Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Diversidade genética e fenotípica do vetor de malária
***Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae) em São Paulo,**
Brasil

Laura Cristina Multini

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

Área de concentração: Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

São Paulo
2020

**Diversidade genética e fenotípica do vetor de malária
Anopheles cruzii (Diptera: Culicidae) em São Paulo,
Brasil**

Laura Cristina Multini

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

Área de concentração: Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

Versão original

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Multini, Laura Cristina

Diversidade genética e fenotípica do vetor de malária
Anopheles cruzii (Diptera: Culicidae) em São Paulo, Brasil /
Laura Cristina Multini; orientador Mauro Toledo Marrelli. -- São
Paulo, 2020.
140 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade
de São Paulo, 2020.

1. Mata Atlântica. 2. Malária. 3. Geometria Alar. 4. SNPs. 5.
Urbanização. I. Toledo Marrelli, Mauro , orient. II. Título.

***“Coragem é a mais importante de todas as
virtudes, porque sem ela nós não podemos
praticar nenhuma outra virtude com
consistência.”***

- Maya Angelou

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto (2015/23386-7). E pelo financiamento do Projeto Biota – FAPESP 2014/50444-5, do Projeto regular FAPESP 2014/10919-4 e do Projeto regular FAPESP 2016/166471, que custearam as coletas, materiais de consumo e insumos necessários à realização desse estudo.

A Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver meu projeto e pelas disciplinas oferecidas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli, pela confiança na realização desse projeto, pelo apoio, orientação e ajuda nestes quase nove anos de colaboração.

Ao meu companheiro, André Barretto Bruno Wilke, por toda a sua dedicação, ajuda, pelo seu amor e apoio incondicionais durante essa jornada. Sem ele, a realização desse projeto não seria possível.

A Ana Letícia da Silva de Souza, por toda a sua ajuda durante o desenvolvimento desse projeto, pela amizade e por ouvir meus desabafos nos momentos difíceis.

A Tatiane Marques Porangaba de Oliveira, por toda a sua ajuda na preparação das amostras de DNA para serem enviadas ao exterior, e pela sua atenção em todos os meus momentos de dúvida.

Aos colegas de laboratório, Walter Ceretti Junior, Aristides Fernandes, Antônio Ralph Medeiros de Sousa e Amanda Alves Camargo, pela amizade, ajuda e por todos os momentos de conversa e descontração.

Aos meus queridos amigos, Lucelia Lopes, Bruna Almeida, Thayane Cristina, Barbara de Freitas, Wellington Paixão, Fernando Pulvirenti, Ariane Primo e Mailson Oliveira, pela lealdade, pelos momentos de alegria e por todo o apoio durante todos esses anos de amizade.

Aos membros da minha banca de qualificação, Dr. Maria Anice Sallum e Dr. André Luis da Costa da Silva, pela ajuda e pelas ótimas sugestões durante a qualificação desse projeto. Elas foram muito importantes para o desenvolvimento e melhora desse trabalho.

Aos membros da Superintendência de Controle de Endemias, pela ajuda nas coletas de campo durante o andamento do projeto.

Aos membros da banca, Dr. Tamara Lima Camara, Dr. Karin Kirchgatter e Dr. Flávia Virginio, por aceitarem participar desse momento e por todas as contribuições durante a pré-banca.

A toda a minha família, aos meus pais Ademir e Verônica e a minha irmã Ana Rúbia, pelo seu amor incondicional, pelo incentivo e pelo apoio. Sem eles nada seria possível.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse possível.

RESUMO

Multini LC. Diversidade genética e fenotípica do vetor de malária *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae) em São Paulo, Brasil [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2019.

Mudanças antropogênicas no ambiente podem ser um fator poderoso na evolução das espécies. A fragmentação de áreas naturais devido às interferências humanas é associada à diminuição na riqueza e aumento na abundância de espécies de mosquitos adaptadas a ambientes urbanos. A Mata Atlântica brasileira tem passado por um processo intenso de fragmentação e desmatamento devido às alterações antropogênicas no ambiente. Esse bioma é um importante local de transmissão de malária, no qual o principal vetor de patógenos que causam a malária humana e simiana é o *Anopheles cruzii*. Desse modo, é possível que alterações antropogênicas no meio ambiente possam modular o fenótipo e genótipo de *An. cruzii*. Neste estudo, foram usados a geometria alar e marcadores moleculares SNPs para acessar a estrutura micro-geográfica de populações de *An. cruzii* coletadas em uma área hipoendêmica de malária na cidade de São Paulo, Brasil. Nesta região, as modificações antropogênicas suprimem a Mata Atlântica a fragmentos, fazendo com que *An. cruzii*, *Plasmodium* e seres humanos vivam em simpatria. Diferentes hipóteses para ambos os marcadores foram usadas em um desenho de estudo transversal e longitudinal para acessar se estruturação simpátrica e processos microevolutivos estão modulando as populações de *An. cruzii*. No geral, as hipóteses testadas foram divididas em: há estrutura entre populações de *An. cruzii* de copa e solo, há estrutura entre populações de *An. cruzii* em áreas com diferentes níveis de modificações antropogênicas e há estrutura populacional em relação ao tempo em *An. cruzii*. Portanto, foram investigadas a variação alar e genética em populações de *An. cruzii* coletadas em áreas silvestre, periurbana e urbana durante um período de três anos. Os principais resultados da análise de geometria da asa mostraram que as populações de copa e solo do ambiente urbano são distintas de acordo com a análise de variáveis canônicas. Os resultados também mostraram uma sutil, mas significativa variação fenotípica nas populações das três áreas durante os três anos de estudo. As variações temporal e simpátrica do formato alar foram maiores no ambiente urbano, sugerindo que mudanças antropogênicas no ambiente podem modular a variação no formato alar de *An. cruzii*. Os resultados da análise de 1.235 SNPs considerados neutros e independentes mostraram baixa estruturação genética

entre as populações de *An. cruzii* no geral. Porém, as análises sugeriram que as populações de copa e solo da área urbana são significativamente estruturadas. A população do solo da área urbana apresentou maior diversidade genética que a de copa, corroborando os resultados da morfometria alar. Esses resultados indicam que modificações antropogênicas no ambiente levando à fragmentação de áreas naturais podem estar modulando a acrodendrofilia de *An. cruzii* e mantendo estrutura e diversidade genética na população de solo da área urbana.

Descritores: Mata Atlântica; Malária; Geometria Alar; SNPs; Estrutura populacional; Urbanização.

ABSTRACT

Multini LC. [Genetic and phenotypic diversity in the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae) in São Paulo, Brazil][thesis] São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2019. Portuguese.

Anthropogenic changes in the environment can be a powerful aspect in the evolution of the species. Fragmentation of natural areas due to human interference has been associated with the decrease of species richness and increase in the abundance of species that are adapted to these environments. The Brazilian Atlantic Forest has been undergoing an intense process of fragmentation and deforestation due to anthropogenic alterations in the environment. This biome is an important hotspot of malaria transmission, in which the main vector of simian and human malaria is the mosquito *Anopheles cruzii*. We hypothesized that anthropogenic alterations in the environment are an important driver for the phenotypic and genetic structure and diversity of *An. cruzii*. We tested five different hypotheses using both a cross-sectional and longitudinal design to assess the sympatric structure and microevolution process driving *An. cruzii* populations. We used both wing geometry and SNPs to assess the microgeographical genetic structure of *An. cruzii* populations in a malaria hypo-endemic area in the city of São Paulo, Brazil. In this region, anthropogenic modifications in the environment suppress the Atlantic Forest into fragments, resulting in mosquitoes *An. cruzii*, *Plasmodium* and humans living in sympatry. Our results show a slight but significant phenotypic variation in all three populations over the study period. Time was a more powerful driver for wing variation than geographic distance. Temporal wing-shape variation appears to be positively associated with urbanization, suggesting that anthropogenic changes in the environment may be a strong driver for wing-shape variation in *An. cruzii*. After filtering and removal of outlier loci, 1,235 SNPs were considered independent and neutral, and therefore, suitable to perform the analyses. The results showed an overall weak genetic structure among populations with a significant sympatric structure between ground and tree canopies populations from the urban area, with the population from ground level showing higher genetic diversity. Our findings indicate that anthropogenic modifications leading to habitat fragmentation could be driving the acrodendrophily of *An. cruzii* and maintaining genetic diversity and structure in populations from ground level.

Keywords: Atlantic Forest; Malaria; Wing Geometry; SNPs; Population Structure; Urbanization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de asas de <i>Anopheles cruzii</i> utilizadas para análise de morfometria geométrica e número de espécimes enviados para sequenciamento de SNPs pelo método <i>NextRAD</i> , de acordo com tipo de armadilha, ano e local de coleta.	51
Tabela 2 -	Resultados dos testes de classificação par a par das análises das populações de <i>Anopheles cruzii</i> coletadas nas copas e solo.	64
Tabela 3 -	Resultados dos testes de classificação par a par comparando as populações de <i>Anopheles cruzii</i> coletadas em 2015, 2016 e 2017 nas áreas silvestre, periurbana e urbana.	71
Tabela 4 -	Caracterização dos SNPs bi-alélicos usados nas análises genéticas das populações de <i>Anopheles cruzii</i> em todas as hipóteses testadas.	75
Tabela 5 -	Descritores genéticos para os 1.235 SNPs para as populações de <i>Anopheles cruzii</i> em todas as hipóteses testadas.	76
Tabela 6 -	Estatísticas de estrutura populacional. Estimativas globais de D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST} , em todos os SNPs para as Hipóteses SNP-1 e SNP-2.	77
Tabela 7 -	Estatísticas de estrutura populacional. Estimativas globais de D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST} , para todos os <i>loci</i> para as populações da Hipótese SNP-3.	82
Tabela 8 -	Estatísticas de estrutura populacional. Estimativas globais de D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST} , em todos os SNPs para as Hipóteses SNP-4 e SNP-5.	84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa do Brasil mostrando seus biomas e número de casos de malária autóctone da região Extra-Amazônica de 2007 a 2017.** Casos confirmados de malária foram coletados em “Sistema de Informação de Agravos de Notificação” (SINAN/DATASUS <http://portalsinan.saude.gov.br/malaria>). Todos os casos foram causados por espécies de *Plasmodium* reportadas na região Extra-Amazônica. 22
- Figura 2 - *Canistrum lindeni*.** Espécie de bromeliácea que serve como criadouro de *Anopheles cruzii*. Fonte da imagem: Reitz 1983. 26
- Figura 3 - *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab (1908).** Créditos: J. Stoffer, WRBU. 31
- Figura 4 - Mapa da cidade de São Paulo, Brasil mostrando os locais de coleta de *Anopheles cruzii*.** Mapa criado com o programa QGIS v2.18.9.a 48
- Figura 5 - Asa direita de *Anopheles cruzii* mostrando os 18 marcos anatômicos utilizados nas análises de morfometria geométrica.** 52
- Figura 6 - Gráfico Boxplot mostrando a média dos valores de centroide das asas de *Anopheles cruzii* coletadas na copa e no solo nos ambientes Silvestre, Periurbano e Urbano.** Tamanho do centroide: corresponde à raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada marco anatômico e o centro de massa. 59
- Figura 7 - Comparação dos formatos de asa no morfoespaço. A)** Primeira variável canônica (CV1=100%) para as populações de *Anopheles cruzii* de copa e Solo dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. X: primeira variável canônica; Y: frequência de cada formato alar. MD= distâncias de Mahalanobis; todas as estimativas foram significativas ($P<0.001$). O ponto zero (0.0) da escala representa a grande média dos dados em relação às variáveis canônicas. **B)** Gráfico do *wireframe* mostrando a comparação par-a-par das populações de *Anopheles cruzii* de copa e Solo dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. 61
- Figura 8 - Sobreposição dos *wireframes* das populações de copa (linhas pretas) e solo (linhas cinzas) do ambiente urbano, obtidos pela análise de extremo de diferenciação.** A) Variação do formato: 1X. B) Variação do formato: 3X. C) Variação do formato: 10X. Os diagramas foram sobrepostos baseando-se no marco anatômico 2. 62

- Figura 9 - Comparação dos formatos de asa no morfoespaço.** Primeira variável canônica (CV1=100%) para as populações de *Anopheles cruzii* de copa e solo em todas as áreas. X: primeira variável canônica; Y: frequência de cada formato alar. 63
- Figura 10 -** Gráfico Boxplot mostrando a média dos valores de centroide das asas de *Anopheles cruzii* nas populações silvestre, periurbana e urbana nos anos de 2015, 2016 e 2017. Tamanho do centroide: corresponde à raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada marco anatômico e o centro de massa. 65
- Figura 11 - Comparação dos formatos de asa no morfoespaço.** Primeira variável canônica (CV1=100%) para as populações de *Anopheles cruzii* de 2015, 2016 e 2017 dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. X: primeira variável canônica; Y: frequência de cada formato alar. MD= distâncias de Mahalanobis; *valor de P não significativo ($P > 0.05$). O ponto zero (0.0) da escala representa a grande média dos dados em relação às variáveis canônicas. 67
- Figura 12 -** Espaço morfológico das duas primeiras variáveis canônicas para as populações de *Anopheles cruzii* baseado em 18 marcos anatômicos. Comparação das três populações (silvestre, periurbana e urbana) sem separação por ano de coleta. A contribuição relativa de cada variável canônica é mostrada em parênteses. 69
- Figura 13 -** Gráfico do *wireframe* mostrando a comparação par-a-par das populações de *Anopheles cruzii* de 2015, 2016 e 2017 dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. 70
- Figura 14 -** Árvore de *Neighbor-Joining* baseada nas distâncias de Mahalanobis para as populações silvestre (SY), periurbana (PU) e urbana (UR) de *Anopheles cruzii* com 1.000 réplicas de *bootstrap*. *Anopheles darlingi* foi utilizado como grupo externo. 72
- Figura 15 -** Gráfico da distribuição dos valores de Heterozigosidade em relação aos valores de F_{ST} para todos os SNPs filtrados. Cada SNP é representado por um ponto preto no gráfico. O intervalo de confiança de 95% é representado pelas linhas vermelhas. 74
- Figura 16 - Diversidade genética das populações copa e solo de *Anopheles cruzii*.** Análise dos Componentes Principais (PCA). Eixo x-y: Variância explicada pelos PC1 e PC2. Os dados foram transformados usando a PCA e plotados como uma função dos dois primeiros componentes principais. 79

Figura 17 - Estrutura genética das populações de copa e solo de *Anopheles cruzii*. Análise Bayesiana de *clusters* multi-locus implementada no programa *STRUCTURE*. Cada um dos indivíduos é representado por uma linha vertical, esta linha é fracionada em segmentos de cores que representam a probabilidade dos indivíduos de pertencer a algum dos *clusters* genéticos.

81

Figura 18 - Diversidade e estrutura genética das populações de *Anopheles cruzii* dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. A) Análise dos Componentes Principais (PCA) comparando as populações de *Anopheles cruzii* dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. Eixo x-y: Variância explicada pelos PC1 e PC2. Os dados foram transformados usando a PCA e plotados como uma função dos dois primeiros componentes principais. **B)** *STRUCTURE* - Análise Bayesiana de *clusters* multi-locus ($K=2$). Cada um dos indivíduos é representado por uma linha vertical, fracionada em segmentos de cores que representam a probabilidade dos indivíduos em pertencer a algum dos *clusters* genético.

83

Figura 19 - Diversidade genética das populações de *Anopheles cruzii* dos anos de 2016 e 2017 em todas as áreas e em cada área. Análise dos Componentes Principais. Eixo x-y: Variância explicada pelos PC1 e PC2. Os dados foram transformados usando a PCA e plotados como uma função dos dois primeiros componentes principais.

86

Figura 20 - Estrutura genética das populações *Anopheles cruzii* coletadas nos anos de 2016 e 2017. A) Hipótese SNP-4. B) Hipótese SNP-5. Análise bayesiana de *clusters* multi-locus implementada no programa *STRUCTURE*. Cada um dos indivíduos é representado por uma linha vertical no gráfico, esta linha é fracionada em segmentos de cores que representam a probabilidade dos indivíduos em pertencer a algum dos *clusters* genéticos.

88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Família Culicidae.....	15
1.2	Malária	17
1.2.2	Malária na região Extra-Amazônica brasileira.....	21
1.2.3	Malária Bromélia	24
1.2.4	Malária simiana.....	29
1.3	<i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> Dyar & Knab (1908).....	30
1.4	Mata Atlântica e Urbanização	34
1.4.1	Parelheiros.....	35
1.5	Estudos Populacionais em <i>Anopheles cruzii</i>	38
1.6	Morfometria Geométrica.....	40
1.7	Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs).....	42
1.8	Hipóteses	45
2	OBJETIVOS	47
3	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	Áreas de estudo e populações de <i>Anopheles cruzii</i>	48
3.1.1	Área de Proteção Ambiental (APA) Capivari-Monos (Zona Sul)	49
3.3	Métodos de coleta.....	49
3.4	Identificação dos espécimes	50
3.5	Morfometria Geométrica Alar	50
3.5.1	Análise da Morfometria Geométrica Alar	52
3.6	Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs).....	54
3.6.1	Extração de DNA	54
3.6.2	Preparação de bibliotecas de SNPs.....	54
3.6.3	Análise dos SNPs	56
4	RESULTADOS	59
4.1	Morfometria Geométrica Alar	59
4.1.1	Hipótese MGA-1 e MGA-2	59
4.1.2	Hipóteses MGA-3 e MGA-4	64
4.2	SNPs.....	73
4.2.1	Hipótese SNP-1 e Hipótese SNP-2.....	76
4.2.2	Hipótese SNP-3	82
4.2.3	Hipótese SNP-4 e Hipótese SNP-5.....	84

5	DISCUSSÃO	89
5.1	Estruturação simpátrica e acrodendrofilia de <i>Anopheles cruzii</i>	89
5.2	Estruturação populacional transversal em <i>Anopheles cruzii</i>	92
5.3	Microevolução em <i>Anopheles cruzii</i>	93
5.4	Controle de <i>Anopheles cruzii</i>	97
6	CONCLUSÕES	98
7	REFERÊNCIAS	100
	ANEXOS	113
	Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsaurus em cada amostra de <i>Anopheles cruzii</i>	113
	Anexo 2 - Heterozigosidade e F_{ST} calculados pela análise de 'fsthet' para todos SNPs considerados <i>outliers</i>	123
	CURRÍCULO LATTES	126

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família Culicidae

Os mosquitos são um grupo abundante de insetos alados que compõem a família Culicidae (Ordem: Diptera). Esse grupo é composto por mais de 3.500 espécies classificadas em duas subfamílias e 113 gêneros. As espécies de mosquitos estão distribuídas por todas as regiões temperadas e tropicais do Mundo (Harbach 2008). O ciclo biológico dos mosquitos compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto. As formas imaturas são aquáticas e os adultos são alados com pernas e antenas longas. Os mosquitos adultos se alimentam principalmente de seiva, porém as fêmeas também realizam repasto sanguíneo necessário para a maturação de seus ovos (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

Os mosquitos são extensamente conhecidos e estudados devido a muitas espécies deste grupo serem responsáveis por transmitir patógenos causadores de doenças em seres humanos e animais. Os três gêneros de mosquitos que possuem maior importância médica, são *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). As espécies do gênero *Culex* são implicadas na transmissão dos patógenos que causam a Filariose Linfática (Ottesen 2006) e de vírus causadores de diversas encefalites que assolam a população humana, como vírus do Nilo ocidental, e o vírus que causa encefalite equina venezuelana (Campbell et al. 2002; Weaver et al. 2004). As espécies do gênero *Aedes* são responsáveis pela transmissão dos vírus que causam dengue, Zika, chikungunya, febre amarela, entre outras (Costa Vasconcelos 2003; Pialoux et al. 2007; Hayes 2009; Bhatt et al. 2013). As espécies do gênero *Anopheles* são responsáveis pela transmissão de diferentes espécies de *Plasmodium* que causam a malária em humanos e diversos grupos de animais (Ashley et al. 2018).

Desse modo, os mosquitos são considerados os animais mais perigosos do planeta, uma vez que ameaçam bilhões de pessoas que vivem em áreas de risco de adquirir os patógenos transmitidos por esses vetores.

O controle de vetores é a principal ferramenta para prevenir e controlar as doenças associadas a mosquitos (Benelli et al. 2016). Porém, existem diversos desafios inerentes a esse controle. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, o controle de vetores muitas vezes é negligenciado, em parte por falta de consciência da população e órgãos públicos, bem como, por razões socioeconômicas (Tauil 2006). As estratégias de controle de mosquitos se baseiam, principalmente, no uso de inseticidas químicos em conjunto com manejo ambiental, fundamentados na redução e remoção de criadouros para as formas imaturas (Benelli et al. 2016). Devido ao surgimento de resistência aos inseticidas químicos, bem como, ao alto grau de poluição que seus ativos podem causar ao ambiente, o seu uso deve ser regulado (Benelli et al. 2016; Naqqash et al. 2016). Além disso, o uso de inseticidas, como organofosfatos, carbamatos e piretróides, pode ser nocivo à saúde humana e ao meio ambiente. Um exemplo foi o uso indiscriminado de dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) no século passado, um inseticida atualmente banido do Brasil desde 2009 devido à sua alta toxicidade (Brasil 2009).

O aumento de movimentação de pessoas entre áreas endêmicas e não endêmicas para doenças infecciosas, e o financiamento limitado para saúde pública em países em desenvolvimento contribuem para a ocorrência de surtos e epidemias de doenças. Baseado-se nisso, a Organização Mundial da Saúde (OMS), adotou o Manejo Integrado de Pragas (MIP) para o controle de vetores (WHO 2004). O MIP consiste em ordenamento ambiental, conscientização da população e controle biológico de vetores (Chanda et al. 2017). Neste tipo de manejo, a utilização de inseticidas químicos deve ser empregada somente em casos de surtos e epidemias. Um dos objetivos do MIP é

controlar populações de mosquitos vetores com eficácia e preservar o meio ambiente de contaminações (WHO 2004).

O controle biológico de mosquitos inclui: inseticidas baseados em organismos naturalmente letais para mosquitos, ou suas formas imaturas (ex: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti)) e soltura de mosquitos que são estéreis ou incapazes de transmitir patógenos (Benelli & Mehlhorn 2016; Benelli et al. 2016). As novas estratégias de controle biológico de mosquitos são promissoras, porém elas devem ser capazes de funcionar em larga escala e em um ambiente que está em constantes mudanças devido às interferências antropogênicas (Wilke et al. 2018a). O melhor conhecimento sobre a biologia, comportamento e fisiologia dos mosquitos vetores irá, inevitavelmente, estimular novas abordagens para o seu controle.

1.2 Malária

Em 2018, foi estimado que 228 milhões de casos de malária ocorreram ao redor do mundo, totalizando cerca de 405 mil mortes pela doença (WHO 2019). A malária é uma doença tropical, infecciosa e endêmica em 91 países (WHO 2019). Essa doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, quatro espécies são conhecidas por infectarem humanos: *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti (1890), *Plasmodium falciparum* Welch (1897), *Plasmodium malariae* Feletti & Grassi (1889) e *Plasmodium ovale* Stephens (1922) (Suh et al. 2004), sendo os dois primeiros os mais importantes causadores de malária no Brasil. Além destes, dois parasitas zoonóticos, *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulligan (1933) no sudeste asiático e *Plasmodium simium* no Brasil, também são capazes de causar doença em humanos (Ramasamy 2014; Brasil et al. 2017). Esses parasitas são transmitidos aos seres humanos através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (WHO 2019). Existem mais de 70 espécies

de *Anopheles* capazes de transmitir os agentes etiológicos da malária, sendo 40 espécies dominantes (Sinka et al. 2010).

Dentre as doenças relacionadas a mosquitos vetores, a malária é provavelmente a mais importante e que recebe mais investimentos para pesquisa e eliminação. Porém, esta doença persiste atingindo principalmente os países mais pobres do mundo. Por isso pesquisadores, órgãos governamentais e não-governamentais preveem dificuldade em atingir a redução de pelo menos 40% da incidência de casos de malária até 2020, um dos principais objetivos da “Estratégia Técnica Mundial para o Paludismo 2016 – 2030” (OMS 2015).

Para o ciclo da malária acontecer, assim como qualquer outra doença associadas a mosquitos vetores, é necessária a presença de três fatores: parasitas, mosquitos vetores competentes e hospedeiros suscetíveis. A transmissão de malária ocorre, na maioria das vezes, quando mosquitos infectados com *Plasmodium* em forma de esporozoítos os injetam no tecido subcutâneo ou diretamente na corrente sanguínea dos humanos durante o repasto sanguíneo. Assim que atingem a corrente sanguínea, os esporozoítos migram até o fígado do humano infectado. No fígado, os esporozoítos invadem as células hepáticas (hepatócitos) e se multiplicam em milhares de merozoítos que conseguem invadir os eritrócitos (hemácias) assim que são liberados das células do fígado (Ministério da Saúde 2010), e lá se multiplicam até o rompimento dos eritrócitos. Quando as células se rompem no fígado começa o ciclo eritrocítico da doença, onde os acometidos começam a desenvolver os sintomas logo que a parasitemia atinge mais que 100 parasitas por μL (Ashley et al. 2018).

Uma pequena proporção de parasitas assexuados se converte em gametócitos (formas sexuais do parasito). Por sua vez, os gametócitos são as formas que infectam

os mosquitos *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Os gametócitos machos criam flagelos dentro do intestino dos mosquitos e gametas machos e fêmeas se fundem formando um zigoto. Este se transforma em oocineto móvel, que atravessa a parede do intestino dos mosquitos, alojando-se na hemocele. Na hemocele, o oocineto se transforma em uma forma multinucleada denominada oocisto, onde milhares de esporozoítos se desenvolvem. Os oocistos se rompem e liberam os esporozoítos que migram para as glândulas salivares dos mosquitos e que irão infectar novos humanos suscetíveis, completando o ciclo de vida do *Plasmodium* (Suh et al. 2004; Ministério da Saúde 2010).

Os sintomas mais comuns da malária são inespecíficos, tais como febre alta, calafrios, tremores, sudorese, dores no corpo e dor de cabeça, dificultando o diagnóstico da doença em áreas não endêmicas. Os sintomas da forma grave da doença, geralmente causada por *P. falciparum*, incluem principalmente: prostração, alteração da consciência, convulsões e hiperventilação. Infecções assintomáticas de malária *falciparum* e *vivax* são comuns em áreas com alta endemicidade da doença (Ministério da Saúde 2019a).

Em 2019, foram notificados mais de 151 mil casos de malária no Brasil (Ministério da Saúde 2020). Segundo o Ministério da Saúde, a incidência de malária teve um aumento de 26% (88.565 casos) no período de janeiro a junho de 2018, em relação ao mesmo período de 2017, que já havia registrado um aumento de 59% em relação a 2016 (Ministério da Saúde 2018). O Ministério da Saúde prevê que os desafios para os próximos anos serão: retomada da redução, reestruturação dos níveis locais, redução da letalidade em áreas de baixa transmissão, melhorar a oportunidade de tratamentos e reposta rápida a surtos. No Brasil, 99% dos casos de malária ocorrem na região Amazônica do país. Porém, ainda há casos autóctones de malária sendo registrados na

região Extra-Amazônica do país, local onde mosquitos *Anopheles*, *Plasmodium* e humanos vivem em simpatria, e onde uma grande parcela das transmissões são negligenciadas por falta de conhecimento de profissionais da saúde (Lorenz et al. 2015; Multini et al. 2019a).

Segundo recomendação da OMS, a estratégia para o controle da malária deve ser baseada em quatro pilares: controle de vetores, quimioprevenção, diagnóstico e tratamento (OMS 2015). O controle de vetores se baseia em duas estratégias mais predominantes: o uso de mosquiteiros tratados com inseticidas e a pulverização de inseticidas dentro dos domicílios. No entanto, o controle de vetores deve ser orientado por dados epidemiológicos e entomológicos locais, incluindo a resistência ao inseticidas e comportamento dos mosquitos, também há a necessidade de uso de novas abordagens em conjunto com as existentes e a capacitação de profissionais com conhecimento em entomologia em saúde pública (The Lancet Global Health 2017; Beier et al. 2018).

Além disso, as estratégias de controle de vetores devem levar em consideração o MIP (Beier et al. 2008). É necessário conhecer a fauna local de anofelinos e sua biologia para saber qual estratégia de controle é mais indicada para cada caso, reconhecendo o papel importante da vigilância entomológica no combate à doença. Os mosquiteiros, por exemplo, são eficazes para evitar os mosquitos que picam durante à noite, mas não os que picam durante o dia ou no crepúsculo. A pulverização domiciliar de inseticidas não afetará populações de espécies de *Anopheles* que picam no exterior das casas (Beier et al. 2018).

A quimioprevenção inclui o tratamento preventivo intermitente de mulheres grávidas e bebês, assim como tratamento preventivo sazonal para crianças menores de

5 anos, por serem os grupos mais afetados pelas formas graves da doença. A quimioprofilaxia, que consiste no uso de antimaláricos em doses subterapêuticas, também é indicada para viajantes, profissionais da saúde ou pesquisadores que sejam suscetíveis à doença e irão viajar para zonas endêmicas (OMS 2015). Quatro antimaláricos são indicados atualmente para a quimioprofilaxia: doxiciclina, mefloquina, a combinação de atovaquona e proguanil, e cloroquina (Ministério da Saúde 2008).

O diagnóstico de malária deve ser feito e confirmado, por meio de microscopia ou teste diagnóstico rápido, para todos os pacientes suspeitos de malária. Todos os casos confirmados devem ser notificados ao sistema de vigilância em saúde. O tratamento é feito por meio de medicamentos específicos, nos casos de malária por *P. falciparum* não complicada é indicado o uso de artemisinina. Para os casos de malária por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* o uso de cloroquina é o mais indicado. Para os casos graves de malária causados por *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. knowlesi* o tratamento é feito por via parentérica com artesunato ou arteméter, seguido de tratamento oral à base de artemisinina (OMS 2015; Ashley et al. 2018).

1.2.2 Malária na região Extra-Amazônica brasileira

Apesar da grande maioria dos casos de malária que ocorrem no Brasil estarem restritos à região Amazônica, ainda são notificados casos da doença na região Extra-Amazônica do país. A região Extra-Amazônica brasileira abrange estados das regiões sul (Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul), sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo), nordeste (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia) e centro-oeste (Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal) do país. De janeiro de 2007 a setembro de 2019, 815 casos autóctones de malária humana foram confirmados na região Extra-Amazônica (Figura 1) (Ministério

da Saúde 2019b). Além disso, em publicação do Ministério da Saúde sobre a situação epidemiológica da malária, foi reportado o aumento de 35% na incidência de malária autóctone na região Extra-Amazônica de janeiro a julho de 2018, em relação ao mesmo período de 2017 (Ministério da Saúde 2018). Nessa região dois perfis de casos de malária humana são comumente notificados: casos importados e casos autóctones. Os casos autóctones podem ser introduzidos (secundários a casos importados) e casos de malária bromélia.

Figura 1. Mapa do Brasil mostrando seus biomas e número de casos de malária autóctone da região Extra-Amazônica de 2007 a 2019. Casos confirmados de malária foram coletados em “Sistema de Informação de Agravos de Notificação” (SINAN/DATASUS <http://portalsinan.saude.gov.br/malaria>). Todos os casos foram causados por espécies de *Plasmodium* reportadas na região Extra-Amazônica. doi: 10.1016/j.pt.2019.03.009.

Os casos de malária importada representam a grande maioria de casos notificados na região Extra-Amazônica. Eles podem ser casos importados originários da região Amazônica brasileira ou de outros países endêmicos, principalmente Africanos (Lorenz et al. 2015). Segundo o Ministério da Saúde (2018), 70% dos casos de malária registrados na região Extra-Amazônica de janeiro a julho de 2018 foram importados, sendo 37% da região Amazônica e 33% de outros países. Os principais países responsáveis pelos casos importados foram: Angola, África do Sul, Moçambique e Nigéria (Ministério da Saúde 2018).

Os casos introduzidos, caracterizam-se por serem casos de malária secundários a casos importados. Esses casos ocorrem, principalmente, em áreas em que a malária já foi endêmica no passado (Pina-Costa et al. 2014). A epidemiologia da malária introduzida, decorrente de um caso importado, caracteriza-se pela transmissão do *Plasmodium* introduzido (geralmente *P. vivax* ou *P. falciparum*) por mosquitos anofelinos da fauna local. Geralmente, mosquitos do gênero *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (por exemplo: *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root (1926), *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *aquasalis* Curry (1932) e espécies do complexo *Albitarsis*) (Pina-Costa et al. 2014).

A maioria dos casos de malária autóctone registrados na região Extra-Amazônica são causados pela malária introduzida, principalmente nos estados de Espírito Santo e Minas Gerais (Limongi et al. 2008; Meneguzzi et al. 2009). Apesar das grandes mudanças paisagísticas e melhoramento sanitário destas regiões desde 1960, a maioria do território ainda é altamente receptivo para a transmissão de malária (Pina-Costa et al. 2014). Surtos de malária introduzida, geralmente, acontecem quando há a combinação de três fatores: migração da região Amazônica, presença de vetor competente (principalmente *An. darlingi* e *An. aquasalis*) e população suscetível (Lorenz et al. 2015).

Pina-Costa et al. (2014), ressaltaram que a confirmação de espécies de *Anopheles* do subgênero *Nyssorhynchus* envolvidos na transmissão de casos introduzidos ainda é baixa. Os autores revelam que a pesquisa entomológica realizada após o descobrimento de casos, geralmente, envolve simplesmente o registro da fauna de anofelinos do local. Sendo assim, não há busca ativa por espécies de anofelinos no domicílio ou naturalmente infectadas por *Plasmodium spp.* Portanto, a determinação dos vetores da malária fora da região Amazônica se torna limitada.

1.2.3 Malária Bromélia

A malária bromélia ocorre de fato fora da região Amazônica, abrangendo áreas de Mata Atlântica. O ciclo de transmissão deste tipo de malária envolve como principal vetor o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab (1908), espécie alvo deste presente estudo. Portanto, a história da malária bromélia será aqui contada com maiores detalhes.

O envolvimento de espécies do subgênero *Kerteszia* na transmissão de *Plasmodium* no sudeste brasileiro foi proposto pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1903 (Lutz 1903), quando construía-se a linha de ferro que ia de São Paulo a Santos. Com o grande número de trabalhadores desbravando a Mata Atlântica serrana de São Paulo, era comum observar um grande número de doentes afetados pela malária. Lutz, movido pelo desejo de entender o ciclo de transmissão de malária nesta região, ficou hospedado em uma casa à beira da Mata e observou o comportamento dos mosquitos que ali viviam. Ele notou a presença de diversas espécies que já lhe eram familiares e a presença de uma espécie nova. Essa espécie tratava-se do *Anopheles lutzii*, descrita posteriormente por Theobald (1905), e que mais tarde seria conhecida como *Anopheles cruzii*. Lutz notou que essa espécie de *Anopheles* era mais delicada que as outras e,

mais tarde, verificou que essa espécie possuía uma ampla distribuição nos estados ao longo da costa brasileira, mas limitada às matas serranas (Lutz 1903).

Após a confirmação de que esse era o mosquito que transmitira os patógenos causadores da malária em São Paulo, era o momento da procura pelos criadouros de suas larvas. Lutz, conhecendo as características ambientais da Mata Atlântica, considerou que as poças d'água e brejos aconteciam apenas em condições excepcionais neste local. Após um pouco de meditação (como ele mesmo descreve) e aproveitando a experiência adquirida no campo, ele finalmente chegou em uma solução. Considerando que na Mata Atlântica era abundante o número de plantas que armazenavam água, as chamadas bromélias, e que em outras partes do mundo diversos seres vivos eram capazes de viver nos tanques de água destas plantas, as formas imaturas dos mosquitos também seriam capazes de ali viver (Figura 2). Assim, ele começou a examinar as águas das bromeliáceas (Lutz 1903).

Logo no início da busca, Lutz notou que as bromélias eram difíceis de alcançar, pois mesmo as que se encontravam nos galhos mais baixos das árvores, ainda estavam a 10 metros do solo. Sendo assim, ele ponderou que se os mosquitos estavam de fato ovipondo nas águas das bromélias, eles faziam isso acima “de nossas cabeças”. Após algum tempo, ele encontrou bromélias de mais fácil acesso na mesma região, onde diversas larvas de mosquitos foram coletadas, incluindo de *An. cruzii*. Lutz formulou a hipótese de que os mosquitos das florestas realizam a oviposição quase que exclusivamente nas águas das bromeliáceas (Lutz 1903). Cabe ressaltar que esse foi o primeiro relato de uma espécie de *Anopheles* sendo incriminada na transmissão de *Plasmodium* no Brasil (Deane 1986). Há relatos de que dois anos após a publicação do estudo de Lutz, Galli-Valério publicou uma nota sobre um mosquito muito danificado,

infectado com oocistos, que havia sido coletado em Paranaguá, Paraná. O próprio Galli-Valério identificou o mosquito como sendo da espécie *An. cruzii* (Gadelha 1994).

Figura 2. *Canistrum lindeni*. Espécie de bromeliácea que serve como criadouro de *Anopheles cruzii*. Fonte da imagem: Reitz 1983.

Depois de alguns anos da publicação de “*Waldmosquito und Waldmalaria*”, a descoberta de Lutz foi criticada e desacreditada por Frederick Knab (Knab 1912) durante um encontro da Sociedade Entomológica de Washington. Em uma das discussões do encontro, Knab apontou que para serem bons vetores de doenças humanas, os mosquitos deveriam ser associados com os seres humanos e ter a oportunidade de fazer

o repasto sanguíneo em humanos diversas vezes. O que ele não considerava que espécies silvestres seriam capazes de fazer, mesmo que ocasionalmente (Knab 1912).

Knab também afirmou que o *An. cruzii*, o qual Lutz encontrou e atribuiu como vetor dos patógenos que causam a malária, nada teria a ver com o surto de malária que ocorreu entre os trabalhadores da linha de ferro (Knab 1912). Devido à autoridade de Knab no assunto, a discussão sobre a malária da floresta foi encerrada naquele momento e, nos anos seguintes, pouca atenção foi dada à possibilidade das espécies de *Kerteszia* serem vetoras de patógenos causadores de malária.

A discussão foi retomada quando Fonseca e Corrêa (1941), publicaram um estudo sobre a infecção experimental do *An. cruzii* com o *P. vivax*. Neste estudo, os autores criaram os mosquitos machos e fêmeas em laboratório e fizeram a identificação a partir da genitália masculina. As fêmeas foram infectadas com gametócitos de *P. vivax* e dissecadas à medida que morriam. De 29 fêmeas infectadas, duas apresentaram formas evoluídas do parasita, uma no estômago e outra nas glândulas salivares, comprovando, assim, a capacidade de *P. vivax* se desenvolver até o ciclo final em *An. cruzii*.

Mais tarde, Downs e Pittendrigh (1946), propuseram o termo “*bromeliad-malaria*” para a transmissão da doença envolvendo os mosquitos do subgênero *Kerteszia*. Downs e Pittendrigh, pesquisavam a malária em Trindade e Tobago, a qual tem como principal vetor o *Anopheles (Kerteszia) bellator* Dyar & Knab (1906). Neste mesmo estudo, os autores criticam as observações de Frederick Knab acerca dos mosquitos silvestres. Eles afirmaram que nem todos os mosquitos silvestres ficam restritos ao ambiente silvestre, podendo deixá-lo em busca do repasto sanguíneo. Os autores também

propuseram que os homens modificam os ambientes naturais e podem criar florestas artificiais que são atrativas aos mosquitos silvestres (Downs & Pittendrigh 1946).

No Brasil, a epidemiologia da malária bromélia é caracterizada pelo ciclo de transmissão que ocorre em regiões de Mata Atlântica, consistindo na transmissão de *P. vivax* e *P. malariae* para humanos, principalmente pelo *An. cruzii* e por outras espécies do subgênero *Kerteszia*, como *An. bellator* e *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (1937) (Pina-Costa et al. 2014). A malária bromélia também envolve um ciclo de malária símia, no qual *P. simium* e *Plasmodium brasilianum* Gonder & Von Berenberg-Gossler (1908) são transmitidos para primatas não humanos pelo *An. cruzii* (Deane 1992).

A malária bromélia foi uma importante endemia no Brasil no começo e meio do século passado. Na década de 1940, em uma área habitada por aproximadamente 1 milhão de pessoas abrangendo os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, eram reportados cerca de 40.000 casos por ano. Nos anos de 1942 e 1943 foi reconhecido que todos os casos de malária da região eram causados por *Plasmodium* transmitidos por mosquitos do subgênero *Kerteszia* (Deane 1988; Gadelha 1994). Após uma agressiva campanha de eliminação da malária no sul e sudeste do Brasil, que envolvia o uso indiscriminado de DDT e remoção manual de bromélias, os casos diminuíram significativamente passando de 40.000 casos na década de 1940 para de 4.000 a 5.000 na década de 1970 e cerca de 500 na década de 1980 (Deane 1988). Em 1988, Deane (1988), considerou que a malária transmitida em áreas de Mata Atlântica havia sido eliminada.

Atualmente, é possível afirmar que a malária em regiões de Mata Atlântica nunca foi eliminada e continua ocorrendo consistentemente, acometendo pessoas que vivem em contato com fragmentos de mata, sendo chamada de malária residual (Pina-Costa

et al. 2014; Lorenz et al. 2015; Multini et al. 2019a). Ademais, em um estudo conduzido por Couto et al. (2010), os autores analisaram casos autóctones de malária notificados no estado de São Paulo entre 1980 e 2007, e identificaram 821 notificações nas regiões leste e oeste do estado, sendo que 91,6% dos casos ocorreram na região leste em municípios sob influência da Mata Atlântica.

Além disso, a epidemiologia da malária bromélia tem aumentado a sua complexidade (Multini et al. 2019a). Estudo realizado com amostras de sangue de doadores do banco de sangue de São Paulo encontrou positividade para *P. falciparum*, um parasita que não era considerado importante para a epidemiologia da malária bromélia (Maselli et al. 2014). O estudo gerou um grande debate e levantou questões sobre a veracidade dos dados na comunidade científica (Mendrone et al. 2014), o que levou os autores a escrever um novo artigo com dados que suportavam a presença de *P. falciparum* (ou uma espécie similar) em regiões de Mata Atlântica (Sallum et al. 2014). Ainda, cabe ressaltar que essa não foi a primeira vez que infecções assintomáticas por *P. falciparum* foram registradas em regiões de Mata Atlântica (Curado et al. 2006).

A real extensão da transmissão de malária na Mata Atlântica ainda é pouco conhecida. O diagnóstico de malária nessa região é feito principalmente por microscopia por gota espessa, e as estratégias de controle se baseiam em tratamento, uso de inseticidas e barreiras aos vetores (Duarte et al. 2008). Entretanto, somente 19% dos casos de malária que acontecem nessa região são devidamente detectados e tratados (Lorenz et al. 2015). Isso acontece por conta do alto número de infecções assintomáticas e porque os profissionais de saúde não estão habituados a diagnosticarem malária fora da região Amazônica.

1.2.4 Malária simiana

A malária simiana em áreas de Mata Atlântica também faz parte da epidemiologia da malária bromélia. A malária simiana é caracterizada pela transmissão de *P. brasilianum* e *P. simium* pelo *An. cruzii* para primatas não humanos (Deane 1992). *Plasmodium brasilianum* é considerada espécie sinônima de *P. malariae* e já foi encontrado infectando naturalmente tanto macacos da região Amazônica brasileira, quanto da região Extra-Amazônica, assim como diversas espécies de macacos da América Latina (Dunn & Lambrecht 1963; Deane 1992). *Plasmodium simium* possui alto grau de similaridade com o *P. vivax* humano, sendo predominantemente encontrado na Mata Atlântica das regiões sul e sudeste do Brasil (Fonseca 1951). *Plasmodium simium* foi encontrado em espécies símias pertencentes aos gêneros *Alouatta*, *Brachyteles* e, mais recentemente, *Cebus* e *Sapajus* (Deane 1992; Alvarenga et al. 2015; Abreu et al. 2019).

1.3 *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab (1908)

Anopheles cruzii (Figura 3) recebeu seu nome em homenagem ao sanitarista e bacteriologista Oswaldo Cruz. Esse mosquito possui distribuição neotropical sendo encontrado em países da América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela) e da América Central (Costa Rica e Panamá) (WRBU 2019). No Brasil, essa espécie de mosquito possui uma ampla distribuição pela costa brasileira, estendendo-se da região sul até o nordeste. Apesar disso, encontra-se restrita a áreas de Mata Atlântica, por ser um bioma rico em plantas da família das Bromeliáceas. O *An. cruzii* utiliza, exclusivamente, água das chuvas retida nas axilas de bromélias como criadouro para suas formas imaturas (Forattini 2002). Desse modo, sua densidade populacional é positivamente correlacionada com a abundância de bromélias e altos níveis de umidade do ar, sendo muito abundante nas matas úmidas das encostas litorâneas (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

Figura 3. *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab (1908). Créditos: J. Stoffer, WRBU.

Este anofelino pode ser encontrado picando tanto durante o dia, quanto à noite, porém aumenta sua atividade hematofágica durante o crepúsculo vespertino e primeiras horas da noite (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Esse mosquito é considerado exófilo e não sinantrópico, porque, apesar de ser capaz de invadir domicílios em busca de fontes humanas para o repasto sanguíneo, principalmente aqueles situados próximos às matas onde se criam, seu ambiente natural são áreas florestadas (Forattini et al. 1993; Guimarães et al. 2000). Estudos prévios reportaram alta abundância de *An. cruzii* no peridomicílio durante um surto de casos de infecções plasmodiais assintomáticas em áreas de Mata Atlântica. Análises moleculares para identificar as fontes de repasto

sanguíneo deste mosquito revelaram que os humanos eram suas fontes principais, indicando que *An. cruzii* exibe comportamento antropofílico (Kirchgatter et al. 2014).

Anopheles cruzii é considerado o principal vetor das espécies de *Plasmodium* que causam a malária humana e simiana na região Extra-Amazônica brasileira, principalmente nas regiões sul e sudeste do país (Deane et al. 1970; Forattini et al. 1986; Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Meneguzzi et al. 2009). Espécimes de *An. cruzii* foram confirmados infectados, por meio de teste imunoenzimático (ELISA), por ambos *P. vivax* e *P. vivax* variante VK247 nos municípios de Juquitiba e São Vicente no estado de São Paulo (Curado et al. 1997). Além disso, espécimes de *An. cruzii* também foram encontrados infectados por *P. vivax* e *P. malariae* em área silvestres, periurbanas e urbanas do subdistrito de Parelheiros no município de São Paulo (Duarte et al. 2013). Infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, descobertas por meio de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR-RT), também foram reportadas em *An. cruzii* em locais de florestas intermixadas com locais modificados por humanos (Laporta et al. 2015). Resultados de *An. cruzii* infectados por diferentes espécies de *Plasmodium* em regiões de floresta, assim como em áreas modificadas por seres humanos, revelam a importância epidemiológica desta espécie no ciclo da malária na região Extra-Amazônica.

Anopheles cruzii possui comportamento acrodendrófilo, caracterizado pela tendência em habitar e fazer repasto sanguíneo junto à copa das árvores (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Sua acrodendrofilia é bem documentada na maioria das áreas em que essa espécie é estudada. Um exemplo marcante é do Horto Florestal da Cantareira, no município de São Paulo, onde em um levantamento entomológico, 99% dos espécimes de *An. cruzii* foram coletados na copa das árvores contra apenas 1% no solo (Deane et al. 1971). Porém, em algumas localidades, esse vetor é encontrado com

abundância tanto junto à copa das árvores quanto no solo (Deane et al. 1984). Acredita-se que essa característica comportamental faça com que seja possível em lugares onde o *An. cruzii* está presente, porém sem casos de malária humana, observar um alto número de casos de malária simiana.

Em um estudo realizado por Deane e colaboradores (1984), fêmeas de *An. cruzii* coletadas em São Francisco do Sul, Santa Catarina, foram analisadas. Neste local era possível observar alta dispersão vertical de *An. cruzii* e alto números de casos humanos de malária. Os autores criaram a hipótese de que os mosquitos que picavam junto à copa das árvores poderiam pertencer à uma espécie diferente daqueles que picavam junto ao solo. Após realização de coleta, marcação com corante e soltura, os pesquisadores notaram que os mosquitos coletados e marcados no solo, podiam ser coletados novamente nas copas das árvores e vice-versa. Sendo assim, assumiram que neste local tanto os espécimes da copa das árvores quanto os do solo pertenciam à mesma espécie. Apesar disso, não dispensaram a possibilidade do *An. cruzii* pertencer a duas espécies diferentes (Deane et al. 1984).

Nas localidades onde o *An. cruzii* é encontrado com grande capacidade de dispersão vertical, há grande probabilidade que essa espécie busque por repasto sanguíneo em primatas não humanos (junto à copa das árvores) e humanos e outros primatas (ao nível do solo), tornando possível a transmissão zoonótica de *Plasmodium* de primatas não humanos para humanos (Deane et al. 1984; Ueno et al. 2007; Yamasaki et al. 2011; Brasil et al. 2017). O primeiro relato de *P. simium* infectando humano foi feito por Deane et al. (1966), em um estudo realizado no Horto Florestal da Cantareira, São Paulo. Nesta localidade casos humanos de malária nunca haviam sido notificados anteriormente. Os autores deste estudo implicaram que o vetor da infecção seria o *An. cruzii*. Muitos anos depois, um estudo recente de Brasil et al. (2017), relataram 33

pacientes infectados por *P. simium* em áreas de Mata Atlântica do Rio de Janeiro. A infecção havia sido anteriormente identificada como sendo de *P. vivax*. Após a publicação de Brasil et al. (2017), a hipótese de que a malária na Mata Atlântica poderia ser um antroponose foi levantada, tornando-se um assunto que merece atenção (Grigg & Snounou 2017).

1.4 Mata Atlântica e Urbanização

A Mata Atlântica brasileira é um dos biomas mais ameaçados do mundo (Myers et al. 2000). Esse importante bioma é caracterizado por floresta úmida e densa, assim como por alta biodiversidade e alto grau de endemismo. Nas últimas décadas, a Mata Atlântica foi submetida a um processo severo de desmatamento e fragmentação, resultado de alterações antropogênicas descontroladas, como urbanização, industrialização e expansão da agricultura (Ribeiro et al. 2009). Esses fatores levaram esse bioma a se transformar em um arquipélago de pequenas ilhas de vegetação inseridas em uma matriz de áreas degradadas, pasto, agricultura e áreas urbanas (Joly et al. 2014).

Este bioma é considerado um dos maiores *hotspots* de conservação de biodiversidade do mundo (Myers et al. 2000). Atualmente é considerado que a cobertura vegetal remanescente da Mata Atlântica seja de 28% (Rezende et al. 2018), um cenário animador considerando que há 10 anos atrás a estimativa era de 11 – 16% de cobertura vegetal (Ribeiro et al. 2009). Grande parte da Mata Atlântica foi substituída por cidades que hoje albergam cerca de 125 milhões de pessoas, contribuindo com 70% do produto interno bruto do país. Além disso, os maiores centros urbanos na América do Sul encontram-se nos domínios da Mata Atlântica (Joly et al. 2014; Rezende et al. 2018). Apesar disso, o atual ecossistema da Mata Atlântica ainda é habitado por cerca de 1.400

espécies de animais vertebrados e 20.000 espécies de plantas, além de milhares de espécies de invertebrados, todos com alto grau de endemismo (Ribeiro et al. 2009).

Adicionalmente, a Mata Atlântica brasileira é considerada um importante *hotspot* de transmissão de malária (Marrelli et al. 2007; Laporta et al. 2013). E é possível que os processos de mudanças antropogênicas sofridas por esse bioma, possa aumentar o contato entre humanos, primatas não humanos e anofelinos do subgênero *Kerteszia*, levantando questões em relação ao atual cenário epidemiológico de malária bromélia em regiões de Mata Atlântica (Sallum et al. 2014).

O estado de São Paulo, coberto em grande parte pelo bioma Mata Atlântica, é o mais populoso do Brasil, com mais de 45 milhões de habitantes. Sua capital, São Paulo, é considerada uma megalópole com aproximadamente 12 milhões de habitantes (IBGE 2019). Os processos de urbanização sofridos na cidade de São Paulo são, possivelmente, responsáveis por aumentar o contato entre humanos e *An. cruzii*, acarretando em um total de 34 casos de malária humana autóctones entre os anos de 2007 e 2019 (Meneguzzi et al. 2009; Ministério da Saúde 2019b).

1.4.1 Parelheiros

O subdistrito de Parelheiros, localizado no extremo Sul da cidade de São Paulo, abrange os distritos de Parelheiros e Marsilac (Prefeitura de São Paulo 2019b). Essa região é considerada um Patrimônio Ambiental do município de São Paulo. A região abrange duas Áreas de Proteção Ambiental (APA): Capivari-Monos e Bororé-Colônia (Prefeitura de São Paulo 2019a). O subdistrito abrange uma área de 353,50 Km² com uma população de 159.737 pessoas, sendo 151.339 no distrito de Parelheiros e 8.398 em Marsilac (Fundação SEADE 2019). A totalidade do território está situada em área de proteção aos mananciais e a região compreende remanescentes importantes de Mata

Atlântica mantendo grande parte de sua mata nativa e biodiversidade. Devido às grandes extensões de áreas naturais, essa região é importante para equilibrar as correntes térmicas da cidade de São Paulo apresentando o maior índice pluviométrico do município e menores temperaturas médias. Sua rede hídrica contempla três bacias hidrográficas: Capivari, Guarapiranga e Billings, com as duas últimas fornecendo água para 25% da população da cidade (Prefeitura de São Paulo 2019a).

Parelheiros possui uma interessante história de ocupação. Por determinação e convite do governo imperial, um grupo de imigrantes alemães, austríacos e suíços chegaram a São Paulo em 1827. Eles vieram para o estabelecimento de uma colônia agrícola na cidade e após um ano de estudos e discussões, o governo determinou que uma área a cerca de 50 km do centro da cidade seria ideal para alocá-los. Tal área ficou conhecida como Colônia Alemã. A posse do território começou com a chegada de 94 famílias alemãs, em 1829. Hoje, habitam na região descendentes de alemães, japoneses e pessoas vindas de vários estados brasileiros. Além de duas aldeias indígenas, *Pyau (Krucutu)* e *Tenondé Porá* (Morro da Saudade), de origem guarani (Prefeitura de São Paulo 2019a).

Devido à urbanização desordenada da cidade e alto fluxo migratório, a ocupação inadequada do solo em áreas de mananciais é extremamente comum no subdistrito de Parelheiros. Toda essa região é extremamente carente de infraestrutura e sua população vem crescendo de forma irregular, com baixa renda, gerando aumento no déficit monetário da região. Esses fatores levam a um impasse, pois a população de baixa renda compra lotes a preços baixos e com documentação inadequada em áreas de preservação, e passam a ocupar desordenadamente o território. Além disso, os serviços de saúde, educação, cultura, lazer, transporte e saneamento básico disponíveis

na região são insuficientes para atender toda sua população (Prefeitura de São Paulo 2019a).

Devido à região ser inserida em uma área remanescente de Mata Atlântica, a população humana vive em contato direto com fragmentos de florestas. A intermixagem de ambientes naturais com ambientes modificados pelo homem favorece a proliferação de mosquitos, isso ocorre, por conta do vasto ambiente para oviposição (ex. criadouros artificiais e naturais) e grande número de hospedeiros para o repasto sanguíneo (ex. humanos e animais silvestres). Como consequência, a população dessa área pode ser inserida em ciclos naturais de doenças causadas por patógenos veiculados por mosquitos vetores que podem ser encontrados na região (Ribeiro et al. 2012).

Em um levantamento entomológico realizado dentro da APA Capivari-Monos, o *An. cruzii* foi o mosquito mais abundante em áreas mais silvestres e o terceiro mais abundante em áreas mais urbanizadas da região (Ribeiro et al. 2012). Neste local, a urbanização restringe a mata a fragmentos remanescentes de Mata Atlântica, favorecendo *An. cruzii* a buscar por hospedeiros cada vez mais próximos ao peridomicílio (Sallum et al. 2014). Essa hipótese é suportada por vários casos autóctones de malária causada por *P. vivax* notificados no subdistrito de Parelheiros nas últimas décadas (Laporta et al. 2013) e por estudos realizados pelo nosso grupo, nos quais *An. cruzii* foi abundantemente coletado tanto nas copas das árvores, quanto ao nível do solo também na região de Parelheiros (Medeiros-Sousa et al. 2019).

Anopheles cruzii também foi encontrado infectado por *P. vivax* e *P. malariae* na região de Parelheiros (Duarte et al. 2013). Resultados de um estudo realizado em Parelheiros, sugerem que *An. cruzii* diminui sua abundância em áreas que foram submetidas a modificações antropogênicas, mas por outro lado, apresenta maior

atividade ao nível do solo em locais com maior efeito de borda e supressão de áreas florestadas (Medeiros-Sousa et al. 2019). A maior presença dessa espécie ao nível do solo em Parelheiros pode aumentar o contato entre *An. cruzii* e humanos que vivem próximos a fragmentos de floresta, podendo aumentar o risco de transmissão de *Plasmodium* nessa região.

1.5 Estudos Populacionais em *Anopheles cruzii*

A vigilância epidemiológica e o uso de medidas de controle são necessárias para evitar a expansão ou introdução de malária em áreas onde as espécies vetoras são abundantes e humanos suscetíveis estão presentes (Rona et al. 2009). Desse modo, a avaliação do *status* epidemiológico de regiões onde ocorrem casos isolados de malária, assim como o conhecimento sobre a biologia, comportamento e as características genéticas dos vetores são relevantes para prevenir a ocorrência de surtos ou para conduzir estratégias de controle, principalmente, em áreas que já foram endêmicas no passado. Apesar da importância epidemiológica do *An. cruzii* na transmissão de *Plasmodium spp.*, a caracterização genética e fenotípica de suas populações permanecem pouco exploradas (Marrelli et al. 2007).

O avanço de técnicas moleculares permitiu estudos qualitativos do ácido desoxirribonucleico (DNA) de animais. A PCR, na qual um fragmento específico de DNA é amplificado milhares de vezes, facilitou experimentos realizados por pesquisadores moleculares, como, por exemplo, sequenciamento e clonagem (Saiki et al. 1988; Erlich et al. 1991). Isso, por sua vez, abriu as portas para novas investigações experimentais utilizando a técnica. Desse modo, após a criação da técnica de PCR, os marcadores moleculares capazes de revelar polimorfismos ao nível de DNA, também sofreram

avanços (Schlötterer 2004). Técnicas que antes eram baseadas em enzimas, passaram a ser baseadas no DNA, aumentando sua especificidade (Schlötterer 2004).

Estudos populacionais realizados com diferentes marcadores moleculares e enzimáticos em *An. cruzii*, demonstraram polimorfismo entre elas. Diferenças nas frequências de inversão e padrões de bandas do cromossomo X indicaram a existência de um complexo de espécies crípticas de *An. cruzii*, compreendendo três espécies irmãs no estado de São Paulo (Ramirez et al. 1994; Ramírez & Dessen 2000a, 2000b).

Um estudo com isoenzimas indicou dois grupos geneticamente isolados, um do nordeste e outro do sudeste e sul do Brasil (Carvalho-Pinto & Lourenço-de-Oliveira 2004). Adicionalmente, em um estudo baseado no Espaçador Interno Transcrito 2 (ITS2), os autores não encontraram evidências conclusivas para confirmar a existência de espécies irmãs entre as amostras de *An. cruzii* do sudeste e sul do Brasil (Malafronte et al. 2007). Outro estudo, no qual foi utilizado o gene *timeless* (400pb) em *An. cruzii* para avaliar variabilidade intraespecífica e divergência genética entre seis populações coletadas em diferentes locais no Brasil, corroborou que essa espécie é um complexo de pelo menos duas espécies crípticas, uma ocorrendo no nordeste (Bahia) e a outra no sul e sudeste do Brasil (Rona et al. 2009). Com a utilização de análise de multilocus, Rona et al. (2010) sugeriram que populações de *An. cruzii* de Itaparica-BA e Florianópolis-SC, na verdade representam duas espécies diferentes que compõem o Complexo *Anopheles cruzii* e sugerem ainda que não há migrantes entre as duas espécies.

Além disso, populações de *An. cruzii* de Itatiaia (RJ) foram consideradas espécies irmãs vivendo em simpatria (Rona et al. 2010b). E populações de *An. cruzii* de

Florianópolis-SC e Itatiaia-RJ também foram consideradas como duas espécies distintas que compõem o Complexo *Anopheles cruzii* (Rona et al. 2013).

Em um estudo mais recente, no qual foram analisadas populações de *An. cruzii* de áreas montanhosas da Mata Atlântica do sul e sudeste do Brasil usando sequências parciais dos genes *cpr* e *Clock*, as populações de *An. cruzii* foram divididas em dois grupos independentes: um com populações de São Paulo e Rio de Janeiro e outro com populações de Florianópolis e Rio de Janeiro. Em uma das localidades do estudo, Bocaína-RJ, houve a separação críptica de espécimes entre grupo 1 e 2 (de Rezende Dias et al. 2018).

Apesar de diversos estudos populacionais, técnicas mais modernas para análises fenotípicas, microevolutivas e genéticas de populações de mosquitos, foram pouco empregadas em populações de *An. cruzii*, principalmente em escala microgeográfica. Para obtenção de tais informações, dois marcadores são mais comumente utilizados. O primeiro é baseado na técnica de morfometria geométrica de asa, essa técnica é utilizada para investigar diferenças fenotípicas no tamanho e formato da asa de mosquitos, baseando-se na diferenciação de, geralmente, 18 marcos anatômicos formados pela intersecção das veias alares (Lorenz et al. 2017). O segundo são os marcadores moleculares, que podem ser baseados em variações em sequências do DNA, para comparações genotípicas (Morin et al. 2004; Louise et al. 2015).

1.6 Morfometria Geométrica

A técnica de morfometria geométrica pode ser considerada como o estudo da medição do tamanho, forma e relação entre tamanho e forma (alometria) de uma estrutura anatômica (Dujardin 2011). A geometria, juntamente com a estatística multivariada, que é o ponto principal da morfometria geométrica, permite que a forma de

uma estrutura seja definida (Klingenberg & Marugan-Lobon 2013). Desse modo, se houver relação entre indivíduos com base nos pontos marcados e analisados em uma respectiva estrutura morfológica, a análise da forma permite comparações fenotípicas entre indivíduos e/ou populações. Em insetos, as asas são as estruturas anatômicas mais utilizadas para a análise da morfometria geométrica, por ser uma estrutura bidimensional que reduz possíveis erros de digitalização (Dujardin 2008, 2011).

Dujardin (2008), sugere que variações fenotípicas podem fornecer informações sobre características genéticas em espécies de insetos com importância epidemiológica, uma vez que, eles foram submetidos a diversas pressões seletivas de controle, assim como, mudanças paisagísticas. Nesse senso, a morfometria geométrica pode ser usada para quantificar essa variação. Enquanto variações fenotípicas tiverem causas ambientais e/ou genéticas, a morfometria geométrica poderá ajudar entomologistas a detectá-las em populações de insetos.

Em mosquitos, essa técnica já foi utilizada para acessar variação intraespecífica e interespecífica, dimorfismo sexual, para detecção da presença de parasitas e para separar cepas laboratoriais e diferentes tratamentos (Motoki et al. 2012; Jaramillo-O et al. 2015; Sendaydiego & Demayo 2015; Virginio et al. 2015; Wilke et al. 2016; Demari-Silva et al. 2017; Lorenz et al. 2017). Em espécies de *Anopheles* do Brasil, a morfometria geométrica de asa foi utilizada para detectar diferenças entre populações de *An. darlingi* coletadas em cinco diferentes biomas brasileiros com diferentes climas, vegetação e condições ambientais (Motoki et al. 2012).

Variações microevolutivas são mudanças temporais que podem acontecer no genoma e/ou fenótipo entre espécies ou populações de uma mesma espécie (Hendry & Kinnison 1999; Corley 2005). A microevolução é significativa para determinar como

pressões seletivas distintas podem influenciar a variação fenotípica entre populações de localidades diferentes (Adams & Collyer 2009). Além de estudos transversais, a morfometria geométrica também é amplamente utilizada em estudos microevolutivos, já que provou ser uma ferramenta sensível para detectar variações temporais em diversas espécies de mosquitos, incluindo *An. cruzii*, *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (1894) (Vidal et al. 2012; Lorenz et al. 2014; Louise et al. 2015).

Apesar de técnicas genéticas serem mais usadas para auxiliar o entendimento de processos microevolutivos, a morfometria geométrica de asa provou ser uma alternativa confiável (Dujardin 2008; Lorenz et al. 2017), pois as variações no formato alar são conhecidas por serem conservadas e terem altos níveis de herdabilidade (Henry et al. 2010).

A técnica de morfometria geométrica de asa foi utilizada com sucesso para a distinção entre três espécies de *Kertessia*: *An. cruzii*, *An. bellator* e *An. homunculus*. Essas espécies apresentam caracteres taxonômicos similares e, portanto, são difíceis de serem identificados (Lorenz et al. 2012). No estudo microevolutivo de Lorenz et al. (2014), a morfometria geométrica revelou evidências de estruturação populacional de *An. cruzii* em diferentes altitudes (planície e colina), na região de Cananéia, São Paulo.

1.7 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs)

Mutações conhecidas como Polimorfismos de Nucleotídeo Único (do inglês: *Single Nucleotide Polimorphisms SNPs*) são abundantes e espalhadas no genoma de diversas espécies e estão presentes em regiões codantes e não codantes do DNA (Morin et al. 2004). Os SNPs são formados quando ocorre uma variação na sequência do DNA, com substituição, deleção ou inserção de uma única base nucleica (Guanina,

Citosina, Adenina ou Timina) na sequência do genoma, com alternativa de dois nucleotídeos possíveis em uma determinada posição (Brookes 1999; Vignal et al. 2002). Em princípio, em cada posição da sequência de DNA qualquer uma das quatro bases nucleicas podem estar presentes, porém SNPs são geralmente bi-alélicos, possuem dois alelos por *locus* (Vignal et al. 2002). A formação de SNPs bi-alélicos pode ocorrer de quatro formas, incluindo uma transição $C \leftrightarrow T$ ($G \leftrightarrow A$) e três transversões $C \leftrightarrow A$ ($G \leftrightarrow T$), $C \leftrightarrow G$ ($G \leftrightarrow C$) e $T \leftrightarrow A$ ($A \leftrightarrow T$) (Brookes 1999).

Existem diversas técnicas para a genotipagem de SNPs. A técnica mais simples depende de que a região contendo os genes candidatos seja identificada, e posteriormente é feito o sequenciamento dos produtos de PCR obtidos de diferentes amostras (Vignal et al. 2002). Essa abordagem, porém, requer um grande investimento para a descoberta e genotipagem de SNPs em um grande número de amostras (Baird et al. 2008). Por outro lado, abordagens mais modernas e mais efetivas estão surgindo. Um exemplo é o sequenciamento baseado em DNA associado com sítios de enzimas de restrição (RAD) (do inglês: *Restriction site Associated DNA*), que são fragmentos curtos de DNA adjacentes de um local de reconhecimento de enzimas de restrição (Baird et al. 2008; Russello et al. 2015). Somente cerca de 1µg de DNA é necessário para a construção das bibliotecas de SNPs utilizando essa técnica (Baird et al. 2008), possibilitando a genotipagem de SNPs em baixas concentrações de DNA (Russello et al. 2015)

Recentemente, uma nova abordagem de genotipagem por sequenciamento (*genotyping by sequence*) de SNPs denominado nextRAD (do inglês: *Nextera-tagmented reductively-amplified DNA*) foi desenvolvida pela empresa SNPsaurus LLC (Eugene, OR). Essa abordagem é caracterizada por não utilizar enzimas de restrição, mas sim se baseia em PCR seletiva para um método rápido de preparação de

bibliotecas de SNPs. O método *nextRAD* utiliza um iniciador de sequência arbitrária que amplifica somente *loci* que apresentam sequências complementares. O método para a construção de bibliotecas, denominado *Nextera* (Illumina, San Diego, CA), utiliza uma reação de transposição modificada, a tagmentação (*tagmentation*). A tagmentação é como uma inserção de transposon, exceto que o “transposomo” (complexo transposase e transposon) corta o DNA selecionado e insere sequências finais do transposon nos fragmentos resultantes da amplificação (Shapland et al. 2015). Esse processo fragmenta o DNA e ao mesmo tempo adiciona as sequências necessárias para a amplificação por PCR e sequenciamento em uma única etapa (Adey et al. 2010; Shapland et al. 2015). Portanto, o método *nextRAD* consegue genotipar rapidamente altas quantidades de DNA, com alto rendimento, baixo custo e utilizando baixas concentrações de DNA (Adey et al. 2010; Russello et al. 2015; Shapland et al. 2015).

Com o melhoramento e diminuição do custo de técnicas para a genotipagem de SNPs, esses marcadores moleculares estão sendo amplamente utilizados para estudo de genética de populações (Russello et al. 2015; Campos et al. 2017; Pless et al. 2017; Sherpa et al. 2018, Campos et al 2019). Os SNPs são considerados marcadores moleculares altamente informativos e mesmo uma pequena fração de SNPs possui alta taxa de informação para análise da estrutura genética de populações (Helyar et al. 2011), se sobressaindo aos microssatélites (Campos et al. 2017). Adicionalmente, SNPs possuem a capacidade de examinar regiões neutras do genoma, o que aumenta a capacidade de análise do genoma de populações (Vignal et al. 2002). Os SNPs são extensamente utilizados como marcadores moleculares para abordar diferenças genéticas entre populações em escala geográfica e evolucionária (Morin et al. 2004). Assim como, para analisar padrões de estruturação genética e fluxo gênico em populações de mosquitos, indicando padrões associados à distribuição de doenças

transmitidas por vetores e auxiliando na elaboração de intervenções epidemiológicas (Hemme et al. 2010; Campos et al. 2012, 2017; Pless et al. 2017; Sherpa et al. 2018).

Existem diversos estudos populacionais utilizando SNPs em espécies de anofelinos ao redor do Mundo (Lee et al. 2012, 2014; Miles et al. 2017). No Brasil, os SNPs foram utilizados para analisar diferenças em populações de *An. darlingi*, vetor primário de malária na Região Amazônica. Esses marcadores revelaram estrutura populacional para essa espécie em escala macrogeográfica (Emerson et al. 2015), microgeográfica (Campos et al. 2017) e até mesmo em populações simpátricas da espécie picando dentro e fora do domicílio (Campos et al. 2019). Os estudos provam que essa ferramenta é confiável e possui grande sensibilidade para revelar diferenças genéticas em um número inferior de amostras quando comparado a outros marcadores moleculares. Porém, não há estudos genéticos utilizando essa ferramenta para *An. cruzii*.

1.8 Hipóteses

Levando em consideração os avanços nas técnicas de análises fenotípicas e genéticas de populações, o objetivo principal deste estudo foi caracterizar fenotipicamente e geneticamente populações de *An. cruzii* coletadas em três diferentes ambientes com diferentes níveis de modificações antropogênicas: silvestre, periurbano e urbano na APA Capivari-Monos, Parelheiros, São Paulo. Para obter tais informações, a técnica de morfometria geométrica foi utilizada para acessar possíveis variações fenotípicas entre populações de *An. cruzii*, e os SNPs foram utilizados para acessar possíveis variações genéticas. Os dados foram testados em diferentes hipóteses para cada técnica empregada.

Os dados de morfometria geométrica de asa (MGA) foram testados em quatro principais hipóteses: **Hipótese MGA-1:** populações de *An. cruzii* coletadas junto às copas das árvores se diferenciam de populações coletadas junto ao solo em todas as áreas; **Hipótese MGA-2:** populações de *An. cruzii* coletadas junto às copas das árvores se diferenciam das populações de solo em cada ambiente com diferentes níveis de modificações antropogênicas; **Hipótese MGA-3:** populações de *An. cruzii* se estruturam em relação a diferentes níveis de mudanças antropogênicas que cada ambiente apresenta; **Hipótese MGA-4:** processos microevolutivos, variações temporais nos traços fenotípicos, dependem de seleções locais produzidas por diferentes ambientes em populações de *An. cruzii* na região de Parelheiros, São Paulo.

Os dados genéticos de SNPs foram separados para serem testados em cinco principais hipóteses: **Hipótese SNP-1:** populações de *An. cruzii* coletados nas copas das árvores se diferem geneticamente de populações do nível do solo; **Hipótese SNP-2:** há estruturação genética entre populações de copa e solo em áreas com diferentes níveis de modificações antropogênicas; **Hipótese SNP-3:** as populações de *An. cruzii* são estruturadas transversalmente entre áreas com diferentes níveis de modificações antropogênicas; **Hipótese SNP-4:** processos microevolutivos, variações no genótipo em relação ao tempo, não dependem de pressões seletivas locais e são notados nas populações de *An. cruzii* como um todo; **Hipótese SNP-5:** processos microevolutivos, variações no genótipo em relação ao tempo, dependem de pressões seletivas locais produzidas por ambientes com diferentes níveis de modificações antropogênicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar se há estruturação populacional em mosquitos *An. cruzii* provenientes da Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos, localizado no município de São Paulo.

2.2 Específicos

Analisar se há estruturação populacional simpátrica em *An. cruzii* coletados nas copas das árvores e ao nível do solo.

Investigar se há variação temporal no formato e tamanho da asa de populações de *An. cruzii* coletados em três diferentes ambientes: (i) silvestre, (ii) periurbano e (iii) urbano,

Analisar se há estruturação populacional em *An. cruzii* nos estratos de urbanização (urbano, periurbano e silvestre) presentes na Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos.

Avaliar variações fenotípicas entre populações de *An. cruzii* e correlacioná-las com variáveis ambientais, genéticas e distância geográfica.

Avaliar variabilidade genética entre populações de *An. cruzii* e correlacioná-las com variáveis ambientais, fenotípicas e distância geográfica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo e populações de *Anopheles cruzii*

Este estudo foi desenvolvido a partir de dados coletados em uma Unidade de Conservação localizada no município de São Paulo: ao sul da cidade, no subdistrito de Parelheiros, Área de Proteção Ambiental (APA) Capivari-Monos, administrada pela prefeitura do município. Nesta área foram realizadas coletas em três locais: ambiente urbano, periurbano e silvestre, de março de 2015 até junho de 2017 (Figura 4). As coletas dos espécimes foram financiadas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto Biota – FAPESP nº 2014/50444-5 e Projeto regular FAPESP nº 2014/10919-4). As coletas foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), Número: 44740-1, de 13/08/2014.

Figura 4. Mapa da cidade de São Paulo, Brasil mostrando os locais de coleta de *Anopheles cruzii*. Mapa criado com o programa QGIS v2.18.9.a.

3.1.1 Área de Proteção Ambiental (APA) Capivari-Monos (Zona Sul)

A Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos (Parelheiros) está localizada na Zona Sul do município de São Paulo e apesar de estar a cerca de 60 km do centro da cidade, ela abrange 1/6 da área total da cidade. A APA faz fronteira com o Parque Estadual da Serra do Mar, faz parte da Reserva da Biosfera do Cinturão Verde de São Paulo e possui vegetação nativa remanescente de Mata Atlântica. Esse ecossistema se encontra ameaçado pela presença humana e expansão desordenada da cidade, através do desmatamento e da urbanização. Loteamentos clandestinos e moradias em zonas rurais são encontrados nessa área, que é considerada endêmica para malária.

As três áreas selecionadas para o estudo na APA Capivari-Monos são:

1) Silvestre: Mata em uma propriedade particular na Estrada para a Cachoeira do Marsilac (23° 56.378'S 46° 41.659'O).

2) Periurbano: Sítio Águas de Siloé, localizado próximo ao núcleo urbano de Marsilac, constitui área de transição entre pasto e floresta (23° 54.556'S 46° 42.167'O).

3) Urbano: vilarejo do Bairro Engenheiro Marsilac, próximo à linha de ferro Mairinque-Santos (23° 54.395'S 46° 42.486'O).

3.3 Métodos de coleta

Coletas de mosquitos foram realizadas uma vez por mês ao longo de dois anos e três meses, de março de 2015 até junho de 2017. Foram adotados os seguintes métodos de coleta, em cada um dos três pontos selecionados: 1) Duas armadilhas tipo CDC com isca de gelo seco, uma a 1 metro do solo e outra na altura das copas das árvores (>10 metros). As coletas com CDC tiveram duração de 14 horas e

compreenderam os crepúsculos vespertino e matutino, período de maior atividade hematófaga de *An. cruzii*. 2) Uma armadilha de Shannon utilizando luz como atrativo. As coletas tinham início no crepúsculo vespertino com duração de duas horas.

3.4 Identificação dos espécimes

A identificação morfológica das espécies foi realizada no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (LESP/FSP/USP). Após a identificação dos espécimes coletados os dados foram armazenados em banco de dados.

3.5 Morfometria Geométrica Alar

Um total de 511 asas direitas de fêmeas de *An. cruzii* coletadas em Parelheiros foram montadas entre lâmina e lamínula para microscopia óptica, em camada fina de bálsamo do Canadá (Tabela 1). As imagens das asas foram capturadas com 50x de aumento com o auxílio de câmera digital Leica 300 acoplada a um estereomicroscópio de óptica plana Leica S6 do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Tabela 1 - Número de asas de *Anopheles cruzii* utilizadas para análise de morfometria geométrica e número de espécimes enviados para sequenciamento de SNPs pelo método *NextRAD*, de acordo com tipo de armadilha, ano e local de coleta.

Local de Coleta	Armadilha	Número de espécimes			Coordenadas
		2015	2016	2017	
Silvestre	CDC Copa	15 A	29 A / 30 D	27 A / 25 D	23° 56.378'S
	CDC Solo	14 A	30 A / 30 D	-	46° 41.659'O
	Shannon	38 A	35 A / 30 D	37 A / 26 D	
Periurbano	CDC Copa	16 A	20 A / 22 D	25 A / 25 D	23° 54.556'S
	CDC Solo	-	29 A / 30 D	-	46° 42.167'O
	Shannon	18 A	30 A / 30 D	28 A / 30 D	
Urbano	CDC Copa	-	14 A / 18 D	7 A / 9 D	23° 54.395'S
	CDC Solo	-	11 A / 15 D	-	46° 42.486'O
	Shannon	31 A	30 A / 30 D	27 A / 30 D	

A = Número de asas usadas nas análises de morfometria geométrica. D = Número de indivíduos com o DNA extraído.

Foram selecionados 18 marcos anatômicos formados por padrões quantitativos das nervuras alares presentes em cada asa digitalizada (Figura 5). As coordenadas posicionais obtidas foram dispostas em um plano cartesiano com o auxílio do programa *TpsDig* 1.40 (Rohlf 2004).

Figura 5. Asa direita de *Anopheles cruzii* mostrando os 18 marcos anatômicos utilizados nas análises de morfometria geométrica.

3.5.1 Análise da Morfometria Geométrica Alar

Para determinar o tamanho da asa e compará-lo entre populações, o tamanho do centroide, estimador isométrico da média do tamanho, foi calculado utilizando o programa *MorphoJ* 1.02 (Klingenberg, 2011). Os resultados do tamanho do centroide foram submetidos à análise de variância por um fator (*one-way ANOVA*) e comparados pelo Teste de Tukey (*Tukey's post hoc test*) no programa *PAST* 1.89 (Hammer et al. 2001). Para calcular a influência do tamanho da asa no seu formato, a alometria foi acessada pela regressão multivariada das coordenadas de Procrustes contra o tamanho do centroide usando um teste de permutação com 10.000 randomizações.

A análise discriminante foi realizada para determinar o grau de dissimilaridade entre as populações em um morfoespaço definido pela análise de variáveis canônicas e para calcular as distâncias de Mahalanobis. A análise de variáveis canônicas (CVA) encontra transformações lineares dos dados, o que, portanto, maximiza a variação intrapopulacional relativa à variação agrupada interpopulacional.

Duas abordagens foram utilizadas para a CVA das análises de copa e solo: (1) comparação par-a-par na variação do formato das asas das populações de *An. cruzii* coletadas nas copas das árvores e no solo nos ambientes silvestre, periurbano e urbano; (2) comparação entre as populações de copa e de solo sem separá-las por ambiente.

Duas abordagens foram utilizadas para a CVA das análises de variação temporal e transversal: (1) comparação par-a-par das populações de *An. cruzii* coletadas em 2015, 2016 e 2017 nos ambientes silvestre, periurbano e urbano para comparar a variação do formato das asas pelo tempo; (2) comparação entre as três populações (silvestre, periurbana e urbana) sem separá-las por ano, para investigar a variação nos formatos de asas transversalmente de acordo com o ambiente. As sobreposições das asas foram obtidas a partir da análise de regressão dos valores da CVA contra a variação no formato das asas para visualizar o *wireframe* da disparidade do formato de asas entre as populações. Cada indivíduo foi reclassificado de acordo com sua similaridade alar em relação à média do formato alar de membros do grupo usando testes de *cross-validation* baseados nas distâncias de Mahalanobis em relação à acurácia do teste de classificação morfométrica. Todas as análises foram feitas no programa *MorphoJ* 1.02. A árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) foi construída para exibir as distâncias de Mahalanobis entre as populações utilizando o programa *PAST* 1.89 com 1.000 réplicas de *bootstrap* (30 espécimes de *Anopheles darlingi* foram usados como grupo externo).

Uma análise subsequente capaz de realçar os extremos de diferenciação dos marcos anatômicos foi feita para a melhor visualização da sobreposição dos *wireframes* das populações de copa e solo do ambiente urbano. A análise foi feita à partir das coordenadas posicionais dos marcos anatômicos. O programa *TpsRelw* 1.45 (Rohlf 2003) foi utilizado para analisar os *relative warps* dos formatos alares. A variabilidade no

formato alar foi calculada através da CVA para comparar as populações de copa e solo, no programa *Statistica 7* (StatSoft & StatSoft 2004). Adicionalmente, o programa *TpsRegr 1.31* (Rohlf 2009) foi utilizado para a realização da análise de regressão entre os valores das variáveis canônicas e a variação dos marcos anatômicos, assim como, para a visualização dos *wireframes*. Os *wireframes* gerados foram sobrepostos no programa *Adobe Photoshop CS* (San Jose, CA).

Para testar por possível isolamento por distância entre as populações, a correlação entre as distâncias de Procrustes e as distâncias geográficas entre as populações foi calculada usando análise linear no programa *PAST 1.89*.

3.6 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs)

3.6.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *Kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Um quantificador *Qubit Fluorometer* (ThermoFisher, Dietikon, Switzerland) foi utilizado para quantificar o DNA. Os produtos da extração foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para mensurar qualidade e pureza das amostras. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com câmera digital.

3.6.2 Preparação de bibliotecas de SNPs

O DNA genômico (1ng/μL) extraído de 380 espécimes de *An. cruzii* coletados durante os anos de 2016 e 2017 foi enviado à empresa SNPsaurus (Eugene, Oregon, USA) para a preparação de bibliotecas de genotipagem por sequenciamento de SNPs pelo método *nextRAD*, como em Russello et al. (2015) (Tabela 1). Os espécimes

coletados em 2015 não tiveram seu DNA processado, pois o DNA desses espécimes seria utilizado para outros fins.

O DNA genômico das amostras foi primeiramente fragmentado com o reagente *Nextera Flex* (Illumina, Inc.) que também liga pequenas sequências ao final dos fragmentos. A reação *Nextera* foi dimensionada para fragmentar 10 ng de DNA genômico. O DNA fragmentado foi amplificado por 25 ciclos a 75°C, com um dos *primers* se ligando ao adaptador e estendendo oito nucleotídeos no DNA genômico com a sequência seletiva TGCAGGAG. Portanto, apenas fragmentos começando com uma sequência que pode ser pareada pela sequência seletiva do *primer* foram amplificados eficientemente.

As bibliotecas *nextRAD* foram sequenciadas em um HiSeq 4000 com quatro linhas de leituras “*single-end*” de 150 pares de bases (University of Oregon). As análises genotípicas foram feitas usando *scripts* personalizados (SNPsaurus, LLC) que apararam as leituras usando *bbduk* (BBMap tools, <http://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Após isso, uma referência “*de novo*” foi criada coletando-se 10 milhões de leituras uniformemente das amostras e excluindo leituras que tiveram uma contagem menor que sete e maior que 700. Os *loci* que permaneceram foram alinhados uns com os outros para identificar *loci* alélicos e haplótipos de *loci* colapsados para um único representante.

Todas as leituras foram mapeadas para a referência com um “alinhamento identidade” com um ponto de corte de 0.95 utilizando *bbmap* (BBMap tools). *Calling* dos genótipos foi realizado usando *Samtools* e *bcftools* (`samtools mpileup -gu -Q 15 -t DP,DPR -f ref.fasta -b samples.txt | bcftools call -cv - > genotypes.vcf`). O arquivo vcf (*variant call format*) foi filtrado para remover alelos com frequência populacional menor que 3%. *Loci* heterozigotos em todas as amostras ou que tiveram mais de dois alelos

em uma amostra (sugerindo parálogos colapsados) foram removidos. A ausência de artefatos foi checada contando os SNPs a cada posição de nucleotídeo lida e determinando que o número de SNPs não aumentasse com qualidade de bases reduzida ao final da leitura (Anexo 1).

3.6.3 Análise dos SNPs

Para a realização das análises genéticas o programa *VCFtools* (<https://github.com/vcftools>) (Danecek et al. 2011) foi utilizado para realizar a filtragem final dos genótipos. Para a filtragem dos *loci*, os critérios estabelecidos, baseados na literatura existente, foram: qualidade mínima dos *loci* (30), profundidade de leitura (*read depth*; 20), desequilíbrio de ligação, frequência mínima de alelos maior que 50% em todas as amostras, exclusão de *loci* com mais de 5% de dados faltantes (*missing data*) e remoção de *indels* (Russello et al. 2015; Lanes et al. 2018). Após a filtragem, o arquivo *vcf* foi submetido ao programa PGDSpider para conversão dos dados para os formatos *STRUCTURE* 2.3.4 (Pritchard et al. 2007) e *Arlequin* v3.5 (Excoffier et al. 2005). Os *loci* filtrados passaram por uma análise que gera quantis para determinar a relação entre F_{ST} e heterozigosidade para cada *locus* a partir da distribuição empírica dos dados (Flanagan & Jones 2017). A análise é utilizada para a identificação de *loci* “*outliers*”, ou que podem estar sob seleção de genes. Essa análise foi realizada no R usando o pacote *fsthet* (Flanagan & Jones 2017; R Core Team 2017).

Após a filtragem e identificação de *loci outliers*, os SNPs independentes e neutros resultantes foram manualmente separados para serem testados em cinco diferentes hipóteses:

Hipótese SNP-1 - Há estrutura genética entre populações de copa e solo.

Hipótese SNP-2 - Há diferença entre populações de copa e solo dentro de cada estrato de urbanização (silvestre, periurbano e urbano).

Hipótese SNP-3 - Há estrutura entre os diferentes estratos de urbanização (silvestre, periurbano e urbano).

Hipótese SNP-4 - Há estrutura microevolutiva entre populações coletadas em 2016 e 2017.

Hipótese SNP-5 - Há diferença entre populações coletadas em 2016 e 2017 dentro de cada estrato de urbanização (silvestre, periurbano e urbano).

Após a separação dos dados de acordo com cada hipótese a ser testada, os arquivos foram submetidos aos programas de análises estatísticas e genéticas. As análises de caracterização dos *loci* SNPs (dados faltantes, heterozigosidade e Equilíbrio de Hardy-Weinberg) e as estimativas globais dos índices de estruturação genética de D (Jost 2008), F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST} (Meirmans & Hedrick 2011) foram estimadas pelo pacote *StrataG* no programa R e pelo programa *Arlequin* v3.5 (Excoffier et al. 2005; Archer et al. 2017; R Core Team 2017). O pacote *Adegenet* (Jombart 2008) no programa R foi usado para a realização da Análise de Componentes Principais (PCA), uma análise multivariada usada para simplificar a diversidade genética observada entre indivíduos ou populações.

A análise bayesiana de *clusters* multi-locus foi realizada no programa *STRUCTURE* pelo pacote *StrataG* no programa R. Essa análise infere estrutura populacional usando dados genótipos consistindo de marcadores moleculares não ligados. A análise foi realizada assumindo o modelo de ancestralidade *Admixture*, considerando que os indivíduos podem ter ancestralidade mixada, e de frequências

alélicas correlacionadas entre as populações. Para realização da análise foram conduzidas dez corridas independentes para cada valor de K (1-6), usando um “*burn-in period*” de 100.000 com 100.000 de réplicas. O valor estimado de K ideal, que identifica grupos homogêneos de indivíduos, foi calculado utilizando o método de (Evanno et al. 2005), implementado pelo programa online *StructureHarvester* (Web v0.6.94).

4 RESULTADOS

4.1 Morfometria Geométrica Alar

4.1.1 Hipótese MGA-1 e MGA-2

Nas análises de variação alar entre as populações de *An. cruzii* coletadas nas copas das árvores comparadas com as do nível do solo o tamanho do centroide variou de 1680 a 2210 na população silvestre, de 1740 a 2320 na população periurbana e de 1810 a 2190 na população urbana. A variação global da média dos valores do tamanho do centroide demonstrou valores significativos apenas na população periurbana (ANOVA; $P < 0,05$). Na comparação par-a-par do teste de Tukey apenas a comparação entre copa e solo na população periurbana foi significativa (teste t; $P < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6. Gráfico Boxplot mostrando a média dos valores do tamanho do centroide das asas de *Anopheles cruzii* coletadas na copa e no solo nos ambientes Silvestre, Periurbano e Urbano. Tamanho do centroide: corresponde à raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada marco anatômico e o centro de massa.

A alometria apresentou variação de 4,35% ($P=0.0855$) para a população silvestre, 3,33% ($P=0.0945$) para periurbana e 5,25% ($P=0.2750$) para urbana. Os valores da alometria foram medianos, não estatisticamente significativos e, portanto, removidos das análises subsequentes. A CVA revelou um padrão moderado de segregação entre as comparações par-a-par nas populações silvestre e periurbana, e grande variação na comparação de copa e solo da população urbana (Figura 7A). Nas populações silvestre e periurbana é possível observar uma clara segregação entre copa e solo com algum nível de sobreposição. Na população urbana, por outro lado, a análise demonstrou completa segregação entre copa e solo, com um alto valor de distância de Mahalanobis. A análise da comparação par-a-par do *wireframe* da asa entre as populações copa e solo de todos os ambientes mostrou uma maior variação quantitativa nas populações silvestre e periurbana, enquanto na população urbana, não há variação do *wireframe* da asa (Figura 7B).

Figura 7. Comparação dos formatos de asa no morfoespaço. A) Primeira variável canônica (CV1=100%) para as populações de *Anopheles cruzii* de copa e solo dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. X: primeira variável canônica; Y: frequência de cada formato alar. MD= distâncias de Mahalanobis; todas as estimativas foram significativas ($P<0.001$). O ponto zero (0.0) da escala representa a grande média dos dados em relação às variáveis canônicas. **B)** Gráfico do *wireframe* mostrando a comparação par-a-par das populações de *Anopheles cruzii* de copa e solo dos ambientes silvestre, periurbano e urbano.

Devido à falta de variação encontrada na análise do *wireframe* para a população urbana, uma análise subsequente capaz de realçar o extremo de diferenciação dos marcos anatômicos foi realizada. Os resultados foram similares aos encontrados na primeira análise realizada, porém quando a variação foi realçada em 3x, pode-se notar um maior padrão de variação alar. Quando o realce de 10x foi utilizado, pode-se notar um distinto padrão alar entres as populações de copa e solo do ambiente urbano (Figura 8).

Figura 8. Sobreposição dos wireframes das populações de copa (linhas pretas) e solo (linhas cinzas) do ambiente urbano, obtidos pela análise de extremo de diferenciação. A) Variação do formato: 1X. B) Variação do formato: 3X. C) Variação do formato: 10X. Os diagramas foram sobrepostos baseando-se no marco anatômico 2.

A CVA comparando as populações de copa e solo sem a distinção de ambientes demonstrou pouca segregação entre as populações e alto grau de sobreposição (Figura 9). A distância de Mahalanobis entre os grupos foi de 1,5384 ($P < 0,001$). Esses resultados indicam que não há estruturação entre os grupos.

Figura 9. Comparação dos formatos de asa no morfoespaço. Primeira variável canônica (CV1=100%) para as populações de *Anopheles cruzii* de copa e solo em todas as áreas. X: primeira variável canônica; Y: frequência de cada formato alar.

Os testes de reclassificação baseados nas distâncias de Mahalanobis mostraram que os espécimes foram corretamente reclassificados entre 45 e 62% de acurácia, indicando poucas diferenças no formato alar entre as populações (Tabela 2). Os grupos copa e solo na população urbana demonstraram a maior diferença entre os valores de classificação (62% e 45%, respectivamente), indicando que a população de solo compartilha mais formatos alares com a população de copa, do que o contrário.

Tabela 2 - Resultados dos testes de classificação par a par das análises das populações de *Anopheles cruzii* coletadas nas copas e no solo.

População	Cross-validation		
	Silvestre (%)	Periurbano (%)	Urbano (%)
Copa	51	50	62
Solo	57	55	45

4.1.2 Hipóteses MGA-3 e MGA-4

Nas análises da variação temporal no tamanho e forma das asas entre populações de *An. cruzii* o tamanho do centroide variou de 1670 a 2200 na população silvestre (SI); de 1600 a 2320 na população periurbana (PU); e de 1660 a 2200 na população urbana (UR). Valores estatisticamente significativos para a variação global na média do tamanho do centroide foram encontrados entre todos os grupos nas três localidades (ANOVA; $P < 0.05$). Comparação par a par do teste de Tukey foi significativa entre SI-2015 e SI-2017; PU-2016 e PU-2017; e entre UR-2015 e UR-2016; UR-2016 e UR-2017 (teste t; $P < 0.05$) (Figura 10).

Figura 10. Gráfico Boxplot mostrando a média dos valores do tamanho do centroide das asas de *Anopheles cruzii* nas populações silvestre, periurbana e urbana nos anos de 2015, 2016 e 2017. Tamanho do centroide: corresponde à raiz quadrada do somatório dos quadrados das distâncias entre cada marco anatômico e o centro de massa.

A alometria representou variação de 1,2% ($P=0,0359$) para SI, 3,62% ($P<0,0001$) para PU e 4,18% ($P<0,0001$) para UR. Apesar dos valores de alometria serem significativos, estes foram removidos das análises subsequentes. A CVA revelou um padrão moderado de segregação entre todas as comparações par a par nos três anos (Figura 11). Foi possível observar um padrão claro de sobreposição em todas as comparações, exceto para a comparação entre 2015 e 2017 no ambiente urbano.

Apesar das populações do ambiente silvestre apresentarem um maior número de padrões de formatos alares, é possível observar um alto grau de sobreposição entre eles (Figura 11). As comparações do ambiente periurbano apresentaram alto número de padrões de formatos alares, assim como silvestre. Porém com menor grau de sobreposição entre os formatos alares (Figura 11). Resultando em um padrão de variação associado positivamente com o tempo. Finalmente, apesar das populações do ambiente urbano apresentarem o menor número de padrões de formatos alares em relação aos outros ambientes, suas comparações apresentaram baixo grau de

sobreposição (Figura 11). A população 2015 do ambiente urbano apresentou alta variação quando comparada a 2017 e nesta comparação houve sobreposição de apenas um padrão de formato alar. Esses resultados sugerem que as populações UR estão expostas a pressões seletivas mais intensas, traduzidas em variações no formato alar.

Figura 11. Comparação dos formatos de asa no morfoespaço. Primeira variável canônica (CV1=100%) para as populações de *Anopheles cruzii* de 2015, 2016 e 2017 dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. X: primeira variável canônica; Y: frequência de cada formato alar. MD= distâncias de Mahalanobis; *valor de P não significativo ($P > 0.05$). O ponto zero (0.0) da escala representa a grande média dos dados em relação às variáveis canônicas.

As distâncias de Mahalanobis (MD) apresentaram significância estatística em quase todas as comparações, exceto para as comparações UR-2015 e UR-2016; e UR-2016 e UR-2017. Apesar disso, a comparação entre UR-2015 e UR-2017 apresentou o maior valor de MD, sugerindo que o formato da asa variou mais na população urbana e que esta variação é, provavelmente, caótica. Esses resultados sugerem que as populações do ambiente urbano são submetidas a maiores pressões seletivas, o que pode ser percebido como maior variação do formato alar. A CVA comparando as três populações (silvestre, periurbana e urbana) sem a influência do tempo, revelou alto grau de sobreposição dos formatos de asas entre todas as populações (Figura 12), indicando que não há estrutura entre estas populações.

Figura 12. Espaço morfológico das duas primeiras variáveis canônica para as populações de *Anopheles cruzii* baseado em 18 marcos anatômicos. Comparação das três populações (silvestre, periurbana e urbana) sem separação por ano de coleta. A contribuição relativa de cada variável canônica é mostrada em parênteses.

A comparação par-a-par do *wireframe* da asa entre as populações revelou variação do formato da asa em todas as comparações (Figura 13). Alto grau de variação do formato da asa ocorreu em relação ao tempo em todas as três populações, corroborando os resultados da CVA.

Figura 13. Gráfico do *wireframe* mostrando a comparação par-a-par das populações de *Anopheles cruzii* de 2015, 2016 e 2017 dos ambientes silvestre, periurbano e urbano.

Os testes de reclassificação baseados nas distâncias de Mahalanobis mostraram que os espécimes foram corretamente reclassificados entre 51 e 75% de acurácia, indicando diferenças importantes no formato alar entre as populações (Tabela 3). As populações UR-2015 e UR-2016 foram reclassificadas com o maior grau de diferença (51 e 67%, respectivamente), sugerindo que a população UR-2015 compartilha mais formatos alares com UR-2016 do que o contrário.

Tabela 3 - Resultados dos testes de classificação par a par comparando as populações de *Anopheles cruzii* coletadas em 2015, 2016 e 2017 nas áreas silvestre, periurbana e urbana.

Comparação	Ano	<i>Cross-validation</i>		
		Silvestre (%)	Periurbano (%)	Urbano (%)
2015 vs. 2016	2015	69	62	51
	2016	71	71	67
2016 vs. 2017	2016	73	71	57
	2017	72	75	53
2015 vs. 2017	2015	61	53	68
	2017	66	60	70

A árvore de *Neighbor-Joining* baseada nas distâncias de Mahalanobis demonstrou um padrão de segregação por ano de coleta (Figura 14). A população UR-2017 ficou em um clado completamente segregado de todas as outras populações testadas com alto valor de bootstrap (100). Um outro clado é formado pelo restante das populações. Neste clado é possível observar que as populações ficaram agrupadas por ano de coleta. A população SI-2016 ficou próxima em um clado com um valor de bootstrap de 52, enquanto que as populações PU-2016 e UR-2016 ficaram agrupadas. As populações de 2015 também ficaram próximas, distribuindo-se em dois clados, em um ficou PU-2015 e no outro SI-2015 e UR-2015 ficaram agrupadas. As populações PU-2017 e SI-2017 ficaram agrupadas em um clado com valor de bootstrap de 53.

Figura 14. Árvore de *Neighbor-Joining* baseada nas distâncias de Mahalanobis para as populações silvestre (SY), periurbana (PU) e urbana (UR) de *Anopheles cruzii* com 1.000 réplicas de *bootstrap*. *Anopheles darlingi* foi utilizado como grupo externo.

A análise de regressão linear revelou que não há correlação entre as distâncias de Procrustes e distâncias geográficas ($r^2=0.033269$; $P=0.8382$), indicando que não há isolamento por distância nas populações silvestre, periurbana e urbana.

4.2 SNPs

Um total 21.678 SNPs foram genotipados em 380 espécimes de *An. cruzii* pela empresa SNPsauros. Após a aplicação dos filtros no arquivo vcf com o objetivo de selecionar os *loci* com maior qualidade, frequência alélica mínima maior que 50%, sem estarem em desequilíbrio de ligação, com alta profundidade de leitura e com até 15% de dados faltantes restaram 4.073 *loci*.

Após a primeira filtragem, muitos *loci* ainda continham quantidade substancial de dados faltantes, portanto a porcentagem de dados faltantes permitida foi alterada para apenas 5% em todos os *loci* e um filtro para a remoção de *indels* foi aplicado. Após a segunda filtragem restaram 1.313 *loci*. Um total de 78 (~6%) *loci* foram considerados “outliers” pelo método de ‘*fsthet*’ (Flanagan & Jones 2017) e, portanto, removidos das análises subsequentes (Figura 15; Anexo 2).

Figura 15. Gráfico da distribuição dos valores de Heterozigosidade em relação aos valores de F_{ST} para todos os SNPs filtrados. Cada SNP é representado por um ponto preto no gráfico. O intervalo de confiança de 95% é representado pelas linhas vermelhas.

No teste das hipóteses SNP-1 e SNP-2, os dados faltantes ficaram dentro do esperado. Em SNP-1 os *loci* apresentaram uma baixa percentagem de alelos privados apenas para a população solo. Em SNP-2, os *loci* utilizados nas análises de todas as áreas apresentaram de 2 – 7% de alelos privados, sendo a maior percentagem na população urbana (Tabela 4). Nos testes das hipóteses SNP-3 e SNP-4, os *loci* não apresentaram alelos privados para nenhuma população. Em SNP-3, os dados faltantes ficaram dentro do esperado e em SNP-4, o número de dados faltantes na população de 2017 foram maiores que na população de 2016 (Tabela 4). No teste da hipótese SNP-5, os SNPs utilizados na análise apresentaram baixa percentagem de alelos privados, com maior percentagem (1%) na população urbana de 2017 e o número de dados faltantes foi dentro do esperado (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização dos SNPs bi-alélicos usados nas análises genéticas das populações de *Anopheles cruzii* em todas as hipóteses testadas.

Hipótese	Área	População	N	Dados Faltantes	Alelos Privados
Hipótese 1	Todas as areas	Copa	70	1.86	0
		Solo	75	2.56	0.0004
Hipótese 2	Silvestre	Copa	30	0.54	0.02
		Solo	30	0.42	0.02
	Periurbano	Copa	21	0.09	0.04
		Solo	30	1.52	0.02
	Urbano	Copa	18	1.23	0.07
		Solo	15	0.62	0.07
Hipótese 3	Silvestre		138	2.68	0
	Periurbano		136	3.62	0
	Urbano		102	5.26	0
Hipótese 4	Todas as areas	2016	135	4.43	0
		2017	241	7.13	0
Hipótese 5	Silvestre	2016	90	2.35	0
		2017	48	0.32	0.00121458
	Periurbano	2016	82	2.36	0.00080972
		2017	54	1.26	0.00242915
	Urbano	2016	63	2.35	0.00202429
		2017	39	2.91	0.01255061

N = número de amostras

Todas as comparações para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) demonstraram que as populações apresentaram os valores de heterozigosidade esperada (H_e) maior que os valores de heterozigosidade observada (H_o) (Tabela 5). Apesar disso, os valores de P calculados para o desvio de HWE não foram significativos.

Tabela 5 - Descritores genéticos para os 1.235 SNPs para as populações de *Anopheles cruzii* em todas as hipóteses testadas.

Hipótese	Área	População	Ho	He	HWE (P-valor)
Hipótese 1	Todas as áreas	Copa	0.192	0.2647	0.2592
		Solo	0.1907	0.2638	0.2442
Hipótese 2	Silvestre	Copa	0.1963	0.269	0.4423
		Solo	0.1862	0.2643	0.4349
	Periurbano	Copa	0.187	0.2717	0.4487
		Solo	0.1994	0.2638	0.4855
	Urbano	Copa	0.2119	0.2709	0.618
		Solo	0.2057	0.2872	0.5587
	Silvestre		0.1892	0.2648	0.133
	Periurbano		0.1889	0.2634	0.1342
	Urbano		0.1897	0.2626	0.1927
Hipótese 4	Todas as áreas	2016	0.1842	0.2627	0.122
		2017	0.1921	0.2645	0.0833
Hipótese 5	Silvestre	2016	0.1853	0.2639	0.1895
		2017	0.1966	0.2658	0.3523
	Periurbano	2016	0.1853	0.2622	0.2039
		2017	0.1946	0.265	0.3206
	Urbano	2016	0.1853	0.2639	0.1894
		2017	0.1966	0.2658	0.3523

Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He), Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

4.2.1 Hipótese SNP-1 e Hipótese SNP-2

As estimativas globais das estatísticas utilizadas para testar estruturação populacional nas populações de *An. cruzii* das hipóteses SNP-1 e SNP-2 apresentaram valores baixos e não significativos na maioria dos testes (Tabela 6). Todos os testes para as populações de copa e solo das áreas silvestre e periurbana da hipótese SNP-2

apresentaram valores baixos e nenhum deles significativo. Esses resultados indicam que não há estruturação entre as populações de copa e solo nestes dois locais. Por outro lado, as estimativas globais de D , F_{ST} e F_{IS} apresentaram valores significativos nos testes para as populações de copa e solo da área urbana. Apesar das estimativas mostrarem valores baixos, eles podem indicar que as populações de copa e solo no ambiente urbano podem estar caminhando para uma possível estruturação (Tabela 6).

Tabela 6 - Estatísticas de estrutura populacional. Estimativas globais de D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST} , em todos os SNPs para as Hipóteses SNP-1 e SNP-2.

Hipótese	Área	Estrutura populacional		
		Estatística	Estimativa	P-valor
Hipótese 1	Todas as áreas	D	0.00022992	0.6183816
		F_{ST}	-0.0007029	0.8941059
		F_{IS}	-0.0009899	0.8951049
		G''_{ST}	0.02421096	0.8941059
Hipótese 2	Silvestre	D	0.00052606	0.7582418
		F_{ST}	3.46E-05	0.4335664
		F_{IS}	4.78E-05	0.4335664
		G''_{ST}	0.06047334	0.4285714
	Periurbano	D	0.00075999	0.3396603
		F_{ST}	0.00035395	0.3876124
		F_{IS}	0.00050948	0.3876124
		G''_{ST}	0.07533064	0.5314685
	Urbano	D	0.0015011	0.00899101
		F_{ST}	0.00496805	0.04095904
		F_{IS}	0.00700188	0.04095904
		G''_{ST}	0.1256977	0.06593407

Em negrito, números de P significativos.

Na comparação entre copa e solo da hipótese SNP-1, a variância dos dados explicados pelos PC1 e PC2 da PCA foi de 2,4% e 2%, respectivamente (Figura 16a). A PCA apresentou alto grau de sobreposição dos pontos, porém a população de copa foi mais diversa, apresentando alguns pontos “*outliers*” (Figura 16a). Nos testes da hipótese SNP-2, a variância dos dados explicada pelos PC1 e PC2 da PCA foram de 3,8% e 3,4% para o ambiente silvestre, 3,8% e 3,5% para o ambiente periurbano e 5,1% e 4,9% para o ambiente urbano, respectivamente (Figura 16b). As populações de copa e solo no ambiente urbano foram as que mais se diferenciaram e apresentaram maiores porcentagem de variância explicada pela PCA, além de maior diversidade da população de solo.

Hipótese 1

Hipótese 2

Figura 16. Diversidade genética das populações copa e solo de *Anopheles cruzii*. Análise dos Componentes Principais (PCA). Eixo x-y: Variância explicada pelos PC1 e PC2. Os dados foram transformados usando a PCA e plotados como uma função dos dois primeiros componentes principais.

A análise bayesiana de *clusters* multi-locus e subsequente aplicação do método de Evanno foram usados para identificar o mais provável número de grupos genéticos, o que de acordo com o ΔK foi de $K=2$ para as populações da hipótese SNP-1. No gráfico do *STRUCTURE* é possível observar que as populações são muito homogêneas e não apresentaram estruturação genética, pois a probabilidade dos indivíduos de pertencerem ao grupo genético 1 ou 2 foi similar (Figura 17a).

Nos testes da hipótese SNP-2, o ΔK foi de $K=2$ para as populações de copa e solo do ambiente silvestre. No gráfico do *STRUCTURE* apresentando a configuração $K=2$ é possível observar grande similaridade entre a proporção de indivíduos de cada população pertencendo ao grupo genético 1 ou 2 (Figura 17b). Para as populações de copa e solo do ambiente periurbano o ΔK foi de $K=3$. No gráfico do *STRUCTURE* apresentando a configuração $K=3$ é possível observar que a população de solo apresentou maior probabilidade dos indivíduos de pertencerem ao grupo genético de cor azul (Figura 17b). Para as populações de copa e solo do ambiente urbano o ΔK foi de $K=3$. No gráfico do *STRUCTURE* apresentando a configuração $K=3$ é possível observar que a população de Solo apresentou maior diversidade de grupos genéticos do que a população de copa (Figura 17b). Esses resultados indicam que os indivíduos do solo apresentam maior probabilidade de pertencerem a mais grupos genéticos do que os indivíduos da copa, pois na população de copa é possível observar a predominância de somente um grupo genético.

Figura 17. Estrutura genética das populações de copa e solo de *Anopheles cruzii*. Análise Bayesiana de *clusters* multi-locus implementada no programa *STRUCTURE*. Cada um dos indivíduos é representado por uma linha vertical, esta linha é fracionada em segmentos de cores que representam a probabilidade dos indivíduos de pertencer a algum dos *clusters* genéticos. Eixo x: Probabilidade 0 a 1. Eixo y: número de indivíduos. A) 70 e 75. B) Silvestre: 30 e 30; Periurbano: 22 e 30; Urbano: 18 e 15.

4.2.2 Hipótese SNP-3

As estimativas globais das estatísticas utilizadas para análises de estruturação populacional apresentaram valores baixos, porém significativos (Tabela 7). Na análise par-a-par entre as populações, somente a comparação entre as populações silvestre e periurbana demonstraram valores significativos para todos os índices testados ($F_{ST}=0.0007635092$; $G''_{ST}=0.01413157$; $D=0.00016681$). Apesar dos valores significativos, as estimativas foram baixas, indicando que não há estruturação genética entre as três populações.

Tabela 7 - Estatísticas de estrutura populacional. Estimativas globais de D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST} , para todos os *loci* para as populações da Hipótese SNP-3.

Hipótese	Resultados de Estruturação Populacional		
	Estatística	Estimativa	<i>P</i> -valor
Hipótese 3	D	0.0002	0.02397602
	F_{ST}	0.0005074	0.03496503
	F_{IS}	0.00072278	0.03496503
	G''_{ST}	0.01363214	0.03596404

Em negrito, valores de *P* significativos.

Na comparação entre os ambientes transversalmente, a variância dos dados explicada pelos PC1 e PC2 da PCA foi de 1,8% e 1,6%, respectivamente (Figura 18a). Na PCA não há distinção entre as populações, pois elas são apresentadas com grande sobreposição de pontos. Os resultados da análise bayesiana de *clusters* multi-locus e

subsequente aplicação do método de Evanno identificaram o mais provável número de grupos genéticos como $K=2$. No gráfico do *STRUCTURE* apresentando a configuração $K=2$ é possível observar que as populações silvestre, periurbana e urbana são bastante homogêneas e apresentaram a mesma probabilidade de pertencer aos grupos genéticos 1 e 2 (Figura 18b).

Figura 18. Diversidade e estrutura genética das populações de *Anopheles cruzii* dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. A) Análise dos Componentes Principais (PCA) comparando as populações de *Anopheles cruzii* dos ambientes silvestre, periurbano e urbano. Eixo x-y: Variância explicada pelos PC1 e PC2. Os dados foram transformados usando a PCA e plotados como uma função dos dois primeiros componentes principais. **B)** *STRUCTURE* - Análise Bayesiana de *clusters* multi-locus ($K=2$). Cada um dos indivíduos é representado por uma linha vertical, fracionada em segmentos de cores que representam a probabilidade dos indivíduos em pertencer a algum dos *clusters* genético. Eixo x: probabilidade 0 a 1. Eixo y: número de indivíduos (141, 137 e 102).

4.2.3 Hipótese SNP-4 e Hipótese SNP-5

As estimativas globais das estatísticas para análise de estruturação populacional para as hipóteses SNP-4 e SNP-5 apresentaram valores baixos e não significativos (Tabela 8). Os resultados indicaram que de acordo com as estimativas testadas não há estrutura entre as populações testadas. Para a hipótese SNP-5, além das estimativas apresentarem valores baixos, os valores de P apresentados não foram significativos, indicando que de acordo com essas estatísticas não há estruturação genética temporal entre as populações silvestre, periurbana e urbana.

Tabela 8 - Estatísticas de estrutura populacional. Estimativas globais de D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST} , em todos os SNPs para as Hipóteses SNP-4 e SNP-5.

Hipótese	Área	Estrutura Populacional		
		Estatística	Estimativa	P -valor
Hipótese 4	Todas as áreas	D	0.00010138	0.4705295
		F_{ST}	0.00021021	0.1898102
		F_{IS}	0.00029592	0.1898102
		G''_{ST}	0.01077554	0.1798202
Hipótese 5	Silvestre	D	0.00028958	0.4185814
		F_{ST}	-0.0003226	0.6423576
		F_{IS}	-0.0004413	0.6413586
		G''_{ST}	0.0280301	0.7382617
	Periurbano	D	0.00025936	0.5664336
		F_{ST}	-0.0003234	0.6513487
		F_{IS}	-0.0004483	0.6493506
		G''_{ST}	0.02742571	0.6783217
	Urbano	D	0.00037651	0.4585415
		F_{ST}	-0.000781	0.7882118
		F_{IS}	-0.0011262	0.7912088
		G''_{ST}	0.03861435	0.6833167

Na comparação entre 2016 e 2017 sem distinção de ambientes, a variância dos dados explicados pelos PC1 e PC2 da PCA foi de 1,8% e 1,6%, respectivamente (Figura 19a). A PCA apresentou alto grau de sobreposição dos pontos, porém a população do ano de 2017 parece ser mais diversa, apresentando mais pontos “*outliers*” no gráfico. Para os testes da hipótese SNP-5, a variância dos dados explicadas pelos PC1 e PC2 da PCA foi de 2,3% e 2,3% para as populações do ambiente silvestre, 2,3% e 2,2% para as populações do ambiente periurbano e de 2,7% e 2,5% para as populações do ambiente urbano, respectivamente (Figura 19b). Os gráficos da PCA apresentaram alto grau de sobreposição de pontos para todas as populações, com as populações de 2016 em ambos os ambientes silvestre e urbano apresentando maior número de “*outliers*” e consequentemente, maior diversidade.

Figura 19. Diversidade genética das populações de *Anopheles cruzii* dos anos de 2016 e 2017 em todas as áreas e em cada área. Análise dos Componentes Principais. Eixo x-y: Variância explicada pelos PC1 e PC2. Os dados foram transformados usando a PCA e plotados como uma função dos dois primeiros componentes principais.

A análise bayesiana de *clusters* multi-locus e subsequente aplicação do método de Evanno foram usados para identificar o mais provável número de grupos genéticos, o que de acordo com o ΔK foi de $K=2$ para as populações da hipótese SNP-4. No gráfico do *STRUCTURE* é possível observar que as populações são muito homogêneas e não apresentaram estruturação genética, pois a proporção de indivíduos pertencentes ao grupo genético 1 ou 2 é similar (Figura 20a).

Nos testes da hipótese SNP-5, ΔK foi de $K=3$ para as populações de 2016 e 2017 do ambiente silvestre (Figura 20b). No gráfico do *STRUCTURE* apresentando a configuração $K=3$ é possível observar grande similaridade entre a proporção de grupos genéticos em cada população, com alguns indivíduos da população de 2016 apresentando maior proporção da cor vermelha em relação a população 2017. Para as populações de 2016 e 2017 do ambiente periurbano o ΔK foi de $K=3$ (Figura 20b). No gráfico do *STRUCTURE* é possível observar grande similaridade na distribuição dos grupos genéticos em cada população, com os indivíduos da população 2016 apresentando maior presença do grupo genético azul em relação a 2017. Para as populações de 2016 e 2017 do ambiente urbano o ΔK foi de $K=2$ (Figura 20b). No gráfico do *STRUCTURE* apresentando a configuração $K=2$ é possível observar grande similaridade genética entre as populações e similar distribuição dos grupos genéticos, indicando alta homogeneidade genética entre elas.

Figura 20. Estrutura genética das populações *Anopheles cruzii* coletadas nos anos de 2016 e 2017. A) Hipótese SNP-4. B) Hipótese SNP-5. Análise bayesiana de *clusters* multi-locus implementada no programa *STRUCTURE*. Cada um dos indivíduos é representado por uma linha vertical no gráfico, esta linha é fracionada em segmentos de cores que representam a probabilidade dos indivíduos em pertencer a algum dos *clusters* genéticos. Eixo x: Probabilidade 0 a 1. Eixo y: número de indivíduos. A) 235 e 145. B) Silvestre: 90 e 51; Periurbano: 82 e 55; Urbano: 63 e 39.

5 DISCUSSÃO

Urbanização causa um grande impacto no ambiente físico, em processos do ecossistema e na ecologia de organismos (Johnson & Munshi-South 2017). Esses impactos podem resultar em um desfecho dramático para o ambiente, como por exemplo o aumento nas temperaturas, perda de habitat, poluição e desmatamento. O conhecimento de como a urbanização afeta a microevolução de mosquitos é importante para entender as consequências dos processos antropogênicos e auxiliar a mitigar a proliferação de mosquitos vetores. Os resultados encontrados neste presente estudo indicam que as mudanças antropogênicas no ambiente são capazes de modular o fenótipo e genótipo de populações de *An. cruzii*.

5.1 Estruturação simpátrica e acrodendrofilia de *Anopheles cruzii*

Os resultados obtidos através dos testes das hipóteses MGA-1 e SNP-1, no qual populações de copa e solo foram comparadas considerando todas as áreas, revelaram resultados semelhantes para os dois marcadores. Os testes realizados baseados na MGA e em SNPs não encontraram evidências de estruturação populacional entre os dois grupos testados. A CVA da análise de morfometria da asa indicou que as duas populações são similares e apresentam formatos alares semelhantes. As análises genéticas de PCA, análise bayesiana e os índices de D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST} baseadas nos marcadores SNPs, exibiram baixa diversidade e falta de estrutura entre as populações de copa e solo de todas as áreas. Portanto, as populações de copa e solo de todas as áreas não apresentaram estruturação populacional fenotípica e genotípica. Por outro lado, os testes das hipóteses MGA-2 e SNP-2 revelaram resultados interessantes. Nas hipóteses MGA-2 e SNP-2, as populações de *An. cruzii* coletadas nas copas das árvores e ao nível do solo foram comparadas em cada área separadamente.

Os resultados das análises fenotípicas dos testes da hipótese MGA-2 revelaram que as populações de copa e solo do ambiente urbano apresentaram clara estruturação populacional, corroborada pela CVA e pelo valor alto e significativo da distância de Mahalanobis. Além disso, é importante ressaltar que as populações silvestre e periurbana apresentaram valores mais baixos da distância de Mahalanobis e sobreposição de formatos alares no gráfico da CVA. Indicando que as populações de copa e solo do ambiente urbano são mais distintas do que nos outros ambientes. Apesar do alto grau de estruturação populacional apresentado pela CVA e pelo valor da distância de Mahalanobis, o teste de reclassificação não foi capaz de classificar as populações de copa e solo corretamente, demonstrando acurácia de 62% e 45%, respectivamente. Assim como o *wireframe* da asa não revelou diferenças em marcos anatômicos quantitativos.

Os resultados genotípicos do teste da hipótese SNP-2, mostraram um padrão de diversidade distinto no gráfico da PCA de cada área, enquanto nas áreas silvestre e periurbana as populações de copa se demonstraram mais diversas, na área urbana houve uma inversão e a população de solo apresentou maior diversidade genética. Além disso, os resultados mostraram uma clara estruturação entre as populações de copa e solo da área urbana corroborada por todas as análises: PCA, análise bayesiana e estimadores de estrutura populacional (D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST}). Os resultados dos dois marcadores de acordo indicam que, de fato, há diferença entre as populações de copa e solo do ambiente urbano e que é provável que as pressões seletivas impostas por esse ambiente podem ser capazes de modular a acrodendrofilia de *An. cruzii*.

A perda de diversidade genética em populações nativas pode ser associada à mudanças antropogênicas no meio ambiente (desmatamento, agricultura e urbanização) (Gardner et al. 2009; Campos et al. 2017; Johnson & Munshi-South 2017). Há crescente

evidências de que populações de animais e de plantas vivenciam seleções divergentes em ambientes urbanos e não urbanos, o que pode explicar o maior grau de diversidade genética da população de solo do ambiente urbano (Knop 2016; Johnson & Munshi-South 2017). Não há evidências da presença de *An. cruzii* em áreas metropolitanas altamente urbanizadas (Ceretti-Junior et al. 2016). Porém, *An. cruzii* é constantemente encontrado habitando áreas com modificações humanas próximas a fragmentos de florestas, ou até mesmo em bromélias ornamentais no ambiente antrópico (Forattini et al. 1996; Marques & Forattini 2009; Laporta et al. 2015; Multini et al. 2019c). *Anopheles cruzii* é uma espécie especialista em bromélias e a sua abundância é evidentemente associada a altos níveis de umidade, cobertura florestal e disponibilidade de bromélias. Por outro lado, estudos têm mostrado que modificações antrópicas em áreas naturais podem influenciar a dispersão vertical, fenótipo e genótipo de *An. cruzii*, o que provavelmente influenciará a dinâmica da transmissão de *Plasmodium* envolvendo este importante vetor (Medeiros-Sousa et al. 2019; Multini et al. 2019c).

Um estudo recente indicou que apesar de modificações antrópicas no ambiente levarem à redução na abundância de *An. cruzii*, a presença deste mosquito próximo ao solo é maior em áreas com maior supressão florestal devido a modificações antropogênicas (Medeiros-Sousa et al. 2019). Portanto, a acrodendrofilia de *An. cruzii* pode ser afetada pelas modificações humanas no meio ambiente e pela proximidade de áreas domiciliares com fragmentos de floresta (Forattini 1968; Medeiros-Sousa et al. 2019). Esses achados ecológicos corroboram nosso estudo genético, o que pode indicar que a presença de *An. cruzii* próximo ao solo pode ser diretamente associada a atividades antropogênicas. Considera-se fato que a variação no comportamento acrodendrófilo de *An. cruzii* possui implicações epidemiológicas importantes na dinâmica de transmissão de malária (Deane et al. 1984; Multini et al. 2019a).

Modificações promovidas por atividades antropogênicas podem ter um papel essencial nas mudanças na dispersão vertical de *An. cruzii*. A fragmentação da Mata Atlântica devido a intervenções humanas leva à redução de fontes naturais para o repasto sanguíneo de *An. cruzii*, as quais nas copas das árvores seriam, principalmente, pássaros e macacos (Forattini 1968; Deane 1992; Marrelli et al. 2007). A redução de fontes silvestres para o repasto sanguíneo pode estar levando o *An. cruzii* a procurar por fontes para o repasto ao nível do solo em lugares compostos por habitações humanas próximas a fragmentos de floresta, o que corrobora o comportamento antropofílico de *An. cruzii* e a transmissão de *Plasmodium* humanos e simianos para humanos vivendo em proximidade com áreas florestadas (Forattini 1968; Medeiros-Sousa et al. 2019; Multini et al. 2019a).

5.2 Estruturação populacional transversal em *Anopheles cruzii*

Os testes da hipótese MGA-3 revelaram que não há estruturação populacional de acordo com o fenótipo entre as populações silvestre, periurbana e urbana comparadas transversalmente. A análise da CVA revelou grande sobreposição de formatos alares entre todas as populações. Como observado em outras espécies de culicídeos (Gómez et al. 2014; Carvalho et al. 2017), pressões seletivas resultantes de modificações antropogênicas podem promover homogeneização biótica (McKinney 2006), o que pode ser refletido em reduzida variação intraespecífica do formato alar. Esse fenômeno pode explicar a baixa variação alar entre as populações quando comparadas transversalmente.

SNPs são considerados marcadores moleculares confiáveis para analisar padrões de estrutura genética em populações de mosquito em escala microgeográfica (Campos et al. 2017; Schmidt et al. 2017). Porém, os resultados obtidos através da

análise de SNPs mostraram que não há estrutura transversal entre as populações das áreas silvestre, periurbana e urbana de acordo com a PCA e análise bayesiana, indicando que as diferenças entre as populações são sutis e apenas visíveis quando populações próximas são comparadas, por exemplo, as populações de copa e solo do ambiente urbano, que vivem em simpatria e apresentaram diferenças genéticas. Apesar dos estimadores de estrutura genética (D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST}) terem mostrado valores de P significativos no teste da hipótese SNP-3, todos os valores estimados foram baixos e não revelaram estrutura genética. Não há barreiras físicas entre as populações de *An. cruzii* aqui consideradas e analisadas, portanto, elas podem representar uma grande e bem distribuída população com alto grau de homogeneidade genética. Estudos anteriores sugerem que espécies nativas apresentam falta de estrutura genética, enquanto espécies invasivas são mais geneticamente estruturadas e diversas (Multini et al. 2016, 2019b; Wilke et al. 2017, 2018b). Esse fenômeno pode explicar a falta de estrutura entre as populações de *An. cruzii* em áreas com diferentes níveis de modificações antropogênicas.

5.3 Microevolução em *Anopheles cruzii*

Nos testes da hipótese MGA-4, os resultados revelaram uma variação fenotípica considerável em ambos os tamanho e formato das asas de *An. cruzii* durante os três anos de estudo, sugerindo rápidas mudanças microevolutivas. Os resultados revelaram um sutil, mas significativa diferenciação detectada pela CVA para todas os testes, suportados por valores significativos de distância de Mahalanobis. Observa-se nos resultados um gradiente de variação alar do ambiente mais silvestre para o ambiente mais urbano, com a população urbana apresentando maior variação nos padrões de formatos alares em relação ao tempo, indicando que variações no formato alar podem também ser influenciadas pelo meio ambiente.

Esses resultados foram corroborados pela análise de *wireframe*, a qual revelou variação longitudinal em marcos anatômicos quantitativos e pelos testes de *cross-validation* que apresentaram acurácia de até 75%. Apesar do tempo analisado ser curto, os testes de *cross-validation* apresentaram valores altos, pois as asas são consideradas caracteres morfológicos conservados em mosquitos (Henry et al. 2010). A árvore de Neighbor-Joining baseada nas distâncias de Mahalanobis sugere que tempo é um fator mais forte para a variação alar do que a distância geográfica. A alteração nos habitats naturais de *An. cruzii* provavelmente seja refletida em sua biologia e percebida nesse estudo através de padrões de variação em seu formato alar. Essa observação sugere que mudanças antropogênicas no ambiente podem ser um importante fator para a variação do formato alar de *An. cruzii*.

O ecossistema de Parelheiros está sendo afetado pelo aumento da presença humana e expansão desordenada da cidade, o que reflete em desmatamento e urbanização. Assentamentos clandestinos e casas em áreas rurais são comumente encontrados nessa região (Duarte et al. 2013). O rápido aumento na urbanização dessa área pode agir afetando o formato alar das populações de *An. cruzii*, podendo ser resultado de perda de habitat e diminuição na disponibilidade de hospedeiros naturais (primatas não humanos). Essa hipótese é suportada pela transmissão ativa de *Plasmodium* na áreas mais urbanizadas de Parelheiros, onde as dinâmicas de transmissão de malária são provavelmente mantidas por reservatórios assintomáticos humanos e primatas não humanos (Duarte et al. 2013; Sallum et al. 2014).

Apesar do tamanho da asa das populações de *An. cruzii* também ter variado, a variação no tamanho alar é geralmente uma manifestação de qualidade do habitat larval, disponibilidade de nutrientes, densidade larval e temperatura (Dujardin 2008; Morales Vargas et al. 2010) e varia de uma geração para a outra, o tornando menos informativo

para estudos microevolutivos (Lorenz et al. 2017). Por outro lado, a variação do formato alar tem sido mostrada como sendo determinada geneticamente e, por isso, usada em diversos estudos evolutivos (Klingenberg 2003; Dujardin et al. 2009; Lorenz et al. 2017).

Anopheles cruzii foi considerado verticalmente estruturado entre altas e baixas altitudes pela análise da geometria da asa. Os autores sugeriram que o formato alar de *An. cruzii* pode ser sensível a pressões seletivas impostas por estressores ambientais (Lorenz et al. 2014). As suas conclusões corroboram a hipótese deste estudo que estressores gerados pelo meio ambiente podem afetar o fenótipo de *An. cruzii*. Morfometria geométrica de asa também foi usada para acessar a microevolução de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*. Louise et al. (2015), detectaram variação temporal na asa de populações de *Ae. aegypti* coletadas por 14 meses na cidade de São Paulo e encontraram associação entre a rápida evolução dessa espécie e densa urbanização, entre outras variáveis. Resultados similares foram encontrados em um estudo realizado com populações de *Ae. albopictus* coletadas por quatro anos, mostrando que as variações ocorreram gradualmente pelo tempo em populações dessa espécie (Vidal et al. 2012).

Apesar do presente estudo ter encontrado alta variabilidade fenotípica para *An. cruzii*, alguns estudos observaram morfologia da asa como sendo relativamente uniforme, atribuindo estes resultados a fortes mecanismos canalizantes (Debat et al. 2009; Henry et al. 2010). Apesar disso, a plasticidade fenotípica tem mostrado possuir importância evolucionária e pode, portanto, estar ocorrendo nas populações deste estudo, principalmente, nas populações da área mais urbanizada (Debat & David 2001; Pigliucci 2005; Adams & Collyer 2009; Debat et al. 2009). Não há barreiras naturais entre as populações de *An. cruzii* do presente estudo, o que pode implicar em adaptação local. Portanto, é provável que seleção local pode produzir diferentes fenótipos (Dujardin et al.

2009) e que mecanismos como assimilação genética e acomodação genética podem induzir a real diferenciação (Waddington 1953).

Marcadores moleculares e fenotípicos são muitas vezes contraditórios. Enquanto a morfometria geométrica da asa demonstrou uma clara estruturação temporal em populações de *An. cruzii* (Multini et al. 2019c), os SNPs não identificaram estrutura entre as mesmas amostras. Nos testes das hipóteses SNP-4 e SNP-5, as populações de *An. cruzii* não mostraram sinais de estrutura e diversidade genética quando analisadas em relação ao tempo. Os resultados da PCA apresentaram as populações com baixa diversidade genética e alto grau de sobreposição de pontos, assim como a análise bayesiana e as estatísticas (D , F_{ST} , F_{IS} e G''_{ST}) não revelaram estruturação genética.

Estudos anteriores comparando geometria da asa e marcadores microssatélites em mosquitos revelaram que os padrões de formato alar mudam mais rapidamente (Vidal & Suesdek 2012; Louise et al. 2015). O formato alar de mosquitos é determinado por diversos genes e suas expressões, portanto, quando o formato alar é comparado com o polimorfismo de SNPs que são marcadores moleculares bi-alélicos, neutros e independentes diferentes desfechos podem ser esperados (Ayala et al. 2011; Lorenz et al. 2017).

Os traços fenotípicos são controlados por diversos fatores genéticos e podem ser sensíveis às mudanças ambientais durante o desenvolvimento, assim como variações sazonais podem afetar o tamanho e formato da asa de insetos (Francuski et al. 2011; Gómez et al. 2014). Cabe ressaltar que os espécimes de *An. cruzii* analisados neste estudo foram coletados durante três anos, abrangendo todas as estações do ano. Desse modo, não é possível descartar os efeitos da sazonalidade no formato alar de *An. cruzii*. Além disso, os resultados de variação fenotípica maior que a genotípica indicam que os

níveis de diferenciação nos caracteres alares excederam o que é esperado por marcadores genéticos neutros. Isso pode ser explicado pela hipótese de que os caracteres alares podem modular a performance de voo e outras funções biológicas, como dispersão e sucesso em encontrar parceiros para cópula em mosquitos *Anopheles* (Sanford et al. 2011; Gómez et al. 2014).

5.4 Controle de *Anopheles cruzii*

Estratégias efetivas de controle de vetores são de grande importância para atingir a eliminação da malária. Devido à sua complexa biologia, ecologia e características genéticas similares é particularmente difícil de controlar populações de *An. cruzii*. Este mosquito tem o hábito de mover-se do ambiente natural para áreas peridomiciliares e domiciliares procurando por fontes para o repasto sanguíneo, desafiando o desenvolvimento de estratégias de controle baseadas no manejo integrado de vetores (Forattini et al. 2000; Multini et al. 2019a). No passado, desmatamento e destruição de bromélias eram comuns para diminuir as populações de *An. cruzii* durante surtos de malária nas regiões sul e sudeste do Brasil, mas essas estratégias não são mais aceitáveis e podem piorar o cenário ambiental brasileiro (Deane 1988). O desmatamento pode levar à perda de biodiversidade resultando na diminuição de hospedeiros finais de *Plasmodium*, levando ao aumento na possibilidade de transmissão de *Plasmodium* a humanos (Laporta et al. 2013; Multini et al. 2019a). Manejo ambiental, conservação florestal e controle de casas e assentamentos ilegais e ecoturismo em áreas protegidas, podem levar à redução de populações geneticamente estruturadas de *An. cruzii* em proximidade com o solo o que inexoravelmente levaria a redução de infecções por plasmódios em humanos em áreas de Mata Atlântica (Laporta et al. 2013; Multini et al. 2019a).

6 CONCLUSÕES

- Os resultados indicam que mudanças antropogênicas no ambiente podem modular o fenótipo e genótipo de *An. cruzii*.
- Foram encontradas evidências de estruturação genética e fenotípica entre populações de copa e solo do ambiente urbano
- Enquanto as populações de copa dos ambientes silvestre e periurbano demonstraram maior diversidade genética, no ambiente urbano a população de solo foi mais diversa que a população de copa.
- Os resultados indicam que há variação temporal no tamanho e formato da asa de populações de *An. cruzii* de ambientes com diferentes níveis de modificações antropogênicas.
- Há um gradiente de sobreposição temporal de padrões de formatos de asa de *An. cruzii*, com a população mais urbana demonstrando menor grau de sobreposição e, por consequência, mais diferenciação. Enquanto a população mais silvestre demonstrou maior grau de sobreposição de padrões de formatos alares.
- Enquanto a morfometria geométrica da asa demonstrou uma clara estruturação temporal em populações de *An. cruzii*, os marcadores SNPs não identificaram estrutura entre as mesmas amostras, indicando que há alguma discrepância entre os dois marcadores.
- Não foram encontradas evidências de estruturação genética temporal entre as populações de *An. cruzii* de ambientes com diferentes níveis de modificações antropogênicas.

- Não foram encontradas evidências de estruturação genética e fenotípica transversal de populações de *An. cruzii* entre ambientes com diferentes níveis de modificações antropogênicas.

7 REFERÊNCIAS

- Abreu FVS de, Santos E Dos, Mello ARL, Gomes LR, Alvarenga DAM de, Gomes MQ, et al. Howler monkeys are the reservoir of malarial parasites causing zoonotic infections in the Atlantic forest of Rio de Janeiro. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(12):e0007906.
- Adams DC, Collyer ML. A general framework for the analysis of phenotypic trajectories in evolutionary studies. *Evolution (N Y)*. 2009;63(5):1143–54.
- Adey A, Morrison HG, Asan, Xun X, Kitzman JO, Turner EH, et al. Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition. *Genome Biol*. 2010;11(12):R119.
- Alvarenga DAM, Pina-Costa A, Sousa TN, Pissinatti A, Zalis MG, Suárez-Mutis MC, et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: First description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malar J*. 2015;14(1):1–9.
- Archer FI, Adams PE, Schneiders BB. StrataG: An R package for manipulating, summarizing and analysing population genetic data. *Mol Ecol Resour*. 2017;17(1):5–11.
- Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet*. 2018;391(10130):1608–21.
- Ayala D, Caro-Riaño H, Dujardin JP, Rahola N, Simard F, Fontenille D. Chromosomal and environmental determinants of morphometric variation in natural populations of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon. *Infect Genet Evol*. 2011;11(5):940–7.
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, et al. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. Fay JC, editor. *PLoS One*. 2008;3(10):e3376.
- Beier JC, Keating J, Githure JI, Macdonald MB, Impoinvil DE, Novak RJ. Integrated vector management for malaria control. *Malar J*. 2008;7(Suppl 1):S4.
- Beier JC, Wilke ABB, Benelli G. Newer Approaches for Malaria Vector Control and Challenges of Outdoor Transmission. In: *Towards Malaria Elimination - A Leap Forward*. InTech; 2018. p. 387- 402.
- Benelli G, Jeffries C, Walker T. Biological Control of Mosquito Vectors: Past, Present, and Future. *Insects*. 2016;7(4):52.
- Benelli G, Mehlhorn H. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitol Res*. 2016;115(5):1747–54.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504–7.
- Brasil. Lei nº 11.936, de 14 de maio de 2009. Proíbe a fabricação, a importação, a exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e o uso de

- diclorodifeniltricloreto (DDT) e dá outras providências. Diário Oficial da União. 15 mai 2009; Seção 1:1.
- Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. Lancet Glob Heal. 2017;5(10):e1038–46.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. Gene. 1999;234(2):177–86.
- Campbell GL, Marfin A a, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. Lancet Infect Dis. 2002 Sep;2(9):519–29.
- Campos M, Alonso DP, Conn JE, Vinetz JM, Emerson KJ, Ribolla PEM. Genetic diversity of *Nyssorhynchus (Anopheles) darlingi* related to biting behavior in western Amazon. Parasit Vectors. 2019;12(1):242.
- Campos M, Conn JE, Alonso DP, Vinetz JM, Emerson KJ, Ribolla PEM. Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. Parasit Vectors. 2017;10(1):76.
- Campos M, Spenassatto C, Da Graça Macoris MDL, Paduan KDS, Pinto J, Ribolla PEM. Seasonal population dynamics and the genetic structure of the mosquito vector *Aedes aegypti* in São Paulo, Brazil. Ecol Evol. 2012;2(11):2794–802.
- Carvalho-Pinto CJ, Lourenço-de-Oliveira R. Isoenzimatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(5):471–5.
- Carvalho GC, Vendrami DP, Marrelli MT, Wilke ABB. Wing variation in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) in urban parks. Parasit Vectors. 2017;10(1):423.
- Ceretti-Junior W, de Oliveira Christe R, Rizzo M, Strobel RC, de Matos Junior MO, de Mello MSH, et al. Species composition and ecological aspects of immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) in bromeliads in urban parks in the city of São Paulo, Brazil. J Arthropod Borne Dis. 2016;10(1):102–12.
- Chanda E, Ameneshewa B, Bagayoko M, Govere JM, Macdonald MB. Harnessing integrated vector management for enhanced disease prevention. Trends Parasitol. 2017;33(1):30–41.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Vol. 11, Cadernos de Saúde Pública. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1994.
- Corley LS. Microevolution and development: studies of the genetic basis of adaptive variation in insects. Evol Dev. 2005;7(2):79–80.
- Costa Vasconcelos PF. Febre amarela. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(2):275–93.
- Couto RD, Latorre MdoRDO, 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(1):52–8.

- Curado I, Duarte AMRC, Lal A a., Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997;92(2):235–43.
- Curado I, dos Santos Malafronte R, de Castro Duarte AMR, Kirchgatter K, Branquinho MS, Bianchi Galati EA. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. Acta Trop. 2006;100(1–2):54–62.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. Bioinformatics. 2011;27(15):2156–8.
- Deane LM. Malaria vectors in Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986;81:5–14.
- Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1988;38(2):223–30.
- Deane LM. Simian malaria in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87(Suppl 3):1–20.
- Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto J. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. Bull World Health Organ. 1966;35(5):805–8.
- Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto JA, Barbosa de Almeida F. On the transmission of simian malaria in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1971;13(5):311–9.
- Deane LM, Ferreira Neto J, Lima MM. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzi* in a forest in southern Brazil suggests that human cases of malaria of simian origin might be expected. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79(4):461–3.
- Deane LM, Ferreira Neto JA, Deane MP, Silveira IPS. *Anopheles (Kerteszia) cruzi*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1970;64(4):647.
- Debat V, David P. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. Trends Ecol Evol. 2001;16(10):555–61.
- Debat V, DeBelle A, Dworkin I. Plasticity, canalization, and developmental stability of the *Drosophila* wing: joint effects of mutations and developmental temperature. Evolution. 2009;63(11):2864–76.
- Demari-Silva B, Multini LC, Suesdek L, Oliveira TMP, Sallum MAM, Marrelli MT. Wing morphometry and genetic variability between *Culex coronator* and *Culex usquatus* (Diptera: Culicidae), two sibling species of the Coronator Group. J Med Entomol. 2017;1–8.
- Downs WG, Pittendrigh CS. Bromeliad malaria in Trinidad, British West Indies. Am J Trop Med Hyg. 1946;(26):47–66.
- Duarte AMRC, Malafronte RS, Cerutti C, Curado I, Paiva BR, Maeda AY, et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: Reservoirs for human infections? Acta Trop. 2008;107(2):179–85.

- Duarte AMRC, 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(1):58.
- Dujardin J-P. Modern morphometrics of medically important insects. In: *Genetics and Evolution of Infectious diseases*. 2011. p. 473–501.
- Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol*. 2008;8(6):875–90.
- Dujardin JP, Costa J, Bustamante D, Jaramillo N, Catalá S. Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. *Acta Trop*. 2009;110(2–3):101–11.
- Dunn FL, Lambrecht FL. The hosts of *Plasmodium brasilianum* Gonder and von Berenberg-Gossler, 1908. *J Parasitol*. 1963;49(2):316.
- Dyar HG, Knab F. Descriptions of some new mosquitoes from tropical America. *Proc United States Natl Museum*. 1908;35(1632):53–70.
- Emerson KJ, Conn JE, Bergo ES, Randel M, Sallum MAM. Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) clusters by major biogeographical region. *PLoS One*. 2015;10(7):e0130773.
- Erich H, Gelfand D, Sninsky J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. 1991;252(5013):1643–51.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14(8):2611–20.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2005;1:47–50.
- Flanagan SP, Jones AG. Constraints on the FST–Heterozygosity outlier approach. *J Hered*. 2017;108(5):561–73.
- Fonseca F. Plasmódio de primata do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1951;49:543–51.
- Fonseca F, Corrêa RR. Infecção experimental de *Anopheles (Kerteszia) cruzi* pelo *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Butantan*. 1941;(15):91–9.
- Forattini OP. *Culicidologia Médica*. Vol. 2. São Paulo: EDUSP; 2002.
- Forattini OP, Gomes C, Natal D, Santos JL. Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae em matas primitivas da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 1986;20(3):178–203.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 4 - Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. *Rev Saude Publica*. 1993;27(6):398–411.

- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 11 - Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles (Kerteszia)* in South-Eastern Brazil. *Rev Saude Publica*. 1996;30(2):107–14.
- Forattini OP, Kakitani I, dos Santos RC, Kobayashi KM, Ueno HM, Fernández Z. [The synanthropic potential of *Kerteszia* and *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil]. *Rev Saude Publica*. 2000;34(6):565–9.
- Forattini OP, Lopes OS, Rabello EX. Investigações sobre o comportamento de formas adulta de mosquitos silvestres no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publ*. 1968;2(2):111–73.
- Francuski LJ, Matić I, Ludoški J, Milankov V. Temporal patterns of genetic and phenotypic variation in the epidemiologically important drone fly, *Eristalis tenax*. *Med Vet Entomol*. 2011;25(2):135–47.
- Fundação SEADE. Portal de Estatísticas do Estado de São Paulo [Internet]. 2019 [acesso em 1 mar 2019]. Disponível em: <http://www.seade.gov.br>
- Gadelha P. From “forest malaria” to “bromeliad malaria”: a case-study of scientific controversy and malaria control. *Parassitologia*. 1994;36:175–95.
- Gardner TA, Barlow J, Chazdon R, Ewers RM, Harvey CA, Peres CA, et al. Prospects for tropical forest biodiversity in a human-modified world. *Ecol Lett*. 2009;12(6):561–82.
- 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 Trop*. 2014;135:75–85.
- Grigg MJ, Snounou G. *Plasmodium simium*: a Brazilian focus of anthroponotic vivax malaria? *Lancet Glob Heal*. 2017;5(10):e961–2.
- Guimarães AE, Gentile C, Lopes CM, De Mello RP. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, state of São Paulo, Brazil. III - Daily biting rhythms and lunar cycle influence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(6):753–60.
- Hammer Ø, Harper DATT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*. 2001;4(1):9.
- Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory [Internet]; 2008 [acesso em 22 abr 2019]. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>
- Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1347–50.
- Helyar SJ, Hemmer-Hansen J, Bekkevold D, Taylor MI, Ogden R, Limborg MT, et al. Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Mol Ecol Resour*. 2011 Mar;11(Suppl. 1):123–36.

- Hemme RR, Thomas CL, Chadee DD, Severson DW. Influence of urban landscapes on population dynamics in a short-distance migrant mosquito: Evidence for the dengue vector *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(3):1–9.
- Hendry AP, Kinnison MT. Perspective: The pace of modern life: measuring rates of contemporary microevolution. Evolution. 1999;53(6):1637–53.
- Henry A, Thongsripong P, Fonseca-Gonzalez I, Jaramillo-Ocampo N, Dujardin J-P. Wing shape of dengue vectors from around the world. Infect Genet Evol. 2010;10(2):207–14.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estado de São Paulo [Internet]; 2018 [acesso em 1 mar 2018]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/panorama>
- Jaramillo-O N, Dujardin J-P, Calle-Londoño D, Fonseca-González I. Geometric morphometrics for the taxonomy of 11 species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) mosquitoes. Med Vet Entomol. 2015;29(1):26–36.
- Johnson MTJ, Munshi-South J. Evolution of life in urban environments. Science. 2017;358(6363):eaam8327.
- Joly CA, Metzger JP, Tabarelli M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. New Phytol. 2014;204(3):459–73.
- Jombart T. Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics. 2008;24(11):1403–5.
- Jost L. GST and its relatives do not measure differentiation. Mol Ecol. 2008;17(18):4015–26.
- Kirchgatter K, Tubaki RM, Malafronte RDS, Alves IC, Lima GFMD, Guimarães LDO, et al. *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzei* (Diptera: Culicidae) in peridomestic 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 São Paulo. 2014;56(5):403–9.
- Klingenberg CP. Quantitative genetics of geometric shape: Heritability and the pitfalls of the univariate approach. Evolution. 2003;57(1):191–5.
- Klingenberg CP. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Mol Ecol Resour. 2011;11(2):353–7.
- Klingenberg CP, Marugan-Lobon J. Evolutionary covariation in geometric morphometric data: analyzing integration, modularity, and allometry in a phylogenetic context. Syst Biol. 2013;62(4):591–610.
- Knab F. Reported discussion. In: Proceedings of the Entomological Society of Washington. 1912. p. 79–81.
- Knop E. Biotic homogenization of three insect groups due to urbanization. Glob Chang Biol. 2016;22(1):228–36.

- Lanes ÉC, Pope NS, Alves R, Carvalho Filho NM, Giannini TC, Giulietti AM, et al. Landscape genomic conservation assessment of a narrow-endemic and a widespread morning glory from Amazonian savannas. *Front Plant Sci.* 2018;9:1–13.
- Laporta GZ, Burattini MN, Levy D, Fukuya LA, de Oliveira TMP, Maselli LMF, et al. *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? *Malar J.* 2015;14(1):1–12.
- Laporta GZ, Prado PIKL, Kraenkel RA, Coutinho RM, Sallum MAM. Biodiversity can help prevent malaria outbreaks in tropical forests. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2139.
- Lee Y, Marsden CD, Nieman C, Lanzaro GC. A new multiplex SNP genotyping assay for detecting hybridization and introgression between the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol Resour.* 2014;14(2):297–305.
- Lee Y, Seifert SN, Fornadel CM, Norris DE, Lanzaro GC. Single-Nucleotide Polymorphisms for high-throughput genotyping of *Anopheles arabiensis* in East and Southern Africa. *J Med Entomol.* 2012;49(2):307–15.
- Limongi JE, Chaves KM, Paula MBC, Costa FC, Silva AA, Lopes ÍS, et al. Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(3):232–7.
- Lorenz C, Almeida F, Almeida-Lopes F, Louise C, Pereira SN, Petersen V, et al. Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured? *Infect Genet Evol.* 2017;54:205–15.
- Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit 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). *Parasit Vectors.* 2014;7(1):1–12.
- Lorenz C, Virginio F, Aguiar BS, Suesdek L, Chiaravalloti-Neto F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. *Malar J.* 2015;14(1):1–13.
- Louise C, Vidal PO, Suesdek L. Microevolution of *Aedes aegypti*. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137851.
- Lutz A. Waldmosquitos und Waldmalaria. *Cent für Bakteriöl Parasitenkd und Infekt.* 1903;33(4):282–92.
- Malafronte RDS, Marrelli MT, Ramirez CCL, Nassar MN, Marinotti O. Intraspecific variation of second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA among populations of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2007;44(3):538–42.
- Marques GRM, Forattini OP. Encontro de imaturos de *Anopheles cruzii* em bromélias de área urbana, litoral de São Paulo. *Rev Saude Publica.* 2009;43(2):369–72.

- Marrelli MT, Malafronte RS, Sallum MA, Natal D. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: Current knowledge and future challenges. *Malar J.* 2007;6:127.
- Maselli LM, Levy D, Laporta GZ, Monteiro AM, Fukuya LA, Ferreira-Da-Cruz MF, et al. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* subclinical infection in non-endemic region: Implications for blood transfusion and malaria epidemiology. *Malar J.* 2014;13(1):1–9.
- McKinney ML. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biol Conserv.* 2006;127(3):247–60.
- Medeiros-Sousa AR, Christie RO, Castro Duarte AMR, Mucci LF, Ceretti-Junior W, Marrelli MT. Effects of anthropogenic landscape changes on the abundance and acrodendrophily of *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, the main vector of malaria parasites in the Atlantic Forest in Brazil. *Malar J.* 2019;18(1):110.
- Meirmans PG, Hedrick PW. Assessing population structure: FST and related measures. *Mol Ecol Resour.* 2011;11(1):5–18.
- Mendrone A, Cerutti C, Levi J, Boulos M, Sanchez MC, Malafronte R dos, et al. Unexpected detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in asymptomatic blood donors: fact or artifact? *Malar J.* 2014;13(1):336.
- Meneguzzi VC, dos Santos CB, 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(4):570–5.
- Miles A, Harding NJ, Bottà G, Clarkson CS, Antão T, Kozak K, et al. Genetic diversity of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Nature.* 2017;552:96–100.
- Ministério da Saúde. Guia para profissionais de saúde sobre prevenção da malária em viajantes. Brasília – DF; 2008.
- Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento de malária no Brasil [Internet]. Brasília - DF; 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf
- Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da malária [Internet]. 2018b [acesso em 1 mar 2019]. Disponível em: https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/30/3.%20c%20-%20malaria_CIT_30_ago_2018_cassiopeterka.pdf
- Ministério da Saúde. Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção [Internet]. 2019a [acesso em 1 mar 2019]. Disponível em: <http://portalsms.saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>
- Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net [Internet]. 2019b [acesso em 4 fev 2020]. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/malaria>.

- Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da malária na região Amazônica, 2017 a 2019 [Internet]. 2020 [acesso em 4 fev 2020]. Disponível em: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep_regioAmaznica_2019_10_31_15797230553370/casos_notificados_2019_regio_Amaznica
- Morales Vargas RE, Ya-umphan P, Phumala-Morales N, Komalamisra N, Dujardin J-P. Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. *Infect Genet Evol.* 2010;10(4):580–5.
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK, the SNP workshop group. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends Ecol Evol.* 2004;19(4):208–16.
- Motoki MT, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MAM. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1246–52.
- Multini LC, Wilke ABB, Suesdek L, Marrelli MT. Population genetic structure of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *PLoS One.* 2016;11(9):e0162328.
- Multini LC, Marrelli MT, Beier JC, Wilke ABB. Increasing complexity threatens the elimination of Extra-Amazonian malaria in Brazil. *Trends Parasitol.* 2019a;35(6):383–7.
- Multini LC, Souza ALS, Marrelli MT, Wilke ABB. Population structuring of the invasive mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on a microgeographic scale. *PLoS One.* 2019b;14(8):e0220773.
- Multini LC, Wilke ABB, Marrelli MT. Urbanization as a driver for temporal wing-shape variation in *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.* 2019c;190:30–6.
- Myers N, Mittermeier R a., Mittermeier CG, da Fonseca GB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 2000;403(6772):853–8.
- Naqqash MN, Gökçe A, Bakhsh A, Salim M. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitol Res.* 2016;115(4):1363–73.
- Organização Mundial da Saúde. Estratégia técnica mundial para o paludismo 2016-2030. Genebra; 2015.
- Pialoux G, Gaüzère B-A, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolos. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(5):319–27.
- Pigliucci M. Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now? *Trends Ecol Evol.* 2005;20(9):481–6.
- Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACF e S, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(5):618–33.
- Pless E, Gloria-Soria A, Evans BR, Kramer V, Bolling BG, Tabachnick WJ, et al. Multiple introductions of the dengue vector, *Aedes aegypti*, into California. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(8):e0005718.

- Prefeitura de São Paulo. Histórico da Região de Parelheiros. São Paulo; 2019a.
- Prefeitura de São Paulo. Parelheiros [Internet]. 2019b [acesso em 22 abr 2019]. Disponível em: <https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/subprefeituras/parelheiros/>
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes*. 2007;7(4):574–8.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vol. 2. R Foundation for Statistical Computing; 2017. p. 1–12.
- Ramasamy R. Zoonotic malaria - global overview and research and policy needs. *Front Public Heal*. 2014;2:123.
- Ramírez CCL, Dessen EMB. Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles cruzii*. *Genome*. 2000a;43(1):143–51.
- Ramírez CCL, Dessen EMB. Chromosome differentiated populations of *Anopheles cruzii*: evidence for a third sibling species. *Genetica*. 2000b;108:73–80.
- Ramirez CCL, Dessen EMB, Otto PA. Inversion polymorphism in a natural population of *Anopheles cruzii*. *Caryologia*. 1994;47(2):121–30.
- Reitz R. Bromeliaceas: e a malaria-bromelia endêmica. IDESC; 1983.
- Rezende CL, Scarano FR, Assad ED, Joly CA, Metzger JP, Strassburg BBN, et al. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspect Ecol Conserv*. 2018;16(4):208–14.
- Rezende Dias G, Fujii TTS, Fogel BF, Lourenço-de-Oliveira R, Silva-do-Nascimento TF, Pitaluga AN, et al. Cryptic diversity in an Atlantic Forest malaria vector from the mountains of South-East Brazil. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):36.
- Ribeiro AF, Urbinatti PR, Duarte AMRC, Paula MB, Pereira DM, Mucci LF, et al. Mosquitoes in degraded and preserved areas of the Atlantic Forest and potential for vector-borne disease risk in the municipality of São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol*. 2012;37(2):316–24.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol Conserv*. 2009;142(6):1141–53.
- Rohlf FJ. TpsRelw, relative warps analysis [Programa de Computador]. Versão 1.45. New York: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook; 2003.
- Rohlf FJ. TpsDig [Programa de Computador]. Versão 1.4. New York: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook; 2004.
- Rohlf FJ. TpsRegr [Programa de Computador]. Versão 1.31. New York: Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook; 2009.

- Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Peixoto A. 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.* 2013;13(1):207.
- Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Gentile C, Grisard EC, Peixoto AA. Assessing the molecular divergence between *Anopheles (Kerteszia) cruzii* populations from Brazil using the timeless gene: further evidence of a species complex. *Malar J.* 2009;8:60.
- Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Mazzoni CJ, Peixoto AA. Estimation of divergence time between two sibling species of the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex using a multilocus approach. *BMC Evol Biol.* 2010a;10:91.
- Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Peixoto AA. Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex in south-east Brazil. *Malar J.* 2010b;9:33.
- Russello MA, Waterhouse MD, Etter PD, Johnson EA. From promise to practice: pairing non-invasive sampling with genomics in conservation. *PeerJ.* 2015;3:e1106.
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487–91.
- Sallum MA, Daniel-Ribeiro C, Laporta G, Ferreira-da-Cruz M, Maselli LM, Levy D, et al. Finding connections in the unexpected detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in asymptomatic blood donors: a fact in the Atlantic Forest. *Malar J.* 2014;13(1):337.
- Sanford MR, Demirci B, Marsden CD, Lee Y, Cornel AJ, Lanzaro GC. Morphological differentiation may mediate mate-choice between incipient species of *Anopheles gambiae* s.s. *PLoS One.* 2011;6(11): e27920.
- Schlötterer C. The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nat Rev Genet.* 2004;5(1):63–9.
- Schmidt TL, Rašić G, Zhang D, Zheng X, Xi Z, Hoffmann AA. Genome-wide SNPs reveal the drivers of gene flow in an urban population of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(10):1–20.
- Sendaydiego JP, Demayo CG. Describing variations in wing shapes of *Anopheles flavirostris* detected positive and negative of filaria using relative warp and Euclidean distance matrix analysis. *Int J Mosq Res.* 2015;2(2):9–13.
- Shapland EB, Holmes V, Reeves CD, Sorokin E, Durot M, Platt D, et al. Low-cost, high-throughput sequencing of DNA assemblies using a highly multiplexed Nextera process. *ACS Synth Biol.* 2015;4(7):860–6.
- Sherpa S, Rioux D, Pougnet-Lagarde C, Després L. Genetic diversity and distribution differ between long-established and recently introduced populations in the invasive mosquito *Aedes albopictus*. *Infect Genet Evol.* 2018;58:145–56.

- Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors*. 2010;3(1):117.
- StatSoft & StatSoft. 2004. Statistica 7.0 Software.
- Suh KN, Kain KC, Keystone JS. Malaria. *CMAJ*. 2004;170(11):1693–702.
- Tauil PL. [Perspectives of vector-borne diseases control in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(3):275–7.
- The Lancet Global Health. Vector control: time for a planetary health approach. *Lancet Glob Heal*. 2017;5(6):e556.
- Ueno HM, Forattini OP, Kakitani I. Vertical and seasonal distribution of *Anopheles (Kerteszia)* in Ilha Comprida, Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica*. 2007;41(2):269–75.
- Vidal PO, Carvalho E, Suesdek L. Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(8):1030–4.
- Vidal PO, Suesdek L. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012;12(3):591–6.
- Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*. 2002;34(3):275–305.
- Virginio F, Vidal PO, Suesdek L. Wing sexual dimorphism of pathogen-vector culicids. *Parasit Vectors*. 2015;8(1):1–9.
- Waddington CH. Genetic Assimilation of an acquired character. *Evolution*. 1953;7(2):118.
- Weaver SC, Ferro C, Barrera R, Boshell J, Navarro J-C. Venezuelan Equine Encephalitis. *Annu Rev Entomol*. 2004;49(1):141–74.
- Wilke ABB, Beier JC, Benelli G. Transgenic Mosquitoes – Fact or Fiction? *Trends Parasitol*. 2018a;34(6):1–10.
- Wilke ABB, de Carvalho GC, Marrelli MT. Retention of ancestral polymorphism in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2018b;65:333–9.
- Wilke ABB, Christe R de O, Multini LC, Vidal PO, Wilk-da-Silva R, de Carvalho GC, et al. Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161643.
- Wilke ABB, Wilk-da-Silva R, Marrelli MT. Microgeographic population structuring of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*. 2017;12(9):e0185150.

World Health Organization. Global strategic framework for integrated vector management. Geneva; 2004.

World Health Organization. World Malaria Report. Geneva; 2019.

Walter Reed Biosystematics Unit. Systematic Catalog of Culicidae [Internet]. 2019 [acesso em 1 mar 2019]. Disponível em: http://www.mosquitocatalog.org/taxon_descr.aspx?ID=15856

Yamasaki T, Duarte AMRC, Curado I, Summa MEL, Neves DVD a, 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(6):392–400.

ANEXOS

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsauros em cada amostra de *Anopheles cruzii*.

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
1	4992207	1140014	1252	14285	2830	3311
2	6224619	3372618	581	14643	2838	3616
3	5888079	2730769	2139	13802	2304	3433
4	5284176	3071546	714	14586	2755	3623
5	6268108	3155611	651	14544	2858	3625
6	4344406	2458704	801	14310	3160	3407
7	4732735	2592904	792	14572	2752	3562
8	4434034	2285405	2286	13494	2773	3125
9	2810433	559886	3846	11815	3266	2751
10	3277356	1566982	2423	14039	1577	3639
11	5214334	2980014	547	14497	3259	3375
12	4154214	2261433	1064	14475	2415	3724
13	3091829	1783065	5179	11084	3001	2414
14	1804996	977126	1761	13760	2863	3294
15	1852642	924410	2025	13140	3425	3088
16	3879924	1772972	9395	9260	721	2302
17	5038770	965508	1991	13465	2927	3295
18	3489985	1965623	790	14441	2911	3536
19	4132243	2054220	1098	14387	2582	3611
20	1800066	1017793	3902	12393	2236	3147
21	3288905	1712687	1159	14182	2910	3427
22	3342082	1803133	1094	14340	2864	3380
23	1257814	717805	4469	11435	3148	2626
24	3565965	1873577	1396	14158	2504	3620
25	4278466	700281	3795	12106	2862	2915
26	2990540	1580654	1672	14000	2493	3513
27	5448242	2848843	800	14741	2586	3551
28	3766759	2148347	832	14438	2906	3502
29	4649618	2311446	997	14374	2792	3515
30	3008766	1474127	2312	14020	1860	3486
31	4119668	2205203	939	14520	2635	3584
32	496369	274417	10431	7679	1743	1825
33	6623754	1487616	1664	13956	2667	3391
34	2208208	1153518	2708	13226	2357	3387
35	2088897	1108538	4626	12045	1909	3098
36	1512663	852586	2772	13073	2631	3202

continua

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsauros em cada amostra de *Anopheles cruzii*. continuação

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
37	2656153	1411664	1843	13986	2343	3506
38	3024117	1642150	1765	14140	2287	3486
39	1924284	1036295	3702	12769	1896	3311
40	3616408	1975478	1377	14172	2613	3516
41	6046679	1404055	1450	13954	2824	3450
42	3560306	1915976	1072	14334	2725	3547
43	3249694	1768339	1442	14054	2693	3489
44	2897937	1621713	1184	14271	2708	3515
45	1606949	783687	5653	11307	1775	2943
46	3755411	2122071	1193	14301	2670	3514
47	2281754	1162620	4062	12452	1941	3223
48	2434602	1277514	2434	13449	2381	3414
49	6558463	1265654	1812	13772	2586	3508
50	1574623	827872	5070	11706	1852	3050
51	3875521	2096870	1712	14092	2252	3622
52	1179057	560104	8089	10017	1048	2524
53	3496941	1860455	1493	14223	2393	3569
54	2394850	1326019	3533	12924	1789	3432
55	2592225	1324434	3513	12961	1837	3367
56	2832049	1546371	2063	13833	2346	3436
57	5892023	1244420	2468	13435	2524	3251
58	3642124	1894824	1198	14253	2656	3571
59	4412232	2424373	1003	14542	2471	3662
60	207978	80883	17917	2717	554	490
61	2424089	1271802	2524	13388	2362	3404
62	1755553	928374	5656	11375	1711	2936
63	6441339	3236986	755	14615	2727	3581
64	2696165	1390719	1938	13918	2398	3424
65	6740226	1615278	2024	13844	2360	3450
66	3602955	1911960	2187	13783	2140	3568
67	3993152	2149958	1008	14435	2461	3774
68	1491950	785655	5376	11639	1579	3084
69	2573376	1261415	3511	12857	1983	3327
70	3191573	1772064	2180	13728	2147	3623
71	4371964	2175919	1316	14441	2107	3814
72	2007772	1065641	3043	13069	2257	3309
73	2268760	261465	12104	6436	1722	1416
74	2972969	1568086	1795	13905	2560	3418

continua

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsauros em cada amostra de *Anopheles cruzii*. continuação

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
75	2484619	1334805	3020	13222	2120	3316
76	3504763	2016560	991	14501	2654	3532
77	3634882	1676035	1550	14085	2592	3451
78	3804744	2080184	1348	14370	2158	3802
79	3453150	1834548	1656	14159	2230	3633
80	1831458	1000517	4142	12431	1855	3250
81	5757712	1200775	2963	13133	2124	3458
82	3004861	1555471	1516	14113	2594	3455
83	1672653	842341	4178	12305	2183	3012
84	2533873	1414736	1779	13989	2452	3458
85	4015887	2066138	983	14497	2704	3494
86	3605591	1911705	1463	14262	2457	3496
87	4013147	2140827	1140	14403	2453	3682
88	2826013	1468096	1747	13960	2403	3568
89	4876436	1130720	2300	13446	2690	3242
90	3561233	1908631	1185	14365	2565	3563
91	3762360	2127536	1320	14410	2296	3652
92	1841709	1056002	2401	13425	2529	3323
93	1953983	1058352	3632	12816	2040	3190
94	4647468	2524451	1038	14619	2428	3593
95	2072409	1022798	5383	11688	1675	2932
96	4572192	859226	2094	13320	3068	3196
97	3520668	1874580	1751	14027	2217	3683
98	5042149	2743072	1006	14595	2336	3741
99	3292021	1848358	1216	14159	2760	3543
100	4503390	2257142	1285	14334	2455	3604
101	4172194	2261858	1011	14537	2438	3692
102	3438534	1812622	1919	13977	2295	3487
103	2225804	1092676	2679	13362	2409	3228
104	5733639	1369937	1838	13773	2546	3521
105	3100843	1650388	1747	13992	2426	3513
106	5143220	2769815	883	14690	2500	3605
107	1456292	825143	4706	11888	2097	2987
108	1448028	816088	3243	12780	2530	3125
109	2469137	1422276	1689	13904	2627	3458
110	1609028	857614	4546	12154	1911	3067
111	3087434	1667342	1783	13999	2388	3508
112	7877036	1539177	1353	14070	2784	3471

continua

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsauros em cada amostra de *Anopheles cruzii*. continuação

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
113	4747460	2573803	704	14678	2711	3585
114	5744230	3022330	811	14682	2537	3648
115	2831991	1585169	1741	13991	2343	3603
116	2594953	1255441	2199	13571	2670	3238
117	4593230	2510178	647	14775	2638	3618
118	1464569	790999	5034	11827	1770	3047
119	3754184	1952168	1493	14131	2558	3496
120	7544716	1564327	1131	14176	2841	3530
121	3708863	2074861	955	14484	2752	3487
122	4777924	2607248	702	14567	2725	3684
123	1012828	582050	5252	11334	2330	2762
124	3199464	1679850	1483	14103	2563	3529
125	3184101	1768926	857	14436	2905	3480
126	2337521	1332121	988	13958	3511	3221
127	1018913	494303	7043	10203	1901	2531
128	3681701	745614	3246	12649	2797	2986
129	4152873	2113012	745	14476	2887	3570
130	4106107	2189093	739	14628	2745	3566
131	1446327	761249	4450	11819	2510	2899
132	3898154	1948970	1025	14402	2763	3488
133	2850863	1557334	1563	14061	2537	3517
134	1012125	508978	7073	10179	1842	2584
135	42611	20920	21628	26	20	4
136	3057683	498224	4030	11770	3333	2545
137	3173652	1730154	983	14318	2977	3400
138	5162014	2742360	583	14613	3036	3446
139	3141863	1576100	1299	14062	2986	3331
140	3213460	1596323	1754	13908	2582	3434
141	5017963	2671836	869	14636	2477	3696
142	4166218	2019765	1340	14443	2459	3436
143	1594829	835421	3986	12306	2330	3056
144	7176914	1815328	1413	14046	2703	3516
145	1121381	513489	6252	10509	2538	2379
146	3732963	1968531	1686	14228	2150	3614
147	3105911	1746236	1673	14177	2355	3473
148	3550966	1763286	1777	14037	2338	3526
149	5033773	2903919	630	14593	2763	3692
150	5073148	2735365	973	14536	2535	3634

continua

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsaurus em cada amostra de *Anopheles cruzii*. continuação

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
151	3949014	1996506	1574	14163	2328	3613
152	8196618	1676828	1196	14085	3064	3333
153	4824396	2690392	672	14650	2635	3721
154	5562963	2965779	847	14772	2409	3650
155	1955123	1071922	2980	13261	2239	3198
156	2933300	1414649	2578	13506	2242	3352
157	3950402	2135627	1251	14412	2488	3527
158	1524557	744116	3849	12350	2659	2820
159	991120	540423	6460	10643	1955	2620
160	6786261	1845524	1310	14203	2687	3478
161	5439302	2971268	667	14806	2504	3701
162	5563737	3009800	813	14678	2569	3618
163	3356629	1880627	1326	14298	2461	3593
164	7808367	3981587	611	15007	2339	3721
165	4901623	2599390	970	14580	2563	3565
166	4310875	2387345	1152	14482	2508	3536
167	2987466	1608152	2775	13358	2010	3535
168	3726502	946865	5718	11302	1647	3011
169	1355160	620897	5408	11466	2056	2748
170	4106197	2239446	1993	14063	2065	3557
171	4396130	2566276	1173	14493	2137	3875
172	7073267	3822246	751	14778	2373	3776
173	4620881	2526679	1797	14007	2106	3768
174	5008094	2734627	1382	14322	2201	3773
175	3534452	1831561	2311	13821	1995	3551
176	5933323	1773909	1410	14184	2460	3624
177	3522979	2010296	1194	14167	2614	3703
178	3263989	1785872	2084	13918	2157	3519
179	1902708	1057857	3911	12511	2050	3206
180	1618269	835343	4897	11969	1845	2967
181	4076082	2306717	1391	14192	2202	3893
182	3331475	1790217	1579	14168	2355	3576
183	2796195	1501275	1816	13816	2437	3609
184	6689989	1529216	1330	14216	2657	3475
185	4102564	2127247	1145	14397	2607	3529
186	4975815	2696619	883	14835	2214	3746
187	3184909	1805226	1460	14053	2615	3550
188	5068037	2746590	936	14583	2404	3755

continua

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsaurus em cada amostra de *Anopheles cruzii*. continuação

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
189	4774093	2591176	822	14744	2427	3685
190	4449959	2362007	1219	14368	2556	3535
191	7392886	2237064	1021	14470	2594	3593
192	5409270	2961295	650	14709	2815	3504
193	6567957	3619398	728	14778	2435	3737
194	4095936	2328863	1233	14421	2315	3709
195	5461709	2724718	999	14534	2537	3608
196	5040941	2817454	783	14678	2659	3558
197	3628777	2012479	784	14483	2996	3415
198	3023604	1533445	1398	14198	2825	3257
199	4665093	1514315	1369	14117	2742	3450
200	2263691	1279801	1171	14118	3000	3389
201	6163738	3387279	887	14664	2546	3581
202	3471039	1997466	896	14518	2638	3626
203	2480486	1073352	2473	13058	3051	3096
204	1213628	673563	2847	12821	3086	2924
205	1424891	746868	2579	13008	3032	3059
206	76590	36290	21202	257	181	38
207	2107724	354672	7364	9481	2610	2223
208	2299658	1222030	1537	13793	2996	3352
209	1575070	800743	4007	12290	2309	3072
210	2552654	1411296	1865	13935	2340	3538
211	3104532	1537936	2210	13699	2142	3627
212	2675760	1501421	1598	14077	2376	3627
213	1831805	1022569	2041	13438	2991	3208
214	2319408	1282934	1765	13806	2681	3426
215	4713162	1010780	2133	13418	2841	3286
216	3565288	1986386	817	14467	2927	3467
217	5522034	2846324	803	14659	2506	3710
218	1302183	708412	5347	11508	1797	3026
219	3206988	1482711	856	14192	3188	3442
220	3181457	1625534	582	14440	3143	3513
221	4151316	1956873	672	14293	3246	3467
222	1570675	689338	4093	12210	2530	2845
223	790351	124583	15678	3977	1176	847
224	3366572	1890529	1395	14260	2463	3560
225	4055476	2181917	1434	14335	2444	3465
226	2568808	1411178	1867	13956	2309	3546

continua

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsaurus em cada amostra de *Anopheles cruzii*. continuação

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
227	3598401	1737008	1546	13995	2672	3465
228	3615192	1901488	1853	14051	2297	3477
229	3519518	1955942	1495	14315	2314	3554
230	3544248	1935875	1487	14306	2159	3726
231	5097921	1807899	1465	14111	2511	3591
232	3662543	2015168	1101	14430	2597	3550
233	4484136	2379022	1007	14462	2660	3549
234	2633817	1380085	1696	13809	2687	3486
235	1957497	950185	4403	12145	1899	3231
236	4601459	2448755	899	14593	2593	3593
237	3313998	1763587	1014	14353	2863	3448
238	2980852	1435844	1377	14123	2738	3440
239	5284576	1320362	1295	14030	2923	3430
240	3259513	1748341	1404	14151	2619	3504
241	4113399	2243708	1069	14598	2476	3535
242	3013516	1658260	1456	14191	2517	3514
243	2779659	1441084	2595	13431	2287	3365
244	4730778	2582458	942	14643	2395	3698
245	3098384	1575673	1212	14233	2806	3427
246	3608948	1903820	1126	14279	2742	3531
247	5111789	1127616	1579	13755	3004	3340
248	3604743	1922897	928	14328	2881	3541
249	4475464	2350108	806	14543	2765	3564
250	2414921	1193264	2022	13608	2608	3440
251	3105472	1520558	1601	14079	2531	3467
252	3931784	2045359	931	14459	2623	3665
253	4093049	1987338	1102	14386	2644	3546
254	3915309	1910028	1268	14244	2567	3599
255	5241442	1278244	1202	14103	2850	3523
256	5036295	2559545	968	14486	2673	3551
257	5369648	2889336	608	14583	2744	3743
258	2228449	941015	2587	13113	2785	3193
259	51497	24779	21596	44	31	7
260	5449540	2760880	568	14683	2856	3571
261	5690517	3039687	615	14751	2855	3457
262	4378156	2240227	822	14536	2831	3489
263	2678962	540262	2751	12480	3629	2818
264	3573041	1851268	1071	14302	2809	3496

continua

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsaurus em cada amostra de *Anopheles cruzii*. continuação

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
265	2934834	1467275	2583	13555	2147	3393
266	2365429	1287342	1879	13815	2604	3380
267	3265663	1661028	1523	14016	2652	3487
268	4778088	2581111	802	14609	2672	3595
269	4650566	2383347	925	14518	2639	3596
270	2889724	1621048	1819	13979	2431	3449
271	5278830	1240967	1292	14071	2821	3494
272	3492093	1857399	1313	14217	2722	3426
273	4394324	2329076	966	14608	2412	3692
274	2400962	1288288	1981	13668	2619	3410
275	4269919	2132396	790	14526	2921	3441
276	3171650	1632532	1351	14115	2858	3354
277	3438524	1867297	1525	14179	2428	3546
278	2895016	1342741	2014	13540	2753	3371
279	4439130	1131847	1869	13664	2798	3347
280	4058419	2019757	1031	14509	2587	3551
281	4768179	2443467	913	14650	2434	3681
282	3224783	1780471	1164	14333	2758	3423
283	62188	29779	21475	100	89	14
284	5704247	3017482	596	14846	2541	3695
285	5085575	2543618	950	14641	2470	3617
286	4584352	1178460	1856	13661	2844	3317
287	3237675	1734504	1214	14381	2520	3563
288	5279736	2933237	869	14632	2478	3699
289	3495556	1946425	1019	14358	2855	3446
290	4114873	2088393	1032	14499	2688	3459
291	3398055	1855100	608	14563	3074	3433
292	4339907	2320273	707	14539	2901	3531
293	2434137	1273259	2189	13583	2486	3420
294	4881059	1291458	1668	13759	2747	3504
295	3091164	1632211	1329	14189	2698	3462
296	123505	60077	19846	1222	365	245
297	3264122	1814354	771	14318	3108	3481
298	73737	34203	20999	429	175	75
299	1288170	669133	1870	13042	3807	2959
300	1867672	967268	1263	13750	3305	3360
301	3264434	1661286	824	14396	2879	3579
302	2607775	356584	6095	10155	3270	2158

continua

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsaurus em cada amostra de *Anopheles cruzii*. continuação

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
303	3560506	1859239	957	14340	2747	3634
304	2567617	1302867	1451	14127	2672	3428
305	1804750	1029126	2574	13258	2550	3296
306	3876621	2056326	1252	14392	2342	3692
307	1973603	1120787	2044	13693	2686	3255
308	3593287	1990871	987	14286	2894	3511
309	3360751	1786693	931	14262	3006	3479
310	6600448	1500534	1277	14053	2941	3407
311	4424994	2347096	586	14513	3184	3395
312	5507743	2866556	674	14629	2792	3583
313	3934904	2175575	592	14494	3153	3439
314	1542759	806826	4096	12291	2301	2990
315	3419743	1895470	761	14312	3231	3374
316	3164182	1745825	1675	14017	2487	3499
317	4601789	2474980	664	14545	2975	3494
318	4038507	746092	2735	12731	3102	3110
319	3368552	1792211	1243	14365	2563	3507
320	3700991	2084259	1245	14302	2473	3658
321	682082	382521	6815	9930	2552	2381
322	5102911	2523353	637	14596	2843	3602
323	2792201	1514063	850	14276	3127	3425
324	1451913	647372	2995	12718	2979	2986
325	2637392	1384800	1099	14079	3152	3348
326	3877537	656288	2727	12647	3454	2850
327	3650424	1849271	955	14453	2860	3410
328	3998011	2046465	868	14529	2845	3436
329	3139842	1719707	947	14536	2604	3591
330	2801704	1426619	1005	14161	3151	3361
331	3029094	1571162	739	14198	3378	3363
332	2150295	1081246	1108	13921	3443	3206
333	4310366	1942916	677	14426	3160	3415
334	2556105	445992	3630	11713	3777	2558
335	2598380	1297432	2849	13403	2107	3319
336	4668405	2484190	747	14793	2532	3606
337	2505791	1298536	1435	14054	2885	3304
338	4008000	2037881	1162	14266	2590	3660
339	5003287	2654845	1021	14571	2521	3565
340	2507649	1277654	1235	14062	3063	3318

continua

Anexo 1 - Informação sobre a genotipagem de SNPs realizada pela empresa SNPsauros em cada amostra de *Anopheles cruzii*. continuação

Amostra	Leitura	Leituras mapeadas*	SNPs faltantes	Alelos referência	Heterozigotos	Homozigotos
341	4005260	2081347	816	14566	2582	3714
342	4882201	1077614	1374	13896	2997	3411
343	4433054	2290130	1070	14453	2477	3678
344	4941473	2628532	984	14581	2596	3517
345	1692720	932486	3244	12890	2385	3159
346	3879746	1943012	1148	14363	2584	3583
347	3401125	1801835	1021	14430	2714	3513
348	2555502	1386592	987	14187	3015	3489
349	3827465	1985422	973	14463	2679	3563
350	5563168	1387157	920	14177	3194	3387
351	5716408	2969804	802	14626	2698	3552
352	5219173	2787485	605	14746	2734	3593
353	3407369	1859488	1178	14410	2494	3596
354	5427467	2709477	643	14814	2710	3511
355	4862854	2663913	1221	14393	2374	3690
356	3281795	1769030	1555	14147	2525	3451
357	4286411	2348691	1078	14432	2539	3629
358	5476330	1441356	1203	13969	2975	3531
359	5308483	2914573	785	14644	2489	3760
360	5684854	3055756	981	14550	2372	3775
361	3831766	2137667	1186	14581	2318	3593
362	5782131	3094056	553	14760	2777	3588
363	6917043	3818826	544	14819	2671	3644
364	3162834	1717384	1074	14342	2760	3502
365	3860975	1977988	1386	14239	2513	3540
366	3327854	724880	2212	13008	3412	3046
367	3318782	1748507	928	14384	2867	3499
368	3222668	1704281	847	14375	2997	3459
369	2811196	1554971	1447	14069	2489	3673
370	3632950	1807725	902	14348	2891	3537
371	3262275	1747752	1002	14468	2679	3529
372	2867490	1496000	1080	14257	2891	3450
373	3026080	1482372	1167	14167	2976	3368
374	3083822	664128	2672	12725	3333	2948
375	3971272	2054690	746	14595	2719	3618
376	5105324	2620392	855	14576	2691	3556
377	3048663	1683231	1126	14135	2826	3591
378	3836985	1954022	731	14445	2972	3530
379	3366703	1806639	947	14423	2733	3575
380	3526394	1765622	1261	14242	2700	3475

Anexo 2 - Heterozigosidade e F_{ST} calculados pela análise de 'fsthet' para todos SNPs considerados *outliers*.

SNP	Heterozigosidade	FST
SNP_6	0.18861496	0.01070297
SNP_23	0.35009514	0.05538485
SNP_37	0.16614422	0.00828603
SNP_50	0.17421748	0.00850621
SNP_70	0.11409664	0.00815627
SNP_73	0.47108992	0.06727733
SNP_78	0.10205438	0.00879343
SNP_136	0.19624352	0.09671167
SNP_157	0.10772855	0.00997525
SNP_177	0.1098692	0.00894346
SNP_184	0.49609065	0.0898272
SNP_230	0.46592107	0.06876711
SNP_235	0.12106972	0.06147423
SNP_245	0.29993564	0.06189054
SNP_253	0.21348873	0.0106103
SNP_264	0.43534772	0.04944008
SNP_268	0.33709794	0.07460442
SNP_271	0.18794161	0.01071289
SNP_301	0.15588214	0.00847545
SNP_320	0.11278365	0.00689383
SNP_330	0.46859304	0.08968124
SNP_338	0.26874496	0.06550187
SNP_353	0.22244901	0.08527199
SNP_385	0.38967938	0.04828464
SNP_393	0.15156953	0.07522197
SNP_407	0.44270538	0.01074122
SNP_422	0.17207697	0.00841627
SNP_446	0.20142663	0.00992355
SNP_461	0.30029923	0.01260201
SNP_474	0.30303738	0.06442195
SNP_475	0.49995341	0.00821782
SNP_478	0.13895795	0.00982738
SNP_483	0.40350271	0.05657335
SNP_492	0.48566148	0.01049475
SNP_503	0.13475164	0.00895711
SNP_566	0.13540286	0.05684825
SNP_584	0.09474704	0.0115407

continua

Anexo 2 - Heterozigosidade e F_{ST} calculados pela análise de 'fsthet' para todos SNPs considerados *outliers*.

SNP	Heterozigosidade	FST
SNP_586	0.44427501	0.00376819
SNP_602	0.1371191	0.06122573
SNP_611	0.2880628	0.05892905
SNP_633	0.12743258	0.00989776
SNP_651	0.37729721	0.05213373
SNP_671	0.38535836	0.00914578
SNP_675	0.33707057	0.01235853
SNP_708	0.13679235	0.05201148
SNP_721	0.25777338	0.06511487
SNP_725	0.49251647	0.07047502
SNP_798	0.13687031	0.05862466
SNP_803	0.42066148	0.07685466
SNP_804	0.25451936	0.009917
SNP_816	0.15362729	0.05822676
SNP_859	0.23657141	0.09881175
SNP_867	0.1249716	0.0645696
SNP_890	0.49996947	0.01018198
SNP_892	0.2427374	0.01057825
SNP_903	0.19996118	0.01053315
SNP_912	0.34888229	0.07124001
SNP_930	0.49911742	0.07038411
SNP_937	0.29021386	0.01179169
SNP_969	0.13865461	0.00871964
SNP_996	0.19690019	0.07072434
SNP_1002	0.21861557	0.00923012
SNP_1014	0.09411529	0.04824865
SNP_1038	0.20199082	0.08441062
SNP_1082	0.4972063	0.07033571
SNP_1099	0.31129122	0.01108642
SNP_1104	0.08885734	0.05643463
SNP_1115	0.12820149	0.0050095
SNP_1142	0.28708634	0.01154237
SNP_1143	0.2496211	0.06223679
SNP_1156	0.15486785	0.06755735
SNP_1167	0.14763205	0.0538292
SNP_1179	0.1081055	0.06003376
SNP_1189	0.3619021	0.04829993

continua

continuação

Anexo 2 - Heterozigosidade e F_{ST} calculados pela análise de 'fsthet' para todos SNPs considerados *outliers*. continuação

SNP	Heterozigosidade	FST
SNP_1204	0.12124109	0.07446266
SNP_1226	0.48885468	0.01040528
SNP_1255	0.11543001	0.05217443
SNP_1311	0.09658219	0.01192277

Laura Cristina Multini

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3842562436610936>

ID Lattes: **3842562436610936**

Última atualização do currículo em 07/10/2019

Possui graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Fundação Santo André (2012). Em 2013, foi Aprimorando Profissional da Fundação do Desenvolvimento Administrativo na área de Entomologia Médica e Soroepidemiologia, na Faculdade de Saúde Pública da USP. Mestre em Ciências pelo Instituto de Medicina Tropical da USP, na área de Doenças Tropicais e Saúde Internacional. Atualmente cursando o Doutorado em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Laura Cristina Multini

Nome em citações bibliográficas

MULTINI, L. C.;MULTINI, LAURA C.;MULTINI, LAURA CRISTINA

Lattes iD

<http://lattes.cnpq.br/3842562436610936>

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2016

Doutorado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 6).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Estudos microevolutivos em *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae), utilizando morfometria geométrica da asa e marcadores microssatélites,

Orientador: Mauro Toledo Marrelli.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2014 - 2016

Mestrado em Medicina Tropical (Conceito CAPES 5).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Caracterização genética de populações de *Aedes fluviatilis* de parques municipais em São Paulo, utilizando marcadores microssatélites, Ano de Obtenção: 2016.

Orientador: Mauro Toledo Marrelli.

Coorientador: André Barretto Bruno Wilke.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

Palavras-chave: *Aedes fluviatilis*; Marcadores microssatélites; Genética de populações; Processos de urbanização.

2009 - 2012

Graduação em Ciência Biológicas.

Centro Universitário Fundação Santo André, CUFA, Brasil.

Mauro Toledo Marrelli

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6872138193111416>

ID Lattes: **6872138193111416**

Última atualização do currículo em 09/01/2020

Professor Associado do Depto. de Epidemiologia da FSP-USP (desde 2011). Possui Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Mackenzie (1990). Aperfeiçoamento em Protozoologia pelo Instituto de Medicina Tropical (FM-USP, 1992). Mestrado em Parasitologia, pelo ICB, Universidade de São Paulo (1995) e doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) (ICB-USP, 2000). Pós-doutorado pela Case Western Reserve University (Cleveland-OH) (2002), e pela Johns Hopkins School of Public Health (Johns Hopkins University) (Baltimore-MD) (2005). Tem experiência na área de Parasitologia e Epidemiologia de doenças transmitidas por vetores, atuando principalmente nos seguintes temas: ecologia e biologia molecular de vetores, marcadores moleculares em entomologia, controles alternativos de vetores. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Mauro Toledo Marrelli
Nome em citações bibliográficas	MARRELLI, M. T.;MARRELLI, MAURO TOLEDO;MARRELLI, MAURO;Marrelli, MT;Marrelli, Mauro Toledo;Marrelli, Mauro T.;MARRELLI, MAURO T.;MARRELLI, M.
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/6872138193111416
Orcid iD	https://orcid.org/0000-0002-0312-8777

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Av. Dr. Arnaldo 715 Cerqueira César 01246904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617922
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

1996 - 2000	Doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)pgbmq@icb.usp.br (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Anopheles oswaldoi (Diptera, Culicidae): Análise do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico e da susceptibilidade à infecção com Plasmodium vivax, Ano de obtenção: 2000. Orientador: Osvaldo Marinotti. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
1993 - 1995	Mestrado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)pgbmq@icb.usp.br (Conceito CAPES 7).