.S., Peterson, A.T., Benedict, M.Q., 2004. Geographic and ecologic distributions of the *Anopheles gambiae* complex predicted using a genetic algorithm. Am. J. Trop. Med. Hyg. 70, 105–109.
Lima, M.M., 1952. Do diagnóstico diferencial entre o *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* e o *Anopheles* (*Kerteszia*) *homunculus* na fase larvária. Rev. Bras. Malariol. Doencas Trop. 4 (401), 411.
Lockwood, C.A., Kimbel, W.H., Lynch, J.M., 2004. Morphometrics and hominoid phylogeny: support for a chimpanzee—human clade and differentiation among great ape subspecies. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 4356–4360.
Lorenz, C., Marques, T.C., Sallum, M.A.M., Suesdek, L., 2012. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. Parasit. Vectors 5, 1–7.
Lounibos, L.P., Conn, J.E., 2000. Malaria vector heterogeneity in South America. Am. Entomol. 4, 238–249.
Lozovei, A.L., Silva, M.A.N., 1999. 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. 16, 957–966.
Malafronte, R.S., Marrelli, M.T., Ramirez, C.C.L., Nassar, M.N., Marinotti, O., 2007. Intraspecific variation of second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA among populations of *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 44, 538–542.
Marrelli, M.T., Malafronte, R.S., Sallum, M.A., Natal, D., 2007. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. Malar. J. 6, 127–135.
Minh, B.Q., Nguyen, M.A.T., Von-Haeseler, A., 2013. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. Mol. Biol. Evol. 5, 1188–1195.
MOME (Morphometrics in Medical Entomology), 2010. Available at: <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/>. Accessed 12/Apr/2015.
Papadopoulou, A., Anastasiou, I., Vogler, A.P., 2010. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. Mol. Biol. Evol. 7, 1659–1672.
Petersen, V., Devicari, M., Suesdek, L., 2015. High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses. Parasit. Vectors 8, 128–137.
Pina-Costa, A.D., Brasil, P., Santi, S.M.D., Araujo, M.P.D., Suárez-Mutis, M.C., Oliveira-Ferreira, J., Daniel-Ribeiro, C.T., 2014. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 109, 618–633.
Rachou, R.G., Moura-Lima, M., Ferreira-Neto, J.A., Martins, C.M., 1958. Alguns dados sobre o comportamento de mosquitos de Ponta Grossa (Florianópolis, Santa Catarina). Rev. Bras. Malar. 10, 417–427.
Ramirez, C.C.L., Dessen, E.M.B., 2000. Chromosome differentiated populations of cruzii: evidence for a third sibling species. Genetica 108, 73–80.
Reidenbach, K.R., Cook, S., Bertone, M.A., Harbach, R.E., Wiegmann, B.M., Besansky, N.J., 2009. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. BMC Evol. Biol. 1, 298–312.
Rohlf, F.J., 2003. TpsRelw, relative warps analysis [Computer program] Version 1.36. Dept Ecol. & Evol., St. Univ. New York, Stony Brook.
Rohlf, F.J., 2003. TpsRegr, shape regression [Computer program] Version 1.28. Dept Ecol. & Evol., St. Univ. New York, Stony Brook.
Rohlf, F.J., 2004. TpsUtil, file utility program [Computer program] Version 1.26. Dept Ecol. & Evol., St. Univ. New York, Stony Brook, New York.
Rohlf, F.J., 2006. TpsDig2, digitize landmarks and outlines [Computer program] Version 2.10. Dept Ecol. & Evol St. Univ. New York, Stony Brook.
Rona, L.D., Carvalho-Pinto, C.J., Gentile, C., Grisard, E.C., Peixoto, A.A., 2009. Assessing the molecular divergence between *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* populations from Brazil using the timeless gene: further evidence of a species complex. Malar. J. 8, 60.
Rona, L.D.P., Carvalho-Pinto, C.J., Mazzoni, C.J., Peixoto, A.A., 2010. Estimation of divergence time between two sibling species of the *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* complex using a multilocus approach. BMC Evol. Biol. 10, 91–100.
Rona, L.D., Carvalho-Pinto, C.J., Peixoto, A.A., 2013. Evidence for the occurrence of two sympatric sibling species within the Anopheles (Kerteszia) cruzii complex in southeast Brazil and the detection of asymmetric introgression between them using a multilocus analysis. BMC Evol. Biol. 13, 207.
Rosa-Freitas, M.G., Lourenco-de-Oliveira, R., Carvalho-Pinto, C.J., Flores-Mendoza, C., Silva-do-Nascimento, T.F., 1998. Anopheline species complexes in Brazil: current knowledge of those related to malaria transmission. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93, 651–655.
Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R., 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19, 2496–2497.
Rúa, G.L., Quiñones, M.L., Vélez, I.D., Zuluaga, J.S., Rojas, W., Poveda, G., Ruiz, D., 2005. Laboratory estimation of the effects of increasing temperatures on the duration of gonotrophic cycle of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 5, 515–520.
Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R.C., Conn, J.E., McKeon, S.N., Levin, D.M., Quiñones, M.L., Linton, Y.M., 2012. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (Anopheles: Nyssorhynchus) of Neotropical malaria vectors. Parasit. Vectors 5, 1–12.
Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Wilkerson, R.C., 2000. Phylogeny of anophelinae (Diptera Culicidae) based on morphological characters. Ann. Entomol. Soc. Am. 4, 745–775.
Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A., Wilkerson, R.C., 2002. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. Syst. Entomol. 27, 361–382.
SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Brazil) <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Accessed 03/Feb/2015.
Smith, L.B., 1952. Bromeliad malaria. Annu. Rep. Smithson. Inst. 92, 385–398.
StatSoft, Inc., 2004. Statistica for Windows [Computer program manual]. StatSoft, Inc, Tulsa, OK. Available at: <http://www.statsoft.com>.
Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123, 585–595.
Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2013. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 6.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596–1599.
Ueno, H.M., Forattini, O.P., Kakitani, I., 2007. Vertical and seasonal distribution of Anopheles (*Kerteszia*) in Ilha Comprida, Southeastern Brazil. Rev. Saúde Pública 41, 269–275.
Vaidya, G., Lohman, D.J., Meier, R., 2001. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics 2, 171–180.
Veloso, H.P., Moura, J.V., Klein, R.M., 1956. Delimitação Ecológica dos anofelinos do subgênero *Kerteszia* na região costeira do sul do Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 54, 517–520.
Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.W., Lambkin, C., Yeates, D.K., 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. Proc. Natl. Acad. Sci. 14, 5690–5695.
Wilkerson, R.C., Peyton, E.L., 1991. The Brazilian malaria vector *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii*: life stages and biology (Diptera: Culicidae). Mosq. Syst. 23, 110–122.
Xie, W., Lewis, P.O., Fan, Y., Kuo, L., Chen, M.H., 2010. Improving marginal likelihood estimation for Bayesian phylogenetic model selection. Syst. Biol. 2, 150–160.
Zavortink, T.J., 1973. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. Contrib. Am. Entomol. Inst. 9, 1–54.
Zavortink, T.J., Poinar, G.O., 2000. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *dominicanus* (Diptera: Culicidae) from Dominican amber. Ann. Entomol. Soc. Am. 6, 1230–1235.
Zhang, D.X., Hewitt, G.M., 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. Insect Mol. Biol. 6, 143–150.

Lorenz *et al. Malar J (2015) 14:408*
DOI 10.1186/s12936-015-0934-6

MALARIA JOURNAL

RESEARCH

Open Access

Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil

Camila Lorenz[1,2*†], Flávia Virginio[1,2†], Breno S. Aguiar[4], Lincoln Suesdek[1,2,3] and Francisco Chiaravalloti-Neto[4]

Abstract

Background: Mosquitoes, *Plasmodium* parasites, and humans live in sympatry in some extra-Amazonian regions of Brazil. Recent migrations of people from Amazonia and other countries to extra-Amazonian regions have led to many malaria outbreaks. Lack of relevant expertise among health professionals in non-endemic areas can lead to a neglect of the disease, which can be dangerous given its high fatality rate. Therefore, understanding the spatial and temporal epidemiology of malaria is essential for developing strategies for disease control and elimination. This study aimed to characterize imported (IMP) and autochthonous/introduced (AU/IN) cases in the extra-Amazonian regions and identify risk areas and groups.

Methods: Epidemiological data collected between 2007 and 2014 were obtained from the Notifiable Diseases Information System of the Ministry of Health (SINAN) and from the Department of the Unified Health System (DATASUS). High malaria risk areas were determined using the Local Indicator of Spatial Association. IMP and AU/IN malaria incidence rates were corrected by Local Empirical Bayesian rates.

Results: A total of 6092 malaria cases (IMP: 5416, 88.9 %; AU/IN: 676, 11.1 %) was recorded in the extra-Amazonian regions in 2007–2014. The highest numbers of IMP and AU/IN cases were registered in 2007 (n = 862) and 2010 (n = 149), respectively. IMP cases were more frequent than AU/IN cases in all states except for Espírito Santo. Piauí, Espírito Santo, and Paraná states had high incidences of AU/IN malaria. The majority of infections were by *Plasmodium falciparum* in northeast and southeast regions, while *Plasmodium vivax* was the predominant species in the south and mid-west showed cases of dual infection. AU/IN malaria cases were concentrated in the coastal region of Brazil, which contains the Atlantic Forest and hosts the *Anopheles* transmitters. Several malaria clusters were also associated with the Brazilian Pantanal biome and regions bordering the Amazonian biome.

Conclusion: Malaria is widespread outside the Amazonian region of Brazil, including in more urbanized and industrialized states. This fact is concerning because these highly populated areas retain favourable conditions for spreading of the parasites and vectors. Control measures for both IMP and AU/IN malaria are essential in these high-risk areas.

Keywords: Malaria, Imported, Autochthonous, Introduced, Epidemiology, Bromeliad-malaria, Outbreaks, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*

Background

Malaria remains a major public health problem in Brazil, with approximately 145,000 cases reported in 2014 [1]. Most of the malaria cases occur in the Brazilian Amazonia region (the Amazon Biome), an endemic area of malaria in which the mosquito *Anopheles darlingi* is incriminated as the main vector [2]. However, recent migrations of people from the Amazonian region and/or other countries to the extra-Amazonian regions led to outbreaks of secondary imported cases (i.e. introduced malaria) [3–6]. It is important to note that mosquitoes, *Plasmodium*, and humans also live in sympatry in some extra-Amazonian regions. An example of this is the dynamic "bromeliad malaria" [7], in which autochthonous cases are associated with the Atlantic Forest biome

*Correspondence: camilalorenz@usp.br
†Camila Lorenz and Flávia Virginio contributed equally to this work
[1] Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, São Paulo CEP 05509-300, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Lorenz et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

where *Kerteszia* subgenus is considered the primary vector of malaria [8].

In Brazil, mainly three *Plasmodium* species are associated with native human malaria cases: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum,* and *Plasmodium malariae* [1]. The relative incidence of each *P. vivax* and *P. falciparum* malaria was approximately 50 % in 1988 [9]. A shift occurred after 1990, when 44.3 % of cases were due to *P. falciparum*, and by 2014 *P. vivax* became the predominant species in the Amazonian region, with only 16.18 % of cases being due to *P. falciparum*. Although *P. vivax* causes a less dangerous type of malaria associated with low mortality, the morbidity in endemic communities is very high, which makes it similar in this regard to *P. falciparum* [9].

Only 19 % of all malaria cases in the extra-Amazonian regions are diagnosed and treated within 48 h after symptoms onset, in contrast to 60 % of malaria cases in the Amazonian region. This may explain the high proportion of severe malaria cases in non-endemic areas. Accordingly, the malaria fatality rate in the extra-Amazonian regions is higher than in the Amazonian region [6]. Furthermore, the lack of expertise among health professionals of non-endemic areas in diagnosis and management of malaria [6] and poor general public knowledge serve as aggravating factors in disease treatment and control [10, 11]. For instance, malaria is frequently misdiagnosed as dengue in the city of Rio de Janeiro [12].

Understanding the epidemiology of malaria in the temporal and spatial dimensions is essential for planning control strategies and disease elimination. Therefore, the aims of this study were to: (a) characterize cases of autochthonous/introduced (AU/IN) and imported (IMP) malaria in the extra-Amazonian regions in 2007–2014; (b) assess the dynamics of the etiological agents of malaria in Brazil (Amazonian and extra-Amazonian regions) and from other countries; and (c) detect risk areas and groups.

Methods

This was a descriptive study to evaluate the occurrence of AU/IN and IMP malaria in the following Brazilian states of the extra-Amazonian regions (Fig. 1): south: Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), and Paraná (PR); southeast: São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES), and Minas Gerais (MG); northeast: Piauí (PI), Ceará (CE), Rio Grande do Norte (RN), Paraiba (PB), Pernambuco (PE), Alagoas (AL), Sergipe (SE), and Bahia (BA); and mid-west: Goiás(GO), Mato Grosso do Sul (MS), and Distrito Federal (DF). These states together comprise 4762 municipalities [13].

According to the epidemiological malaria classification of the World Health Organization [14], the cases of this study were classified into (1) IMP: cases of malaria contracted outside the area where the diagnosis was made; (2) AU: cases of malaria contracted in the city or county where the diagnosis was made; and (3) IN: direct secondary cases if they constituted the first local transmission link after a known IMP case. AU and IN cases were combined because available data do not permit one to distinguish between them; IMP cases from the Amazonian region and from other countries were also pooled for the same reason.

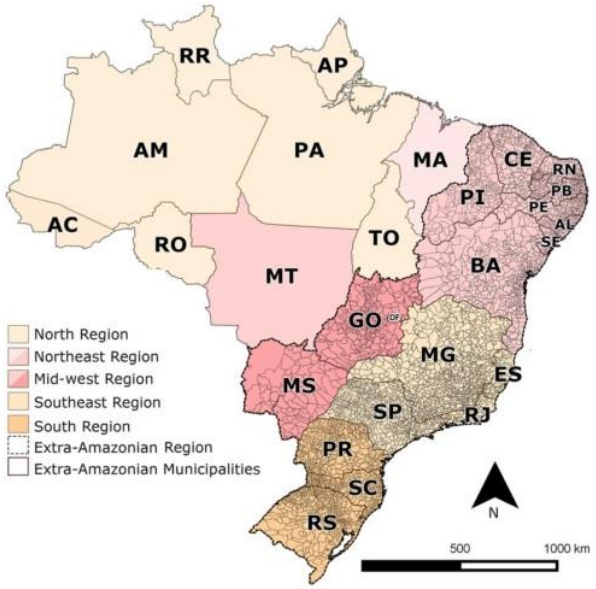


Fig. 1 Map of Brazil showing the States belonging to the extra-Amazonian region. Modified from IBGE [13]

Reports of malaria cases were obtained from the Notifiable Diseases Information System (SINAN), which is publicly available from the Department of the Unified Health System (DATASUS), Brazilian Ministry of Health (see Additional file 1). The following information about malaria cases that occurred between 2007 and 2014 was collected: case classification (AU/IN or IMP), parasitological analysis result (*P. vivax*, *P. falciparum*, or both), sex, age group, year of occurrence, residence municipality, country of infection, and occurrence of death. Parasitological analysis results positive for *P. falciparum* or [*P. falciparum* + *P. falciparum* gametocyte] were considered to represent *P. falciparum* infection. Furthermore, numbers of inhabitants according to state and year were obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics [13].

The information on municipality and year was incorporated into the georeferenced map of the municipalities belonging to the extra-Amazonian regions, which was made available by the IBGE in latitude-longitude

projection and Datum SIRGAS 2000. Incidence rates were calculated according to the year and case classification in the entire extra-Amazonian region and in the individual states during the study period. The proportional distribution of malaria cases by *Plasmodium* type, geographical region, and malaria mortality rates for all the extra-Amazonian regions according to year for the entire study period was obtained in DATASUS [15].

The incidence rates of AU/IN and IMP malaria and mortality rates were calculated throughout the study period for all the municipalities of the extra-Amazonian regions. Spatial aggregation patterns of these rates were assessed using the Local Moran Index or Local Indicator of Spatial Association (LISA), which allowed identifying significant spatial clusters ($\alpha < 0.05$). Among the 4 possible groups identified by LISA, the group was chosen that is used to classify locations according to the "high–high" category (i.e. spatial units with high malaria rates surrounded by units with high malaria rates, which can be characterized as high-risk cluster areas) [16].

AU/IN and IMP malaria incidence rates were obtained for the following three stages according to municipalities: beginning (2007), middle (2010), and ending (2014). To correct for distortions in the incidence rates caused by random fluctuations resulting from small populations of some municipalities, the Local Empirical Bayesian rate was used to re-estimate the settlement rate based on neighbours and municipality population [17, 18]. The neighbourhood criterion was contiguity (i.e. locations that share a side or point were defined as neighbours).

The graphs were created using the software Statistica 7.0 [19] and Microsoft Excel (Microsoft, 1987). To construct maps and detect spatial clusters, we used QGIS 2.8.3.Wien, TerraView 4.1.0, GeoDa 1.6.7.9, and Adobe Photoshop 1.6 (Adobe Systems, San Jose 165, CA, USA).

Results

Temporal epidemiology

Between 2007 and 2014, 6092 malaria cases (IMP: 5416, 88.9 %; AU/IN: 676, 11.1 %) were recorded in the extra-Amazonian regions. All cases were confirmed by thick blood smears. The years with the highest number of IMP and AU/IN cases were 2007 (862 cases, incidence rate of 0.52 cases per 100,000 inhabitants-year) and 2010 (149 cases, incidence rate of 0.09 cases per 100,000 inhabitants-year), respectively (Fig. 2). In 2014, both IMP and AU/IN malaria had the lowest incidence rates.

IMP cases were more frequent than AU/IN cases in all states except ES (Fig. 3). The mid-west region had the highest IMP malaria incidence rates between 2007 and 2014. PI also had more IMP cases than other northeast states. The incidence rates of AU/IN malaria were higher than the average total rate in the extra-Amazonian regions (0.05 cases/100,000 inhabitants-year) in PR, ES, and PI. According to parasitological examinations, the patterns of *P. vivax* and *P. falciparum* infections were similar among the reported cases in the northeast and

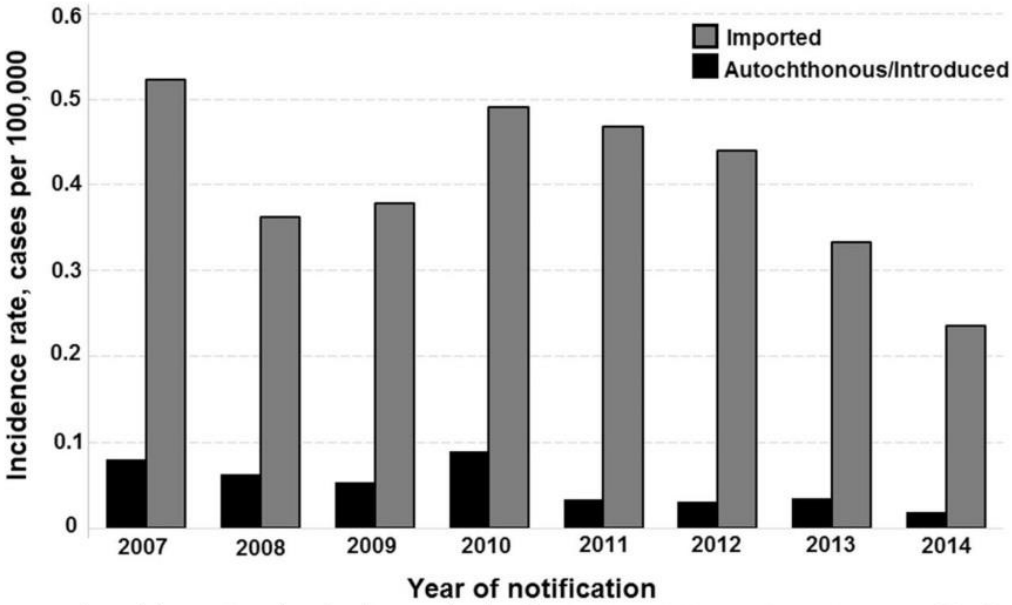


Fig. 2 Incidence rates of autochthonous/introduced and imported malaria from 2007 to 2014 in extra-Amazonian region of Brazil

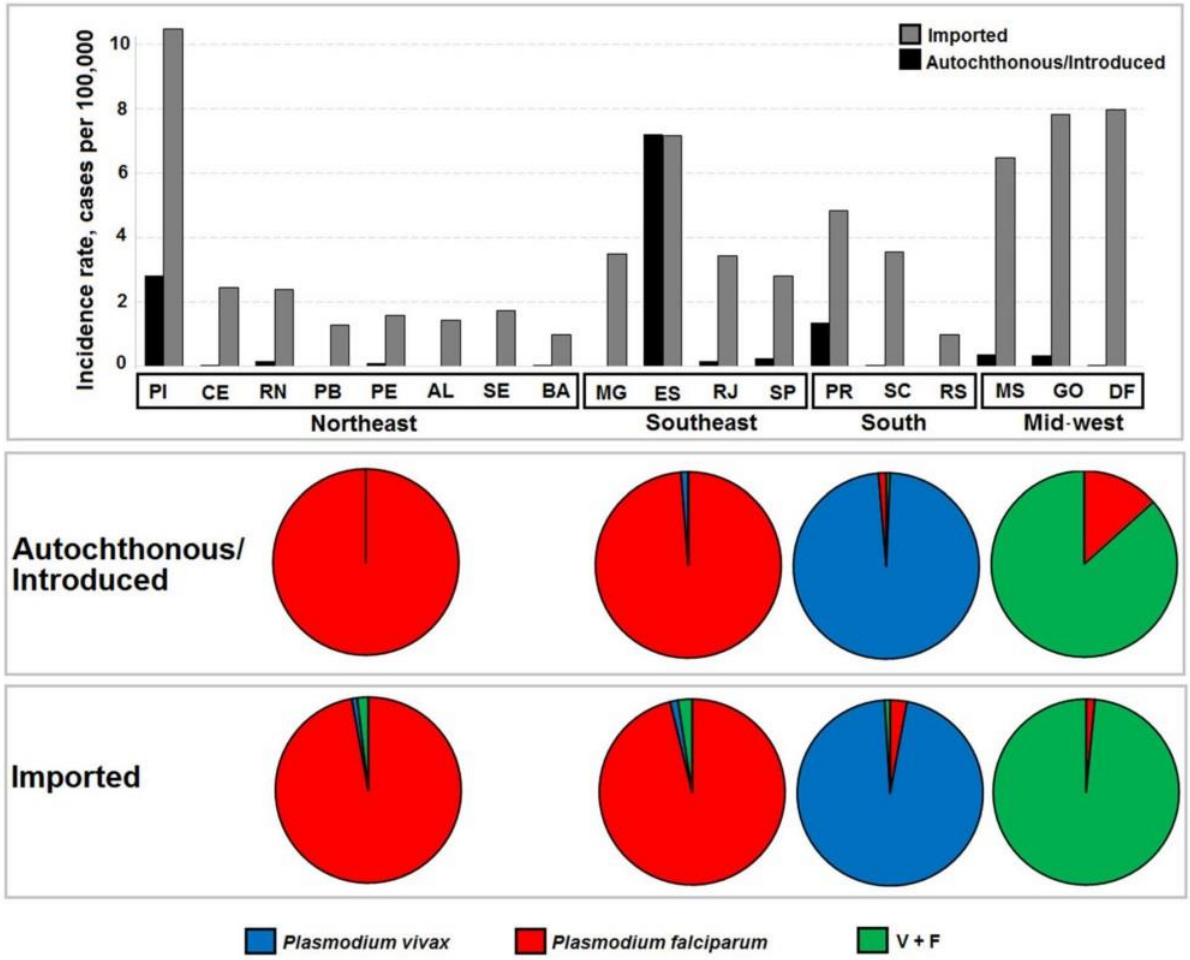


Fig. 3 Incidence rates of autochthonous/introduced and imported malaria cases (per 100,000 inhabitants/year) by state from 2007 to 2014 in extra-Amazonian region of Brazil and proportional presence of *Plasmodium* in each region. The incidence rate was calculated based on follow raw data: autochthonous/introduced cases by municipality of infection; imported cases by residence municipality. Positive parasitological results to *P. vivax* (*blue*), *P. falciparum* (*red*) and double-infection (*green*)

southeast regions. A large number of *P. falciparum* infections were observed as IMP and AU/IN cases in these regions. *Plasmodium vivax* infection was predominant in the south, representing 98 % of the total AU cases and 97 % of the IMP cases. A high number of double-infection cases (i.e. with two species of *Plasmodium* present in patient's blood) were observed in the mid-west region.

During the eight-year study period, there were 40 deaths from malaria in the extra-Amazonian regions. The overall mortality rate varied widely between the years (Fig. 4) and did not follow the distribution of malaria cases, peaking in 2011 (9 deaths, 0.0054 deaths per 100,000 inhabitants/year). Men accounted for 80 % of IMP and 75 % of AU/IN malaria cases. The highest incidence for both types of malaria infections was in the 20–30 years age group.

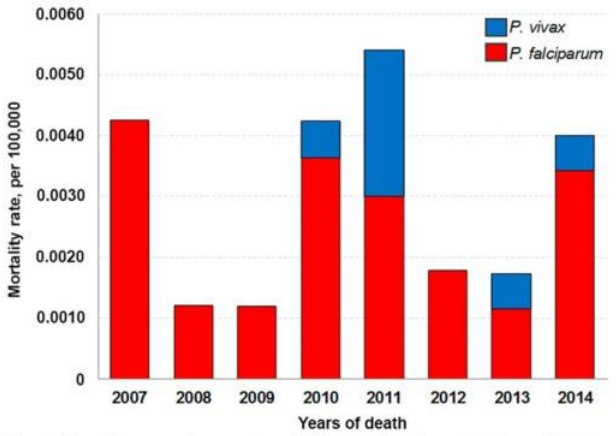


Fig. 4 Mortality rate by species of *Plasmodium* from 2007 to 2014 in extra-Amazonian region of Brazil. Data of 2007–2013 were obtained from Mortality Information System (SIM/DATASUS); data of 2014 were obtained from SVS-MS Epidemiological Bulletin [1]

Over the last few years, *P. falciparum* has been responsible for the majority of IMP and AU/IN malaria cases in the extra-Amazonian regions (Fig. 5). In addition, a significant decrease in incidence rate in recent years is evident. IMP cases originated from other countries to extra-Amazonian region are shown in Fig. 6. Africa was the main source of foreign IMP cases in the eight-year study period (1110), followed by South America (520). Most IMP cases were caused by *P. falciparum*.

Spatial epidemiology

The IMP and AU/IN malaria incidence rates in the extra-Amazonian regions varied within the 8-year study period (Figs. 7, 8), with the lowest values for both observed in 2014. The incidence rates of AU/IN cases were lower than those of IMP cases in the majority of municipalities analysed. The highest occurrence of AU/IN cases was in 2010, with >100 cases per 100,000 inhabitants-year after Bayesian correction in one municipality (São Miguel do Iguaçu in PR).

When the cases were grouped according to the species of *Plasmodium* (Figs. 9, 10), a clear separation was observed between the states for both IMP and AU/IN infections: *P. vivax* malaria was concentrated in the south (mainly in PR), double-infection malaria occurred predominantly in the mid-west, and *P. falciparum* cases were registered throughout the rest of the country. Similar spatial patterns were found in the IMP and AU/IN maps because the types of *Plasmodium* infection were the same, suggesting that IMP cases may have initiated the AU/IN cases (outbreaks).

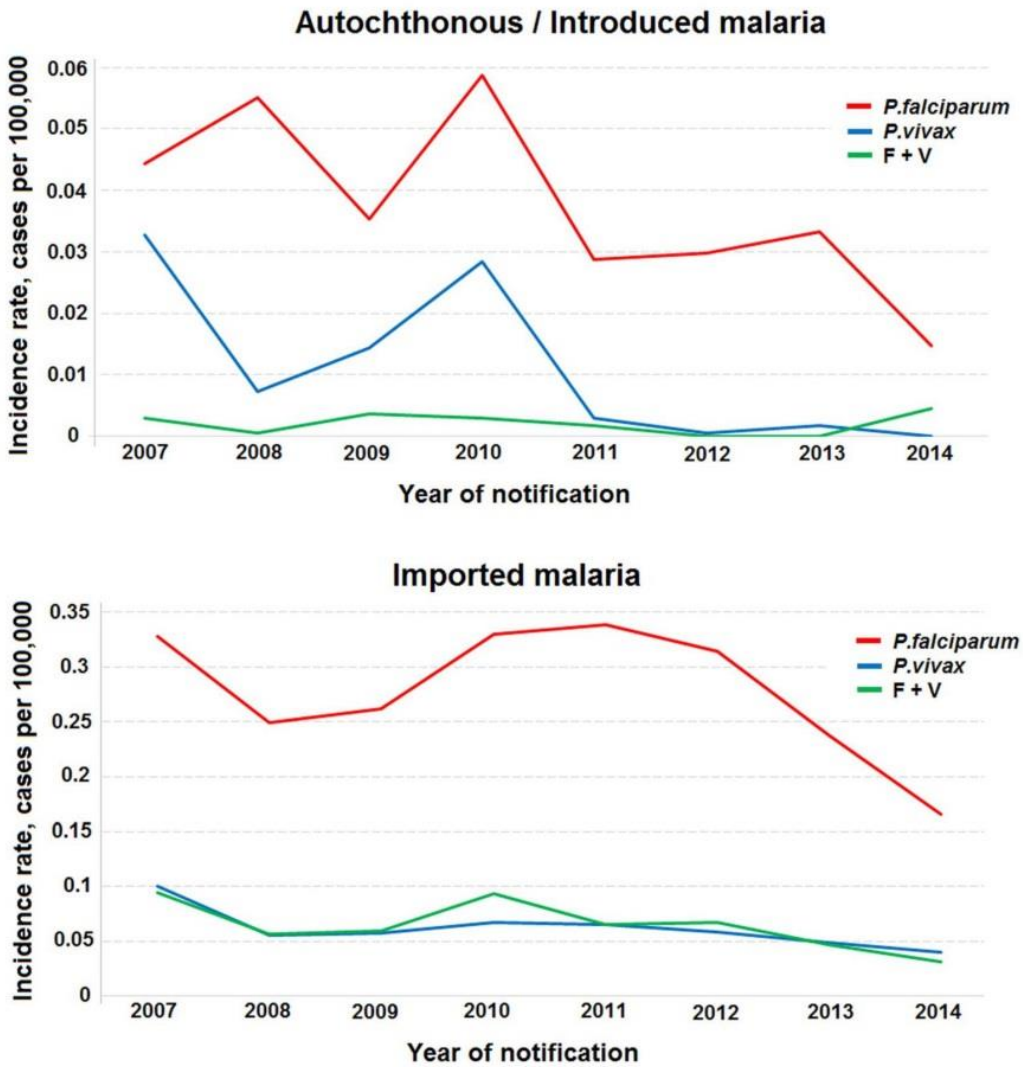


Fig. 5 Incidence rates of autochthonous/introduced and imported malaria cases by parasitological result from 2007 to 2014 in extra-Amazonian region of Brazil. *P. vivax* (*blue*), *P. falciparum* (*red*) and double-infection (*green*)

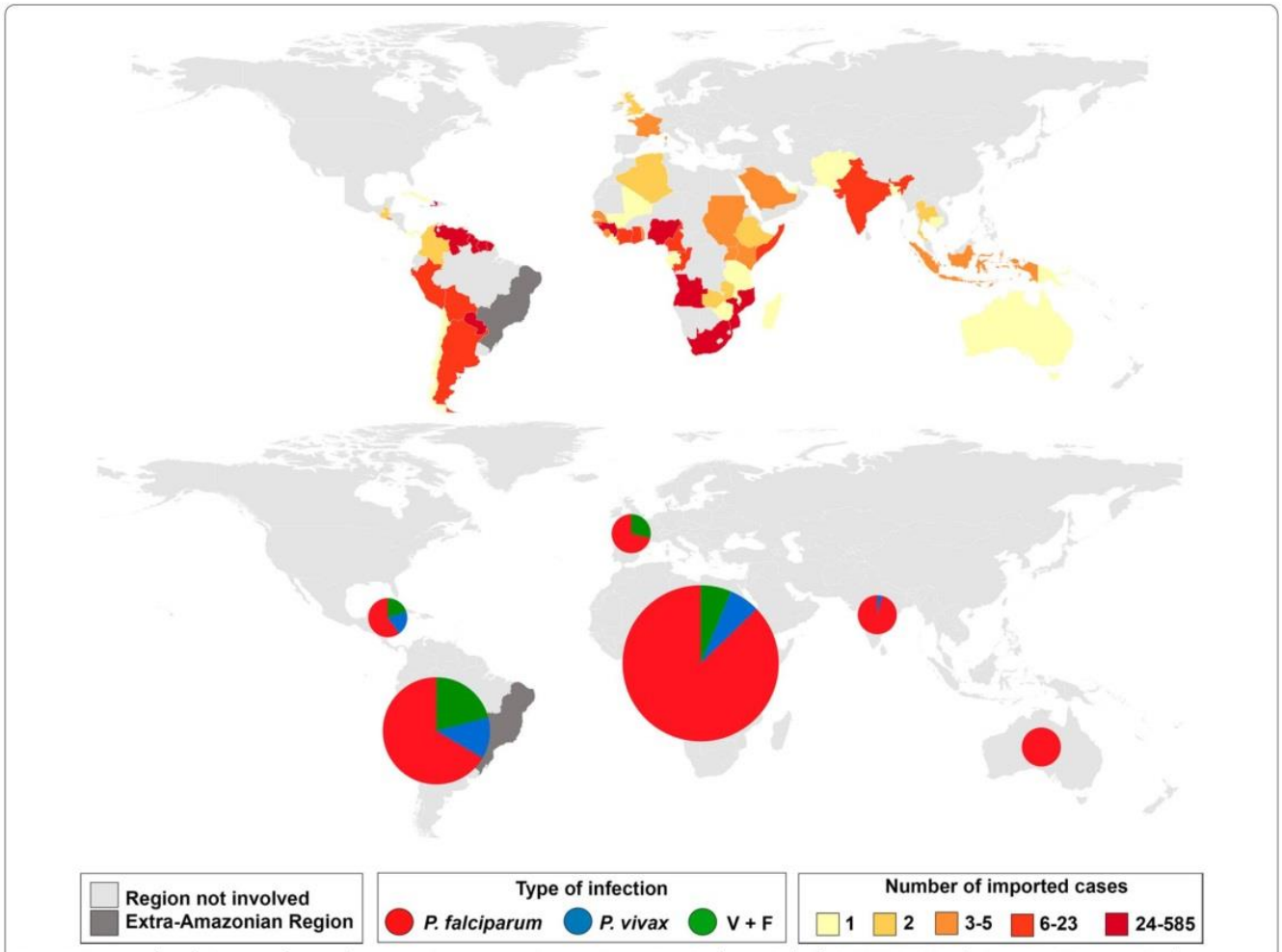


Fig. 6 Imported malaria cases from other countries to extra-Amazonian region in the period of 2007–2014. North America: 51 cases; South America: 520 cases; Africa: 1,100 cases; Europe: 7 cases; Asia: 24 cases; Oceania: 1 case. *P. vivax* (*blue*), *P. falciparum* (*red*) and double-infection (*green*)

High-risk clusters distributed in the extra-Amazonian regions were also grouped according to the types of *Plasmodium* infection during 2007–2014 (Fig. 11). An important high-risk area for AU/IN malaria was situated in SP and ES, which represent the Atlantic Forest biome. IMP cases were spread throughout all the Brazilian regions.

Discussion

Autochthonous/introduced and imported cases in extra-Amazonian regions

The number of IMP and AU/IN malaria cases in the Brazilian extra-Amazonian regions has declined in recent years. This coincides with the reduction in the number of malaria cases in the Amazonian region observed between 2007 and [1, 6] and with the 37 % drop in the worldwide incidence of malaria since 2000 [20]. This general trend reflects the 20-fold increase in global investments into eradication of the disease in the last 15 years [20]. Specifically in Brazil, the following preventive measures adopted by the population have been the main factor responsible for the decrease in the number of cases: use of personal protective equipment against insect bites, especially in risk areas; use of insecticide-treated mosquito nets; use of nets on doors and windows; use of repellent; and avoiding bathing sites during periods of higher activity of mosquitoes [21]. Although 99 % of malaria cases recorded in Brazil occurred in the Legal Amazon [22], the extra-Amazonian areas deserve special attention because of their large populations (about 87 % of the Brazilian population as reported by the IBGE in 2015 [13]). Furthermore, regions with mosquitoes, *Plasmodium,* and humans living in sympatry would facilitate AU/IN outbreaks.

The higher number of IMP malaria cases than AU/IN cases registered in the extra-Amazonian regions, with the exception of ES, could be a consequence of the increased migration of workers to endemic regions due to recent economic development and construction of hydroelectric

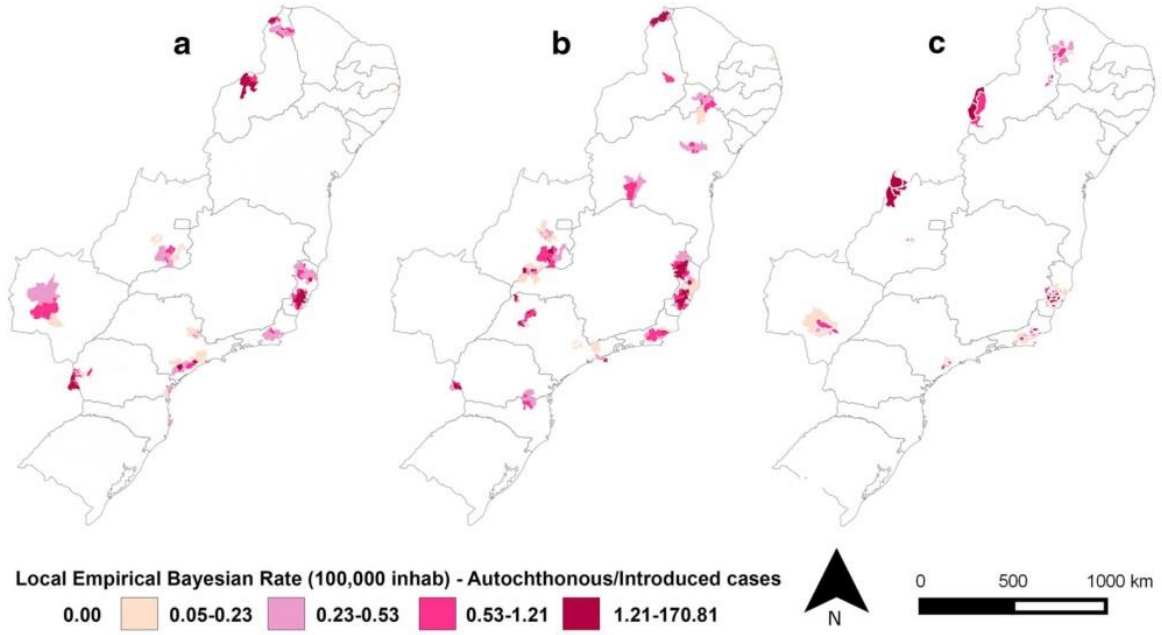


Fig. 7 Bayesian incidence rates of autochthonous/introduced (AU/IN) malaria in **a** 2007, **b** 2010 (year with most cases) and **c** 2014 in extra-Amazonian region of Brazil. In this analysis the species of *Plasmodium* were grouped

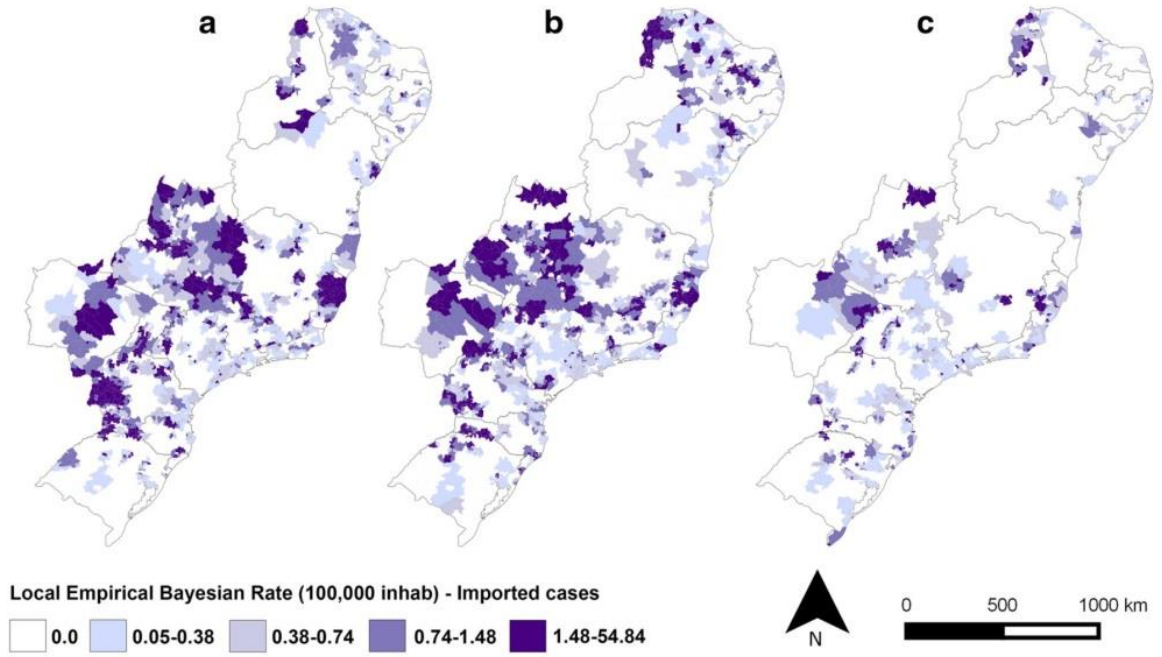


Fig. 8 Bayesian incidence rates of imported (IMP) malaria in **a** 2007, **b** 2010 and **c** 2014 in extra-Amazonian region of Brazil. In this analysis the species of *Plasmodium* were grouped

plants [6]. In addition, the level of international migration to Brazil has been high in the last years. Thus, approximately 455,000 people migrated from foreign countries during 2000–2010. This resulted in significant increases in numbers of international migrants in GO, ES, and MG [13]. There was also a recent increase in the number of malaria cases imported from Africa in SP and RJ [23]. These patterns of migration to different regions

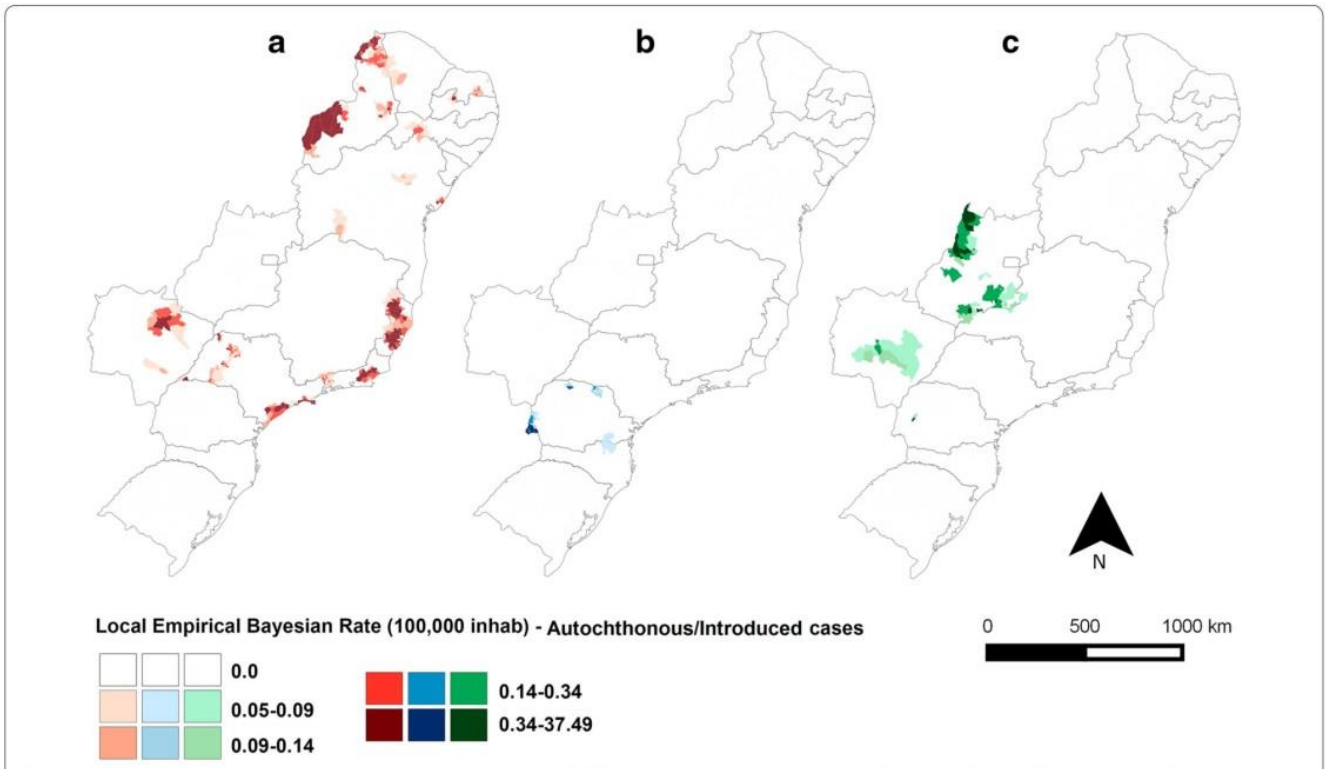


Fig. 9 Bayesian incidence rates of autochthonous/introduced (AU/IN) malaria separate by species of *Plasmodium*: **a** *P. falciparum*, **b** *P. vivax* and **c** double-infection, in extra-Amazonian region of Brazil in the period of 2007–2014

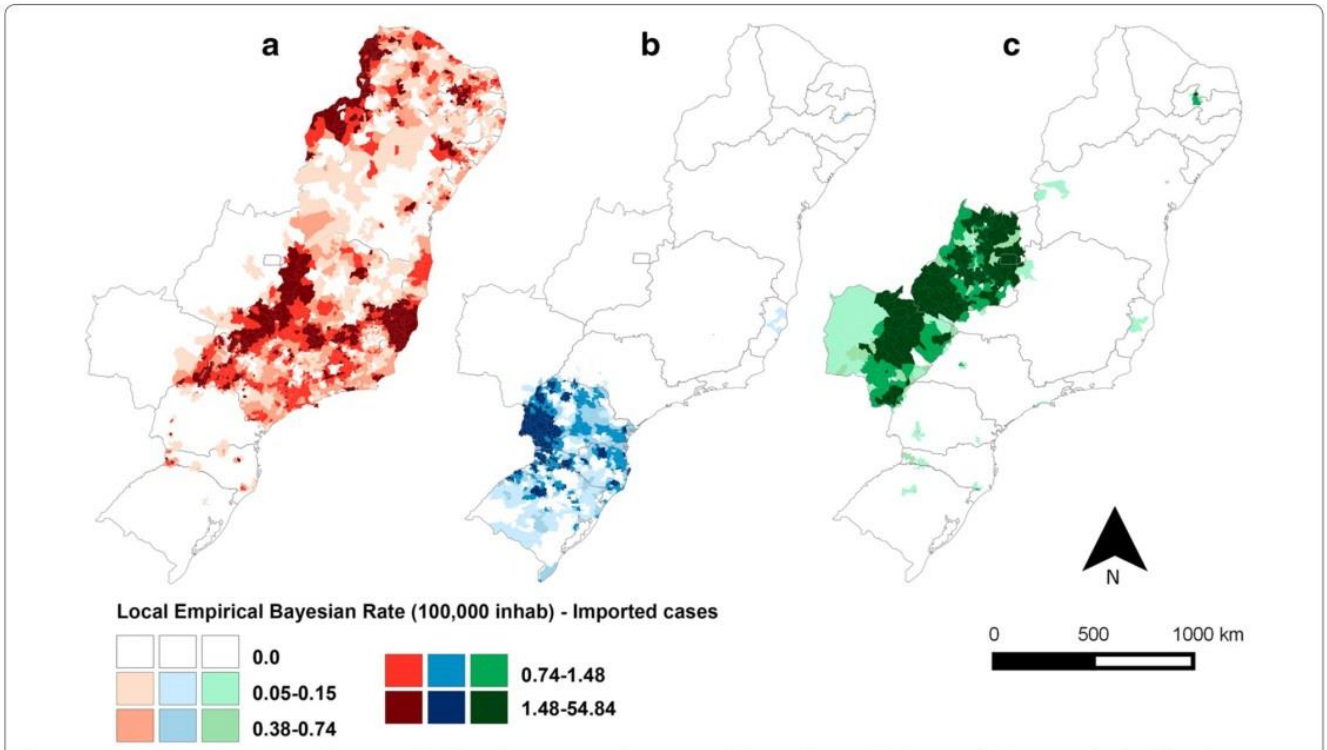


Fig. 10 Bayesian incidence rates of imported (IMP) malaria separate by species of *Plasmodium*: **a** *P. falciparum*, **b** *P. vivax* and **c** double-infection, in extra-Amazonian region of Brazil in the period of 2007–2014

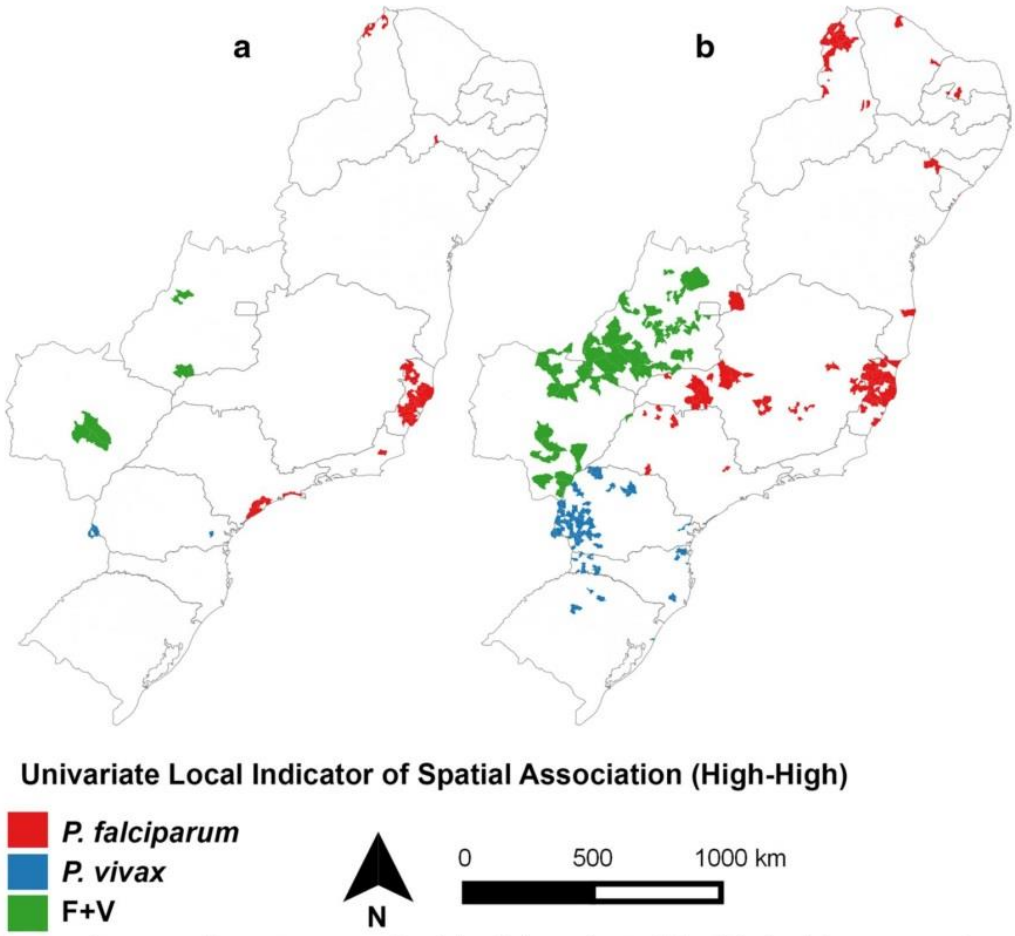


Fig. 11 Map of municipalities in extra-Amazonian regions of Brazil classified, according to LISA, with high risk for occurrence of **a** autochthonous/introduced (AU/IN) malaria and **b** imported (IMP) malaria according species of *Plasmodium*. *P. vivax* (*blue*), *P. falciparum* (*red*) and double-infection (*green*)

of the country, lack of clinical management skills among health professionals, and limited number of locations for malaria diagnosis have created a serious public health concern in the non-endemic areas.

For cases of AU/IN malaria, there are two different contexts of transmission that were grouped in this study: outbreaks from IMP cases (introduced malaria) and bromeliad malaria [7]. Outbreaks usually occur when there is a combination of three factors: migration from the Amazonian region, presence of competent vector (usually *Anopheles darlingi*), and a susceptible population group. In such environment, one IMP case can lead to several IN cases. On the other hand, the frequency of bromeliads malaria remains virtually constant in the Atlantic Forest, with *An. cruzii* serving as the primary vector [24–27]. As an example, a high incidence rate of AU malaria observed in Espírito Santo can be explained by the topography and climatic characteristics that favour mosquito breeding. *An. darlingi* and *Anopheles aquasalis* have been incriminated as vectors of IN malaria in Espírito Santo, with the former present within the state and the latter restricted to maritime regions [28].

Spatial epidemiology and risk groups

It was possible to outline the social profile of the subpopulation predominantly infected with malaria in the extra-Amazonian regions. Thus, the highest percentage of cases occurred in men of economically active age (20–39 years), suggesting that employment-driven displacement of population is one of the reasons for IMP malaria infections in the endemic areas. In addition, about 2400 men, mostly young adults aged 20–29 years, migrated between Brazilian states in 2005–2010 [29]. Similar results for both endemic and non-endemic regions were found in other published studies [30–38]. Furthermore, men are expected to have a higher rate of AU infections because they tend to visit native forests more often than women [39, 40]. Knowledge of these variables is

critical to identifying the populations at risk and increasing awareness among medical professionals.

It was observed that IMP and AU/IN cases have a similar *Plasmodium* type infection pattern in all the analysed regions. This is probably because individuals with IMP malaria are generally asymptomatic and serve as *Plasmodium* reservoirs in regions that harbour the mosquito vector. This allows the parasite to maintain its lifecycle and be transmitted to other humans through this mosquito species, giving rise to AU malaria cases. The presence of such a cycle is evident from the large overlap between the specific areas of IMP and AU/IN cases when compared simultaneously. Bromeliad malaria is mainly concentrated in the Atlantic Forest region where the *Kerteszia* subgenus is responsible for infections (Fig. 12). According to the literature, monkey species in some of these regions may also serve as reservoirs of *Plasmodium* [26, 27, 41]. On the other hand, the vector *An. darlingi* is primarily responsible for IN malaria outbreaks in most regions of Brazil owing to its high transmission capacity and distribution throughout about 80 % of the country [9].

The overall mortality rate fluctuated between 2007 and 2014 and did not follow the distribution of malaria cases. Some municipalities had high malaria mortality rates, which may be due to lack of experience in the health community to diagnose malaria in non-endemic areas [42–45]. The vast majority of deaths were due to *P. falciparum*, which causes the most dangerous type of infection [46]. There was a peak in deaths due to *P. vivax* in 2011 that may be related to the delay in disease detection and/or treatment. Furthermore, in the last 10 years, a pattern of unusual clinical complications and fatal cases associated with *P. vivax* has been reported in Brazil [9] and should be investigated.

Plasmodium species and their distribution

In this study an unusual pattern of AU/IN infections predominantly by *P. falciparum* in the Northeast and Southeast regions was observed. One possible explanation for this fact may be under-reporting by *P. vivax*. Since infections by *P. vivax* are generally benign and often asymptomatic, patients do not seek medical attention. Furthermore, especially in the extra-Amazonian regions, febrile malaria caused by *P. vivax* is often mistaken for other diseases (e.g. dengue) [12] and is not reported correctly. Thus, the number of *P. vivax* infections may be underestimated, which may obscure the actual scenario that occurs in the extra-Amazonian regions.

On the other hand, an unexpectedly high prevalence of *P. falciparum* was recently found in the blood of asymptomatic donors living in the southeast Brazilian Atlantic forest [47]. Additionally, Laporta et al. [48] showed that *P. falciparum* actively circulates, in higher proportion than *P. vivax*, among *Anopheles* mosquitoes in parts of the southeast Brazilian Atlantic forest. Therefore, a high rate of *P. falciparum* transmission by *Kerteszia* mosquitoes may challenge the classical bromeliad-malaria paradigm.

Almost all cases reported in 2007–2014 in the south were caused by *P. vivax*. PR had a high rate of AU malaria, with a high-risk cluster situated in the region of Foz do Iguaçu. Although the other southern states (SC and RS)

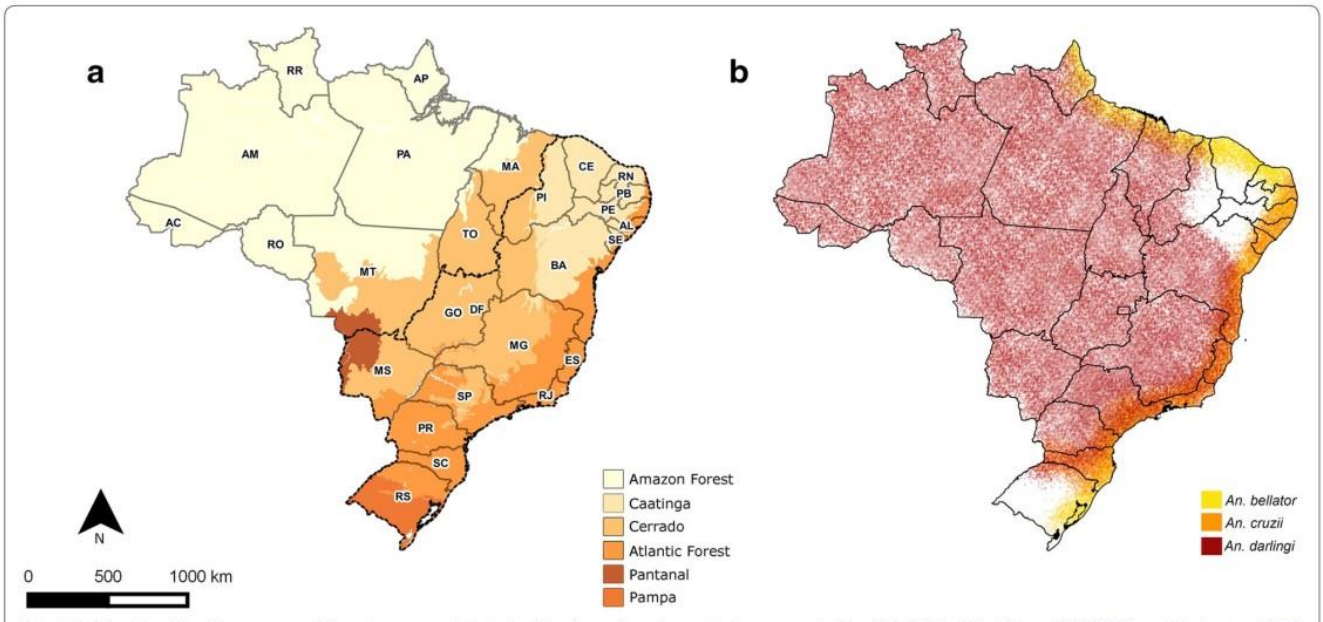


Fig. 12 The Brazilian biome map (**a**) and geographical distribution of major malaria vectors in Brazil (**b**). Modified from IBGE [13] and Sinka et al. [53]

had no cases of AU malaria in the study period, this does not exclude the possibility that malaria of this type occurred in these states. Asymptomatic patients with undiagnosed and untreated *Plasmodium* malaria have been detected in Atlantic Forest areas, which may allow maintenance of the parasite in this region [42, 49]. In line with these facts is the current presence of vector species circulating in those locations and capable of contributing to a possible outbreak.

The frequency of both IMP and AU/IN malaria caused by *P. falciparum* and *P. vivax* has been decreasing in the extra-Amazonian regions since 2007. Cases of double-infection are concentrated mainly in the mid-west, and their numbers remain constant. Future climate change may influence the distribution of the disease, which is dependent on the distribution of *Anopheles* mosquitoes that are competent of transmitting *P. falciparum* [50]. Moreover, the status of species not previously incriminated as vectors can change with changes in the landscape of the region, such as deforestation and rising temperatures. For example, the hitherto neglected epidemiological importance of *albitarsis* complex members in malaria transmission in South America might be to increase in the next years it [50].

Temporal epidemiology

There was a significant decrease in both IMP and AU/IN cases in the extra-Amazonian regions in the last years. Nevertheless, some regions in PI had high incidence of IMP malaria. Chagas et al. [51] found that most of these cases were imported from Suriname or Maranhão (Amazonian region). Another cluster that often had a high malaria rate was observed in the region of Foz do Iguaçu, PR. This region is home to the Itaipu hydroelectric plant and, according to Ferreira [52], the following factors contributed to the occurrence of AU malaria there: (1) presence of cities or localities situated near the reservoir and other water bodies suitable for breeding of *An. darlingi*; (2) professional activities and recreational fishing that began after the impoundment; and (3) housing types (i.e. huts and wooden buildings) that allow easy access of mosquitoes. It is important to emphasize that PR had the highest percentage of international immigrants during the last 10 years in Brazil [29], which could have contributed to the increase in IMP malaria cases. The Pantanal biome region (see Fig. 12), which covers MS, also contains high-risk clusters of malaria because it is a highly preserved area that hosts the vector *An. darlingi* [53].

Although the numbers of malaria cases are relatively low, the disease is still present in all extra-Amazonian regions of Brazil. For example, an unusual increase in AU cases has been recently documented in the Rio de Janeiro state [54]. A surveillance system should be established and prepared to successfully overcome challenges associated with asymptomatic or oligosymptomatic *Plasmodium* infections [55] occurring in these regions. Since the 1980s, there has been a need for comprehensive serological studies in some areas with high-risk clusters [56]. Preventive active search may be a tool for the epidemiological surveillance of AU malaria. Continuous progress in epidemiological surveillance is necessary in these extra-Amazonian areas to assess vulnerability and susceptibility in different regions and enable rapid diagnosis and treatment across the healthcare network [57]. In addition to mapping risk areas, it will be useful to re-evaluate vector species that potentially contribute to the transmission because continuous reintroduction of *Plasmodium* and malaria is expected in controlled areas.

Conclusions

Cases of malaria were detected between 2007 and 2014 throughout the extra-Amazonian regions of Brazil, which are vulnerable owing to climatic conditions and the presence of competent vectors. The number of IMP cases was higher than that of AU cases because of more active human migration. AU/IN cases were linked to the native forests, which serve as breeding sites of *Anopheles*, or related to outbreaks from IMP cases.

The observed unusual pattern of AU/IN infections predominantly by *P. falciparum* may be due to under-reporting of *P. vivax* malaria or a high rate of *P. falciparum* transmission by *Kerteszia* mosquitoes, which challenges the classical bromeliad-malaria paradigm. IMP and AU/IN cases had similar *Plasmodium* type infection patterns in all the analysed regions, probably because individuals with IMP malaria are generally asymptomatic and serve as *Plasmodium* reservoirs in regions that harbour the mosquito vector.

In the extra-Amazonian regions, malaria has become a problem that mainly affects isolated subpopulations with certain social characteristics (e.g. housing types) or professional activities. Therefore, adequate education of individuals at risk and health professionals is necessary. In addition, means of rapid diagnosis should be implemented in these regions to prevent serious adverse events or deaths from malaria.

Additional file

Additional file 1. Raw data from Notifiable Diseases Information System (SINAN) used in all analyses of this study.

Authors' contributions

CL, FV, and FCN conceived the study and carried out data analysis. CL, FV, BSA, LS, and FCN carried out results interpretation and written the manuscript. BSA produced all maps. All authors approved the final manuscript.

Author details
[1] Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, São Paulo CEP 05509-300, Brazil. [2] Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro-Instituto de Ciências Biomédicas-USP, São Paulo, Brazil. [3] Instituto de Medicina Tropical, Avenida Dr Enéas Carvalho de Aguiar, 470, São Paulo CEP 05403-000, Brazil. [4] Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av Dr Arnaldo, 715, São Paulo CEP 05509-300, Brazil.

Acknowledgements
Fellowship: FAPESP 2013/05521-9 and CAPES 23038.005274/2011-24.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Received: 6 March 2015 Accepted: 7 October 2015
Published online: 15 October 2015

References

1. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde 2015. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014—Ministério da Saúde. 2015; (46) No 25. ISSN 2358-9450.
2. Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. Rev Iber Parasitol. 1998;58:163–7.
3. Rey L. Bases da Parasitologia. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
4. Forattini OP. Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia, vol. II. EDUSP: São Paulo; 2002.
5. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasília. 2007. pp 1–6.
6. Pina-Costa AD, Brasil P, Santi SMD, Araujo MPD, Suárez-Mutis MC, Oliveira-Ferreira J, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:618–33.
7. Downs WG, Pittendrigh CS. Bromeliad malaria in Trinidad, British West Indies. Am J Trop Med Hyg. 1946;26:47–66.
8. Zavortink TJ. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. Cont Am Entomol Inst. 1973;9:1–54.
9. Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Review malaria in Brazil: an overview. Malar J. 2010;9:115–30.
10. Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais. O perfil das doenças transmissíveis. In: Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, Análise da Situação de Saúde de Minas Gerais. Secretaria Estadual de Saúde, Belo Horizonte. 2007. pp 66–70.
11. Limongi JE, Chaves KM, Paula MBCD, Costa FCD, Lopes IDS, Neto P, et al. Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:232–7.
12. Costa AP, Bressan CS, Pedro RS, Valls-de-Souza R, Silva S, Souza PR, et al. Diagnóstico tardio de malária em área endêmica de dengue na extra-Amazônia brasileira: experiência recente de uma unidade sentinela no Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43:571–4.
13. IBGE—Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. http://downloads.ibge.gov.br/downloads_geociencias.html. Accessed 20 Aug 2015.
14. WHO. Terminology of malaria and of malaria eradication. Report of a drafting committee. Geneva: World Health Organization; 1963.
15. DATASUS—Department of the Unified Health System, Ministério da Saúde. 2014. http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php. Accessed 10 Sep 2015.
16. Anselin L. Local indicators of spatial association—LISA. Geogr Anal. 1995;27:93–115.
17. Marshall RJ. Mapping disease and mortality rates using empirical Bayes estimators. Appl Stat. 1991; 283–94.
18. Bailey TC. Spatial statistical methods in health. Cad Saúde Pública. 2001;17:1083–98.
19. StatSoft, Inc: Statistica for Windows [Computer program manual]. Tulsa: OK: StatSoft, Inc. 2004. http://www.statsoft.com. Accessed 02 Sep 2015.
20. World Health Organization. World health statistics. 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671_eng.pdf. Accessed 15 Sep 2015.
21. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil. Brasília. 2011. pp 1–6.
22. FUNASA—Fundação Nacional de Saúde. Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal. Brasília: Funasa; 2000. http://www.funasa.gov.br. Accessed 5 Oct 2014.
23. Lupi O. Estudo dos casos suspeitos de malária importada, um Centro de Referência na região extra-Amazônica. Res pt. 2014;1:613.
24. Forattini OP. Entomologia médica, vol. I. Faculdade de Saúde Pública: São Paulo; 1962.
25. Aragão MB. Sobre a biomassa dos *Anopheles* do subgênero *Kerteszia* em seus criadouros. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1968;66:227–37.
26. Deane LM. Malaria vectors in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986;81:5–14.
27. Duarte AM, Pereira DM, de Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, Ribeiro AF, et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil. Parasit Vectors. 2013;6:58.
28. Meneguzzi VC, Santos CBD, Pinto IDS, Feitoza LR, Feitoza HN, Falqueto A. Use of geoprocessing to define malaria risk areas and evaluation of the vectorial importance of anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Espírito Santo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:570–5.
29. IBGE—Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. http://www.ibge.gov.br/home/. Accessed 01 Sep 2015.
30. Alves MJCP, Barata LCB, Barata RCB, Almeida MCRR, Gutierrez EB, Wanderley DMV, et al. Aspectos sócio-econômicos dos indivíduos com malária importada na região metropolitana de São Paulo, Brasil. I-Caracterização da população e conhecimento sobre a doença. Rev Saude Publ. 1990;24:253–8.
31. Andrade JCR, Wanderley DMV. Malária induzida no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1991;24:157–61.
32. Alves MJCP, Rangel O, Souza SSAL. Malária na região de Campinas, São Paulo, Brasil, 1980 a 1994. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33:53–60.
33. Marques GRAM, Condino MLF, Serpa LLN, Cursino TVM. Aspectos epidemiológicos de malária autóctone na mata atlântica, litoral norte, Estado de São Paulo, 1985–2006. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:386–9.
34. Couto RD, Latorre MRDO, Di Santi SM, Natal D. Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos de 1980 a 2007. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43:52–8.
35. Wanderley DMV, Andrade JCR, Alves MJCP, Alves MCGP, Mattos MR, Gurgel SM, et al. Malária no Estado de São Paulo: Avaliação de aspectos da vigilância epidemiológica. Cad Saúde Publ. 1989;5:296–304.
36. Wanderley DMV, Andrade JCR, Meneguetti LC, Chinelatto MJ, Dutra AP. Malária no Estado de São Paulo, Brasil, 1980 a 1983. Rev Saúde Publ. 1985;19:28–36.
37. Barroso WJ. A Malária de Mata Atlântica no Brasil. Informe Farmacêutico. 2003;15:1–3.
38. Capuano DM, Gomes AS, Polidorio SRB. Malária na região de Ribeirão Preto—São Paulo, Brasil—1984 a 1993. Rev Inst Adolfo Lutz. 1996;56:1–8.
39. Rezende HR, Soares RM, Cerutti C Jr, Alves IC, Natal D, Urbinatti PR, et al. Entomological characterization and natural infection of anophelines in an area of the Atlantic Forest with autochthonous malaria cases in mountainous region of Espírito Santo State, Brazil. Neotrop Entomol. 2009;38:272–80.
40. Cerutti C, Boulos M, Coutinho AF, Maria do Carmo LD, Falqueto A, Rezende HR, et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. Malar J. 2007;6:33.
41. Yamasaki T, Duarte AMRC, Curado I, Summa ME, Do Valle DD, Wunderlich G, et al. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. J Med Primatol. 2011;40:392–400.
42. Machado RLD, Couto AARA, Cavasini CE, Calvosa VSP. Malária em região extra-Amazônica: situação no Estado de Santa Catarina. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:581–6.
43. Braga MDM, Alcântara GC, Silva CND, Nascimento CGH. Cerebral malaria in Ceara: a case report. Rev Soc Bras Med Trop. 2004;37:53–5.
44. Marcondes CB, Marchi MJ. Estão os médicos de fora da Amazônia preparados para diagnosticar e tratar malária? Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43:477.
45. Tauil PL, Luz FDC, Oliveira APLD, Deckers FAL, Santos JB. Vivax malaria with long incubation period, detected in the Federal District: three case reports. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43:213–4.

46. Gomes AP, Vitorino RR, Costa ADP, Mendonça EGD, Oliveira MGDA, Siqueira-Batista R. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. Rev Bras Ter Inten. 2011;23:358–69.
47. Maselli LM, Levy D, Laporta GZ, Monteiro AM, Fukuya LA, Ferreira-da-Cruz MF. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* subclinical infection in non-endemic region: implications for blood transfusion and malaria epidemiology. Malar J. 2014;13:10–1186.
48. Laporta GZ, Burattini MN, Levy D, Fukuya LA, de Oliveira TMP, Maselli LMF. *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? Malar J. 2015;14:181.
49. Barroso WJ. A malária de mata Atlântica no Brasil. Informe Farmacêutico. 2003;15:1–3.
50. Laporta GZ, Linton YM, Wilkerson RC, Bergo ES, Nagaki SS, Sant'Ana DC, Sallum MAM. Malaria vectors in South America: current and future scenarios. Parasit Vectors. 2015;8:1–13.
51. Chagas MFB, Feitosa HP, Souza RMS, Costa MA. Malária: uma endemia (re) emergente no Piauí? Rev Soc Brasil Med Trop. 2005;38:329.
52. Ferreira MEMC. Ocorrência de malária na área de influência do reservatório de Itaipu–margem esquerda–Paraná, Brasil. Um estudo de geografia médica. São Paulo: Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo; 1996.
53. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vector. 2010;3:72.
54. SVS/MS-RJ—Boletim Epidemiológico 001/2015. Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2015. pp 1–6.
55. Couto RD, Latorre MRDO, Di Santi SM, Natal D. Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos de 1980 a 2007. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43:52–8.
56. Alves MJCP, Rangel O, Souza SSAL. Malária na região de Campinas, São Paulo, Brasil, 1980 a 1994. Rev Soc Bras Med Trop. 2000;33:53–60.
57. Albuquerque BC. Malária urbana em áreas endêmicas e não endêmicas. Rev Soc Brasil Med Trop. 2002;35:22–3.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Acta Tropica 152 (2015) 165–169

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Artificial Neural Network applied as a methodology of mosquito species identification

Camila Lorenz[a,b,*], Antonio Sergio Ferraudo[c], Lincoln Suesdek[a,d]

[a] Instituto Butantan—Avenida Vital Brasil, 1500, Sao Paulo CEP 05509-300, Brazil
[b] Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, Sao Paulo CEP 05508-000, Brazil
[c] Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Av. Prof Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, Sao Paulo CEP 14884-900, Brazil
[d] Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 January 2015
Received in revised form 29 August 2015
Accepted 17 September 2015

Keywords:
Wing
Geometric morphometrics
Parasite vector
Principal components
Artificial neural network

ABSTRACT

There are about 200 species of mosquitoes (Culicidae) known to be vectors of pathogens that cause diseases in humans. Correct identification of mosquito species is an essential step in the development of effective control strategies for these diseases; recognizing the vectors of pathogens is integral to understanding transmission. Unfortunately, taxonomic identification of mosquitoes is a laborious task, which requires trained experts, and it is jeopardized by the high variability of morphological and molecular characters found within the Culicidae family. In this context, the development of an automatized species identification method would be a valuable and more accessible resource to non-taxonomist and health professionals. In this work, an artificial neural network (ANN) technique was proposed for the identification and classification of 17 species of the genera *Anopheles*, *Aedes*, and *Culex*, based on wing shape characters. We tested the hypothesis that classification using ANN is better than traditional classification by discriminant analysis (DA). Thirty-two wing shape principal components were used as input to a Multilayer Perceptron Classification ANN. The obtained ANN correctly identified species with accuracy rates ranging from 85.70% to 100%, and classified species more efficiently than did the traditional method of multivariate discriminant analysis. The results highlight the power of ANNs to diagnose mosquito species and to partly automatize taxonomic identification. These findings also support the hypothesis that wing venation patterns are species-specific, and thus should be included in taxonomic keys.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Currently, 3,543 mosquito species of the Culicidae family have been identified (http://mosquito-taxonomic-inventory.info/, accessed 01/Dec/2014), but only about 200 of them are recognized vectors of pathogens that cause disease in humans, including viruses (arboviruses), filarial worms (helminths), and protozoa (malaria). These identified species are primarily members of the genera *Anopheles*, *Aedes*, and *Culex*. The relationship between mosquitoes and public health has driven much research, which focuses primarily on species of medical interest (Reidenbach et al., 2009). Correct identification of these species is essential, to both recognize the vectors involved in pathogen transmission, and to develop efficient control strategies (World Health Organization, 1995). Morphological identification of specimens is currently restricted to a small number of highly specialized professionals, owing to difficulty in character interpretation by the laity. Molecular identification of mosquito DNA samples remains a slow and expensive process for most laboratories.

In recent years, the geometric morphometrics technique (Bookstein, 1991; Rohlf and Marcus, 1993) has proven to be a useful tool for identifying species based on polymorphic morphological characters (Calle et al., 2002; Lorenz et al., 2012; Villemant et al., 2007). In the case of mosquitoes, the wing is more commonly analysed by morphometrics, owing to its two-dimensional feature and the ease by which researchers can obtain anatomical landmarks (Gómez et al., 2013; Jaramillo et al., 2014; Demari-Silva et al., 2014). Typically, morphometrical data are statistically assessed using multivariate discriminant analyses (DA) (Dujardin, 2008; Lorenz et al., 2014). Artificial Neural Networks (ANN) is another methodology recently utilized to identify organisms based on morphological traits (Hopfield, 1988; Wang, 2003; Yegnanarayana, 2009). ANN

* Corresponding author at: Instituto Butantan—Avenida Vital Brasil, 1500, Sao Paulo CEP 05509-300, Brazil.
E-mail address: camilalorenz@usp.br (C. Lorenz).

http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.011
0001-706X/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

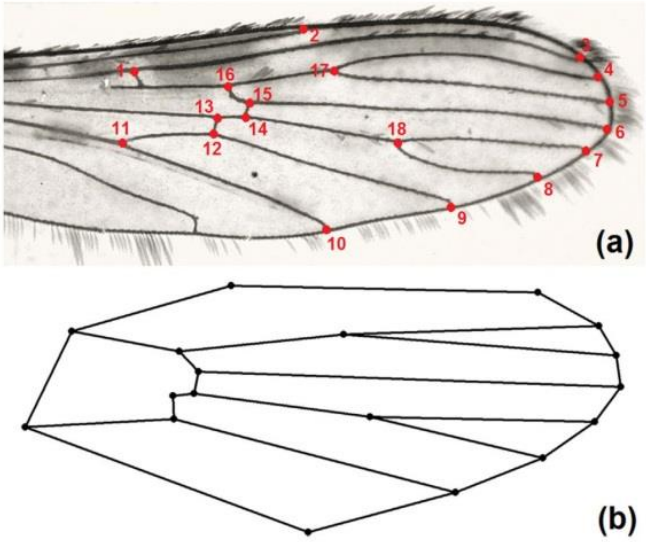


Fig. 1. Geometric Morphometrics. (a) Wing of *Anopheles triannulatus* showing the 18 landmarks used in analyses; (b) Hypothetical geometric diagram representing the wing portion considered in this study.

has been adopted from the field of computational intelligence and is being used with increasing frequency to classify biological organisms (Dobigny et al., 2002; Marcondes and Borges, 2000), due to its efficiency in handling large datasets and its generalizability. Some types of ANN employ ratios between dimensions of morphological structures to classify and identify species (Marcondes and Borges, 2000). Recent studies have also used genetic characters in ANNs to identify species of mosquito (Banerjee et al., 2008; Venkateswarlu et al., 2012).

An efficient classification system should be able to extract relevant features from biological data in order to distinguish species with minimal to no error. In this work, we combined geometric morphometrics and ANNs to explore the efficiency of this identification methodology in distinguishing among 17 mosquito species of the genera *Anopheles*, *Aedes,* and *Culex* based on wing shape. We hypothesized that ANN is a superior classification method in comparison to DA, the traditional method. DA has been widely used to make statistical inferences from morphometric data, but it is inaccurate and inefficient in some cases (Calle et al., 2002; Lorenz et al., 2012). We wish to further the development of an automatized species identification method, which would provide non-taxonomists with the ability to accurately and feasibly identify mosquitoes.

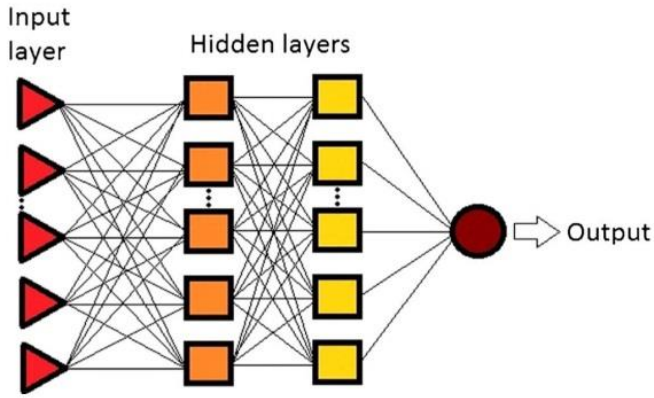


Fig. 2. Schematic representation of an artificial neural network with two hidden layers and one output.

2. Material and methods

Specimen identification was based on larvae, pupae, and adult mosquito characteristics compiled from the identification key proposed by Forattini (2002) and features suggested by Sallum et al. (2009). The geometric morphometrics analyzes were based on 18 points, called landmarks, marked on the right wing of each mosquito (Fig. 1). We used only right wings to follow the standard of other morphometric studies on culicids (Lorenz et al., 2012; Gómez et al., 2013). We believe that the use of solely right wing is enough representative, given that all species sampled showed no directional asymmetry (data not shown). We used 388 female specimens, because these are the ones that are hematophages, representing 17 species of the three major genera of disease vectors: *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex*. The species sampled and the sampling sites are described in Table 1.

Wings were photographed using a Leica DFC320 digital camera coupled to a Leica S6 microscope with 40× magnification. The landmarks were digitized using TpsDig v 1.40 software (Rohlf, 2006) and coordinate images were plotted onto a Cartesian plane for morphometric analysis. All digital images were scored by the principal author (CL) and the repeatability test considered the marking system acceptable. To reduce the original space of variables while preserving maximum information, we generated new latent variables called principal components. These are eigenvectors, built

Table 1
Information about mosquito species used in this study.

Genus	Species	N	Sampling site	Date	Geographic coordinates
Aedes	*Ae. aegypti*	35	São Paulo/SP	Jan-13	23°29′52.6″S/46°31′33.1″W
	Ae. albopictus	35	São Paulo/SP	Jan-13	23°29′52.6″S/46°31′33.1″W
Anopheles	*An. homunculus*	24	Pariquera-Açu/SP	Jul-14	24°53′25.6″S/47°50′16.0″W
	An. triannulatus s.l.	23	Minas Gerais/MG	Jan-14	20°03′56.3″S/48°58′10.3″W
	An. albitarsis s.l.	18	Minas Gerais/MG	Jan-14	20°03′56.3″S/48°58′10.3″W
	An. aquasalis	36	São Paulo/SP	Mar-14	23°29′52.6″S/46°31′33.1″W
	An. bellator	36	Pariquera-Açu/SP	Jul-14	24°53′25.6″S/47°50′16.0″W
	An. cruzii	24	Pariquera-Açu/SP	Jul-14	24°53′25.6″S/47°50′16.0″W
	An. darlingi	28	Manaus/AM	Nov-13	3°00′13.6″S/59°55′07.5″W
Culex	*Cx. sacchetae*	9	Pariquera-Açu/SP	Jul-14	24°53′25.6″S/47°50′16.0″W
	Cx. usquatus	17	Pariquera-Açu/SP	Jul-14	24°53′25.6″S/47°50′16.0″W
	Cx. atratus	10	Rio de Janeiro/RJ	Nov-14	22°56′46.8″S/43°17′09.6″W
	Cx. coronator	16	Manaus/AM	Nov-13	3°00′13.6″S/59°55′07.5″W
	Cx. ribeirensis	15	Rio de Janeiro/RJ	Nov-14	22°56′46.8″S/43°17′09.6″W
	Cx. cornirger	27	São Paulo/SP	Mar-14	23°29′52.6″S/46°31′33.1″W
	Cx. nigripalpus	19	Manaus/AM	Nov-13	3°00′13.6″S/59°55′07.5″W
	Cx. quinquefasciatus	16	São Paulo/SP	Mar-14	23°29′52.6″S/46°31′33.1″W

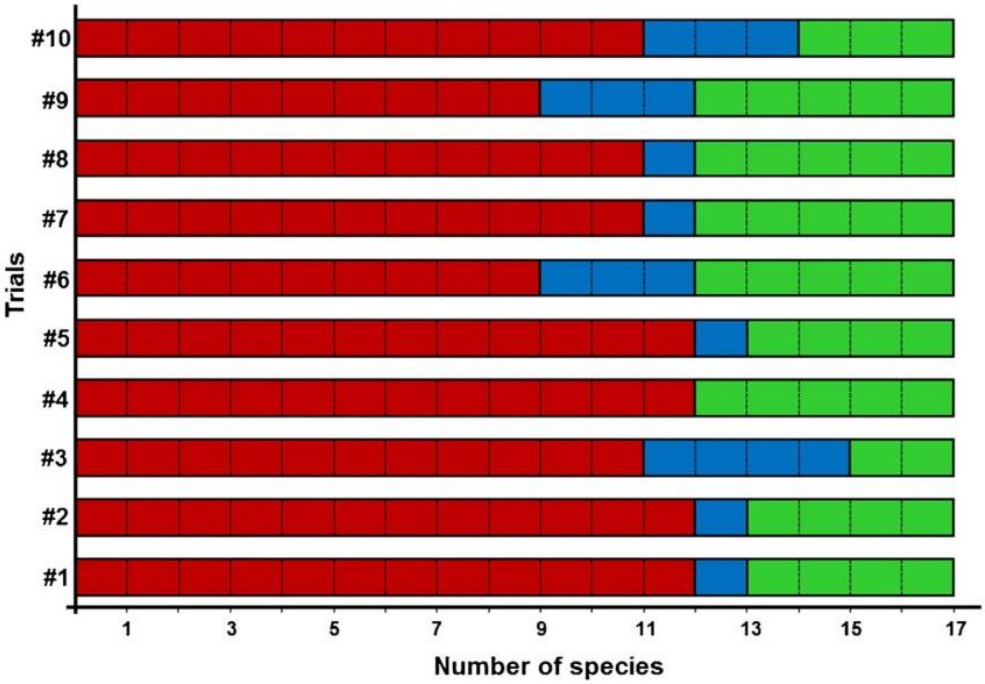


Fig. 3. Number of species that scored highest in correct classification using trials of ANNs. Each single block represents a species. The colours represent a better classification using ANN (red), DA (blue), or both approaches (green). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

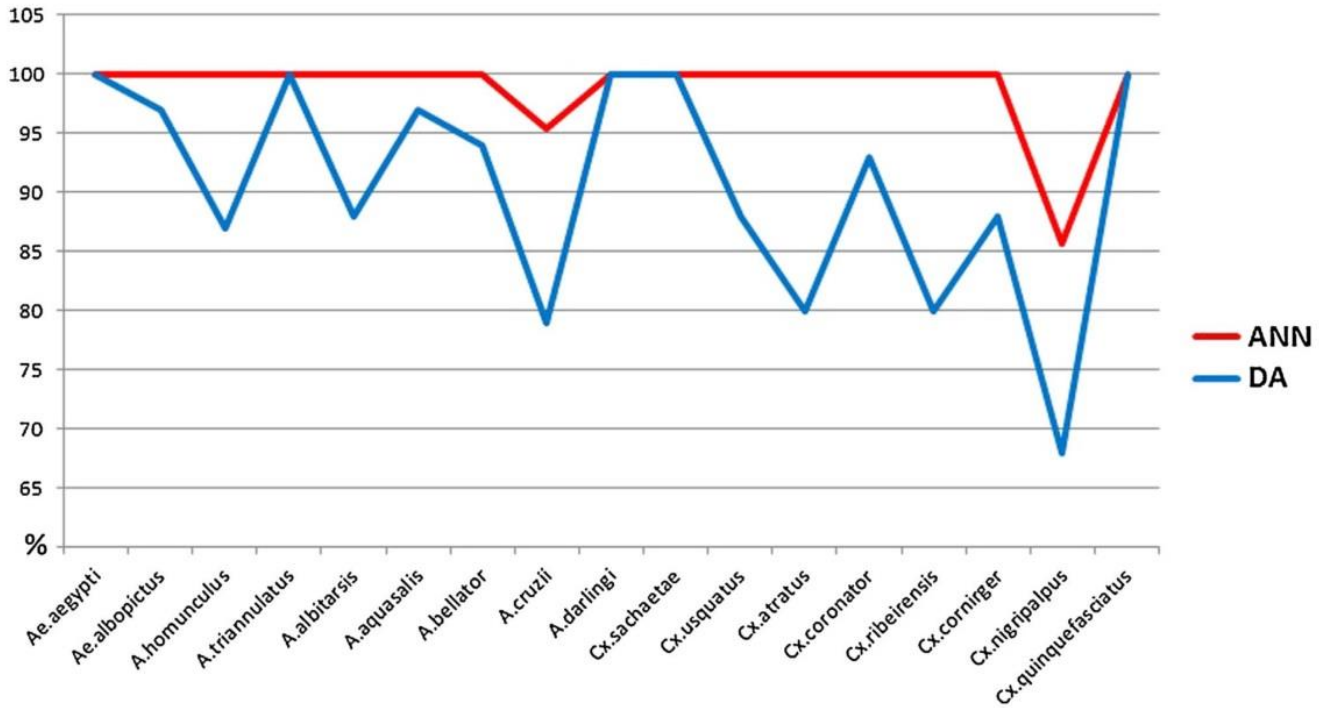


Fig. 4. A comparison between classification by Artificial Neural Network (ANN) and Discriminant Analysis (DA). We used 17 species; their scores of correct classification are represented on the *y*-axis (%).

with eigenvalues of the correlation matrix of the original variables. This Principal Component Analysis (PCA) was processed in the software MorphoJ 1.02 (Klingenberg, 2011). The 32 obtained principal components were used as input to an ANN using the software StatSoft, Inc. (2004). We calculate the allometric effect of all samples and it was not significant (2.54%; $p = 0.466$). The network model used was multi-layered for classification ("Multilayer Perceptron", Fig. 2) during the modelling process to determine the network topology. Phase 1 of the network had 100 epochs through a back propagation model, and phase 2 had 500 epochs through a conjugate gradient descendent model. Inner layers ranged from 1 to 4, containing up to 20 neurons each. Learning rates ranged from 0.1 to 0.5 and the momentum rate was 0.4. We used the logistic function as the activation function. A group of 300 individuals, randomly selected, were used as model training and 88 were reserved for validation. Discriminant analyses were performed to compare with

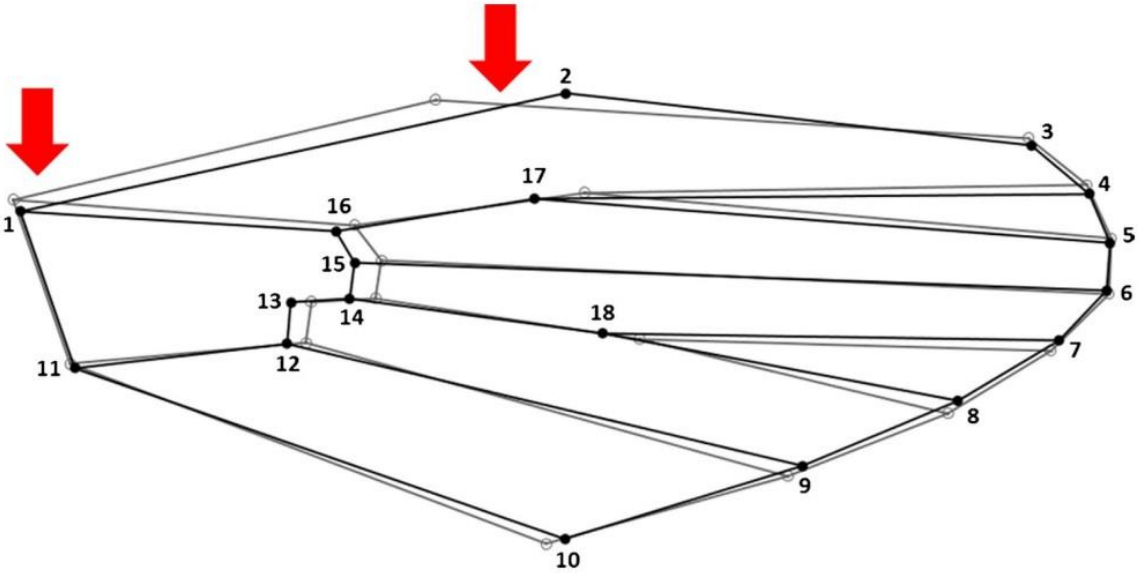


Fig. 5. Variation of the wing. The contours represent the most distinct extremes within the 17 sampled species. The arrows indicate landmarks of greatest variation in shape analysis after Procrustes superimposition.

ANN results and effectiveness. The software PADWIN (Dujardin, 2002) was used with cross-validation among groups.

3. Results and discussion

After heuristically testing several alternatives and comparing their respective performances, the most efficient topology was found to be that of 32 input neurons (corresponding to 32 principal components of wing shape), two hidden layers with 17 neurons each, and one output neuron. It is important to emphasize that ANN is a heuristic classification method, not an exhaustive one; therefore, different results from the same data set may be obtained. After the best network topology was chosen, we reran the same data for a total of 10 trials to verify the efficiency of ANNs (Fig. 3). All of the trials displayed better results than did the traditional discriminant analysis, and in all networks at least nine species obtained a better reclassification score.

We choose the best ANN (Fig. 3—Trial #4) to demonstrate its efficiency compared to discriminant analysis. Classification results ranged from 85.70% to 100%, a better score than the one obtained using discriminant analysis for most of the species (Fig. 4). Only *Anopheles cruzii* and *Culex nigripalpus* showed ranking scores lower than other species. These ANN results agreed with the DA scores, which were also lower in these two species.

The largest variation between species was observed in landmarks #1 and #2, located in the border of the wing (Fig. 5).

The combination of many principal components through ANNs allowed for highly accurate and reliable species identification, more efficient for most species than DA methodology. To statistically evaluate the geometric morphometrics data, the ANN method seems to be a good substitute for traditional DA; all ANN tests here resulted in greater than or equal identification accuracy. The great advantage of using ANN instead of traditional DA is the ability to handle large amounts of data quickly and the possibility of automating the process with constructed models.

This is the first study that has associated geometric morphometrics analysis with ANNs for identifying mosquito species. Using wing shape data as a network input speeds and reduces the process in comparison to the use of genetic data. For mosquitoes analysed in this study there are unique features in the wing venation that allow the correct identification of species. Our results also open a new question to be investigated: which other species present a species-specific pattern?

For a more complete and accurate identification, technique combination would be ideal, as would employing more specimens for method validation. Here, we show that it is possible to distinguish among mosquito species using the wing; however, further study is required that focuses on the combination of ANN with other methodologies to increase the accuracy of results. The classification method proposed here can aid in initial insect screening from the field, and is useful as a complementary tool of traditional identification keys. This technique should be tested in other species groups, such as complex or cryptic species, and in different populations of the same species to verify its effectiveness and generalizability.

Acknowledgements

Thanks to a number of people of the Butantan Institute and School of Public Health of USP who provided field and laboratory assistance or mosquito samples used in this study. C.L. is a fellow of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant #2013/05521-9. This investigation was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Grants #23038.005274/2011-24 and 1275/2011.

References

Banerjee, A.K., Kiran, K., Murty, U.S.N., Venkateswarlu, C., 2008. Classification and identification of mosquito species using artificial neural networks. Comput. Biol. Chem. 32, 442–447.

Bookstein, F.L., 1991. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press.

Calle, L., David, A., Quiñones, M.L., Erazo, H.F., Jaramillo, O., 2002. Morphometric discrimination of females of five species of Anopheles of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 1191–1195.

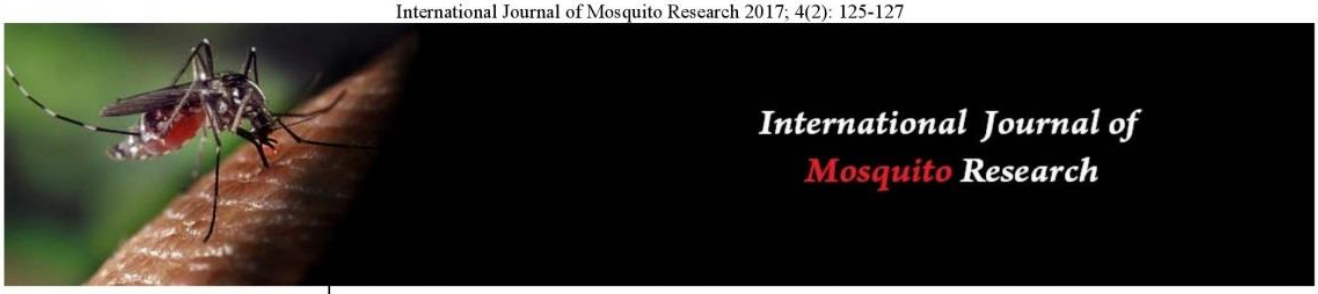
Demari-Silva, B., Suesdek, L., Sallum, M.A.M., Marrelli, M.T., 2014. Wing geometry of Culex coronator (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. Parasit Vectors 7, 174.

Dobigny, G., Baylac, M., Denys, C., 2002. Geometric morphometrics, neural networks and diagnosis of sibling *Taterillus* species (*Rodentia Gerbillinae*). Biol. J. Linn. Soc. 77, 319–327.

Dujardin, J.P., (2002). Permutations and discriminant analises (PAD). Available at: <mpl.ird.fr/morphometrics>.

Dujardin, J.P., 2008. Morphometrics applied to medical entomology. Infect. Gen. Evol. 8, 875–890.

Forattini, O.P. (2002). Culicidologia Médica: Identificação. Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Edusp, 2.
Gómez, G., Jaramillo, L., Correa, M.M., 2013. Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the Albitarsis Complex from Colombia. Mol. Ecol. Resour. 13 (6), 1082–1092.
Hopfield, J.J., 1988. Artificial neural networks. Circuits Devices Mag. IEEE 4, 3–10.
James Rohlf, F., Marcus, L.F., 1993. A revolution morphometrics. Trends Ecol. Evol. 8, 129–132.
Jaramillo, O.N., Fonseca-González, I., Chaverra-Rodríguez, D., 2014. Geometric morphometrics of nine field isolates of *Aedes aegypti* with different resistance levels to lambda-cyhalothrin and relative fitness of one artificially selected for resistance. PLoS One 9 (5), 1–15.
Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Mol. Ecol. Res. 11, 353–357.
Lorenz, C., Marques, T.C., Sallum, M.A.M., Suesdek, L., 2012. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. Bellator*. Parasit Vectors 5, 257.
Lorenz, C., Marques, T.C., Sallum, M.A.M., Suesdek, L., 2014. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii*. Parasit Vectors 7, 581.
Marcondes, C.B., Borges, P.S., 2000. Distinction of males of the Lutzomyia intermedia (Lutz & Neiva, 1912) species complex by ratios between dimensions and by an artificial neural network (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95 (5), 685–688.
Reidenbach, K.R., Cook, S., Bertone, M.A., Harbach, R.E., Wiegmann, B.M., Besansky, N.J., 2009. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. BMC Evol. Biol. 9, 298.
Rohlf, F.J., 2006. TpsDig. State University of New York at Stony Brook, Department of Ecology and Evolution, version 2.10.
Sallum, M. A., Dos Santos, C. L., Wilkerson, R.C., (2009). Studies on Anopheles (Kerteszia) homunculus Komp (Diptera: Culicidae). Walter Reed Army Inst of Research Silver Spring MD Dept of Entomology.
StatSoft, Inc., (2004). Statistica for Windows Computer Program Manual. Tulsa, OK: StatSoft, Inc.
Venkateswarlu, C., Kiran, K., Eswari, J.S., 2012. A hierarchical artificial neural system for genera classification and species identification in mosquitoes. Appl. Art. Intell. 26, 903–920.
Villemant, C., Simbolotti, G., Kenis, M., 2007. Discrimination of Eubazus (*Hymenoptera, Braconidae*) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. Syst. Entomol. 32 (4), 625–634.
Wang, Sun-Chong, 2003. Artificial neural network. In: Interdisciplinary Computing in Java Programming, Springer US, pp. 81–100.
World Health Organization. (1995). Vector Control for Malaria and Other Mosquito-Borne Diseases: report of a WHO study group.
Yegnanarayana, B. (2009). Artificial neural networks. PHI Learning Pvt. Ltd.



ISSN: **2348-5906**
CODEN: **IJMRK2**
IJMR 2017; 4(2): 125-127
© 2017 IJMR
Received: 17-01-2017
Accepted: 18-02-2017

Breviglieri E
1). Instituto Butantan - Avenida Vital Brazil, 1500, Sao Paulo, CEP, Brazil
2). Imperatriz Leopoldina School- Rua Pedro Doll, 240 - Santana, Sao Paulo, CEP, Brazil

Lorenz C
1). Instituto Butantan - Avenida Vital Brazil, 1500, Sao Paulo, CEP, Brazil
2). Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro - Instituto de Ciências Biomédicas- USP. Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, Sao Paulo, CEP, Brazil

Correspondence
Lorenz C
1). Instituto Butantan - Avenida Vital Brazil, 1500, Sao Paulo, CEP, Brazil
2). Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro - Instituto de Ciências Biomédicas- USP. Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, Sao Paulo, CEP, Brazil

Biodiversity of culicidae in a fragment of Atlantic forest, Sao Paulo State, Brazil

Breviglieri E and Lorenz C

Abstract
A mosquito faunal survey was conducted from April/2016 to October/2016 in the Butantan Institute park of Sao Paulo City, Brazil. A total of 12 species grouped into seven genera were collected (*Aedes*, *Culex*, *Limatus*, *Ochlerotatus*, *Psorophora*, *Toxorhynchites*, and *Wyeomyia*). The artificial larval habitats found here were colonized by a great diversity of species, thus human artifacts left by the public in the area that collect water may promote an increase in mosquito populations. Among the species collected, some are known or suspected vectors of pathogens to humans and/or veterinary relevance, and it deserves attention for future studies.

Keywords: Mosquito, urban park, immature, diversity

1. Introduction

Members of the Culicidae family, popularly known as mosquitoes, have a global distribution and have recently attracted a lot of attention in the field of public health, as they are involved in the transmission of various pathogens in humans and other animals [1]. Currently, approximately 3,500 species have been described [2], most of which are endemic to the Neotropical region [3]. Knowledge of the distribution and abundance of mosquitoes in primary Atlantic Forest remnants typical of Brazil is of great importance for understanding the eco-epidemiology of mosquito-borne diseases [4]. Despite this fact, most entomological studies have mainly focused on species such as *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse 1895), which are exotic in Brazil. Research on the diversity of mosquitoes in their natural environment may reveal unknown habits of these vectors [5].

The Butantan Institute (Instituto Butantan) is a research center in Sao Paulo, Brazil, surrounded by a park comprising 80 ha with more than 62% of green area. The park is situated in a large fragment of the Atlantic Forest surrounded by urban areas. Although the mosquito fauna of Sao Paulo is scarcely known, some local surveys indicate high mosquito frequency in specific areas [6, 7, 8]. To increase the knowledge of the biodiversity and identify larval habitats used by immature mosquitoes in this place, we conducted an entomological survey in multiple areas within the park of the Butantan Institute. Such knowledge is important, because it enables an evaluation of the impact of anthropogenic activities in this region. The main objective of this study was to identify the immature and adult Culicidae specimens in different collection sites inside the park and describe the population in terms of species richness and composition.

2. Materials and Methods

The Culicidae fauna were sampled from April/2016 to October/2016. We collected immature mosquitoes using traps such as small plastic pots or bamboos containers distributed in approximately 40 sites within the green area (Figure 1). Besides, ten natural and artificial breeding sites found around the Institute park were also sampled. Adults were collected using suction tubes (mouth aspirators) and Shannon traps. All collections were made during the daytime. The specimens were transported to the laboratory; to improve the identification accuracy, immature forms were allowed to develop into adults. Specimens were identified at the Entomology Laboratory of the Faculty of Public Health – University of Sao Paulo (USP) and morphological identification was based on Forattini [1].

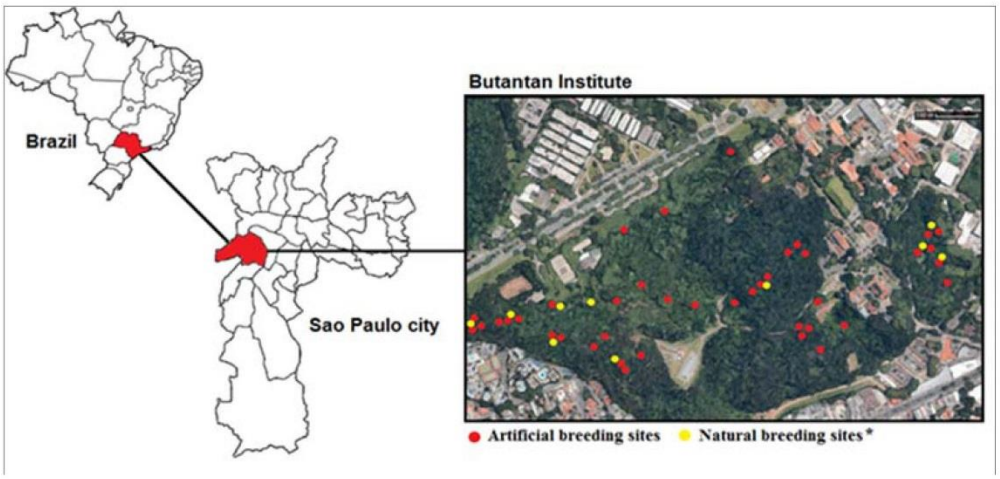


Fig 1: Location of study area and sampling sites in the Butantan Institute, Sao Paulo Brazil. *Natural breeding sites: temporary ground water and phytotelmata bromeliads.

3. Results & Discussion

Over the sampling period, 12 different species belonging to seven genera were collected (Table 1). Some of these species are recognized vectors of human disease, e.g., *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. *Culex dolosus* (L. Arribálzaga 1891) was the dominant species (43.2%) and colonized the highest number of larval habitats, followed by *Ae. albopictus* (15%). Other species with low abundance (<1%) included *Ae. serratus*, *Ae. crinifer*, *Culex pleuristriatus*, and *Toxorhynchites* sp. When we compared these results with the results of other studies conducted in parks in Sao Paulo, we noticed that the species richness of the Butantan Institute park was relatively low. According to Medeiros-Souza *et al.* [8], other state parks yielded more than 25 species, in contrast to just 12 species found in our study. Keesing *et al.* [9] have stated that biodiversity loss could affect the transmission dynamics of infectious diseases. From this eco-epidemiological viewpoint, studies that seek to explain the role of urban green fragments in the incidence of vector-borne disease are of great relevance [8].

Table 1: Total numbers of immature and adult mosquito specimens collected in Butantan Institute (Brazil) from April/2016 to October/2016.

Species	Collection site*	Adults	Immatures	Total (%)
Culex dolosus	A/N	15	103	43.2
Aedes albopictus	A	6	35	15.0
Culex coronator	A/N	10	29	14.3
Limatus durhami	A/N	13	18	11.4
Psorophora ferox	N	2	13	5.5
Ochlerotatus scapularis	A/N	2	8	3.7
Aedes aegypti	A	8	3	4.0
Aedes serratus	N	-	2	0.72
Aedes crinifer	N	-	1	0.36
Culex pleuristriatus	N	-	1	0.36
Wyeomyia theobaldi	N	2	1	1.1
Toxorhynchites sp.	N	-	1	0.36
Total		58	215	100

* A = Artificial breeding sites; N = Natural breeding sites

The larval mosquito community was found in artificial habitats, temporary ground water, and phytotelmata bromeliads. Some mosquito species that develop quickly, such as *Ochlerotatus scapularis* (Rondani 1848) and some *Culex* and *Psorophora* mosquitoes as those found in this study can exploit habitats like temporary rain pools that, depending on temperature conditions, may only last for a few days. Regarding Sabethini mosquitoes, some studies showed that *Limatus durhamii* (Theobald 1901) was the species best adapted to the urban environment, with a high potential for domiciliation and adaptation to different types of artificial larval habitats [4]. Lourenço-de-Oliveira *et al.* [10] have found immature *Li. durhamii* exclusively in artificial containers in peri-urban areas of the city of Rio de Janeiro. Consistently, in Instituto Butantan 80% of *Li. durhamii* larvae were collected from artificial containers.

In the present study, *Psorophora ferox* (Von Humboldt 1819) were collected exclusively in ground water, and mostly in temporary waters. This species lay eggs that can tolerate drought conditions and may remain viable for several years or until the next flood event [11], a strategy that would allow them to colonize recently formed ground pools and that is common to all species of Psorophora in general [1].

4. Conclusions

In general, the artificial larval habitats found in Instituto Butantan were colonized by a great diversity of species, thus human artifacts left by the public in the area that collect water may promote an increase in mosquito populations. Among the species collected, some are known or suspected vectors of pathogens to humans and/or veterinary relevance, and it deserves attention for future studies.

5. Acknowledgments

We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo (2013/05521-9) for funding and to all other members of the Instituto Butantan and Entomology Laboratory of the Faculty of Public Health who contributed during the field and laboratory works.

6. References

1. Forattini OP. Culicidologia médica. São Paulo, Brazil: EDUSP. 2002, 2.
2. Harbach RE. Mosquito taxonomic inventory. Available from: http://mosquito-taxonomic-inventory.info/. 12 Jan, 2017.
3. Ward RA. Culicidae. In: Hurlbert SH, Villalobos-Figueroa A, editors. Aquatic biota of Mexico, Central America and the West Indies. San Diego, CA: San Diego State University. 1982, 417-429.
4. Alencar J, de Mello CF, Serra-Freire NM, Guimarães A, Gil-Santana HR, Gleiser RM. Biodiversity and Temporal Distribution of Immature Culicidae in the Atlantic Forest, Rio de Janeiro State, Brazil. PloS One. 2016, 11(7).
5. Hutchings RSG, Sallum MAM, Ferreira RLM, Hutchings RW. Mosquitoes of the Jaú National Park and their potential importance in Brazilian Amazonia. Medical Veterinary Entomology. 2005; 19:428-441.
6. Urbinatti PS, Sendacz S, Natal D. Imaturos de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parque de área metropolitana aberto à visitação pública. Revista de Saúde Pública. 2001; 35:461-466.
7. Taipe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. Revista de Saúde Pública. 2003; 37:275-279.
8. Medeiros-Sousa AR, Ceretti Jr W, Urbinatti PR, De Carvalho GC, De Paula MB, Fernandes A *et al.* Mosquito fauna in municipal parks of São Paulo City, Brazil: a preliminary survey. Journal of American Mosquito Control Association. 2013; 29:275-279.
9. Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD *et al.* Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature. 2010; 468:647-652.
10. Lourenço-De-Oliveira R, Heyden R, Da Silva TF. Alguns aspectos da ecologia dos mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma área de planície (Granjas Calabrias), em Jacarepaguá, Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1986; 81:265-271.
11. Foss K, Deyrup LD. New record of *Psorophora ciliata* in Maine, United States. Journal of American Mosquito Control Association. 2007; 23:476-477.

ANEXO A

Termo SISBIO de autorização para coleta

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38983-1	Data da Emissão: 03/06/2013 19:16	Data para Revalidação*: 03/07/2014

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: CAMILA LORENZ	CPF: 066.351.929-21
Título do Projeto: Caracterização de padrões macroevolutivos em Culicidae (Diptera) mediante morfometria geométrica, sequenciamento genético e espectrometria de massa.	
Nome da Instituição : Instituto de Ciencias Biomedicas	CNPJ: 63.025.530/0005-38

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e transporte de espécimes invertebrados	04/2013	04/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Assim que possível a pesquisadora deverá informar em quais regiões da unidade de conservação será realizada a pesquisa de campo/coleta. Para o inicio das coletas em campo o solicitante deverá entrar em contato com o chefe da unidade, com o objetivo de agendar as atividades, bem como se informar das regras de uso da UC. Os responsáveis deverão portar cópia desta autorização sempre que comparecerem à unidade de conservação para realizar as atividades. Todos os equipamentos e estruturas de apoio, bem como marcações e sinalizações, deverão ser retirados ao término da atividade.
2	Os responsáveis deverão portar cópia desta autorização sempre que comparecerem à unidade de conservação para realizar as atividades. Todos os equipamentos e estruturas de apoio, bem como marcações e sinalizações, deverão ser retirados ao término da atividade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PA	PARQUE NACIONAL DA AMAZÔNIA	UC Federal
2		RJ	PARQUE NACIONAL DA TIJUCA	UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 29156871

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38983-1	Data da Emissão: 03/06/2013 19:16	Data para Revalidação*: 03/07/2014

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: CAMILA LORENZ	CPF: 066.351.929-21
Título do Projeto: Caracterização de padrões macroevolutivos em Culicidae (Diptera) mediante morfometria geométrica, sequenciamento genético e espectrometria de massa.	
Nome da Instituição : Instituto de Ciencias Biomedicas	CNPJ: 63.025.530/0005-38

SISBIO

3	DUQUE DE CAXIAS	RJ	PARQUE XERÉM	Fora de UC Federal
4		SP	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL CANANÉIA-IGUAPÉ-PERUÍBE	UC Federal
5		SP	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DA SERRA DA MANTIQUEIRA	UC Federal
6	JARDINOPOLIS	SP	JARDINÓPOLIS	Fora de UC Federal
7	CUBATAO	SP	CUBATÃO	Fora de UC Federal
8	CAMPOS DO JORDAO	SP	HORTO FLORESTAL	Fora de UC Federal
9	SAO PAULO	SP	PARQUE ECOLÓGICO TIETÊ	Fora de UC Federal
10	SAO PAULO	SP	PARQUE ESTADUAL DA CANTAREIRA	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Diptera
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Diptera (*Qtde: 500)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Diptera

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres)	Secreção
2	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Outros métodos de captura/coleta(Armadilha Shannon), Captura manual, Armadilha luminosa

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Instituto de Ciencias Biomedicas	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 29156871

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38983-1	Data da Emissão: 03/06/2013 19:16	Data para Revalidação*: 03/07/2014

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: CAMILA LORENZ	CPF: 066.351.929-21
Título do Projeto: Caracterização de padrões macroevolutivos em Culicidae (Diptera) mediante morfometria geométrica, sequenciamento genético e espectrometria de massa.	
Nome da Instituição : Instituto de Ciencias Biomedicas	CNPJ: 63.025.530/0005-38

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 29156871