FLÁVIA VIRGINIO FONSECA

MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E BANCO DE DADOS NA INVESTIGAÇÃO DE PROBLEMAS BIOLÓGICOS EM CULICIDAE.

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

São Paulo
2018

FLÁVIA VIRGINIO FONSECA

MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E BANCO DE DADOS NA INVESTIGAÇÃO DE PROBLEMAS BIOLÓGICOS EM CULICIDAE.

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Lincoln Suesdek

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o Programa de Pós-Graduação.

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Virginio-Fonseca, Flávia
MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E BANCO DE DADOS NA INVESTIGAÇÃO DE PROBLEMAS BIOLÓGICOS EM CULICIDAE. / Flávia Virginio-Fonseca; orientador Lincoln Suesdek. -- São Paulo, 2018.
202 p.

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

1. Dimorfismo sexual. 2. Morfometria geométrica alar. 3. WingBank. 4. Espécies crípticas. 5. Subgrupo Strodei. I. Suesdek, Lincoln, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Flávia Virginio Fonseca

Título da Tese: Morfometria geométrica e banco de dados na investigação de problemas biológicos em Culicidae.

Orientador (a): Lincoln Suesdek

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

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

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

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

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

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

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

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **914/2017** referente ao projeto intitulado: "***Morfometria geométrica e banco de dados na investigação de problemas biológicos em Culicidae***" sob a responsabilidade de ***Flávia Virginio Fonseca*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Lincoln Suesdek,*** do Departamento de Parasitologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 27 de setembro de 2017.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR
Setor Bancário Norte (SBN), Quadra 2, Bloco L, Lote 06, Edifício Capes, 9° andar - Bairro Asa Norte, Brasília/DF, CEP 70040-020
Telefone: e Fax: @fax_unidade@ - www.capes.gov.br

DECLARAÇÃO

Processo nº 23038.001614/2016-52

Interessado: Coordenação de Programas de Indução e Inovação

Declaramos para os devidos fins que **Flávia Virginio Fonseca** CPF: **071.004.849-10,** foi contemplada com uma bolsa da modalidade Doutorado, sob supervisão do Professor Doutor Lincoln Suesdek, no âmbito do projeto intitulado *"Elaboração de dados morfológicos de asas de culicídeos de interesse médico"*, Edital Parasitologia Básica nº 032/2010, por 48 (quarenta e oito) meses, com início da concessão em outubro de 2012 e término em setembro de 2016.

Documento assinado eletronicamente por **Julio Cesar Piffero de Siqueira**, **Analista em Ciência e Tecnologia**, em 13/09/2017, às 09:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 25, inciso II, da Portaria nº 01/2016 da Capes.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.capes.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0514651** e o código CRC **9E630BD0**.

Referência: Processo nº 23038.001614/2016-52 SEI nº 0514651

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE APERFEIÇOAMENTO DE ENSINO

C E R T I F I C A D O

A Comissão Central do PROGRAMA DE APERFEIÇOAMENTO DE ENSINO da Universidade de São Paulo, instituída pela Portaria GR-3588, de 10/05/2005, modificada pelas Portarias GR-4391, de 03/09/2009 e GR-4601, de 19/11/2009, C E R T I F I C A que

Flavia Virgínio Fonseca

aluno(a) de pós-graduação, nível **Doutorado**, na área de **Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro**, do Instituto de Ciências Biomédicas, realizou estágio, com carga horária semanal de 06 horas, durante o 2º. Semestre de 2013, tendo desenvolvido atividades didáticas junto à(s) disciplina(s) **BMP0219 - Parasitologia Básica**, do Departamento de **Parasitologia**, do Instituto de Ciências Biomédicas, aos alunos de graduação, sob supervisão do(a) Prof(a). Dr(a). **Margareth de Lara Capurro Guimarães**.

São Paulo, 29 de junho de 2015.

Luiz Roberto Giorgetti de Britto
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

As minhas famílias e amigos com amor e gratidão por toda compreensão, carinho e incansável apoio durante estes anos de Doutoramento.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus genes pela oportunidade de ter nascido e vivido para poder defender minha tese de Doutorado.

Às minhas famílias, por todo apoio, confiança e amor. Em especial à minha mãe, Vanderléia, meu pai, Flávio, e minhas avós Nialva e Neuza, pelo constante incentivo, preocupação e, sobretudo, amor incondicional. Ao meu esposo Joel, por ser meu porto seguro, pela compreensão, apoio, carinho, amor e companhia constantes. Aos meus amigos, desde as melhores amigas de infância, passando pelos adquiridos durante a graduação, até os mais recentes, pela compreensão e contínuo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lincoln Suesdek, por aceitar-me como orientanda, acolher-me e dar-me liberdade para desenvolver minhas ideias, por mais arriscadas que elas parecessem ser. Pela importante contribuição em minha formação acadêmica, profissional e humana. Pelo apoio, orientação e amizade durante os mais de cinco anos de convivência.

Aos demais doutores: Leandro Monteiro, Christian Klingenberg e Jean-Pierre Dujardin, por todo ensinamento transmitido a mim sobre morfometria geométrica. À Raquel Souza e à Michelle Pedrosa, por darem-me a oportunidade de transmitir todo esse conhecimento que obtive.

Aos amigos da Universidade de São Paulo (USP) e/ou do Instituto Butantan (IBu): Sandra Nagaki (Sandrinha), Eduardo Kuwabara (Edu), Paloma Vidal (Palominha), Vivian Petersen (Vivi), Fábio de Almeida (Fio), Camila Lorenz (Cá), Fernanda Almeida (Fer), Felipe Gomes (Felipão) e Antônio (Seu Toninho), pelas divertidas viagens a Frutal-MG. Por colaborarem dias e noites com a coleta dos espécimes que fazem parte deste trabalho. A todos os fazendeiros, donos de chácaras e funcionários que permitiram nossa entrada em seus terrenos para coleta de insetos, pelas boas conversas e troca de experiência.

À Prof[a]. Dra. Maria Anice Mureb Sallum e à técnica Tatiane Porangaba de Oliveira (Tati), por todo apoio, paciência e ensinamento sobre as técnicas de biologia molecular. E a todos os demais amigos da FSP-USP: Denise Sant'ana, Ivy Luizi de Sá, Sandrinha e Bruna Demari (Bru), pelo carinho, amizade e companhia em diferentes congressos.

Ao biólogo e taxonomista Aristides Fernandes (Ari), pela identificação taxonômica de tantos mosquitos e à técnica Fer, pela dissecção e montagem de tantas lâminas. São poucos os que possuem a qualidade profissional de vocês.

Aos membros da minha banca de qualificação: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, Prof[a]. Dra. Denise Selivon Scheepmaker e Prof[a]. Dra. Maria Anice Mureb Sallum, pelas sugestões.

À Prof[a]. Dra. Kelly Rosa Braghetto, pelos ensinamentos sobre álgebra relacional, modelagem de banco de dados, sistema de gerenciamento de dados e linguagem SQL. Por prontamente receber-me tantas vezes para discutirmos sobre

minha modelagem e minha tese. Pela paciência, disposição, colaboração e apoio durante o desenvolvimento e implementação do *WingBank*.

À equipe de criação e implementação do *WingBank*, a qual tive a honra de compor e coordenar. À técnica de apoio Karina Zanatta, pela ajuda durante a triagem de mais de 13 mil registros; à técnica do LECZ-IBu Gabrielle de Andrade, por toda ajuda durante o tombamento dos laminários; ao desenvolvedor e colaborador Victor Domingues, por toda paciência e capricho na implementação do *WingBank*; ao arquiteto de sistemas da Infraestrutura de Tecnologia da Informação do IBu, Lucas Miranda, por toda paciência, ensinamento, colaboração e apoio durante o desenvolvimento e implementação do *WingBank*.

A toda equipe do Laboratório de Parasitologia do IBu (Entomologia e Malacologia), pela amizade e incentivo. A todos do grupo de pesquisa MosquitoLab, que durante muitos anos foram minha segunda família, pela troca de experiência e horas de conversa, por ouvirem meus desabafos, por entenderem meu ponto de vista, por concordarem e discordarem de mim. Por todo o aprendizado. Pela doação de parte do material que compõem o estudo de dimorfismo sexual alar em mosquitos e o *WingBank*. Ao Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT-IBu) e tantos outros núcleos do IBu que estão envolvidos na institucionalização do *WingBank*.

A todos os funcionários do Departamento de Parasitologia (ICB-USP), bem como ao Programa de Pós-Graduação Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, por todo apoio e esclarecimento de dúvidas referentes ao programa.

À Paloma, Camila e Vivian pelas belíssimas colaborações científicas, amizade e companhia em congressos nacionais e internacionais. Ao Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti-Neto (Chico), Breno Aguiar e Thiago de Azevedo, pela bela amizade e belos trabalhos publicados, frutos de uma colaboração científica espetacular.

A todos os meus professores da Unisul, principalmente minha orientadora de Iniciação Científica, Prof[a]. Dra. Josiane Somariva Prophiro, por apresentar-me e fascinar-me com a ciência.

À Luciana Mônaco, Fernanda Ricci, Karen Teixeira (NDC-IBu) e Sabrina Acosta (LEHC-IBu), por acreditarem em meu potencial e contribuição na interface Ciência-Educação, e pelos belos frutos que já começamos a colher. À Natália Pasternak Taschner e Luiz Almeida (ICB-USP), Paulo Monteiro (LEHC-IBu), Adriano Oliveira e Gláucia Colli Inglez (Museu de Microbiologia-IBu), Cintia Lucci, Hélia Figueiredo de Araújo e André Martins (Comunicações-IBu), por acreditarem em meu interesse e paixão pela divulgação científica, uma nova área que entrou em minha vida durante o Doutorado e que provavelmente nunca sairá.

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

A vocês, meu muito obrigada!

Este trabalho foi majoritariamente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Processo 23038.005.274/2011-24 (Auxílio: 1275/2011). O estudo sobre dimorfismo sexual alar de mosquitos[†] o qual é apresentado como parte desta tese, em particular, contou com auxílio adicional da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processos 2010/15039-1 e 2006/02622-5.

[†] Virginio, F.; Vidal, P. O; e Suesdek, L. (2015). *Wing sexual dimorphism of pathogen-vector culicids. Parasites and Vectors* 8(1): 159–167. http://doi.org/10.1186/s13071-015-0769-6. Autorização de reprodução (Anexo B).

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

Tenzin Gyatso (14º Dalai Lama), em O Livro de Dias, Sextante

RESUMO

Virginio-Fonseca, F. Morfometria geométrica e banco de dados na investigação de problemas biológicos em Culicidae. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2018.

Enquanto muitas espécies de mosquitos são conhecidas por sua importância epidemiológica, a capacidade vetorial de algumas ainda não é clara. A identificação taxonômica, bem como a sexagem dos espécimes de Culicidae são essenciais para qualquer estudo ou ação, entretanto muitas vezes caracteres-chave estão danificados ou são restritos a uma fase de vida do animal. Em espécies crípticas, a identificação dos espécimes também pode ser prejudicada, o que dificulta, sobretudo, a compreensão da atividade vetorial em mosquitos. A morfometria geométrica alar, uma técnica barata e precisa para identificação de sutis dissimilaridades morfológicas, pode contribuir para a resolução destes tipos de problemas. O grupo de pesquisa MosquitoLab aplica esta técnica há mais de 10 anos e acumulou milhares imagens de asas com seus respectivos metadados. Estas informações, se organizadas como banco de dados relacional, podem permitir a sistematização do uso, consulta e armazenamento dos dados, além de viabilizar novos estudos e servir também como base para aplicações de identificação automática de mosquitos. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a utilidade da morfometria geométrica alar para a resolução de dois problemas biológicos: dimorfismo sexual e espécies crípticas, e desenvolver um protótipo de plataforma para armazenamento de dados biológicos relacionados à morfometria de asa, por meio de um banco de dados relacional e um sistema *web* nomeado "*WingBank*". Com base na técnica de morfometria geométrica alar, dois estudos de caso foram realizados: a) avaliação do dimorfismo sexual de 10 espécies de mosquitos de interesse médico e, b) diferenciação morfológica alar de *Anopheles strodei s.s.* e *Anopheles arthuri s.l.* com base em dois diferentes conjuntos de pontos anatômicos. Para construção do protótipo do *WingBank* uma equipe multidisciplinar realizou levantamento de requisitos, modelagem e criação do banco de dados relacional, e implementação de uma plataforma *web*. Os resultados referentes ao dimorfismo sexual alar apresentaram significativa diferenciação entre os sexos e padrões específicos de forma alar em todas as espécies estudadas. Os pontos anatômicos alares mais variáveis foram os das regiões proximal e distal das veias mediana e radial. Fêmeas apresentaram asas significativamente mais largas e curtas do que os machos. Diferenciação morfológica alar entre as espécies crípticas avaliadas foi observada em ambos os conjuntos de dados (18 e 22 pontos), sendo que no conjunto de 22 pontos com alometria, foi mais evidente. Os pontos anatômicos mais variáveis nas análises com os conjuntos de 18 e 22 pontos foram 1, 2 e 17, e 1, 2, 19, respectivamente. Finalmente, o protótipo *WingBank* foi implementado com dados referentes a 77 espécies pertencentes a 15 gêneros de Culicidae. Ao todo foram catalogados 13.287 registros de asas, dos quais 2.138 já estão disponibilizados a partir do presente trabalho, para uso de terceiros. Globalmente, este é o maior banco de dados de asas de Culicidae de que temos conhecimento.

Palavras-chave: Dimorfismo sexual. Subgrupo Strodei. Espécies crípticas. Identificação taxonômica. Morfometria geométrica alar. *WingBank*.

ABSTRACT

Virginio-Fonseca, F. Geometric morphometry and database in the investigation of biological problems in Culicidae. [Ph. D. Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

While many species of mosquitoes are known for their epidemiological importance, the vector capacity of some is still unclear. Taxonomic identification and sexing of Culicidae specimens are essential for any study or action; however, often key characters are damaged or restricted to a stage of life of the animal. In cryptic species, the identification of specimens can also be damaged, which makes it difficult to understand the vector activity in mosquitoes. Geometric morphometry, an cheap and precise technique for identifying subtle morphological dissimilarities, may contribute to the resolution of these types of problems. The MosquitoLab research group has applied this technique for more than 10 years and has accumulated thousands of wing images with their metadata. This information, if organized as a relational database, may allow the systematization of the use, consultation and storage of the data, besides making possible new studies and also serve as a basis for applications of automatic identification of mosquitoes. Therefore, the aims of this work were to evaluate the usefulness of the geometric morphometry to solve two biological problems: sexual dimorphism and cryptic species, and to develop a prototype of plataform for the storage of biological data related to wing morphometry, by means of a relational database and a *web* system named "*WingBank*". Based on the technique of wing geometric morphometry, two case studies were carried out: a) evaluation of the sexual dimorphism of 10 species of mosquitoes of medical importance and b) wing morphological differentiation of *Anopheles strodei s.s.* and *Anopheles arthuri s.l.* based on two different sets of landmarks. In order to build the *WingBank* prototype a multidisciplinary team performed requirements survey, modeling and creation of the relational database, and implemented a *web* platform. The results regarding wing sexual dimorphism showed significant differentiation between the sexes and specific patterns of wing shape in all species studied. The most variable landmarks were those of the proximal and distal regions of the medial and radial veins. Females showed slightly and significantly wider and shorter wings than males. Wing morphological differentiation between *An. strodei* s.s. and *An. arthuri* s.l. was observed in both sets of data (18 and 22 landmarks), but in the set of 22 with allometry, it was more evident. The most variable landmarks in the analyzes with the sets of 18 and 22 landmarks were 1, 2 and 17, and 1, 2, 19, respectively. Finally, the *WingBank* prototype was implemented with data referring to 77 species belonging to 15 genera of Culicidae. In all, 13,287 wing records were cataloged, of which 2,138 are from the present work, already available for use by third parties. Globally, as far as we know, this is the largest database of Culicidae wings.

Keywords: Sexual dimorphism. Strodei Subgroup. Cryptic species. Taxonomic identification. Wing geometric morphometrics. *WingBank*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Compilado de cartazes referente a campanhas de combate à malária (1950-1960) e febre amarela (1970-1990) no Brasil. 24

Figura 2 – Árvore de *neighbor-joining* de sequências de ITS2 do Subgrupo Strodei.. 29

Figura 3 - Asa de mosquito do gênero *Culex*, com 18 pontos anatômicos anotados. 32

Figura 4 - A) Asa direita de fêmea de *Culex nigripalpus*; B) Asa esquerda de fêmea de *Anopheles strodei s.s.* 33

Figura 5 - Passos iniciais de registro de dados do MosquitoLab. 40

Figura 6 - Asas montadas entre lâmina e lamínula, identificação não-padronizada. 41

Figura 7 - Bancos de Dados registrados apresentados no re3data (www.re3data.org), separado por área.....43

Figura 8 - Esquema DER para um banco de dados hipotético. 48

Figura 9 - Representação de especialização sobreposta 49

Figura 10 - Passo a passo da montagem e tomada fotográfica das asas.....55

Figura 11 - Asa direita *de Anopheles arthuri s. l.* com: A) 18 e B) 22 pontos anatômicos anotados. 68

Figura 12 - Diagrama geral da plataforma *WingBank* e abstração dos dados, baseado em seis tópicos principais: Origem, Imagem da Asa, Controle Interno, Classificação Taxonômica, Método de Classificação e Pessoa Responsável...71

Figura 13 - Representação do Projeto Conceitual do *WingBank* por meio de um Diagrama Entidade-Relacionamento (DER) Estendido. 72

Figura 14 - Representação do Modelo Lógico (modelo de dados relacional) do *WingBank*.. 76

Figura 15 - Caso de Uso para o sistema de busca da plataforma *WingBank*.....80

Figura 16 - Caso de Atividade para o sistema de busca da plataforma *WingBank*.....81

Figura 17 - Diagramas de comparação entre a forma da asa de fêmeas (vermelho) e machos (azul) com base na primeira variável canônica.....84

Figura 18 - Extremos de diferenciação intraespecífico.....85

Figura 19 - Diagrama de similaridade (separadamente para machos e fêmeas) com base nos valores de distância de Mahalanobis.. 86

Figura 20 - Estatística descritiva do tamanho do centroide das asas (em mm) de machos e fêmeas de diferentes espécies.....89

Figura 21 - Razão entre médias do tamanho do centroide de fêmeas e machos para cada espécie.....90

Figura 22 - Morfoespaço de variáveis canônicas mais representativas entre os quatro grupos amostrados, representando que o dimorfismo sexual em ambas as espécies, é maior que a própria assimetria.. 92

Figura 23 - Amostra do resultado do alinhamento de 120 sequências para a busca de sítios diagnósticos entre *An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.* 96

Figura 24 - Dendrograma Neighbor-joining evidenciando as relações entre de 18 espécimes pertencentes a 13 espécies do Subgênero Nyssorhynchus, baseado em sequências de ITS2 97

Figura 25 - Representação de quantidade de grupo provável dentro de *An. arthuri s.l.* com 18 pontos anatômicos.. 98

Figura 26 – Representação de quantidade de grupo provável dentro de *An. arthuri s.l.* com 22 pontos anatômicos.. 98

Figura 27 - Representação da variação entre os dois grupos (*An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.*) de acordo com a análise de Componentes Principais e extremos de diferenciação com A) 18 e B) 22 pontos anatômicos.....99

Figura 28 - Representação da variação da forma alar (consensos) com 18 pontos anatômicos de *An. strodei* s.s. e *An. arthuri* s.l. após sobreposição de Procrustes. Asas alinhadas pelo ponto 1.....100

Figura 29 - Representação da variação da forma alar (consensos) com 22 pontos anatômicos de *An. strodei* s.s. e *An. arthuri* s.l. após sobreposição de

Procrustes. Asas alinhadas pelo ponto 1. Extremo de diferenciação ao longo do CP1. 100

Figura 30 - Representação da variação entre os dois grupos (*An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.)* de acordo com a análise de variáveis canônicas, com 18 pontos anatômicos.. 101

Figura 31 - Representação da variação entre os dois grupos (*An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.*) de acordo com a análise de variáveis canônicas, com 22 pontos anatômicos.. 102

Figura 32 - Representação gráfica da diferença entre o tamanho do centroide (em mm) de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.,* com 18 pontos anatômicos anotados.. 103

Figura 33 - Representação gráfica da diferença entre o tamanho do centroide (em mm) de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.,* como 22 pontos anatômicos anotados.. 104

Figura 34 - *Layout* do *WingBank* demonstrando a interface de busca simples. 111

Figura 35 - *Layout* do *WingBank* demonstrando a interface de busca avançada. Detalhe para o sistema de busca "Taxonomic Identification".. 112

Figura 36 - *Layout* do *WingBank* demonstrando a interface de devolução do resultado ao usuário.. 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de bancos de dados biológicos 44

Tabela 2 - Comparativo entre diferentes restrições de cardinalidade / participação e suas representações no diagrama relacional, de acordo com a notação "pé de galinha" de Everest [173]. 50

Tabela 3 - Detalhamento das configurações das imagens utilizadas em cada estudo.....55

Tabela 4 - Dados sobre as espécies de Culicidae coletadas 58

Tabela 5 - Informações referentes à caracterização morfométrica e à validação taxonômica (tradicional e molecular) das espécies pertencentes ao Subgrupo Strodei 61

Tabela 6 - Descritivo dos domínios do atributo *Name* da entidade *AreaType.* ..74

Tabela 7 - Diferenciação fenética entre os sexos de cada espécie: valores do teste de reclassificação após validação, resíduos alométricos, e distâncias de Mahalanobis e suas respectivas significâncias estatísticas. 85

Tabela 8 - Diferenciação fenética entre *An. strodei s.s*. e *An. arthuri s.l.* 101

Tabela 9 - Relação de publicações e dados disponíveis no *WingBank* para uso por terceiros. 106

Tabela 10 - Relação de gêneros e espécies armazenadas no *WingBank* 108

Tabela 12 - Novos códigos dos materiais do MosquitoLab 109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACP	Análise de Componentes Principais
AVC	Análise de Variáveis Canônicas
DNA	do inglês *DeoxyriboNucleic Acid*
DMSO	Dimetil sulfóxido
BD	Banco de Dados
BDR	Banco de Dados Relacional
CP	Componente Principal
DDD	do inglês *Domain-Drive Design*
DDL	do inglês *Data Definition Language*
DER	Diagrama Entidade-Relacionamento
dM	Distância de Mahalanobis
DML	do inglês *Data Manipulation Language*
dNTP	do inglês *deoxyriboNucleic-Three Phosphate*
dP	Distância de Procrustes
DPI	do inglês Dot per Inch
DQL	do inglês *Data Query Language*
DS	Dimorfismo Sexual
DSF	Dimorfismo Sexual de Forma
DSFA	Dimorfismo Sexual de Forma Alar
DST	Dimorfismo Sexual de Tamanho
DSTA	Dimorfismo Sexual de Tamanho Alar
GE	do inglês *General Electric*
ITS2	do inglês *Internal Transcribed Spacer 2*
LECZ	Laboratório Especial de Coleções Zoológicas
MER	Modelo Entidade-Relacionamento
MG	Morfometria Geométrica
MGA	Morfometria Geométrica Alar
MVC	Modelo-Visão-Controlador
PA	Pontos Anatômicos
Pb	Pares de base de DNA
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PEG	PoliEtilenoGlicol
Sephadex	Do inglês *Separation Pharmacia Dextran*
SGBD	Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados
Sp	Sobreposição de Procrustes
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TC	Tamanho do centroide
UVP	Ultravioleta Pulsada

LISTA DE SÍMBOLOS

M	Molar
Ml	Microlitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
Nm	Newton-metro
U	Unidade
µl	Microlitro
V	Volts
Hz	Hertz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
1.1 A importância epidemiológica da família Culicidae 22
1.2 Importância da identificação de espécies crípticas na Família Culicidae 27
1.3 A utilidade da morfometria geométrica como técnica e de asas como instrumento para a resolução de problemas biológicos 30
1.3.1 A morfometria geométrica alar em estudos de dimorfismo sexual em Culicidae 34
1.3.2 A morfometria geométrica alar no diagnóstico de espécies crípticas em Culicidae 36
1.4 A importância do uso de banco de dados e sua relação com morfometria geométrica alar de mosquitos 37
1.4.1 Importância local e global do WingBank 38
1.5 Conceitos básicos em Banco de Dados 44
1.5.1 Criação de um Banco de Dados Relacional 46
1.5.2 Implementação de um sistema com acesso a Banco de Dados Relacional 51
2 OBJETIVOS 53
2.1 Objetivos gerais 53
2.2 Objetivos específicos 53
3 MATERIAIS E MÉTODOS 54
3.1 Considerações gerais sobre a taxonomia adotada 54
3.2 Considerações gerais sobre coleta de espécimes de Culicidae e uso da técnica de morfometria geométrica 54
3.3 Avaliação do dimorfismo sexual alar em Culicidae, por meio da morfometria geométrica 58
3.4 Diagnóstico de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.* Subgrupo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)*, por meio da morfometria geométrica alar 59
3.4.1 Coleta e identificação taxonômica tradicional 59
3.4.2 Identificação por taxonomia molecular 59
3.4.2.1 Extração de DNA 60
3.4.2.2 Amplificação e purificação da região do ITS2 65
3.4.2.3 Eletroforese em gel de agarose 66
3.4.2.4Sequenciamento 66
3.4.2.5 Comparativo e validação das sequências 66
3.4.2.6 Morfometria geométrica alar 67
3.5 Modelagem e Implementação do Banco de Dados Relacional do *WingBank* 68
3.5.1 Equipe de desenvolvimento 69
3.5.2 Levantamento de requisitos 70
3.5.3 Projeto Conceitual 71
3.5.4 Projeto Lógico 75
3.5.5Projeto Físico 77

3.5.6 Implementação do WingBank ***77***
3.5.6.1 Criação do *WingBank* 77
3.5.6.2 Carga dos dados pré-existentes 77
3.5.6.3 Desenvolvimento do sistema *web* 78
3.5.7 Padronização da rotulação das imagens ***82***
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **83**
4.1 Avaliação do dimorfismo sexual alar em Culicidae, por meio da morfometria geométrica **83**
4.2 Diagnóstico de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.* do Subgrupo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)*, por meio da morfometria geométrica alar e validado por meio de técnica de DNA recombinante **93**
4.3 *WingBank*: um banco de dados de imagens alares de mosquitos **105**
5 CONCLUSÕES **115**
5.1 Principais Conclusões **115**
5.2 Conclusões adicionais **116**
6 PERSPECTIVAS **118**
REFERÊNCIAS ***119***
APÊNDICES **139**
A - Alinhamento das sequências de ITS2 **139**
B - Dicionário de dados - *WingBank* ***176***
C - Termo de uso - *WingBank* ***184***
D - Artigos científicos publicados em periódicos durante o doutorado **188**
ANEXOS **190**
A - Autorização para atividades com finalidade científica *Coleta de Mosquitos) - SISBio (2012-2014) **190**
B - Autorização de uso de artigo científico (na íntegra) em Tese **199**

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância epidemiológica da família Culicidae

As doenças cujos agentes etiológicos dispersam-se por vetores, como os mosquitos, são um dos maiores problemas de saúde pública mundial há séculos. Estas doenças, entre os séculos 17 e 20, causaram a morte de mais pessoas do que todas as outras causas combinadas [1], impediram o desenvolvimento de grandes áreas do trópico como a África [1, 2], foram temas de cartas trocadas entre Dom Pedro II e Pasteur [3, 4] e também prejudicaram obras como a construção do Canal do Panamá, a qual só pode ser concluída após medidas de controles [1, 2, 5].

A família Culicidae representa um importante grupo de insetos composto por diversas espécies vetoras de patógenos causadores de doenças. Dentre eles podemos citar vírus, filárias e plasmódios. Desde 1877, quando o papel dos mosquitos como vetores de filárias de humano para humano foi registrado por Patrick Mason, descobriu-se também, em anos seguintes, que malária, febre amarela e dengue tinham ciclos de transmissão similares [2]. A partir de então, uma sequência histórica foi registrada.

Apesar de, em 1854, Louis D. Beauperthuy [5] ter levantado pela primeira vez a hipótese de que a febre amarela poderia ser transmitida por mosquitos, e, em 1881, Carlos Juan Finlay [6] ter apresentado pela primeira vez em um congresso que o vetor do vírus da febre amarela era um mosquito, apenas em 1900, em Cuba, iniciou-se a primeira pesquisa oficial coordenada por Walter Reed [7], a qual testou esta hipótese. No Brasil, mesmo após as comprovações feitas pelos demais pesquisadores estrangeiros, havia resistência quanto ao meio de transmissão da febre amarela. Devido a isso, em 1902 Emílio Ribas e Adolfo Lutz decidiram realizar experimentos complementares no país [8]. Praticamente em paralelo aos acontecimentos relacionados à febre amarela, iniciavam-se os estudos sobre outra doença de similar importância para o Brasil e o mundo, a malária. Em 1897, Ronald Ross confirmou a hipótese de Laveran e Manson de que os mosquitos tinham relação com a transmissão da malária [9, 10].

Apenas a partir de 1900, a efetividade dos controles vetoriais começa a surgir, primeiramente em Cuba com o controle da febre amarela, seguido por Panamá, o qual erradicou a febre amarela e malária. O Brasil conseguiu a erradicação de

Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, 1762. em 1955, referendada oficialmente pela Organização Pan-Americana da Saúde em 1958. No entanto, este controle vetorial manteve-se apenas até 1970, quando esta mesma espécie foi reintroduzida no território brasileiro, onde se estabeleceu até os dias atuais [11]. Em 1938, o governo brasileiro conseguiu controlar a infestação e em seguida erradicar *Anopheles (Cellia) gambiae* s.l. Giles do Brasil, uma espécie invasora como *Ae. aegypti* e que estava envolvida com a transmissão de malária. Em 1954, o Brasil obteve sucesso no controle de malária (Figura 1), porém, em 1975, o problema voltou a preocupar [11], principalmente na região amazônica. Vale ressaltar que um estudo recente, demonstrou que entre 2007-2014, a região extra-amazônica apresentou um total de 6.092 casos [12], e que a taxa de mortalidade causada pela malária na região extra-Amazônica é maior que na região Amazônica [13].

O Brasil possui alguns exemplos de doenças relacionadas a mosquitos que causam grandes problemas de saúde pública, como dengue, febre amarela, zika e chikungunya, além das diversas doenças negligenciadas e subnotificadas. No entanto, malária ainda chama muita atenção no Brasil e no mundo [13]: Em 2014, cerca de 207 milhões de casos e 438 mil mortes relacionadas a ela foram registrados no mundo e, no Brasil os casos chegaram a aproximadamente 145 mil. Esta doença é causada por cerca de seis espécies de Plasmódios [14] e transmitida por pelo menos 60 espécies de *Anopheles* [15]. Estes dados são sempre preocupantes, pois além de ser um problema à saúde das pessoas, estas doenças têm um alto custo econômico e clínico para a sociedade [16-18].

Estudos recentes têm sugerido que mudanças climáticas e aquecimento global têm efeito direto no tamanho populacional, densidade e distribuição de vetores [19-21], e que vários fatores ambientais influenciam na distribuição, inclusive, de vírus negligenciados, como Oropouche, Mayaro, *Saint Louis* e Rocio, sendo que a temperatura é a determinante central em áreas de alto-risco [22]. O Brasil possui uma larga extensão de florestas e ecossistemas naturais, além de possuir grandes centros urbanos os quais concentram grande número de pessoas e mosquitos antropofílicos, como o *Ae. aegypti.* No entanto, ainda são poucos os estudos que envolvem fatores ambientais e estes tipos de doença.

Figura 1 - Compilado de cartazes referente a campanhas de combate à malária (1950-1960) e febre amarela (1970-1990) no Brasil. Fonte: Coleção Cartazes de Campanha de Saúde. Acervo Museu de Saúde Pública Emílio Ribas / Instituto Butantan

O controle dessas doenças depende de muitos fatores, os quais o torna bastante complexo. A filariose linfática, desde a criação do Plano Nacional de Eliminação da filariose linfática no Brasil, em 1997, por recomendação do Conselho Nacional de Saúde, tem seus registros de casos diminuídos anos após anos [23]. A febre amarela urbana e dengue foram efetivamente controladas em grande parte

das Américas do Sul e Central e eliminadas da América do Norte (exceto na Venezuela, ilhas das Antilhas e Sul dos Estados Unidos).

A malária já esteve perto de ser erradicada nas Américas. No entanto, durante as últimas décadas, devido a mudanças tanto nas políticas públicas em saúde quanto mudanças sociais e demográficas, mudanças na genética dos patógenos, além da resistência a inseticidas e medicamentos, diversas doenças relacionadas aos mosquitos têm emergido ou reemergido [11]. Além disso, ao longo do tempo, pode-se também perceber que fatores como a urbanização acelerada favoreceram o surgimento e a disseminação de novas, e a reemergência ou manutenção de antigas doenças infecto-parasitárias [24].

Apenas no ano de 2016, ocorreram surtos de pelo menos seis arboviroses pelo mundo: febre do Vale do Rift, febre amarela, oropouche, chikungunya, Zika e dengue [25], sendo que destes vírus, pelo menos cinco circulam atualmente no Brasil. Além disso, ocorreram reemergência de uma doença já conhecida pelos brasileiros, a febre amarela [26] e emergência de chikungunya e zika (263.598 e 211.770 casos prováveis em 2016, respectivamente) [27]. Devido à importância e influência que essas doenças possuem, é imprescindível estudá-las, incluindo o envolvimento das mais diversas espécies de mosquitos na dinâmica de suas transmissões [16].

Mais de 3.500 espécies de culicídeos já foram descritas no mundo [28], dentre as quais dezenas possuem relação comprovada na transmissão de agentes etiológicos ou apresentam alguma característica de interesse médico-veterinário [29], enquanto outras dezenas ainda necessitam de estudos referentes às suas capacidades e competências vetoriais.

Em 2007, o Brasil foi considerado o país com a maior riqueza de espécies de mosquitos (447 espécies), apresentando também um dos maiores números de espécies endêmicas [30]. Atualmente, no território brasileiro há cerca de 500 espécies (https://www.mosquitocatalog.org) de mosquitos tanto silvestres quanto urbanas. A família Culicidae é responsável por grande impacto à saúde pública no Brasil e em muitos países. Esta família alberga duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae, sendo que a última congrega o maior número de representantes. Os gêneros *Anopheles, Aedes e Culex* estão entre os que possuem maior importância médica-veterinária [31].

Fêmeas da espécie *Ae. aegypti* atuam como vetores de diferentes agentes patogênicos aos seres humanos e outros vertebrados, dentre eles os vírus Dengue 1, 2, 3 e 4, Zika, Chikungunya e da Febre Amarela, além de também poderem transmitir microfilárias em áreas urbanas [32-34]. Mosquitos pertencentes a outras espécies do gênero *Aedes,* como *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 e *Aedes (Georgecraigius) fluviatilis* Lutz, 1904, são capazes de se infectar a nível laboratorial com o vírus da Febre Amarela [35-36] entre outros vírus [37-40], enquanto que um espécime de *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* Rondani, 1848, já foi encontrado naturalmente infectado com o vírus da febre amarela [41]. No entanto, atualmente os vetores brasileiros do vírus da febre amarela que chamam atenção são os dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, considerando que apenas o ciclo silvestre está ocorrendo [42], o que não justifica a negligência da espécie *Ae. aegypti* perante a transmissão urbana desta doença. Mosquitos do gênero *Culex* podem transmitir microfilárias e vírus como o do Nilo Ocidental e o do Vale do Rift, participar da transmissão da encefalite japonesa [43-45] e, como recentemente descoberto, mosquitos da espécie *Culex quinquefasciatus* Say 1823 possivelmente também possuem competência vetorial para Zika [46].

Particularmente no Brasil, a malária pode ser dividida em malária amazônica e malária extra-amazônica (ou bromélia-malária). Estas subdivisões são baseadas principalmente na dinâmica de transmissão de cada área: na região amazônica em geral, os integrantes da espécie *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926, são considerados vetores primários [48], salvo em alguns municípios como Macapá, onde a espécie *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* Galvão e Damasceno assume esta posição epidemiológica [49, 50], enquanto que na extra-amazônica, o principal vetor é *Anopheles* (*Kerteszia) cruzii* Dyar e Knab [51-53]. Em algumas outras áreas específicas, *An. darlingi* e *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* Curry são incriminados como vetores de malária, como é o caso de Espírito Santo. Integrantes deste mesmo gênero também podem transmitir outros parasitas, geralmente em áreas rurais, como microfilárias [54-56].

No Brasil, principalmente devido à urbanização acompanhada pelo desmatamento, e também devido à reintrodução da espécie exótica *Ae. aegypti*, o país vem sendo marcado por diversas epidemias de doenças relacionadas a mosquitos. Esta espécie é uma das quais são amplamente conhecidas por sua importância primária na epidemia de diversas doenças, é uma das espécies

invasoras mais bem-sucedida no mundo, além de atualmente ser uma das espécies mais relevantes no território brasileiro [57-58]. No entanto, esta não é a única que possui importância epidemiológica. Muitas outras desempenham ou podem desempenhar papel importante na dinâmica vetorial destas doenças (ver páginas 107 e 108), porém ainda são pouco ou nada estudadas.

É cada vez mais frequente o reconhecimento da importância de diversas outras espécies (até então negligenciadas) na transmissão de agentes etiológicos relacionados a estas doenças. Desse modo, destaca-se também a importância da investigação da capacidade e competência vetoriais em mosquitos potencialmente vetores, principalmente urbanos, os quais coexistem com a grande quantidade de humanos, o que favorece a rápida dispersão de uma epidemia.

Outro fator importante a ser considerado, o qual é impactante na obtenção do conhecimento sobre a capacidade e competência vetorial dos mosquitos, é a existência de complexos de espécies crípticas, as quais podem viver ou não em simpatria. Espécies próximas e/ou que fazem parte de complexos de espécies em *Anopheles* e que são vetoras de plasmódios, costumam ser encontradas em simpatria, como: *Anopheles cruzii* e *Anopheles homunculus* Komp no sudeste do Brasil [60, 61] e complexo *Anopheles gambiae* na África [62].

Além disso, as fêmeas possuem grande importância epidemiológica, pois são as únicas que se alimentam de sangue e podem então, transmitir patógenos aos animais. Enquanto que os machos desempenham outros papéis de importância equivalente, e são extremamente importantes para as estratégias de controle vetorial. Sendo assim, a sexagem correta dos mosquitos torna-se essencial para qualquer estudo.

1.2 Importância da identificação de espécies crípticas na Família Culicidae

O subgênero *Nyssorhynchus* é conhecido por abranger espécies de difícil identificação morfológica tanto entre fêmeas [63, 64], quanto entre machos [65]. Segundo Sallum [66], este subgênero é difícil de identificar utilizando apenas a morfologia, pois existem poucas diferenças nos caracteres externos. Assim, o esclarecimento morfológico desse grupo poderia, então, aumentar a eficiência no controle epidemiológico destes vetores. O Subgrupo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)* possui espécies crípticas ainda pouco estudadas [66-71], e essa

falta de conhecimento pode dificultar a incriminação precisa dos vetores, como é o caso de *An. Strodei,* que já foi incriminado como vetor de malária [19, 72-74]. Porém, como é morfologicamente muito similar aos demais integrantes do Subgrupo Strodei, até o momento não se sabe qual espécie é realmente incriminada como vetor [69]. Este Subgrupo é amplamente distribuído desde o Panamá até o sul da Argentina. *An. strodei s.l.* demonstra alta zoofilia (porcos e gado), no entanto ainda pouco se sabe sobre o hábito alimentar destes animais [75]. Paralelamente, estudos taxonômicos e ecológicos [70], também estão sendo desenvolvidos, a fim de compreender melhor a dinâmica deste Subgrupo.

Este Subgrupo atualmente compreende as espécies: *An. strodei, An. striatus, An. albertoi* e *An. arthuri*, a qual possui indícios de que é subdividida em outras espécies (atualmente consideradas como *An. arthuri* A-D) [69]. Em 1926, baseado em caracteres morfológicos de fêmeas, machos, 4º instar larval e pupa, de indivíduos coletados em Juiz de Fora - MG, Root descreveu *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* (Root, 1926). Em 1940, Unti descreveu a variedade *ramosi* Unti [76], com base em diferenças encontradas em 4º instar larval de indivíduos coletados em Lorena - SP. No ano seguinte, com base na morfologia de ovo, Unti [77] reconheceu as variedades *albertoi, arthuri, artigasi,* coletados em Rio Paraíba-SP, e a variedade *lloydi*, coletada no Panamá. No entanto, em 1980, Faran decidiu sinonimizar todas as variedades descritas por Unti 1940 e 1941 com *An. strodei.* Porém, recentemente, Sallum et al. [66], com base em morfologia externa do ovo, genitália masculina e os genes *white* e COI, removeu *An. strodei* variedades *albertoi* e *arthuri* da sinonímia e reconheceu-as como espécie válida, além de reconhecer também a presença de uma nova espécie, hoje denominada *An. striatus* [71].

São cada vez mais frequentes os avanços no desenvolvimento de ferramentas moleculares para a discriminação de espécies crípticas e/ou irmãs com alta precisão [78], inclusive para espécies que vivem em simpatria, como é o caso de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.*, no entanto elas ainda tem custo elevado e requerem treinamento especializado [79]. A taxonomia tradicional, inclusive, consegue resolver alguns casos, no entanto também são vários os problemas envolvidos com esta técnica: está cada vez mais escassa a existência de especialistas na área de taxonomia, e no caso de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.,* por exemplo, além de a diferenciação morfológica ser bastante sutil (ver tabela comparativa em Sant'Ana e Sallum, [71]), a maioria das estruturas são específicas de machos (o que limita a

identificação a 50% das amostras) e de ovos (o que necessita da submissão das fêmeas coletadas à oviposição).

Em 2004, Fritz caracterizou *An. strodei*, *Anopheles trinkae* Faran, 1979, *Anopheles rangeli* Gabaldón, Cova Garcia e Lopez, e *Anopheles triannulatus* (Neiva e Pinto), utilizando sequências do Espaçador Interno Transcrito 2 (em inglês *Internal Transcribed Spacer* 2, ITS2) e descreveu um protocolo para identificação molecular [80].

Recentemente, Bourke et al. [69], por meio de análises filogenéticas utilizando ITS2 e os genes COI e *white* de amostras pertencentes ao Subgrupo Strodei, provenientes de diferentes localidades brasileiras, percebeu que quando concatenados os três genes (COI, *white* e ITS2) apresentaram-se sete clados monofiléticos bem suportados, o que sugere que, além das espécies já previstas, *An. strodei*, *An. albertoi*, *An. arthuri* e CP Form (*An. striatus*), existem outras três espécies, as quais os autores consideraram "tipos" do que hoje é chamado de *An. arthuri s.l.* (nomeados, *a priori* como *An. arthuri* A-D) [69]. Aqueles mesmos autores perceberam que o gene ITS2 é suficiente para diferenciar *An. strodei* x *An. albertoi* x *An. arthuri* x CP Form (*An. striatus*) (Figura 2).

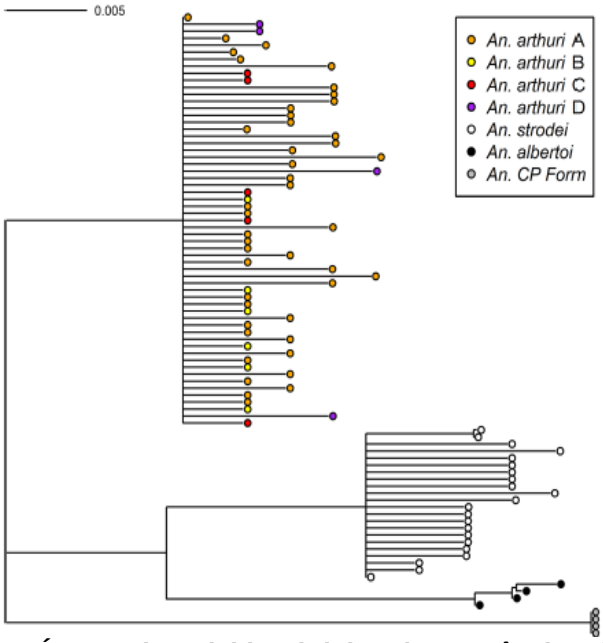

Figura 2 – Árvore de *neighbor-joining* de sequências de ITS2 do Subgrupo Strodei. Construída com distância Kimura-2-Parâmetros, suportada por 10.000 *bootstraps*. Todos os clados tiveram suporte maior que 70% (reproduzido de Bourke et al. [69]).

Embora as múltiplas cópias de DNA ribossomal evoluam em concerto [81] e, devido a isso, apresentem baixa variação intraespecífica ou intragenômica, não é incomum encontrar alta variação em artrópodes vetores [82-85]. Entretanto ainda é vantajoso utilizar o ITS2 (localizado entre os genes 5,8 S e 28 S do DNA ribossomal) como marcador taxonômico molecular, pois: a) a sequência completa deste espaçador já é conhecida em muitas espécies do subgênero *Nyssorhynchus*; b) existe uma importante e considerável variação interespecífica, c) ele ocorre em múltiplas cópias, o que aumenta a sensibilidade de amplificação [80]. O espaçador ITS2 já foi utilizado individualmente e em conjunto com outros genes para identificação/distinção de espécies crípticas e/ou irmãs de mosquitos do gênero *Anopheles* [88-92]. Como este espaçador não codifica proteínas e evolui rapidamente, ele tem sido escolhido, inclusive, como marcador para estudos populacionais [93-95]. Comprimentos típicos do ITS2 variam entre 350-500 pb, entretanto já foram observadas variações de tamanho próximas a 600 e 700 pb em *An. punctulatus* e *An. dirus*, respectivamente [86, 87].

Um dos problemas críticos na taxonomia de *Anopheles (Nyssorhynchus)* spp. é reconhecer fêmeas de espécies-irmãs que vivem em simpatria [96]. Como uma alternativa, em *Anopheles* e outros gêneros, diversas espécies que podem ocorrer em simpatria têm sido estudadas por meio da técnica de MGA, como: *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* [97], *An. cruzii* e *An. homunculus* [98], *Cx. coronator* e *Cx. usquatus*, *An. nuneztovari* e *Anopheles rangeli* [99], *An. benarrochi* B, *An. oswaldoi s.l.* e *Anopheles strodei* [100].

1.3 A utilidade da morfometria geométrica como técnica e de asas como instrumento para a resolução de problemas biológicos

Resultado da fusão entre geometria, biologia [101] e estatística [102], a MG permite o estudo multivariado da forma de estruturas biológicas em duas ou três dimensões espaciais. Esta técnica permite várias avaliações biométricas estatísticas e também a representação gráfica da forma e do tamanho, além de preservar a integridade física da forma e evitar o colapso em medidas lineares que não representam a estrutura como um todo [103]. Ela possui alto poder de resolução, uma vez que se baseia em análise de caracteres multivariados, o que permite a comparação simultânea de diferentes características em uma estrutura corporal

complexa [102, 104]. Por meio desta técnica se pode comparar órgãos biológicos muito similares, pode-se evidenciar assimetria, dimorfismo sexual (DS), evolução morfológica, entre outras variações imperceptíveis ao olho humano, mas descritíveis pelas ferramentas geométricas e estatísticas.

A MG tem sido extensivamente utilizada para resolver diferentes problemas biológicos. Em alguns casos, possui grande utilidade quando aplicada isoladamente; em outros, sua combinação com técnicas de biologia molecular ou de taxonomia integrativa pode aumentar sua precisão [105].

Em mosquitos, a asa é a estrutura mais utilizada, principalmente devido à sua bidimensionalidade, o que aumenta a precisão e a repetibilidade mesmo quando são montadas e digitalizadas por diferentes operadores [106]. Em geral, a forma da asa é bastante informativa [107], sobre questões tanto hereditárias, quanto geográficas e evolutivas. Alguns estudos têm indicado que em dípteros, o formato da asa é herdável [108], tem determinação poligênica e é minimamente influenciado por fatores epigenéticos [109-110]. Embora relatos indiquem que o formato da asa sofre alguma influência por diferença de temperatura e fatores eco-geográficos [111,112], essa influência é mínima [105]. Portanto, a forma da asa se apresenta como um caráter mais estável do que o tamanho da asa, o qual é fortemente influenciado pelo meio (fatores climáticos e ambientais como: densidade larval em um mesmo criadouro, disponibilidade de comida, temperatura, etc.) [112, 113], e variações neste caráter devem ser interpretadas com cautela.

Os pontos anatômicos (PA), também conhecidos como *landmarks*, podem ser de três tipos: I) justaposição de tecidos; II) pontos de máxima curvatura ou outros processos (saliências) morfogenéticos locais; e III) pontos extremos [101]. Na maioria dos estudos de morfometria geométrica alar (MGA), utilizam-se os PA do tipo I, o qual inclui pontos no espaço onde três estruturas se encontram, como é o caso das interseções entre as veias alares dos mosquitos (Figura 3). A anotação destes pontos gera uma matriz de dados composta por suas coordenadas cruas em um plano cartesiano, essenciais para as análises subsequentes. Além destes tipos de anotações, pode-se também avaliar semi pontos (*semi landmarks*) e contornos das estruturas [114, 115]. Uma das maiores vantagens da MG é a reconstituição gráfica da forma biológica original, o que é pouco viável com a morfometria tradicional. A partir destes dados, pode-se fazer diversas análises, como

comparação da magnitude das variações e estudos estatísticos diversos [102, 116, 117].

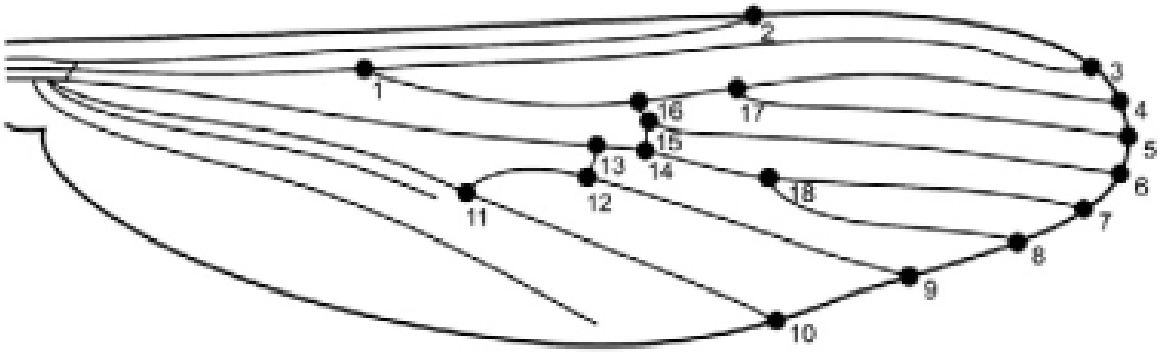

Figura 3 - Asa de mosquito do gênero *Culex*, com 18 pontos anatômicos anotados (reproduzido de Morais et al., [122]).

É importante também que os dados a serem utilizados nas análises sejam homólogos. Como existe uma sutil diferença anatômica entre as asas das subfamílias Culicinae e Anophelinae, caso haja interesse em compará-las, a tomada dos pontos deve ser padronizada como exemplificado na Figura 4. Ademais, Garros e Dujardin [79] sugerem que as resoluções (ou tamanhos) das imagens devem ser idênticas e, embora não exista uma regra, devem também ser a maior possível. Aqueles autores também aconselham que a escala de tamanho da imagem seja associada a cada imagem. Isso é importante, principalmente, para estudos relacionados ao tamanho isométrico das asas.

Particularmente em mosquitos, a quantidade de pontos anotados varia de 10 a 26, dependendo da escolha dos autores [105]. No entanto, a sequência de 18 pontos (Figuras 3 e 4), embora não seja um conjunto de dados universal, tem se mostrado suficiente para descrever DS [59, 118-121], variação intraespecífica [59, 110, 113, 119, 122-126] e interespecífica, inclusive entre espécies-irmãs, crípticas e/ou pertencentes a complexo de espécies [97, 98, 127, 128].

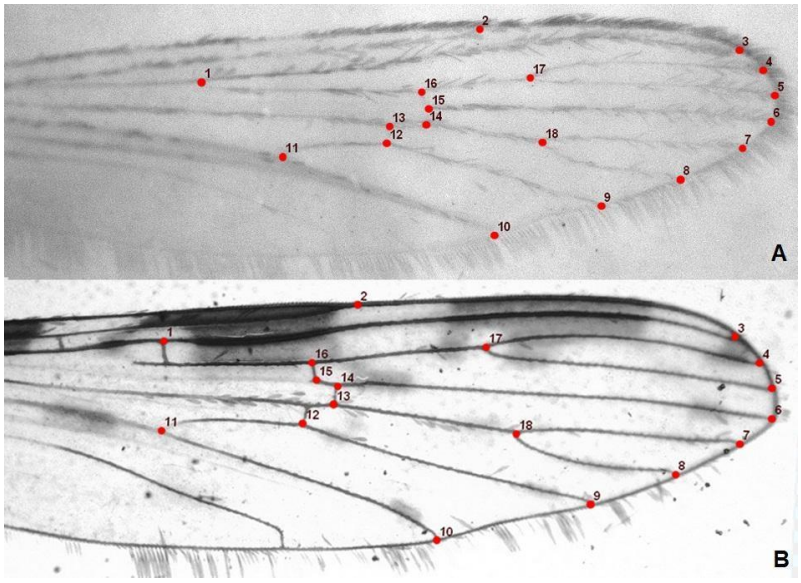

Figura 4 - A) Asa direita de fêmea de *Culex nigripalpus*; B) Asa esquerda de fêmea de *Anopheles strodei s.s.* Fotos: A) Paloma O. Vidal e B) Flávia Virginio

Em seu sentido estrito, a forma é a geometria de um objeto após a remoção da localização, orientação e tamanho [129]. Desse modo, quando objetiva-se analisar apenas a forma (sem descartar o efeito alométrico natural), a sobreposição de Procrustes (sP), uma das análises decorrentes da técnica de MG, elimina as variações artefatuais causadas justamente pela orientação, posição e pelo tamanho isométrico das asas [130]. As coordenadas residuais desta análise (também chamadas de *partial warps*) [131] são produzidas e seus componentes principais (também chamados de *relative warps*) podem ser comparados entre os grupos [132]. Já o tamanho da asa, de acordo com Dujardin [133], pode ser diretamente representado pelo tamanho do centroide (TC), o qual é formalmente representado pela raiz quadrada da soma das distâncias ao quadrado de todos os PAs até o centroide.

Caso o objetivo seja avaliar o tamanho e a forma alar isoladamente, a regressão multivariada da sP x TC deve ser adotada. Através desta análise, o efeito alométrico (efeito do tamanho isométrico sobre a forma) pode ser facilmente removido da análise, tornando possível a comparação entre as formas com mínima interferência dos diferentes tamanhos [134], além de possibilitar a avaliação do valor alométrico.

Preliminarmente pode-se também obter informações sobre a existência de padrões por meio da representação gráfica do conjunto de dados multivariados a ser analisado, como por exemplo, a Análise de Componentes Principais (ACP) [102] a partir da qual se pode perceber a relação entre as características mais relevantes das amostras.

Outra análise importante na MG é a análise discriminante que utiliza Variáveis Canônicas. Esta análise permite avaliar quantitativamente a dissimilaridade entre amostras. Para tal usa-se, por exemplo, a distância de Mahalanobis (dM). Adicionalmente, existe outra distância importante para as análises de MG, a distância de Procrustes (dP). Ambas as distâncias servem para estimar a dissimilaridade entre grupos num espaço multidimensional. A dM leva em consideração o quão incomuns são os indivíduos dentro de cada grupo, enquanto que a dP estima a distância entre os indivíduos de maneira mais generalizada e homogeneizada.

A assimetria é um fator importante o qual pode ser calculado por meio de ANOVA de Procrustes (Análise de Variância de Procrustes), a qual avalia as quantidades relativas de variação [135, 136] como, por exemplo, a diferenciação da asa direita em relação à asa esquerda.

1.3.1 A morfometria geométrica alar em estudos de dimorfismo sexual em Culicidae

Parte do conteúdo deste item está presente na publicação *"Wing sexual dimorphism of pathogen-vector culicids"* (DOI: http://doi.org/10.1186/s13071-015-0769-6, Virginio et al. [120]).

Tipicamente, o DS é classificado dicotomicamente em dimorfismo sexual de tamanho (DST) e dimorfismo sexual de forma (DSF). Entretanto, sabe-se também que existe uma interação entre o tamanho e a forma do corpo, o que podemos chamar de DS alométrico. Contudo, embora em alguns casos o DS aparente ser resultado da alometria [137], exemplos de DS também podem ser atribuídos puramente ao tamanho [138] ou à forma [139].

Durante décadas, o DS em animais tem sido investigado sob pontos de vista evolutivos e ecológicos. Cerca de 140 anos atrás, Darwin [140] hipotetizou que o DS poderia ser um elemento da seleção sexual, ou seja, processo pelo qual a manutenção evolutiva de traços específicos do sexo poderia ser conduzida pela

preferência do sexo oposto. Mesmo após quase um século e meio, a visão contemporânea sobre o DS, apesar de ter agregado novos dados empíricos, restrições e conceitos, ainda preserva a ideia subjacente por trás da hipótese de Darwin [141].

Insetos têm sido usados como modelos de estudos sobre DS para demonstrar que diferenças ligadas ao sexo podem ocorrer em vários órgãos, como olhos [142], pernas [143, 144] e cápsula cefálica [145]. Outras estruturas e características, como cerdas e antenas, tamanho do corpo, aparelhos bucais, genitália [146] e asas [118, 120, 121, 139] podem também ser observadas e utilizadas no processo de sexagem.

Em alguns grupos de insetos, o comportamento sexual, como som de cópula, pode depender da geometria das asas, as quais são específicas para cada sexo [107]. Estes podem ser indícios de que as asas dos insetos podem ter evoluído através da ação seletiva associada com o comportamento de cópula [147, 148].

Em Culicidae, sabe-se que apenas as fêmeas são hematófagas e competentes para a transmissão de patógenos, e que também utilizam suas asas para garantir uma precisa aproximação a outros animais e poder, então, sugar seu sangue; enquanto que os machos podem copular com várias fêmeas e utilizam a frequência do batimento de suas asas para compor um “dueto” com a fêmea durante a corte [149].

Apesar da importância epidemiológica dos mosquitos e da relação das asas com o comportamento destes insetos, poucos são os estudos sobre DSA em Culicidae. O DSA nesta família tem sido descrito ocasionalmente em chaves taxonômicas, mas seus padrões específicos e variabilidades ainda não são bem conhecidos. O dimorfismo sexual de tamanho e o dimorfismo sexual de forma alar (DSTA e DSFA, respectivamente) já foram reportados em pelo menos 11 espécies de mosquitos [118, 120, 121], mas uma perspectiva comparativa entre espécies foi realizada apenas em um dos nossos estudos [120], do qual parte dos resultados será apresentada nesta tese.

Estudos sobre DSA em culicídeos podem indiretamente enriquecer nosso conhecimento acerca de sua epidemiologia dado que a relevância epidemiológica e o papel desempenhado pelas asas são particulares para cada sexo. O DSA deve ser estudado, pois pode estar atrelado a genes sexuais, os quais são especialmente úteis para o desenvolvimento de mosquitos geneticamente modificados, por exemplo [150, 151]. Uma abordagem inicial para estudar o DSA em Culicidae pode ser

detectar, quantificar e comparar o DSA em espécies as quais representam os principais subgrupos taxonômicos. Isso pode proporcionar informações preliminares sobre a frequência do DS e também sobre o papel das restrições filogenéticas e/ou adaptações específicas de cada espécie na evolução do DS.

1.3.2 A morfometria geométrica alar no diagnóstico de espécies crípticas em Culicidae

Embora a família Culicidae, comparada a outros grupos de insetos, possua uma sistemática relativamente organizada, ainda há discussões referentes ao *status* taxonômico de alguns gêneros e subgêneros [146, 152, 153]. Outro ponto importante na sistemática de Culicidae é a presença de complexos de espécies crípticas ou espécies-irmãs [154], principalmente no subgênero *Nyssorhynchus* de *Anopheles*. Espécies crípticas são duas ou mais espécies as quais, baseadas em suas similaridades morfológicas, são consideradas como apenas uma espécie, mas que, entretanto, estão em processo de reclassificação como espécies distintas com base em taxonomia integrativa, a qual envolve morfologia, filogenia e ecologia [155]. Espécies-irmãs, de acordo com Mayr [156], são populações morfologicamente similares ou idênticas, as quais são reprodutivamente isoladas, enquanto que complexos de espécies são espécies indistinguíveis morfologicamente, mas que podem apresentar diferenças no comportamento e variação genética [69].

Também são outros pontos a serem considerados: a diversidade de conceitos de espécie considerados para as segregações/identificações dos grupos (biológico, morfológico, filogenético, etc.) [157], além das particularidades para identificação destes grupos com base nos caracteres externos, pois somente alguns são considerados chave (genitália masculina, caracteres morfológicos dos ovos, caracteres presentes apenas na fase larval, etc.).

A identificação taxonômica precisa de alguns taxons em Culicidae pode ser bastante complexa. Considerando-se apenas a taxonomia tradicional, existe uma importante complexidade e subjetividade presente nas chaves dicotômicas, além da atual falta de profissionais especializados nesta área. Mesmo para um especialista em taxonomia de Culicidae, ainda existirá a extrema similaridade morfológica entre espécies muito próximas, o que muitas vezes só é resolvida a partir de taxonomia molecular, uma técnica ainda em constante desenvolvimento, que pode ser muito

cara, mesmo que precisa. Somado a isso, ainda pode-se discutir sobre o tempo o qual é despendido para a aplicação destas técnicas, a má conservação de caracteres chave para a identificação, etc.

Devido ao alto poder de resolução da MG [104, 102], esta técnica tem se mostrado eficiente para, além de resolução de outros problemas biológicos, distinção de espécies-irmãs, simpátricas e/ou crípticas em Culicidae [97, 98, 127, 128]. Para isso, inclusive, diferentes conjuntos de PA já foram utilizados [99].

No entanto, ainda não é possível se obter uma identificação taxonômica exclusivamente por meio da MG, é necessário primeiramente haver a confirmação taxonômica por algum outro meio, para depois aplicá-la. Em alguns casos, a identificação prévia feita por meio da taxonomia tradicional pode ser suficiente, no entanto, em outros casos é necessária uma confirmação taxonômica molecular. Particularmente devido às dificuldades em caracterização dos membros do subgênero *Nyssorhynchus* (anteriormente mencionado), o marcador ITS2 é frequentemente escolhido.

Como supracitado, embora a MG seja útil para a distinção de grupos, ainda não está desenvolvida a identificação de espécies de mosquitos de maneira automatizada exclusivamente feita por MG. Funcionalidades de bioinformática poderão futuramente contribuir, por exemplo, como a criação de programas de digitalização e identificação automática de mosquitos, como visto para digitalização de asas de moscas [158] e identificação automática em abelhas [159]. A criação de BDs como o WingBank também poderá contribuir para novos avanços neste tipo de aplicação.

1.4 A importância do uso de banco de dados e sua relação com morfometria geométrica alar de mosquitos

Garros e Dujardin [79] enfatizam que para uso taxonômico, não basta apenas utilizar uma técnica poderosa como a MG, para avaliar as similaridades entre os taxons, é preciso também compartilhar os dados com outros pesquisadores, sejam eles genéticos ou morfológicos.

A ausência de bancos de dados de imagens alares tem dificultado testes de classificação ou identificação biométrica, bem como estudos de inferência biológica a longo prazo em insetos [160]. Ademais, em revisões temáticas sobre a MG de

insetos de interesse médico, Dujardin [133] e Lorenz et al. [105] incentivam pesquisadores a utilizarem esta metodologia e enfatizam a importância de se construir bancos de dados morfométricos de Culicidae. Além disso, Garros e Dujardin [79] sugerem que para um Banco de Dados (BD) morfométricos ter utilidade taxonômica, ele deve compartilhar as coordenadas computadas ou as imagens.

A automatização da identificação de espécies baseado em MG além de demandar implementações computacionais, requer um BD que permita a validação desta aplicação por meio de testes. Atualmente, dois repositórios que compartilham imagens úteis para a MGA em insetos estão disponíveis, o ApiClass (http://apiclass.mnhn.fr) e o CLIC (http://mom-clic.com/clic-bank). O ApiClass é um sistema *online* especializado para identificação de subespécies de abelhas pertencentes à espécie *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, com base nas asas, e que utiliza um Banco de Dados Relacional (BDR) (com 5.763 imagens) mantido com o Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados (SGBD) MySQL. O CLIC é classificado pelo próprio autor como um "*web space containing reference images*" [161], ou seja, é uma base de dados mas não constitui propriamente um BDR. Entretanto, o *WingBank* (http://www.*wingbank*.butantan.gov.br), um BDR de informações morfológicas, por nós idealizado e desenvolvido por uma equipe multidisciplinar, surge com a proposta de ser o primeiro BDR com compartilhamento tanto das coordenadas computadas quanto das imagens, além de outros dados de interesse para taxonomia integrativa como dados espaço-temporais, exclusivamente de mosquitos.

1.4.1 Importância local e global do WingBank

O grupo de pesquisa MosquitoLab, o qual está sob a coordenação do Prof. Dr. Lincoln Suesdek, alocado no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, nos últimos 10 anos produziu uma série de trabalhos relacionados à MGA de mosquitos, culminando recentemente com uma revisão científica [105]. Como matéria-prima para estes estudos, milhares de asas foram extraídas dos mosquitos, montadas, fotografadas e arquivadas em formato digital juntamente com uma série de informações morfométricas, e uma quantidade equivalente de informações

biológicas/taxonômicas, geográficas/espaço-temporais, ambientais/climáticas e de recursos humanos foram anotadas em um livro-tombo.

A organização inicial destes dados se dava a partir do processamento tradicional de arquivos, onde cada usuário definia e utilizava os arquivos e suas respectivas informações vinculadas para um objetivo específico. Existia uma organização geral, mas no entanto, havia heterogeneidades organizacionais e particularidades vinculadas a cada projeto as quais refletiam nesta organização.

Inicialmente, o processo de armazenamento de dados no MosquitoLab seguia os passos descritos na Figura 5, onde: a) durante as coletas, cada coletor registrava os dados (geográficos, ambientais, etc.) de interesse específico para seu próprio estudo; b) o registro no livro-tombo se dava da seguinte maneira: criava-se um código da coleta o qual representava a combinação de diferentes caracteres: i) uma letra - cada livro tombo possuía uma letra que o representava (A ou B); ii) um numeral ou uma sequência numérica - cada página continha um número (001 a 200); iii) a letra T acompanhada por um numeral ou uma sequência numérica - cada linha de cada página do livro tombo era preenchida por informações mais específicas referentes ao “tipo” (T) de coleta, de experimentação, espécie coletada e etc. Desse modo, obtinham-se códigos similares a “A1T2”. O código de cada indivíduo não era registrado no livro tombo; c) as lâminas, em geral, contendo dois pares de asas (cada um referente a um indivíduo), cobertos por uma lamínula utilizando como solução de adesão bálsamo-do-Canadá, comumente eram identificadas com o código da coleta + número sequencial referente aos indivíduos + lado da asa + sexo do indivíduo; d) as asas eram fotografadas individualmente e o arquivo digital recebia o mesmo código anotado na lâmina/lamínula.

Assim, apesar de a organização dos dados suprir as necessidades do laboratório na época, existiam incompletudes de dados, visto que se o objetivo de um estudo específico não abrangesse certos tipos de dados, eles não eram anotados, ou se eram anotados, estavam em arquivos específicos de cada pesquisador e não no livro tombo.

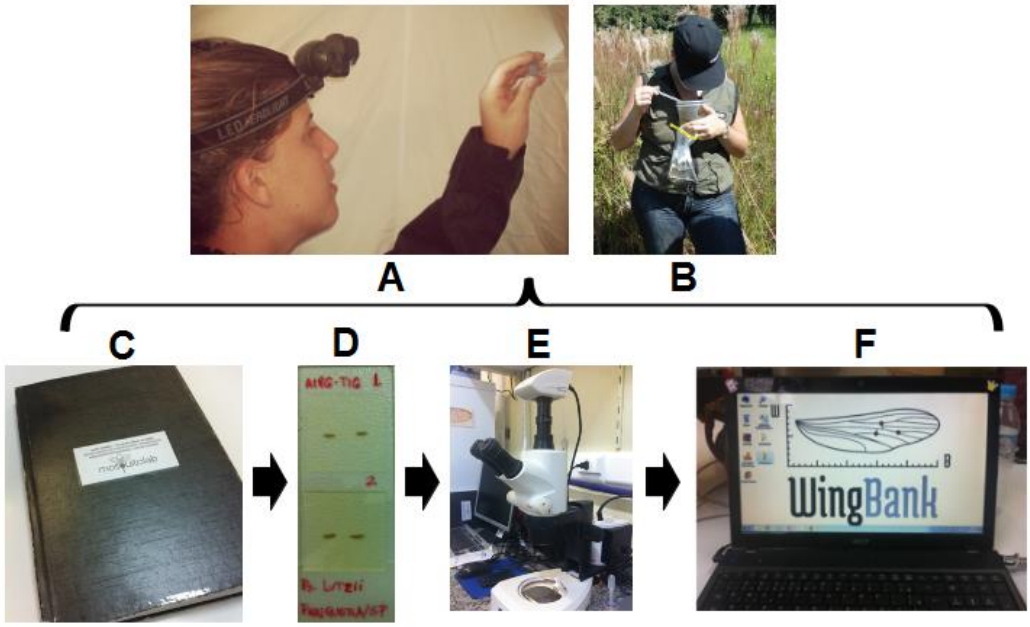

Figura 5 - Passos iniciais de registro de dados do MosquitoLab. A) e B) Coleta; C) Registro no livro tombo; D) Montagem das asas em lâminas; E e F) Registro fotográfico das asas.

Para garantir o referenciamento das imagens, as lâminas (Figura 6) foram triadas e depositadas no Laboratório Especial de Coleções Zoológicas (LECZ) do Instituto Butantan, onde cada asa recebeu uma etiqueta identificadora contendo um código sequencial de acordo com as políticas adotadas pelo LECZ e com as informações adicionais cedidas pelo MosquitoLab, como sexo, lado da asa e número do indivíduo (p.e. IBSP1.FD001).

Como uma tentativa de organização/padronização dos dados (quando ainda não se havia pensado em uma estrutura de BD), as informações registradas no livro tombo foram digitalizadas e as imagens, organizadas de acordo com cada registro. Inicialmente, os dados foram apenas tabulados em uma planilha eletrônica, em que cada linha representava o registro de um indivíduo e cada coluna representava um atributo do indivíduo, como data de coleta, sexo, etc. No entanto, a quantidade de dados cresceu ao longo dos anos, tornando inviável a busca por informação na planilha.

Figura 6 - Asas montadas entre lâmina e lamínula, identificação não-padronizada.

Com a evolução das tecnologias de geração e armazenamento de dados ao longo das últimas décadas, tem se tornado cada vez mais comum o acúmulo de dados / documentos digitais, os quais precisam de uma organização específica para facilitar a sua recuperação. Um BDR, com o auxílio de um SGBD (explicações mais detalhadas na próxima seção, 1.5), possibilita a centralização do armazenamento destes dados [162].

Desse modo, ao invés de o usuário do MosquitoLab realizar pesquisa preliminar em dois locais distintos (livro tombo e computador), ele pode economizar tempo e recurso, buscando diretamente no *WingBank*. É esperado que o *WingBank* apresente para os usuários do MosquitoLab benefícios como os de organização de dados, facilitação de busca e acesso a todos os dados depositados (sem exceções). Atrelada a esta vantagem e com os ganhos adicionais, como possibilitar o armazenamento de informações de outras fontes no futuro, garantir integridade e consistência dos dados, evitar redundâncias e possibilitar a disponibilização pública destes dados, a implementação de um sistema de BD, composto por um BDR e um

sistema *web* que provê uma interface amigável para o seu uso, pode ser uma interessante opção.

Além destes benefícios oferecidos ao público restrito (usuários MosquitoLab), considerando ainda como “importância local” o alcance nacional, estima-se que este banco seja importante para profissionais da área da saúde, como funcionários das vigilâncias entomo e epidemiológica, os quais poderão usufruir dos dados depositados vinculados a alguma publicação científica, para comparações e criação de novos estudos. No que concerne a “importância global”, pretende-se que este banco seja acessado por usuários de qualquer parte do mundo (sejam eles estudantes de graduação/pós-graduação, pesquisadores científicos ou profissionais da área da saúde, e demais usuários extra-MosquitoLab), os quais poderão recuperar dados já vinculados a publicações científicas e utilizá-las para elaboração de novos estudos. Ademais, este banco, pode servir também como base para aplicações de identificação automática de mosquitos.

Vale ressaltar que a estrutura do *WingBank* poderá futuramente ser utilizada por outros grupos de pesquisa que queiram organizar seus próprios dados. Ademais, a padronização da nomenclatura dos arquivos de imagem das asas, p.e. ‘F00000001L’ (melhor detalhada no item 3.5.7) pode servir como base para outros grupos, principalmente os que utilizam o programa MorphoJ [180], devido à sua funcionalidade específica chamada “*Extract New Classifier from ID String* ...”, a qual possibilita a classificação das amostras a serem analisadas com base no nome dos arquivos (*input*).

Com base nos dados apresentados pelo re3data (www.re3data.org), um registro global de repositórios de dados relacionados à pesquisa em diferentes disciplinas acadêmicas, existem cerca de 1000 bancos de dados registrados na área de Ciências da Vida, e 974 em Ciências Naturais. Estes números são bastante expressivos; juntos, correspondem a mais de sete vezes o número de registros da área com menos registros, que é a Engenharia (com 266) (Figura 7). Isso pode ser explicado pelo grande crescimento da produção de dados nos últimos anos, principalmente dos conhecidos como *Big Data* presentes principalmente na área de Biologia Molecular, reflexo da produção massiva de sequências gênicas [163]. Atualmente, o Brasil contribui com apenas seis registros no Re3data.

Figura 7 - Bancos de Dados registrados apresentados no re3data (www.re3data.org), separado por área.

Na Tabela 1, apresentamos uma amostra de bancos de dados relacionados com as áreas de Ciências da Vida e/ou Ciências Naturais, inclusive Entomologia Médica e MGA. Entre estes bancos de dados encontram-se, inclusive, alguns do tipo relacional, como: ApiClass, AnoBase e GigaDB. Vale ressaltar que nem todos os bancos de dados listados a seguir, estão registrados no re3data.org, o que significa que a quantidade de bancos de dados nestas áreas é ainda maior do que o indicado pelo Re3data.

Tabela 1 - Exemplos de bancos de dados biológicos

Nome	URL	Referência (DOI)
VectorMap (antigo MosquitoMap)	http://vectormap.si.edu	https://doi.org/10.1186/1476-072X-9-11
Mosquito Catalog	http://www.mosquitocatalog.org	----
Mosquito Taxonomic Inventory	http://mosquito-taxonomic-inventory.info	----
Zoobank - The Official Registry of Zoological Nomenclature	http://zoobank.org	---
Taxonomy Database*	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy	10.1093/nar/gkr1178
GigaDB*	http://gigadb.org	10.1093/database/bau018
Biofragment Database	http://vergil.chemistry.gatech.edu/active_bfdb/bfdb/cgi-bin/bfdb.py	http://dx.doi.org/10.1063/1.5001028
FlyBase*	http://flybase.org	https://doi.org/10.1093/nar/gkw1016
AnoBase	http://www.anobase.org	10.1111/j.1365-2583.2005.00596.x
AnoXcel	http://www.anobase.org/AnoBase/Genes/Ano-Xcel	10.1111/j.0962-1075.2004.00503.x
VectorBase*	https://www.vectorbase.org	10.1093/nar/gku1117
GenBank*	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/*GenBank*	10.1093/nar/gks1195
InsectBase (InsectGenome)	http://www.insect-genome.com	10.1093/nar/gkv1204
ApiClass	http://apiclass.mnhn.fr	----
CLIC Bank	https://mome-clic.com/clic-bank/	10.1186/1756-0500-3-266
PhiBase (Pathogen Host Interactions)	http://www.phi-base.org/	10.1093/nar/gku1165

*Bancos de dados registrados no re3data.org.

A história da Torre de Babel pode servir como metáfora para um problema existente na sistemática de insetos [164], mas também pode ser associada à extensa “produção independente” de programas e bancos de dados referentes às anotações gênicas [165], por exemplo. Para evitar a mesma incoerência na criação de bancos de dados de referência para MG, e apesar de o *WingBank* hoje ainda não se comunicar com bancos de dados de georreferenciamento (como o VectorMap), anotações gênicas (como o *GenBank*) e bibliográficos (como o PubMed), pretende-se em um futuro próximo, conectá-lo a estes bancos de dados, bem como a outros bancos de dados que possam surgir.

1.5 Conceitos básicos em Banco de Dados

De uma maneira bastante simples, pode-se dizer que um BD é uma coleção de dados relacionados. Um BD digital pode ser convenientemente mantido por meio de

um SGBD, uma coleção de programas que possibilita a criação e manutenção do BD [166].

Diversas vantagens decorrentes do uso de SGBDs são listadas por importantes estudiosos nesta área, como Date [167]: independência entre programas e dados, melhor desempenho nas operações de consulta e modificação dos dados, menos “trabalho duro” para a organização e manutenção dos dados, facilidade no compartilhamento e atualização de dados, controle de acesso, redução da redundância e prevenção de inconsistência, imposição de padrões e garantia de integridade. E Elmasri e Navathe [166], os quais fazem uma comparação entre as principais características da abordagem de processamento tradicional de arquivos e as da utilização de BD: no processamento tradicional, os arquivos de dados são criados e mantidos pelas próprias aplicações de programa que os utilizam, o que pode gerar redundância na definição e no armazenamento dos dados, levando ao desperdício de espaço de armazenamento e dificuldade na manutenção da consistência dos dados. Na abordagem baseada em BD, os dados são mantidos em um repositório único e ficam acessíveis a diferentes usuários e aplicações, além disso, os nomes (ou rótulos) dos dados são definidos uma única vez e utilizados repetidamente em consultas, transações e aplicações.

Ademais, os autores enfatizam a natureza auto-descritiva dos bancos de dados: um SGBD armazena os dados de um banco juntamente com informações sobre sua estrutura e as restrições que se aplicam a eles. Isso possibilita o isolamento entre programas e dados, ou seja, que edições nos programas não influenciem nos dados e vice-versa. No processamento tradicional, as estruturas dos arquivos de dados são embutidas nos programas de aplicação [166].

São características da abordagem baseada em BD: a abstração de dados, ou seja, destaque apenas para características essenciais para um entendimento dos dados; suporte para múltiplas visões dos dados; compartilhamento de dados e controle de acessos concorrentes, o qual possibilita a utilização (inserção e edição de dados, principalmente) de múltiplos usuários simultaneamente. As principais fases para a criação de um BD são: levantamento de requisitos, projeto conceitual, projeto lógico e projeto físico (Tabela 2) [166].

O tipo de BDR é o mais utilizado e considerado o de maior sucesso para a implementação de BD nas últimas três décadas, dominando o campo de gerenciamento de dados [168]. São alguns exemplos de BDR: aplicações científicas,

as quais armazenam grandes quantidades de dados resultantes de experimentos científicos; armazenamento e recuperação de imagens; e aplicações de mineração de dados, as quais analisam uma grande quantidade de dados em busca de ocorrências de padrões específicos [166].

O modelo usado neste tipo de BD foi criado por Edgar F. Codd [169], e foi considerado uma ideia revolucionária na década de 70 [170]. A principal motivação foi uma observação feita sobre o fluxo de trabalho dos programadores da empresa IBM (*International Business Machines*) onde Codd trabalhava, os quais necessitavam reescrever grande quantidade de programas de aplicação manualmente sempre que o conteúdo ou organização física de um BD mudasse [168].

Este tipo de BD foi originalmente proposto para separar armazenamento físico dos dados das suas representações conceituais e fornecer fundamentos matemáticos para a representação e busca dos dados. Em um BDR, os dados são registrados como um conjunto de relações representados em tabelas, organizadas em tuplas (um conjunto de valores representados em linhas), sendo que cada tupla representa um registro. Uma tupla pode conter várias informações separadas, chamadas de atributos (campos). As tuplas de uma relação são identificadas univocamente por uma *chave*, que é um conjunto de atributos para os quais quaisquer par de tuplas da relação não podem ter valores iguais. Pode-se criar associações entre tuplas (possivelmente de diferentes relações), agilizando a busca de elementos que se relacionam entre si. Uma associação desse tipo é feita por meio de uma *chave estrangeira*, que consiste em um conjunto de atributos que apontam para a chave de outra tabela ou da mesma tabela, ou seja, o valor para uma *chave estrangeira* em um dado registro é o identificador unívoco de outro registro. A linguagem de consulta comumente utilizada neste tipo de BD é a *Structured Query Language* (SQL), um padrão da ANSI/ISO [166, 167].

1.5.1 Criação de um Banco de Dados Relacional

O projeto de um BDR inicia-se pelo levantamento de requisitos, que consiste basicamente na coleta de informações referentes aos interesses dos futuros usuários do BD e das aplicações de programa que com ele interagirão, a qual

comumente é realizada com base em reuniões pontuais. Os requisitos são anotados com detalhamento, e com base neles, cria-se o modelo conceitual [166].

O modelo conceitual é conciso, descritivo e apresenta os principais requisitos do domínio modelado. Pode-se representá-lo de diferentes formas, a mais comum (e que foi usada no *WingBank*) é por meio de um Modelo Entidade-Relacionamento (MER) representado por um Diagrama Entidade-Relacionamento (DER), utilizando a notação gráfica, ambos criados por Peter Chen [171]. Um DER é estruturado em: a) *entidades* (retângulos), as quais representam a abstração de um objeto do mundo real no BD, como por exemplo, Indivíduo, Imagem e Identificação Taxonômica; b) *atributos* (elipses), os quais são detalhamentos, propriedades que caracterizam um tipo de entidade, como por exemplo, sexo do indivíduo, dimensão da imagem; e c) *relacionamentos* (losangos), os quais representam as associações entre as entidades, acompanhadas de suas *restrições de participação* e *cardinalidades*, como por exemplo: [Indivíduo] 1 <possui> 2 [imagem], [indivíduo] 1 <é> 1 [espécie], ou seja, cada indivíduo pode ter até 2 imagens, e cada indivíduo é correspondente apenas à uma espécie; os numerais representam a cardinalidade, como no exemplo hipotético apresentado na Figura 8.

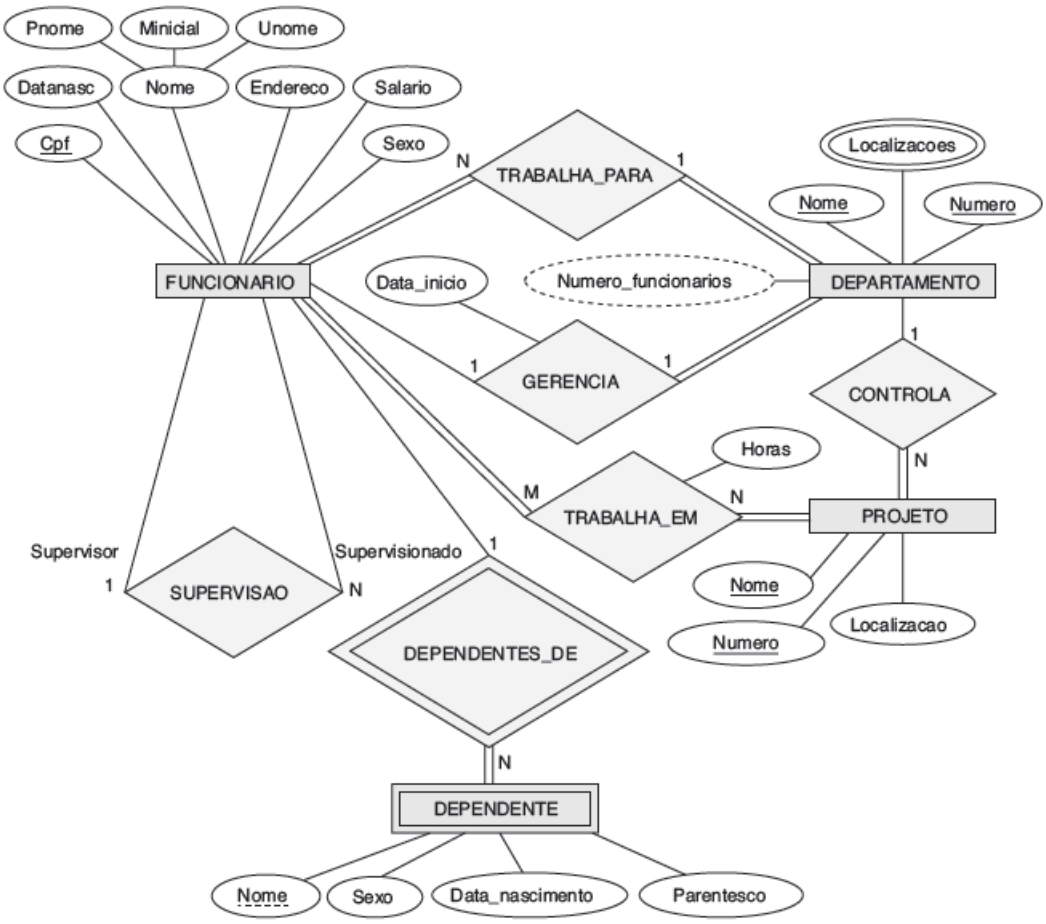

Figura 8 - Esquema DER para um banco de dados hipotético (reproduzido de Elmasri e Navathe, [166]).

As entidades são tipificadas em *concretas* (e definidas no diagrama por um contorno simples) ou *abstratas* (contorno duplo). Os atributos podem ser *compostos* (ou seja, subdivididos em mais de um atributo) ou *simples*; *mono* (com contorno simples) ou *multivalorados* (com contorno duplo). Os *atributos chaves*, ou seja, que identificam univocamente suas entidades, são denotados por um sublinhado sob o seu nome, enquanto que os que são chaves parciais são denotados por uma linha tracejada. Quando a participação de uma entidade em um relacionamento é *parcial*, a linha que liga a entidade ao relacionamento é simples; quando a participação é *total*, a linha é dupla [166].

Uma versão estendida do DER incorpora conceitos adicionais que permitem enriquecer a semântica do modelo conceitual. Esses conceitos são os de *especialização/generalização* e *categoria* (ou *união*). Uma especialização é a definição de subconjuntos de entidades (subclasses) de um tipo de entidade (neste caso, considerada uma superclasse), onde as subclasses possuirão atributos e/ou

relacionamentos próprios e que, ao mesmo tempo, herdarão os atributos (inclusive, as chaves) da superclasse. Portanto, uma entidade de uma subclasse sempre é também uma entidade da sua superclasse. A generalização pode ser entendida como o processo inverso ao de especialização, em que se suprimem as diferenças entre vários tipos de entidades (subclasses), identifica-se suas características comuns e as generaliza em uma única superclasse. Uma especialização/generalização pode ser do tipo *sobreposta* (denotada pelo símbolo "o" dentro de um círculo, do inglês "*overlapping*") ou *disjunta* (símbolo "d" dentro de um círculo, do inglês "*disjunction*"). Na disjunta, uma entidade da superclasse pode estar em no máximo uma das subclasses da especialização/generalização; na sobreposta, uma entidade da superclasse pode estar em várias subclasses. Uma categoria ou união (denotada pelo símbolo "u" dentro de um círculo, do inglês *union*) pode ser vista como um conjunto de entidades de diferentes tipos que não necessariamente possuem atributos em comum entre eles [166].

Em geral, o símbolo ∩ é adicionado ao relacionamento no qual se pretende representar a especialização/generalização ou categoria. A abertura deste símbolo é direcionada à entidade para a qual se está aplicando a restrição. Por exemplo, se a intenção é representar que um Indivíduo pode ter origem em uma coleta de campo, em uma colônia de laboratório, ou que ele pode ser coletado em campo, mas depois ser colonizado / mantido em laboratório, pode-se representar isso direcionando a abertura do símbolo à Origem (que é a superclasse de uma especialização sobreposta) como mostrado na Figura 9. Ademais, como a notação do MER nem sempre é suficiente para descrever todos os detalhes do BD, quando necessário, um dicionário de dados costuma ser elaborado para complementar o diagrama [166].

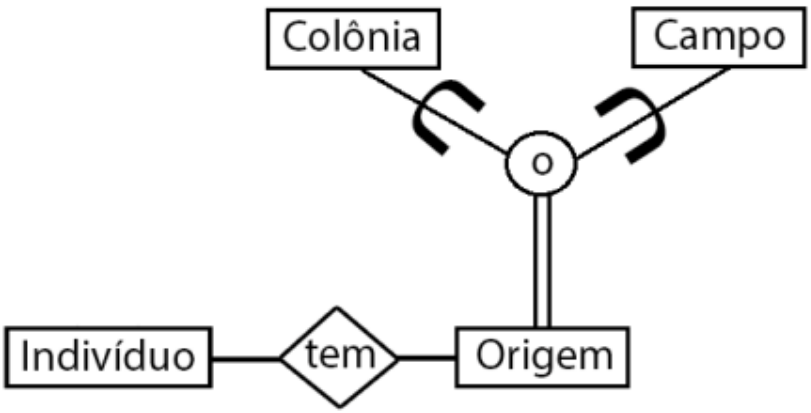

Figura 9 - Representação de especialização sobreposta

A modelagem lógica do BD corresponde ao mapeamento do esquema conceitual para um modelo de dados de implementação, que contém detalhes sobre os tipos de dados os quais compõem tal BD e as restrições que se aplicam sobre ele, por exemplo. No caso do *WingBank*, o modelo de dados de implementação escolhido foi o relacional, por razões já destacadas anteriormente neste texto. No mapeamento para o modelo relacional, os dados são apresentados “em tabelas, nada além de tabelas” [172], ou seja, os tipos de entidades são transformados em tabelas, os atributos em colunas das respectivas tabelas, os atributos multivalorados em outras tabelas, os relacionamentos em chaves estrangeiras e (possivelmente) novas tabelas. E então, para representar um esquema no modelo relacional, pode-se utilizar diferentes notações.

O programa usado para o desenho do esquema relacional do *WingBank*, o *Visual Paradigm Community* 14.1 (https://www.visual-paradigm.com), utiliza a notação “pé de galinha” criada por Everest [173], originalmente chamada de *crow’s foot* (pé de corvo). Essa notação foi criada para a modelagem conceitual de dados, mas frequentemente é usada (combinada a outras notações) para representar graficamente restrições de cardinalidade e de participação sobre os relacionamentos expressos por meio de chaves estrangeiras em um esquema relacional. Um sumário da notação "pé de galinha" é apresentado na Tabela 3.

O refinamento do esquema é uma etapa opcional no projeto lógico, porém é comumente utilizado. Por meio dele é possível identificar problemas em potencial no esquema criado e aplicar técnicas para melhorá-lo.

Tabela 2 - Comparativo entre diferentes restrições de cardinalidade/participação e suas representações no diagrama relacional, de acordo com a notação “pé de galinha” de Everest [173].

Cardinalidade/Participação	Representação
Relacionamento 1:1	
Relacionamento N:M	
Relacionamento Opcional (Participação Parcial)	
Relacionamento Obrigatório (Participação Total)	
Relacionamento Identificado	
Relacionamento Não-Identificado	

No modelo físico, algumas especificações finais são implantadas, principalmente as relacionadas a armazenamento e acesso ao BD. Nesta fase, alguns índices podem ser criados, tanto para garantir a coerência dos relacionamentos entre os dados, quanto para melhorar o desempenho das futuras operações sobre os dados [166].

Todas as operações realizadas sobre um BDR, desde a criação das tabelas até qualquer busca realizada pelo usuário final, podem ser realizadas por meio de uma linguagem de BD, sendo que a Linguagem de Consulta Estruturada (*Structured Query Language*, SQL) é a melhor estabelecida até o momento. Apesar de a SQL ser única, ela é dividida em (pelo menos) três tipos: a) Linguagem de Definição de Dados (*Data Definition Language*, DDL), representada por comandos como CREATE, ALTER e DROP, os quais são criados para criar, alterar e deletar tabelas por inteiro, respectivamente; b) Linguagem de Manipulação de Dados (*Data Manipulation Language*, DML), são comandos como INSERT, UPDATE e DELETE, os quais interagem diretamente com os dados armazenados nas tabelas, ou seja, inserem, atualizam ou removem as informações dentro de uma tabela. c) Linguagem de Consulta de Dados (*Data Query Language*, DQL), a qual inclui o comando SELECT, usado para a recuperação de dados em um BD [166, 172, 174].

1.5.2 Implementação de um sistema com acesso a Banco de Dados Relacional

Há diferentes abordagens para o projeto e desenvolvimento de um sistema com acesso a BD. No *WingBank*, que é um sistema *web*, usou-se Projeto Orientado a Domínio (*Domain-Drive Design,* DDD) e Modelo-Visão-Controlador (MVC). O primeiro é uma abordagem de desenvolvimento que enfoca o entendimento das regras de negócio e de como elas devem estar refletidas no código do sistema e no modelo do domínio [175]. Além de esta técnica estar ligada às boas práticas da programação orientada a objetos, é uma forma de organizar o código de modo que as regras de negócios fiquem em contextos delimitados. Este projeto foi utilizado para a arquitetura de praticamente toda a aplicação, desde infraestrutura até o acesso aos dados. Para a comunicação entre a camada de modelo do sistema e o BD, usou-se o Mapeamento Objeto-Relacional (*Object-Relational Mapper,* ORM). O ORM é uma técnica que consiste em representar um objeto de programa de maneira relacional para que ele possa ser persistido (ou seja, gravado) em um BDR e,

quando necessário, ser recuperado e criado como um objeto em memória principal novamente, sem que haja perda de informação nesse processo.

O segundo, o padrão MVC, foi utilizado apenas para a arquitetura da aplicação *cliente* da interface *web*. Neste padrão, a camada de *modelo* se refere à representação dos dados sobre os quais o sistema opera. A camada de *visão* é a apresentação dos dados e da lógica de processamento aos usuários finais, possibilitando inclusive sua interação com o sistema. Por fim, o *controlador* responde a eventos, gerencia o acesso ao modelo e à visão e coordena o fluxo de dados entre eles.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a utilidade da morfometria geométrica alar para a identificação de dimorfismo sexual e diferenciação de espécies crípticas;

Modelar e implementar um banco de dados relacional (*WingBank*) direcionado ao estudo de morfometria geométrica alar e taxonomia integrativa.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a existência e a magnitude do dimorfismo sexual alar em dez espécies de Culicidae de importância médico-veterinária por meio da técnica de morfometria geométrica;

Diferenciar por meio da técnica de morfometria geométrica, as espécies crípticas *Anopheles strodei s.s.* e *Anopheles arthuri s.l.,* pertencentes ao Subgrupo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)*;

Desenvolver um protótipo de plataforma para armazenamento de dados biológicos relacionados à morfometria de asa, por meio de um banco de dados relacional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações gerais sobre a taxonomia adotada

A classificação taxonômica adotada neste estudo seguiu a utilizada por *Walter Reed Biosystematics Unit (*WRBU*),* Divisão de Entomologia, Instituto de Pesquisa Walter Reed (*Walter Reed Army Institute of Research*, WRAIR) em seu Catálogo Sistemático de Culicidae (http://www.mosquitocatalog.org/), e apresentado por Ralph Harbach [176] em seu Inventário Taxonômico de Mosquitos (http://mosquito-taxonomic-inventory.info/), seguindo as orientações de Wiley e Liebermann [177] Vences et al. [178] e Wilkerson et al. [152] para a classificação da Tribo Aedini.

As categorias taxonômicas informais (Série, Grupo, Subgrupo, Complexo) não foram adotados na modelagem e na implementação do *WingBank*, apenas foram adotadas as denotações *sensu lato* (*s.l.*) junto às espécies pertencentes a complexo de espécies as quais não possuem identificação específica e *sensu stricto* (*s.s.*). para as identificadas a nível específico (por meio da taxonomia tradicional ou molecular).

3.2 Considerações gerais sobre coleta de espécimes de Culicidae e uso da técnica de morfometria geométrica

Os representantes de estágios imaturos (ovos, larvas e pupas) foram coletados em criadouros naturais e artificiais. Em laboratório as larvas foram alimentadas com ração para peixe (Tetramin®) e mantidos sob condições de temperatura (25 ± 1 °C), umidade (80 ± 10 %) e fotoperíodo (12 : 12 horas claro : escuro) controladas, até a emergência dos adultos. Os espécimes adultos foram coletados com aspiradores entomológicos portáteis e/ou armadilhas luminosas do tipo *Shannon*.

As asas foram destacadas do tórax de cada indivíduo e montadas entre lâmina e lamínula utilizando solução de Bálsamo do Canadá como meio de imersão (Figura 10). Algumas características fenotípicas das asas podem dificultar a obtenção dos dados morfométricos, sendo assim, quando as asas apresentaram-se inconspícuas, foram submetidas a um tratamento químico como descrito por Lorenz et al. [106] e quando se apresentaram com excesso de escamas, sua remoção foi realizada com o auxílio de um pincel de cerdas macias adaptado. Todas as imagens foram

fotografadas em lupa estereoscópica com 40 X de magnitude, maiores detalhes constam na Tabela 4.

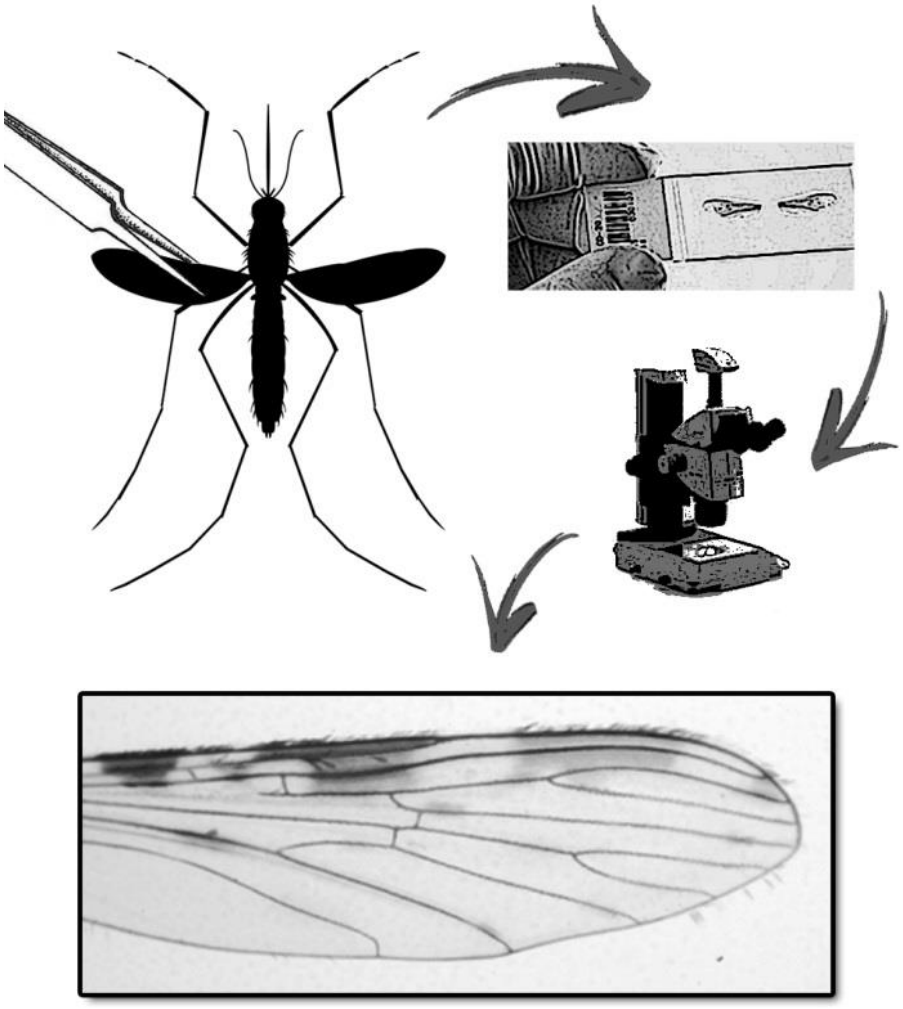

Figura 10 - Passo a passo da montagem e tomada fotográfica das asas.

Tabela 3 - Detalhamento das configurações das imagens utilizadas em cada estudo

Estudo	Espécie	Sexo	Resolução (DPI - *Dots per Inch*)	Dimensões
Diferenciação entre duas espécies do Subgrupo Strodei	*An.strodei s.s.*	F	150	2088x1550
		M	150	2088x1550
	An. arthuri s.l.	F	150	2088x1550
		M	150	2088x1550
Dimorfismo sexual alar	*An. strodei s.l.*	F	300	2088x1550
		M	300	2088x1550
	An.albitarsis s.l.	M	300	2088x1550
		F	300	2088x1550
	An.triannulatus s.l.	F	300	2088x1550
		M	300	2088x1550
	An.homunculus	F	150	2088x1550
		M	150	2088x1550

	An. cruzii s.l.	F	150	2087x1548
		M	150	2087x1548
	Ae. albopictus	F	150	2088x1550
		M	150	2088x1550
	Ae. aegypti	F	150	2087x1548
		M	150	2087x1548
	Ae. scapularis	F	150	2088x1550
		M	150	2088x1550
	Cx. quinquefasciatus	F	150	2088x1550
		M	150	2088x1550
	Cx. nigripalpus	F	150	2088x1550
		M	150	2088x1550

Os PA do tipo I de interesse para cada problema biológico foram anotados usando TpsDig [179]. Cada ponto recebeu uma coordenada posicional no plano cartesiano bidimensional (x, y). As coordenadas foram agrupadas de acordo com o objetivo de cada análise, por meio do programa TpsUtil [179]. Na sequência, estes dados foram analisados por meio de diferentes programas.

Algumas variáveis como: a) pequena variação nas resoluções (DPI - *Dots per Inch*) e nas dimensões das imagens (Tabela 4); b) diferentes anos e possivelmente diferentes períodos sazonais de coletas; c) distintas fases de desenvolvimento dos indivíduos coletados; e d) diferentes tipos de criadouros, exposição a diferentes temperaturas e densidades populacionais dos indivíduos imaturos coletados, não foram controladas no estudo de DSA. Contudo, embora não tenha sido possível o controle destas variáveis, isso não prejudicou as análises da forma alar neste estudo, pois as variações ocorreram entre espécies, enquanto as análises foram aplicadas comparando-se os sexos.

No estudo sobre a diferenciação entre *An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.*, foram utilizadas imagens com a mesma resolução e dimensão, foram coletadas em anos diferentes, porém no mesmo período sazonal, no mesmo município, em ambientes e criadouros similares. Uma variável que não foi possível de se controlar neste estudo foi a variação de fases de desenvolvimento coletadas, pois o número amostral de *An. strodei* s.s. foi muito baixo e decidimos utilizar todas as amostras. Embora se tenha coletado indivíduos em diferentes fases de vida, os espécimes quando alocados em laboratório, foram mantidos em ambiente controlado o que pode ter controlado possíveis alterações ambientais na continuidade do desenvolvimento de vida destes mosquitos até a fase adulta. Além disso, sabe-se que a forma alar é minimamente influenciada por fatores epigenéticos, sendo assim, as variações de

estágio coletado, provavelmente não influenciaram as análises de forma alar realizadas no presente estudo.

Entretanto, não se pode descartar totalmente a possibilidade de viés devido a todas estas variações nas comparações que envolvem o tamanho do centroide, seja isoladamente ou na análise do efeito alométrico, sendo assim, deve-se considerar as interpretações relacionadas a tamanho, com cautela. Embora exista a possibilidade de haver algum viés ambiental nas análises de tamanho alar no presente estudo, dirimir esta dúvida não estava em nossos objetivos.

O procedimento de sP foi realizado em todas as ocasiões onde se objetivou avaliar a variação da forma alar, por meio do programa MorphoJ, já o tamanho global da asa foi estimado por meio do tamanho do seu centroide utilizando-se os programas MOG (Pacote CLIC) [110] ou TpsRelW [179]. Os valores do TC foram comparados entre as amostras pelo teste T não-pareado em populações que tiveram distribuição gaussiana, e pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney em populações sem distribuição gaussiana por meio do programa *GraphPad InStat* (San Diego, Califórnia/USA) e representadas graficamente por meio do programa MOG (Pacote CLIC) [181] ou Statistica (StatSoft).

Ademais, embora ambas as avaliações práticas dos problemas biológicos realizadas no presente estudo, sejam macroevolutivas e provavelmente a variação alométrica faça parte das diferenças evolutivas relevantes para a sistemática [182], as análises de forma alar foram realizadas com e sem o efeito alométrico, para possibilitar a análise independente do tamanho e da forma, além do efeito alométrico em cada comparação. Para as análises sem o efeito alométrico, foi realizada regressão multivariada entre sP e TC, com teste de permutação (10.000 repetições) para avaliar a significância da alometria, por meio do programa MorphoJ.

Análises discriminantes, como Análise de Variáveis Canônicas (AVC), validada pelo teste de permutação com 10.000 repetições, e Teste de reclassificação com validação cruzada (*cross-validation*), baseadas nas dM foram utilizadas para avaliar a similaridade entre as amostras por meio do programa MorphoJ. A representação gráfica das similaridades morfológicas entre os grupos analisados foi por meio de histogramas (programa MorphoJ) e diagramas comparativos de extremo de diferenciação por meio dos programas TpsRegr ou MorphoJ. Os PA mais variáveis foram encontrados a partir de análises feitas no programa COV (Pacote CLIC) [181].

3.3 Avaliação do dimorfismo sexual alar em Culicidae, por meio da morfometria geométrica

Parte do conteúdo deste item está presente na publicação *"Wing sexual dimorphism of pathogen-vector culicids"* (DOI: http://doi.org/10.1186/s13071-015-0769-6) (Virginio et al. [120])

Com o intuito de testar a hipótese de que DSA existe e é diferencial em dez espécies de Culicidae, análises baseadas em MG foram realizadas. Para isso, mosquitos fêmeas e machos pertencentes a 10 espécies que compõem as subfamílias Anophelinae e Culicinae pertencentes à família Culicidae (*Ae. aegypti, Ae. albopictus, Ae. scapularis, An. albitarsis s. l., An. cruzii, An. homunculus, An. strodei s.l., An. triannulatus s.l., Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus)* foram coletados entre os anos de 2007 e 2013 nos estados de São Paulo e Minas Gerais (Tabela 5) e identificados ao nível de espécie [146, 183, 184].

Tabela 4 - Dados sobre as espécies de Culicidae coletadas

Espécies	Localização geográfica	Coordenada geográfica	Ano	Nº de espécimes	Tipo de criadouro
Cx. quinquefasciatus	Rio Pinheiros, SP	-23.595138 S; -46.694258 O	2007	17 F / 17 M	Natural
Cx. Nigripalpus	Parque Ecológico do Tietê, SP	-23.480094 S; -46.509274 O	2007	16 F / 20 M	Natural
Ae. scapularis	Tremembé, SP	-22.954916 S; -45.543534 O	2010	24 F / 25 M	Natural
Ae. aegypti	São José do Rio Preto, SP	-20.810039 S; -49.368546 O	2011	25 F / 25 M	Artificial
Ae. albopictus	Campinas, SP	-22.905906 S; -47.069657 O	2011	25 F / 25 M	Artificial
An. albitarsis s.l.	Frutal, MG	-20.030129 S; -49.021425 O	2013	15 F / 09 M	Natural
An. Homunculus	Cananéia, SP	-24.695063 S; -47.870972 O	2012	32 F / 24 M	Natural
An. triannulatus s.l.	Frutal, MG	-20.030129 S; -49.021425 O	2013	22 F / 17 M	Natural
An. strodei s.l.	Frutal, MG	-20.030129 S; -49.021425 O	2013	22 F / 16 M	Natural
An. cruzii s.l.	Cananéia, SP	-25.012376 S, -47.935381 O	2012	40 F / 33 M	Natural

As asas foram destacadas e montadas como descrito no item 3.2, e 18 PA foram anotados. As análises foram realizadas conforme indicado anteriormente, sendo que a ilustração da comparação entre os sexos em cada espécie foi adicionalmente representada por meio da construção de um fenograma de UPGMA usando o programa PHYLIP (*Phylogeny Inference Package)* versão 3.6 [185], o

extremo de diferenciação foi calculado no programa TpsRegr, o cálculo e a representação gráfica do TC para ambos os sexos em cada espécie, foi realizada por meio do programa MOG, e o cálculo e representação gráfica da razão entre as média do tamanho do centroide, por meio do programa Microsoft Excel 2010.

3.4 Diagnóstico de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.* Subgrupo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)*, por meio da morfometria geométrica alar

Com intuito de testar a hipótese de que a MGA é capaz de diferenciar duas espécies crípticas (*An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.*) pertencentes ao Subgrupo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)* as quais vivem em simpatria, avaliando dois diferentes conjuntos de dados para este fim, análises baseadas em MG foram realizadas.

3.4.1 *Coleta e identificação taxonômica tradicional*

Indivíduos fêmeas coletados nos meses de Janeiro, Março e Abril de 2013 e Janeiro, Fevereiro e Março de 2014, Frutal, Minas Gerais, Brazil (Tabela 6 e Anexo A), foram preliminarmente identificados por meio da taxonomia tradicional, como *An. (Nyssorhynchus) strodei* de acordo com Consoli e Lourenço-de-Oliveira [186] e Forattini [146].

3.4.2 *Identificação por taxonomia molecular*

As espécies *Anopheles arthuri s.l. e Anopheles strodei s.s.,* as quais pertencem ao Subgrupo Strodei [66], foram identificadas pela técnica de taxonomia molecular por meio do sequenciamento do ITS2 e de suas comparações com as sequências gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Maria Anice Mureb Sallum (M.A.M.S.) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP), as quais estão depositadas [69] no *GenBank* [187] (Tabela 6).

3.4.2.1 Extração de DNA

Para isso, após retirar as asas de cada indivíduo, o DNA genômico de 88 exemplares foi extraído por meio de maceração individual em 100 µl de solução de homogeneização [Tris-HCl 10 mM (pH=7,5) + NaCl 60 mM + EDTA 50 mM], subsequente adição de 100 µl de solução de lise [SDS 1,25% + Tris-HCl 0,3 M (pH = 9) + EDTA 0,1 M + sacarose 5 %] e 1 µl de proteinase K a 100 µg / ml, e incubação a 65 º C durante 40 minutos, para a “lise” das células e a clivagem das proteínas em peptídeos menores por meio da ação da proteinase K. Após essa fase, a esta solução foi adicionado 50 µl de Acetato de Potássio 8 M e então esta solução foi incubada a 4 ºC durante 45 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 12.000 g (FRC) por 10 minutos na mesma temperatura.

Tabela 5 - Informações referentes à caracterização morfométrica e à validação taxonômica (tradicional e molecular) das espécies pertencentes ao Subgrupo Strodei

Espécie	Local de coleta		Código de Acesso		Validação molecular	Tamanho dos *amplicons* de ITS2	Caracterização morfológica alar	
	Coordenadas geográficas	Cidade, Estado	*GenBank*	MosquitoLab			18 pontos anatômicos	22 pontos anatômicos
An. strodei s.s.	-20.03539 S, -48.87232 O	Frutal, MG	MG049812	013-A170T08.0	X	360	--	--
An. strodei s.s.	-20.02511 S, -48.93586 O	Frutal, MG	MG049809	030-A170T08.0	X	360	X	X
An. strodei s.s.	-20.02511 S, -48.93586 O	Frutal, MG	MG049807	044-A170T08.0	X	360	X	X
An. strodei s.s.	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049805	114-A171T08.0	X	360	--	--
An. strodei s.s.	-20.03356 S, -48.87683 O	Frutal, MG	MG049810	061-A171T08.0	X	360	X	X
An. strodei s.s.	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049806	074-A171T08.0	X	360	X	X
An. strodei s.s.	-20.07362 S, -48.89258 O	Frutal, MG	MG049808	075-A171T08.0	X	360	X	X
An. strodei s.s.	-20.03539 S, -48.87232 O	Frutal, MG	MG049811	009-A170T08.0	X	360	--	--
An. arthuri s.l	-20.02511 S, -48.93586 O	Frutal, MG	MG049861	029-A170T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.02041 S, -49.06583 O	Frutal, MG	MG049905	004-A170T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.02041 S, -49.06583 O	Frutal, MG	MG049826	005-A170T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049874	104-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049830	106-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049900	109-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049849	111-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049831	121-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049824	123-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.07362 S, -48.89258 O	Frutal, MG	MG049903	125-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049904	127-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049909	134-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049837	065-A171T08.1	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049859	066-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.02533 S, -49.07711 O	Frutal, MG	MG049902	067-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049872	067-A171T08.1	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049882	068-A171T08.1	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049891	069-A171T08.1	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.07362 S, -48.89258 O	Frutal, MG	MG049894	070-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049899	071-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049906	073-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049855	077-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049856	078-A171T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049862	082-A171T08.0	X	380	--	--

An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049863	083-A171T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049867	087-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049868	088-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049883	093-A171T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049869	011-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.07362 S, -48.89258 O	Frutal, MG	MG049901	115-A171T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049878	122-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049881	124-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049887	128-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049870	013-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049889	133-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049828	134-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049844	136-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049845	141-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049846	143-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049893	144-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049847	147-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049897	149-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049871	015-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.02527 S, -49.07638 O	Frutal, MG	MG049898	154-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049836	155-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049873	016-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049875	017-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049876	018-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049814	019-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049840	002-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049877	020-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049879	021-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049880	022-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.0354 S, -48.8763 O	Frutal, MG	MG049851	023-A181T08.0	X	381	--	--
An. arthuri s.l	-20.0354 S, -48.8763 O	Frutal, MG	MG049852	025-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.03356 S, -48.87683 O	Frutal, MG	MG049886	026-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049888	031-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.10358 S, -48.95868 O	Frutal, MG	MG049890	033-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049825	050-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049864	051-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049827	052-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049884	053-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049892	054-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049895	055-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049850	056-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049907	058-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049854	060-A181T08.0	X	380	--	--

An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049857	063-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049839	064-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049823	065-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049853	066-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049865	067-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049885	069-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049829	071-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049896	072-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049848	073-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049838	083-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049858	086-A181T08.0	X	380	--	--
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049860	088-A181T08.0	X	380	X	X
An. arthuri s.l	-20.00045 S, -49.12912 O	Frutal, MG	MG049866	094-A181T08.0	X	380	--	--
An. strodei s.s.	**-15.090910 S, -39.343700 O**	**São José da Vitória, BA**	**KC330297**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-19.916667 S, -40.600000 O**	**Santa Teresa, ES**	**FJ178875**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-21.587778, S, -43.265834 O**	**Coronel Pacheco, MG**	**GU226693**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-21.587778 S, -43.265834 O**	**Coronel Pacheco, MG**	**GU226694**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-25.265361 S, -54.309583 O**	**São Miguel do Iguaçu, PR**	**KC330299**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-20.745598 S, -44.915613 O**	**Oliveira, MG**	**KC330298**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-29.589556 S, -50.262639 O**	**Maquiné, RS**	**KC330300**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-22.999333 S, -45.495361 O**	**Pindamonhangaba, SP**	**KC330301.1**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-22.999333 S, -45.495361 O**	**Pindamonhangaba, SP**	**KC330302**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-21.618861 S, -50.940000 O**	**Lucélia, SP**	**GU226696**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-21.618861 S, -50.940000 O**	**Lucélia, SP**	**GU226698**	--	**X**	**361**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-21.681417 S, -50.919889 O**	**Inubia Paulista, SP**	**GU226697**	--	**X**	**361**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-23.318889 S, -46.586944 O**	**Mairiporã, SP**	**KC330303**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. strodei s.s.	**-22.134694 S, -48.391722 O**	**Dourado, SP**	**KC330305**	--	**X**	**360**	**--**	**--**
An. arthuri A	**-21.681417 S, -50.919889 O**	**Inubia Paulista, SP**	**GU226699.1**	--	**X**	**378**	**--**	**--**
An. arthuri A	**-21.538836 S, -43.200856 O**	**Goianá, MG**	**GU226723.1**	--	**X**	**374**	**--**	**--**
An. arthuri A	**- 19.981278 S, -49.096028 O**	**Frutal, MG**	**FJ178881.1**	--	**X**	**377**	**--**	**--**
An. arthuri A	**-18.906128 S, -51.024917 O**	**Itarumã, GO**	**KC330279-KC330282***	--	**X**	**374**	**--**	**--**
An. arthuri A	**-19.988472 S, -49.093361 O**	**Frutal, MG**	**FJ178880**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri A	**-20.025278 S, -49.076500 O**	**Frutal, MG**	**GU226707-GU226711***	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri A	**-20.746389 S, -44.915278 O**	**Oliveira, MG**	**KC330283**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri A	**-20.745598 S, -44.915613 O**	**Oliveira, MG**	**KC330285**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri A	**-20.712500 S, -44.974444 O**	**Oliveira, MG**	**KC330290**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri A	**-20.768428 S, -44.878209 O**	**Oliveira, MG**	**KC330292**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri B	**-3.8867500 S, -41.001250 O**	**Ubajara, CE**	**KC330269**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri B	**-3.8442220 S, -40.897778 O**	**Ubajara, CE**	**KC330271**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri B	**-4.0964170 S, -40.896361 O**	**São Benedito, CE**	**KC330273**	--	**X**	**380**	**--**	**--**

An. arthuri C	**-10.637639 S, -65.499833 O**	**Campo Novo de Rondônia, RO**	**KC330293**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri C	**-10.637639 S, -65.499833 O**	**Campo Novo de Rondônia, RO**	**KC330294**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri C	**-10.268639 S, -63.555389 O**	**Monte Negro, RO**	**GU226729**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. arthuri D	**-20.754444 S, -44.917222 O**	**São Franscisco de Paula, MG**	**KC330291**	--	**X**	**380**	**--**	**--**
An. albertoi	**-20.025278 S, -49.076500 O**	**Frutal, MG**	**FJ178888.1**	--	**X**	**372**	**--**	**--**

*Dois códigos de acesso no *GenBank*: significam que duas sequências foram depositadas neste banco de dados (indivíduos clonados). Em negrito as amostras cedidas por M.A.M.S.

Ao final da centrifugação, formaram-se duas fases na mistura, conservou-se o sobrenadante (ácidos nucléicos e sais) e descartou-se o precipitado (peptídeos). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e a ele foi adicionado 600 µl de etanol 100%, para a precipitação do DNA. Uma nova centrifugação de 5 minutos a 12.000 g em temperatura ambiente, foi realizada após 5 minutos de incubação nesta mesma temperatura. O sobrenadante foi descartado e 1 ml de etanol (70%) foi adicionado ao precipitado, e a mistura foi submetida à última centrifugação em temperatura ambiente a 12.000 g (FRC) por cinco minutos. O *pellet* (precipitado) de cada espécime foi seco e ressuspendido em 20 µl de água milli-Q (Millipore) (modificado de Jowett [188]).

3.4.2.2 Amplificação e purificação da região do ITS2

A região do ITS2 foi amplificada por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando os iniciadores (*primers*) 5.8S (5′-ATC ACT CGG CTC GTG GAT CG-3′) e 28S (5′-ATG CTT AAA TTT AGG GGG TAG TC-3′) [40]. Cada reação foi preparada em uma mistura aquosa de 25 µl contendo 1 µl da solução de extração de DNA e as seguintes soluções com suas respectivas concentrações finais: 1X PCR *buffer* (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl2 (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP, 0,1 µM de cada iniciador (5.8S - *forward,* 28S - *reverse*), 1,25 µl de DMSO (Sigma, 5%), 1,25 U da enzima Platinum^{TM} *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume final de 25 µl. As condições para as reações foram: um ciclo de 94 ºC durante 3 minutos, 35 ciclos de: 94 ºC durante 30 segundos para a desnaturação, 60 ºC durante 30 segundos, para anelamento (*annealing*) e 72 ºC durante 30 segundos para extensão, por fim foi realizado um ciclo final de 72 ºC por 5 minutos. Os produtos da PCR foram purificados utilizando solução de PEG [Polietilenoglicol 8.000 (20 %); NaCl (2,5 M)]. Para isso, foram adicionados volumes iguais de PEG 20% e dos produtos de PCR em microtubos, os quais foram rapidamente agitados por meio da utilização de agitador do tipo vórtex, e incubados a 37 ºC por 15 minutos, seguido por uma centrifugação de 15 minutos a 16.110 g (FRC). O sobrenadante foi desprezado, e ao *pellet* foram adicionados 200 µl de álcool etílico gelado (80%), centrifugado a 16.110 g (FRC) por 15 minutos a 4 ºC e o álcool desprezado. Este processo se repetiu mais uma vez e o produto foi então desidratado e ressuspendido em 10 µl de água.

3.4.2.3 Eletroforese em gel de agarose

Tanto as extrações de DNA, quanto as amplificações e suas respectivas purificações foram conferidas qualitativamente por meio de eletroforeses em agarose, seguindo descrições de Sambrook et al. [189]. As eletroforeses foram realizadas em cuba transversal a 80 V, utilizando como tampão de corrida o TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X. Em geral, foram aplicados 2 µl do material amplificado, 1 µl de azul de bromofenol e 1 µl de GelRed™ (Biotium) 1:5.000. Como padrão de comparação, marcadores de massa molecular (1 µl) foram utilizados. Os géis foram observados por meio de um fotodocumentador digital UVP sob radiação ultravioleta de 300 nm.

3.4.2.4 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no sentido 5'-3' (*forward*), usando: 0,5 µl de Bigdye® Terminator v 3.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 2,0 µl de 5X Buffer (*Applied Biosystems*), 1,0 µl de DMSO (Sigma, 5 %), 1,0 µl do iniciador 5.8S (3,6 pmol / µl), 4,5 µl de água milli-Q (Millipore) e 1,0 µl do produto da PCR purificado. O perfil térmico utilizado foi: 25 ciclos de 96 ºC por 15 segundos, 50 ºC durante 15 segundos, e 60 ºC durante 4 minutos. As reações de sequenciamento foram purificadas em colunas de *Sephadex* (*SEparation PHArmacia DEXtran*) G50® (GE *HealthCare*) e o sequenciamento da região do ITS2 foi realizado por meio do método *Sanger.*

3.4.2.5 Comparativo e validação das sequências

As sequências de ITS2 foram editadas com o programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5 [190]. Após edição, estas mesmas sequências foram alinhadas a sequências de ITS2 completo de *An. arthuri s.l.* (código de acesso no *GenBank*: GU226699.1, 370 pb), e de *An. strodei s.s.* (código de acesso no *GenBank*: FJ178875.1, 360pb), as quais foram consideradas como referência para este estudo, e em seguida foram trimadas (*trimming*).

Em seguida, as sequências foram comparadas a uma série de sequências depositadas no *GenBank,* por meio da Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local de Nucleotídeos (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*,

BLASTn, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) a qual encontra regiões de similaridade entre sequências biológicas, comparando sequências de nucleotídeos em um BD e calculando a significância estatística destas comparações. Isso foi feito, para obter uma identificação taxonômica molecular preliminar.

A partir disso, 88 sequências obtidas neste estudo (*An. arthuri*, n = 80 e *An. strodei*, n = 8) foram alinhadas (Apêndice A) junto a 32 sequências cedidas pela Dra. M.A.M.S., *An. strodei s.s.* (n= 14), *An. arthuri* A (n= 10), *An. arthuri* B (n=3), *An. arthuri* C (n=3), *An. arthuri* D (n=1) e *An. albertoi* (n= 1), por meio do algoritmo Muscle [191] no programa Sequencher® versão 5.4.6. Em seguida, as sequências foram analisadas em busca de sítios diagnósticos, os quais corroborassem a diferenciação molecular específica entre *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.*

Por fim, foi construído um dendrograma de similaridade, utilizando o algoritmo *neighbor-joining*, (1000 *bootstraps*) por meio do programa MEGA [192] para avaliar a distância genética das sequências obtidas no presente estudo com as sequências cedidas pela Prof. Dra. M.A.M.S. e outras 10 espécies pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus* (*An. aquasalis s.l.*, *An. rangeli s.l.*, *An. dunhami s.l.*, *An. galvaoi*, *An. argyritarsis*, *An. darlingi*, *An. albitarsis s.l.*, *An. albimanus*, *An. triannulatus s.l.* e *An. braziliensis*) – obtidas no Genbank. Para isso, foi utilizada uma pequena amostra do total de sequências obtidas neste estudo. Para garantir que não estivesse ocorrendo má interpretação quanto à localização das sequências no dendrograma, a mesma análise comparativa contendo todas as amostras obtidas neste estudo, foi realizada (dados não mostrados).

3.4.2.6 Morfometria geométrica alar

Para visualizar a diferenciação morfológica entre *An. arthuri s.l. e An. strodei s.s.*, asas direitas de 29 indivíduos (24 e 5, respectivamente), foram utilizados para as análises. Como supracitado, apesar de o conjunto de 18 PA ser suficiente para diferentes estudos, não há um consenso na comunidade científica sobre a quantidade de PA úteis para diferenciação de espécies crípticas. Por não haver ideal *a priori*, sugerimos a utilização comparativa de dois diferentes conjuntos de PA (18 e 22) para avaliar viabilidade diagnóstica (Figura 11). A metodologia utilizada foi a mesma descrita anteriormente (item 3.2), sendo que o TC foi calculado e

representado por meio dos programas TpsRelW e Statistica, respectivamente e os extremos de diferenciação por meio do programa MorphoJ. Além disso, o pacote *Mclust* do programa R foi utilizado para avaliar a presença de indícios de subgrupos dentro da entidade taxonômica *An. arthuri s.l.*

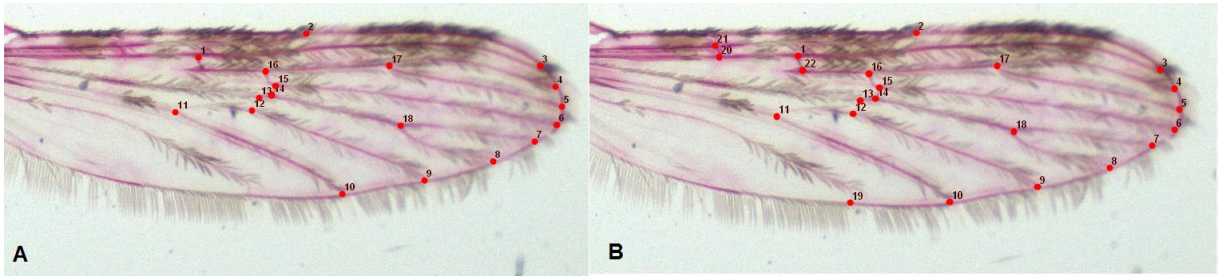

Figura 11 - Asa direita *de Anopheles arthuri s. l.* com: A) 18 e B) 22 pontos anatômicos anotados.

3.5 Modelagem e Implementação do Banco de Dados Relacional do *WingBank*

A plataforma *WingBank* foi desenvolvida para o armazenamento, integração e recuperação de diferentes dados biológicos (p.e., classificação taxonômica, imagem das asas, sexo do indivíduo, etc.), dados geográficos e espaço-temporais (p.e., data e local de coleta), dados ambientais (p.e., condições laboratoriais, tipo de área de coleta), e de recursos humanos (p.e., pessoa responsável pela colônia, pela coleta de campo, etc.), visando otimizar estudos de meta- e re-análises relacionados à morfometria geométrica e/ou taxonomia integrativa.

Para a construção de esquemas, foi adotada como nomeação adequada palavras no singular e a convenção *UpperCamelCase* (ou *PascalCase*), a qual representa a “prática de escrever palavras compostas”, nas quais as palavras são iniciadas com letra maiúscula e unidas sem espaço [193]. Ademais, os tipos de dados utilizados neste trabalho foram baseados nas definições do SGBD Microsoft SQL Server 2008. Desse modo, os *datatypes* apresentados neste estudo são específicos para este SGBD.

O idioma adotado para o desenvolvimento e implementação do *WingBank* foi o Inglês, visto que esta é considerada a língua universal e que se deseja que este BD seja acessado por usuários de toda parte do mundo. Ademais, optou-se por manter dois registros (português ou “língua original” / inglês) no BD para *SpecificLocality* e *InstitutionName*, os quais possuem nomes de locais e instituições que podem ter

características nominais específicas em cada idioma, pois se deseja que a busca seja efetiva, independente do idioma dos usuários. As imagens e seus metadados estão sob a Licença Creative Commons – Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) - <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.

3.5.1 Equipe de desenvolvimento

O desenvolvimento do *WingBank* contou com uma equipe multidisciplinar, na qual atuei como coordenadora e desenvolvedora. As atribuições de cada membro desta equipe, encontram-se a seguir:

Eu, Flávia Virginio Fonseca (F.V.F.), doutoranda em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro), pelo Departamento de Parasitologia ICB-USP, levantei os requisitos para o desenvolvimento deste BD e o modelei.

Prof. Dr. Lincoln Suesdek (L.S.), meu orientador, pesquisador PqC-VI do Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, formulou a ideia inicial (Programa Nacional de Incentivo à Pesquisa em Parasitologia Básica CAPES - Edital nº 032/2010) e propôs o nome do projeto.

Prof. Dra. Kelly Rosa Braghetto (K.R.B.), professora do Departamento de Ciência da Computação IME-USP, orientou-me no desenvolvimento da modelagem do BD e instruiu-me sobre conceitos básicos durante a disciplina “lBI5013 - Banco de Dados para Bioinformática”, na qual participei como ouvinte.

Lucas Miranda Andrade (L.M.A.), arquiteto de sistemas do Instituto Butantan, criou o esquema do BD no SGBD e inseriu nele os dados previamente existentes.

Victor Luiz Domingues (V.L.D.), aluno de graduação em Ciências da Computação, implementou o sistema *web* que interfaceia a interação dos usuários finais com o BD.

Como supracitado, o projeto de um BD relacional envolve quatro fases: levantamento de requisitos, projeto conceitual, projeto lógico e projeto físico [168]. Nas seções seguintes serão detalhadas cada uma das etapas de criação do *WingBank*.

3.5.2 Levantamento de requisitos

Para a implementação do sistema de BD, foi realizado por mim, por meio de reuniões junto aos pesquisadores pertencentes ao grupo MosquitoLab e com base nos formulários e diretrizes de coleta de dados propostos por Gaffigan e Pecor [194] e Foley et al. [195], um levantamento de dados com o qual se pode identificar os principais requisitos para a elaboração do *WingBank*. Então, pode-se caracterizar os tipos de dados desejáveis para armazenamento no *WingBank* e as funcionalidades de consulta e de manutenção de dados a serem oferecidas aos usuários por meio do sistema *web*. O público para o qual este banco é destinado *a priori* é: estudantes de graduação e pós-graduação, pesquisadores científicos e funcionários de áreas da saúde, como vigilância entomo- e epidemiológica.

Sendo assim, os principais tipos de dados (Figura 12) do *WingBank* são os de Origem: Campo e/ou Colônia, e/ou Doação; de Imagens da Asa, as quais podem ser asas direita e/ou esquerda e podem ser relacionadas com alguma Publicação Científica e também com Anotações de PA; Classificação Taxonômica (Família, Subfamília, Tribo, Gênero, Subgênero, Espécie, Subespécie), Método de Classificação, onde se pode relatar qual o método utilizado (Molecular ou Morfológico); e a pessoa responsável por cada indivíduo. O relacionamento da Imagem da Asa com uma Publicação Científica é um requisito para que os dados de um indivíduo possam ser disponibilizados publicamente.

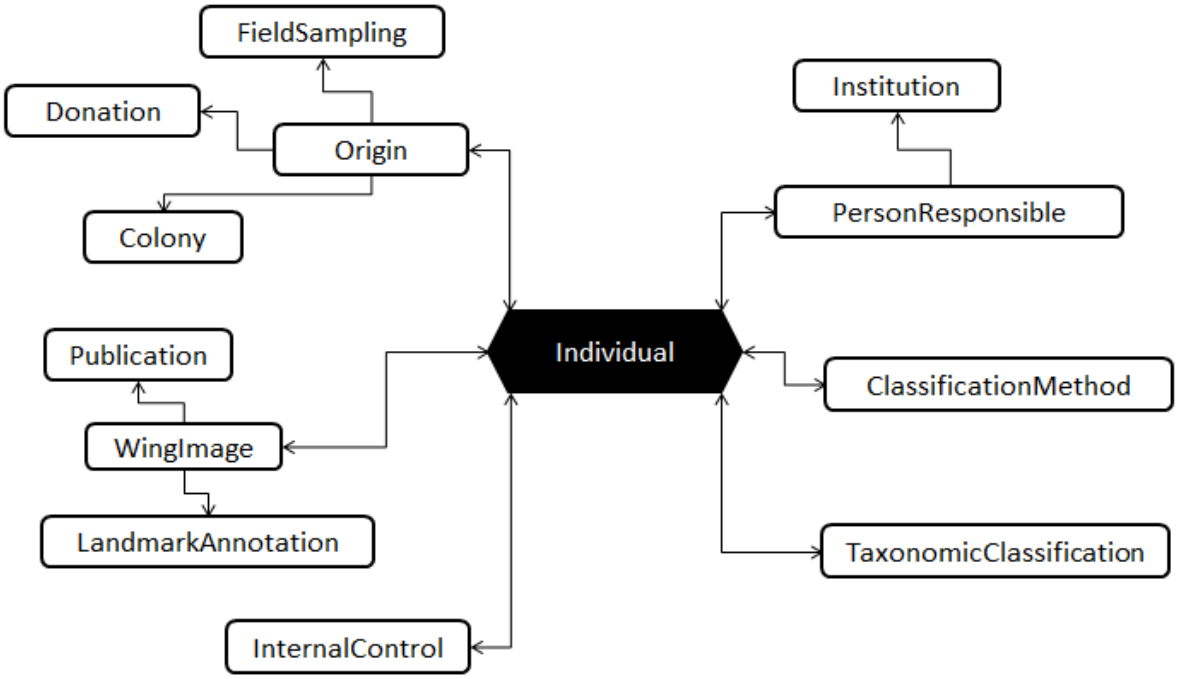

Figura 12 - Diagrama geral da plataforma *WingBank* e abstração dos dados, baseado em seis tópicos principais: Origem, Imagem da Asa, Controle Interno, Classificação Taxonômica, Método de Classificação e Pessoa Responsável.

3.5.3 Projeto Conceitual

Após o levantamento dos requisitos, iniciei a construção do Projeto Conceitual do BD *WingBank*. Baseado no MER Estendido, com a notação proposta por Chen [171], o DER foi construído no programa de código aberto Dia Diagram Editor v 0.97.2 (http://live.gnome.org/Dia) (Figura 13). Este modelo foi escolhido por ser amplamente usado no auxílio à modelagem de BDs relacionais, ter uma notação bastante expressiva, mas de fácil compreensão, e por suprir as necessidades de abstração para esta fase de modelagem do *WingBank*. Após a construção do DER, este modelo foi validado com os pesquisadores do MosquitoLab.

O modelo conceitual representa a seguinte situação: Um indivíduo (fêmea ou macho) é taxonomicamente classificado a partir de um método e com base em uma referência específica. As informações taxonômicas de cada indivíduo podem ser apresentadas em diferentes níveis: Família, Subfamília, Tribo, Gênero, Espécie e Subespécie.

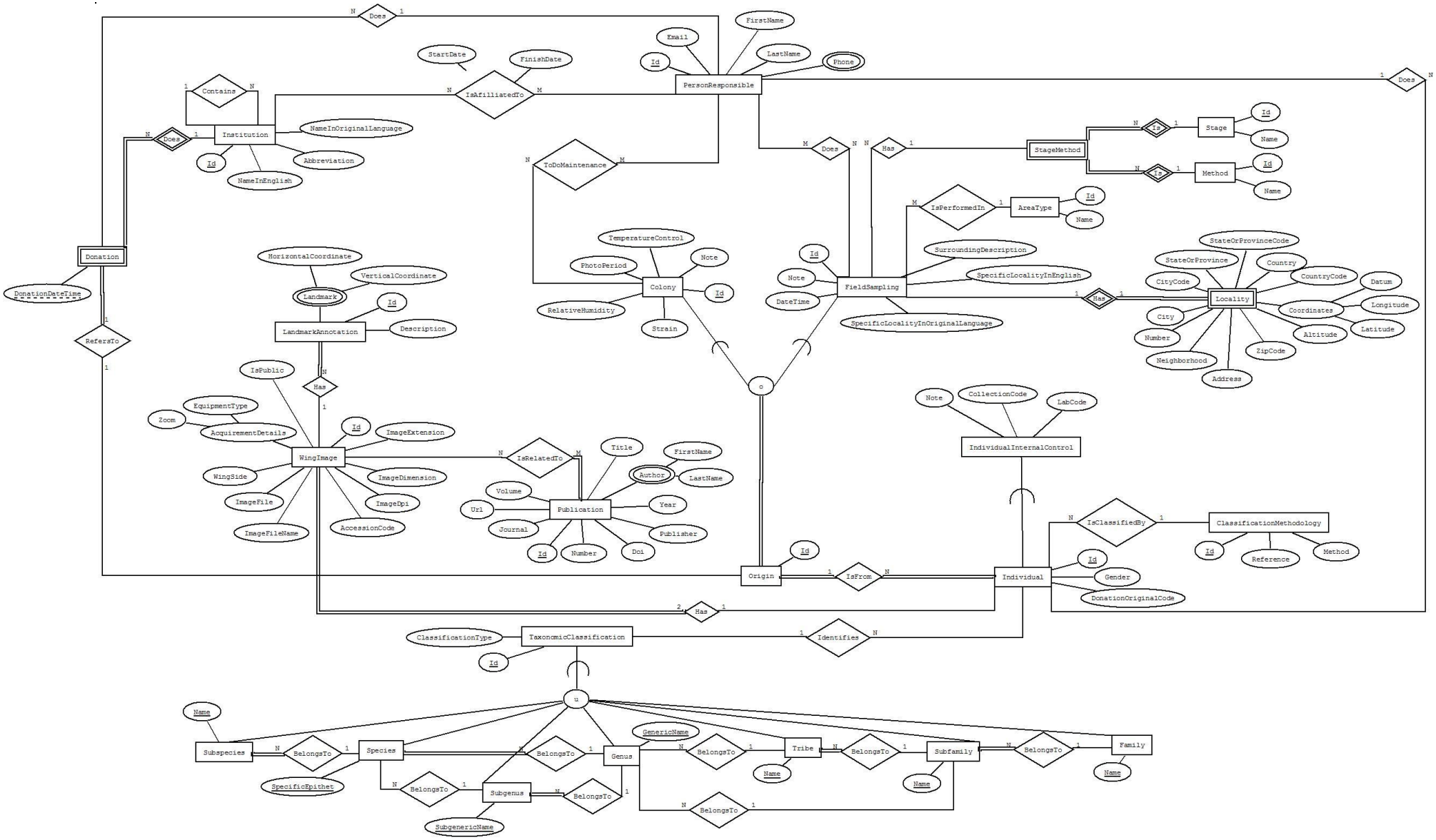

Figura 13 - Representação do Projeto Conceitual do *WingBank* por meio de um Diagrama Entidade-Relacionamento (DER) Estendido.

Caso o indivíduo tenha sido originado a partir de uma doação e possua um código original (*DonationOriginalCode*), este código é mantido nos registros. Caso este indivíduo seja de propriedade do MosquitoLab, ele possui um código interno (*LabCode*) e se já estiver depositado no LECZ, receberá um código tombo (*CollectionCode)*. Cada indivíduo pode ter origem em uma Coleta de Campo, em uma Colônia de Laboratório, além de poder ser Coletado e em seguida Colonizado, além de poder ser Doado (o qual originalmente também pode ter sido coletado e/ou colonizado). Caso o indivíduo seja resultado de uma coleta, possui informações referentes ao estágio coletado, método de coleta, data de coleta, localização generalista e específica, informações da redondeza da área de coleta, tipo de área, etc. Caso o indivíduo seja originário de colônia artificial de laboratório, possui informações referentes às condições laboratoriais, como temperatura, umidade relativa do ar, etc. Existem pessoas responsáveis por cada passo, pelo qual os indivíduos passaram, como coleta, colonização, doação e classificação taxonômica. Estas pessoas por sua vez, estão vinculadas a uma ou mais Instituições.

Cada indivíduo pode possuir até duas imagens de suas asas (direita e esquerda). Estas imagens possuem informações específicas, como: resolução, dimensão, extensão, etc. Caso a imagem seja de um indivíduo que faça parte de um grupo que já foi utilizado em uma ou mais publicações científicas, ele recebe uma "sinalização" de que é público, o que faz com que ele seja disponibilizado para download. Para uma imagem ser considerada "pública", ela deve possuir informações referentes à (as) publicação (ões) científica (s). Ademais, cada imagem pode possuir uma ou mais anotações de PA.

O *WingBank* é composto por tipos de entidades concretas (ex.: *Publication*) e abstratas (ex.: *FieldSampling*); atributos compostos e simples (ex.: *Coordinates* e *Altitude* em *Locality*, respectivamente), mono e multivalorados (ex.: *Email* e *Phone* em *PersonResponsible*, respectivamente), e complexos (ex.: *Author* em *Publication*). Os atributos chave (ou seja, que identificam univocamente suas entidades) são denotados por um sublinhado sob o seu nome (por exemplo, *Id* na maioria das entidades), enquanto que os que são chaves parciais são denotados por uma linha tracejada (como em *DonationDateTime*). Trata-se de um DER Estendido, pois algumas restrições específicas foram aplicadas, como a especialização sobreposta total de *Origin* (*Colony* e *FieldSampling*), a especialização de *Individual* (*IndividualInternalControl)*; e a categoria ou tipo de união parcial da classe

TaxonomicClassification, a qual controla parcialmente a união entre as superclasses *Family, Subfamily, Tribe, Genus, Subgenus, Species e Subspecies*).

O tipo de entidade fraca *StageMethod* não possui atributos (algo incomum) pois foi criada para representar um relacionamento binário entre *Stage* e *Method* e, então, possibilitar sua associação a *FieldSampling*. Os tipos de entidades fracas como *Locality* não receberam chave parcial, pois participam de um relacionamento 1:1 com *Sampling*, ou seja, se cada *Sampling* pode possuir apenas 1 *Locality*, então a chave de *Locality* pode ser a própria chave de *Sampling*.

Ademais, considerando a importância do compartilhamento de coordenadas computadas em BD morfométricos, como mencionado por Garros e Dujardin [79], a modelagem do *WingBank* inclui os tipos de entidades *LandmarkAnnotation* e *Landmark,* as quais possibilitam o armazenamento de coordenadas computadas cruas (pontos anatômicos, semi pontos e pontos tomados no contorno das asas).

Alguns tipos de entidades receberam valores pré-definidos (Tabela 7), como é o caso do tipo de entidade *AreaType,* na qual os valores do atributo *Name*, foram restritos a *Park*, o qual representa Parque Urbano ou Parque Linear; *Urban,* o qual se refere a áreas distribuídas pelas cidades; *Preserved,* o qual representa Áreas Florestadas, Áreas de Proteção Ambiental, Unidades de Conservação, ou Áreas de Preservação Permanente; e *Rural,* o qual representa Agricultura e Pecuária.

Tabela 6 - Descritivo dos domínios do atributo *Name* da entidade *AreaType.*

Valor do domínio	Descrição
Park	Parque Urbano Parque Linear
Urban	Cidade
Preserved	Área Florestada Área de Proteção Ambiental Unidade de Conservação Área de Preservação Permanente
Rural	Agricultura Pecuária

Outros tipos de entidades como *Stage* e *Method*, a princípio, receberam valores restritos para o atributo *Name*, como: *Immature, Egg, Larva (1st stage), Larva (2nd stage), Larva (3rd stage), Larva (4th stage), Larva, Pupa, Adult, Imature/Adult e Manual Sampling, Manual Aspiration, Metal / Plastic Scoop, Fine*

Mesh, Pasteur Pipette / Dropper, Manual suction pump, Metal Ladle, Entomological Manual Aspirator, Entomological Automatic Aspirator, Trap, Egg Trap, Larva Trap, Adult Trap, CDC, Shannon, New Jersey, MoquitoMagnet, Manual Sampliing / Manual Aspiration, respectivamente. Por fim, o tipo de entidade *ClassificationMethodology* recebeu apenas dois diferentes valores para o atributo *ClassificationMethod:* Morphological ou Molecular.

3.5.4 Projeto Lógico

Após a construção do Modelo Conceitual, utilizando o programa *Visual Paradigm Community* 14.1 (uso não comercial) (https://www.visual-paradigm.com/) foi realizado o mapeamento do DER para um Modelo Lógico, o Modelo de Dados Relacional (Figura 14). No diagrama do esquema relacional, foi utilizada a notação "pé de galinha" [196] para indicar as cardinalidades dos relacionamentos estabelecidos por meio das chaves estrangeiras. Neste esquema, o domínio de cada atributo foi definido.

Como os dados armazenados atualmente no *WingBank* foram coletados no passado e com menos homogeneidade, parte dos atributos podem receber o valor especial NULL, uma vez que os valores desses atributos para alguns dos registros previamente coletados são desconhecidos. Vale ressaltar que isso não significa que estes campos serão permanentemente nulos. Espera-se que os novos registros sejam mais completos. Ademais, além das restrições implícitas e explícitas adicionadas desde o modelo lógico, as restrições semânticas (regras de negócio) foram descritas e um dicionário de dados (Apêndice B) elaborado.

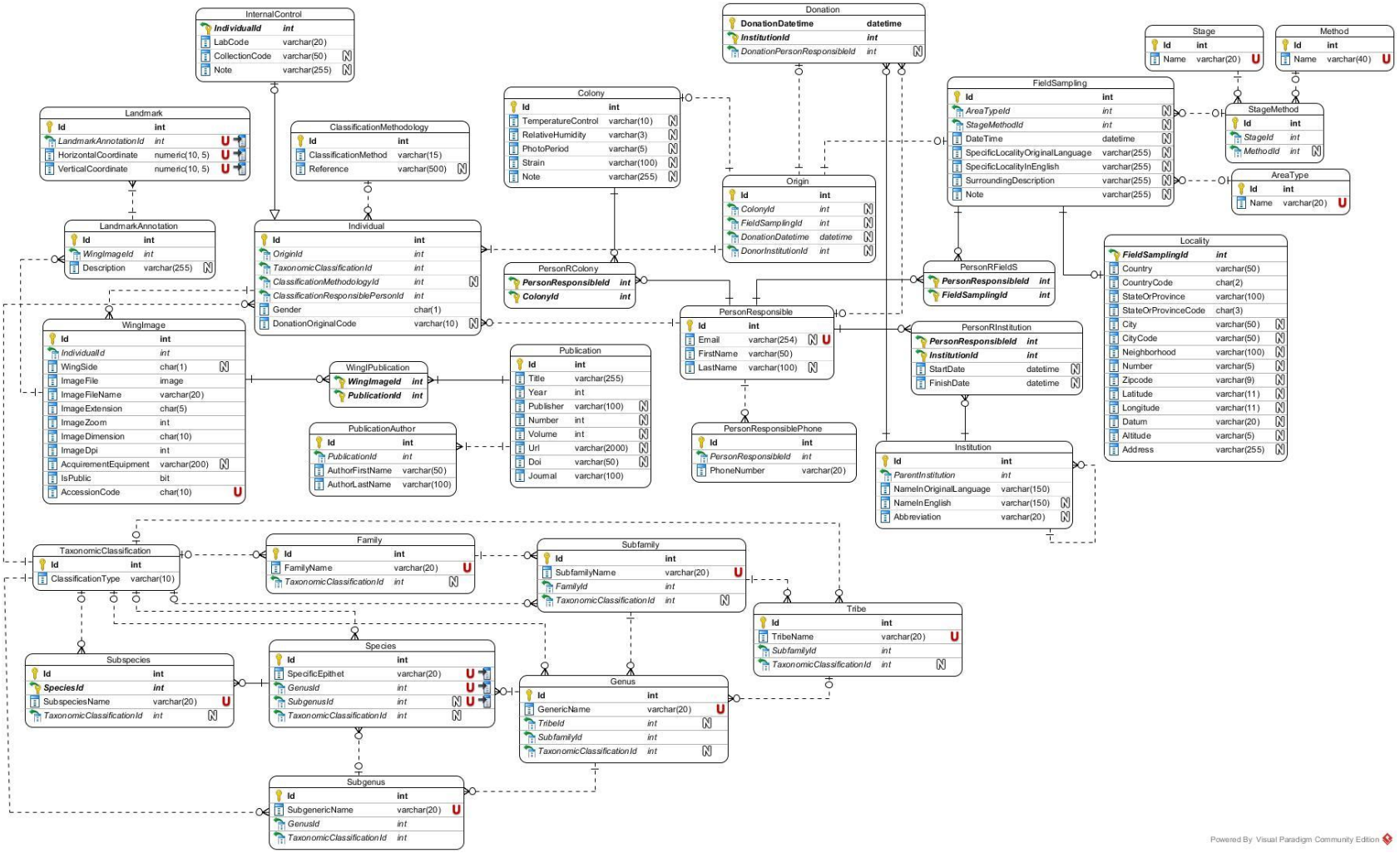

Figura 14 - Representação do Modelo Lógico (modelo de dados relacional) do *WingBank*. Regra de negócio: Na entidade Genus, caso possua '*TribeId*' não aceitar '*SubfamilyId*' (e vice-versa), caso contrário poderá ocorrer uma inconsistência entre os valores dos atributos *Genus* (*SubfamilyId*) e *Tribe (SubfamilyId).*

3.5.5 Projeto Físico

O SGBD usado para criar e manter o BD *WingBank* foi o Microsoft SQL Server (MS-SQL). Devido a isso, os comandos SQL usados para criar o BD apresentam algumas particularidades deste sistema gerenciador, como por exemplo os *data types*: *'datetime', 'image' e 'bit'.* O esquema relacional do projeto lógico sofreu algumas alterações durante o desenvolvimento do projeto físico. Por este motivo e devido às funcionalidades do programa *Visual Paradigm* (as quais tornam similares os esquemas lógico e físico), decidiu-se representar todos os detalhamentos do projeto físico já no esquema lógico. Um dos exemplos é a definição de índices para *SpecificEpithet, GenusId* e *SubgenusId* em *Species* e a adição de chaves principais substitutas (também conhecidas como chaves artificiais) em praticamente todas as relações, para otimizar o processo de busca e futuras edições. Para chaves desse tipo são atribuídos valores que são números inteiros sequenciais gerados automaticamente. Tabelas como *Donation*, a qual possui a função de "histórico", ou seja, registra todos os estados de um item de dado conforme o tempo passa, não receberam a chave substituta.

3.5.6 Implementação do WingBank

3.5.6.1 Criação do *WingBank*

O conteúdo diagramado nos modelos conceitual, lógico e físico foi transcrito para a linguagem usada no SGBD MS-SQL, a *Transact-SQL* com código gerado em ANSI. Esta fase, bem como parte da próxima (item 3.5.6.2, Carga de dados pré-existentes) foi desenvolvida sob responsabilidade do colaborador L.M.A., por se tratar de uma colaboração que utiliza a infraestrutura tecnológica do Instituto Butantan.

3.5.6.2 Carga dos dados pré-existentes

Parte da limpeza de dados (*data cleaning*) foi feita manualmente por mim, e a outra parte, juntamente com a alimentação do banco, foi realizada por meio de *scripts* em SQL implementados por L.M.A.. Todos os registros armazenados no

WingBank até o momento são resultado de 10 anos de coletas e estudos de MGA obtidos pelo grupo de pesquisa MosquitoLab, do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, ou seja, até o momento, nenhum dado externo foi adicionado a este BD.

Para a obtenção de conhecimento útil a partir dos dados, é necessário que eles sejam claros. No entanto, muitos bancos possuem dados redundantes e inconsistentes, valores faltantes, além de valores e campos que não se relacionam logicamente entre si estocados em uma mesma tabela [197-200]. Para evitar este viés antecedente à carga dos dados, foi realizado manualmente um processo cuidadoso de inspeção, limpeza, uniformização, completação e transformação dos dados. Estas etapas remetem à metodologia de Descoberta de Conhecimento em BDs (*Knowledge Discovery in Databases*, KDD) [201], exceto pela fase de mineração de dados, a qual será desenvolvida na segunda fase de desenvolvimento do *WingBank*.

Como os dados brutos não estavam padronizados em sua totalidade houve pequena perda de informação. Por exemplo, não foram carregados para o BD: a) registros fotográficos sem informações sobre o sexo, b) informações geográficas dos casos em que, embora no registro geral (página do livro tombo) houvesse informações sobre localidade da coleta, não havia relação entre indivíduos e localidades. Outros casos específicos foram mantidos, como: c) registros fotográficos com lado não anotado, mas que não comprometeria a integridade do banco, d) asas danificadas, porém com alguns pontos conservados.

3.5.6.3 Desenvolvimento do sistema *web*

O protótipo do sistema *web* do *WingBank* foi implementado por V.L.D. A linguagem de programação utilizada foi C# .NET, padrão MVC 5, Framework .NET 4.5. Neste sistema apenas foram implementadas funcionalidades para busca, visualização e *download* de dados que possuem relação com uma publicação científica. Como esses dados são públicos, ou seja, podem ser acessados por qualquer tipo de usuário, não há funcionalidades para controle de acesso de usuários no protótipo. Futuramente, quando forem implementadas no sistema *web* funcionalidades relacionadas à inserção e manutenção de dados no banco e ao controle de acesso de usuários, os usuários do MosquitoLab poderão realizar *login*

no sistema e acessar as novas funcionalidades e todos os dados no banco (sem exceção). Ademais, em cada solicitação de download de dados, será solicitado ao usuário que concorde com um Termo de Uso (Apêndice C). A seguir, são apresentados os diagramas de Caso de Uso (Figura 15) e de Caso de Atividade (Figura 16), referentes à implementação do sistema *web WingBank*.

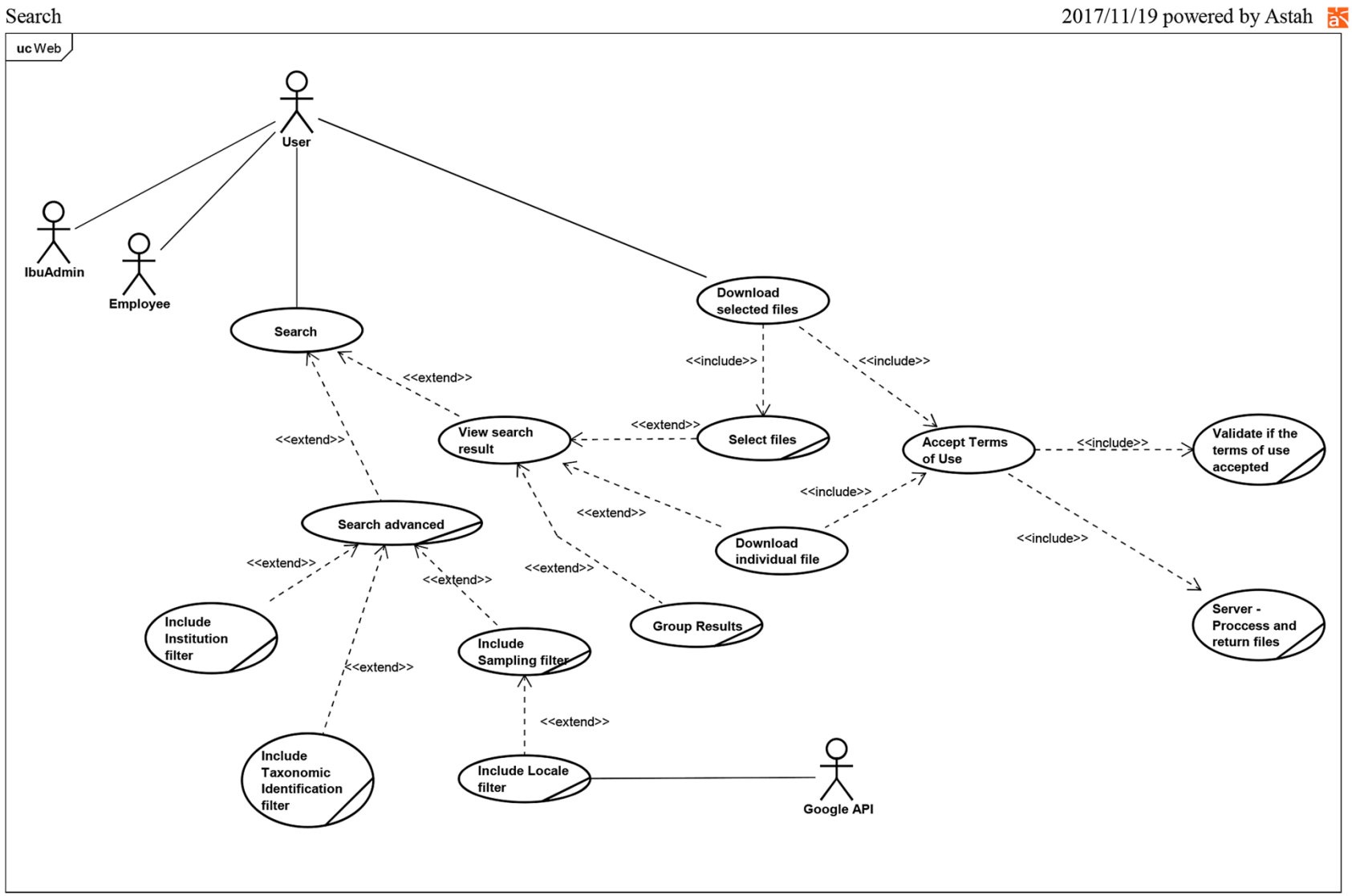

Figura 15 - Caso de Uso para o sistema de busca da plataforma *WingBank*. Diagrama por Victor L. Domingues.

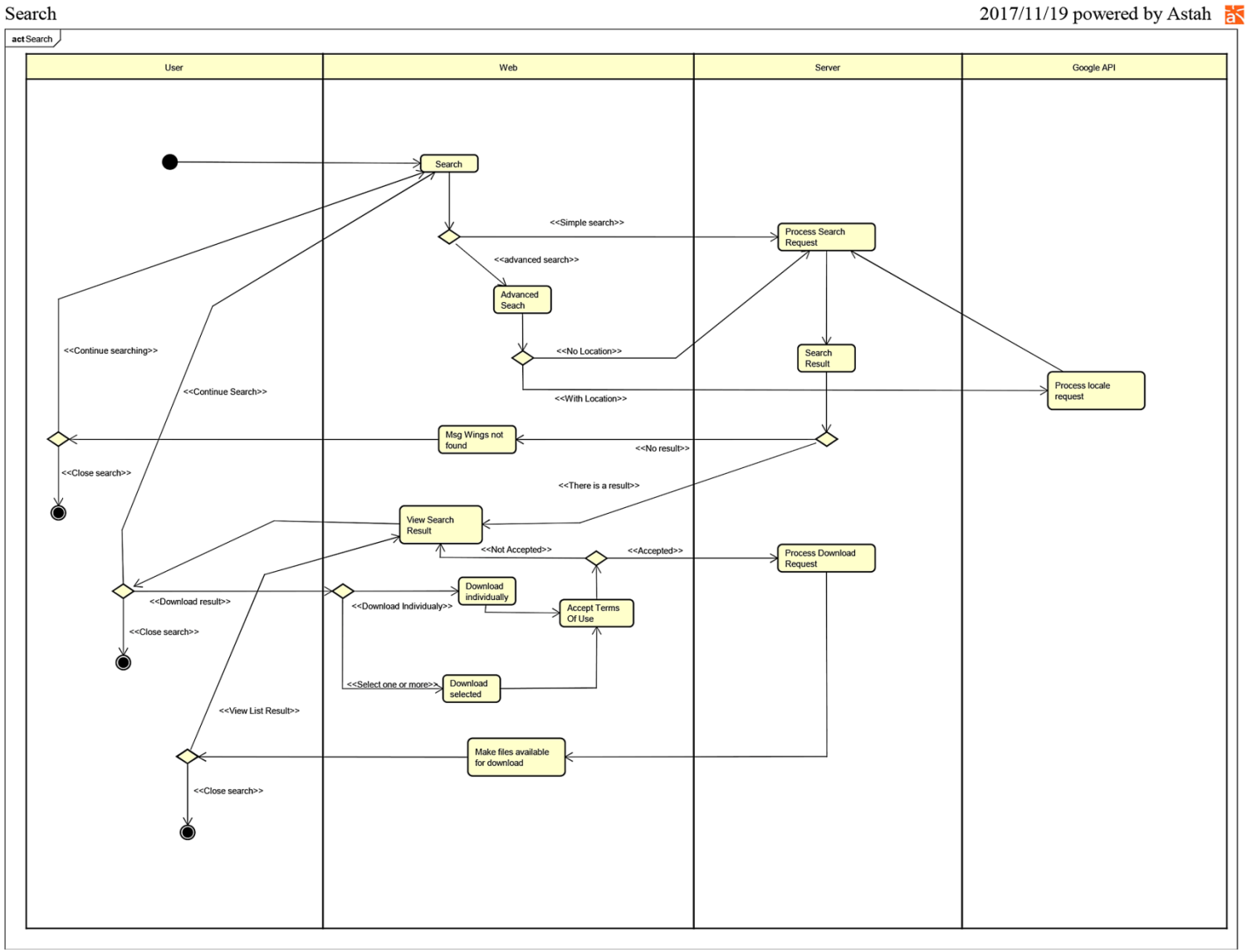

Figura 16 - Caso de Atividade para o sistema de busca da plataforma *WingBank*. Diagrama por Victor L. Domingues.

3.5.7 Padronização da rotulação das imagens

As imagens de cada asa armazenada no BD são peças fundamentais para o *WingBank*. Com a implementação deste BD, elas foram funcionalmente vinculadas a outras informações do *WingBank*, viabilizando a validação e recuperação dos dados.

Existe a possibilidade de no futuro haver registros de indivíduos mesmo que eles não possuam imagens de suas asas. No entanto, é desejável que todo cadastro feito no *WingBank* tenha imagem vinculada, visto que uma das principais funcionalidades deste banco será prover um repositório de imagens úteis para estudos de MG alar de mosquito.

Considerando a funcionalidade do MorphoJ, um dos programas comumente utilizados em análises de MG, chamada "*Extract New Classifier from ID String* ...", a qual possibilita a classificação das amostras a serem analisadas com base no nome dos arquivos (*input*), foi proposto neste estudo um padrão de nomenclatura para os arquivos de imagens das asas. Sendo assim, para cada registro no *WingBank* (imagem da asa + os demais metadados), de modo sequencial atribui-se um identificador exclusivo, o qual permanecerá constante ao longo da vida do registro. Ele acompanhará a imagem para sempre e facilitará a criação de referência da mesma em uma publicação científica, por exemplo. Este identificador consiste em uma sequência alfanumérica contendo uma letra (prefixo) que representa o sexo (F ou M) do indivíduo, uma sequência de 8 dígitos fixos não variáveis, preenchidos com zero à esquerda e uma letra (sufixo), a qual representa o lado (R ou L, de *right* e *left*), como em 'F00000001L'. Quando a informação referente ao lado é inexistente, adota-se a inserção da letra U (*Unknown*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do dimorfismo sexual alar em Culicidae, por meio da morfometria geométrica

Este estudo foi publicado no ano de 2015 na revista *Parasites and Vectors* (DOI: http://doi.org/10.1186/s13071-015-0769-6, Virginio et al. [120]), e a discussão foi atualizada para ser inserida nesta tese. Este estudo enriquece a presente tese com a demonstração da importância da MGA para resolver um dos problemas biológicos tratados aqui, o dimorfismo sexual.

A AVC revelou diferenças na forma alar em todas as espécies analisadas, entre machos e fêmeas, desse modo, pode-se claramente perceber que todas as espécies possuem DSA (Figura 17). Os valores da dM entre os sexos de cada espécie (sem alometria) foram de 7,34 a 34,06 ($p < 0,0001$), indicando uma grande variabilidade no DSA entre as espécies. *Aedes albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* foram as espécies menos e mais sexualmente dimórficas, respectivamente.

A Tabela 8 mostra a diferenciação fenética entre os sexos em cada espécie. Nela, pode-se perceber que a contribuição da alometria foi baixa (<10%) e que em alguns casos, inclusive, não foi significativa, o que reflete diretamente nas variações de dM, as quais foram unanimemente significativas, tanto com, quanto sem alometria. Comparações dos extremos de diferenciação entre fêmeas e machos, revelou grande deslocamento dos PA entre os sexos (Figura 18). Como em *Drosophila* [137, 202-204], os pontos mais variáveis foram os das regiões proximal e distal das veias radial e mediana. Fêmeas apresentaram asas ligeiramente mais largas e curtas do que os machos.

Os diagramas das distâncias pareadas (Figura 19) para as 10 espécies (separadas por sexo) corroboram o DSA encontrado em outras análises. O agrupamento “Anophelinae - machos” foi simétrico ao “Anophelinae - fêmeas”, enquanto que o agrupamento Culicinae não foi congruente entre os sexos. Esta incongruência na topologia da base dos ramos do fenograma entre os aglomerados de Culicinae sugere que as espécies desta subfamília possuem diferentes padrões de DS. Ao encontro disso, Culicinae é o agrupamento mais heterogêneo em termos de grau de DSFA e DSTA. Como Culicinae é também o táxon macroevolutivamente mais derivado, a filogenia do DS merece novas investigações.

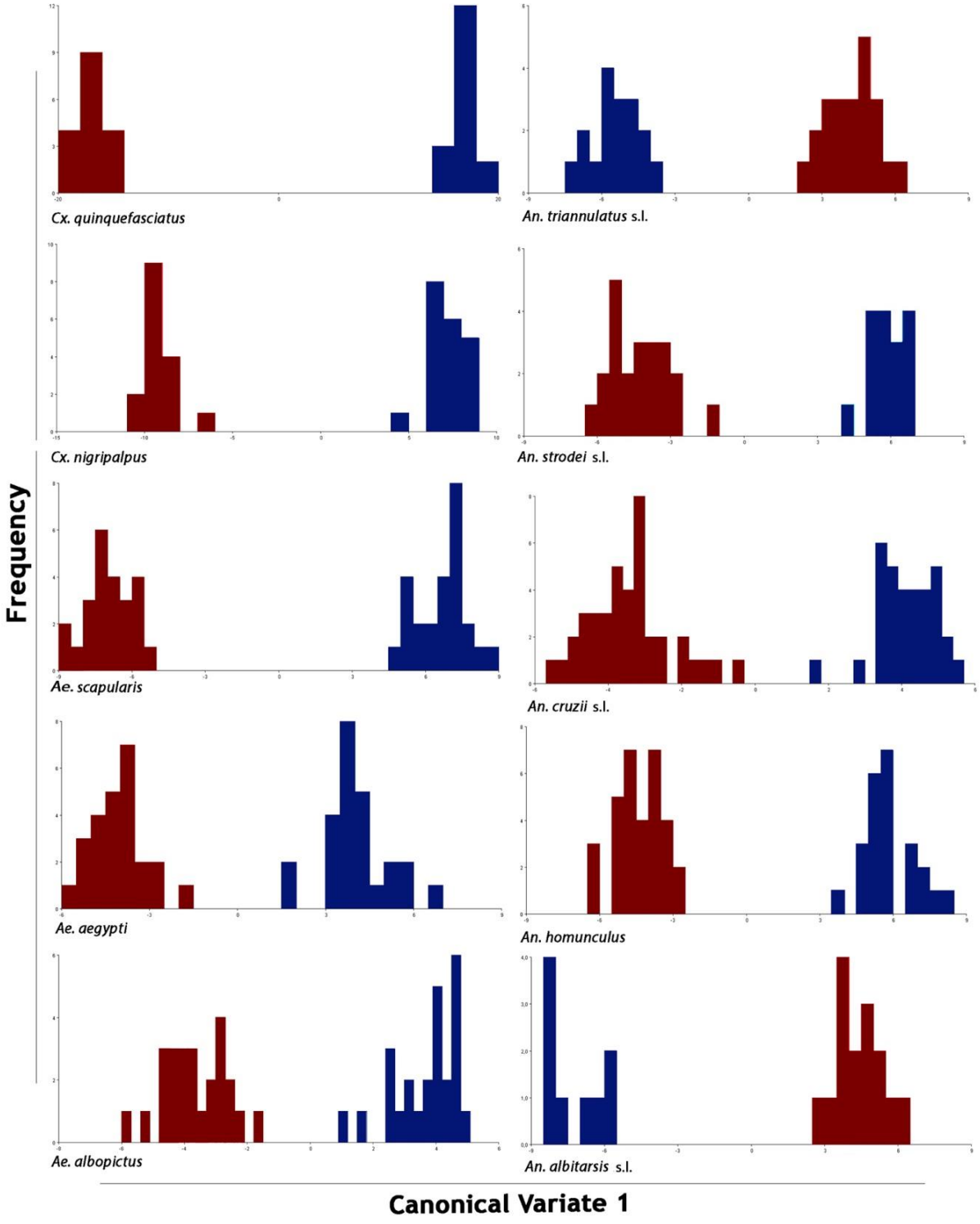

Figura 17 - Diagramas de comparação entre a forma da asa de fêmeas (vermelho) e machos (azul) com base na primeira variável canônica. Reproduzido de Virginio, et al. [120].

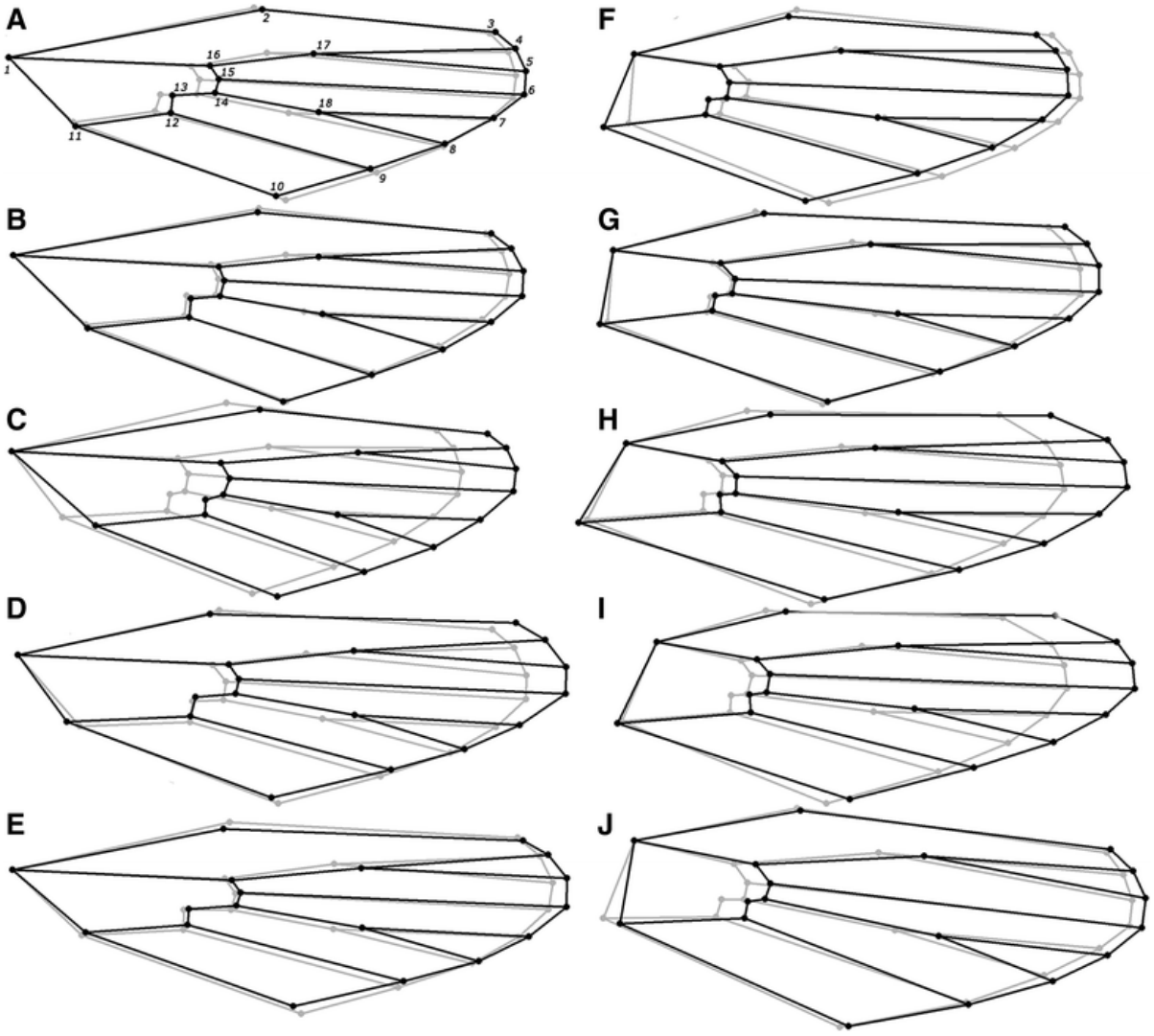

Figura 18 - Extremos de diferenciação intraespecífico. Linha cinza: fêmeas; linha preta: machos. A) *Cx. quinquefasciatus*; B) *Cx nigripalpus*; C) *Ae. scapularis*; D) *Ae. aegypti*; E) *Ae. albopictus*; F) *An. triannulatus s.l.*; G) *An. strodei s.l.*; H) *An. homunculus*; I) *An. cruzii s.l.*; J) *An. albitarsis s.l.* Magnitude da Variação de forma: 1X. Os diagramas foram sobrepostos no ponto anatômico 1. Reproduzido de Virginio et. al. [120].

Tabela 7 - Diferenciação fenética entre os sexos de cada espécie: valores do teste de reclassificação após validação, resíduos alométricos, e distâncias de Mahalanobis e suas respectivas significâncias estatísticas (reproduzido de Virginio et al., [120]).

Espécies	Nº de indiví-duos		Teste de reclassificação				Alome-tria (%)	*P*	Distância de Mahalanobis		
			Com alometria (%)		Sem alometria (%)				Com alometria	Sem alometria	*p* †
	♀	♂	♀	♂	♀	♂					
Cx. quinquefasciatus	17	17	100	100	71	71	4,57	0,1454	34,10	34,06	**<.0001**
Cx. nigripalpus	16	20	62,5	75	75	65	8,51	**0,0025**	16,70	16,62	**<.0001**
Ae. scapularis	24	25	100	100	100	96	5,64	**0,0147**	13,71	13,71	**<.0001**
An. albitarsis s.l.	15	9	87	89	53,3	67	9,50	**0,0144**	8,70	11,74	**<.0001**
An. homunculus	32	24	97	96	100	96	7,08	**<,0001**	9,94	10,23	**<.0001**
An. strodei s.l.	22	16	59,1	81,3	59,1	81,3	5,91	**0,0219**	9,19	10,14	**<.0001**
An. triannulatus s.l.	22	17	68,2	58,8	68,2	70,6	5,37	**0,0379**	9,00	9,68	**<.0001**
Ae. aegypti	25	25	96	92	92	84	6,55	**0,0003**	8,68	8,16	**<.0001**
An. cruzii s.l.	40	33	87,5	94	92,5	100	5,20	**0,0001**	7,12	7,57	**<.0001**
Ae. albopictus	25	25	88	88	88	88	3,70	0,0689	6,78	7,34	**<.0001**

Valores significativos de p estão em negrito. †: Os valores de p para distância de Mahalanobis foram equivalentes para ambos os casos (com e sem alometria). Reproduzido de Virginio, et al. [120].

Teste de reclassificação com validação cruzada baseado na dM foi realizado com precisão de 53,3 a 100%. A mesma análise foi realizada com o efeito alométrico sobre a forma, com o intuito de identificar a contribuição da alometria para o DSA nas espécies estudadas. O valor alométrico nesta análise variou de 58,8 a 100% (Tabela 8).

Ambas as análises (com e sem efeito alométrico) apresentaram resultados similares, exceto para as espécies *Cx. quinquefasciatus*, *An. albitarsis s.l.* e *Ae aegypti*, os quais apresentaram altos valores quando o efeito alométrico foi incluído. Análises de TC indicaram DSTA em todas as espécies, exceto em *An. homunculus* (Figura 20).

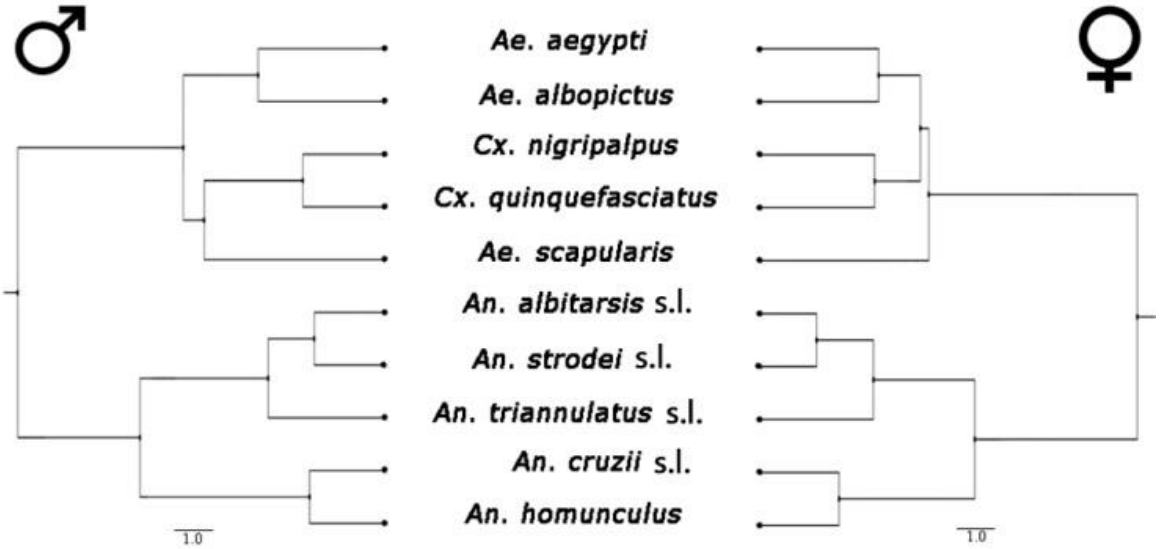

Figura 19 - Diagrama de similaridade (separadamente para machos e fêmeas) com base nos valores de distância de Mahalanobis. Feito por meio do Método de Agrupamento Pareado Não-Ponderado utilizando médias Aritméticas (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*, UPGMA). O agrupamento superior corresponde à Subfamília Culicinae e o inferior à Subfamília Anophelinae. Reproduzido de Virginio et al., [120].

O TC alar de cada espécie apresentaram os seguintes valores (em mm): *Ae. albopictus* (F: 1,85-2,58, M: 1,46-1,91), *Cx. quinquefasciatus* (F: 3,40-3,85, M: 2,64-3,02), *Ae. aegypti* (F: 1,72-2,92, M: 1,46-1,91), *Cx. nigripalpus* (F: 2,69-3,40, M: 2,39-2,97), *An. triannulatus s.l.* (F: 2,30-2,83, M: 2,01-2,71), *An. strodei s.l.* (F: 2,33-3,23, M: 2,07-3,01), *An. albitarsis s.l.* (F:2,57-3,14, M: 2,30-3,14), *Ae. scapularis* (F: 2,37-3,15, M: 2,43-2,94), *An. homunculus* (F: 2,37-2,87, M: 2,45-2,84), *An. cruzii s.l.* (F: 1,51-2,45, M: 1,49-2,57). As espécies com menor TC alar entre os machos foram *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti,* e entre as fêmeas foi *An. cruzii s.l.* As espécies com a

maior asa em machos e fêmeas, foram *An. albitarsis s.l.* e *Cx. quinquefasciatus*, respectivamente.

A representação gráfica da razão das médias do TC das fêmeas em relação aos machos (Figura 21) mostra que as fêmeas são maiores do que os machos na maioria das espécies. As exceções foram *An. homunculus* (razão = 1), para a qual a análise não demonstrou DSTA, e *An. cruzii s.l.* (razão = 0,78), para a qual fêmeas foram menores do que machos.

Os resultados deste estudo indicam DSA nas dez espécies de mosquitos analisadas, sugerindo que a expressão fenotípica da forma da asa é específica de cada sexo. Estes resultados condizem com os encontrados em *Ae. scapularis* [118] e *Ae. fluviatilis* [121].

O significativo DSFA demonstrado em todos os grupos taxonômicos analisados parece ser um padrão na família Culicidae, o que pode significar que há alguma canalização evolutiva da forma da asa que mantém estas estruturas sexualmente dimórficas nestas espécies, inclusive naquelas que são filogeneticamente mais distantes na família. Esta canalização, aparentemente, não é direcionada pela alometria, visto que o efeito alométrico em todas as espécies, mesmo que tenha influenciado no teste de reclassificação, foi baixo e em alguns casos não significativo, exercendo apenas uma influência marginal no DSFA.

Devido à baixa magnitude de alometria observada (como previamente detectado em *An. cruzii s.l.* por Lorenz et al. [119], não se pode dizer que DS em culicídeos é meramente ocasionado pelo efeito alométrico, como já conjecturado [107]. É possível que a presença de DSFA seja mantida pelas especificidades de uso das asas em cada sexo, ou seja, a forma geral da asa pode ser adaptada à função específica de cada sexo.

Ao contrário dos estudos com grilos [205, 206], por exemplo, ainda são poucas as informações sobre a relação entre tamanho corporal, forma alar e dinâmica da batida da asa em mosquitos. Estes estudos em Culicidologia ainda são muito incipientes. No entanto, ainda não se pode descartar a possível existência de restrições não-evolutivas que mantenham o DSFA.

A frequência do batimento alar tem sido estudada para identificação e classificação de espécies de mosquitos [207], e para compreensão do comportamento de cópula, como o realizado por Cator et al. [149], os quais ao analisarem a frequência do batimento alar de fêmeas e machos de *Ae. aegypti*,

mostraram que ambos os sexos modulam os tons do batimento alar quando estão próximos, mas a modulação não é baseada na frequência fundamental de fêmeas (cerca de 400 Hz) ou dos machos (600 Hz), mas sim um harmônico compartilhado de cerca de 1200 Hz. Além disso, um recente estudo demonstrou que grande parte da força aerodinâmica durante o voo, que suporta o peso do mosquito é gerada de maneira diferente de qualquer outro animal voador já descrito [208].

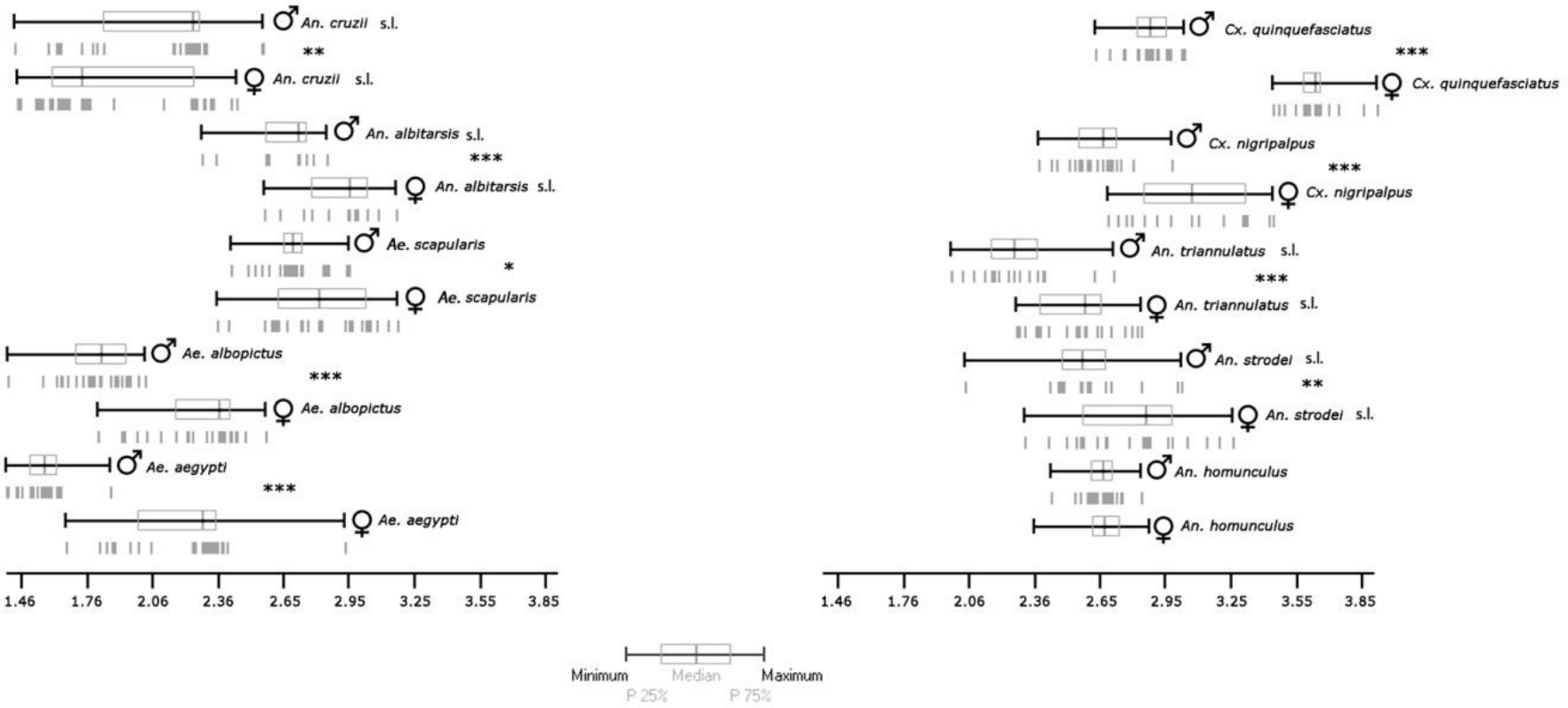

Figura 20 - Estatística descritiva do tamanho do centroide das asas (em mm) de machos e fêmeas de diferentes espécies. Linhas verticais: indivíduos; *: significativo; **: muito significativo; ***: extremamente significativo. Reproduzido de Virginio et al., [120].

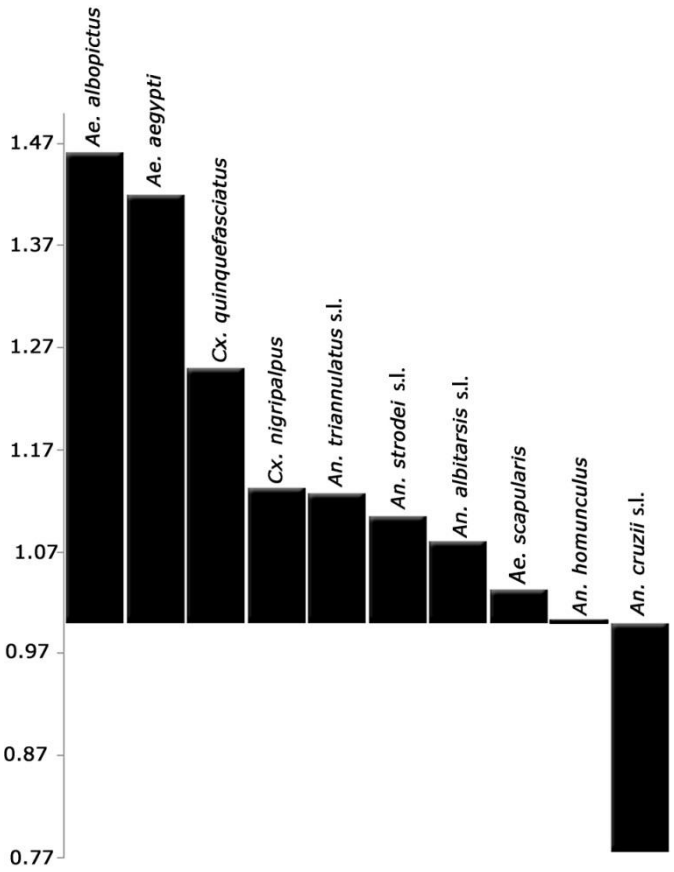

Figura 21 - Razão entre médias do tamanho do centroide de fêmeas e machos para cada espécie Reproduzido de Virginio, et al. [120].

Além disso, há interpretações paralelas sobre a evidência de seleção específica de cada sexo de batidas de asa em algumas espécies de *Anopheles* [209, 210]. No presente estudo, o DSTA foi comum em muitas espécies, embora tenha se manifestado diferentemente entre elas. Na maioria das espécies as fêmeas apresentaram-se maiores, como em outros grupos de insetos: *Ophion intricatus* [139], *Drosophila melanogaster* [211, 212], *Cx. quinquefasciatus* [97], *Ae. albopictus* [59], *Stenurella melanura* [213]. No entanto, também se pode observar a ausência de DSTA em *An. homunculus* e uma inversão no padrão em *An. cruzii s.l.* Sabe-se que em algumas espécies de insetos, os machos podem ser maiores que as fêmeas, mas possuem menos massa corpórea [214], além disso, essa característica nestas duas espécies, pode ser devida a fatores evolutivos e ambientais particulares a estas espécies, as quais são evolutiva e ecologicamente próximas [127]. Além disso, não é incomum a ausência de DSTA em mosquitos [118, 121].

O DSTA provavelmente é mais variável e parece ser menos canalizado do que o DSFA, ou seja, é menos estável do que forma. Isso corrobora os achados de Devicari et al. [118] e confirma a teoria de Dujardin [133], os quais relatam que o tamanho das asas em insetos pode ser plástico e mais influenciado por fatores não-genéticos. *An. cruzii s.l.* também teve baixo DSFA bem como DSTA "invertido", tornando esta espécie particularmente incomum comparada às outras analisadas neste estudo. Até o momento não se sabe as causas desta variabilidade. Embora alguns estudos sugiram que DSF e DST podem ser adaptativos [137-139, 180], e embora o presente estudo tenha detectado diversas características de DSA em espécies de Culicidae, uma clara explicação para ambos os tipos de dimorfismo e para os padrões observados no presente estudo ainda precisa ser proposta. A divergência interespecífica do DS também precisa ser explicada. Considerando que o DS é prevalente e não primordialmente devido à alometria, acredita-se que complexos mecanismos evolutivos sejam responsáveis pela manutenção do DS em mosquitos.

Estudos sugerem que a seleção sexual e o sistema de acasalamento são forças primárias que direcionam a evolução do DS em insetos [215], como ocorre em Drosophilidae, o grupo irmão mais conhecido de Culicidae. No entanto, embora muitos pesquisadores defendam que a evolução do DS seja direcionada pela seleção sexual [145, 216, 217], outros acreditam que isso pode ser um efeito da seleção natural [211].

Assimetria bilateral ocorre em todas as espécies amostradas neste estudo, no entanto sua magnitude é menor do que seu DS. Sendo assim, mesmo que ora tenham sido utilizadas asas direitas, ora esquerdas, o erro presumido é mínimo e o resultado final não será influenciado, como exemplificado na Figura 22. Ademais, considerando que neste estudo mais de 87% das asas utilizadas foram direitas, acredita-se que esta análise está livre deste tipo de viés.

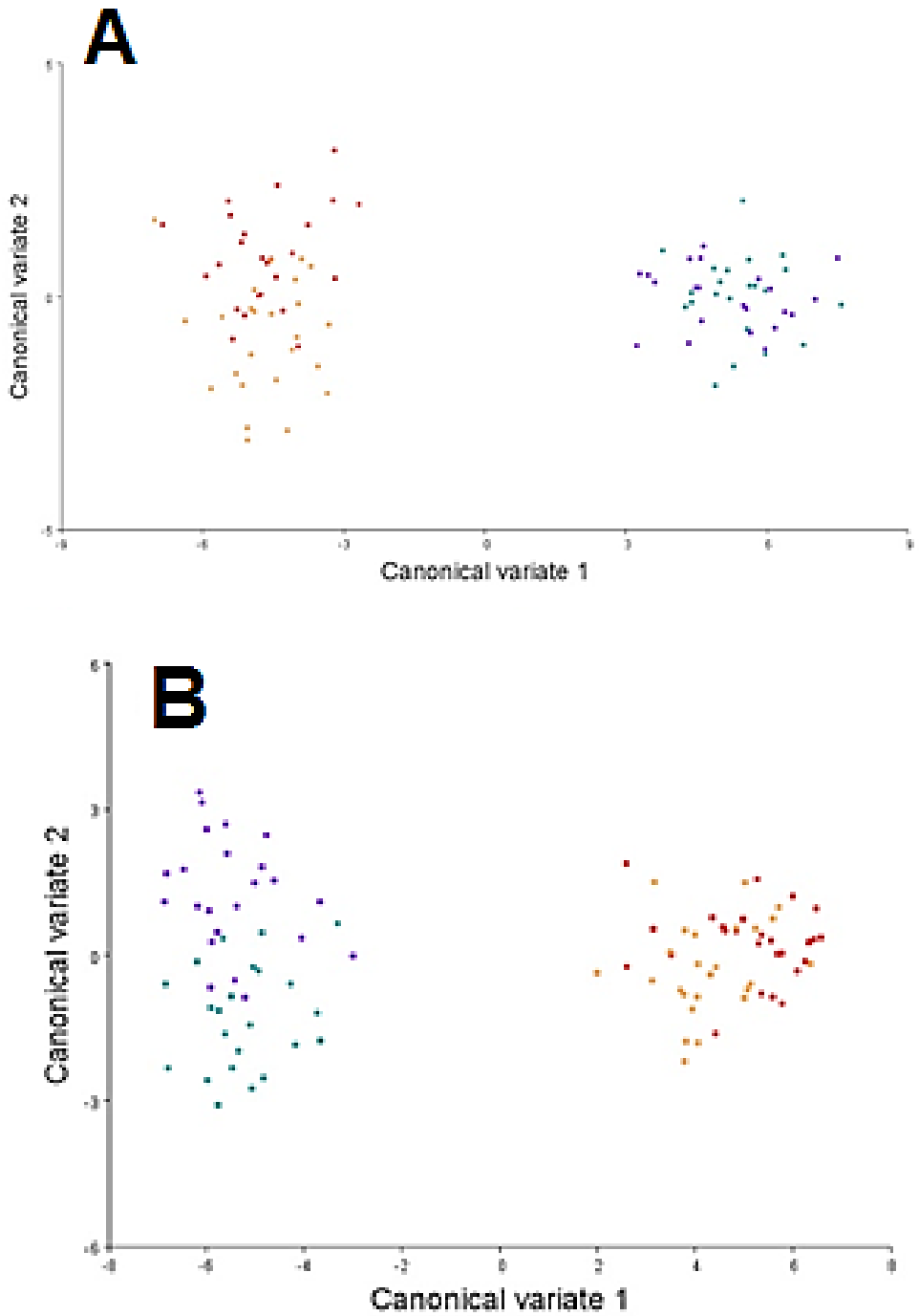

Figura 22 - Morfoespaço de variáveis canônicas mais representativas entre os quatro grupos amostrados, representando que o dimorfismo sexual em ambas as espécies, é maior que a própria assimetria. A) *Aedes scapularis*; B) *Aedes aegypti*. Pontos azuis claros: asas direitas de machos; pontos roxos: asas esquerdas de machos; pontos vermelhos: asas direitas de fêmeas; pontos laranjas: asas esquerdas de fêmeas. Análise sobre os dados publicados em Virginio et al. [120].

O presente estudo descreve muitas peculiaridades do DSA em culicídeos, no entanto, apesar de este assunto já ser bastante estudado em insetos, ainda são poucos os estudos deste tipo em Culicidae, desse modo, não se sabe em que aspecto as considerações sobre outros insetos são generalizáveis para Culicidae.

Estabelecer respostas para as seguintes perguntas pode ajudar a esclarecer se o DSFA é conduzido pela seleção sexual: a geometria da asa influencia a batida da asa e outros traços de asa sexualmente selecionáveis? Quais genes estão envolvidos na determinação da forma da asa em Culicidae? Qual é a herança e expressividade desses genes? Este assunto é um campo aberto para pesquisas futuras que acabarão por enriquecer nosso conhecimento da biologia, evolução e epidemiologia desses mosquitos.

4.2 Diagnóstico de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.* do Subgrupo Strodei de *Anopheles (Nyssorhynchus)*, por meio da morfometria geométrica alar e validado por meio de técnica de DNA recombinante.

Antes da avaliação da efetividade da técnica de MG no diagnóstico de *An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.*, indivíduos foram previamente identificados por meio de taxonomia morfológica tradicional como *An. strodei s.l.*, e posteriormente identificados molecularmente através do sequenciamento do ITS2, como *An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.*, com uma variação de tamanho final das sequências gênicas de 360 a 380 pb. Estas duas identificações taxonômicas serviram como validação prévia das análises que morfológicas realizadas em seguida. Como justificativa ao uso do ITS2 como legítimo validador da MG, a seguir é apresentada uma breve discussão sobre este marcador.

O espaçador ITS2 tem sido extensivamente testado para identificação taxonômica em *Anopheles* [89, 218-230] e já foi utilizado individualmente e em conjunto com outros genes para identificação/distinção de espécies crípticas e/ou irmãs de mosquitos do gênero *Anopheles* [69, 87, 89-91, 231).

Evolução em concerto incompleta ocorre quando a taxa de homogeneização entre as cópias de ITS2 é insuficiente para causar fixação deste caráter, resultando em variações intragenômicas e haplótipos compartilhados entre espécies estreitamente relacionadas, como é o caso de *An. arthuri s.l.* [69] e de outras espécies do subgênero *Nyssorhynchus*, como *An. aquasalis* [232] e *An. albitarsis* [233].

Embora a variação intragenômica individual exista em *An. arthuri s.l.*, e tenha-se amplificado apenas uma fita (*forward*) do espaçador ITS2 no presente estudo, isso não interferiu nas análises. No entanto, vale ressaltar que a partir do *locus* 370,

onde apareceram picos duplos em 4/80 sequências de *An. arthuri s.l.* obtidas no presente estudo (dados não mostrados), deve-se analisar e considerar os *loci* diagnósticos com cautela, já que a presença destes picos duplos pode indicar presença de variação intraespecífica.

Os espécimes pertencentes a estas duas espécies tiveram suas sequências alinhadas a outras 32 sequências [*An. strodei s.s.*, *An. arthuri* (A, B, C e D) e *An. albertoi*] cedidas pela Dra. M.A.M.S., para a realização de busca por sítios diagnósticos (Apêndice A). Embora a busca por sítios diagnósticos tenha sido direcionada a diferenciar *An. strodei s.s.* de *An. arthuri s.l.*, uma sequência de *An. albertoi* foi adicionada como parâmetro comparativo de magnitude de divergência. Foram encontrados 25 *loci* diagnósticos dentre 393 pb (6,36%), como ilustrado na Figura 23 e descrito a seguir: *locus* 16: *An. albertoi* – [T], *An. arthuri* – [A], *An. strodei s.s.* – [T]; *locus* 18: *An. albertoi* – [G], *An. arthuri* – [C], *An. strodei s.s.* – [T]; *locus* 87: *An. albertoi* – [T], *An. arthuri* – [T], *An. strodei s.s.* – [C]; *locus* 120: *An. albertoi* – [T], *An. arthuri* – [T], *An. strodei s.s.* – [:]; *locus* 121: *An. albertoi* – [C], *An. arthuri* – [C], *An. strodei s.s.* – [:]; *locus* 254: *An. albertoi* – [T], *An. arthuri* – [C], *An. strodei s.s.* – [T]; *locus* 263: *An. albertoi* – [:], *An. arthuri* – [C], *An. strodei s.s.* – [:]; *locus* 264: *An. albertoi* – [:], *An. arthuri* – [G], *An. strodei s.s.* – [:]; *locus* 286: *An. albertoi* – [T], *An. arthuri* – [A], *An. strodei s.s.* – [G]; *locus* 305: *An. albertoi* – [G], *An. arthuri* – [:], *An. strodei s.s.* – [A]; *locus* 306: *An. albertoi* – [A], *An. arthuri* – [:], *An. strodei s.s.* – [A]; *locus* 332: *An. albertoi* – [C], *An. arthuri* – [T], *An. strodei s.s.* – [C]; *locus* 342: *An. albertoi* – [:], *An. arthuri* – [G], *An. strodei s.s.* – [:]; *locus* 343: *An. albertoi* – [:], *An. arthuri* – [T], *An. strodei s.s.* – [:]; *locus* 354: *An. albertoi* – [T], *An. arthuri* – [C], *An. strodei s.s.* – [T]; *locus* 356: *An. albertoi* – [:], *An. arthuri* – [C], *An. strodei s.s.* – [:]; *locus* 363: *An. albertoi* – [:], *An. arthuri* – [T], *An. strodei s.s.* – [:]; *locus* 365: *An. albertoi* – [T], *An. arthuri* – [G], *An. strodei s.s.* – [T]; *locus* 370: *An. albertoi* – [A], *An. arthuri* – [C], *An. strodei s.s.* – [A]; *locus* 371: *An. albertoi* – [C], *An. arthuri* – [G], *An. strodei s.s.* – [C]; *locus* 372: *An. albertoi* – [G], *An. arthuri* – [C], *An. strodei s.s.* – [G]; *locus* 376: *An. albertoi* – [A], *An. arthuri* – [C], *An. strodei s.s.* – [G]; *locus* 377: *An. albertoi* – [G], *An. arthuri s.l.* – [G], *An. strodei s.s.* – [A]; *locus* 378: *An. albertoi* – [C], *An. arthuri* – [A], *An. strodei s.s.* – [C]; *locus* 384: *An. albertoi* – [T], *An. arthuri* – [A], *An. strodei s.s.* – [T].

Por meio da construção de um dendrograma com base nas sequências de ITS2 de espécimes de *An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.* (obtidas no presente estudo +

sequências cedidas), juntamente como sequências de outras 10 espécies pertencentes ao Subgênero *Nyssorhynchus* adquiridas no *GenBank* (Figura 24), pode-se perceber que *An. strodei s.s.* e *An. albertoi* são mais similares entre si que *An. strodei s.s.* e *An. arthuri*, o que corrobora os achados nos sítios diagnósticos (17/25 *loci* idênticos entre *An. strodei s.s.* e *An. albertoi*, contra 4/25 entre *An. arthuri s.l.* e *An. albertoi*) como também já havia sido demonstrado por Bourke et al. [69]. A mesma análise comparativa contendo todas as amostras obtidas neste estudo juntamente com as demais, foi realizada (dados não mostrados) e confirmado que independente da sequência utilizada para esta análise, não ocorre má interpretação quanto à localização das sequências no dendrograma.

Após validação molecular, a técnica de MGA foi aplicada. Como citado anteriormente, apesar de 18 PA serem suficientes para resolver diversos problemas biológicos, não existe um consenso entre os pesquisadores sobre qual conjunto de dados é melhor para cada estudo, ou se existe um conjunto de dados ideal. Talvez este consenso não existirá, pois possivelmente diferentes conjuntos podem responder diferentes perguntas.

Em *Drosophila sp.*, por exemplo, estudos indicam que a orientação da divisão celular durante o desenvolvimento do disco imaginal da asa pode refletir na proporção das asas dos indivíduos adultos, sendo que a orientação da divisão celular pode estar relacionado com outras diversos fatores [234].

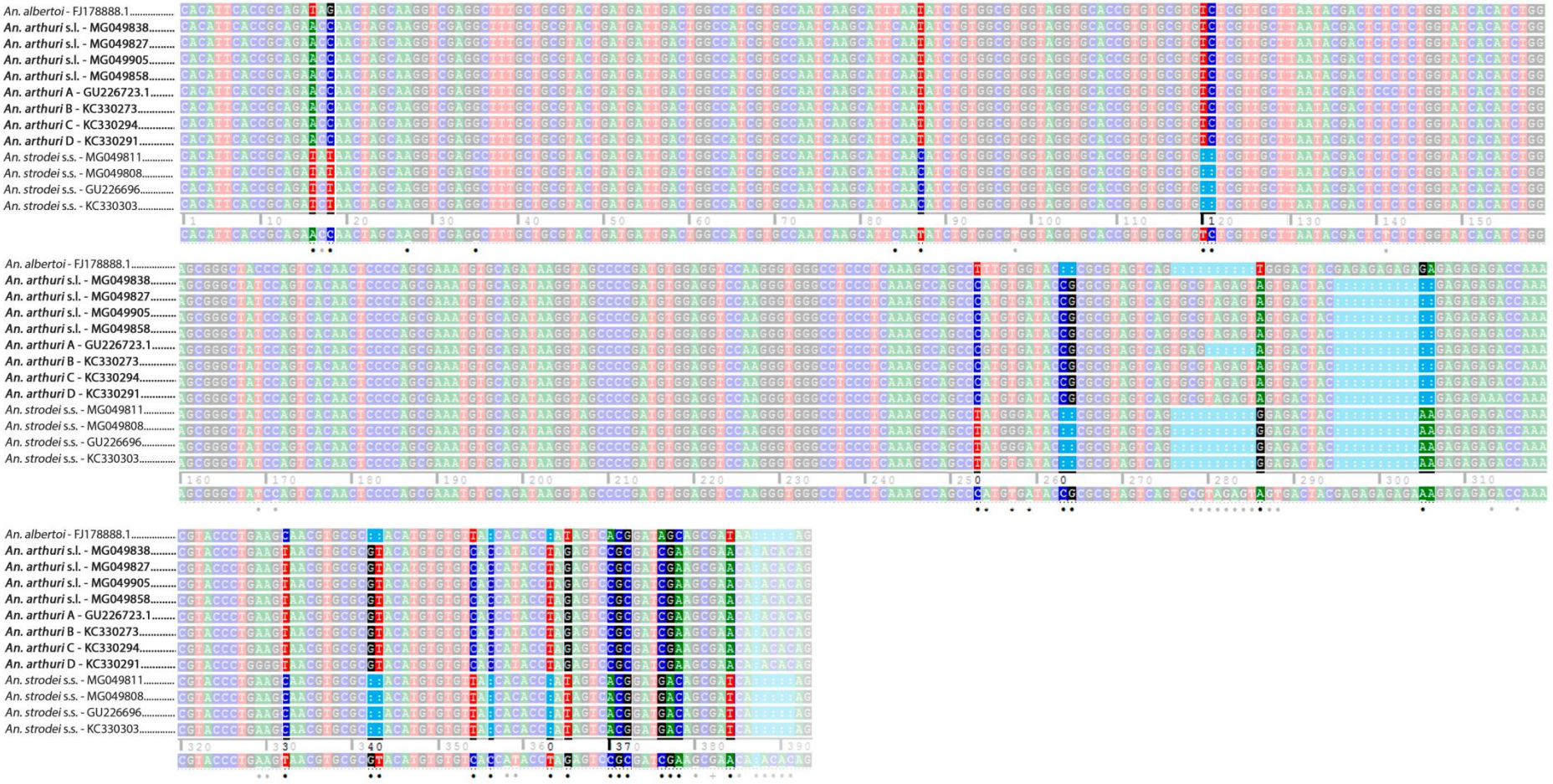

Figura 23 - Amostra do resultado do alinhamento de 120 sequências para a busca de sítios diagnósticos entre *An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.*

Primeiramente, de modo exploratório e apenas para o grupo *An. arthuri s.l.*, para o qual se possui a suspeita de existência de 4 subgrupos, foi realizada uma análise de agrupamento (*cluster*) baseada no Modelo de Mistura de Gaussianas, por meio do pacote Mclust do R. Esta análise, tem a capacidade de identificar padronizações entre os dados, buscando similaridades ou diferenças entre eles. Neste estudo, ela foi utilizada para estimar quais são os grupos mais prováveis dentro de *An. arthuri s.l.* e assim avaliar se existiria algum indício de presença de outras espécies (A, B, C e/ou D) dentre a amostra de *An. arthuri s.l.* (Figuras 25 e 26). No entanto, esta análise considerou toda a amostra como um único grupo, apresentando-se inconclusiva, como visto por Lorenz [266].

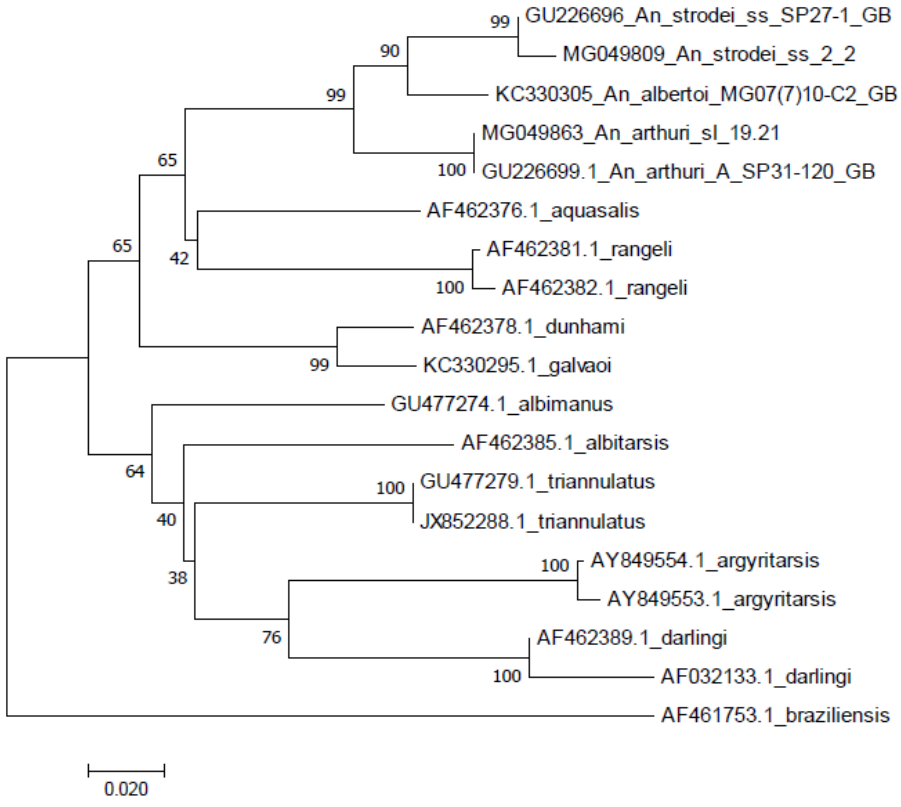

Figura 24 - Dendrograma Neighbor-joining evidenciando as relações entre de 18 espécimes pertencentes a 13 espécies do Subgênero Nyssorhynchus, baseado em sequências de ITS2

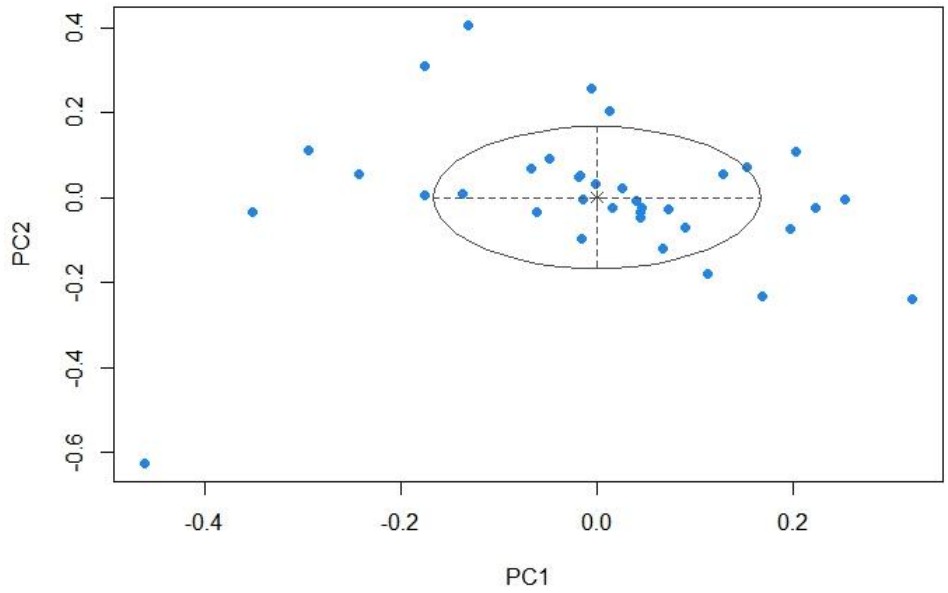

Figura 25 - Representação de quantidade de grupo provável dentro de *An. arthuri s.l.* com 18 pontos anatômicos. A elipse representa o grupo provável detectado.

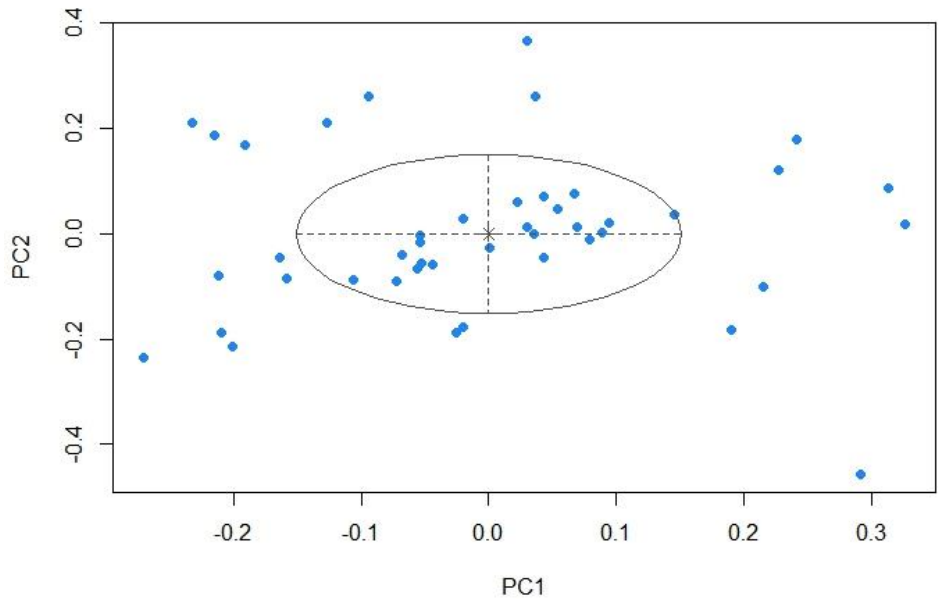

Figura 26 – Representação de quantidade de grupo provável dentro de *An. arthuri s.l.* com 22 pontos anatômicos. A elipse representa o grupo provável detectado.

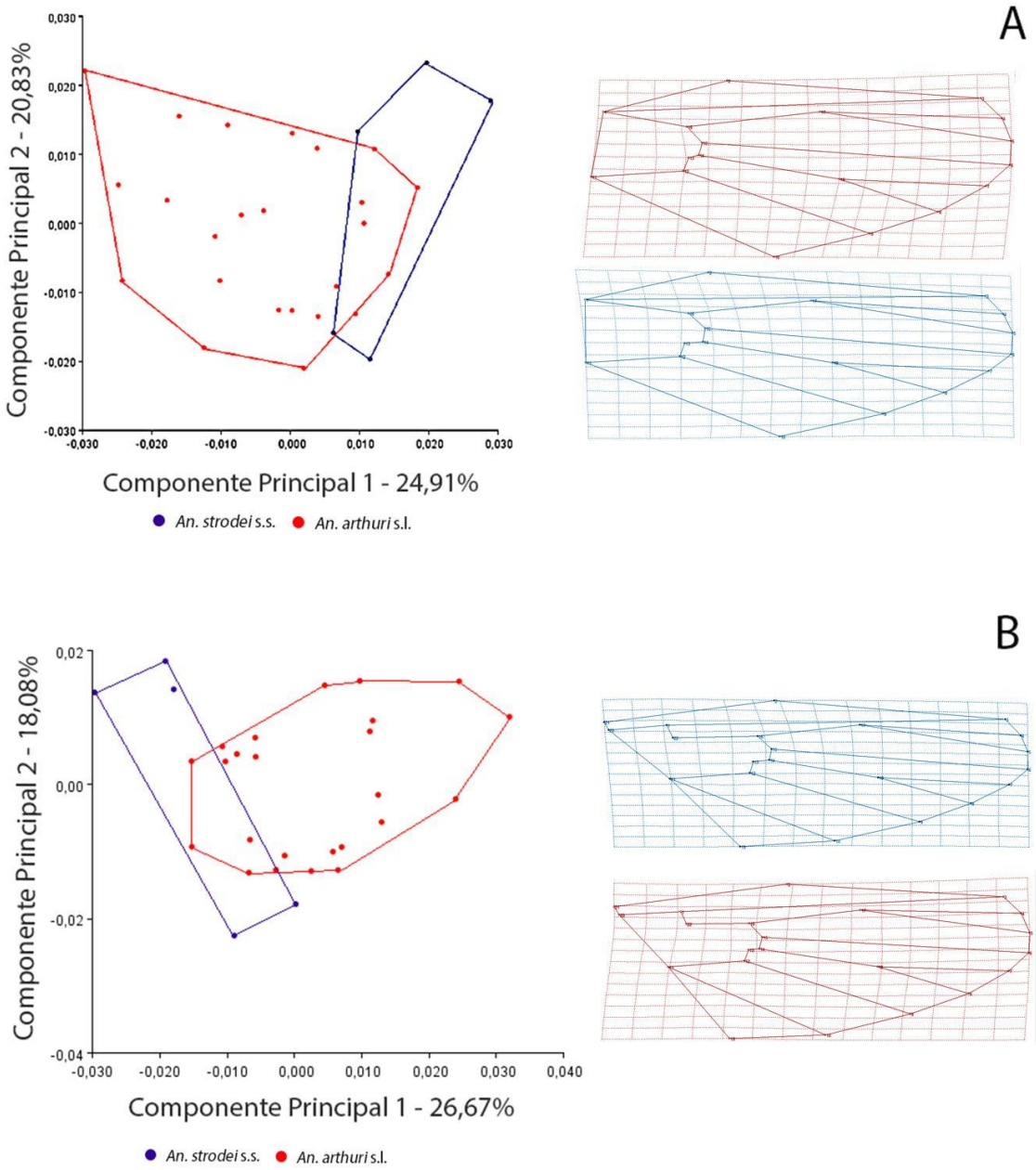

Figura 27 - Representação da variação entre os dois grupos (*An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.*) de acordo com a análise de Componentes Principais e extremos de diferenciação com A) 18 e B) 22 pontos anatômicos.

Também de modo preliminar e exploratório, a ACP foi aplicada para avaliar a existência de algum padrão de distribuição dos dados de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.* Como o gráfico apresentado é 2D, apenas duas Componentes Principais (CP) podem ser representadas, e por definição, as variáveis CP 1 e 2 são as mais expressivas. No presente estudo, mesmo que tenham sido as mais expressivas, a soma das CP1 e CP2 não contemplaram nem ao menos 50% da variabilidade

(Figura 27), fazendo com que a abrangência das interpretações baseadas nesta figura referente a diferenciação morfológica entre as espécies seja apenas parcial. Essa baixa variabilidade expressa pelos CPs 1 e 2 pode ser devido a pelo menos três diferentes motivos: a) o número amostral não é suficiente para apresentar a real segregação entre as espécies, b) as espécies divergiram recentemente, e c) existe alguma convergência evolutiva entre elas.

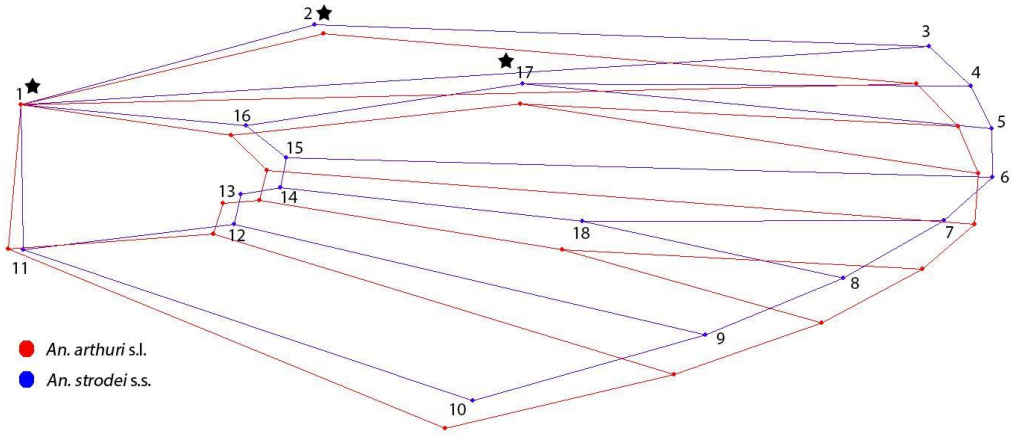

Figura 28 - Representação da variação da forma alar (consensos) com 18 pontos anatômicos de *An. strodei* s.s. e *An. arthuri* s.l. após sobreposição de Procrustes. Asas alinhadas pelo ponto 1. Extremo de diferenciação ao longo do CP1.

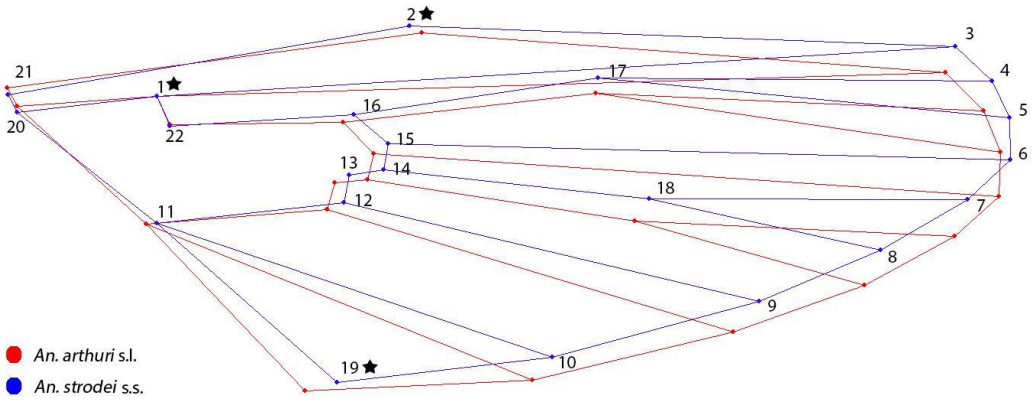

Figura 29 - Representação da variação da forma alar (consensos) com 22 pontos anatômicos de *An. strodei* s.s. e *An. arthuri* s.l. após sobreposição de Procrustes. Asas alinhadas pelo ponto 1. Extremo de diferenciação ao longo do CP1.

As comparações através da análise de extremo de diferenciação baseado nos consensos das variáveis obtidas a partir da marcação de 18 e 22 pontos, entre *An. arthuri s.l.* x *An. strodei s.s.*, são apresentadas nas Figuras 28 e 29. Por meio da análise de PA mais influentes (*influential landmarks*), pode-se observar que os pontos que mais variaram entre as espécies com 18 PA foram 1, 2 e 17, e com 22 PA foram 1, 2 e 19.

Como observado por Lorenz et al. [119, 127] e Wilke et al. [128], no presente estudo o efeito alométrico embora baixo (<10%), foi significativo. Com base neste resultado, e atrelado ao teste de reclassificação e aos valores de dM e dP (com e sem alometria), podemos considerar que o efeito alométrico influenciou na diferenciação das espécies (Tabela 9).

Tabela 8 - Diferenciação fenética entre *An. strodei s.s*. e *An. arthuri s.l.*. Valores do teste de reclassificação após validação, resíduos alométricos, distâncias de Mahalanobis e de Procrustes e suas respectivas significâncias estatísticas.

Pontos Anatômicos		**18**		**22**	
Espécie		*An. arthuri s.l.*	*An. strodei s.s.*	*An. arthuri s.l.*	*An. strodei s.s.*
Nº de indivíduos		24	5	24	5
Teste de reclassificação (%)	Com alometria	66,7	20	79,17	40
	Sem alometria	54,2	20	62,5	20
Alometria (%)		9,98 (p = 0,003)		9,7 (p = 0,005)	
Distância de Mahalanobis	Com alometria	4,95 (p = <0,0001)		4,98 (p = <0,0001)	
	Sem alometria	4,34 (p = <0,0001)		4,27 (p = <0,0001)	
Distância de Procrustes	Com alometria	0,020 (p = 0,04)		0,021 (p = 0,014)	
	Sem alometria	0,014 (p = 0,35)		0,013 (p = 0,45)	

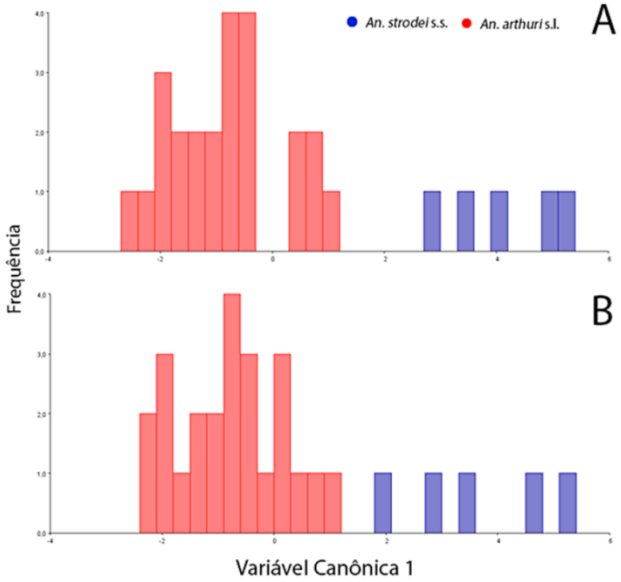

Figura 30 - Representação da variação entre os dois grupos (*An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.)* de acordo com a análise de variáveis canônicas, com 18 pontos anatômicos. A) Com alometria B) Sem alometria.

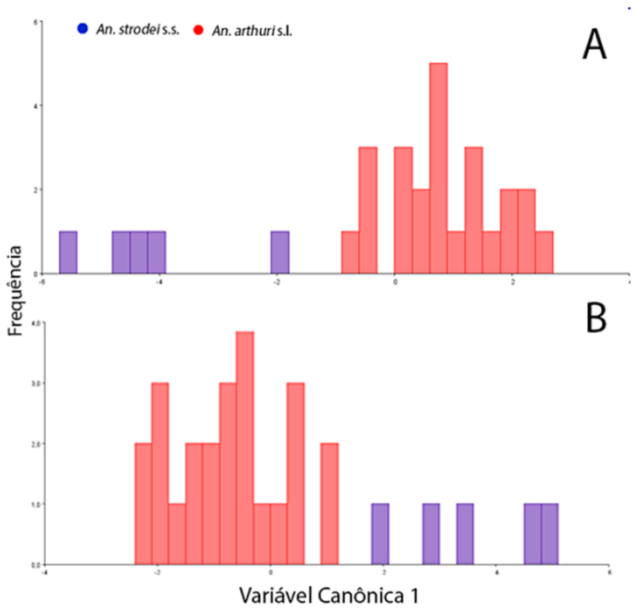

Figura 31 - Representação da variação entre os dois grupos (*An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.*) de acordo com a análise de variáveis canônicas, com 22 pontos anatômicos. A) Com alometria B) Sem alometria.

A AVC demonstrou diferenças na forma alar das fêmeas de *An. strodei s.s.* e de *An. arthuri s.l.*, tanto na análise com 18 quanto com 22 PA, com e sem alometria (Figuras 30 e 31). Esta análise é baseada em dM, a qual foi significativa tanto com alometria (18 PA: 4,95, 22 PA: 4,98; p = <0,0001 em ambos), quanto sem alometria (18 PA: 4,34, 22 PA: 4,27; p = <0,0001 em ambos). Ao observar os valores de distâncias (Mahalanobis e Procrustes), pode-se perceber que embora a variação tenha sido pequena, com alometria as distâncias são maiores, e inclusive, a distância de Procrustes foi significativa apenas com alometria (18 PA: 0,020, p = 0,04; 22 PA: 0,021 p = 0,014).

Geralmente, os testes de reclassificação entre espécies crípticas ou irmãs, apresentam resultados acima de 60%, como observado em: *Cx. coronator* (82,6%) e *Cx. usquatus* (60,8%) [235]; *Cx. quinquefasciatus* (90%) e *Cx. nigripalpus* (85%) [97]; *An. cruzii* (82%) e *An. bellator* (88%), *An. homunculus* (78%) e *An. bellator* (84%) [127], *An. cruzii* (89,7%) e *An. homunculus* (94,6%) [98]. O teste de reclassificação com validação cruzada baseado na dM realizado no presente estudo, apresentou respectivamente para *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.* as precisões de: 66,7% e 20% (18 PA, com alometria), 54,2% e 20% (18 PA, sem alometria), 79,17% e 40% (22 PA, com alometria), 62,5% e 20% (22 PA, sem alometria). Pode-se perceber que este teste em *An. arthuri s.l.* (18 PA: 66,7%; 22 PA: 79,17%) e em *An.*

strodei s.s. (22 PA: 40%) refletiu maiores valores quando o efeito alométrico estava sendo aplicado sobre a forma, o que reforça a teoria de que o efeito alométrico faz parte do processo de identificação de uma espécie [133]. Adicionalmente, os baixos valores resultantes deste teste para os espécimes de *An. strodei s.s.*, podem ser explicados novamente por pelo menos três diferentes motivos: a) o número amostral não é suficiente para apresentar a real segregação entre as amostras, b) as espécies divergiram recentemente, e c) existe alguma convergência evolutiva entre elas.

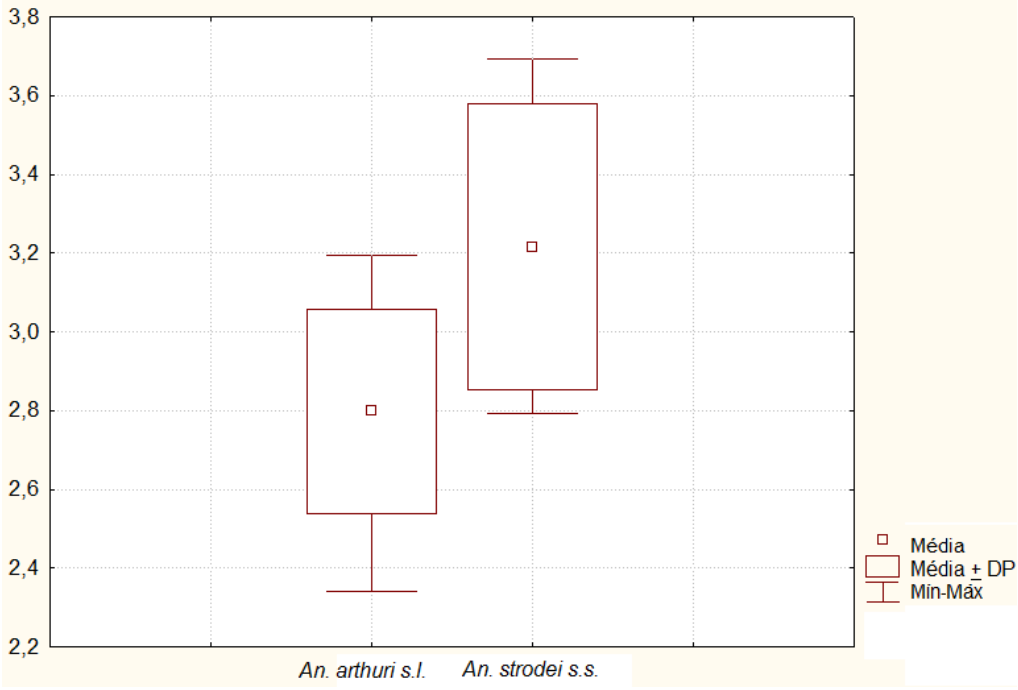

Figura 32 - Representação gráfica da diferença entre o tamanho do centroide (em mm) de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.*, com 18 pontos anatômicos anotados. Diferença muito significativa (p= <0,0052).

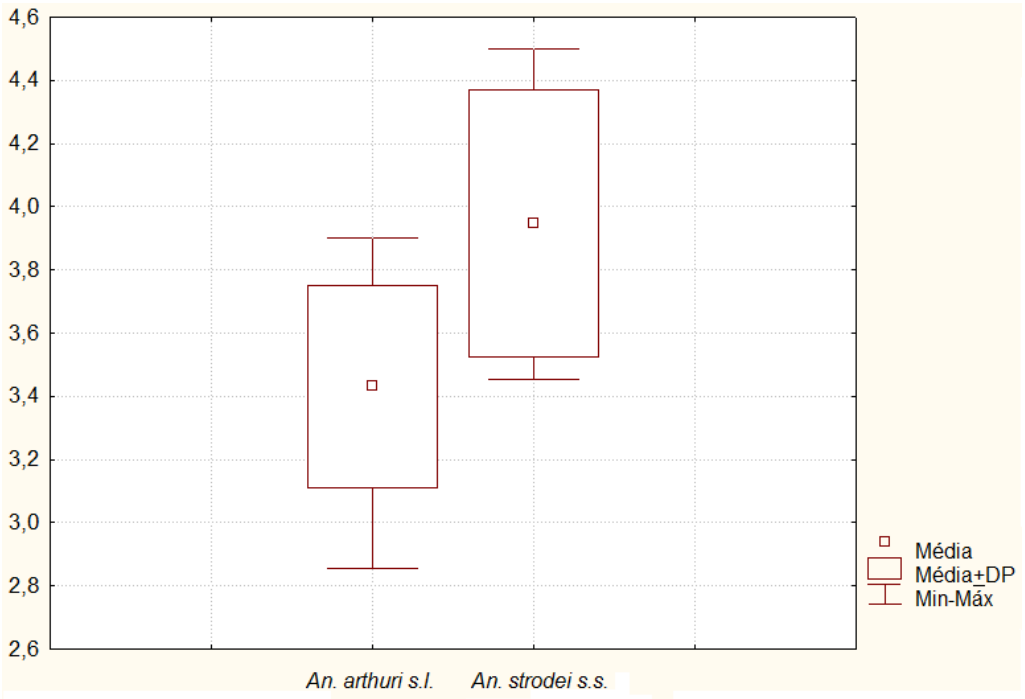

Figura 33 - Representação gráfica da diferença entre o tamanho do centroide (em mm) de *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.*, como 22 pontos anatômicos anotados. Diferença muito significativa (p= < 0,0044).

O tamanho isométrico das fêmeas de *An. strodei s.s.* foi maior do que as de *An. arthuri s.l.* em ambos os conjuntos de dados (18 e 22 PA) (Figuras 32 e 33). O TC das amostras com 18 PA variou de 2,34 a 3,19 mm (média: 2,80 mm) em *An. arthuri s.l.* e de 2,79 a 3,69 mm (média: 3,29 mm) em *An. strodei s.s.*, enquanto que nas amostras com 22 PA variou de 2,86 a 3,90 mm (média: 3,44 mm) em *An. arthuri s.l.* e de 3,45 a 4,50 mm (média: 3,99 mm) em *An. strodei s.s.*. Valores similares foram encontrados em fêmeas de *An. strodei s.l.*, presentes no estudo de DSA realizado por Virginio et. al. [120]. Além disso, TC foi considerado em outros estudos que envolveram fêmeas pertencentes a espécies crípticas como em *Cx. coronator* e *Cx. usquatus* os quais tiveram média de 1,78 mm e 2,09 mm respectivamente [235]; *Cx. quinquefasciatus* o qual apresentou média de 3,54; *An. cruzii, An. homunculus e An. bellator* os quais apresentaram as respectivas médias: 1,62 mm, 1,71 mm e 1,59 mm. As variações de tamanho encontradas no presente estudo podem se somar à série de diferenciações morfológicas entre estas duas espécies apresentadas por Sallum et al. [66] e Sant'Ana e Sallum [71]. No entanto, como não é aconselhável utilizar apenas uma característica para a identificação de espécies [236] e devido a todos os outros fatores já levantados nesta tese sobre a variação do tamanho, não se aconselha utilizar esta característica isoladamente como identificador de espécie.

Como já é de conhecimento comum entre os pesquisadores desta área, a MG não chega ao nível de precisão da biologia molecular para análises de diferenciação populacional e fluxo gênico, mas ela pode ser poderosa como marcador taxonômico. Particularmente no gênero *Anopheles*, embora a MGA tenha sido aplicada com sucesso na resolução de problemas taxonômicos com a discriminação de espécies [99, 100, 127], em alguns outros estudos ela não foi tão precisa e foi necessário utilizar a taxonomia molecular [237, 238]. Isso significa que no presente momento, em alguns casos a MG não é suficiente para resolver certos problemas biológicos, porém ela pode ser complementada por outras técnicas. Além disso, considerando a rápida evolução das tecnologias de informática, não se pode ignorar a capacidade de esta técnica evoluir mais uma vez.

Os resultados aqui apresentados indicam que a MG pode contribuir para a diferenciação de indivíduos pertencentes ao complexo que envolve *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.* Além disso, diversos estudos já têm provado que esta técnica é altamente informativa para resolver problemas taxonômicos, ecológicos, de micro e macroevolução, além de ser barata e rápida [105]. A MG pode ser utilizada para resolver problemas biológicos, taxonômicos e ecológicos em *Anopheles* [100, 127, 238, 239], além disso, a forma corporal já considerada um bom caráter para resolver problemas taxonômicos [240], e os resultados do presente estudo corroboram isso. Ao contrário de Jaramillo et al. [99], os quais perceberam que um conjunto de poucos PAs (12 PA e um conjunto de contornos internos das asas) foram os melhores conjuntos de dados para identificar 11 espécies de *Anopheles (Nyssorhynchus)*, os resultados obtidos no presente estudo indicam que o conjunto de dados contendo 22 pontos, ou seja, mais pontos, são os mais promissores. Este estudo focou em apenas duas espécies que vivem em simpatria na cidade de Frutal, Minas Gerais, portanto não se sabe se é possível estender estes resultados a todos os indivíduos destas duas espécies. Sendo assim, sugere-se que novos estudos, com espécies de diferentes localizações geográficas sejam avaliadas.

4.3 *WingBank*: um banco de dados de imagens alares de mosquitos

O *WingBank* é um BDR o qual contém informações morfológicas e seus respectivos metadados ecológicos e espaço-temporais, exclusivamente de mosquitos. Este BD é um protótipo em teste e está disponível em:

https://www.wingbank.butantan.gov.br e em breve ele será oficialmente lançado pelo Instituto Butantan. Este tipo de BD, foi inspirado nas ações promovidas pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), um dos institutos que mais proveu bancos de dados biológicos até o momento (mais de 30 em 2015) [241].

Neste momento, no *WingBank* pode-se contabilizar 13.287 registros de asas, dos quais 12.939 já estão vinculados a imagens (asas direitas e/ou esquerdas) de mosquitos pertencentes à família Culicidae. Atualmente há 13 publicações científicas cadastradas no *WingBank*, das quais 8 já estão vinculadas a 2.138 imagens que, devido à essa relação com 1 ou mais publicações, já estão disponíveis para utilização por terceiros (Tabela 10). Destas imagens alares disponíveis para uso de terceiros, 584 são asas esquerdas, 1.476 asas direitas e 78 com lado desconhecido. Estas asas juntamente com as demais, estão depositadas no Laboratório Especial de Coleções Zoológicas (LECZ) - Instituto Butantan.

Tabela 9 - Relação de publicações e dados disponíveis no *WingBank* para uso por terceiros. O enunciado das três primeiras colunas representam três atributos da entidade *Publication*.

PublicationId	PublicationTitle	PublicatioDoi	Quantidade Registros
1	Temporal variation of wing geometry in *Aedes albopictus*	http://doi.org/10.15t90/S0074-02762012000800011	180
2	Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae)	http://doi.org/10.1590/S0085-56262011000100022	244
3	Wing sexual dimorphism of pathogen-vector culicids	http://doi.org/10.1186/s13071-015-0769-6	439
4	Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*	http://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.013	378
5	High morphological and genetic variabilities of Ochlerotatus scapularis, a potential vector of filarias and arboviruses	http://doi.org/10.1186/s13071-015-0740-6	116
6	Microevolution of *Aedes aegypti*	http://doi.org/10.1371/journal.pone.0137851	219
7	Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii, An. homunculus* and *An. Bellator*	http://doi.org/10.1186/1756-3305-5-257	--
8	Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae)	http://doi.org/10.1186/s13071-014-0581-8	274
9	Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*	http://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.011	--
10	Assessment of the correlation between wing size and body weight in captive *Culex quinquefasciatus*.	http://doi.org/10.1590/0037-8682-0039-2016	288
11	Artificial Neural Network Applied as a	https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2	--

	Methodology of Mosquito Species Identification.	015.09.011	
12	Evaluation of Chemical Preparation on Insect Wing Shape for Geometric Morphometrics.	https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0359	--
13	Dimorfismo sexual alar em *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae)	http://doi.org/10.1590/S1676-06032011000200016	--
			2138

Até o momento, o *WingBank* armazena dados coletados desde 1998 até 2016, em 10 estados brasileiros. Quarenta e três pessoas, vinculadas a 19 diferentes Instituições de Ensino e Pesquisa Nacionais e Internacionais, contribuíram até o momento com o *WingBank*, seja com coleta de informações e espécimes, montagem de laminário, e/ou registro fotográfico e morfométrico.

Atualmente o *WingBank* possui dados referentes a 77 espécies pertencentes a 15 gêneros, conforme apresentado na Tabela 11. O *WingBank* alberga diversas espécies de importância médico-veterinária no Brasil e no mundo, como:

- *Cx. nigripalpus*, espécie a partir da qual já foi isolado o vírus *Saint Louis* [242-244];
- *Cx. coronator* a qual já teve espécimes encontrados naturalmente infectados com diversos vírus, como *Saint Louis* no Brasil e em Trinidad e Tobago, o Vírus da Encefalite Equina Venezuelana no México [245] e o Vírus do Nilo do Oeste nos Estados Unidos [246];
- *Cx. quinquefasciatus,* espécie com registros de participação na transmissão da febre do Oeste do Nilo, filariose linfática e zika [146, 247];
- *Ae. aegypti,* a qual participa da transmissão de febre amarela urbana, zika, chikungunya, dengue. Além de também poder transmitir microfilárias em áreas urbanas [32-34,188, 248-250];
- *Ae. scapularis*, espécie da qual já foram isolados vírus Ilhéus, Melao e Febre amarela [41, 251, 252], e suspeita-se de sua participação na transmissão do vírus Rocio, devido à sua abundância na região do Vale do Ribeira, na época da epidemia [188].
- *Psorophora ferox*, encontrada naturalmente infectada com vírus Rocio [253];
- *Haemagogus leucocelaenus,* a qual possui espécimes encontrados naturalmente infectados com o vírus amarílico [254];
- *Coquilettidia venezuelensis,* relacionada à transmissão de vírus Oropouche [255];

- *Mansonia titillans,* da qual já foram isolados vírus da Encefalite Equina Venezuelana [256, 257];
- Diversas espécies do gênero *Anopheles*, como: *Anopheles darlingi, An. aquasalis, An. nuneztovari s.l., An. oswaldoi, An. triannulatus s.l., An. albitarsis s.l., An. cruzii s.l.*, *An. bellator* e *An. homunculus* relacionados à transmissão de malária [69, 75, 258].

Além destas espécies, o *WingBank* armazena imagens e informações de muitas outras, as quais podem ainda não ter sido estudadas quanto à capacidade vetorial, mas que podem ser consideradas para futuros estudos. Atualmente, 11 espécies estão disponíveis para busca no *WingBank*: *Ae. aegypti, Ae. albopictus, Ae. scapularis, An. albitarsis s.l., An. arthuri s.l., An. cruzii s.l. , An. homunculus, An. strodei s.l., An. triannulatus s.l., Cx. quinquefasciatus e Cx. nigripalpus.* Este número pode aumentar rapidamente a partir do início do uso do BD por usuários externos, os quais poderão contribuir com imagens e informações de espécies coletadas em todo o mundo.

Tabela 10 - Relação de gêneros e espécies armazenadas no *WingBank*

Gênero	Quantidade de espécies relacionadas
Chagasia Cruz, 1906	1
Aedeomyia Theobald, 1901	1
Runchomyia Theobald, 1903	1
Sabethes Robineau-Desvoidy, 1827	1
Trichoprosopon Theobald, 1901	1
Haemagogus Willston, 1896	2
Mansonia Blanchard, 1901	2
Limatus Theobald, 1903	2
Uranotaenia Lynch Ambálzaga	2
Wyeomyia Theobald 1901	3
Psorophora Robineau-Desvoidy, 1827	5
Coquillettidia Dyar, 1905	5
Aedes Meigen, 1818	7
Anopheles Meigen, 1818	20
Culex Linnaeus, 1758	24
	77

Com a implementação do *WingBank*, os materiais biológicos do MosquitoLab foram reordenados e receberam três códigos novos (Tabela 12).

Tabela 11 - Novos códigos dos materiais do MosquitoLab

Atributo	Regra de negócio
LabCode	Deve seguir o padrão 'sexo' (sigla F ou M) + 'lado da asa em português' (sigla D ou E) + 'nº do indivíduo' (com 3 dígitos) + '-' + 'código do livro tombo' (A, B, C...) + 'nº da página do livro tombo' + 'T' + 'código da coleta (com 2 dígitos' + '.' + código de observação (se não tiver observação, colocar '0')
CollectionCode	Deve seguir o padrão 'IBSP' + 'nº no tombo' + '.' + 'sexo' (sigla F ou M) + 'lado da asa em português' (sigla D ou E) + 'nº do indivíduo' (com 3 dígitos)
WingBankAccessionCode	Deve seguir o padrão 'sexo' (sigla F ou M) + 'sequência de 8 dígitos sequenciais' (comprimento fixo) + 'lado da asa em inglês' (sigla L ou R)

Em publicações recentes referentes a importância de bancos de dados biológicos, Dujardin et al. [182] e Garros e Dujardin [79], relatam sobre a importância da criação de BDs relacionados ao uso da técnica de MGA de mosquitos. Dujardin et al. [182] criaram o MoMe-CLIC (*Morphometrics in Medical Entomology – Collection of Landmark for Identification and Characterization*), como já mencionado nesta tese, um repositório generalista de imagens de asas de artrópodes, o qual inclui desde a família Culicidae representada pelos gêneros *Aedes (Ae. aegypti e Ae. albopictus), Anopheles (An. funestus, An. benarrochi, An. albimanus, An. albitarsis, An. darlingi, An. aquasalis, An., braziliensis, An. nuneztovari, An. oswaldoi, An. rangeli, An. strodei, An. triannulatus), Culex (Cx. quinquefasciatus, Cx. pipiens), e Mansonia (Mansonia bonneae, Mansonia dives);* passando pelas famílias Tephiritidae, (*Bactrocera tau),* Braconidae *(Diachasmimorpha longicaudata),* Glossinidae (*Glossina fuscipes, Glossina palpalis),* Ceratopogonidae *(Culicoides obsoletus),* Psychodidae *(Phlebotomus papatasi),* Reduviidae *(Rhodinius robustus, Triatoma infestans)* até a Ordem aracnídica Solifugae *(Metacleobis fulvipes, Mummucia ibirapemussu),* sendo que a última inserção de dados data o ano de 2013.

Lorenz et al. [105], Jaramillo et al. [99], Wilke et al. [128], entre outros diversos autores que já utilizaram a MGA para resolver problemas biológicos em Culicidae, reforçam direta e indiretamente a importância da reunião de dados morfológicos, ecológicos e espaço-temporais referentes a mosquitos em um BD, o qual possa viabilizar estudos de re- e meta-análises, micro e macroevolutivos e que possa contribuir também com a taxonomia integrativa, uma abordagem multidisciplinar defendida por diversos autores como a melhor abordagem para o diagnóstico de espécies [79, 259].

Garros e Dujardin [79] sugerem que a necessidade de um BD é subestimada, pois o próprio poder da morfometria para identificar taxons é por si só subestimado,

reforçando que o sucesso da identificação dos taxons por meio da MGA depende da relevância das imagens de referência em seu nível de divergência de forma, bem como na técnica de classificação. Além disso, um programa de digitalização automática dos pontos, como o WINGMACHINE [158], pode otimizar o processo. Uma das motivações para a criação do *WingBank*, além de todas as previamente listadas, é a utilidade deste banco como base para programas de digitalização dos pontos como este.

Entre as motivações para a construção do *WingBank* tivemos: a possibilidade de contemplar a culicidofauna sulamericana, a qual é importantíssima devido a grande quantidade de doenças relacionadas a mosquitos presente nesta região, além é claro, da possibilidade de ele servir como base para a criação de um programa de identificação automática de mosquitos, para o qual já se tem um projeto incipiente, o Icarus. Este programa será capaz de identificar diferentes taxons de Culicidae com base na morfologia das asas, similarmente ao que ocorre com as sequências gênicas no *GenBank* [187]. A literatura vem mostrando que o poder preditivo dos classificadores depende em grande parte da qualidade e tamanho da amostra de treinamento [260-265], por este motivo, pretende-se utilizar o *WingBank* como base para o treinamento do Icarus, devido a sua grande variabilidade de espécies e grande número amostral na maioria dos taxons. A atual aplicação apresenta o seguinte layout:

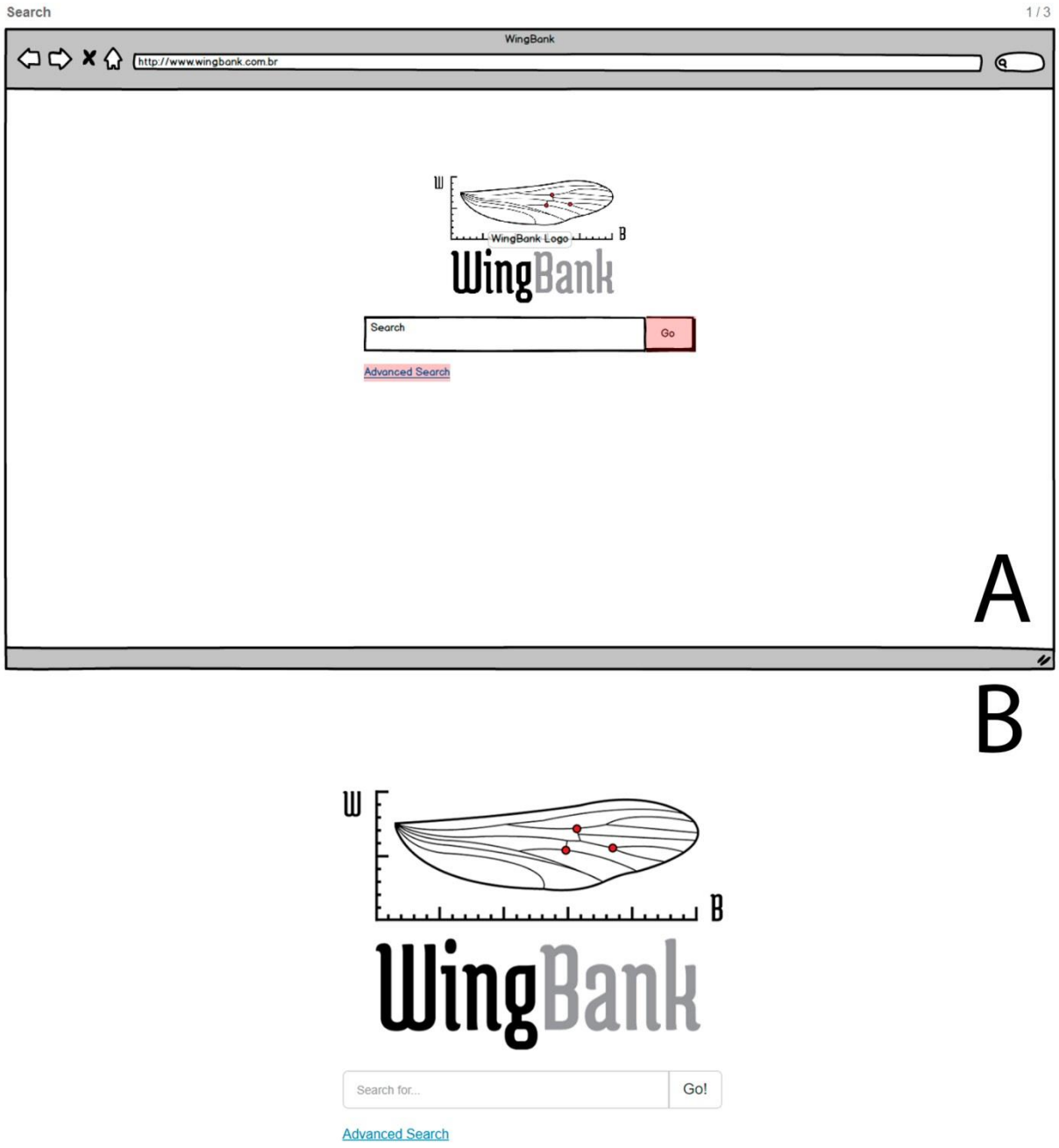

Figura 34 - *Layout* do *WingBank* demonstrando a interface de busca simples. A) Desenho preliminar, B) Aplicação pronta.

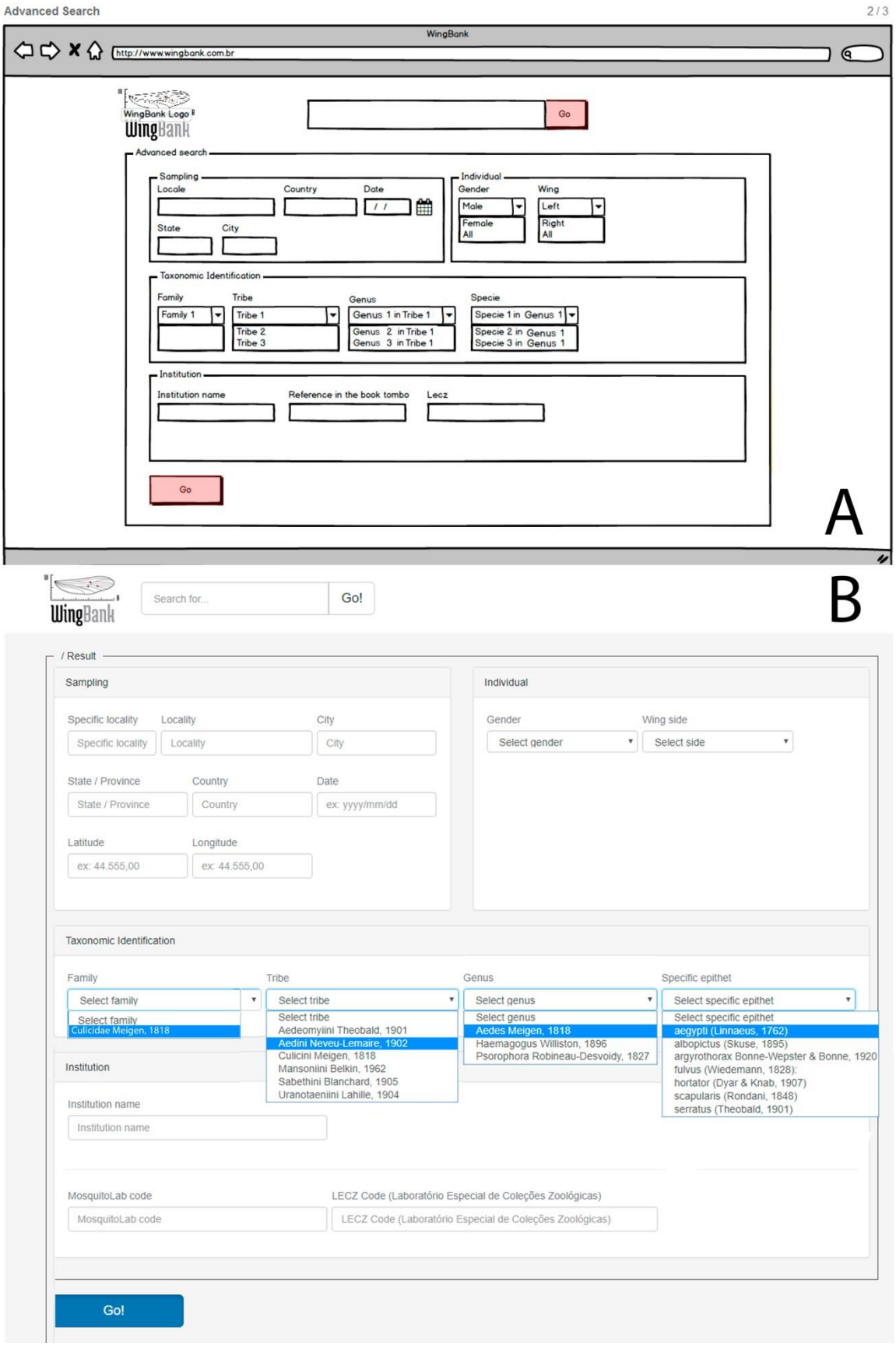

Figura 35 - *Layout* do *WingBank* demonstrando a interface de busca avançada. Detalhe para o sistema de busca "Taxonomic Identification". A) Desenho preliminar, B) Aplicação pronta.

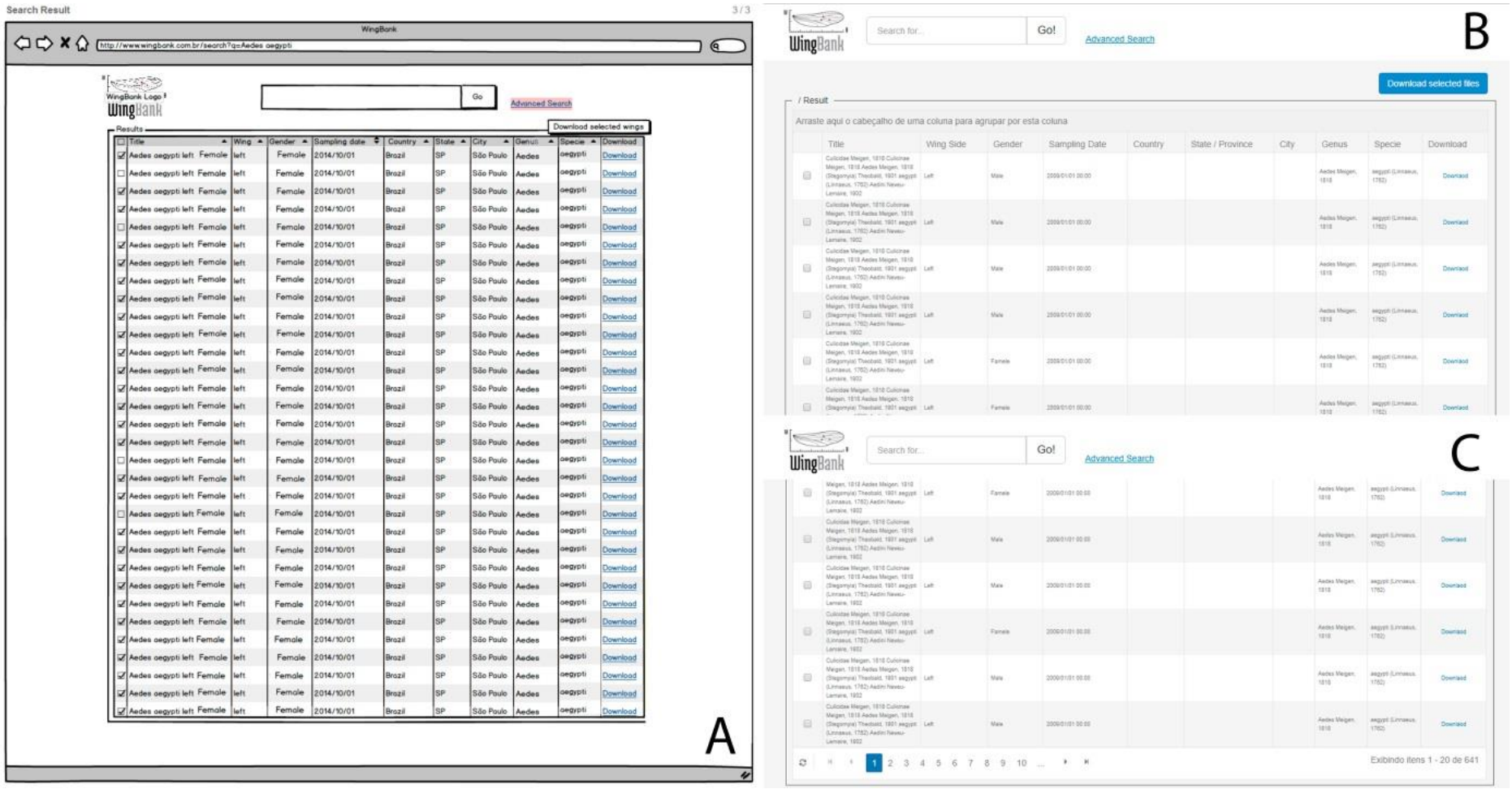

Figura 36 - *Layout* do *WingBank* demonstrando a interface de devolução do resultado ao usuário. A) Desenho preliminar, B) e C) Aplicação pronta.

Por meio da busca simples (Figura 34) o usuário poderá buscar por palavras-chave. A outra modalidade de busca, a avançada (Figura 35), permite ao usuário a busca combinada das mais diversas formas. O usuário poderá filtrar os resultados por características relacionadas à coleta (*Sampling*), ou seja, informações espaço-temporais como: local específico (*Specific Locality*), o qual se refere a especificações como tipo do criadouro; Localidade (*Locality*) referente à localização mais generalizada como endereço, Cidade (*City*), Estado ou Província (*State/Province*), País (*Country*) ou Coordenadas geográficas (*Latitude* e *Longitude*). Poderá também filtrar sua busca por informações relacionadas à biologia do animal, como Gênero (*Gender*) e/ou Lado da asa (*Wing Side*). A busca por Classificação Taxonômica (*Taxonomic Classification*) pode ainda ser filtrada por *Family, Tribe, Genus* e *Specific Epithet.* O campo *Institution*, embora possa, a princípio, ser utilizado por qualquer usuário, é de maior interesse aos usuários internos do MosquitoLab / Instituto Butantan, pois envolve busca por Instituições relacionadas *(Institution Name),* Código Interno do laboratório *(Lab Code)* e código de tombo *(LECZ Code).*

A exibição dos resultados (Figura 36) é apresentada em tabela, na qual o usuário pode ordenar o resultado de sua busca por qualquer um dos cabeçalhos da tabela, basta arrastá-lo para o campo indicado.

Algumas limitações ainda precisam ser consideradas e tratadas, como:

- Quando realizada uma busca por Lab Code, não é possível identificar qual é o "tipo" do código, por exemplo: se existe A101T01 e A101T02, atualmente não é possível identificar se o resultado faz parte do conjunto T01 ou T02;
- A maioria das imagens não possui escala gravada, no entanto todas as asas fotografadas estão guardadas em lâminas permanentes depositadas no LECZ, desta forma, uma nova digitalização, com as devidas padronizações poderá ser realizada.

Finalmente, consideramos que o *WingBank* é o primeiro BDR com as funcionalidades e as pretenções propostas. Além disso, é o maior BD de asas de Culicidae de que temos conhecimento.

5 CONCLUSÕES

5.1 Principais Conclusões

A morfometria geométrica alar se mostrou eficiente para a identificação de dimorfismo sexual alar em 10 espécies de mosquitos vetores de patógenos, bem como se mostrou eficiente para a diferenciação das duas espécies crípticas.

Foi observado tanto dimorfismo sexual de forma quanto de tamanho alar. No entanto, o dimorfismo sexual de tamanho alar se manifestou de modo diferente entre as espécies. A aparente canalização do dimorfismo sexual de forma alar em todas as espécies estudadas e a alta variabilidade de dimorfismo sexual de tamanho, parecem refletir complexos fatores evolutivos subjacentes;

Houve diferenciação morfológica de tamanho e forma alar significativa entre *An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.* com base em ambos os conjuntos de pontos (18 e 22 pontos anatômicos), sendo que a anotação com 22 pontos anatômicos e com alometria se mostrou mais informativa;

O *WingBank* foi modelado e implementado, e já está disponíel (com acesso restrito) em https://www.*WingBank*.butantan.gov.br e em breve será oficialmente lançado pelo Instituto Butantan. Ele é o maior banco de dados de asas de Culicidae de que temos conhecimento, e o primeiro do tipo relacional e com as intenções propostas.

O *WingBank* é um banco de dados relacional o que o torna capaz de facilitar a busca por informações. Ele já possui 13.287 registros de asas, dos quais 12.939 já estão vinculados a imagens, e 2.138 imagens já estão disponíveis para utilização por terceiros, o que possibilita a realização de futuros estudos de meta- e re-análises. Cada registro ganhou um código de acesso, o que torna mais eficiente e confiável a citação a um registro de asas utilizadas em publicações. Por fim, estes mais de 13 mil registros já podem servir como base para futuros programas de identificação automática de mosquitos.

5.2 Conclusões adicionais

a) Identificação de dimorfismo sexual:

Fêmeas das 10 espécies incluídas no estudo de dimorfismo sexual apresentaram asas ligeiramente mais largas e significativamente mais curtas do que os machos;

Os pontos anatômicos mais variáveis entre os sexos das 10 espécies analisadas quanto ao dimorfismo sexual alar foram os das regiões proximal e distal das veias medianas e radial;

Pode-se observar a ausência de dimorfismo sexual de tamanho alar em An. *homunculus* e uma inversão no padrão em *An. cruzii s.l.*. Além disso, *An. cruzii s.l.* também teve baixo dimorfismo sexual de forma, tornando esta espécie particularmente incomum comparada às outras analisadas neste estudo. Essa característica nestas duas espécies pode ser devido a fatores evolutivos e ambientais particulares a estas espécies, as quais são evolutiva e ecologicamente próximas;

A alometria aparentemente não direciona o dimorfismo sexual alar em Culicidae, apenas exerce uma influência marginal no dimorfismo sexual de forma. Desse modo, considerando que o dimorfismo sexual é prevalente e não primordialmente devido à alometria, acredita-se que complexos mecanismos evolutivos sejam responsáveis pela manutenção do dimorfismo sexual em mosquitos;

Possivelmente as espécies da subfamília Culicinae possuem diferentes padrões de dimorfismo sexual de forma alar, comparado à subfamília Anophelinae;

Caracteres morfológicos alares fornecem informações suficientes para estudos de dimorfismo sexual e são ferramentas práticas para identificar o sexo dos culicídeos.

b) Diferenciação *An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.*

De acordo com a comparação de similaridade entre as sequências de ITS2, observou-se que *An. strodei s.s.* e *An. albertoi* são mais similares, que *An. strodei s.s.* e *An. arthuri s.l.*. Isso corrobora os achados nos sítios diagnósticos (17/25 loci idênticos entre *An. strodei s.s.* e *An. albertoi,* contra 4/25 entre *An. arthuri s.l.* e *An. albertoi*);

O efeito alométrico, mesmo que baixo, foi significativo e influenciou a diferenciação entre *An. arthuri s.l.* e *An. strodei s.s.*;

Fêmeas de *An. arthuri s.l.* apresentaram asas isometricamente menores que *An. strodei s.s.* em ambos os conjuntos de dados (18 e 22 pontos anatômicos);

Não foi possível inferir com base nas informações genéticas e morfológicas obtidas no presente estudo, que os indivíduos pertencentes a *An. arthuri s.l.* avaliados são de algum dos subtipos (A, B, C ou D);

c) Modelagem e Implementação do *WingBank*

O *WingBank* foi modelado, construído, implementado e está ativo, além de estar respondendo às buscas com desempenho satisfatório.

6 PERSPECTIVAS

De condição de ser apenas um pré-projeto, o *WingBank* se transformou em um protótipo, o qual ainda precisa ser aperfeiçoado e enriquecido. O projeto *WingBank* é maior do que o que foi apresentado nesta tese, onde a equipe optou por apresentar um protótipo mais sucinto. No projeto inicial estava prevista a criação de entidades referentes a: 'Usuário', 'Fatores Climáticos', 'Fitofisionomia', 'Dados Genéticos' e 'Frequência de Batimentos Alares' além de relacionamento com outros bancos de dados, por meio do uso de APIs.

A segunda fase da criação do *WingBank* contemplará os seguintes passos, os quais não estão necessariamente apresentados em ordem cronológica.

- Publicar os primeiros resultados relacionados a modelagem e implementação do *WingBank*;
- Modelar e implementar a inserção dos tipos de entidades que faltam;
- Avaliar APIs viáveis;
- Registrar o *WingBank* no www.re3data.org;
- Aumentar a quantidade de combinações de pesquisas possíveis na busca avançada;
- Aumentar as especificações dos dados apresentados na interface de resultados;
- Adicionar *datepicker* para a escolha de data na busca avançada;
- Disponibilizar os *scripts* do *WingBank* para outros pesquisadores que queiram adaptar para seus problemas particulares;
- Padronizar escalas nas imagens;
- Padronizar o estereoscópio utilizado;
- Passar o site para português e torná-lo um site bilíngue;
- Iniciar a modelagem do Icarus, um software de identificação automática de mosquitos, com base em imagens alares.

REFERÊNCIAS*

1. Gubler DJ. Insects In Disease Transmission. In: Strickland GT, Editor. *Hunter Tropical Medicine*, 7th Edition. Philadelphia (PA): W. B. Saunders. 1991;981-1000

2. Philip CB, Rozenboom LE. Medico-Veterinary Entomology: A Generation Of Progress. History Of Entomology. 1973. In: Smith RF, Mittler TE, Smith CN, Editors. *History Of Entomology.* Palo Alto (CA): Annual Reviews. 1973;333-359.

3. Calmon P. História De Dom Pedro II. *Rio De Janeiro: J. Olympio.* 1975;*1–5.*

4. Besouchet L. Pedro II E O Século XIX. Rio De Janeiro. 1993.

5. Beauperthuy LD. Fiebre Amarilla. *Gaceta Oficial De Cumaná*. 1854;57.

6. Finlay C. The Mosquito Hypothetically Considered As An Agent In The Transmission Of Yellow Fever Poison. Yale Journal Of Biology And Medicine. 1881.

7. Reed W. Propagation Of Yellow Fever; Observations Based On Recent Researches. 1901; 60:201-9.

8. Figueiredo LTM. A Febre Amarela Na Região De Ribeirão Preto Durante A Virada Do Século XIX: Importância Científica E Repercussões Econômicas. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical.* 1996;29.

9. Ross R. Memoirs. With A Full Account Of The Great Malaria Problem And Its Solution. *American Journal Of Public Health.* 1923;13(11):959-60.

10. Rothstein WG. The Beast In The Mosquito: The Correspondence Of Ronald Ross And Patrick Manson. 1998.

11. Gubler DJ. Resurgent Vector-Borne Diseases As A Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases.* 1998;4(3):442-50.

12. Virginio F, Lorenz C, Aguiar BS, Suesdek L, Chiaravalloti-Neto F. Spatial And Temporal Epidemiology Of Malaria In Extra-Amazonian Regions Of Brazil. *Malaria Journal.* 2015;14(408).

---

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manus*cripts* submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

13. Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, Araujo MPD, Suárez-Mutis, MC, Santelli ACFES, Et Al. Malaria In Brazil: What Happens Outside The Amazonian Endemic Region. *Memórias Instuto Oswaldo Cruz*.109(5):618-33.

14. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Montecchini S, Dell'Anna ML, Et Al. Accurate Identification Of The Six Human *Plasmodium* spp. Causing Imported Malaria, Including *Plasmodium ovale Wallikeri* And *Plasmodiu*m *knowlesi*. *Malaria Journal.* 2013;12:321.

15. Bruce-Chwatt LJ. Essential Malariology. 2nd Ed. New York: John Wiley And Sons.; 1985;76,96,179-83.

16. Bôtto-Menezes C, Bardají A, Campos GDS, Fernandes S, Hanson K, Martínez-Espinosa FE, Et Al. Costs Associated With Malaria In Pregnancy In The Brazilian Amazon, A Low Endemic Area Where Plasmodium Vivax Predominates. *Plos Neglected Tropical Diseases.* 2016;10(3).

17. Shepard DS, Suaya JA, Halstead SB, Nathan MB, Gubler DJ, Mahoney RT, Et Al. Cost-Effectiveness Of A Pediatric Dengue Vaccine. *Vaccine*. 2004;22(9-10):1275-80.

18. Suaya JA, Shepard DS, Chang M-S, Caram M, Hoyer S, Socheat D, Et Al. Cost-Effectiveness Of Annual Targeted Larviciding Campaigns In Cambodia Against The Dengue Vector *Aedes aegypti. Tropical Medicine And International Health.* 2007;12(9):1026-36.

19. Laporta GZ, Linton Y-M, Wilkerson RC, Bergo ES, Nagaki SS, Sant'Ana DC, Et Al. Malaria Vectors In South America: Current And Future Scenarios. *Parasites & Vectors*. 2015;8(426).

20. Sutherst RW. Global Change And Human Vulnerability To Vector Borne Diseases. *Clinical Microbioly Reviews.* 2004;17:136–73.

21. Githeko AK, Lindsay SW, Confalonieri UE, Patz JA. Climate Change And Vector-Borne Diseases: A Regional Analysis. Bulletin Of World Health Organization. 2000;78:1136–47.

22. Lorenz C, Azevedo T, Virginio F, Aguiar B, Chiaravalloti-Neto F, Suesdek L. Impact Of Environmental Factors On Neglected Emerging Arboviral Diseases. *Plos Neglected Tropical Diseases.* 2017.

23. Secretaria De Vigilância Em Saúde − Ministério Da Saúde Boletim Epidemiológico. 2016;47(9).

24. LUNA EJA. A Emergência Das Doenças Emergentes E As Doenças Infecciosas Emergentes E Reemergentes No Brasil. *Revista Brasileira De Epidemiologia.* 2002;5.

25. World Health Organization. Disease Outbreak News - Emergencies Preparedness, Response 2016 [Disponível em: http://www.who.int/csr/don/archive/disease/vector-borne/en/].

26. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Boletim Epidemiológico. Reemergência Da Febre Amarela Silvestre No Brasil, 2014/2015: Situação Epidemiológica E A Importância Da Vacinação Preventiva E Da Vigilância Intensificada No Período Sazonal. 2015.

27. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento Dos Casos De Dengue, Febre De Chikungunya E Febre Pelo Vírus Zika Até A Semana Epidemiológica 49. 2016.

28. Harbach R. Valid Species - Mosquito Taxonomic Inventory Updated 17 October 2017 [Disponível em: http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list].

29. Munstermann LE, Conn JE. Systematics Of Mosquito Disease Vectors (Diptera, Culicidae): Impact Of Molecular Biology And Cladistic Analysis. *Annual Review Of Entomology.* 1997;42:351-69.

30. Foley DH, Rueda LM, Wilkerson RC. Insight Into Global Mosquito Biogeography From Country Species Records. *Journal Of Medical Entomology*. 2007;44(4):554-67.

31. Forattini OP. Culicidologia Médica: EDUSP; 2002. 860 P.

32. Cirio SM. Epidemiologia E Clínica De Cães Portadores De Dirofilariose Em Espaços Urbanos De Município Do Litoral Do Paraná E Aspectos Da Histologia De *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera, Culicidae): Universidade Federal Do Paraná, Curitiba.; 2005.

33. Lee HL, Rohani, A. Transovarial Transmission Of Dengue Virus In *Aedes aegypti* And *Aedes albopictus* In Relation To Dengue Outbreak In An Urban Area In Malaysia. *Dengue Bulletin.* 2005;29:106-11.

34. Noridah O, Paranthaman V, Nayar S, Masliza M, Ranjit K, Norizah I, et al. Outbreak Of Chikungunya Due To Virus Of Central/East African Genotype In Malaysia. *The Medical Journal Of Malaysia.* 2007;62:323-8.

35. Amraoui F, Vazeille M, Failloux AB. French *Aedes albopictus* Are Able To Transmit Yellow Fever Virus. *Eurosurveillance*. 2016;21(39):15-7.

36. Davis N.C, Shannon RC. Studies On Yellow Fever In South America: Attempts To Transmit The Virus With Certain *Aedine* And *Sabethine* Mosquitoes And With Triatomas (Hemiptera). *American Journal Of Tropical Medical Hygiene.* 1931;11:21-9.

37. Vanlandingham DL, Higgs S, Huang YJ. A*edes albopictus* (Diptera: Culicidae) And Mosquito-Borne Viruses In The United States. *Journal Of Medical Entomology.* 2016;53:1024-8.

38. Wong PS, Li MZ, Chong CS, Ng LC, Tan CH. A*edes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector Of Zika Virus In Singapore. *Plos Neglected Tropical Diseases.* 2013;7.

39. Gratz NG. Critical Review Of The Vector Status Of *Aedes albopictus*. *Medical Veterinary Entomology*. 2004;18:215-27.

40. Chompoosri J, Thavara U, Tawatsin A, Boonserm R, Phumee A, Sangkitporn S, Et Al. Vertical Transmission Of Indian Ocean Lineage Of Chikungunya Virus In A*edes aegypti* And A*edes albopictus* Mosquitoes. *Parasites & Vectors*. 2016;9:1.

41. Vasconcelos PFC, Costa ZG, Travassos Da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VLRS, at Al. Epidemic Of Jungle Yellow Fever In Brazil, 2000: Implications Of Climatic Alterations In Disease Spread. *Journal Of Medical Virology.* 2001;65:598-604.

42. Cavalcante KRLJ, Tauil PL. Risco De Reintrodução Da Febre Amarela Urbana No Brasil. 2017;26(3):617-20.

43. Lane, J. Neotropical Culicidae. University Of Sao Paulo; 1953.

44. Brustolin M, Talavera S., Nuñez A., Santamaría C., Rivas R., Pujol N., Valle M., Verdún M., Brun A., Pagès N, Busquets, N. Rift Valley Fever Virus And European Mosquitoes: Vector Competence Of *Culex pipiens* And *Stegomyia albopicta* (=*Aedes albopictus*). *Medical Veterinary Entomology.* 2017.

45. De SK, Chandra G. Studies On The Filariasis Vector - *Culex quinquefasciatus* At Kanchrapara, West-Bengal (India). *Indian Journal Of Medical Research.* 1994;99:255-8.

46. Guedes DRD, Paiva MHS, Donato MMA, Barbosa PP, Krokovsky L, Rocha SWD, et al. Zika Virus Replication In The Mosquito *Culex quinquefasciatus* In Brazil. *Emerging Microbes & Infections*. 2017;6.

47. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D, Et Al. Biodiversité Du Paludisme Dans Le Monde. J*ohn Libbey Eurotext*. 2004:428p.

48. Tauil PL D-RC. Some Aspects Of Epidemiology And Control Of Malaria In Brazil. R*evista Ibérica De Parasitologia*. 1998;58:163-7.

49. Schiavi A. Nota Sobre Mosquitos Vetores Em Iguape. 1945. *Arquivos De Higiene E Saúde Pública.* 10: 69-75

50. Conn J, Wilkerson R, Segura M, Souza R, Schlichting C, Wirtz R, et al. Emergence Of A New Malaria Vector Facilitated By Human Migration And Changes In Land Use. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*. 2002;*66*:18-22.

51. Forattini O. Entomologia Médica. São Paulo: Faculdade De Saúde Pública; 1962.

52. Aragão M. Sobre A Biomassa Dos *Anopheles* Do Subgênero *Kerteszia* Em Seus Criadouros. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 1968;66:227-37.

53. Deane L. Malaria Vectors In Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz.* 1986;81:5-14.

54. Buck A. Filariasis In: Strickland, T. G., *Hunter's Tropical Medicine*. 1991.

55. Mak JW. Epidemiology Of Lymphatic Filariasis. *Ciba Foundation Symposium.* 1987;127:5-14.

56. Manguin S, Bangs MJ, Pothikasikorn J, Chareonviriyaphap T. Review On Global Co-Transmission Of Human Plasmodium Species And *Wuchereria bancrofti* By *Anopheles* Mosquitoes. *Infection, Genetics And Evolution*. 2010;10(2):159-77.

57. Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, et al. Human Impacts Have Shaped Historical And Recent Evolution In *Aedes aegypti,* The Dengue And Yellow Fever Mosquito. *Evolution.* 2014;68(2):514-25.

58. Gloria-Soria A, Ayala D, Bheecarry A, Calderon-Arguedas O, Chadee DD, Chiappero M, et al. Global Genetic Diversity Of *Aedes aegypti.* Molecular Ecology. 2016;25(21):5377-95.

59. Vidal PO, Carvalho E, Suesdek L. Temporal Variation Of Wing Geometry In *Aedes albopictus*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(8):1030-4.

60. Smith LB. Bromeliad Malaria. Annual Report Of The Board Of Regents Of The Smithsonian Institution. 1952;92:385-98.

61. Marrelli MT, Malafronte RS, Sallum MA, Natal D. *Kerteszia* Subgenus Of *Anopheles* Associated With The Brazilian Atlantic Rainforest: Current Knowledge And Future Challenges. *Malaria Journal.* 2007;6:127-35.

62. Levine RS, Peterson AT, Benedict MQ. Geographic And Ecologic Distributions Of The *Anopheles gambiae* Complex Predicted Using A Genetic Algorithm. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene.* 2004;70:105-9.

63. Hribar L. Effect Of Larval Rearing Temperature On Adult Female Morphology Of *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* (Diptera: Culicidae*). Invertebrate Reproduction Development* 1997;*32*:85-8.

64. Hribar L. Costal Wing Spot Variation Within And Among Progeny Of Single Female *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). 1995.

65. Hribar L. Geographic Variation Of Male Genitalia Of *Anopheles nuneztovari* Gabaldon. *Mosquito Systematic*. 1994;*26*:132-44.

66. Sallum MAM, Foster PG, Dos Santos CLS, Flores DC, Motoki MT, Bergo ES. Resurrection Of Two Species From Synonymy Of *Anopheles (Nyssorhynchus) strodei* Root, And Characterization Of A Distinct Morphological Form From The *Strodei* Complex (Diptera: Culicidae). *Journal Of Medical Entomology.* 2010;47(4):504-26.

67. Marrelli MT, Sallum MAM, Marinotti O. The Second Internal Transcribed Spacer Of Nuclear Ribosomal DNA As A Tool For Latin American Anopheline Taxonomy: A Critical Review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006;101:817–32.

68. Bourke BP, Foster PG, Bergo ES, Calado DC, Sallum MAM. Phylogenetic Relationships Among Species Of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera, Culicidae) Based On Nuclear And Mitochondrial Gene Sequences. *Acta Tropica* 2010;114(2):88-96.

69. Bourke BP, Oliveira TP, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MAM. A Multi-Locus Approach To Barcoding In The *Anopheles strodei* Subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*. 2013;6.

70. Greni SE. A Multi-Gene Analysis And Proposed Distribution Of Species Of The *Strodei* Subgroup Of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). Universidade De São Paulo, Faculdade De Saúde Pública. 2016.

71. Sant'Ana DC, Sallum MAM. *Anopheles (Nyssorhynchus) Striatus*, A New Species Of The *Strodei* Subgroup (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira De Entomologia.* 2017;61(2):136-45.

72. Oliveira-Ferreira J, Lourenco-De-Oliveira R, Deane LM, Teva A, Daniel-Ribeiro CT. Natural Malaria Infections In Anophelines In Rondonia State, Brazilian Amazon. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*. 1990;43(1):6-10.

73. DEANE LM. A Cronologia Da Descoberta Dos Transmissores Da Malária Na Amazônia Brasilira. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 1989;84:149-56.

74. Duarte A, 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. *Parasites & Vectors*. 2013;6.

75. WP T, B D-T. Malaria Vectors In The Brazilian Amazon: *Anopheles* Of The Subgenus *Nyssorhynchus*. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*. 2000;42:87-94.

76. Unti O. Anofelinos Do Vale Do Paraíba. Nota III. Biologia Do *Anopheles (Nyssorhynchus) Strodei* Root, 1926 Com A Descrição De Uma Variedade Nova:

Anopheles (Nyssorhynchus) Strodei ramosi Var. Anais Paulista de Medicina e Cirurgia. 1940;40:489–505.

77. Unti O. Anofelinos Do Vale Do Rio Paraíba, *Anopheles (Nyssorhynchus) Strodei* Root, 1926, Com A Descrição De Três Variedades Novas. 1941;33:3–18.

78. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Ponsonby DJ, Herrera M, Sallum MAM, Velez ID, Et Al. Systematics Of The *Oswaldoi* Complex (Anopheles, *Nyssorhynchus*) In South America. *Parasites & Vectors*. 2013;6.

79. Garros C, Dujardin J-P. Genetic And Phenetic Approaches To *Anopheles* Systematics, *Anopheles* Mosquitoes - New Insights Into Malaria Vectors. 2013.

80. Fritz GN, Engman S, Rodriguez R, Wilkerson RC. Identification Of Four Vectors Of Human *Plasmodium* spp. By Multiplex PCR: *Anopheles rangeli*, *An. strodei, An. triannulatus, And An. trinkae* (Diptera : Culicidae : *Nyssorhynchus*). Journal Of Medical Entomology. 2004;41(6):1111-5.

81. Brown DD, Wensink PC, Jordan E. A Comparison Of The Ribosomal DNA's Of *Xenopus laevis* And *Xenopus mulleri*: The Evolution Of Tandem Genes. *Journal Of Molecular Biology.* 1972;63:57-73.

82. Wesson DM, Porter CH, Collins FH, . Sequence And Secondary Structure Comparisons Of ITS rDNA In Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Molecular, Phylogenetic And Evolution*. 1992;1:253–69.

83. Rich SM, Rosenthal BM, Telford SR, Spielman A, Hartl DL, Ayala FJ. Heterogeneity Of The Internal Transcribed Spacer (ITS-2) Region Within Individual Deer Ticks. *Insect Molecular Biology*. 1997;6:123–9.

84. Onyabe DY, Conn JE. Intragenomic Heterogeneity Of A Ribosomal DNA Spacer (ITS2) Varies Regionally In The Neotropical Malaria Vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). Insect Molecular Biology. 1999;8:435–42.

85. Ritchie A, Blackwell A, Malloch G, Fenton B. Heterogeneity Of ITS1 Sequences In The Biting Midge *Culicoides impunctatus* (Goetghebuer) Suggests A Population In Argyll, Scotland, May Be Genetically Distinct. Genome 3: 546–558. 2004.

86. Xu J-NN, Qu F-Y. Ribosomal DNA Difference Between Species A And D Of The *Anopheles* Dirus Complex Of Mosquitoes From China. *Medical And Veterinary Entomology.* 1997 (11):134-8.

87. NW B, Ellis JT, Cooper RD, Saul A. Discrimination Of All Members Of The *Anopheles Punctulatus* Complex By Polimerase Chain Reaction Restriction Fragment Lenght Polymorphism Analysis. *Insect Molecular Biology*. 1999;53:478-81

88. Paskewitz SM, Collins FH. Use Of The Polymerase Chain-Reaction To Identify Mosquito Species Of The Anopheles gambiae Complex. *Medical And Veterinary Entomology*. 1990;4(4):367-73.

89. Walton C, Handley JM, Kuvangkadilok C, Collins FH, Harbach RE, Baimai V, Et Al. Identification Of Five Species Of The *Anopheles dirus* Complex From Thailand, Using Allele-Specific Polymerase Chain Reaction. *Medical And Veterinary Entomology*. 1999 Feb;13(1):24-32.

90. Torres EP, Foley DH, Saul A. Ribosomal DNA Sequence Markers Differentiate Two Species Of The *Anopheles maculatus* (Diptera:Culicidae) Complex In The Philippines. *Journal Of Medical Entomology.* 2000;37(6):933-7.

91. Wilkerson RC, Reinert JF, Cong L. Ribosomal DNA ITS2 Sequences Differentiate Six Species In The *Anopheles crucians* Complex (Diptera : Culicidae). *Journal Of Medical Entomology.* 2004;41(3):392-401.

92. Alam MT, Das MK, Dev V, Ansari MA, Sharma YD. Identification Of Two Cryptic Species In The *Anopheles (Cellia) annularis* Complex Using Ribosomal DNA PCR-RFLP. *Parasitology Research.* 2007;100(5):943-8.

93. Vogler AP, Desalle R. Evolution And Phylogenetic Information Content Of The ITS-1 Region In The Tiger Beetle *Cicindela dorsalis. Molecular Biology And Evolution*. 1994;11:393–405.

94. Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogeny Of Fourteen *Culex* Mosquito Species, Including The *Culex pipiens* Complex, Inferred From The Internal Transcribed Spacers Of Ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology*. 1996;5:93–107.

95. Gentile G, Della Torre A, Maegga B, Powell JR, Caccone A. Genetic Differentiation In The African Malaria Vector, *Anopheles gambiae* s.s., And The Problem Of Taxonomic Status. *Genetics*. 2002;161:1561–78.

96. Quiñones M, Harbach R, Calle D, Ruiz F, Erazo H, Linton Y. Variante Morfológica De Hembras De *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) En Putumayo, Colombia. *Biomédica*. 2001;*21*:351-9.

97. Vidal PO, Peruzin MC, Suesdek L. Wing Diagnostic Characters For *Culex quinquefasciatus* And *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira De Entomologia.* 2011;55(1):134-7.

98. Lorenz C, Patane JSL, Suesdek L. Morphogenetic Characterisation, Date Of Divergence, And Evolutionary Relationships Of Malaria Vectors *Anopheles* cruzii And *Anopheles homunculus. Infection Genetics And Evolution.* 2015;35:144-52.

99. Jaramillo N, Dujardin JP, Calle-Londono D, Fonseca-Gonzalez I. Geometric Morphometrics For The Taxonomy Of 11 Species Of *Anopheles (Nyssorhynchus)* Mosquitoes. *Medical And Veterinary Entomology.* 2015;29(1):26-36.

100. Calle D, Quinones M, Erazo H, Jaramillo N. Differentiation By Geometric Morphometrics Among 11 *Anopheles (Nyssorhynchus)* In Colombia. *Biomedica*. 2008;*28*:371-85.

101. Bookstein FL. Foundations Of Morphometrics. *Annual Review Of Ecology And Systematics.* 1982;13:451–70.

102. Monteiro L, Reis S. Princípios De Morfometria Geométrica. 1999.

103. Richtsmeier JT, Deleon VB, Lele SR. The Promise Of Geometric Morphometrics. *Yearbook Of Physical Anthropology.* 2002;45:63-91.

104. Rohlf FJ. Morphometric Tools For Landmark Data - Geometry And Biology - Bookstein, FL. *Journal Of Classification*. 1993;10(1):133-6.

105. Lorenz C, Almeida F, Almeida-Lopes F, Louise C, Pereira SN, Petersen V, et al. Geometric Morphometrics In Mosquitoes: What Has Been Measured? *Infection, Genetics And Evolution*. 2017;54:205-15.

106. Lorenz C, Suesdek L. Short Report: Evaluation Of Chemical Preparation On Insect Wing Shape For Geometric Morphometrics. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*. 2013;89(5):928-31.

107. Klingenberg CP. Evolution And Development Of Shape: Integrating Quantitative Approaches. *Nature Reviews Genetics.* 2010;11(9):623-35.

108. Bitner-Mathé BC, Klaczko LB. Heritability, Phenotypic And Genetic Correlations Of Size And Shape Of *Drosophila Mediopunctata* Wings. *Heredity*. 1999;83:688-96.

109. Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrungkiat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, et al. Influence Of Larval Density Or Food Variation On The Geometry Of The Wing Of *Aedes (Stegomyia) aegypti. Tropical Medicine & International Health.* 2007;12(11):1354-60.

110. Morales-Vargas RE, Ya-Umphan P, Phumala-Morales N, Komalamisra N, Dujardin JP. Climate Associated Size And Shape Changes In *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations From Thailand. *Infection Genetics And Evolution.* 2010;10(4):580-5.

111. Aytekin S, Aytekin AM, Alten B. Effect Of Different Larval Rearing Temperatures On The Productivity (Ro) And Morphology Of The Malaria Vector A*nopheles Superpictus grassi* (Diptera: Culicidae) Using Geometric Morphometrics. *Journal Of Vector Ecology.* 2009;34(1):32-42.

112. Gómez GF, Márquez EJ, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM. Geometric Morphometric Analysis Of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) Reveals Significant Effect Of Environmental Factors On Wing Traits And Presence Of A Metapopulation. *Acta Tropica* 2014;135:75-85.

113. Morales Vargas R, Phumala-Morales N, Tsunoda T, Apiwathnasorn C, Dujardin J. The Phenetic Structure Of Ae*des albopictus. Infection, Genetics And Evolution* 2013;13(242–251).

114. Gunz P, Mitteroecker P. Semilandmarks: A Method For Quantifying Curves And Surfaces. *Hystrix-Italian Journal Of Mammalogy*. 2013;24(1):103-9.

115. Sheets H, Covino K, Panasiewicz J, Morris S. Comparison Of Geometric Morphometric Outline Methods In The Discrimination Of Age-Related Differences In Feather Shape. *Frontiers In Zoology.* 2006;3.

116. Bookstein FL. Morphometric Tools For Landmark Data. Geometry And Biology Cambridge: *Cambridge University Press*; 1997;455.

117. Rohlf FJ. Relative Warp Analysis And Example Of Its Application To Mosquito Wing. Madrid: Museo Nacional De Ciencias Naturales. 1993.

118. Devicari M, Lopes AR, Suesdek L. Wing Sexual Dimorphism In *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae). *Biota Neotropica.* 2011;11(2):165-9.

119. Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Altitudinal Population Structure And Microevolution Of The Malaria Vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*. 2014;7.

120. Virginio F, Vidal PO, Suesdek L. Wing Sexual Dimorphism Of Pathogen-Vector Culicids. *Parasites & Vectors*. 2015;8.

121. Christe RD, Wilke ABB, Vidal PO, Marrelli MT. Wing Sexual Dimorphism In *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Infection Genetics And Evolution.* 2016;45:434-6.

122. De Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT. Genetic-Morphometric Variation In *Culex quinquefasciatus* From Brazil And La Plata, Argentina. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz.* 2010;105(5):672-6.

123. K.R. Galbo SRT. Fluctuating Asymmetry In The Wings Of *Culex Quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) From Selected Barangays In Iligan City, Philippines. AACL Bioflux. 2014;7:357-64.

124. Demari-Silva B, Suesdek L, Sallum MAM, Marrelli MT. Wing Geometry Of *Culex Coronator* (Diptera: Culicidae) From South And Southeast Brazil. *Parasites & Vectors*. 2014;7.

125. Louise C, Vidal PO, Suesdek L. Microevolution Of Aedes Aegypti. *Plos One*. 2015;10(9).

126. Petersen V, Devicari M, Suesdek L. High Morphological And Genetic Variabilities Of *Ochlerotatus scapularis,* A Potential Vector Of Filarias And Arboviruses. *Parasites & Vectors*. 2015;8.

127. Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Morphometrical Diagnosis Of The Malaria Vectors *Anopheles Cruzii, An. homunculus* And *An. bellator. Parasites & Vectors*. 2012;5.

128. Wilke ABB, Christe RD, 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).

129. Kendall DG. The Diffusion Of Shape. *Advances In Applied Of Probability*. 1977;9(428-230).

130. Rohlf FJ. Shape Statistics: Procrustes Superimpositions And Tangent Spaces. *Journal Of Classification.* 1999;16(2):197-223.

131. Slice DE, Bookstein FL, Marcus LF, Rohlf FJ. Appendix I: Glossary For Geometric Morphometric. In Marcus LF, Corti M, Loy A, GJP. Naylor And Slice DE. Eds. Advances In Morphometrics Plenum Press, New York And London. 1996:531–51.

132. Rohlf FJ. Morphometrics. *Annual Reviews Of Ecology And Systematics*. 1990;21:299-316.

133. Dujardin JP. Morphometrics Applied To Medical Entomology. *Infection Genetics And Evolution.* 2008;8(6):875-90.

134. Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. Geometric Morphometrics: Ten Years Of Progress Following The 'Revolution'. *Italian Journal of Zoology*. 2004;71(1):5–16.

135. Klingenberg CP, Mcintyre GS. Geometric Morphometrics Of Developmental Instability: Analyzing Patterns Of Fluctuating Asymmetry With Procrustes Methods. *Evolution.* 1998;52:1363–75.

136. Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A. Shape Analysis Of Symmetric Structures: Quantifying Variation Among Individuals And Asymmetry. *Evolution*. 2002;56:1909–20.

137. Gidaszewski NA, Baylac M, Klingenberg CP. Evolution Of Sexual Dimorphism Of Wing Shape In The *Drosophila melanogaster* Subgroup. *BMC Evolutionary Biology.* 2009;9.

138. Fairbairn D, Blanckenhorn W, Székely T. Sex, Size And Gender Roles: Evolutionary Studies Of Sexual Size Dimorphism. 2007.

139. Benitez HA, Bravi R, Parra LE, Sanzana MJ, Sepulveda-Zuniga E. Allometric And Non-Allometric Patterns In Sexual Dimorphism Discrimination Of Wing Shape In Ophion Intricatus: Might Two Male Morphotypes Coexist? *Journal Of Insect Science.* 2013;13.

140. Darwin C. The Descent Of Man, And Selection In Relation To Sex. 2th Ed. London: John Murray, Albermarle Street; 1874.

141. Fairbairn DJ. Allometry For Sexual Size Dimorphism: Pattern And Process In The Coevolution Of Body Size In Males And Females. *Annual Review Of Ecology And Systematics.* 1997;28:659-87.

142. Meyer-Rochow VB, Reid WA. Male And Female Eyes Of The Antarctic Midge Belgica-Antarctica (Diptera, Chironomidae) - A Scanning Electron-Microscope Study. *Applied Entomology And Zoology.* 1994;29(3):439-42.

143. Adler PH, Adler CRL. Mating-Behavior And The Evolutionary Significance Of Mate Guarding In 3 Species Of Crane Flies (Diptera, Tipulidae). *Journal Of Insect Behavior*. 1991;4(5):619-32.

144. Eberhard WG. Physical Restraint Or Stimulation? The Function(S) Of The Modified Front Legs Of Male *Archisepsis diversiformis* (Diptera, Sepsidae). *Journal Of Insect Behavior*. 2002;15(6):831-50.

145. Wilkinson G, Dodson G. Function And Evolution Of Antlers And Eye Stalks In Flies. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1997.

146. Forattini OP. Culicidologia Médica: EDUSP. 2002;860.

147. Alexander R, Brown Jr W. Mating Behavior And The Origin Of Insect Wings. Ann Arbor, Michigan: University Of Michigan Museum Of Zoology. 1963.

148. Shevtsova E, Hansson C, Janzen DH, Kjaerandsen J. Stable Structural Color Patterns Displayed On Transparent Insect Wings. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.* 2011;108(2):668-73.

149. Cator LJ, Arthur BJ, Harrington LC, Hoy RR. Harmonic Convergence In The Love Songs Of The Dengue Vector Mosquito. Science. 2009;323(5917):1077-9.

150. Speranca MA, Capurro ML. Perspectives In The Control Of Infectious Diseases By Transgenic Mosquitoes In The Post-Genomic Era - A Review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(4):425-33.

151. Scali C, Catteruccia F, Li Q, Crisanti A. Identification Of Sex-Specific Trans*cripts* Of The *Anopheles gambiae* Double Sex Gene. *Journal of Experimental Biology.* 2005;208:3701–9.

152. Wilkerson RC, Linton YM, Fonseca DM, Schultz TR, Price DC, Strickman DA. Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification Of Tribe Aedini That Balances Utility With Current Knowledge Of Evolutionary Relationships. *Plos One.* 2015;10(7).

153. Reinert J, Harbach R, Kitching I. Phylogeny And Classification Of Tribe Aedini (Diptera: Culicidae). *Zoological Journal Of The Linnean Society.* 2009;157:700−94.

154. Saez AG, Lozano E. Body Doubles. *Nature*. 2005;433(111).

155. Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Et Al. Cryptic Species As A Window On Diversity And Conservation. *Trends In Ecology And Evolution.* 2006;22.

156. Mayr E. Animal Species And Evolution. The Belknap Press Of Harvard University Press Cambridge, Massachusetts. 1966.

157. Mayr E. The Bearing Of The New Systematics On Genetical Problems. The Nature Of Species. *Advances In Genetics*. 1948;[205-37].

158. Houle D, Mezey J, Galpern P, Carter A. Automated Measurement Of *Drosophila* Wings. *BMC Evolutionary Biology*. 2003;3.

159. Baylac M, Garnery L, Tharavy D, Pedraza-Acosta J, Rortais A, Arnold G. Apiclass, An Automatic Wing Morphometric Expert System For Honeybee Identification. 2008.

160. Sonnenschein A, Vanderzee D, Pitchers WR, Chari S, Dworkin I. An Image Database Of *Drosophila melanogaster* Wings For Phenomic And Biometric Analysis. Gigascience. 2015;4.

161. Dujardin J-P. Morphometrics In Medical Entomology – Collection Of Landmark For Identification And Characterization. 2012.

162. Gibas C. Desenvolvendo Bioinformática: Elsevier Editora Ltda; 2002.

163. Stephens ZD, Lee SY, Faghri F, Campbell RH, Zhai C, Efron MJ, Et Al. Big Data: Astronomical Or Genomical? *Plos Biology*. 2015;13(7).

164. Caterino MS, Cho S, Sperling FAH. The Current State Of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower Of Babel. *Annual Review Of Entomology.* 1-54.

165. Drăghici S, Sellamuthua S, Khatria P. Babel's Tower Revisited: A Universal Resource For Crossreferencing Across Annotation Databases. *Bioinformatics.* 2006;22(23):2934–9.

166. Elmasri R, Navathe SB. Fundamentals Of Database Systems. 2011. 6th.

167. Date CJ. An Introduction To Database Systems. 4 Ed. 1986.

168. Seltzer M. Beyond Relational Databases. 2008;51.

169. Codd EF. A Relational Model Of Data For Large Shared Data Banks. Communications Of The Acm. 1970;13(6):377-&.

170. IBM. Icones Do Progresso: Banco De Dados.

171. Chen PP-S. The Entity-Relationship Model: Toward A Unified View Of Data: Library Of The Massachusetts Institute Of Technology; 1977.

172. Date CJ. An Introduction To Database Systems. 8 Ed: Pearson Education, Inc.; 2004.

173. Everest, G. Basic Data Structure Models Explained With A Common Example. Austin, TX: IEEE Computer Society Publications Office; 1976.

174. Celko J. Joe Celko's SQL Programming Style: Morgan Kaufmann - Elsevier; 2005.

175. Evans E. Domain-Driven Design: Tackling Complexity In The Heart Of Software: Addison Wesley; 2003.

176. Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory. 2013.

177. Wiley EO, Liebermann BS. Phylogenetic Systematics. 2 Ed. 2011;432.

178. Vences M, Guayasamin JM, Miralles A, De la Riva I. To Name Or Not To Name: Criteria To Promote Economy Of Change In Linnaean Classification Schemes. Zootaxa. 2013;3636:201-44.

179. Rohlf FJ. The Tps Series Of Software. Hystrix-Italian Journal Of Mammalogy. 2015;26(1):9-12.

180. Klingenberg CP. Morphoj: An Integrated Software Package For Geometric Morphometrics. Molecular Ecology Resources. 2011;11(2):353-7.

181. Dujardin, JP. COO, MOG And COV For Windows. Institut De Recherches Pourle Développement. 2010.

182. Dujardin JP, Kaba D, Henry AB. The Exchangeability Of Shape. 2010.

183. Zavortink TJ. Mosquito Studies (Diptera: Culicidae) XXIX. A Review Of The Subgenus *Kerteszia* Of *Anopheles*. *Contributions of the American Entomological Institute*. 1973;9:1–54.

184. Arnell JH. A Review Of The Scapularis Group Of *Aedes (Ochlerotatus)* . *Contributions of the American Entomological Institute*. 1976;13.

185. Phylip FJ. Phylogeny Inference Package: University Of Washington; 2005.

186. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais Mosquitos De Importância Sanitária No Brasil. 1994:225.

187. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. Genbank. *Nucleic Acids Research.* 2013;41(D1):D36-D42.

188. Jowett T. Preparation Of Nucleic Acids. In: Roberts, D.B. (Ed.), *Drosophila* A Practical Approach. Roberts DB Press, Oxford. 1986.

189. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989;2.

190. Hall TA. Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor And Analysis Program For Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 1999;41:95-8.

191. Edgar RC. MUSCLE: Multiple Sequence Alignment With High Accuracy And High Throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004 Mar;32(5):1792-7.

192. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 For Bigger Datasets.: Molecular Biology Evolution; 2016.

193. Richards J. Naming Conventions Used In XBRL Taxonomies. 2012.

194. Gaffigan T, Pecor J. Collecting, Rearing, Mounting And Shipping Mosquitoes. 1997.

195. Foley D, Rueda P, Wilkerson R. Vectormap. 2011.

196. Everest, G. Basic Data Structure Models Explained With A Common Example. Austin, TX: IEEE Computer Society Publications Office; 1976.

197. Piatetsky-Shapiro G. Discovery, Analysis, And Presentation Of Strong Rules Knowledge Discovery In Databases. 1991:229-47.

198. Savasere A, Omiecinski E, Navathe S. An Efficient Algorithm For Mining Association Rules In Large Databases. In Proceedings Of The 21st International Conference On Very Large Data Bases. 1995:432-44.

199. Adriaans P, Zantinge D. Data Mining. 1996.

200. Parsaye K, Chignell M. Intelligent Database Tools And Applications: Hyperin-Formation Access, Data Quality, Visualization, Automatic Discovery. 1999.

201. Fayyad U, Piatetsky-Shapiro G, Smyth Ap. From Data Mining Toknowledge Discovery Indatabases. *AI Magazine.* 1996;17(3).

202. Dworkin I GG. Epidermal Growth Factor Receptor And Transforming Growth Factor-B Signaling Contributes To Variation For Wing Shape In *Drosophila Melanogaster.* G3 (Bethesda). 2006;173:1417–31.

203. Klingenberg CP, Zaklan SD. Morphological Integration Between Developmental Compartments In The *Drosophila* Wing. *Evolution.* 2000 Aug;54(4):1273-85.

204. Gilchrist AS, Azevedo RBR, Partridge L, O'Higgins P. Adaptation And Constraint In The Evolution Of *Drosophila melanogaster* Wing Shape. *Evolution & Development.* 2000 Mar-Apr;2(2):114-24.

205. Klingenberg CP, Debat V, Roff DA. Quantitative Genetics Of Shape In Cricket Wings: Developmental Integration In A Functional Structure. *Evolution*. 2010 Oct;64(10):2935-51.

206. Simmons LW. Correlates Of Male Quality In The Field Cricket, Gryllus Campestris L: Age, Size, And Symmetry Determine Pairing Success In Field Populations. *Behavioral Ecology.* 1995 Win;6(4):376-81.

207. Chen YP, Why A, Batista G, Mafra-Neto A, Keogh E. Flying Insect Classification With Inexpensive Sensors. *Journal Of Insect Behavior.* 2014 Sep;27(5):657-77.

208. Bomphrey RJ, Nakata T, Phillips N, Walker SM. Aerodynamic Forces Generated By Wings And The Mechanisms That Produce Them: Trailing-Edge Vortices, Leading-Edge Vortices And Rotational Drag. *Nature*. 2017.

209. Caprio MA, Huang JX, Faver MK, A M. Characterization Of Male And Female Wing-Beat Frequencies In The *Anopheles Quadrimaculatus* Complex In Mississippi. *Journal Of American Mosquito Control Association.* 2001;17:186–9.

210. Robertson SP, Caprio MA, Faver MK. Heritability Of Wing-Beat Frequency In *Anopheles* Quadrimaculatus. *Journal Of The American Mosquito Control Association.* 2002 Dec;18(4):316-20.

211. Reeve JP, Fairbairn DJ. Change In Sexual Size Dimorphism As A Correlated Response To Selection On Fecundity. *Heredity.* 1999;83:697-706.

212. Abbott JK, Bedhomme S, Chippindale AK. Sexual Conflict In Wing Size And Shape In *Drosophila Melanogaster*. *Journal Of Evolutionary Biology*. 2010;23(9):1989-97.

213. Moller AP, Zamora-Munoz C. Antennal Asymmetry And Sexual Selection In A Cerambycid Beetle. *Animal Behaviour*. 1997;54:1509-15.

214. Cepeda-Pizarro J, Vásquez H, Veas H, G C. Relaciones Entre Tamaño Corporal Y Biomasa En Adultos De Tenebrionidae (Coleoptera) De La Estepa Costera Del Margen Meridional Del Desierto Chileno. *Revista Chilena de História Natural*. 1996;69:67-76.

215. Allen CE, Zwaan BJ, Brakefield PM. Evolution Of Sexual Dimorphism In The Lepidoptera. *Annual Review Of Entomology,* Vol 56. 2011;56:445-64.

216. Mcalpine D. Observations On Sexual Behavior In Some Australian Platystomatidae (Diptera: Schizophora). *Records Of The Australian Museum.* 1973;29:1-10.

217. Sivinski J. Ornaments In The Diptera. *Florida Entomologist*. 1997;80(2):142-64.

218. Koekemoer LL, Hargreaves K, Hunt RH, Coetzee M. Identification Of *Anopheles* Parensis (Diptera : Culicidae) Using Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS2) Sequence Variation. *African Entomology*. 2002;10(2):235-9.

219. Kengne P, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene HP, Simard F, Awolola TS, Fontenille D. Molecular Differentiation Of Three Closely Related Members Of The Mosquito Species Complex, *Anopheles* Moucheti, By Mitochondrial And Ribosomal DNA Polymorphism. *Medical And Veterinary Entomology.* 2007;21(2):177-82.

220. Proft J, Maier WA, Kampen H. Identification Of Six Sibling Species Of The *Anopheles Maculipennis* Complex (Diptera:Culicidae) By A Polymerase Chain Reaction Assay. *Parasitology Research*. 1999;85(10):837-43.

221. Kampen H, Sternberg A, Proft J, Bastian S, Schaffner F, Maier WA, Et Al. Polymerase Chain Reaction-Based Differentiation Of The Mosquito Sibling Species *Anopheles Claviger* S.S. And *Anopheles Petragnani* (Diptera: Culicidae). *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene.* 2003;69(2):195-9.

222. Kampen H. The ITS2 Ribosomal DNA Of *Anopheles* Beklemishevi And Further Remarks On The Phylogenetic Relationships Within The *Anopheles maculipennis* Group Of Species (Diptera : Culicidae). *Parasitology Research.* 2005;97(2):118-28.

223. Kampen H. Integration Of *Anopheles Beklemishevi* (Diptera : Culicidae) In A PCR Assay Diagnostic For Palaearctic *Anopheles maculipennis* Sibling Species. *Parasitology Research.* 2005;97(2):113-7.

224. Kengne P, Awono-Ambene P, Nkondjio CA, Simard F, Fontenille D. Molecular Identification Of The *Anopheles* Nili Group Of African Malaria Vectors. Medical And Veterinary Entomology. 2003;17(1):67-74.

225. Phuc HK, Ball AJ, Son L, Hanh NV, Tu ND, Lien NG, Et Al. Multiplex PCR Assay For Malaria Vector *Anopheles minimus* And Four Related Species In The Myzomyia Series From Southeast Asia. *Medical And Veterinary Entomology*. 2003;17(4):423-8.

226. Singh OP, Chandra D, Nanda N, Raghavendra K, Sunil S, Sharma SK, Et Al. Differentiation Of Members Of The *Anopheles Fluviatilis* Species Complex By An Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Based On 28S Ribosomal DNA Sequences. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*. 2004;70(1):27-32.

227. Kengne P, Trung HD, Baimai V, Coosemans M, Manguin S. A Multiplex PCR-Based Method Derived From Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers For The Identification Of Species Of The *Anopheles minimus* Group In Southeast Asia. *Insect Molecular Biology.* 2001;10(5):427-35.

228. Brelsfoard CL, Fritz GN, Rodriguez R. Sequence Analysis Of The Rdna Internal Transcribed Spacer 2 And Polymerase Chain Reaction Identification Of *Anopheles fluminensis* (Diptera:Culicidae:*Anopheles*) In Bolivia. *Journal Of Medical Entomology.* 2006;43(3):460-6.

229. Henry-Halldin CN, Reimer L, Thomsen E, Koimbu G, Zimmerman A, Keven JB, Et Al. High Throughput Multiplex Assay For Species Identification Of Papua New Guinea Malaria Vectors Members Of The *Anopheles punctulatus* (Diptera Culicidae)

Species Group. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene.* 2011;84(1):166-73.

230. Thanaphum S, Green CA, Baimai V, Gass RF, JB G. Genetic Linkage Relationships Of Eight Enzyme/Electromorph Loci In *Anopheles minimus.* Genetica. 1990;82:63-72.

231. Wang Z, Su XM, Wen J, Jiang LY, Qiao GX. Widespread Infection And Diverse Infection Patterns Of *Wolbachia* In Chinese Aphids. *Insect Science*. 2014 Jun;21(3):313-25.

232. Fairley TL, Kilpatrick CW, Conn JE. Intragenomic Heterogeneity Of Internal Transcribed Spacer Rdna In Neotropical Malaria Vector *Anopheles aquasalis* (Diptera : Culicidae). *Journal Of Medical Entomology.* 2005 Sep;42(5):795-800.

233. Li C, Wilkerson RC. Intragenomic Rdna ITS2 Variation In The Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Complex (Diptera : Culicidae). *Journal Of Heredity*. 2007 Jan-Feb;98(1):51-9.

234. Baena-López L, Baonza A, García-Bellido A. The Orientation Of Cell Divisions Determines The Shape Of *Drosophila* Organs. Current Biology. 2005;15(18).

235. Demari-Silva B, Multini LC, Suesdek L, Oliveira TMP, Mureb Sallum MA, Marrelli MT. Wing Morphometry And Genetic Variability Between *Culex coronator* And *Culex usquatus* (Diptera: Culicidae), Two Sibling Species Of The Coronator Group. *Journal Of Medical Entomology*. 2017 Jul;54(4):901-8.

236. Rubio-Palis N. *Anopheles (Nyssorhynchus)* De Venezuela. *Taxonomía, Bionomía, Ecología E Importancia Médica.* 2000.

237. Vicente JL, Sousa CA, Alten B, Caglar SS, Falcuta E, Latorre JM, Et Al. Genetic And Phenotypic Variation Of The Malaria Vector *Anopheles atroparvus* In Southern Europe. *Malaria Journal.* 2011 Jan;10.

238. Gómez GF, Jaramillo L, Correa MM. Wing Geometric Morphometrics And Molecular Assessment Of Members In The Albitarsis Complex From Colombia. *Molecular Ecology Resources.* 2013;13:1082–92.

239. Gómez GF, Márquez EJ, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM. Geometric Morphometric Analysis Of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) Reveals Significant Effect Of Environmental Factors On Wing Traits And Presence Of A Metapopulation. *Acta Tropica* 2014;135:75-85.

240. Zelditch ML, Iderski DLS, H. D. Sheets, Fink. WL. Geometric Morphometrics For Biologists: A Primer. 2014;432.

241. Agarwala R, Barrett T, Beck J, Benson DA, Bollin C, Bolton E, Et Al. Database Resources Of The National Center For Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research.* 2015;43(D1):D6-D17.

242. Belle E, Grant L, Page W. The Isolation Of St. Louis Encephalitis Virus From *Culex Nigripalpus* Mosquitoes In Jamaica. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*. 1964;13:452-4.

243. Chamberlain R, Sudia W, Coleman P, Beadle L. Vector Studies In The St. Louis Encephalitis Epidemic, Tampa Bay Area, Florida, 1962. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene.* 1964;13:456-61.

244. Dow R, Coleman P, Meadows K, Work T. Isolation Of St. Louis Encephalitis Viruses From Mosquitoes In The Tampa Bay Area Of Florida During The Epidemic Of 1962. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 1964;13:462–8.

245. Mackay A, Kramer W, Meece J, Brumfield R, Foil L. Host Feeding Patterns Of *Culex* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) In East Baton Rouge Parish, Louisiana. *Journal Of Medical Entomol*ogy. 2010;47(2):238-48.

246. Unlu I, Kramer W, Roy A, Foil L. Detection Of West Nile Virus RNA In Mosquitoes And Identification Of Mosquito Blood Meals Collected At Alligator Farms In Louisiana. *Journal Of Medical Entomol*ogy. 2010;47(4):625-33.

247. Guedes D, Paiva M, Donato M, Barbosa P, Krokovsky L, Rocha S, Et Al. Zika Virus Replication In The Mosquito *Culex quinquefasciatus* In Brazil. *Emerging Microbes & Infection;* 2017.

248. Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, Et Al. Differential Susceptibilities Of *Aedes aegypti* And *Aedes albopictus* From The Americas To Zika Virus. *Plos Neglected Tropical Diseases.* 2016;10(3).

249. Costa-Da-Silva AL, Ioshino RS, De Araujo HRC, Kojin BB, Zanotto PMD, Oliveira DBL, Et Al. Laboratory Strains Of *Aedes aegypti* Are Competent To Brazilian Zika Virus. *Plos One.* 2017;12(2).

250. Costa-Da-Silva AL, Ioshino RS, Petersen V, Lima AF, Cunha MDP, Wiley MR, Et Al. First Report Of Naturally Infected *Aedes aegypti* With Chikungunya Virus Genotype ECSA In The Americas. *Plos Neglected Tropical Diseases.* 2017;11(6).

251. Pauvolid-Correa A, Kenney JL, Couto-Lima D, Campos ZMS, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Et Al. Ilheus Virus Isolation In The Pantanal, West-Central Brazil. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(7).

252. SPENCE L, ANDERSON CR, AITKEN TH, DOWNS WG. Melao Virus, A New Agent Isolated From Trinidadian Mosquitoes. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene.* 1962;11:687-90.

253. Lopes OD, Sacchetta LD, Francy DB, Jakob WL, Calisher CH. Emergence Of A New Arbovirus Disease In Brazil. 3. Isolation Of Rocio Virus From *Psorophora-ferox* (Humboldt, 1819). *American Journal Of Epidemiology.* 1981;113(2):122-5.

254. Shannon Rc, Whitman L, Franca M. Yellow Fever Virus In Jungle Mosquitoes. Science. 1938;88:101-10.

255. Forattini OP. Entomologia Médica. Universidade De São Paulo: Faculdade De Saúde Pública; 1965.

256. Sudia WD. Arthropod Vectors Of Venezuelan Equine Encephalitis. Washington, DC.: *Pan American Healt Organization*.1972.

257. Aitken THG. Habits Of Some Mosquito Hosts Of VEE Virus From Northeastern South America, In Cluding Trinidad. Venezuelan Encephalitis. 1972:254-6.

258. Ramirez CCL, Dessen EMB. Cytogenetic Analysis Of A Natural-Population Of *Anopheles cruzii*. *Revista Brasileira De Genetica.* 1994;17(1):41-6.

259. Schlick-Steiner B, Steiner F, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier R. Integrative Taxonomy: A Multisource Approach To Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology.* 2010;55:421-38.

260. Mukherjee S, Tamayo P, Rogers S, Rifkin R, Engle A, Campbell C, Et Al. Estimating Dataset Size Requirements For Classifying DNA Microarray Data. *Journal Of Computational Biology.* 2003;10(2):119-42.

261. Dobbin KK, Zhao Y, Simon RM. How Large A Training Set Is Needed To Develop A Classifier For Microarray Data? *Clinical Cancer Research*. 2008;14(1):108-14.

262. Tam VH, Kabbara S, Yeh RF, Leary RH. Impact Of Sample Size On The Performance Of Multiple-Model Pharmacokinetic Simulations. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 2006 Nov;50(11):3950-2.

263. Kim SY. Effects Of Sample Size On Robustness And Prediction Accuracy Of A Prognostic Gene Signature. *BMC Bioinformatics*. 2009;10.

264. Kalayeh HM, Landgrebe DA. Predicting the required number of training samples. 1983;5(6):664-7.

265. Nigam K, Mccallum AK, Thrun S, Mitchell T. Text Classification From Labeled And Unlabeled Documents Using EM. Machine Learning. 2000;39(2-3):103-34.

266. Lorenz C. Emprego de técnicas morfométricas, espectrometria MALDI-TOF e sequenciamento genético para classificação e filogenia de Culicidae (Diptera). Tese de Doutorado - Parasitologia. São Paulo - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo. 2017.

Errata: Apêndice A – Alinhamento das sequências de ITS2

Neste apêndice, algumas sequências do alinhamento foram apresentadas com identificação incompleta. Dessa forma, segue abaixo a identificação correta das sequências.

Páginas 1-6
2_An_albertoi_MG07(7)10-C2_GB
2_An_arthuri_A_MG24-1-C1_GB
2_An_arthuri_A_MG03-102-C3_GB
2_An_arthuri_A_MG32-4_GB
2_An_arthuri_A_GO7-6-101-CE_GB
2_An_arthuri_A_SP31-120_GB
2_An_arthuri_A_MG07(20)2_GB
2_An_arthuri_A_MG04-102_GB
2_An_arthuri_A_MG33-12-6_GB

Páginas 7-12
An_arthuri_sl_1.21
An_arthuri_sl_72.32
An_arthuri_sl_13.21
An_arthuri_sl_53.32
An_arthuri_sl_5.32

Páginas 13-18
An_arthuri_sl_18.84
An_arthuri_sl_1.28
1_An_arthuri_sl_56.32
1_An_arthuri_sl_61.32
1_An_arthuri_sl_64.32
1_An_arthuri_sl_70.32

Páginas 19-24
1_An_arthuri_sl_45.32
1_An_arthuri_sl_86.32
1_An_arthuri_sl_88.32
1_An_arthuri_sl_95.32
1_An_arthuri_sl_3.21
1_An_arthuri_sl_4.21

Páginas 25-30
1_An_arthuri_sl_32.21
1_An_arthuri_sl_34.21
1_An_arthuri_sl_36.21
1_An_arthuri_sl_40.21
1_An_arthuri_sl_45.21
1_An_arthuri_sl_47.21

Páginas 31-36
2_An_strodei_ss_SP104-18-1_GB
2_An_strodei_ss_SP56-8_GB
2_An_strodei_ss_SP31-101_GB
2_An_strodei_ss_SP29-121_GB
2_An_strodei_ss_PR20-4-3_GB
2_An_strodei_ss_ES09-1_GB
2_An_strodei_ss_SP105-10-12_GB
2_An_strodei_ss_BA25-4_GB
2_An_strodei_ss_MG27-108_GB

APÊNDICE A

Alinhamento das sequências de ITS2

APÊNDICE B

Dicionário de dados - *WingBank*

Entidade: Individual				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada indivíduo registrado no *WingBank*, Campo auto incremento
Gender	Char	1		Valores aceitos: 'F' ou 'M'
DonationOriginalCode	Varchar	10	Nulo	Possível código que acompanhe o espécime doado
OriginId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada origem de espécime
TaxonomicClassificationId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador da Classificação Taxonômica
ClassificationMetodologyId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador do Método de coleta
ClassificationResponsiblePersonId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de Pessoa Responsável pela Classificação do espécime
Entidade: InternalControl				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
IndividualId	Integer		Chave Estrangeira e Chave Primária	Identificador de cada indivíduo registrado no *WingBank*
LabCode	Varchar	20		Deve seguir o padrão 'sexo' (sigla F ou M) + 'lado da asa' (sigla D ou E) + 'nº do indivíduo' (com 3 caracteres) + '-' + 'código do livro tombo' (A, B, C...) + 'nº da página do livro tombo' + 'T' + 'código da coleta (com 2 dígitos' + '.' + código de observação (se não tiver observação, colocar '0')
CollectionCode	Varchar	50	Nulo	Deve seguir o padrão 'IBSP' + 'nº no tombo' + '.' + 'sexo' (sigla F ou M) + 'lado da asa' (sigla D ou E) + 'nº do indivíduo' (com 3 caracteres)
Note	Varchar	255	Nulo	Espaço destinado para o armazenamento de alguma informação específica importante
Entidade: ClassificationMethodology				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada Método de Classificação Taxonômica, Campo auto incremento
ClassificationMethod	Varchar	15		Valores aceitos: 'Morphological' ou 'Molecular'
Reference	Varchar	500	Nulo	Espaço destinado para o armazenamento de referências utilizadas pelos usuários para a identificação taxonômica no espécime
Entidade: Origin				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de registro de cada origem de espécime, Campo auto incremento
ColonyId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada registro referente à criação de colônia em laboratório
FieldSamplingId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada registro na referente à coleta de campo
DonationDateTime	Datetime		Chave Estrangeira, Nulo	Data da doação do espécime, Formato dd/mm/aaaa 00:00:00
DonorInstitutionId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Instituição de Origem do Doador do espécime
Entidade: *Donation*				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
DonationDateTime	Datetime		Chave Primária	Data da doação do espécime, Formato dd/mm/aaaa 00:00:00

InstitutionId	Integer		Chave Estrangeira e Chave Primária	Identificador da Instituição doadora do espécime
DonationPersonResponsibleId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de Pessoa Responsável pela doação
Entidade: FieldSampling				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada coleta de campo, Campo auto incremento
AreaTypeId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador do Tipo de Área onde foi realizada cada coleta de campo
StageMethodId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada registro de estágio e método de coleta
DateTime	Datetime		Nulo	Data da coleta, Formato dd/mm/aaaa 00:00:00
SpecificLocalityInEnglish	Varchar	255	Nulo	Local específico da coleta em inglês
SurroundingDescription	Varchar	255	Nulo	Descrição da paisagem nos arredores do local de coleta
Note	Varchar	255	Nulo	Espaço destinado para o armazenamento de alguma informação específica importante
Entidade: Stage				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada registro de estágio coletado, Campo auto incremento
Name	Varchar	20	Único	Estágio de vida do espécime coletado. Valores aceitos: Egg, Larva (1º stage), Larva (2º stage), Larva (3º stage), Larva (4º stage), Larva, Imature, Pupa, Adult, Imature/Adult
Entidade: Method				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada registro de método de coleta utilizado, Campo auto incremento
Name	Varchar	40	Único	Métodos utilizados para a coleta dos espécimes. Valores aceitos: Manual Sampling, Manual Aspiration, Metal / Plastic Scoop, Fine Mesh, Pasteur Pipette / Dropper, Manual suction pump, Metal Ladle, Entomological manual aspirator, Entomological manual aspirator, Entomological automatic aspirator, Trap, Egg Trap, Larva Trap, Adult Trap, CDC, Shannon, NewJersey, MoquitoMagnet, ManualSampliing / Manual Aspiration
Entidade: StageMethod				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada registro de estágio e método de coleta, Campo auto incremento
StageId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada registro de estágio coletado
MethodId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada registro de método de coleta utilizado
Entidade: AreaType				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador do Tipo de Área onde foi realizada cada coleta de campo, Campo auto incremento
Name	Varchar	20	Único	Nome de cada "tipo de área" relacionado à uma coleta de campo. Valores aceitos: 'Park' (inclui Parque Urbano e Parque Linear),

				'Urban' (inclui qualquer área urbanizada dentro de uma cidade), 'Preserved' (inclui Área Florestada, Área de Proteção Ambiental, Unidade de Conservação, Área de Preservação Permanente) e 'Rural' (inclui Agricultura e Pecuária)
Entidade: Locality				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
FieldSamplingId	Integer		Chave Estrangeira, Chave Primária	Identificador de cada registro na referente à coleta de campo
Country	Varchar	20		Nome por extenso do país onde a coleta do espécime foi realizada
CountryCode	Char	2		Código do nome do país, baseado na ISO 3166-1 alfa-2
StateOrProvince	Varchar	100		Nome por extenso do estado ou província onde a coleta do espécime foi realizada
StateOrProvinceCode	Char	3		Abreviação do nome do estado ou da província
City	Varchar	50	Nulo	Nome por extenso da cidade onde a coleta do espécime foi realizada
CityCode	Varchar	50	Nulo	Abreviação do nome da cidade
Neighbourhood	Varchar	100	Nulo	Nome por extenso do bairro onde a coleta do espécime foi realizada
Number	Varchar	5	Nulo	Número do estabelecimento onde a coleta foi realizada
Zipcode	Varchar	9	Nulo	CEP de onde a coleta foi realizada
Address	Varchar	255	Nulo	Logradouro de onde a coleta foi realizada
Latitute	Varchar	11	Nulo	Latitute de onde a coleta foi realizada
Longitude	Varchar	11	Nulo	Longitude de onde a coleta foi realizada
Datum	Varchar	20	Nulo	Datum das coordenadas geográficas anotadas
Altitude	Varchar	5	Nulo	Altitude de onde a coleta foi realizada
Entidade: Institution				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada Instituição registrada, Campo auto incremento
ParentInstitution	Integer		Chave Estrangeira	Subdivisões dentro de uma Instituição relacionadas a uma Instituição "mãe"
NameInOriginalLanguage	Varchar	150		Nome da Instituição na língua original do país onde ela se encontra
NameInEnglish	Varchar	150	Nulo	Nome da Instituição em inglês
Abbreviation	Varchar	20	Nulo	Abreviação do nome da Instituição
Entidade: PersonRField				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
PersonResponsibleId	Integer		Chave Estrangeira, Chave Primária	Identificador de Pessoa Responsável pela coleta dos espécimes
FieldSamplingId	Integer		Chave Estrangeira, Chave Primária	Identificador de cada registro na referente à coleta de campo
Entidade: PersonRInstitution				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
PersonResponsibleId	Integer		Chave Estrangeira, Chave Primária	Identificador de Pes+A1:F187soa Responsável pelas diferentes atividades relatadas no banco e que tem relacionamento com

				Instituição
InstitutionId	Integer		Chave Estrangeira e Chave Primária	Identificador da Instituição doadora do espécime
StartDate	Datetime		Nulo	Data de início do vínculo com a Instituição registrada
FinishDate	Datetime		Nulo	Data de encerramento do vínculo com a Instituição registrada
Entidade: PersonResponsible				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de Pessoa Responsável pelas diferentes atividades relatadas no banco, Campo auto incremento
Email	Varchar	254	Nulo, Único	Email da pessoa responsável registrada
FirstName	Varchar	50		Primeiro nome da pessoa responsável registrada
LastName	Varchar	100	Nulo	Último nome da pessoa responsável registrada
Entidade: PersonResponsiblePhone				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada registro telefônico, Campo auto incremento
PersonResponsibleId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de Pessoa Responsável pelas diferentes atividades relatadas no banco e que tenha telefone
PhoneNumber	Varchar	20		Número do telefone
Entidade: Colony				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Campo auto incremento
TemperatureControl	Varchar	10	Nulo	Temperatura controlada em um laboratório
RelativeHumidity	Varchar	2	Nulo	Umidade Relativa controlada em um laboratório
PhotoPeriod	Varchar	5	Nulo	Fotoperíodo controlado em um laboratório
Strain	Varchar	100	Nulo	Cepa/Linhagem criada em laboratório
Note	Varchar	255	Nulo	Notas
Entidade: PersonColony				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
PersonResponsibleId	Integer		Chave Estrangeira, Chave Primária	Identificador de Pessoa Responsável pelas atividades relacionadas à criação de cepas/linhagens em Laboratório, Campo auto incremento
ColonyId	Integer		Chave Estrangeira, Chave Primária	Identificador de cada registro anotado nesta tabela
Entidade: *LandmarkAnnotation*				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada anotação de landmark, Campo auto incremento
WingImageId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada imagem
Description	Varchar	255	Nulo	Descrição sobre cada conjunto de landmarks
Entidade: *Landmark*				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada landmark registrado no banco, Campo auto incremento
LandmarkAnnotatioId	Integer		Único, Índice	Identificador de cada combinação de anotação de landmark

				('horizontal coordinate' + 'vertical coordinate'
HorizontalCoordinate	Numeric	10,5	Único, Índice	coordenada cartesiana horizontal, obtida em cada imagem por meio de um software de anotação
VerticalCoordinate	Numeric	10,5	Único, Índice	coordenada cartesiana vertical, obtida em cada imagem por meio de um software de anotação
Entidade: *WingImage*				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada imagem, Campo auto incremento
IndividualId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada indivíduo registrado no *WingBank*, Campo auto incremento
WingSide	Char	1	Nulo	Valores aceitos 'L' e 'R'
ImageFile	Image			Arquivo fotográfico
ImageFileName	Varchar	20		Nome de cada imagem depositada no *WingBank*
ImageExtension	Char	5		Extensão de cada imagem
ImageZoom	Integer			Zoom utilizado no equipamento para a tomada de cada fotografia
ImageDimension	Char	10		Dimensão de cada imagem
ImageDpi	Integer			Dpi de cada imagem
AcquirementEquipment	Varchar	200	Nulo	Detalhamento do equipamento onde as imagens foram tomadas
IsPublic	Bit			O usuário deverá informar se a (s) imagem (ns) que ele pretende subir, possuem alguma relação com trabalhos científico já publicados
AccessionCode	Char	10	Único	Deve seguir o padrão 'sexo' (sigla F ou M) + 'sequência de 8 dígitos sequenciais' (comprimento fixo) + 'lado da asa em inglês' (sigla L ou R)
Entidade: WingPublication				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
WingImageId	Integer		Chave Estrangeira, Chave Primária	Identificador de cada indivíduo registrado no *WingBank*
PublicationId	Integer		Chave Estrangeira, Chave Primária	Identificador de cada publicação registrada no *WingBank*
Entidade: PublicationAuthor				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de relacionamento entre Publicação e Autor, Campo auto incremento
PublicationId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada publicação registrada no *WingBank*
AuthorFirstName	Varchar	50		Primeiro nome de cada autor
AuthorLastName	Varchar	100		Último nome de cada autor
Entidade: Publication				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada publicação registrada no *WingBank*, Campo auto incremento
Title	Varchar	255		Título de cada publicação
Year	Integer			Ano de cada publicação
Publisher	Varchar	100	Nulo	Editora de cada publicação

Number	Integer		Nulo	Número de cada publicação
Volume	Integer		Nulo	Volume de cada publicação
Url	Varchar	2000	Nulo	Url de cada publicação
Doi	Varchar	50	Nulo	Doi de cada publicação
Journal	Varchar	100		Nome do Jornal onde cada publicação foi divulgada
Entidade: TaxonomicClassification				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada Classificação Taxonômica, Campo auto incremento
ClassificationType	Varchar	10		Tipo de Classificação Taxonômica
Entidade: Family				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada Família, Campo auto incremento
FamilyName	Varchar	20	Único	Nome da Família (único valor aceito: Culicidae)
TaxonomicClassificationId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada Classificação Taxonômica
Entidade: Subfamily				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada SubFamília, Campo auto incremento
SubfamiltyName	Varchar	20	Único	Nome da Subfamília
FamilyId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada Família, Campo auto incremento
TaxonomicClassificationId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada Classificação Taxonômica
Entidade: Tribe				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada Tribo, Campo auto incremento
TribeName	Varchar	20	Único	Nome de cada Tribo relacionada ao depósito
SubfamilyId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada SubFamília, Campo auto incremento
TaxonomicClassificationId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada Classificação Taxonômica
Entidade: Genus				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada Gênero, Campo auto incremento
GenericName	Varchar	20	Único	Nome de cada gênero
TribeId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada Tribo, Campo auto incremento
SubfamilyId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada Família, Campo auto incremento
TaxonomicClassificationId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada Classificação Taxonômica
Entidade: Subgenus				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada SubGênero, Campo auto incremento
SubgenericName	Varchar	20	Único	Nome de cada subgênero cadastrado no *WingBank*
GenusId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada Gênero, Campo auto incremento
TaxonomicClassificationId	Integer		Chave Estrangeira	Identificador de cada Classificação Taxonômica, Campo auto incremento
Entidade: Species				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada Espécie, Campo auto incremento

SpecificEpithet	Varchar	20	Único, Índice	Nome de cada espécie cadastrada no *WingBank*
GenusId	Integer		Chave Estrangeira, Único, Índice	Identificador de cada Gênero, Campo auto incremento
SubgenusId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo, Único, Índice	Identificador de cada Subgênero, Campo auto incremento
TaxonomicClassificationId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada Classificação Taxonômica, Campo auto incremento
Entidade: Subspecies				
Atributo	**Domínio**	**Tamanho**	**Restrição**	**Descrição**
Id	Integer		Chave Primária, Chave Substituta	Identificador de cada Subespécie, Campo auto incremento
SpeciesId	Integer		Chave Estrangeira, Chave Primária	Identificador de cada Espécie, Campo auto incremento
SubspeciesName	Varchar	20	Único	Nome de cada subespécie cadastrada no *WingBank*
TaxonomicClassificationId	Integer		Chave Estrangeira, Nulo	Identificador de cada Classificação Taxonômica, Campo auto incremento

Alguns tipos de dados (*data types*) apresentados nesta tabela podem necessitar de adaptações, caso o modelo apresentado nesta tese seja aplicado em outro SGBD, como por exemplo: *Datetime, Image* e *Bit*.

APÊNDICE C

Termo de Uso – *WingBank*

TERMOS E CONDIÇÕES

1. USO E CITAÇÃO DO WINGBANK

WINGBANK está disponível gratuitamente para o uso em educação e pesquisa. Se você utilizar o WINGBANK para pesquisa a qual será publicada, por favor cite-nos como a seguir: Virginio, F., Domingues, V.L., Miranda, L.A., Braghetto, K.R., Suesdek, L. 2017. Wingbank: a public relational database and a relevant tool to mosquito studies. Available in: https://www.wingbank.butantan.gov.br .

Estes termos e condições determinam as regras de utilização do *website* registrado sob o domínio https://wingbank.butantan.gov.br , bem como a responsabilidade dos usuários pelo envio e aquisição das imagens e dos dados relacionados a elas. O objetivo deste *website* é a formação de uma base de dados a partir do envio, pelos usuários cadastrados, de imagens de asas de mosquitos de qualquer espécie e seus metadados, e da aquisição destas informações pelos demais usuários, dentro das regras e condições a seguir expostas:

2. DO OBJETIVO

O WINGBANK coloca à disposição de seus usuários, mediante a aceitação eletrônica deste termo, uma ferramenta interativa que permite a utilização do serviço gratuito de envio e aquisição de imagens fotográficas de asas de mosquitos e uma série de outros metadados relacionados a estas imagens, com o escopo de formar uma base de dados para utilização em estudos e pesquisas científicas, nas condições deste termo.

3. DA ACEITAÇÃO

A utilização do *website* implica em aceitação total e irrestrita dos itens que constituem este presente termo. O usuário ao aceitá-lo, reconhece e aceita voluntariamente que a sua utilização é de sua única e exclusiva responsabilidade.

É de suma importância que o usuário faça uma leitura minuciosa das condições legais para a utilização do *website*, tendo em vista que, ao acessar o conteúdo na base de dados, manifesta por tal ato expressa concordância com as condições aqui expostas.

4. NORMAS DE UTILIZAÇÃO DO *website*

O banco de dados WINGBANK é desenhado para fornecer o acesso à comunidade científica de informações atualizadas e abrangentes relacionadas a asas de mosquitos e encorajar a busca por estas informações.

Na hipótese de ocorrência de medida judicial ou extrajudicial, em face do disposto neste regulamento, o usuário deve estar ciente de que será denunciado à lide, em consonância com o que dispõe o Código de Processo Civil, responsabilizando-se pelo processo instaurado por eventual terceiro prejudicado, bem como será acionado pelo WINGBANK para ressarcimento de todos os dispêndios realizados a fim de reparar danos causados pelo usuário.

4.1. Acesso aos dados públicos

Para aquisição de imagens e metadados relacionados a alguma publicação científica, o usuário não necessita estar registrado no *website.*

4.2. Acesso aos dados não-públicos

Para aquisição de imagens e metadados não-relacionados a alguma publicação científica, o usuário necessita ser expressamente autorizado pelo administrador do WINGBANK.

5. DIREITOS AUTORAIS E MARCAS

O WINGBANK possui logotipos e marcas exibidos neste *website*, sendo proibido, aos usuários, usá-los sem a permissão prévia e escrita do WINGBANK. A utilização indevida do logotipo e das marcas poderá acarretar a aplicação de sanções, conforme legislação vigente.

6. AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO GRATUITA DE IMAGENS FOTOGRÁFICAS

6.1. RESPONSABILIDADE DOS USUÁRIOS

As imagens e seus metadados estão sob a Licença Creative Commons – Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0). Para mais detalhes, acesse a Licença na íntegra https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/. De acordo com esta licença, o WINGBANK define que o uso de imagens e seus respectivos metadados, e a publicação de resultados relacionados a eles, implicam na obrigação do usuário de indicar o Código de Acesso (Accession Code) de cada imagem (o qual remete à imagem e a todos os seus metadados, inclusive, a publicação relacionada a cada imagem), além de citar o WINGBANK.

6.1.1. Usuário (Uploader):

O usuário (*uploader*) autoriza, ao WINGBANK, a plena utilização das fotografias depositadas em seu banco de dados, podendo armazená-las, publicá-las e veiculá-las eletronicamente ou por qualquer outra forma, sem prazo de vencimento, em todo o território nacional e internacional.

Declara o usuário, ser o único e exclusivo titular do material depositado, responsabilizando-se integralmente pela originalidade de sua criação. Eventuais reclamações por direitos autorais, reclamação pela utilização de imagens que não sejam de sua autorização, ou outros eventuais defeitos relacionados ao tema serão integralmente de sua responsabilidade.

O usuário declara que as imagens fotográficas já foram publicadas em revistas científicas, sendo inteira e ilimitadamente responsável por eventual omissão e (ou) falsidade relacionados a essas informações.

O usuário exime expressamente o WINGBANK de qualquer ônus ou comprometimento advindos de terceiros.

O usuário concorda integralmente que as fotografias depositadas poderão ser utilizadas pelos demais usuários do *website* para realização de estudos morfométricos e demais estudos.

O usuário está ciente que é seu direito, conforme artigo 24 da Lei 9.610 de 1998, ter seu nome, pseudônimo ou sinal convencional indicado ou anunciado, como sendo o autor, na utilização de sua imagem fotográfica.

A utilização das imagens fotográficas depositadas pelo usuário se dá a título gratuito, abrangendo inclusive a licença a terceiros, sem nenhum ônus para o WINGBANK e seus demais usuários.

O usuário autoriza o uso de suas imagens fotográficas por ele depositadas no banco de dados do WINGBANK, sem que nada haja a ser reclamado a título de direitos autorais e conexos.

6.1.2. User (Downloader)

O usuário assume a responsabilidade de utilizar as imagens fotográficas de terceiros de forma ética, citando o trabalho do devido autor das imagens, conforme assegura a Lei de Direitos Autorais. O usuário concorda com as exigências do *website*, e está ciente de que as imagens estão protegidas pela Lei de Direitos Autorais, estando sujeito às consequências pelo descumprimento da lei.

7. DURAÇÃO DO *WEBSITE* WINGBANK

O WINGBANK tem duração indefinida. O WINGBANK, entretanto, poderá a qualquer tempo, encerrar, suspender ou interromper unilateralmente e sem necessidade de comunicação prévia, a veiculação do site e a prestação de seus serviços, sem prejuízo do disposto no correspondente termo de responsabilidade, bem como remover, remanejar ou alterar qualquer conteúdo.

8. CONDIÇÕES FINAIS

O presente termo de responsabilidade é gerado eletronicamente e será regido pelas leis da República Federativa do Brasil, ficando desde já eleito o foro da comarca da Capital de São Paulo/SP para dirimir quaisquer dúvidas oriundas deste termo, renunciando as partes a qualquer outro, por mais privilegiado que o seja. Os casos omissos deverão ser reportados a wingbank@butantan.gov.br.

APÊNDICE D

Artigos científicos publicados em periódicos durante o doutorado

Artigo 1: VIRGINIO, F.; LORENZ, C.; AGUIAR, B. S.; SUESDEK, L.; CHIARAVALLOTI NETO, F. Potential Risks of Zika and Chikungunya Outbreaks in Brazil: a Modelling Study. INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES 70, 20–29, 2018. DOI: 10.1016/j.ijid.2018.02.007.

Artigo 2: VIRGINIO, F.; PETERSEN, V.; SUESDEK, L.. Polymorphism in male genitalia of *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* Rondani, 1848. BULLETIN OF ENTOMOLOGICAL RESEARCH, v. -, p. 1-4, 2017. DOI: 10.1017/S0007485317000359.

Artigo 3: LORENZ, C.; VIRGINIO, F.; ALMEIDA, F.; ALMEIDA-LOPES, F.;; LOUISE, C.; PEREIRA, S. N.; PETERSEN, V.; VIDAL, P. O. ; SUESDEK, L. Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured?. INFECTION GENETICS AND EVOLUTION, v. 54, p. 205-215, 2017. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.06.029.

Artigo 4: LORENZ, C.; AZEVEDO, T. S.; VIRGINIO, F.; AGUIAR, B. S.; SUESDEK, L.; CHIARAVALLOTI NETO, F. Impact of Environmental Factors on Neglected Emerging Arboviral Diseases. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005959.

Artigo 5: VIRGINIO, F.; VIDAL, P. ; SUESDEK, L. . Wing sexual dimorphism of pathogen-vector culicids. Parasites & Vectors, v.8, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0769-6.

Artigo 6: VIRGINIO, F.; LORENZ, C.; AGUIAR, B. S.; SUESDEK, L.; CHIARAVALLOTI NETO, F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. MALARIA JOURNAL, v. 14, p. 408, 2015. DOI: 10.1186/s12936-015-0934-6

ANEXO A

Autorização para atividades com finalidade científica (Coleta de Mosquitos) – SISBio (2012-2014)

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36784-1	Data da Emissão: 17/10/2012 09:17	Data para Revalidação*: 16/11/2013

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

Dados do titular

Nome: Flavia Virginio Fonseca	CPF: 071.004.849-10
Título do Projeto: Associação entre variabilidade genético-morfológica e características ambientais no vetor de malária Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera:Culicidae)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Culicídeos - espécie Anopheles darlingi no município de Frutal	10/2012	10/2014

Observações e ressalvas

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

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	FRUTAL	MG	município de Frutal - MG	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Anopheles darlingi
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Anopheles darlingi (*Qtde: 300)

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

Material e métodos

SISBIO

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

Código de autenticação: 86341457

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36784-1	Data da Emissão: 17/10/2012 09:17	Data para Revalidação*: 16/11/2013

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

Dados do titular

Nome: Flavia Virginio Fonseca	CPF: 071.004.849-10
Título do Projeto: Associação entre variabilidade genético-morfológica e características ambientais no vetor de malária Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera:Culicidae)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual, Outros métodos de captura/coleta(Aspirador entomolÃ³gico (para adultos) SucÃ§Ã£o manual (para imaturos)), Armadilha de interceptação de vôo

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	

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

SISBIO

Código de autenticação: 86341457

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36784-1	Data da Emissão: 17/10/2012 09:17	Data para Revalidação*: 16/11/2013

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

Dados do titular

Nome: Flavia Virginio Fonseca	CPF: 071.004.849-10
Título do Projeto: Associação entre variabilidade genético-morfológica e características ambientais no vetor de malária Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera:Culicidae)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

SISBIO

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

Código de autenticação: 86341457

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36784-1	Data da Emissão: 17/10/2012 09:17	Data para Revalidação*: 16/11/2013

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

Dados do titular

Nome: Flavia Virginio Fonseca	CPF: 071.004.849-10
Título do Projeto: Associação entre variabilidade genético-morfológica e características ambientais no vetor de malária Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera:Culicidae)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

SISBIO

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

Código de autenticação: 86341457

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36784-3	Data da Emissão: 24/09/2013 18:55	Data para Revalidação*: 24/10/2014

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

Dados do titular

Nome: Flavia Virginio Fonseca	CPF: 071.004.849-10
Título do Projeto: Influência ambiental sobre a variabilidade genético-morfológica do vetor da malária Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera:Culicidae)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Culicídeos - espécie Anopheles darlingi no município de Frutal	10/2012	10/2014

Observações e ressalvas

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

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	FRUTAL	MG	município de Frutal - MG	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Anopheles (*Qtde: 200), Anopheles darlingi (*Qtde: 300)

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

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual, Armadilha luminosa, Outros métodos de captura/coleta(Aspirador entomolÃ³gico (para adultos) SucÃ§Ã£o manual (para imaturos)), Armadilha de interceptação de vôo

SISBIO

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

Código de autenticação: 23989496

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36784-3	Data da Emissão: 24/09/2013 18:55	Data para Revalidação*: 24/10/2014

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

Dados do titular

Nome: Flavia Virginio Fonseca	CPF: 071.004.849-10
Título do Projeto: Influência ambiental sobre a variabilidade genético-morfológica do vetor da malária Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera:Culicidae)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	

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

SISBIO

Código de autenticação: 23989496

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36784-3	Data da Emissão: 24/09/2013 18:55	Data para Revalidação*: 24/10/2014

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

Dados do titular

Nome: Flavia Virginio Fonseca	CPF: 071.004.849-10
Título do Projeto: Influência ambiental sobre a variabilidade genético-morfológica do vetor da malária Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera:Culicidae)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

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

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

SISBIO

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

Código de autenticação: 23989496

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36784-3	Data da Emissão: 24/09/2013 18:55	Data para Revalidação*: 24/10/2014

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

Dados do titular

Nome: Flavia Virginio Fonseca	CPF: 071.004.849-10
Título do Projeto: Influência ambiental sobre a variabilidade genético-morfológica do vetor da malária Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera:Culicidae)	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

SISBIO

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

SISBIO

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

Código de autenticação: 23989496

ANEXO B

Autorização de Uso de Artigo Científico (na íntegra) em Tese

butantan

Flávia Virginio <flavia.virginio@butantan.gov.br>

00644329 RE: Authorisation - Use of a paper in my Thesis

2 mensagens

"Ricardo SisonJr" <info@biomedcentral.com> <info@biomedcentral.com> 12 de setembro de 2016 18:09
Para: "flavia.fonseca@butantan.gov.br" <flavia.fonseca@butantan.gov.br>

SPRINGER NATURE

Dear Dr. Fonseca,

Thank you for contacting BioMed Central.

The articles you refer to are open access publications. Therefore you are free to use the articles for non-commercial purposes, as long as their integrity are maintained and the original authors, citation details and publisher are identified.

For detailed information about the terms please refer to the open access license:

http://www.biomedcentral.com/about/policies/license-agreement

or

http://www.springeropen.com/get-published/copyright/copyright-and-license-agreement

If you have any questions, please do not hesitate to contact me.

Best wishes,

Ricardo Sison Jr.
Customer Services Executive
Open Research Group

Springer Nature
236 Gray's Inn Road, London WC1X 8HB, UK
T +44 (0)203 192 2009
F +44 (0)203 192 2010
Ricardo.SisonJr@springernature.com
www.springernature.com

Springer Nature is one of the world's leading global research, educational and professional publishers, created in 2015 through the combination of Nature Publishing Group, Palgrave Macmillan, Macmillan Education and Springer Science+Business Media.

Springer-Verlag London Ltd.

Registered Office: 236 Gray´s Inn Road / London WC1X 8HB / Registered in England
No. 1738860 / VAT Registration No. GB 823826326

----------Your Question/Comment ----------

Dear,

I published a paper in the Parasites and Vector (DOI:10.1186/s13071-015-0769-6) and other in the Malaria Journal (DOI:10.1186/s12936-015-0934-6) as open access. I would like to know if I need any other type of authorisation from the journal to use this paper in my thesis.

Thank you.

Best regards

--

Flávia Virginio Fonseca

<http://www.butantan.gov.br/assinatura/logoassinatura.jpg>

LABORATÓRIO DE PARASITOLOGIA
Diretor Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça
Instituto Butantan
+55 11 2627-9770
www.butantan.gov.br <http://www.butantan.gov.br/>

ref:_00D20CUt._5002014y8M6AAI:ref

Flavia Virginio Fonseca <flavia.fonseca@butantan.gov.br> 12 de setembro de 2016 18:36
Para: lincoln.suesdek@ls.com.br, Camila Lorenz <cammillalorenz@gmail.com>, vivian petersen <var_petersen@hotmail.com>

Oi pessoal, abaixo seguem as infos sobre uso de papers na tese.

Bjs

[Texto das mensagens anteriores oculto]
--
Flávia Virginio Fonseca

LABORATÓRIO DE PARASITOLOGIA
Diretor Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Instituto Butantan
+55 11 2627-9770
www.butantan.gov.br