**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Revisão taxonômica e filogenia da Seção
Myzorhynchella de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*)
(Diptera: Culicidae)**

Sandra Sayuri Nagaki

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.**

Área de Concentração: Epidemiologia

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Anice
Mureb Sallum**

**São Paulo
2015**

**Revisão taxonômica e filogenia da Seção
Myzorhynchella de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*)
(Diptera: Culicidae)**

Sandra Sayuri Nagaki

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum

**São Paulo
2015**

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Aiko Nagaki e Kazuo Nagaki, e ao
meu tio Hideo Nagaki (in memoriam),
com gratidão e amor.*

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa, apoio financeiro para realização deste trabalho (Processo 2011/13322-0).

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Anice Mureb Sallum, pelo apoio e valiosos ensinamentos no decorrer de todos esses (muitos) anos.

À Profa. Dra. Eunice Bianchi Galati pela leitura criteriosa e valiosas contribuições na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvio Nihei, pelos comentários e sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Andrey Andrade pelas contribuições no exame de qualificação do projeto, assim como na pré banca e pela doação de espécimes de Brasília que muito auxiliaram nos resultados desta tese.

Ao Prof Dr. Lincoln Suesdek, pelos comentários e sugestões na elaboração deste trabalho.

À Dra. Eliana Colucci, pelas sugestões dadas no exame de qualificação;

Ao Prof. Dr. Delsio Natal e Dr. Paulo Urbinatti pelos ensinamentos, auxílio sempre que necessário e doação de espécimes;

Ao Aristides Fernandes e Dra. Marcia Bicudo por estarem sempre prontos a ajudar, pela amizade e apoio durante toda a pós graduação;

Ao Prof. Dr. Mauro Marrelli, por permitir o uso do equipamento de automontagem de fotos.

Ao Daniel Corugedo Flores pela ajuda nas fotografias em microscópio eletrônico de varredura.

Ao Sr. Saint' Clair de Vasconcelos por permitir as várias coletas realizadas em sua fazenda em Campos do Jordão.

Ao pesquisador Dr. Eduardo Bergo pela ajuda nas coletas de campo.

Aos pesquisadores Dra. Ana Maria Duarte, Dra. Teresa Fernandes e Dr. Gabriel Laporta pela doação de espécimes.

Aos pesquisadores Dr. Richard Wilkerson, Dra Yvone-Marie Linton e David Pecor pelo auxílio na visita à coleção do Museu Nacional de História Natural de Washington, também à Judith Stoffer pelas fotos dos espécimes e Taina Litwak pelas dicas nas ilustrações.

Ao pesquisador Dr. Ralph Harbach por todo auxílio na visita à coleção do Museu de História Natural de Londres.

À secretária Renilda Shimonio por toda ajuda durante todos esses anos.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Tatiane Porangaba por todo auxílio no laboratório de sistemática molecular, Denise pela ajuda nas coletas de campo, Ivy Sá, Leonardo Suveges, Caio C. Moreira, Carolina Gutierrez, Paulo Moutinho e Susan Greni, pela convivência e amizade.

Ao Filipe, Ronan e cia do Anexo pelos momentos no café da tarde.

À amiga Dra. Bruna Demari e Silva pelo auxílio nas análises moleculares e por compartilhar os momentos difíceis e de alegria desde o início do mestrado.

À amiga Maysa T. Motoki pela ajuda na coleta em Campos do Jordão, e assistência na minha chegada a Washington DC.

À amiga Fabiana T. Vesgueiro pelo auxílio nas coletas do Paraná e Santa Catarina.

Ao amigo Fredy Galvis Ovallos pela ajuda em coleta de campo e companheirismo durante o doutorado.

Aos muitos amigos que a FSP me proporcionou durante a pós graduação, Cleiton Fiório, Eliana Masuda, Mahmi Fujimori, Letícia Marteis, Dra. Rosário Avellaneda, Dra. Edlaine Villela... por todos os bons momentos.

Às pessoas que conheci nas viagens durante as coletas de campo pelas muitas localidades do país.

À minha família, em especial à Haru e Anderson pela paciência e apoio incondicional...

RESUMO

Nagaki SS. Revisão taxonômica e filogenia da Seção Myzorhynchella de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). [Tese de Doutorado]. São Paulo: FSP-USP, 2015.

Anopheles é o gênero da família Culicidae mais estudado devido sua importância médica. Atualmente o gênero *Anopheles* compreende 472 espécies válidas que estão divididas em sete subgêneros. Os principais vetores de plasmódio da Malária no Brasil pertencem ao subgênero *Nyssorhynchus*, que inclui 39 espécies oficialmente reconhecidas e um número crescente de complexos de espécies crípticas que estão distribuídas em três Seções: Myzorhynchella, Albimanus e Argyritarsis. Atualmente a Seção Myzorhynchella é formada por seis espécies: *An. lutzii*, *An. parvus*, *An. nigritarsis*, *An. guarani*, *An. antunesi* e *An. pristinus*. Para o desenvolvimento da análise morfológica, observou-se material-tipo depositado em diferentes coleções, espécimes depositados na coleção entomológica da FSP/USP, além de outros obtidos em coletas realizadas durante o presente estudo em diferentes localidades do Brasil. As análises moleculares foram desenvolvidas a partir de espécimes obtidos nas coletas. Revisão taxonômica da Seção Myzorhynchella é apresentada, incluindo-se descrições de quatro novas espécies e redescrições das demais, informações sobre bionomia, importância médica, caracterização molecular, distribuição geográfica, estado de preservação do material-tipo, além de chaves de identificação de adultos, larva de quarto estágio e genitália masculina. Os resultados das análises filogenéticas utilizando sequências de ITS2, *COI* e *Catalase* indicam a existência de pelo menos doze espécies dentro da Seção Myzorhynchella, os espécimes que vêm sendo identificados como *An. antunesi* constitui um complexo formado por possíveis cinco espécies e aqueles de *An. parvus* e *An. pristinus* também podem representar complexos de espécies. As sequências de ITS2 podem ser utilizadas como marcador diagnóstico para espécies da Seção Myzorhynchella. Contudo, o estudo ainda demonstra que pouco se conhece sobre a diversidade de espécies de *Anopheles* que ocorrem em ambientes onde a malária ocorre em baixa endemicidade. Pelo número de espécies novas encontradas e pela escassez de trabalhos com espécies da Seção, fica evidente a necessidade de mais estudos.

Palavras-chave: *Nyssorhynchus*, Myzorhynchella, revisão taxonômica, análise molecular, novas espécies.

ABSTRACT

Nagaki SS. Taxonomic review and phylogeny of Myzorhynchella Section of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). [Doctoral thesis]. São Paulo: FSP-USP, 2015.

Anopheles is the Culicidae Family genus most studied because of its medical importance. The genus currently comprises 472 valid species that are divided into seven subgenus. The main vectors of plasmodium malaria in Brazil belong to the subgenus *Nyssorhynchus*, that includes 39 valid species and a growing number of cryptic species complexes that are divided in three Sections: Myzorhynchella, Albimanus and Argyritarsis. Myzorhynchella Section currently consists of six species: *An. lutzii*, *An. parvus*, *An. nigritarsis*, *An. guarani*, *An. antunesi* and *An. pristinus*. For the morphological analysis, type material deposited in different collections were studied, specimens deposited in the entomological collection of FSP/USP, and other obtained from field collections in different localities in Brazil during this study. The molecular analyzes were taken from specimens obtained in field collections. Taxonomic review of Myzorhynchella Section is presented, including descriptions of four new species and redescrptions of the others, information on bionomics, medical importance, molecular characterization, geographical distribution, preservation status of type material, as well as identification keys of adults, fourth instar larvae and male genitalia. The results of phylogenetic analysis using sequences of ITS2, *COI* and *Catalase* indicate the existence of at least twelve species within Myzorhynchella Section, the specimens which have been identified as *An. antunesi* is a species complex formed by possible five species and those of *An. parvus* and *An. pristinus* may also represent species complexes. The ITS2 sequences can be used as a diagnostic marker for species of Myzorhynchella Section. However, the study also shows that little is known about the diversity of *Anopheles* species that occur in environments where malaria occurs in low endemicity. By the number of new species found and the lack of studies with species of the Section, it is evident the need for further studies.

Keywords: *Nyssorhynchus*, Myzorhynchella, taxonomic review, molecular analysis, new species.

1. INTRODUÇÃO

Culicidae é uma família de insetos popularmente chamados de mosquitos. Esta é considerada grupo monofilético, possui atualmente 3.546 espécies válidas que estão agrupadas em duas subfamílias e 112 gêneros (HARBACH, 2015). A subfamília Culicinae possui 109 gêneros e a Anophelinae, que inclui os vetores de plasmódio que causam malária em humanos, está subdividida em três gêneros: *Anopheles* Meigen (cosmopolita), *Bironella* Theobald (Australasia) e *Chagasia* Cruz (Neotropical) (HARBACH, 2004; HARBACH e KITCHING, 2005). Os anofelíneos são encontrados em todas as regiões biogeográficas do mundo, mas a riqueza de espécies é maior nas áreas tropicais e subtropicais (FORATTINI, 2002).

Anopheles é um dos gêneros da família Culicidae mais estudado devido sua importância na transmissão de filárias e protozoários ao homem. Atualmente, o gênero *Anopheles* compreende 472 espécies válidas que estão agrupadas em oito subgêneros: *Anopheles* Meigen (Cosmopolita, 183 espécies), *Baimaia* Harbach, Rattanarithikul & Harrison (Oriental, 1 espécie), *Cellia* Theobald (Velho Mundo, 224 espécies), *Christya* Theobald (África Subsaariana, 2 espécies), *Kerteszia* Theobald (Neotropical, 12 espécies), *Lophopodomyia* Antunes (Neotropical, 6 espécies), *Nyssorhynchus* Blanchard (Neotropical, 39 espécies) e *Stethomyia* Theobald (Neotropical, 5 espécies) (HARBACH, 2015; 2013). Entre os subgêneros, quatro incluem espécies que transmitem parasitos da malária ao homem: *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus* (HARBACH, 2013).

Estima-se que 3.3 bilhões de pessoas no mundo estão sob o risco de serem infectadas e desenvolverem malária (WHO, 2014). No Brasil, aproximadamente, 143.000 foi o número de casos registrados em 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os principais vetores de plasmódio da malária no Brasil pertencem ao subgênero *Nyssorhynchus*, que inclui 39 espécies oficialmente reconhecidas e um número crescente de complexos de espécies morfológicamente semelhantes. O subgênero está subdividido em três Seções, *Myzorhynchella*, *Albimanus* e *Argyritarsis*. As duas últimas foram objetos de revisões, a Seção *Albimanus* foi estudada por FARAN (1980) e a Seção *Argyritarsis* por LINTHICUM (1988). Quanto a *Myzorhynchella*, suas espécies foram estudadas por GALVÃO (1941) e mais recentemente por NAGAKI et al. (2010; 2011). No entanto, quase não há relatos sobre seus vários estágios de desenvolvimento, sobretudo dos ovos.

1.1. SEÇÃO MYZORHYNCHELLA

1.1.1. História Taxonômica

CRUZ (1901) descreveu *Anopheles lutzii* a partir de espécimes coletados no Rio de Janeiro. Por considerar as escamas do occipício eretas e bifurcadas, BORROUL (1904) transferiu *Anopheles lutzii* Cruz para o gênero *Pyretophorus* Blanchard. Paralelamente, o autor redescreveu a espécie que passou a ser denominada *Pyretophorus lutzi*. Posteriormente, THEOBALD (1907) descreveu o gênero *Myzorhynchella* juntamente com a nova espécie *Myzorhynchella nigra* que por monotopia se tornou a espécie tipo do gênero.

Em 1907, CHAGAS considerou que *Pyretophorus lutzi* e *Myzorhynchella nigra* eram morfologicamente idênticas. Dessa maneira, o autor transferiu a última espécie para a sinonímia de *Pyretophorus lutzi*, e esta passou a ser designada como *Myzorhynchella lutzii*. Com o gênero bem estabelecido, duas novas espécies, simpátricas, foram descritas: *Myzorhynchella parva* Chagas e a *Myzorhynchella nigratarsis* Chagas.

HOWARD et al. (1917) consideraram congêneros todos os anofelinos e os colocaram no gênero *Anopheles*. Em seguida, CHRISTOPHERS (1924) com base nas estruturas da genitália masculina reconheceu cinco subgêneros distintos (*Chagasia*, *Bironella*, *Anopheles*, *Nyssorhynchus* e *Myzomyia* Blanchard) dentro do gênero *Anopheles* e incluiu as espécies de *Myzorhynchella* no subgênero *Nyssorhynchus* pertencentes ao grupo *Nyssorhynchus*. As espécies do grupo eram representadas por *An. argyritarsis* Robineau-Desvoidy 1827, *An. albimanus* Wiedemann, 1820, *An. tarsimaculatus* Goeldi, 1905, *An. lutzii*, *An. parvus*, *An. nigratarsis*, e *An. gilesi* (Neiva, 1908).

Em 1926, ROOT considerou que três grupos (*Nyssorhynchus*, *Myzorhynchella* e *Kerteszia*) deveriam ser incluídos dentro do subgênero *Nyssorhynchus* e neste trabalho, estudou o grupo *Nyssorhynchus*. Em seguida, o autor revisou espécies do grupo *Myzorhynchella* (*An. lutzii* e *An. parvus*) em comparação ao grupo *Nyssorhynchus* através de características da genitália masculina, larva e adulto (ROOT, 1927).

Shannon descreveu *Anopheles (Nyssorhynchus) guarani* em DYAR (1928). A espécie é considerada sinônimo júnior de *An. lutzii* no trabalho de EDWARDS (1932), no entanto não há registro de que autor a incluiu como sinônimo.

COSTA LIMA (1928) considerou que a classificação proposta por CHRISTOPHERS (1924) era a mais correta, porém em suas considerações demonstrou a necessidade de elevar a categoria grupo a subgênero e considerou as espécies do subgênero *Nyssorhynchus* como pertencentes ao gênero *Nyssorhynchus*, que foi dividido em dois subgêneros: *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. O grupo Myzorhynchella foi considerado com posição sistemática incerta. Todavia, no ano seguinte COSTA LIMA (1929) considerando a opinião de ROOT (1927) sobre o grupo Myzorhynchella, elevou este ao nível de subgênero, dividindo o gênero *Nyssorhynchus* em três subgêneros: *Nyssorhynchus*, *Myzorhynchella* e *Kerteszia*.

PINTO (1930) transferiu os táxons do gênero *Nyssorhynchus* para o gênero *Anopheles*.

EDWARDS (1932) seguiu classificação de ROOT (1927) e dividiu o subgênero *Nyssorhynchus* de *Anopheles* em três grupos: *Nyssorhynchus*, *Myzorhynchella* e *Kerteszia*. O Grupo Myzorhynchella era representado pelas espécies: *An. lutzii*, *An. nigratarsis*, *An. parvus* e *An. pictipennis* (Philippi, 1865).

LANE (1939) em seu catálogo adotou a classificação proposta por EDWARDS (1932), porém considerou *Kerteszia* como subgênero de *Anopheles* e não mais como grupo. Nesse contexto, o grupo Myzorhynchella inclui *An. gilesi* (Neiva, 1908), *An. lutzii*, *An. nigratarsis*, *An. parvus* e *An. pictipennis*.

GALVÃO & AMARAL (1940) descreveram *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi*.

GALVÃO (1941) julgou que *Nyssorhynchus*, *Myzorhynchella*, *Kerteszia* e *Arthuromyia* Galvão fossem considerados como subgêneros de *Anopheles* por formarem grupos homogêneos. Dessa maneira, *An. lutzii*, *An. parvus*, *An. nigratarsis* e *An. antunesi* foram agrupadas no subgênero *Myzorhynchella*.

O autor colocou *An. pictipennis* no subgênero *Nyssorhynchus* por apresentar caracteres como presença de escamas nos segmentos abdominais, assim como asas com manchas claras grandes, não presentes nas outras espécies de *Myzorhynchella*. *Anopheles gilesi* por apresentar características não presentes nos outros subgêneros, também foi colocado em um novo subgênero, *Arthuromyia*.

LANE (1953) adotou seis subgêneros de *Anopheles* (*Anopheles*, *Arribalzagia* Theobald, *Lophopodomyia*, *Myzorhynchella*, *Nyssorhynchus* e *Stethomyia*), sendo o subgênero *Myzorhynchella* para as espécies *An. antunesi*, *An. lutzii*, *An. parvus*. O autor não citou *An. nigratarsis* em nenhum outro agrupamento.

FARAN (1980) subdividiu o subgênero *Nyssorhynchus* em duas Seções, Albimanus e Argyratarsis. O grupo Myzorhynchella não foi incluído como Seção devido à escassez de material disponível e posição taxonômica incerta.

PEYTON et al. (1992) reconheceram Myzorhynchella como Seção do subgênero *Nyssorhynchus* na mesma condição das outras duas Seções, por possuírem características morfológicas distintas e que consideraram significativas para justificar a hipótese proposta. Nesta Seção foram incluídas quatro espécies: *An. antunesi*, *An. lutzii*, *An. nigratarsis* e *An. parvus*.

Recentemente, NAGAKI et al. (2010) descreveram uma nova espécie *Anopheles pristinus* Nagaki & Sallum e redescreveram *An. antunesi*. No ano seguinte, *Anopheles guarani* antes como sinônimo júnior de *An. lutzii*, foi validada e *An. lutzii* redescrita (NAGAKI et al., 2011). Dessa maneira, a Seção Myzorhynchella passou a incluir seis espécies válidas, a saber: *An. antunesi*, *An. guarani*, *An. lutzii*, *An. nigratarsis*, *An. parvus* e *An. pristinus*.

Atualmente a classificação defendida por PEYTON et al. (1992) é a que tem sido adotada (SALLUM et al., 2000; NAGAKI et al., 2010; 2011; BOURKE et al., 2010; 2011; FOSTER et al., 2013; HARBACH, 2015).

1.1.2. Espécies da Seção Myzorhynchella

Todas as espécies da Seção Myzorhynchella foram descritas a partir de espécimes coletados no Brasil (BELKIN et al., 1971; NAGAKI et al., 2011). Atualmente a Seção inclui seis táxons:

- *Anopheles lutzii* Cruz, 1901;
Sinônimo: *Anopheles niger* (Theobald, 1907).
- *Anopheles parvus* (Chagas, 1907);
- *Anopheles nigratarsis* (Chagas, 1907);
- *Anopheles guarani* Shannon, 1928;
- *Anopheles antunesi* Galvão & Amaral, 1940;
- *Anopheles pristinus* Nagaki & Sallum, 2010.

As espécies da Seção Myzorhynchella podem ser diferenciadas das demais do subgênero *Nyssorhynchus*, pela ausência de escamas na superfície dorsal dos segmentos abdominais, as escamas estão presentes nos segmentos genitais (GALVÃO, 1941; FORATTINI, 1962); os tarsômeros posteriores 3 e 4 são completamente brancos, com exceção de *An. nigratarsis* que possui anéis formados de escamas escuras na base dos dois segmentos; e a superfície dorsal da veia alar 1A é predominantemente coberta por escamas escuras, com uma pequena área clara que ocupa a posição mediana (PEYTON et al., 1992). A genitália masculina apresenta caracteres como a presença de folíolos no edeago, e o claspete dorsal possui duas cerdas inseridas em posição apical e uma terceira, subapicalmente (GALVÃO, 1941). Nas larvas de quarto estágio, as cerdas 6 dos segmentos abdominais IV–VI apresentam-se ramificadas (GALVÃO, 1941; FORATTINI, 1962; PEYTON et al., 1992).

A biologia das espécies da Seção é pouco conhecida, por isso, a dificuldade em encontrar formas imaturas em campo. Nos poucos registros que foram publicados na literatura, as fases imaturas de desenvolvimento têm sido encontradas em pequenas coleções hídricas, como poças de água de chuva acumuladas em depressões no solo, pequenos charcos, riachos e buracos em rochas. Os criadouros são geralmente situados em ambientes florestais. São sombreados, com água límpida e vegetação escassa (FORATTINI, 1962).

São mosquitos zoofílicos. No entanto, ANTUNES & LANE (1933) observaram espécimes de *An. parvus* picando o homem na mata no período vespertino. Em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, PINTO et al. (1940) observaram *An. lutzii* também sugando o

homem na mata e invadindo os domicílios quando estes localizavam-se dentro da floresta. Em Juíz de Fora, Minas Gerais, NEIVA (1909) encontrou *An. lutzii* e *An. parvus* predominando na região. Em registro recente, DUARTE et al. (2013) observaram que um espécime de *An. lutzii* coletado em região de Mata Atlântica estava infectado por *Plasmodium vivax*. Apesar deste registro, não há evidências epidemiológicas que confirmem o papel vetor de espécies da Seção Myzorhynchella na dinâmica de transmissão da malária humana.

Em relação aos estudos taxonômicos, FORATTINI et al. (1997) descreveram os ovos de *An. antunesi*, comparando-os com os de outras espécies de *Nyssorhynchus*. No entanto, NAGAKI et al. (2010) demonstraram que os ovos eram de *An. pristinus*, espécie naquela época ainda desconhecida da ciência.

FORATTINI et al. (1998) descreveram os ovos de *An. parvus*. No mesmo trabalho, os autores descreveram os ovos de *An. lutzii* a partir de espécimes coletados em dois municípios do estado de São Paulo, Dourado e Pariquera-Açu. Vale assinalar que os ovos das duas populações de *An. lutzii* estudadas diferiam em aspectos morfológicos, sugerindo que se tratavam de espécies distintas. Tal fato foi comprovado por NAGAKI et al. (2011) que compararam os ovos de *An. guarani* coletados em Foz do Iguaçu, localidade-tipo de *An. guarani*, com aqueles da população de Dourado e estes se mostraram idênticos.

Dessa maneira, evidenciou-se que a morfologia externa de ovos, observados em microscópio eletrônico de varredura, apresentam características que podem ser empregadas na delimitação e definição de espécies de *Anopheles*. Como exemplo, o estudo de LOUNIBOS et al. (1997) que indicou que *Anopheles trinkae* Faran é espécie válida, retirando-a da sinonímia de *Anopheles dunhami* Causey.

Além disso, os resultados das análises empregando sequências de DNA do gene mitocondrial *COI* e do nuclear *white*, além do segundo espaçador interno do DNA ribossômico (ITS2), indicaram que dois espécimes coletados em área de Mata Atlântica do norte do Estado do Rio Grande do Sul representam duas espécies simpátricas ainda não descritas, uma das quais é mais relacionada a *An. antunesi* e a outra pertence ao clado formado por *An. lutzii* (BOURKE et al. 2011). Esses dados foram corroborados por FOSTER et al. (2013) utilizando dois genes nucleares, *white* e *CAD* e o mitocondrial *COI*.

Apesar da escassez de estudos sobre espécies de Myzorhynchella, os últimos trabalhos como de BOURKE et al. (2011) e FOSTER et al. (2013) demonstraram que a Seção necessita de novas investigações, pois os resultados das análises morfológicas e moleculares indicaram

que possam existir espécies ainda desconhecidas da ciência, assim como a presença de complexos de espécies. Este parece ser o caso de *An. parvus*, que pode ser constituído por pelo menos duas espécies, como indicam as sequências do ITS2 e os resultados das análises das sequências concatenadas dos genes *COI*, *white* e do ITS2 (BOURKE et al., 2011).

A Seção *Myzorhynchella* é um grupo relativamente pouco conhecido e a identificação de suas espécies nem sempre é tarefa fácil. Para se obter identificação acurada, os exemplares devem estar em bom estado de conservação, especialmente quanto ao revestimento de escamas das pernas e das asas. Acresce considerar que no caso de espécies morfológicamente semelhantes, a distinção entre elas é difícil por meio de caracteres da morfologia externa de adultos. No entanto, a identificação é mais fácil pela comparação de caracteres da genitália masculina e dos ovos, que são obviamente mais difíceis para se obter do que adultos fêmeas.

As descrições das espécies, no início do século passado, eram muitas vezes insuficientes para as necessidades atuais, quando são conhecidos diversos complexos de espécies. Portanto, há a necessidade de levantar caracteres morfológicos através de descrições mais detalhadas, que poderão ser utilizados em estudos filogenéticos e outros para a elaboração de chaves de identificação de espécies.

1.2. TAXONOMIA INTEGRATIVA

Existe atualmente carência de especialistas que se dediquem à sistemática. Esta situação é preocupante para a ciência da culicidologia, pois a maioria dos mosquitos é pouco conhecida e os estudos filogenéticos restringem-se a grupos de maior importância médica (ZAVORTINK, 1994).

A taxonomia de anofelinos atingiu o auge com a aplicação de técnicas genéticas durante a última década do Século XX. O resultado foi a descoberta de vários complexos de espécies crípticas. Uma abordagem importante para o estudo de espécies crípticas é a integração da taxonomia morfológica com estudos moleculares, o que garante que os resultados do sequenciamento de DNA sejam conectados corretamente aos dados morfológicos. A integração destes métodos auxilia na delimitação de espécies. Dessa maneira,

possibilita a condução de estudos sobre sua bionomia, distribuição geográfica, ecologia e relações das espécies com a transmissão de parasitos. Estes últimos são essenciais para a definição da importância epidemiológica das espécies, e portanto, para a concepção e implementação de medidas para o controle dos vetores (HARBACH, 2007).

DAYRAT (2005) propôs que “a taxonomia integrativa é definida como a ciência que visa delimitar as unidades de diversidade da vida a partir de perspectivas múltiplas e complementares (filogeografia, morfologia, genética de populações, ecologia, desenvolvimento, comportamento, etc.)”. Essa abordagem integrativa tem sido empregada para alguns grupos de vertebrados e invertebrados. Como exemplo, vale citar o estudo de MELVILLE et al. (2014) que empregou informações morfológicas integradas a estudos genéticos e análises para a delimitação de espécies de répteis Agamidae. Dos protocolos utilizados, a taxonomia integrativa produziu os melhores resultados em relação à definição dos limites das espécies. Recentemente, KIRICHENKO et al. (2015) descreveram uma nova espécie de Lepidoptera a partir de abordagem integrada que combinou dados morfológicos e ecológicos com informações moleculares.

1.2.1. Marcadores Moleculares

Dentre os marcadores moleculares, o gene Citocromo Oxidase subunidade I (*COI*) do DNA mitocondrial e o Segundo Espaçador Interno Transcrito (ITS2) do DNA ribossômico têm sido muito utilizados na distinção de espécies do gênero *Anopheles*.

Um código de barras de DNA ideal deve conter significativa variabilidade genética e divergência em nível de espécie, possuir sites conservados para o desenvolvimento de primers de PCR universais e uma sequência curta de modo a facilitar a extração e amplificação (KRESS & ERICKSON, 2008).

O uso de um código de barras para organismos vivos utilizando fragmento de 658 pares de bases do gene mitocondrial *COI* foi proposto por HEBERT et al. (2003). Desde então traz algumas preocupações quanto ao uso da taxonomia tradicional, mas ao mesmo tempo ele possibilita a solução de dúvidas que a taxonomia morfológica não permitiria se

empregada como fonte única de informações. Mais recentemente, o marcador ITS2 foi utilizado como código de barras para plantas e animais (YAO et al., 2010).

Por esta razão eles têm sido utilizados como ferramentas para a identificação e delimitação de complexos de espécies de *Anopheles*. Como exemplos, vale citar o trabalho de RUIZ et al. (2010) que através de sequências de *COI* e ITS2 confirmaram a presença de *An. dunhami* pela primeira vez na Colômbia. SALLUM et al. (2008) empregando sequências do ITS2, apresentaram evidências de que o *An. benarrochi* Galbadon, Cova Garcia e Lopez, *An. oswaldoi* (Peryassu) e *An. konderi* Galvão e Damasceno do município de Acrelândia, estado do Acre, Brasil, representam complexos de espécies. Outro estudo utilizando ambos marcadores, revelou a presença de duas formas distintas de *An. barbirostris* van der Wulp na China (WANG et al., 2015).

De acordo com o estado de preservação de um espécime, que pode estar danificado, em estágio imaturo de desenvolvimento, ou pertencer a um complexo de espécies crípticas, mesmo um especialista pode ser incapaz de fazer a identificação específica. Nesses casos, essas sequências de DNA de genes específicos auxiliam na solução de problemas taxonômicos, a partir do sequenciamento do DNA obtido de pequenos fragmentos do espécime (GARROS & DUJARDIN, 2013).

decorrente de polimorfismo de outra espécie da seção. Acredita-se que seja *An. guarani* devido a similaridade do padrão de manchas claras e escuras presente nas asas de fêmeas. No entanto, não existem exemplares para confirmação através de outros estágios de desenvolvimento ou para sequenciamento de DNA. Variação semelhante foi mencionada por HARBACH et al. (1993) em população de *An. darlingi* Root de Belize, que apresentou a mesma variação presente em *An. nigratarsis* além de outras variações a partir de progênie e larvas coletadas em campo.

Devido a difícil identificação dos espécimes adultos, principalmente quando não se apresentam em bom estado de preservação, e a falta de especialistas treinados na área, é provável que muitos desses dados de literatura estejam incorretos. Por esse motivo, a distinção na apresentação dos mapas por material observado e registro em literatura, uma vez que a maioria dos trabalhos que não de taxonomia, não apresentam material testemunho para comprovação dos resultados.

Projetos de pesquisa requerem investimentos significativos de tempo, esforço e financeiro. Por isso os espécimes devem ser depositados como material testemunho em uma coleção para assegurar que estejam disponíveis para estudos posteriores. Acresce considerar que o método científico é baseado no princípio de que resultados de estudos devem ser replicáveis. Portanto, os exemplares de mosquitos capturados em estudos de diversas naturezas deveriam ser preservados e depositados em coleções institucionais.

6. CONCLUSÕES

Com base na revisão taxonômica e análise filogenética molecular das espécies da Seção Myzorhynchella, pode-se concluir que:

- No estado do Rio Grande do Sul, Brasil, ocorrem pelo menos quatro espécies distintas desconhecidas da ciência. Destas, três novas espécies foram definidas e serão validadas (*An. lutzii* – Forma 1 n. sp., *An. antunesi* – Forma 2 n. sp. e *An. antunesi* – Forma 3 n. sp.). A quarta espécie deverá ser definida e delineada.

- Uma nova espécie que coexiste em simpatria com *An. antunesi* e *An. pristinus* (*An. antunesi* – Forma 1 n. sp) também foi descrita a partir de espécimes de Campos do Jordão, SP, Brasil.
- Os resultados suportam que *An. antunesi* é um complexo formado por pelo menos cinco espécies.
- De acordo com dados moleculares, os resultados sugerem que *An. parvus* e *An. pristinus* também são complexos de espécies.
- As sequências de ITS2 podem ser utilizadas como marcador diagnóstico para espécies da Seção Myzorhynchella.
- Diferenças morfológicas e os resultados das análises filogenéticas moleculares indicam que *Anopheles parvus* representa um grupo distinto que não pertence à Seção Myzorhynchella.
- *Anopheles nigratarsis* é provavelmente sinônimo de outra espécie da Seção Myzorhynchella.
- A Seção Myzorhynchella não pode ser diferenciada das demais Seções de *Nyssorhynchus* pelas características morfológicas da larva que são empregadas em chaves de identificação.
- Há a necessidade de estudos com maior número amostral e outros marcadores moleculares para estabelecer relações entre os grupos e obter resultados mais consistentes.
- Os resultados das análises dos dados moleculares corroboram as hipóteses levantadas por características morfológicas. Além disso, eles sugerem que existem pelo menos 12 espécies na Seção Myzorhynchella. Vale acrescentar, que o conhecimento das espécies da Seção foi ampliado significativamente com a adição de dados morfológicos, moleculares, de bionomia e de distribuição.
- Este estudo demonstra que pouco se conhece sobre a diversidade de espécies de *Anopheles* que ocorrem em ambientes onde a malária é de baixa endemicidade. A necessidade de mais estudos fica evidente pelo número de espécies novas encontradas e ainda pela escassez de investigações científicas com espécies da Seção.

7. REFERÊNCIAS

- Aiken J. Notes on the Mosquitoes of British Guiana. Br Gui Med Annual. 1909;1-25.
- Alencar J, Ferreira ZM, Lopes CM, Serra-Freire NM, Mello RP, Silva JS, Guimarães AE. Biodiversity and Times of Activity of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Biome of the Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. J Med Entomol 2011;48(2):223-231.
- Andrade WA, Santos AT, Parente JAS, Gil-Santan HR, Bragança MAL, Alencar J. Diversidade de anofelinos (Diptera: Culicidae) identificados em área de implantação de hidrelétrica nas margens do rio Tocantins, município de Nacional-TO. Rev Patol Trop. 2006;35(2):143-147.
- Antunes PCA, Lane J. Nota sobre a distribuição geográfica dos culicídeos (Diptera) de São Paulo (Brasil). Rev Biol Hyg. 1933;4(3):91-97.
- Aragão MB, Neto JAF, Martins CM. Observações sobre anofelinos em Santa Catarina, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1973;7(5):289-303.
- Aragão NC, Müller GA, Balbino VQ, Costa Junior CR, Figueirêdo Júnior CS, Alencar J, Marcondes CB. A list of mosquito species of the Brazilian State of Pernambuco, including the first report of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), yellow fever vector and 14 other species (Diptera: Culicidae). Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(4):458-459.
- Araujo R, Silva AM, Souza Filho EC, Luz E. Composição da fauna de *Anopheles* (Diptera, Culicidae) da Reserva Indígena do Ocoy, foco ativo de malária no município de São Miguel do Iguçu, Paraná (Brasil). Acta Biol Par. 2014;43(1-2):85-112.
- Atkinson D. Temperature and organism size - A biological law for ectotherms? Adv Ecol Res. 1994;25:1-58.

- Barghini A, Urbinatti PR, Natal D. Atração de mosquitos (Diptera: Culicidae) por lâmpadas incandescentes e fluorescentes. *Entomol Vect.* 2004;11(4):611-622.
- Basseres M. Atividades da estação biológica de Perú. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1943;38(1):39-52.
- Bejarano JFR, Duret JP. Nota previa sobre mosquitos argentinos. *Rev Sanid Milit Argent.* 1949:452-454.
- Belkin JN. The mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). University of California Press, Berkeley. 1962.
- Belkin JN, Schick RX, Heinemann SJ. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXV. Mosquitoes originally described from Brazil. *Contrib Amer Ent Inst.* 1971;7:1-64.
- Bourke BP, Foster PG, Bergo ES, Calado DC, Sallum MAM. Phylogenetic relationships among species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera, Culicidae) based on nuclear and mitochondrial gene sequences. *Acta Trop.* 2010;114:88-96.
- Bourke BP, Nagaki SS, Bergo EE, Cardoso JC, Sallum MAM. Molecular phylogeny of the Myzorhynchella Section of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae): genetic support for recently described and resurrected species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(6):705-715.
- Bourke BP, Oliveira TP, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MA. A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors.* 2013;6:111.
- Bourroul C. Mosquitos do Brasil. Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina da Bahia. Bahia; 1904.

- Calderón G, Fernández R, Valle J. Species de la fauna anofelina, su distribucion y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Peru. Rev peru epidemiol. 1995;8(1):5-23.
- Cardoso JC, Corseuil, Barata JMS. Anophelinae (Diptera: Culicidae) ocorrentes no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Entomol Vect. 2004;11(1):159-177.
- Cardoso JC, Paula MB, Fernandes A, Santos E, Almeida MAB, Fonseca DF, Sallum MAM. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic forest area on the north coast of Rio Grande do Sul State, Brazil. J Vector Ecol. 2011;36(1):175-186.
- Carvalho MESD, Lustosa ES, Naves HAM, Carneiro E. Anofelinos coletados na chácara Naves. Anofelinos coletados na chácara Naves 1987-1988. Rev Pat Trop. 1992;21(2):203-208.
- Cerutti Jr C, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MCLD, Falqueto A, et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. Malar J. 2007;6:33.
- Chagas C. O novo gênero *Myzorhynchella* de Theobald: Duas novas anophelinas brasileiras pertencentes a este gênero – *Myzorhynchella parva* (nov. sp.). Brazil Med. 1907;21:291-293.
- Chagas C. O novo gênero *Myzorhynchella* de Theobald: Duas novas anophelinas brasileiras pertencentes a este gênero – *Myzorhynchella nigratarsis* (nov. sp.). Brazil Med. 1907;21(31):303-305.
- Christophers SR. Provisional list and reference catalogue of the Anophelini. Indian J Med Res. 1924;3:1-105.
- Consolim J, Pellegrini NJM, Luz E. Culicídeos (Diptera, Culicidae) do Lago de Itaipú, Paraná, Brasil. I. Município de Foz do Iguaçu. Acta Biol Par. 1993; 22(1, 2, 3, 4):83-90.

- Costa Lima A. Sobre algumas anophelinas encontrados no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1928;3:91-113.
- Costa Lima A. Sobre alguns anophelineos encontrados no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1929;12:275-293.
- Coutinho JO, Rachou R, Ferreira M. Considerações em torno de uma inspeção preliminar de malária em zona de alta endemicidade no Estado de Santa Catarina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1944;41(1):1-19.
- Cruz OG. Contribuição para o estudo dos culicídeos do Rio de Janeiro. Brazil Med. 1901;15:423-426.
- Dayrat B. Towards integrative taxonomy. Biol J Linn Soc. 2005;85:407-415.
- Deane, M. P. Causey, O. R. Deane, L. M. Chave ilustrada para a identificação de 32 espécies de anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil pelos caracteres da larva, com a descrição de duas larvas. Rev Serv Esp Saúde Públ. 1947;1(2):335-384.
- Deane, L. M. Causey, O. R. Deane, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. Rev Serv Esp Saúde Públ. 1948;1(4):827-965.
- Deane LM. Monkey malaria in Brazil. A summary of studies performed in 1964-1966. WHO. 1967:21pp
- Deane LM, Neto JA. Malária em macacos do estado de Rio Grande do Sul. Observações preliminares. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1969;11:299-305.
- Deane LM, Deane MP, Neto JA, Almeida FB. On the transmission of simian malaria in Brazil. Rev Inst Med Trop. 1971;13(5):311-319.
- Demari-Silva B, Suesdek L, Sallum MAM, Marelli MT. Wing geometry of *Culex coronator* (Diptera: Culicidae) from South and Southeast Brazil. Parasit Vectors. 2014;7:174.

- Dibo MR, Menezes RMT, Ghirardelli CP, Mendonça AL, Neto FC. Presença de culicídeos em município de porte médio do Estado de São Paulo e risco de ocorrência de febre do Nilo Ocidental e outras arboviroses. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(4):496-503.
- Djadid ND, Gholizadeh S, Tafsiri E, Romi R, Gordeev M, Zakeri S. Molecular identification of palearctic members of *Anopheles maculipennis* in Northern Iran. *Malar J*. 2007;17:6.
- Duarte AMRC, Pereira DM, Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic forest in Brazil. *Parasit Vectors*. 2013;6:58.
- Duret JP. Algunos culicidos nuevos para la Republica Argentina. *Rev San Mil Arg*. 1948;48:449-454.
- Dyar, HG. The mosquitoes of the Americas. Published by Carnegie Institution of Washington. 1928;387:444pp.
- Edwards FW. Diptera Fam. Culicidae. In: P. Wytsman (ed.). *Genera Insectorum*. Fascicule 194. Tervueren, Desmet-Verteneuil. 1932:258 p.
- Elliott R. The biting cycles of some anopheline mosquitos of Colombia. WHO. 1967.
- Falavigna-Guilherme AL, Silva AM, Guilherme EV, Morais DL. Retrospective study of malaria prevalence and *Anopheles* genus in the area of influence of the binational Itaipu reservoir. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2005;47(2):81-86.
- Faran ME. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contrib. Am. Entomol. Inst*. 1980;15(7):1-215.
- Favretto MA, Santos EB, Geuster CJ. Entomofauna do Oeste do estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *ebras*. 2013;6(1):42-63.

- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994;3:294-299.
- Forattini OP. *Entomologia Médica*, volume I. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Departamento de Parasitologia. 1962.
- Forattini OP, Lopes OS, Rabello EX. Investigações sobre o comportamento de formas adultas de mosquitos silvestres no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde públ S Paulo*. 1968;2(2):111-173.
- Forattini OP, Marucci D. The scanning electron microscopy of *Anopheles (Kerteszia)* eggs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88:349-52.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitos (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 7- Behaviour of adults *Nyssorhynchus* anophelines with special reference to *Anopheles albitarsis* s. l. in South-Eastern Brazil. *Rev Saúde Pública*. 1995;29(1):20-26.
- Forattini OP, Sallum MAM, Marques GRAM, Flores DC. Description of the eggs of *Anopheles (Kerteszia) laneanus* and *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* (Diptera: Culicidae) by scanning electron microscopy. *J Am Mosq Control Assoc*. 1997;13:368-374.
- Forattini OP, Sallum MAM, Bergo ES, Flores DC. Ultrastructure of eggs of *Anopheles rondoni*, *Anopheles lutzii*, and *Anopheles parvus*, Three species of the subgenus *Nyssorhynchus*. *J Am Mosquito Contr*. 1998;14(3):256-265.
- Forattini OP. *Culicidologia Médica*, volume II: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: Edusp. 2002.
- Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TMP, Nagaki SS, Sant'Ana DC, Sallum MAM. Phylogenetic Analysis and DNA-based Species Confirmation in *Anopheles (Nyssorhynchus)*. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e54063.

- Franca-Rodriguez ME, Varela JC. *Anopheles (Myzorrhynchella) antunesi*, especie nueva para el Uruguay. An Fac Med Montevideo. 1962;47:246-249.
- Galbadon A, Cova-Garcia P. Zoogeografia de los anofelinos en Venezuela: II. Los vectores secundários y los no vectores. Tijeretazos Malar. 1946;10(2):78-127.
- Galvão ALA, Amaral ADF. Estudos sobre os anofelinos do grupo Myzorrhynchella com a descrição de uma espécie nova, *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* n. sp. (Dipt. Culicidae). Folia Clin Biol. 1940;12(5):151-160.
- Galvão ALA. Contribuição ao Conhecimento das espécies de Myzorrhynchella (Diptera, Culicidae). Arch Zool S Paulo. 1941;2:558-576.
- Garros C, Dujardin JP. Genetic and Phenetic Approaches to *Anopheles* Systematics. in: S. Manguin (Ed.) *Anopheles* Mosquitoes – New Insights into Malaria Vectors. InTech Open Access. 2013;81-105.
- Gomes AC, Paula MB, Natal D, Gotlieb SLD. Ecologia de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root em área de implantação de empreendimento hidrelétrico, na divisa dos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(3):272-276.
- Gorham JR, Stojanovich CJ, Scott HG. Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica Oriental. Published by Atlanta, GA, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Center. 1967.
- Guimarães AE, Arlé M. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil. I – Distribuição Estacional. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79(3):309-323.
- Guimarães AE, Arlé M, Machado RNM. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil. II. Distribuição Vertical. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985;80(2):171-185.

- Guimarães AE, Motta MA, Arlé M, Machado RM, Gonçalves LD. Bionomia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em áreas de Mata Atlântica no município de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, Brasil. I Frequência intra, peri e extradomiciliar. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84(4):243-254.
- Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Sant'Anna A, Jovita AM. Ecologia de mosquitos (Diptera: Culicidae) em áreas do Parque Nacional da Serra da Bocaina, Brasil. I - Distribuição por habitat. Rev Saúde Pública. 2000;34(3):243-50.
- Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, Sant'Anna A. Ecologia de mosquitos em áreas do Parque Nacional da Serra da Bocaina. II – Frequência mensal e fatores climáticos. Rev Saúde Pública. 2001;35(4):392-399.
- Guimarães AE, Lopes CM, Mello RP, Alencar J. Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em áreas do Parque Nacional do Iguaçu, Brasil. 1 – Distribuição por hábitat. Cad Saúde Pública. 2003;19(4):1107-1116.
- Hackett BJ, Gimnig J, Guelbeogo W, Costantini C, Koekemoer LL, Coetzee M, Collins FH, Besansky NJ. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. Insect Mol Biol. 2000;9:369-374.
- Harbach RE, Roberts DR, Manguin S. Variation in the hindtarsal markings of *Anopheles darling* (Diptera: Culicidae) in Belize. Mosquito Systematics. 1993;25(3):192-197.
- Harbach RE. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of the phylogenetic relationships. Bull Entomol Res. 2004;94:537-553.
- Harbach RE, Kitching IJ. Reconsideration of anopheline mosquito phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. Syst Biodv. 2005;3(4):345-374.
- Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa. 2007;1668:591-638.

- Harbach RE. The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. in: S. Manguin (Ed.) *Anopheles Mosquitoes – New Insights into Malaria Vectors*. InTech Open Access. 2013;3-55.
- Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> (acessado em outubro de 2015).
- Herbert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identification through DNA barcodes. *Proc R Lond B*. 2003;270:313-321.
- Howard LO, Dyar HG, Knab F. The mosquitoes of North and Central America and the West Indies. Part II. Published by the Carnegie Institution of Washington. Vol 4. 1917.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. 2001;17:754-755.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16:111-120.
- Kirchgatter K, Tubaki RM, Malafronte RS, Alves IC, Lima GFMC, et al. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) in peridomiliary area during asymptomatic malaria transmission in the Atlantic Forest: Molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. *Rev Inst Med Trop*. 2014;56(5):403-409.
- Kirichenko N, Huemer P, Deutsch H, Triberti P, Rougerie R, Lopez-Vaamonde C. Integrative taxonomy reveals a new species of *Callisto* (Lepidoptera, Gracillariidae) in the Alps. *ZooKeys*. 2015;473:157-176.
- Kress WJ, Erickson DL. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:2761-2762.
- Lane J. Notas sobre Culicídeos de Rifaina. *Rev Biol Hyg*. 1935;6(2):73-78.

Lane J. Notas sobre mosquitos de São Paulo. Instituto de Hygiene de São Paulo. Boletim nº 60. 1936.

Lane J. Catálogo dos mosquitos neotrópicos. Instituto de Higiene de São Paulo. 1939.

Lardeux F, Chávez T, Rodríguez R, Torrez L. *Anopheles* of Bolivia: new records with an updated and annotated checklist. C R Biol. 2009;332:489-499.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 2007;23:2947-2948.

Laurito M, Oliveira TMP, Almirón WR, Sallum MAM. COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:110-122.

Limongi JE, Chaves KM, Paula MBC, Costa FC, Silva AA, Lopes IS, et al. Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(3):232-237.

Linthicum, K.J. A revision of the *Argyritarsis* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1988;20:98-271.

Lira-Vieira AR, Gurgel-Gonçalves R, Moreira IM, Yoshizawa MAC, Coutinho ML, Prado PS, Souza JL, et al. Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the gallery forest of Brasília National Park, Brazil, with an emphasis on potential vectors of yellow fever. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(5):566-574.

Lopes J, Lozovei AL. Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do norte do Paraná, Brasil. II. Coletas com isca humana. Rev bras Zool. 1996;13(3):585-596.

- Lounibos LP, Duzak D, Linley JR. Comparative egg morphology of six species of the Albimanus section of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1997;34:136-155.
- Lustosa ES, Naves HAM, Carvalho MESD. Anofelinos de oito municípios do estado de Goiás e fazenda Riacho Frio, Distrito Federal – 1981 – 1987. Rev Pat Trop. 1989;18(1):1-6.
- Manoel ER, Silva HHG, Silva IG. Espécies de *Anopheles* (Diptera, Culicidae) em municípios com risco e autoctonia de malária no estado de Goiás. Rev Pat Trop. 2010;39(2):137-144.
- Marchon-Silva V, Lourenço-de-Oliveira R, Almeida MD, Silva-Vasconcelos A, Costa J. The type specimens of mosquitos (Diptera, Culicidae) deposited in the Entomological Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91(4):471-478.
- Marcondes CB, Lozovei AL, Falqueto A, Brazil RP, Galati EAB, Aguiar GM, Souza NA. Influence of Altitude, Latitude and Season of Collection (Bergmann's Rule) on the Dimensions of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94:693-700.
- Marcondes CB, Fernandes A, Muller GA. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) near a reservoir in the Western part of the Brazilian State of Santa Catarina. Biota Neotrop. 2006;6(3):bn02606032006.
- Melville J, Smith K, Hobson R, Hunjan S, Shoo L. The Role of Integrative Taxonomy in the Conservation Management of Cryptic Species: The Taxonomic Status of Endangered Earless Dragons (Agamidae: *Tympanocryptis*) in the Grasslands of Queensland, Australia. PLoS ONE. 2014;9:e101847.
- Meneguzzi VC, Santos CB, Pinto IS, 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(4):570-575.

- Ministério da Saúde. Malária: Resumo Epidemiológico Nacional Mensal 2014[SIVEP presente na internet]. Brasília (DF); 2014 [acesso em 21 de julho de 2015]. Disponível em: <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet>.
- Missawa NA, Ribeiro ALM, Maciel GBML, Zeilhofer P. Comparison of capture methods for the diagnosis of adult anopheline populations from State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(5):555-560.
- Morales-Ayala F. A list of the Mosquitoes of Peru (Diptera, Culicidae). *Mosq Syst Newsletter*. 1971;3(3):138-145.
- Mousseau TA. Ectotherms Follow the Converse to Bergmann's Rule. *Evolution*. 1997;51:630-632.
- Nagaki SS, Motta MA, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles (Nyssorhynchus) antunesi* Galvão & Amaral and description of a new species of the Myzorhynchella Section (Diptera: Culicidae) from Serra da Mantiqueira, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(3):278-285.
- Nagaki SS, Silva AM, Sallum MAM. Redescription of *Anopheles (Nyssorhynchus) lutzii*, and resurrection of *Anopheles guarani* from synonymy with *An. lutzii* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am*. 2011;104(3):374-388.
- Naves HAM, Carvalho MESD, Carneiro E, Sales KP. Espécies de Culicidae de Goiânia-Brasil. *Rev Pat Trop*. 1996;25(1):31-42.
- Naves HAM, Carvalho MESD, Sales KP, Carneiro E. Preferência para diferentes tipos de isca por mosquitos (Diptera: Culicidae) capturados em Goiânia-Goiás. *Rev Pat Trop*. 1998;27(1):43-52.
- Nunes TC, Ribeiro RS, Faria PRGV, Silva JR NJ. Vetores de importância médica na área de influência da pequena central hidrelétrica Mosquitão – Goiás. *estudos*. 2008;35(11,12):1085-1105.

- Neiva A. Contribuição para o estudo dos dipteros. Observações sobre a biologia e sistemática das anofelinas brasileiras e suas relações com o impaludismo. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;69-77.
- Parise EV, Vigilância, prevenção e controle da malária em Palmas, Tocantins, Brasil, no período 2000 a 2013. Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde. 2014; Hygeia 2014;10(18):190-206.
- Parra-Henao G, Delgado D, Alarcón EP. Especies de *Anopheles* em el Canón del Río Sogamoso, Santander, Colombia, al inicio de la puesta em marcha del proyecto hidroeléctrico. Bol Mal Salud Amb. 2012;52(2):287-293.
- Peyton EL, Wilkerson RC, Harbach RE. Comparative analysys of the subgenera *Kerteszia* and *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst. 1992;24:51-69.
- Pinto C. Mosquitos da região neotropica (Brasil, S. Paulo). I (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1930;552-560.
- Pinto C. Alguns mosquitos do Brasil e do oriente da Bolivia (Diptera. Culicidae). Rev med-cirurg Brasil. 1932.
- Pinto C, Netto S, Marques H. Mosquitoes do Rio Grande do sul. Arquivos do Departamento Estadual de Saúde Rio Grande do Sul. 1940;1:14-52.
- Portes MGT, Rossi JCN, Nascimento JC, Zeccer S, Silva LA. Anofelinos de Santa Catarina (Diptera: Culicidae), Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(2):156-160.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol. 2008;25(7):1253-6.
- Quispe E. Distribución y actividad de picadura de especies de *Anopheles* en el departamento de Pando, zona amazónica de Bolivia 2006. Rev de Enfermedades Infecciosas y Tropicales. 2009;1(1):24-28.

- Rachou RG, Ferraz DM. Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil: estado de Santa Catarina. Rev Bras Malariol. 1951;3:540-554.
- Rachou RG, Ricciardi I. Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil: Estado do Paraná (Distribuição por municípios e localidades). Rev Bras Malariol. 1951;3:423-447.
- Rachou RG, Sousa J. Do encontro de um exemplar de *A (M) nigratarsis* (Chagas, 1907) no estado do Paraná. Rev Bras Malariol. 1950;2:234-238.
- Rebêlo JMM, Moraes JLP, Alves GA, Leonardo FS, Rocha RV, et al. Distribuição das espécies do gênero *Anopheles* (Diptera, Culicidae) no Estado do Maranhão, Brasil. Cad Saúde Pública. 2007;23(12):2959-2971.
- 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 Evol Biol. 2009;9:298.
- Rezende HR, Soares RM, Cerutti Jr C, Alves I, Natal D, 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(2):272-280.
- Ribeiro ALM, Miyazaki RD, Rodrigues JSV, Campelo Jr JH. Parity and influence of abiotic factors on *Anopheles* in the Manso dam, State of Mato Grosso, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(4):498-501.
- Root FM. Studies on Brazilian mosquitoes. I. The anophelines of the *Nyssorhynchus* group. The American Journal of Hygiene. 1926;6:684-717.
- Root FM. Studies on Brazilian mosquitoes. IV. Notes on some Brazilian species of *Anopheles*. Am J Hyg. 1927;7(5):599-605.

- Rossi GC, Lestani EA, D'oria JM. Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera: Culicidae). *Rev Soc Entomol Argent*. 2006;65(3-4):51-56.
- Rossi GC, Lestani EA. New records of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Misiones Province, Argentina. *Rev Soc Entomol Argent*. 2014;73(1-2):49-53.
- Ruiz F, Linton YM, Ponsonby DJ, Conn JE, Herrera M, Quiñones ML, Vélez ID, Wilkerson RC. Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105:899-903.
- Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, et al. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles*: *Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasit Vectors*. 2012;5:44.
- Sallum MAM, Schultz TR, Wilkerson RC. Phylogeny of Anophelinae (Diptera Culicidae) Based on Morphological Characters. *Ann Entomol Soc Am*. 2000;93:745-775.
- Sallum MAM, Marrelli MT, Nagaki SS, Laporta GZ, Santos CLS. Insight into *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae) Species from Brazil. *J Med Entomol*. 2008;45:970-981.
- Sallum MAM, Foster PG, Dos Santos CLS, Flores DC, Motoki MT, Bergo ES. Resurrection of Two Species from Synonymy of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *strodei* Root, and Characterization of a Distinct Morphological form from the Strodei Complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2010;47:504-526.
- Santos-Neto LG, Lozovei AL. Aspectos ecológicos de *Anopheles cruzii* e *Culex ribeirensis* (Diptera, Culicidae) da Mata Atlântica de Morretes, Paraná, Brasil. *Rev Bras Entomol*. 2008;52(1):105-111.
- Shannon RC. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *guarani* Shannon new species. In Dyar HG. The mosquitoes of the Americas. Carnegie Institution of Washington. 1928;387:444pp.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-2729.
- Theobald FV. A monograph of the Culicidae of the World. London, British Museum (Natural History). 1907.
- Tubaki RM, Hashimoto S, Domingos MF, Berenstein S. Abundance and frequency of culicids, emphasizing anophelines (Diptera, Culicidae), at Taquaruçu dam in the Paranapanema basin, Southern Brazil. *Rev Bras Entomol.* 1999;43(3/4):173-184.
- Wang X, Liu C, Huang L, Bengtsson-Palme J, Chen H, Zhang J, Cai D, Li J. ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *Mol Ecol.* 2015;15:573-586.
- WHO. World Malaria Report 2014. World Health Organization. Geneva. 2014. p. 2-167.
- Wilkerson RC, Peyton EL. Standardized Nomenclature for the Costal Wing Spots of the genus *Anopheles* and other spotted-wing mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1990;27:207-224.
- Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han, J, Li Y, Pang X, Xu H, Zhu Y, Xiao P, Chen S. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS ONE.* 2010;5: e13102.
- Zavortink TJ. The dismal state of mosquito systematics: perspectives of a classical taxonomist. *Bull Soc Vector Ecol.* 1994;19:69-72.