

**Ana Leticia da Silva de Souza**

**Morfometria geométrica alar na identificação de mosquitos  
(Diptera: Culicidae) com importância epidemiológica  
negligenciada**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina  
Tropical da Universidade de São Paulo como  
requisito para obtenção do título de Mestre em  
Ciências**

**Programa de Medicina Tropical e Área de  
concentração: Doenças Tropicais e Saúde  
Internacional**

**Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli**

**São Paulo**

**2020**

**Ana Leticia da Silva de Souza**

**Morfometria geométrica alar na identificação de mosquitos  
(Diptera: Culicidae) com importância epidemiológica  
negligenciada**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina  
Tropical da Universidade de São Paulo como  
requisito para obtenção do título de Mestre em  
Ciências**

**Programa de Medicina Tropical e Área de  
concentração: Doenças Tropicais e Saúde  
Internacional**

**Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli**

**São Paulo**

**2020**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Ana Leticia da Silva de  
Morfometria geométrica alar na identificação de  
mosquitos (Diptera: Culicidae) com importância  
epidemiológica negligenciada / Ana Leticia da Silva  
de Souza. -- São Paulo, 2020.  
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Medicina Tropical. Área de  
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.  
Orientador: Mauro Toledo Marrelli.

Descritores: 1.Entomologia 2.Culicidae  
3.Espécies negligenciadas 4.Classificação  
5.Taxonomia 6.Morfometria geométrica alar

USP/FM/DBD-216/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*À minha irmã, Samanta, por ter deixado minha vida mais suave*

*Aos meus pais, Gerson e Valdete, pela força.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo financiamento de minha bolsa de mestrado

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento dos projetos responsáveis pelas coletas dos espécimes aqui utilizados

À todas as Instituições que colaboraram nas coletas a campo.

Ao meu orientador, Mauro Toledo Marrelli, por toda a orientação prestada não só neste trabalho, mas desde que entrei no laboratório no Programa de Aprimoramento Profissional há alguns anos.

Ao Dr. André Barretto Bruno Wilke por todo auxílio prestado nesse projeto, pela paciência e por todo conhecimento compartilhado no decorrer de todo esse processo

À Dr<sup>a</sup>. Laura Multini, pelos ensinamentos compartilhados em todos esses anos

A todos os colegas do Laboratório de Entomologia em Saúde Pública, que ainda estão conosco ou que já concluíram sua jornada acadêmica, a ajuda de cada um deles nesse processo foi extremamente importante para que esse projeto fosse concluído.

Ao técnico Aristides Fernandes, responsável pela identificação morfológica dos espécimes que foram utilizados aqui.

À banca de qualificação, que sem sombra de dúvidas colaborou para que esse trabalho fosse melhorado e concluído da melhor forma possível.

Aos meus pais, Gerson e Valdite, e a minha irmã, Samanta Carolina, por toda força e apoio nesses dois anos.

Aos meus amigos e familiares, que sempre me incentivaram e aplaudiram cada conquista desde o início dessa jornada.

A todos esses, muito obrigada!

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

(Marie Curie)

## RESUMO

Souza ALS. *Morfometria geométrica alar na identificação de mosquitos (Diptera: Culicidae) com importância epidemiológica negligenciada* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A família Culicidae compreende mais de 3.582 espécies de mosquitos descritas, sendo algumas delas responsáveis pela transmissão de agentes etiológicos causadores de doenças infecciosas. A identificação correta de espécies de culicídeos é essencial para vigilância e controle de vetores e colabora para o estabelecimento de padrões de transmissão de doenças. Comumente a morfologia externa é utilizada para a identificação de espécies, por meio de chaves taxonômicas, técnica que se torna inviável ou complexa caso o espécime esteja danificado ou pertença a um complexo de espécies crípticas. A morfometria geométrica alar (MGA) mostrou-se uma ferramenta acessível e confiável para a identificação de mosquitos, incluindo espécies crípticas. Desse modo, o objetivo deste estudo é usar morfometria geométrica para identificação de dezesseis espécies de mosquitos, algumas dessas com importância epidemiológica descrita por participarem do ciclo de transmissão de agentes etiológicos, e compreendendo oito gêneros (*Aedes*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Limatus*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Runchomyia* e *Wyeomyia*). As asas direitas de 390 indivíduos, previamente identificados morfologicamente, foram removidas e fotografadas para utilização nas análises de morfometria geométrica alar. Asas de quarenta e dois indivíduos do subgênero *Melanoconion*, não identificados à nível de espécie, foram comparadas com as demais espécies do estudo para testar a eficácia da técnica de MGA. Para as análises dos resultados, 18 marcos anatômicos foram indicados nas asas. A influência alométrica foi acessada por regressão multivariada das coordenadas de Procrustes contra o tamanho do centróide antes das análises; a Análise de Variável Canônica (CVA) para gêneros e espécies foi feita, quando possível, e um teste de reclassificação cruzada foi realizado para cada indivíduo. Árvores de *Neighbor-Joining* foram construídas através das distâncias de Mahalanobis acessadas pela CVA, com 1.000 *bootstraps*. As análises e gráficos foram realizados com auxílios dos softwares MorphoJ1.02 e Past 2.17c. A CVA de gêneros resultou em *clusters* distintos para *Culex*, *Limatus* e *Psorophora* e sobreposição parcial entre *Aedes*, *Coquillettidia* e *Mansonia*, um segundo *cluster* com sobreposições entre

*Runchomyia* e *Wyeomyia*. O teste de reclassificação cruzada resultou em 99% de acurácia na identificação de gêneros e 96% na identificação de espécie; em 160 das 260 comparações possíveis, as espécies foram identificadas com 100% de acurácia. No que concerne às análises feitas com os espécimes de *Culex (Melanoconion) sp.*, é possível observar que houve distinção destes com as demais espécies presentes no estudo, o que indica que nenhum deles corresponde às espécies do subgênero *Melanoconion* incluídas anteriormente nas análises. Os resultados mostram que os oito gêneros aqui utilizados foram corretamente identificados, bem como subgêneros e a maioria das espécies, pela forma da asa. Esses resultados demonstram a eficácia da MGA na identificação das espécies de mosquitos aqui utilizadas. Mais estudos são necessários para elucidar a eficácia da ferramenta com outras espécies.

Descritores: Entomologia; Culicidae; Espécies negligenciadas; Classificação; Taxonomia; Morfometria geométrica alar.



## ABSTRACT

Souza ALS. *Wing geometric morphometrics for identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) of neglected epidemiological importance* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

The Culicidae Family comprises more than 3,582 described species and some of them are responsible for the transmission of etiologic agents that cause infectious diseases. The correct identification of culicids species is essential for surveillance and vector control and corroborates for the establishment of disease transmission patterns. Commonly the external morphology is used for species identification, using taxonomic keys, but this technique becomes infeasible or complex if the specimen is damaged or belongs to a complex of cryptic species. Wing geometric morphometrics (WGM) has been proved to be an accessible and reliable tool for mosquito identification, including cryptic species. Therefore, this study aimed to use wing geometric morphometrics to identify sixteen mosquito species from eight genera (*Aedes*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Limatus*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Runchomyia* e *Wyeomyia*). The right wing of 390 specimens were removed, mounted between slides and coverslips and photographed for use in WGM analysis. Wings of forty-two individuals of the subgenus *Melanoconion*, not identified at species level, were compared with the other species in the study to test the efficacy of the WGM technique. Eighteen landmarks were indicated in each image for analysis, using tpsDig software. The allometric influences were accessed by multivariate regression of the Procrustes coordinates against the centroid size before the analysis. The Canonical Variate Analysis (CVA) for genera and species were made and a cross-validation reclassification test was performed for each individual, at genera and species level. *Neighbor-joining* trees were constructed with 1000 bootstraps. The analyses were performed, and the graphs were plotted using the softwares MorphoJ1.02 and Past 2.17c. The genera CVA resulted in distinct clusters for *Culex*, *Limatus* and *Psorophora* and a partial overlap between *Aedes*, *Coquillettidia* and *Mansonia*, and a second cluster with a partial overlap between *Runchomyia* and *Wyeomyia*. The reclassification test resulted in 99% accuracy in identifying genre and 96% in species identification; in 160 of 260 possible comparisons, species were identified with 100% of accuracy. As concerns the analysis with *Culex (Melanoconion) sp.* specimens, there was total distinction between them and the other species present in the study, which means that none of them correspond to

the species of the *Melanoconion* subgenus previously included in the study. The results demonstrated that the eight genera used in the analysis were correctly identified, as well as subgenera and most species, solely by wing shape. These findings demonstrate that WGM is an efficient tool to identify this species. Further studies are required to elucidate the usefulness of this tool.

Descriptors: Entomology; Culicidae; Neglect species; Classification; Taxonomy; Wing geometric morphometrics.

## LISTA DE ABREVIATURAS

MGA – Morfometria Geométrica Alar

WHO – World Health Organization

PAHO/WHO – PanAmerican Health Organization/World Health Organization

DENV – Vírus Dengue

ZIKV – Zika Vírus

CHIKV – Vírus Chikungunya

WNV – West Nile Virus

EEE – Encefalite equina do Leste

EEV – Encefalite equina venezuelana

LM – *landmarks*

PEC - Parque Estadual da Cantareira

APA - Área de Proteção Ambiental

CVA – *Canonical Variate Analysis*

NJ – *Neighbor-joining*

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Família Culicidae – ecologia e epidemiologia	14
1.2	Importância epidemiológica	17
1.2.1	Gênero <i>Aedes</i>	17
1.2.2	Gênero <i>Coquillettidia</i>	19
1.2.3	Gênero <i>Culex</i>	19
1.2.4	Gênero <i>Limatus</i>	21
1.2.5	Gênero <i>Mansonia</i>	22
1.2.6	Gênero <i>Psorophora</i>	23
1.2.7	Gênero <i>Runchomyia</i>	24
1.2.8	Gênero <i>Wyeomyia</i>	25
1.3	Importância da correta identificação dos mosquitos	26
1.4	Morfometria Geométrica Alar	27
2	OBJETIVOS	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.2	Áreas de Estudo	31
3.2.1	Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos – APA (Zona Sul)	31
3.2.2	Parque Estadual da Cantareira – PEC (Zona Norte)	32
3.3	Métodos de coleta e identificação dos espécimes	32
3.4	<i>Culex (Melanoconion)</i> sp.	34
3.5	Morfometria geométrica alar	35
3.6	Análise dos dados	36
4	RESULTADOS	38
5	DISCUSSÃO	55

6	CONCLUSÃO	67
7	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICES	78

APÊNDICE A: Tabela de reclassificação cruzada das dezesseis espécies sem os espécimes machos

APÊNDICE B - Artigo publicado na revista Acta Tropica. "Wing geometric morphometrics for identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) of neglected epidemiological importance" – DE SOUZA, ALS et al., 2020

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Família Culicidae – ecologia e epidemiologia

Os mosquitos são insetos dípteros pertencentes à família Culicidae, formam um grupo abundante, com mais de 3.582 espécies descritas, e dessas, 470 são encontradas no Brasil. (Guedes, 2012; Orlandin et al., 2017; Harbach, 2018; Harbach 2020). A família Culicidae atualmente é dividida em duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae e 113 gêneros. A subfamília Anophelinae tem três gêneros e a subfamília Culicinae tem 110 gêneros, separados em onze tribos. A grande maioria das fêmeas desta família são hematófagas, com exceção das representantes da tribo Toxorhynchitini, que inclui apenas o gênero *Toxorhynchites* (Harbach 2018). As fêmeas das demais tribos e gêneros são sabidamente hematófagas e o repasto sanguíneo pode ser realizado em aves, répteis, anfíbios e humanos, dependendo dos hábitos das espécies (Lorosa et al., 2010; de Carvalho et al., 2014)

Os mosquitos adultos são finos, de pernas alongadas e são providos de asas, enquanto as formas imaturas, compreendidas nas fases de ovos, quatro estágios larval e pupa, ocupam coleções aquáticas comumente chamadas de criadouros (Forattini, 2002; Harbach, 2018). Os ovos de mosquitos têm aspecto alongado, simetria bilateral e são envolvidos por uma casca composta de três camadas. Como aspecto geral, o volume de postura das fêmeas oscila de 50 a 500 ovos, sendo estes postos diretamente na superfície líquida, demorando aproximadamente um dia para eclodir, ou em locais passíveis de serem inundados, eclodindo apenas após a inundação, fenômeno que pode ocorrer meses após a postura (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Acorn et al., 2009).

Em todos os estágios, as larvas de mosquitos são essencialmente aquáticas e de vida livre, dotadas de grande motilidade e passam por quatro estágios evolutivos, sendo o último destes o mais longo. Distinguem-se de outros organismos aquáticos pela ausência de pernas e presença de estruturas, como cabeça e o sifão respiratório. A duração de cada estágio larval difere entre si, todavia o crescimento é classificado contínuo, ao se considerar o conjunto destes, podendo levar de oito

a dez dias para que o desenvolvimento destas seja concluído (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Harbach, 2018).

As pupas, assim como as larvas, também são aquáticas. Esse estágio corresponde ao período de transição em que ocorrem profundas transformações que resultam na formação do adulto e na consequente mudança do meio hídrico para o terrestre. A fase de pupa dura cerca de dois dias, ou um pouco mais, desde que em condições naturais (Forattini, 2002).

Devido ao comportamento hematófago das fêmeas de diversas espécies de culicídeos, algumas destas podem participar do ciclo de transmissão de patógenos, como vírus (arbovírus), helmintos e protozoários, desempenhando um papel essencial na transmissão de patógenos transmitidos por vetores, causando milhares de mortes anualmente (Forattini, 2002; World Health Organization – WHO, 2017a; Harbach, 2018). Malária, dengue, zika, febre amarela e chikungunya afligem grande parte da população mundial que vive em áreas endêmicas, a grande maioria das áreas afetadas é composta por países em desenvolvimento e regiões pobres do mundo, causando altas taxas de morbidade e mortalidade por essas doenças (Gubler, 2011; Sinka et al., 2012; Benelli e Beier, 2017; Etienne et al, 2017; Faria et al., 2017; Paules e Fauci, 2017; WHO, 2017a, 2017b).

Muitos arbovírus já foram reportados no Brasil. Os vírus da Dengue (DENV), Zika (ZIKV), febre amarela e Chikungunya (CHIKV) são mais comuns no território e têm maior importância epidemiológica, contudo outros arbovírus negligenciados e que não estão associados a maiores surtos também foram encontrados no país, como Mayaro, Oropouche, Vírus do Oeste do Nilo (West Nile Virus – WNV), Encefalite de Saint Louis e Rocio (Mourão et al., 2009; Lima-Camara, 2016; Lorenz et al., 2017b; de Souza et al., 2020).

Grandes surtos foram reportados no Brasil recentemente. De 2016 a 2018 o país sofreu com um surto de Febre amarela que resultou em cerca de 2.000 casos humanos da doença. *Aedes aegypti* é vetor comprovado da doença em seu ciclo urbano, contudo *Aedes serratus* já foi encontrado infectado pelo vírus e seu papel na manutenção em surtos como este é pouco entendido (Cardoso et al., 2010a, Paules e Fauci, 2017; Giovanetti et al., 2019). *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* foram implicados como vetores dos vírus Zika, Chikungunya e Dengue nos surtos recentes

das doenças no Brasil. O ZIKV foi reportado no Brasil pela primeira vez em 2015 e causou cerca de 150.000 casos no país, enquanto o CHIKV foi detectado pela primeira vez em 2014, no estado do Amapá e se espalhou pelo território do país (Nunes et al., 2015; Zanluca et al., 2015; Faria et al., 2016; Lima-Camara, 2016).

Desde o primeiro surto de Dengue no Brasil em 1986, o país é considerado endêmico para a doença, tendo os quatro sorotipos circulando no território. Apenas em 2019, 1,2 milhões de casos da doença foram repostados no Brasil (Nunes et al., 2019; Pan American Health Organization/World Health Organization - PAHO/WHO, 2019).

Os principais arbovírus circulantes no Brasil são transmitidos *pelo Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* já se mostrou competente para transmissão de patógenos e já foi encontrado naturalmente infectado por certos arbovírus, entretanto o vírus da Febre amarela, DENV, ZIKV e CHIKV foram isolados em *Ae. serratus*, *Aedes terreus*, subgênero *Melanoconion* de *Culex*, *Limatus durhamii*, *Mansonia indubitans*, *Mansonia titillans*, *Psorophora ferox* e *Wyeomyia confusa*, além de outros arbovírus que são negligenciados (Vasconcelos et al., 1998; Turell et al., 2000; Méndez et al., 2001; Figueiredo, 2007; Segura e Castro, 2007; Santos-Neto e Lozovei, 2008; Mourão et al., 2009; Cardoso et al., 2010a; Unlu et al., 2010; Cardoso et al., 2010b; Lourenço-de-Oliveira e Failloux, 2017; Barrio-Nuevo, 2019). Além disso, faltam informações confiáveis e atualizadas sobre a capacidade vetorial de muitas das espécies de mosquitos no Brasil, conforme destacado pela recente descoberta de um estudo conduzido por de Melo Ximenes et al. (2020) a respeito da suscetibilidade do *Aedes fluviatilis* ao vírus Chikungunya. Outros gêneros de culicídeos, como *Haemagogus* e *Sabethes*, também têm grande importância por participarem na transmissão de patógenos (Gomes et al. 2010; Figueiredo 2007)

Controle de vetores é o principal método disponível para gerenciar diversas das doenças transmitidas por vetores e, por vezes, é o único método disponível, devido à falta de vacinas eficazes para algumas destas doenças. As ferramentas de controle podem ter como alvo as formas imaturas ou adultas, por isso a ecologia dos vetores, tais como os mosquitos, deve ser estudada e compreendida (Golding et al., 2015; Achee et al., 2019; Wilson et al., 2020).



## 1.2 Importância epidemiológica

Para esse estudo, foram selecionadas espécies que são sabidamente encontradas com maior frequência em ambientes silvestres e no peridomicílio; algumas dessas são incriminadas como vetores de patógenos ou demonstraram competência para veicular agentes etiológicos responsáveis por diversas encefalites e outras arboviroses, como é o caso dos gêneros *Culex* (*Melanoconion*), e *Limatus*, das espécies *Psorophora ferox*, *Mansonia titillans*, *Ma. indubitans*, *Aedes serratus* e *Ae. terreus* (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Cardoso et al., 2010a, 2010b; Moreno et al., 2011; Guedes, 2012; Lourenço-de-Oliveira e Failloux, 2017)

A importância epidemiológica das espécies estudadas aqui, bem como seus hábitos e demais generalidades estão descritos nos itens a seguir:

### 1.2.1 Gênero *Aedes*

O gênero *Aedes* pertence à tribo Aedini, que possui 1.257 espécies classificadas em 10 gêneros. Juntamente com os gêneros *Psorophora* e *Haemagogus*, são os únicos representantes dessa tribo no Brasil (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Harbach, 2018). Esse gênero possui o maior número de espécies da tribo, com 932 espécies (Wilkerson e Linton, 2015). Possui 78 subgêneros e têm distribuição mundial, sendo encontrados desde os trópicos até o ártico, porém o gênero não está tão bem representado na Região Neotropical. A maioria dos subgêneros ocorre nas regiões orientais, oceânica e Australásica (Forattini 2002; Harbach, 2018); apenas os subgêneros *Ochlerotatus*, *Stegomyia*, *Howardina* e *Protomacleaya* são encontrados no Brasil. As espécies de *Aedes* de importância epidemiológica estão agrupadas nos subgêneros *Stegomyia* e *Ochlerotatus* (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

No estudo foram analisadas três espécies de *Aedes*, pertencentes a dois subgêneros: *Aedes* (*Ochlerotatus*) *crinifer*, *Aedes* (*Ochlerotatus*) *serratus* e *Aedes* (*Protomacleaya*) *terreus*

- *Aedes* (*Ochlerotatus*) *crinifer* (Theobald, 1903)

*Ae. crinifer* é encontrado em países da América do Sul, exclusivamente (Gaffigan et al., 2001). Orlandin et al. (2017) afirmaram que a presença de *Ae.*

*crinifer* em ambientes fragmentados pode indicar os diferentes estágios de regeneração da área e modificações antropogênicas na área circundante. Anteriormente, Gomes et al. (2009) expuseram a necessidade da realização de mais estudos sobre os hábitos da espécie, devido ao seu amplo potencial em se desenvolver em ambiente antrópico, e dos Santos et al. (2014) citaram a escassez de estudos que investigam os hábitos de *Ae. crinifer*.

Essa espécie realiza repastos em aves, primatas não humanos e outros mamíferos, além de realizar repasto em humanos (Gomes et al., 2010; de Carvalho et al., 2014). Não foram encontrados registros de encontros dessa espécie infectada com arbovírus ou que comprovassem sua competência na transmissão de patógenos.

- *Aedes (Ochlerotatus) serratus* (Theobald, 1903)

*Ae. serratus* é heterogêneo quanto ao aspecto do adulto, podendo ser um complexo de espécies, compondo o grupo Serratus; essa espécie se assemelha morfológicamente com *Ae. nubilus*. É possível diferenciar as duas espécies através de uma faixa clara longitudinal no escudo dos indivíduos de ambos os sexos, entretanto, as fêmeas do grupo Serratus podem ou não possuir tal faixa, o que causa confusão na identificação das fêmeas de *Ae. serratus* e *Ae. nubilus*. É eclético quanto ao hospedeiro, realizando repasto em aves, humanos e outros mamíferos; tem pico de atividade ao pôr-do-sol e é encontrado nas matas secundárias ao domicílio ou no peridomicílio (Lane, 1992; Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; de Carvalho et al., 2014). Sua distribuição vai desde a América Central até América do Sul (Gaffigan et al. 2001). Exemplares de *Ae. serratus* já foram encontrados infectados com vírus de encefalites, vírus da Febre Amarela, Oropouche e entre outros (Vasconcelos et al., 1998a; Figueiredo, 2007; Segura e Castro, 2007; Mourão et al., 2009; Cardoso et al., 2010a, 2010b; Laporta et al., 2012).

- *Aedes (Protomacleaya) terrens* (Walker, 1856)

*Ae. terrens* é encontrado em ambientes de mata e peridomicílio e realizam repasto tanto em primatas não humanos – ao nível da copa das árvores - quanto em humanos – ao nível do solo; sua distribuição vai do Panamá até América do Sul

(Calado e Silva, 2001; Gaffigan et al., 2001; Forattini, 2002). Demonstrou competência para a transmissão das duas linhagens do vírus Chikungunya que circulam pelas Américas (Lourenço-de-Oliveira e Failloux, 2017).

### 1.2.2 Gênero *Coquillettidia*

O gênero *Coquillettidia*, juntamente com *Mansonia*, faz parte da tribo Mansoniini, e engloba aproximadamente 58 espécies, agrupadas em três subgêneros, dos quais apenas *Rhynchotaenia* ocorre no Brasil. (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Gaffigan et al., 2001; Harbach, 2018). Pouco se sabe sobre a participação de *Coquillettidia* (*Rhynchotaenia*) na transmissão de patógenos, exceto por *Coquillettidia venezuelensis*, que é vetor comprovado de certos arbovírus (Harbach, 2018). Apenas a espécie *Cq. albifera* foi incluída neste estudo.

- *Coquillettidia* (*Rhynchotaenia*) *albifera* (Prado, 1931)

*Cq. albifera* tem distribuição geográfica mais restrita, sendo encontrada apenas no Brasil (São Paulo e Rio de Janeiro) e na Argentina. As fêmeas dessa espécie são similares as de *Cq. chrysonotum* e a separação dessas espécies é feita pela genitália do macho (Gil-santana e Zeraik, 2002; Alencar et al., 2019). Realiza repasto sanguíneo em humanos e outros mamíferos (Evangelista, 2018). Poucos estudos foram feitos acerca dessa espécie, portanto não foram encontrados registros de infecção natural da espécie ou estudos que descrevam sua capacidade ou competência.

### 1.2.3 Gênero *Culex*

O gênero *Culex* pertence a tribo Culicini e é um grande e importante gênero de culicídeos. Está distribuído mundialmente e possui aproximadamente 729 espécies, agrupadas em 26 subgêneros, 13 destes encontrados nas Américas, sendo o subgênero *Culex* mais diverso entre eles, seguido do subgênero *Melanoconion*, tendo 200 e 160 espécies descritas, respectivamente; estes subgêneros possuem diversas espécies envolvidas na transmissão de patógenos e do ponto de vista epidemiológico as atenções são voltadas a eles (Forattini, 2002; Harbach, 2018). O subgênero *Melanoconion* é neotropical, com algumas espécies

neárticas (Forattini 2002). Apenas representantes deste subgênero foram incluídas no presente trabalho.

As espécies desses subgêneros são encontradas desde a América do Norte até América do Sul (Harbach, 2018). Alguns arbovírus causadores de doenças febris e de encefalites foram isolados de espécimes de *Culex (Melanoconion)* (Iversson, 1994), porém o isolamento é comumente associado ao nome genérico do subgênero (*Culex (Melanoconion) sp.*), visto que a identificação de espécies deste subgênero é laboriosa; é subdividido em duas seções: Seção Spissipes, possivelmente com maior importância epidemiológica, e seção Melanoconion, esta última apresentando maior dificuldade de identificação (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Harbach, 2018). É notável tendência a domiciliação vista em algumas espécies deste subgênero (Forattini et al., 1991)

No presente trabalho, três espécies de *Culex (Melanoconion)* foram analisadas: *Cx. pereyrai*, *Cx. ribeirensis* e *Cx. vaxus*.

- *Culex (Melanoconion) pereyrai* (Duret, 1967)

*Cx. pereyrai* tem distribuição restrita à América do sul, sendo encontrado no Brasil e no Paraguai (Torres-Gutierrez e Sallum, 2015). Não há dados disponíveis sobre a importância médica *Cx. pereyrai* e pouco se sabe sobre seus habitats (Sallum e Forattini, 1996; Sallum et al., 2001); pouco se sabe, também, sobre os hábitos de *Cx. pereyrai*. Esta espécie pertence a seção Spissipes de *Melanoconion* (Sallum e Forattini, 1996).

- *Culex (Melanoconion) ribeirensis* (Forattini e Sallum, 1985)

*Cx. ribeirensis* é encontrado no Sul e Sudeste do Brasil, exclusivamente; existem registros antigos desta espécie sob a designação de *Culex epanastasis* e *Culex crybda* (Forattini e Sallum 1985; Santos-Neto e Lozovei, 2008). É eclético quanto ao repasto sanguíneo, porém demonstrou predileção por mamíferos e certo grau de antropofilia (Forattini et al., 1987). Esta espécie é encontrada no peridomicílio e apresenta capacidade de domiciliação (Forattini et al., 1991).

Acredita-se que *Cx. ribeirensis* esteve envolvido na transmissão do vírus da encefalite equina do Leste (EEE) na região sul do Estado de São Paulo, sob a designação de *Culex epanastasis*. Esta espécie pertence a seção *Spissipes* de *Melanoconion* (Sallum e Forattini, 1996).

- *Culex (Melanoconion) vaxus* (Dyar, 1920)

*Cx. vaxus* tem distribuição geográfica restrita a América do Sul, entretanto, anteriormente era erroneamente identificado como *Cx. educator* e *Cx. theobaldi*, fato que pode dificultar o estabelecimento da distribuição correta da espécie (Forattini e Sallum, 1993; Gaffigan et al, 2001; Torres-Gutierrez e Sallum, 2015). Essa espécie geralmente realiza repasto sanguíneo em mamíferos (Evangelista, 2018).

Em estudo recente feito por Barrio-Nuevo (2019) foi isolado o vírus Dengue sorotipo 2 (DENV-2) em um *pool* de mosquitos *Cx. vaxus* coletado em Parelheiros, porém a capacidade dessa espécie em participar da transmissão deste agente etiológico permanece desconhecida (Barrio-Nuevo, 2019). Essa espécie pertence a seção *Melanoconion* do subgênero *Melanoconion*. Existem poucos estudos com de *Cx. vaxus*, portanto pouco se sabe sobre a participação desta espécie na transmissão de possíveis agentes patológicos.

#### 1.2.4 Gênero *Limatus*

O gênero *Limatus* pertence a tribo Sabethini e compreende apenas nove espécies; representantes desse gênero são encontrados na América Central, leste da América do Sul e Índias Ocidentais (Harbach, 2018). Existe dificuldade em separar as fêmeas de sabetíneos, fato observado também no gênero *Limatus*, portanto, permanece obscuro o grau de participação dessas espécies na transmissão de patógenos; as fêmeas de *Limatus* são hematófagas diurnas, porém não são tão agressivas ao homem; sua competência vetorial tem se revelado a partir de isolamento de vírus em espécies do gênero em condições naturais (Forattini 2002).

- *Limatus durhamii* (Theobald, 1901)

A espécie apresenta características de hábito silvestre, sendo comumente encontrado em chácaras e ambientes periurbanos e há registros desta espécie criando-se em criadouros artificiais; apresenta, também potencial para a domiciliação, devido a sua elasticidade em relação aos locais que se cria (criadouros naturais ou artificiais, quando estes se localizam próximo ao seu habitat) (Lopes et al., 1993; Guimarães et al., 2000; Calado e Silva, 2001).

Espécimes de *Li. durhamii* coletados em Parelheiros foram encontrados naturalmente infectados com vírus Zika e a espécie também foi encontrada infectada por outros arbovírus que não estão relacionado a grandes epidemias, como os vírus Guama, Maguari e Tucunduba (Turell et al., 2005; Segura e Castro, 2007; Barrio-Nuevo, 2019).

#### 1.2.5 Gênero *Mansonia*

O gênero *Mansonia* pertence a tribo Mansoniini, tribo que engloba dois gêneros (*Mansonia* e *Coquillettidia*) e possui cerca de 27 espécies (Harbach, 2018). Além de terem potencial epidemiológico, as espécies de *Mansonia* são fatores de incômodo, uma vez que apresentam hematofagismo voraz; têm hábitos predominantemente noturnos, com picos nos crepúsculos, tanto vespertino quanto matutino (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002). Representantes da tribo são encontradas essencialmente nas regiões neotropicais - Américas centrais e do Sul - e na região neártica (Forattini, 2002). Seguramente 9 espécies de *Mansonia* ocorrem no Brasil, das quais *Ma. titillans* é a mais comum (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

Nesse estudo duas espécies de *Mansonia* foram utilizadas: *Mansonia (Mansonia) indubitans* e *Mansonia (Mansonia) titillans*

- *Mansonia (Mansonia) indubitans* (Dyar e Shannon, 1925)

*Ma. indubitans* é amplamente encontrada nas Américas do Sul e Central (Gaffigan et al., 2001). A espécie se mostrou competente em estudos realizados em laboratório para quatro cepas de encefalite equina venezuelana (Turell et al., 2000).

Tem hábitos semelhantes àqueles descritos nas generalidades do gênero e, devido a lacuna presente nos estudos sobre essa espécie, pouco se sabe sobre sua participação no ciclo de transmissão de possíveis patógenos.

- *Mansonia (Mansonia) titillans* (Walker, 1848)

*Ma. titillans* distribui-se amplamente do sul dos E.U.A. ao sul da América do Sul; é incriminada como possível vetor do vírus da encefalite equina venezuelana (EEV), tendo sido experimentalmente infectada por uma cepa do vírus em estudo feito por Turell (1999) e de arbovírus de doenças febris, além de ter sido encontrada infectada com o vírus do Oeste do Nilo (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Turell 1999; Unlu et al., 2010). Essa espécie realiza repasto em humanos, outros mamíferos, aves e répteis (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Méndez et al., 2001; Lorosa et al. 2010; Unlu et al., 2010).

Devido aos seus hábitos alimentares oportunistas, incluindo repastos sanguíneos em pássaros e outros animais, *Ma. titillans* pode desempenhar um papel potencial na transmissão de EEV e outros arbovírus tendo aves como hospedeiros reservatórios (Lorosa et al., 2010).

#### 1.2.6 Gênero *Psorophora*

Os representantes do gênero *Psorophora* restringem-se às Américas; tem hábitos predominantemente diurnos e realizam repasto no homem e em outros mamíferos (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002). São pertencentes a tribo Aedini e se assemelham aos mosquitos do gênero *Aedes*; atualmente se encontra dividido em três subgêneros, *Psorophora*, *Janthinisoma* e *Grabhamia* (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Harbach, 2018).

No presente estudo, apenas um representante do subgênero *Janthinisoma* foi incluído, a espécie *Psorophora ferox*.

- *Psorophora (Janthinisoma) ferox* (Humboldt, 1819)

*Ps. ferox* é amplamente encontrada na região das américas; tem atividade tipicamente diurna e realiza repasto indiscriminadamente no homem e em outros

animais (Gaffigan, et al. 2001; Forattini, 2002; Harbach, 2018). *Ps. ferox* tem sido encontrada naturalmente infectada com arbovírus causadores de encefalites, como EEV, no norte da América do Sul, incluindo a Amazônia brasileira, Encefalite de Saint Louis, em Trinidad, e Rocio no litoral de São Paulo, além dos vírus Ilhéus e Mayaro.

Por fim, em estudo conduzido por Moreno et al. demonstrou isolamento do vírus da febre amarela de um pool de *Ps. ferox* coletado em Ribeirão Preto e, em outro estudo conduzido por Bernard et al. (2001), o vírus do Nilo ocidental (ou West Nile Virus – WNV) foi isolado em amostra desta espécie (De Lopes et al., 1981; Mitchell et al., 1986; Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Bernard et al., 2001; Moreno et al., 2011).

#### 1.2.7 Gênero *Runchomyia*

O gênero *Runchomyia* pertence a tribo Sabethini, que é composta por quatorze gêneros e são encontrados em sua maioria nas regiões neotropicais (Forattini, 2002; Harbach, 2018). Na região das Américas são encontrados sete gêneros desta tribo; alguns gêneros são encontrados apenas no Brasil sendo *Limatus*, *Sabethes* e *Trichoprosopon* alguns exemplos, bem como o gênero em questão, *Runchomyia* (Guedes, 2012; Harbach, 2018)

O gênero *Runchomyia* compreende oito espécies e dois subgêneros (Harbach, 2018). Apenas uma espécie do subgênero *Runchomyia* foi contemplada no presente trabalho.

- *Runchomyia (Runchomyia) reversa* (Lane e Cerqueira, 1942)

*Ru. reversa* é encontrada exclusivamente em países da América do Sul (Gaffigan et al., 2001). Devido à escassez de estudos com essa espécie, pouco se sabe sobre seus hábitos. *Ru. reversa* é essencialmente encontrada em ambientes silvestres, assim como os demais sabetíneos, e a presença desta espécie em ambientes modificados ocorre por acaso ou devido à busca de repasto sanguíneo (Guimarães et al., 2000). Não foram encontrados registros que descrevem a competência ou capacidade vetoriais dessa espécie.



### 1.2.8 Gênero *Wyeomyia*

Os *Wyeomyia* pertencem a tribo Sabethini e são considerados mosquitos silvestres, diurnos; são ecléticos quanto aos hospedeiros e podem atacar o homem quando estão em elevado número (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). É essencialmente neotropical, mas sua distribuição vai do Caribe até a América do Norte (Forattini, 2002; Harbach, 2018). Existem isolamentos de vírus de espécies de *Wyeomyia*, mas pouco se sabe sobre sua real importância epidemiológica; por vezes, isolamentos virais são associados ao nome genérico do Gênero (*Wyeomyia* sp.), o que dificulta o estabelecimento real do possível ciclo de transmissão de patógenos, por exemplo (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Auguste et al., 2010).

Compreende dezessete subgêneros, dos quais três estão incluídos nesse estudo - *Prosopolepis*, *Myiamia* e *Phonyiomyia* - além de um representante cujo subgênero permanece incerto (Harbach, 2018)

- *Wyeomyia (Prosopolepis) confusa* (Lutz, 1905)

*Wy. confusa* é a única espécie validada do subgênero *Prosopolepis*, sendo encontrada exclusivamente no Brasil, em regiões de Mata Atlântica (Lourenço-de-Oliveira et al., 1999; Harbach, 2018). Espécimes de *Wy. confusa* coletados em Parelheiros foram encontrados naturalmente infectados com o Vírus Zika, porém não se sabe o real papel da espécie na transmissão de tal agente etiológico (Barrio-Nuevo, 2019)

- *Wyeomyia (Phonyiomyia) edwardsi* (Lane e Cerqueira, 1942); *Wyeomyia (Miamiomyia) oblita* (Lutz, 1904); *Wyeomyia serratoria* (Dyar e Nuñez Tovar, 1927).

Os hábitos dos demais representantes de *Wyeomyia* contidos nesse estudo são aqueles descritos anteriormente nas generalidades do gênero

*Wy (Miamiomyia) oblita* e *Wy serratoria* são encontradas exclusivamente na América do Sul (Gaffigan et al., 2001; Harbach, 2018) e *Wy. (Phonyiomyia) edwardsi* é encontrada exclusivamente no Brasil (Gaffigan et al., 2001). A diagnose dessas espécies é feita, principalmente, por caracteres morfológicos do adulto, da larva e,

em alguns casos (*Wy. oblita*), da pupa, além de caracteres da genitália masculina (Harbach, 2018).

Devido à falta de estudos com espécies de *Wyeomyia*, pouco se sabe sobre estes. Trata-se de um grupo que carece de estudos taxonômicos que tenham como objetivo diferenciar as numerosas espécies nele contida (Forattini, 2002).

### **1.3 Importância da correta identificação dos mosquitos**

A identificação correta de mosquitos é fundamental para a vigilância e controle de vetores e colabora para estabelecer padrões de transmissão de patógenos, já que a abundância e a infecção de diferentes vetores frequentemente indicam diferentes níveis de risco de transmissão (Farajollahi et al., 2011). Comumente utiliza-se da morfologia externa do indivíduo para realizar sua identificação por meio de chaves taxonômicas, porém esse método se torna inviável quando o espécime está, por algum motivo, danificado (Forattini, 2002; Wilke, et al. 2016).

Pode ser de extrema dificuldade quando se trata de espécies muito semelhantes ou membros de complexos de espécies crípticas, como, por exemplo, os complexos *Culex pipiens* e *Anopheles gambiae*, a genitália masculina é utilizada como forma de diferenciação, tornando a identificação correta das fêmeas complexa (White, 1974; Petrarca et al., 1998; Fonseca et al., 2004; Calado e Navarro-Silva, 2005; Farajollahi et al., 2011; Laurito et al., 2013; Börstler et al., 2014; Lorenz et al., 2017a

Métodos genéticos são, também, empregados para a identificação de espécimes com grande êxito, inclusive em casos em que a identificação morfológica é comprometida e já foi usada com sucesso em diversos estudos, como na diferenciação de fêmeas de *Anopheles (Kerteszia)*, na identificação de representantes da subfamília Culicinae, com larvas e mosquitos do gênero *Aedes* e para diferenciar mosquitos do gênero *Culex* (Toma et al., 2000; Calado e Navarro-Silva, 2005; Beebe et al., 2007; Engdahl et al., 2014). Porém marcadores moleculares possuem custos relativamente elevados quando comparado a outras técnicas e requerem infraestrutura específica (Dujardin, 2008).

Morfometria é apresentada como sendo tradicional – fazendo uso de métricas limitadas – ou geométrica – que enfatiza métodos que capturam a geometria das estruturas morfológicas de interesse e preservam essa informação ao longo das análises. A distinção é devido ao tipo de dado métrico utilizado para a análise. A morfometria tradicional apresentava problemas nas análises, principalmente no que concerne a forma do objeto a ser estudado. Devido a essas dificuldades, foram pesquisados métodos alternativos para quantificar e analisar a forma (Adams et al., 2004; Dujardin, 2008).

As técnicas morfométricas medem tamanho, forma e a relação entre esses, chamada de alometria. Em termos práticos, tamanho e forma se referem a uma parte mensurável do organismo em estudo. Para acessar tais informações, marcos anatômicos – ou *landmarks* (LM) – são dispostos em uma parte mensurável do corpo, porém não descrevem perfeitamente a forma. Entretanto, desde que haja homologia operacional (semelhança entre as características) entre marcos anatômicos individuais, apenas uma captura parcial de forma é necessária para permitir comparações válidas entre espécies (Cracraft, 1967; Dujardin et al., 2010).

A dificuldade em identificar membros da família Culicidae é amplamente discutida na literatura. Por compartilharem caracteres com outras espécies ou pela falta de características constantes e diferenciais no sexo feminino, a identificação exata de algumas espécies é possível apenas pela análise da genitália do macho (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Forattini, 2002). Com isso, ferramentas que buscam elucidar problemáticas como esta se tornam importantes no processo de identificação de espécies.

#### **1.4 Morfometria Geométrica Alar**

A morfometria geométrica se concentra na variação fenotípica da estrutura estudada, sua parametrização e sua relação com fatores extrínsecos (Dujardin, 2008).

Essa técnica é extensamente utilizada na identificação de insetos, obtendo resultados positivos em estudos com triatomíneos, distinguindo corretamente representantes do subcomplexo *Sordida*, para diferenciar espécies-irmãs de

*Triatoma* e *Rhodnius* (Gurgel-Gonçalves et al., 2011; Márquez et al., 2011; Nattero et al., 2017; Falcone et al., 2020). Também foi aplicada em estudos com flebotomíneos, distinguindo corretamente alguns representantes do gênero *Lutzomyia* e, posteriormente, do subgênero *Lutzomyia*, bem como em estudos com moscas de importância forense, para citar alguns exemplos (Giordani et al., 2017; Sontigun et al., 2017).

A técnica já foi empregada em estudos com diversas espécies da família Culicidae e mostrou-se confiável para seu uso na identificação correta de espécies nas quais a identificação por chaves taxonômicas é comprometida a semelhança entre as espécies, como é o caso de fêmeas de *Culex nigripalpus* e *Cx. quinquefasciatus* – cuja identificação morfológica dessas espécies é comprometida quando os espécimes estão danificados e há perda de caracteres usados na diferenciação das duas espécies – em complexo de espécies nos quais a identificação é feita por meio a genitália do macho, como no complexo *Cx. pipiens* e em espécies que vivem em simpatria, como *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* e *An. bellator* (Calle L et al., 2002; Farajollahi et al., 2011; Vidal et al., 2011; Lorenz et al., 2012; Wilke et al., 2016).

Em insetos, as asas são normalmente utilizadas nesta análise, pois são quase estruturas bidimensionais, diminuindo, assim, erros de digitalização (Dujardin, 2008). Contudo, outras estruturas, como a cabeça do espécime, já foram estudadas para aplicação da técnica, em flebotomíneos e triatomíneos. (Gurgel-Gonçalves et al., 2011; Nattero et al., 2017; Godoy et al., 2018).

Entretanto as asas ainda são as estruturas mais indicadas para a realização da técnica para o estudo com culicídeos, exatamente devido à sua forma bidimensional e porque contém veias que abrangem marcos anatômicos naturais ideais para definir os marcos anatômicos. A maioria das veias apresenta pontos de referência reconhecidos e são homólogos, de modo que podem ser encontrados em todos os representantes da família Culicidae (Lorenz et al., 2017a).

Segundo Lorenz et al. (2017a) as formas dos organismos podem apresentar semelhanças ou diferenças dependendo do sexo, localização geográfica, relacionamento filogenético, relações ecológicas e tipos de tratamentos sofridos,

permitindo identificar variações morfológicas e explorar suas causas dentro e entre populações. Em mosquitos, pode ser aplicada para estudos com variações intraespecíficas, variações interespecíficas, detecção de parasitas, dimorfismo sexual, plasticidade e desvio e para separação de cepas de laboratório.

Neste âmbito, a morfometria geométrica já foi utilizada para acessar a estrutura populacional de *Culex nigripalpus* (de Carvalho et al., 2017) e para acessar a influência da urbanização em *Aedes aegypti* e *Anopheles cruzii* (Wilk-da-Silva et al., 2018; Multini et al., 2019), para citar alguns exemplos da aplicação da ferramenta, além de seu uso em variação interespecífica e identificação de espécies.

Morfometria geométrica alar (MGA), como é chamada, é uma ferramenta vantajosa, de baixo custo, rápida e corretamente empregada na identificação de mosquitos (Vidal et al., 2011). Contanto que a asa esteja preservada, é possível identificar espécimes rapidamente e com equipamentos de baixo custo, sobretudo quando comparada com técnicas genéticas, podendo ser realizada em campo (Wilke et al., 2016).

A importância epidemiológica de Culicidae é conhecida e descrita em diversos estudos. A correta identificação das espécies desta família se faz importante, já que auxilia a estabelecer padrões de transmissão de patógenos, relacionando-os com a abundância de vetores, infectividade e competência vetorial. Espécies que formam um complexo, mesmo sendo similares morfológicamente, podem desempenhar papéis diferentes na transmissão de patógenos, fazendo com que a identificação correta se faça crucial para estabelecer os padrões epidemiológicos da doença.

Diversas espécies contidas no presente estudo são negligenciadas, ou seja, receberam pouca importância quando comparadas com outras espécies de culicídeos e carecem de pesquisas e outras tem seu papel epidemiológico já descrito, como visto em *Psorophora ferox*. Há, ainda, espécies cuja identificação é laboriosa e, devido a isso, estudos que objetivam analisar ferramentas que assegurem a identificação correta destas se tornam importantes, já que colaboram

para o estabelecimento do padrão epidemiológico das doenças em que estas espécies podem ser incriminadas como vetores.

## **2 OBJETIVOS**

### **Geral**

- Analisar o uso da MGA para identificar dezesseis espécies de mosquitos com importância epidemiológica negligenciada, pertencentes a oito gêneros.

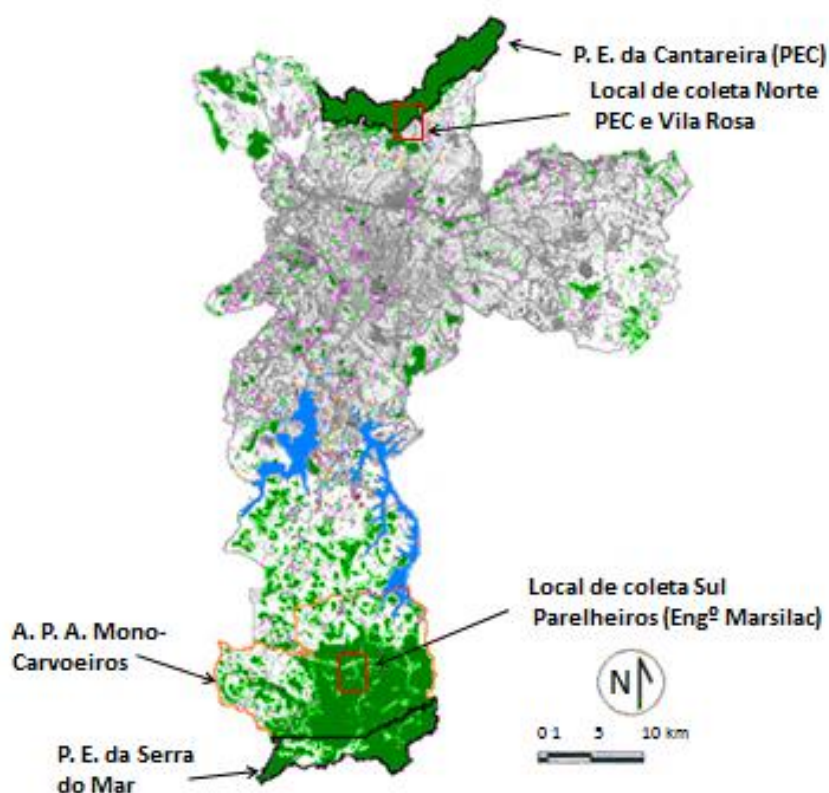
### **Específicos**

- Analisar e identificar os espécimes de dezesseis espécies de acordo com o gênero.
- Analisar e identificar os espécimes de acordo com a espécie.
- Validar uso de MGA para identificação de dezesseis espécies.
- Analisar e identificar espécimes de *Culex (Melanoconion)* sp com MGA.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2 Áreas de Estudo

O presente estudo foi desenvolvido a partir de dados coletados em duas Unidades de Conservação do município de São Paulo, uma localizada no extremo norte da cidade, o Parque Estadual da Cantareira (PEC), e outra localizada ao sul do município no subdistrito de Parelheiros, a Área de Proteção Ambiental (APA) Capivari-Monos (Figura 1). As coletas dos espécimes foram realizadas através de dois projetos FAPESP (Projeto Biota – FAPESP nº 2014/50444-5 e Projeto regular FAPESP nº 2014/10919-4), com anuência do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO: Número: 44740-3).



**Figura 1.** Mapa do município de São Paulo com limites do Parque Estadual da Cantareira (contorno preto), Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos (contorno laranja) e locais de coleta (retângulos vermelhos).

##### 3.2.1 Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos – APA (Zona Sul)

A Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos está localizada na Zona Sul do município de São Paulo – subprefeitura de Parelheiros – e está a cerca de 60 km do centro da cidade, abrangendo 1/6 de toda área do município.

Esta unidade integra duas Reservas da Biosfera, a da Mata Atlântica e a do Cinturão Verde da Cidade de São Paulo e se sobrepõe, em parte, ao Núcleo Curucutu do Parque Estadual da Serra do Mar e possui vegetação nativa remanescente da Mata Atlântica (São Paulo: Secretaria do Verde e do Meio Ambiente, 2011).

De acordo com o plano de manejo da APA, são encontradas na unidade 780 espécies vegetais e 364 espécies compondo a fauna da unidade de conservação (São Paulo: Secretaria do Verde e do Meio Ambiente, 2011).

Esse ecossistema encontra-se ameaçado pela presença humana e expansão desordenada da cidade, através do desmatamento e da urbanização. Loteamentos clandestinos e moradias em zonas rurais são encontrados nessa área, que é considerada endêmica para malária (São Paulo: Secretaria do Verde e do Meio Ambiente, 2011; Duarte et al., 2013).

### **3.2.2 Parque Estadual da Cantareira – PEC (Zona Norte)**

O Parque Estadual da Cantareira fica localizado na Zona Norte do município de São Paulo e abrange, também, os municípios de Caieiras, Mairiporã e Guarulhos, tendo o território de cerca de 7.916,52 hectares (São Paulo: Secretaria do Verde e do Meio Ambiente, 2009).

O PEC Possui vegetação típica de Mata Atlântica e é estimado que 866 espécies pertencem a fauna do PEC e 678 espécies à flora do local. É possível observar a “presença de recursos humanos, equipamentos e infraestrutura cuja origem está associada a processos de licenciamento de obras e empreendimentos em seu entorno ou em outras regiões do estado” (São Paulo: Secretaria do Verde e do Meio Ambiente, 2009).

O fato de a PEC estar inserido na região metropolitana agrava a degradação da mata remanescente do local. “Nesse sentido, o entorno do parque está sob constante ameaça devido à aproximação de loteamentos aos seus limites e à especulação dos recursos naturais oferecidos pela área” (Montes, 2005).

### **3.3 Métodos de coleta e identificação dos espécimes**

Para captura dos espécimes foram utilizadas três estratégias de coleta:



1. Armadilhas luminosas do tipo CDC com isca de CO<sub>2</sub> (Sudia; Camberlain 1988) : as armadilhas do tipo CDC usaram isca de CO<sub>2</sub> como atrativo em cada uma das unidades de conservação, sendo colocadas a nível da copa das árvores, acima de dez metros de altura (CDC copa) e outra a nível do solo, com aproximadamente um metro de altura (CDC solo). As armadilhas foram expostas por 18h para permitir a coleta de mosquitos de hábitos diurnos, crepusculares e noturnos.
2. Armadilhas de Shannon (Shannon 1939): a armadilha de Shannon contou com dois coletores munidos de aspiradores entomológicos manuais (Natal; Marucci 1984) e a coleta teve início no crepúsculo vespertino (considerando que este é o horário de maior atividade hematofágica da maioria das espécies) e teve a duração de três horas.
3. Aspirador entomológico (Nasci 1981): a aspiração foi realizada em cada um dos pontos de coleta, utilizando um aspirador entomológico, para coleta de espécimes que estariam em repouso na mata, com duração de 20 minutos.

As coletas foram feitas mensalmente em cada uma das unidades de conservação, conforme delimitado pelos projetos FAPESP supracitados, e as espécies foram escolhidas de acordo com o local de coleta e os habitats descritos na literatura para cada uma, a fim de examinar espécies em ambientes peridomésticos, de hábitos sabidamente silvestres (de Souza et al., 2020). Ao todo, trinta e uma coletas foram feitas para o presente estudo, sendo vinte e uma destas realizadas em 2015 e dez em 2016.

A identificação morfológica dos espécimes coletados foi realizada no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (LESP/FSP/USP), utilizando chaves taxonômicas específicas (Lane, 1953; Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

O tipo de armadilha utilizado e o local de coleta, bem como as demais informações pertinentes a coleta das espécies presentes no estudo estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Mosquitos (Culicidae) adultos, obtidos por meio de coletas com armadilhas CDC, Shannon e aspirador elétrico, identificados na APA Capivari-Monos e PEC-Cantareira, no município de São Paulo, SP, em 2015 e 2016.

Espécie	Local de coleta	Ano de coleta	Armadilha			
			CDC copa	CDC Solo	Shannon	Aspiração
<i>Aedes crinifer</i>	30 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X		X	X
<i>Aedes serratus</i>	30 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X	X	X	X
<i>Aedes terrens</i>	30 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X		X	X
<i>Coquillettidia albifera</i>	21 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X	X	X	
<i>Culex pereyrai</i>	11 PEC-Cantareira	2015		X	X	X
<i>Culex ribeirensis</i>	30 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X	X	X	
<i>Culex vaxus</i>	22 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X		X	
<i>Limatus durhamii</i>	26 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X	X	X	X
<i>Mansonia indubitans</i>	30 APA Capivari-Monos	2015/2016	X	X	X	X
<i>Mansonia titillans</i>	10 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015			X	
<i>Psorophora ferox</i>	30 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X	X	X	X
<i>Runchomyia reversa</i>	30 APA Capivari-Monos	2015/2016	X		X	
<i>Wyeomyia confusa</i>	30 PEC-Cantareira	2015/2016	X	X	X	X
<i>Wyeomyia edwardsi</i>	21 APA Capivari-Monos	2015	X		X	X
<i>Wyeomyia oblita</i>	20 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X	X		
<i>Wyeomyia serratoria</i>	19 APA Capivari-Monos; PEC-Cantareira	2015/2016	X	X		

Ao todo foram coletados 390 espécimes de dezesseis espécies e oito gêneros. Desses, apenas seis espécimes machos foram incluídos no estudo, a fim de aumentar a suficiência amostral de três espécies, conforme descrito a seguir: *Coquillettidia albifera* (2 machos), *Culex pereyrai* (3 machos) e *Mansonia indubitans* (1 macho).

### 3.4 *Culex (Melanoconion) sp.*

Foram incluídos no presente estudo 42 espécimes de mosquitos *Culex* do subgênero *Melanoconion*, que não foram possíveis de identificar a nível de

espécies, com objetivo de compará-los com as demais espécies de *Melanoconion*, e testar a técnica de MGA para a identificação desses espécimes a nível de espécie.

Estes espécimes foram coletados no Parque Zoológico de São Paulo e foram cedidos pela Prof. Dr<sup>a</sup> Karin Kirchgatter. Os espécimes foram coletados por meio de armadilhas do tipo CDC com isca de CO<sub>2</sub> instaladas em troncos de árvores em quatro locais de coleta; as coletas tiveram início no período crepuscular vespertino e ficaram em funcionamento por 12 horas, conforme descrito por Chagas (2016).

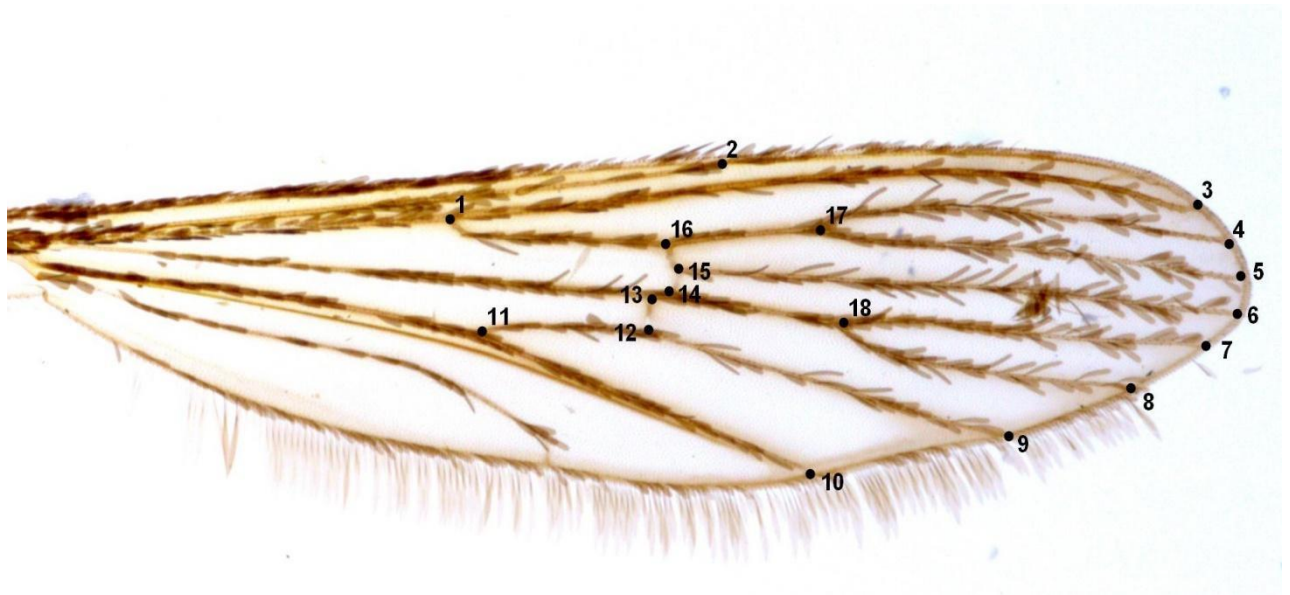
### **3.5 Morfometria geométrica alar**

Trezentos e noventa espécimes de dezesseis diferentes espécies foram previamente identificados como o uso de chaves taxonômicas (Forattini 2002), tiveram as asas direitas destacadas do tórax dos indivíduos e montadas entre lâmina e lamínula, com bálsamo de Canadá.

A captura das imagens das asas foi feita com auxílio de uma câmera Leica DFC320, acoplada a um esteromicroscópio, com o aumento de 40X e as imagens foram armazenadas em banco de dados.

Com auxílio do software tpsDig (Rohlf, 2015), 18 marcos anatômicos foram marcados em cada imagem (Figura 2) e as análises pertinentes aos dados foram feitas nos programas MorphoJ (Klingenberg, 2011) e Past (Hammer et al., 2001).

As asas dos demais quarenta e dois espécimes de *Cx. (Mel.)* sp. haviam sido removidas anteriormente do tórax dos indivíduos e estavam armazenadas em álcool 70% até o momento da montagem sob lâmina e lamínula. O mesmo procedimento de montagem, marcação e posterior análise foi realizado com essas amostras.



**Figura 2.** Asa de culicídeo (*Wy. edwardsi*) com os 18 marcos anatômicos indicados

### 3.6 Análise dos dados

Para o presente trabalho, a alometria (influência do tamanho na forma) foi acessada através de regressão multivariada das coordenadas de Procrustes contra o tamanho do centróide usando um teste de permutação com 10000 randomizações (Wilke et al., 2016). Posteriormente sucederam-se as análises de variáveis canônicas (*Canonical variate analysis* - CVA) e a construção de uma árvore *Neighbor-joining* (NJ).

Análise discriminante foi realizada para acessar o grau de diferença entre as asas das espécies em um gráfico produzido pela análise de variáveis canônicas e um teste de reclassificação validado cruzado foi realizado posteriormente.

- Análise de variáveis canônicas (CVA)

Fornece uma descrição das diferenças entre grupos, especificados *a priori*, demonstrando o índice de variação de cada grupo em um conjunto de dados multivariados. O objetivo da análise é verificar a relação da grandeza de diferença entre os grupos e dentro destes (Ravindra e Dayanand N., 2000; Silveira, 2011). A análise foi feita pelo programa MorphoJ 1.06 (Klingenberg, 2011), utilizando os trezentos e noventa indivíduos presentes a priori no estudo, separados por

espécies, gêneros e, por fim, os indivíduos foram analisados individualmente dentro de cada gênero.

Posteriormente a mesma análise foi realizada com os trezentos e noventa espécimes existentes *a priori* no estudo, juntamente com os quarenta e dois espécimes de *Culex (Mel) sp.* que foram inseridos no estudo posteriormente.

As distâncias de Mahalanobis utilizadas nas demais análises foram calculadas por meio da CVA.

- Árvore *Neighbor-Joining* (NJ)

A NJ foi feita para acessar os padrões de segregação entre as espécies (Wilke et al., 2016). Para a realização desta análise, 30 asas da espécie *Anopheles cruzii* foram utilizadas como *outgroup*. Estes espécimes foram coletados na cidade de São Paulo, na APA Capivari-Monos, em meio urbano

A análise foi feita primeiramente com os trezentos e noventa espécimes que estavam inclusos *a priori* no estudo e, posteriormente, foi feita uma segunda análise incluindo os quarenta e dois espécimes de *Cx. (Mel.) sp.* Os mesmos 30 espécimes de *An. cruzii* foram utilizados como *outgroup* na construção da segunda árvore NJ.

Para a análise foram utilizadas as distâncias de Mahalanobis, calculadas pelo programa MorphoJ, na CVA, e a árvore foi construída no programa Past 3.20 (Hammer et al., 2001).

- Teste de reclassificação validado cruzado

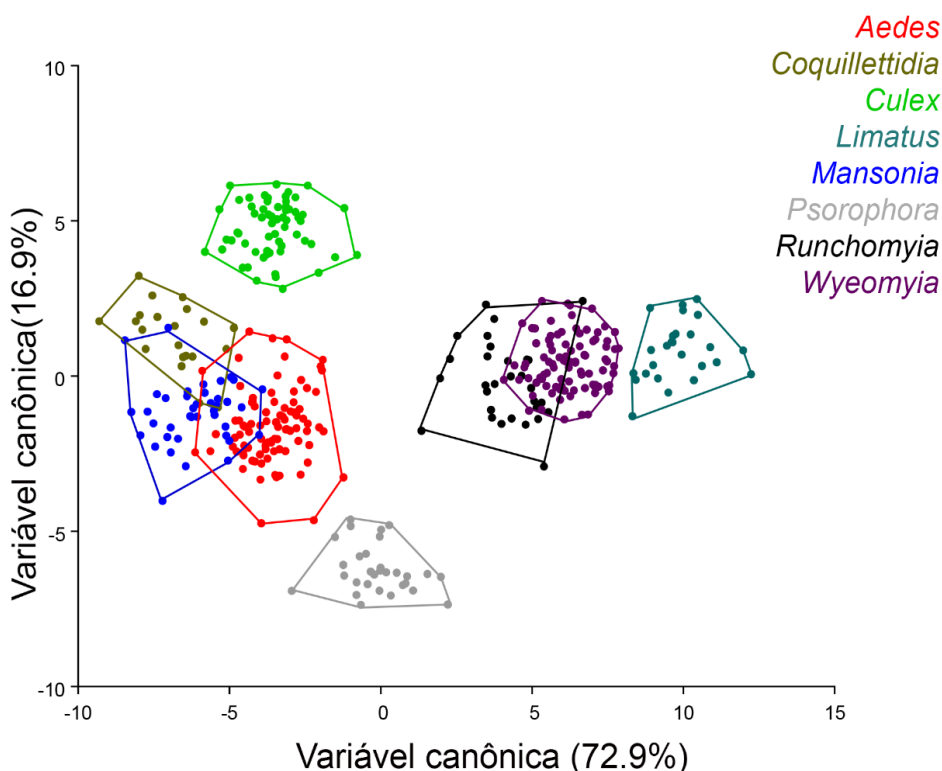
O teste de reclassificação cruzado foi realizado para acessar o grau de confiabilidade das análises. Para tal, foram feitas comparações par-a-par para cada indivíduo; as análises foram feitas a nível de gênero e espécies, respectivamente. Posteriormente a análise foi repetida separadamente para os espécimes de *Cx. (Mel.) sp.*, sendo feitas comparações entre as demais espécies e, em seguida, entre as espécies de *Melanoconion* incluídas no estudo, separadamente.

#### 4 RESULTADOS

Parte dos resultados apresentados a seguir foi publicada na revista ACTA TROPICA, no artigo intitulado “Wing geometric morphometrics for identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) of neglected epidemiological importance” (de Souza et al. 2020 – Apêndice B).

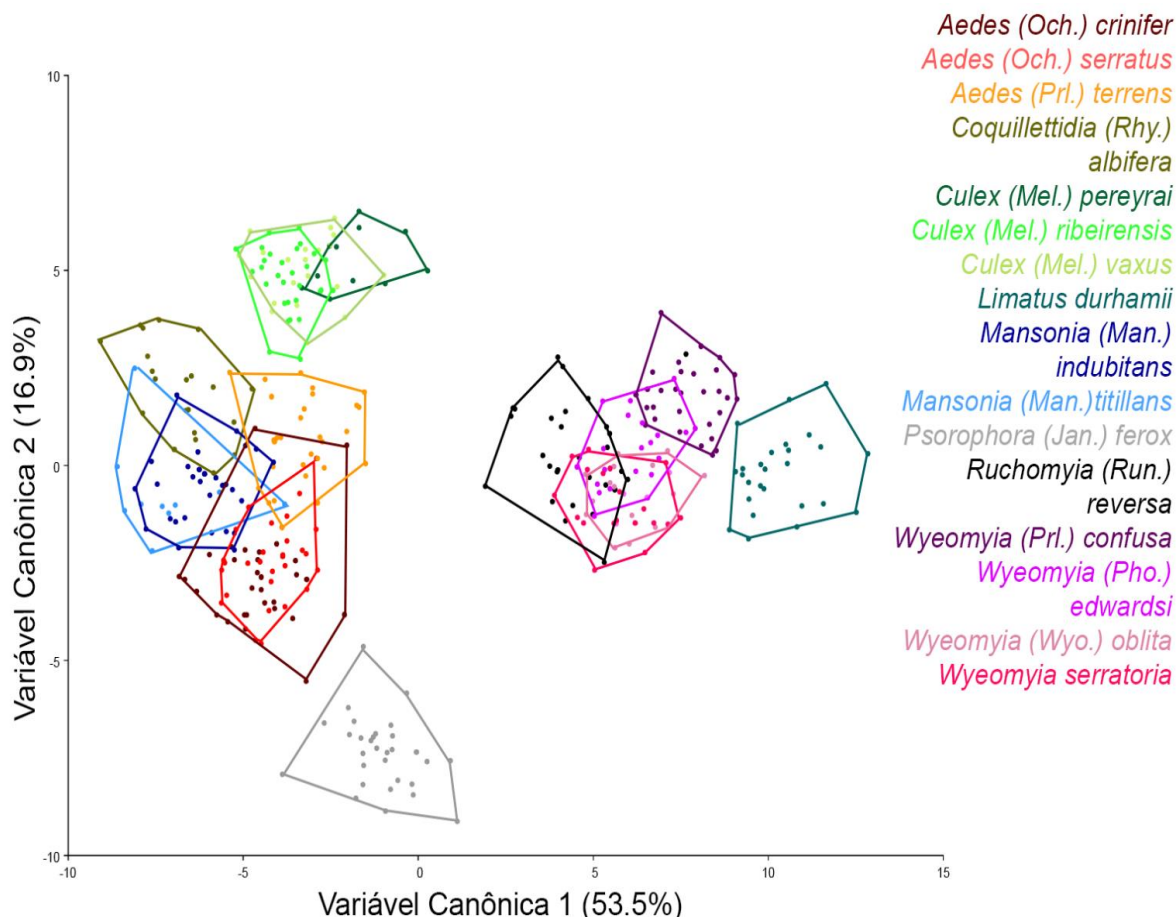
A influência alométrica do tamanho na variação da forma da asa foi de 4.26% ( $P < 0.0001$ ) e, embora tenha sido pequena, não foi removida das análises, pois consideramos essa influência informativa e parte do processo de identificação (Dujardin, 2008; Wilke et al., 2016).

Os resultados da Análise de Variável Canônica (CVA) dos oito gêneros resultou em *clusters* distintos para *Culex*, *Limatus* e *Psorophora* no morfoespaço e sobreposição parcial foi encontrada entre os gêneros *Aedes*, *Coquillettidia* e *Mansonia*, e *Runchomyia* e *Wyeomyia* (Figura 3).



**Figura 3.** Morfoespaço produzido pela CVA dos oito gêneros de mosquito do estudo

Já na CVA para a variação na forma das asas das dezesseis espécies houve certo grau de sobreposição entre algumas espécies, pertencentes ao mesmo gênero e similares entre si. A análise gerou *clusters* distintos para as espécies *Limatus durhamii* e *Psorophora ferox*. (Figura 4).



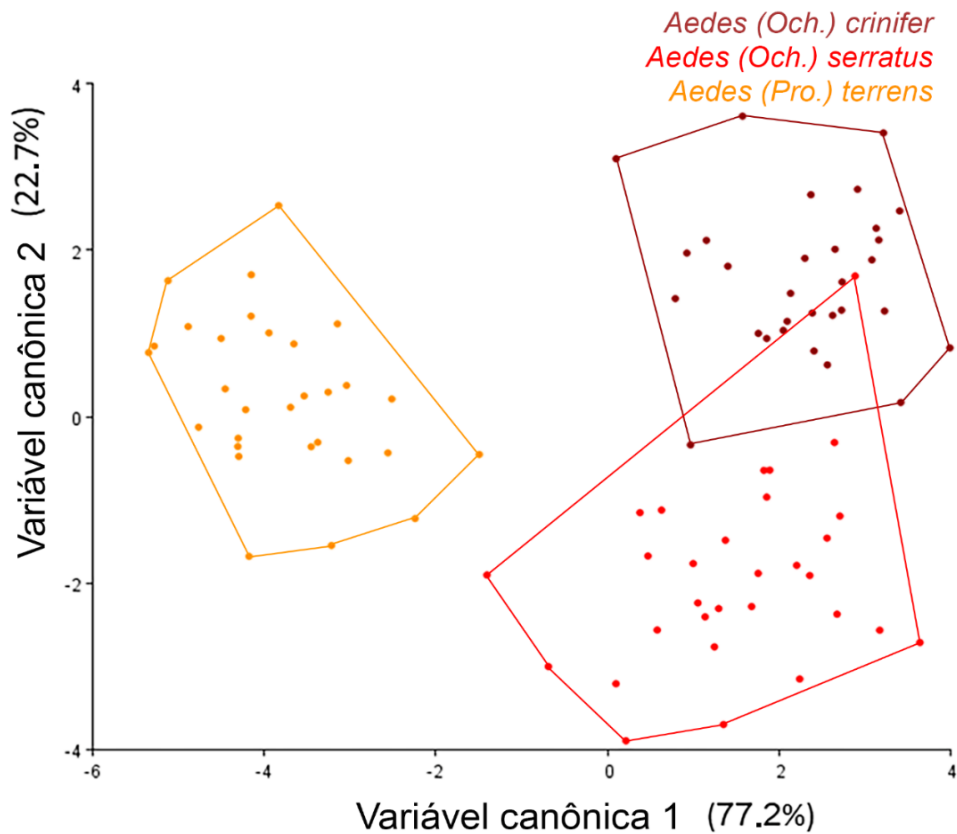
**Figura 4.** Morfoespaço produzido pela CVA das dezesseis espécies de mosquitos do estudo

Uma CVA foi feita individualmente para cada gênero, quando possível, resultando na identificação bem-sucedida de subgêneros (quando presentes) e espécies. O gênero *Aedes* foi corretamente agrupado em três *clusters*, identificando corretamente os subgêneros, *Ochlerotatus* e *Protomacleya*, assim como as três espécies. Um pequeno grau de sobreposição entre *Ae. serratus* e *Ae. crinifer* foi observado, entretanto esse resultado era esperado, pois ambos pertencem ao subgênero *Ochlerotatus* (Figura 5).

O gênero *Wyeomyia* foi separado em três *clusters* principais, um compreendendo *Wy. confusa*, o segundo *Wy. edwardsi* e o terceiro contendo as

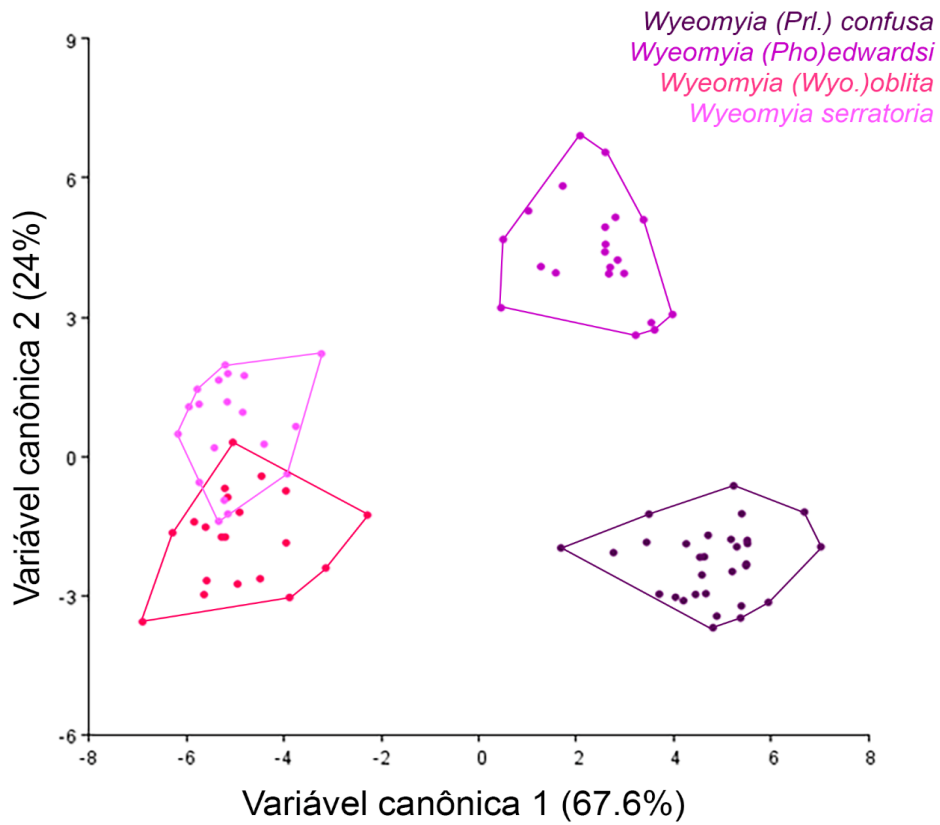
espécies *Wy. oblita* e *Wy. serratoria* (cujo subgênero permanece incerto) com pequeno grau de sobreposição (Gaffigan et al., 2001). Além disso, os três subgêneros, *Prosopolepis*, *Phoniomyia* e *Myamyia*, foram identificados corretamente. (Figura 6).

O gênero *Culex* foi agrupado em três *clusters* bem distintos, separando corretamente as três espécies desse gênero usadas nesse estudo, *Cx. ribeirensis*, *Cx. pereyrai* e *Cx. vaxus* (Figura 7).

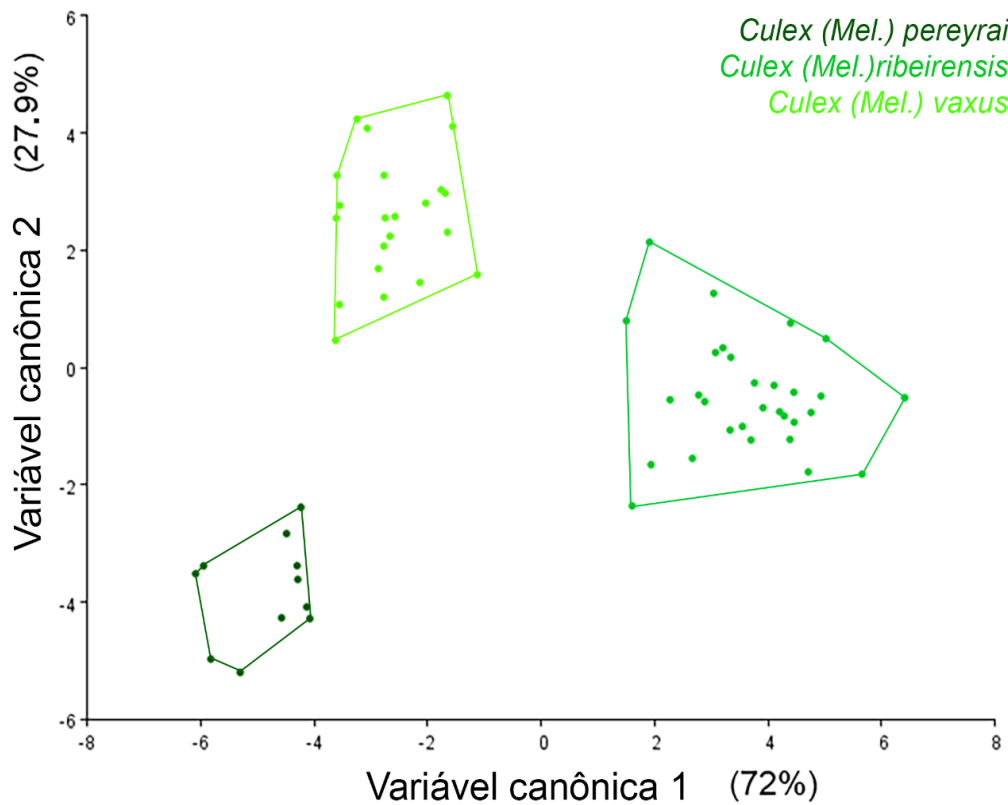


**Figura 5.** Morfoespaço produzido pela CVA do gênero *Aedes*.



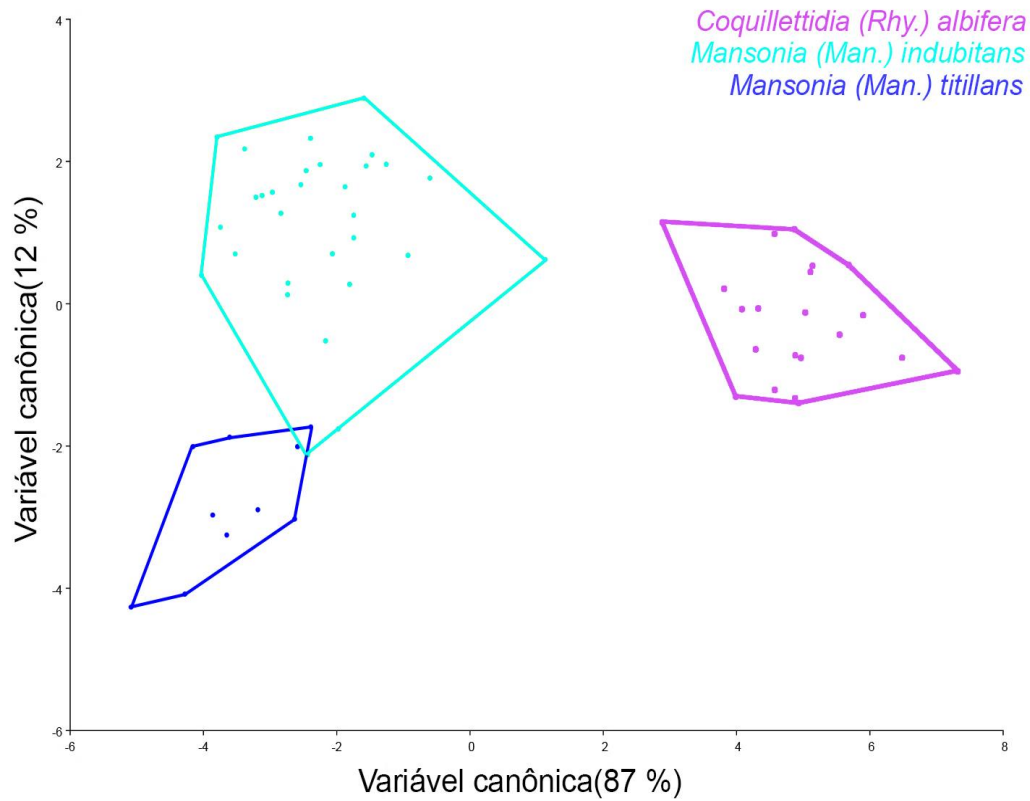


**Figura 6.** Morfoespaço produzido pela CVA do gênero *Wyeomyia*.



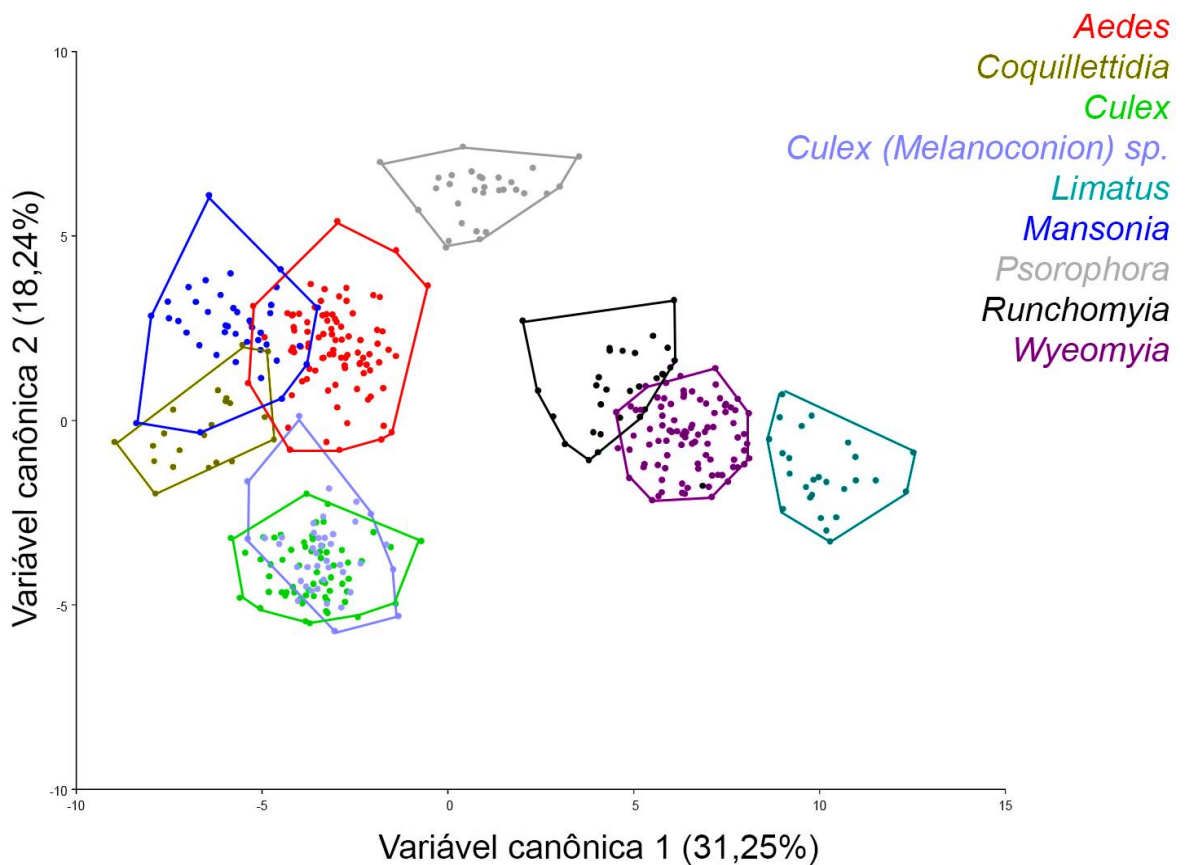
**Figura 7.** Morfoespaço produzido pela CVA do gênero *Culex*.

A fim de comparação, uma CVA foi feita também para os representantes da tribo Mansoniini contidas no estudo: as espécies *Cq. albifera*, *Ma. indubitans* e *Ma. titillans*. Uma pequena sobreposição foi observada entre *Ma. indubitans* e *Ma. titillans*, espécies que são conhecidamente similares entre si (Figura 8).



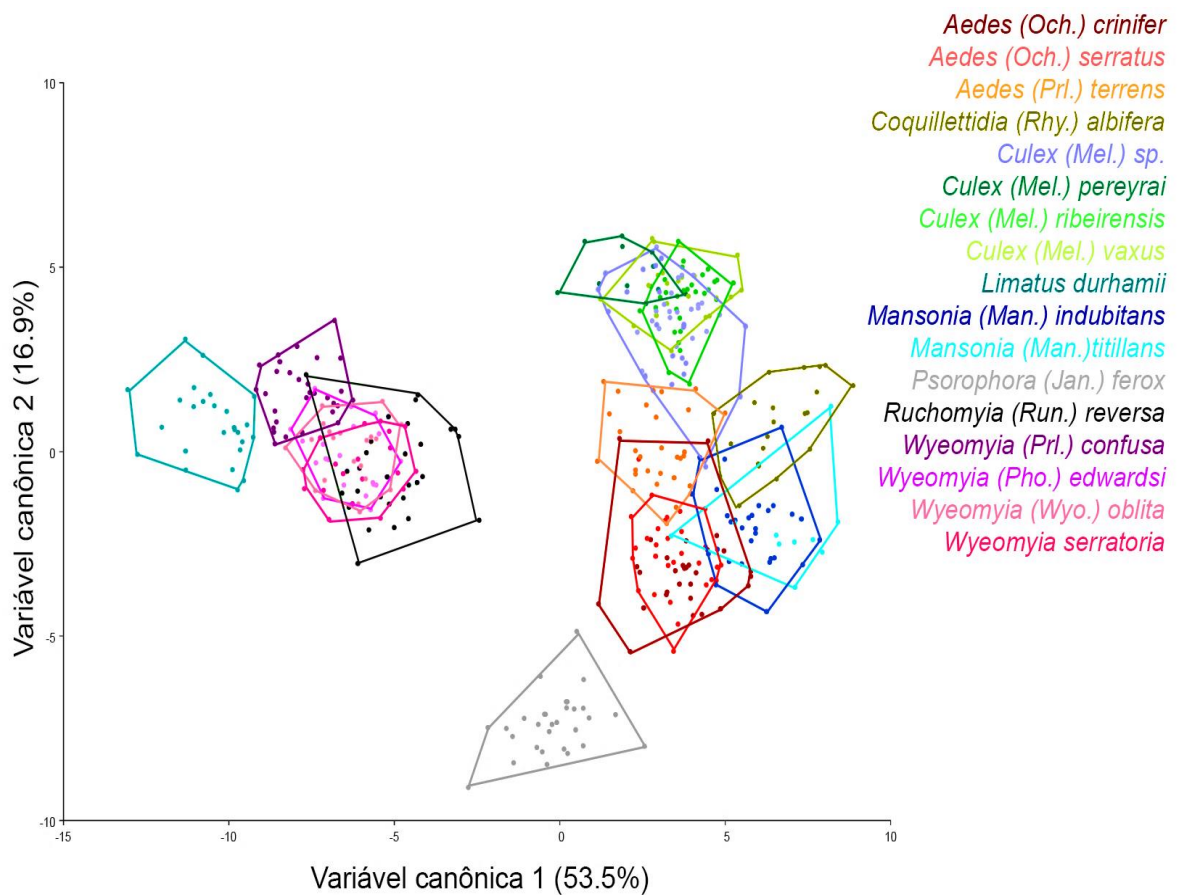
**Figura 8.** Morfoespaço produzida pela CVA da tribo Mansoniini.

A CVA foi repetida para realizar análises específicas com os espécimes de *Culex (Mel.) sp* coletados no Parque Zoológico, inseridos no trabalho posteriormente. Na CVA de gêneros feita com esses espécimes, foi possível observar, além da sobreposição com o gênero *Culex*, sobreposição desses espécimes com o gênero *Aedes* (Figura 9).



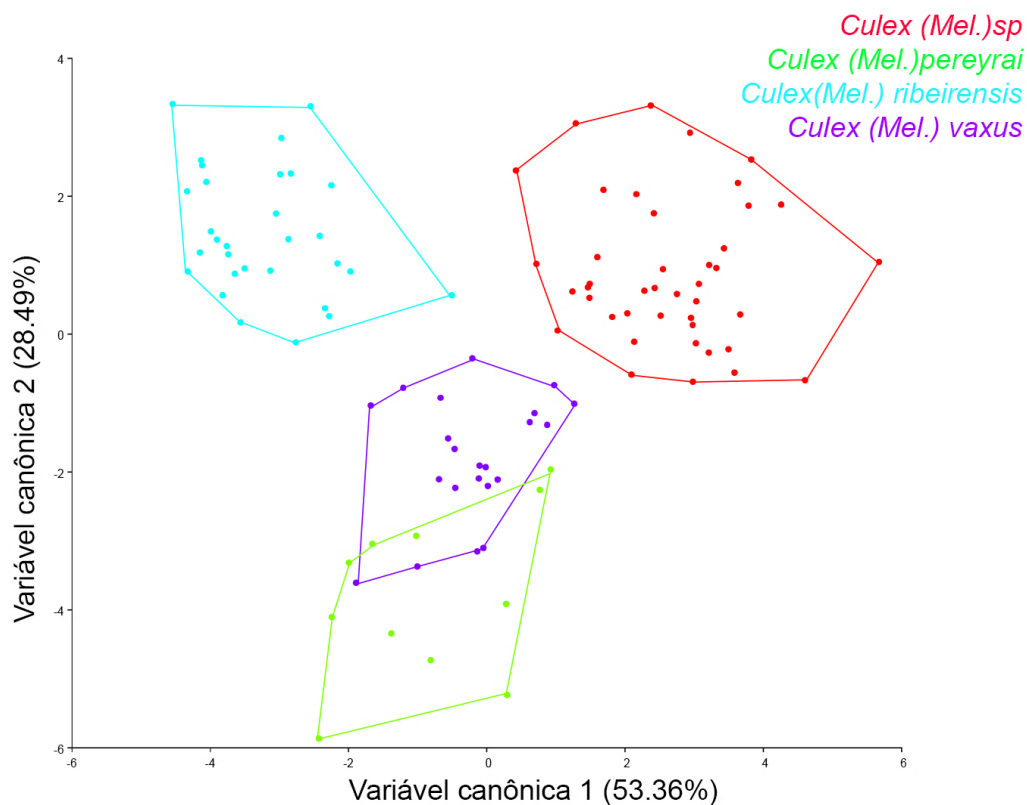
**Figura 9.** Morfoespaço produzido pela CVA de gêneros e de *Culex (Mel.) sp*.

Na CVA de espécies também houve sobreposição, dessa vez com as espécies *Aedes terreus*, *Mansonia indubitans* e *Coquillettidia albifera*, além de sobreposição com as demais espécies de *Culex (Melanoconion)* inseridos no trabalho (Figura 10).



**Figura 10.** Morfoespaço produzido pela CVA das dezesseis espécies do estudo *Culex (Mel.) sp.*

Uma última CVA foi feita apenas com os exemplares de *Culex (Melanoconion)* do estudo: *Cx. pereyrai*, *Cx. ribeirensis*, *Cx. vaxus* e *Cx. (Mel.) sp.* No morfo-espaço formado pelas quatro espécies do subgênero, houve apenas uma sobreposição entre *Cx. pereyrai* e *Cx. vaxus*. A espécie de *Culex (Melanoconion) sp* coletada no Zoológico não fez sobreposição com nenhuma outra espécie (Figura 11).



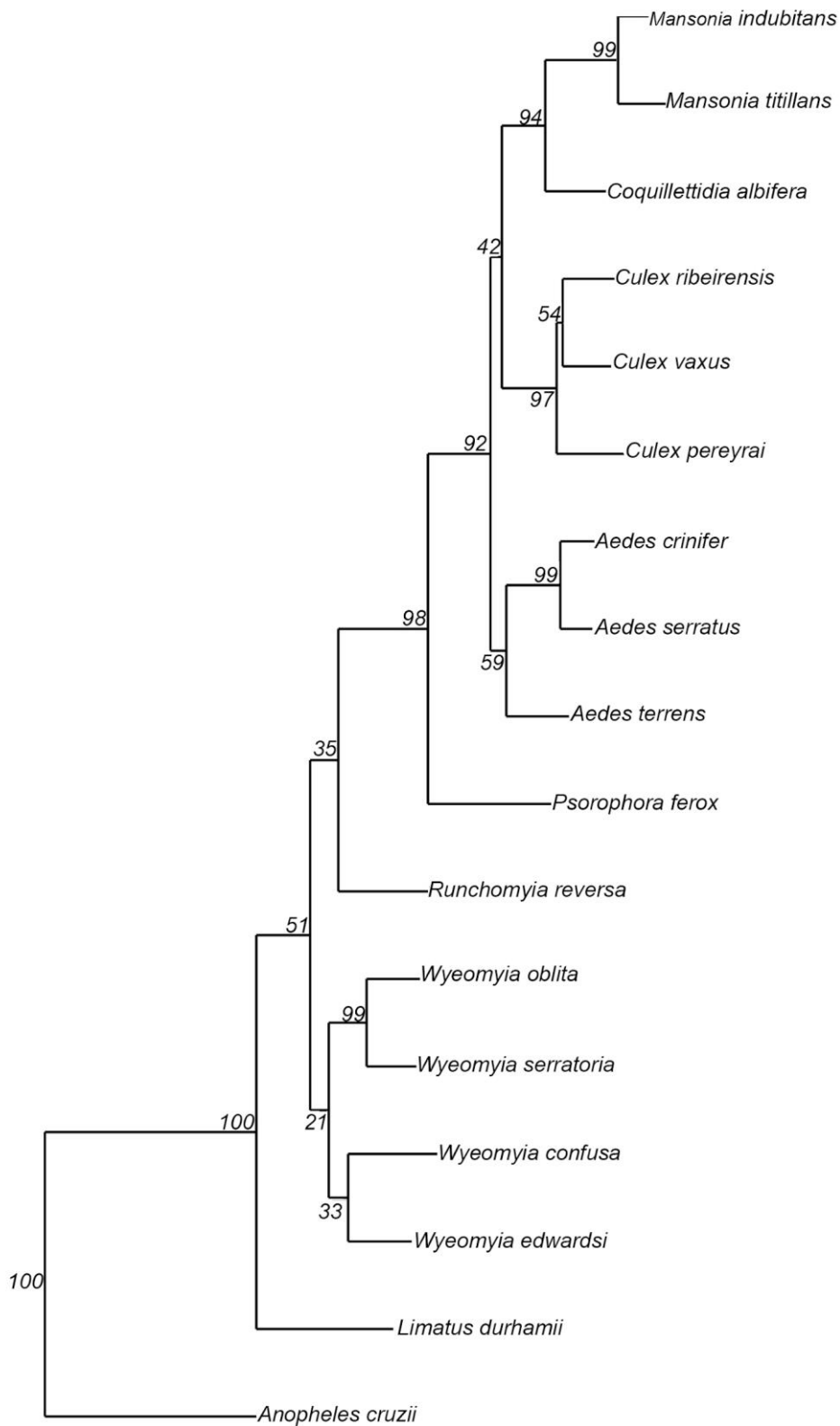
**Figura 11.** Morfoespaço produzido pela CVA do subgênero *Melanoconion*.

A árvore NJ corrobora com os resultados vistos na CVA, agrupando corretamente as espécies de acordo com o gênero e subgênero (Figura 12). *Limatus durhamii* foi a espécie mais distinta de acordo com essa análise. Todas as espécies do gênero *Culex* foram agrupadas juntas, com maior nível de similaridade sendo observado entre as espécies *Cx. ribeirensis* e *Cx. vaxus*. O mesmo padrão foi observado no gênero *Aedes*, no qual todas as três espécies presentes no estudo foram agrupadas juntas, com maior grau de similaridade entre *Ae. crinifer* e *Ae. serratus*, ambos pertencentes ao subgênero *Ochlerotatus*. *Psorophora ferox* demonstrou similaridade com os demais Aedini, mas, entre as espécies dessa tribo, foi a mais distinta de acordo com a NJ.

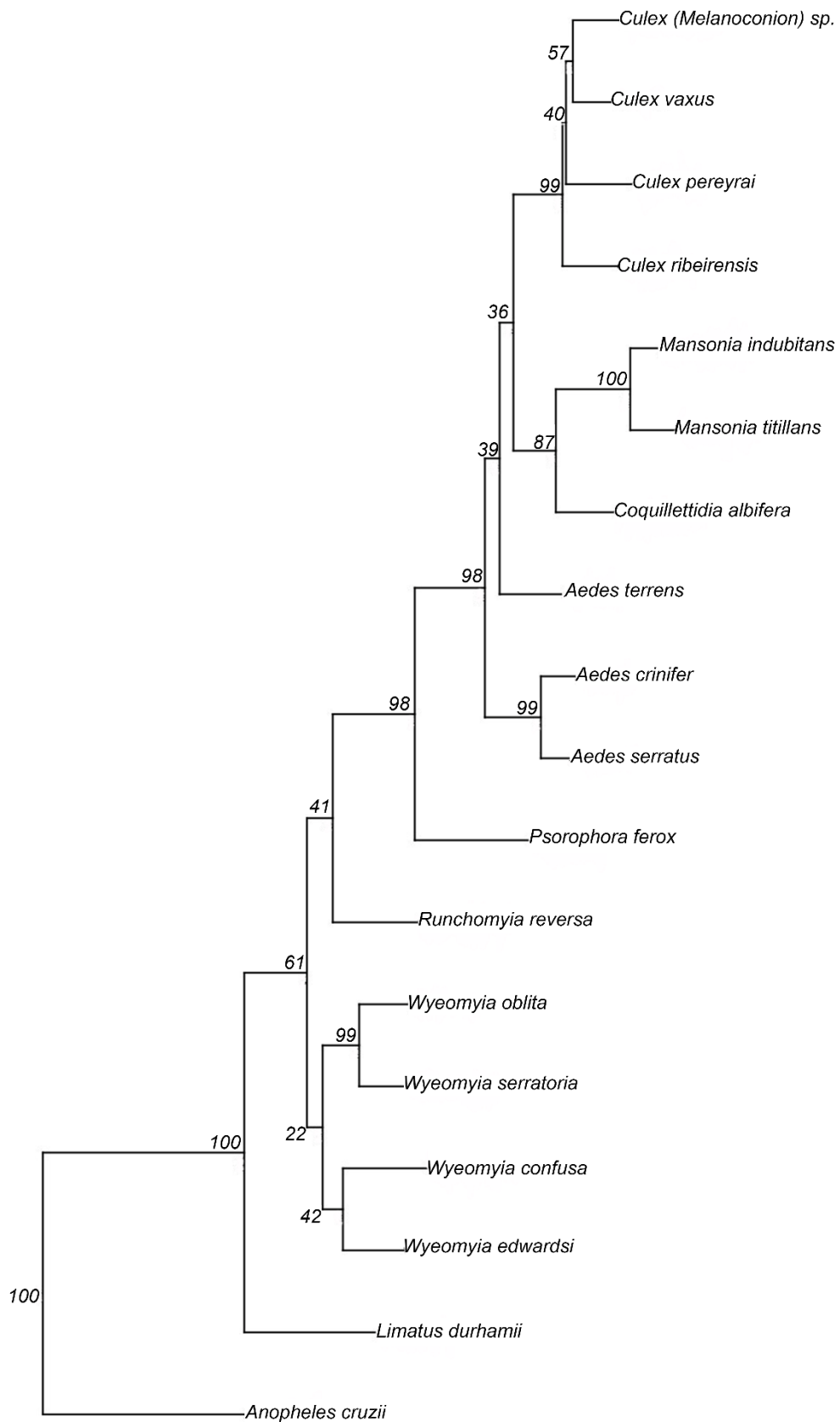
As espécies do gênero *Mansonia* também foram agrupadas juntas e demonstraram similaridades com *Coquillettidia albifera*; essas três espécies pertencem à mesma tribo (Mansoniini). As demais espécies da tribo Sabethini também foram agrupadas, sendo *Runchomyia reversa* a espécie mais distinta dentre os representantes dessa tribo presentes no estudo. Os representantes do

gênero *Wyeomyia* foram agrupados juntos e sendo divididos em dois ramos, um com as espécies *Wy. edwardsi* e *Wy. confusa* e um segundo ramo com as espécies *Wy. oblita* e *Wy. serratoria*, mostrando maior similaridade entre elas.

Uma segunda árvore NJ foi construída inserindo *Cx (Mel.) sp* na análise; os resultados se mantiveram os mesmos já descritos, sendo possível observar a separação por gênero e subgênero. A espécie *Cx (Mel.) sp* foi agrupada com os demais *Culex* e demonstrou maior similaridade com *Cx. vaxus*, sendo agrupado com essa espécie no mesmo ramo (Figura 13).



**Figura 12.** Árvore *neighbor-joining* baseada nas distâncias Mahalanobis das dezesseis espécies do estudo.



**Figura 13.** Árvore *neighbor-joining* baseada nas distâncias Mahalanobis das dezesseis espécies do estudo e *Culex (Mel.) sp.*



O teste de reclassificação cruzada resultou em altos valores na maioria das espécies; quando a identificação foi realizada a nível de gênero, o teste resultou em valores acima de 90% e, em 48 das 56 comparações possíveis, o resultado do teste foi 100% (Tabela 3).

Considerando a identificação a nível de espécie, de um total de 240 comparações possíveis, em 160 as espécies foram identificadas, com um valor de reclassificação de 100%. A média de valores de reclassificação para ambos os grupos (1 e 2) foi 96%, indicando a alta confiabilidade na identificação dessas espécies. Contudo, apenas três comparações obtiveram valores abaixo de 70%, *Ma. indubitans* vs. *Ma. titillans* (63%), *Ma. titillans* vs. *Ma. indubitans* (50%) e *Wy. serratoria* vs. *Wy. oblita* (65%) (Tabela 4). Mesmo com estes baixos valores de reclassificação pontuais, *Ma. Indubitans*, *Ma. titillans* e *Wy. serratoria* obtiveram uma média dos valores reclassificação de 92%, 97% e 95% respectivamente

**Tabela 2.** Resultados do teste de reclassificação cruzada dos oito gêneros incluídos no estudo

		Grupo 2							
		<i>Aedes</i>	<i>Coquillettidia</i>	<i>Culex</i>	<i>Limatus</i>	<i>Mansonia</i>	<i>Psorophora</i>	<i>Runchomyia</i>	<i>Wyeomyia</i>
Grupo 1	<i>Aedes</i>	x	100	100	100	95	100	100	100
	<i>Coquillettidia</i>	100	x	100	100	90	100	100	100
	<i>Culex</i>	99	100	x	100	97	100	100	100
	<i>Limatus</i>	100	100	100	x	100	100	100	100
	<i>Mansonia</i>	100	90	100	100	x	100	100	100
	<i>Psorophora</i>	99	100	100	100	97	x	100	100
	<i>Runchomyia</i>	100	100	100	100	100	100	x	100
	<i>Wyeomyia</i>	100	100	100	100	100	100	96	x

$P < 0.001$ . Valores dados em porcentagem.

**Tabela 3.** Resultados do teste de reclassificação cruzada das dezesseis espécies incluídas no estudo

		Grupo 2															
		<i>Ae. crinifer</i>	<i>Ae. serratus</i>	<i>Ae. terrens</i>	<i>Cq. albifera</i>	<i>Cx. pereyrai</i>	<i>Cx. ribeirensis</i>	<i>Cx. vaxus</i>	<i>Li. durhamii</i>	<i>Ma. indubitans</i>	<i>Ma. titillans</i>	<i>Ps. ferox</i>	<i>Ru. reversa</i>	<i>Wy. confusa</i>	<i>Wy. edwardsi</i>	<i>Wy. oblita</i>	<i>Wy. serratoria</i>
Grupo1	<i>Ae. crinifer</i>	x	73%	97%	100%	100%	97%	100%	100%	90%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	
	<i>Ae. serratus</i>	77%	x	90%	100%	91%	100%	100%	100%	87%	90%	100%	100%	100%	100%	100%	
	<i>Ae. terrens</i>	97%	93%	x	90%	91%	97%	100%	100%	97%	70%	100%	100%	100%	100%	95%	100%
	<i>Cq. albifera</i>	100%	100%	100%	x	100%	100%	95%	100%	80%	80%	100%	100%	100%	91%	95%	95%
	<i>Cx. pereyrai</i>	97%	86%	83%	100%	x	80%	73%	100%	97%	100%	100%	90%	100%	100%	100%	95%
	<i>Cx. ribeirensis</i>	100%	100%	100%	100%	82%	x	91%	100%	93%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%
	<i>Cx. vaxus</i>	97%	100%	97%	100%	73%	80%	x	100%	100%	70%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	<i>Li. durhamii</i>	100%	100%	86%	100%	100%	100%	100%	x	100%	100%	100%	100%	97%	100%	85%	100%
	<i>Ma. indubitans</i>	93%	96%	100%	86%	82%	96%	100%	100%	x	50%	100%	100%	100%	100%	95%	100%
	<i>Ma. titillans</i>	93%	86%	90%	95%	100%	100%	82%	85%	63%	x	97%	100%	100%	100%	100%	100%
	<i>Ps. ferox</i>	100%	96%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	93%	90%	x	100%	100%	100%	100%	100%
	<i>Ru. reversa</i>	100%	100%	100%	100%	91%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	x	100%	90%	85%	100%
	<i>Wy. confusa</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97%	x	86%	95%	100%
	<i>Wy. edwardsi</i>	100%	100%	100%	100%	91%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	87%	x	90%	89%
	<i>Wy. oblita</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	92%	90%	90%	100%	100%	100%	100%	x	79%
	<i>Wy. serratoria</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	96%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	65%

*P*<0.001. Valores dados em porcentagem

O teste de reclassificação cruzado foi feito com *Culex (Melanoconion) sp.*, inicialmente com todas as espécies do estudo (Tabela 5) e, posteriormente, apenas entre os espécimes do subgênero existentes no estudo (Tabela 6).

O teste de reclassificação cruzada feito com todas as espécies, *Cx. (Mel.) sp.* obteve valores altos de reclassificação em todas as comparações possíveis, sendo os menores valores sendo obtidos na comparação com *Cx. vaxus* (88% - *Cx. (Mel.) sp. vs Cx. vaxus*) e *Cx. pereyrai* (82% - *Cx. pereyrai vs Cx. (Mel.) sp.*)

Já a análise com os espécimes de *Melanoconion* separadamente obteve valores acima de 90% em todas as comparações da espécie, exceto pela comparação com *Culex vaxus*, que obteve 88% de reclassificação (Grupo 1 x Grupo 2). Estes valores de reclassificação são altos, mesmo com essa queda pontual, que indica que essas espécies são minimamente similares entre si.

**Tabela 4.** Resultados do teste de reclassificação cruzada das dezesseis espécies e

Cx. (Mel.) sp

		Grupo 2																	
		Ae.	Ae.	Ae.	Cq.	Cx.	Cx.	Cx.	Li.	Ma.	Ma.	Ps.	Ru.	Wy.	Wy.	Wy.	Wy.		
		<i>crinifer</i>	<i>serratus</i>	<i>terrens</i>	<i>albifera</i>	(Mel.) sp	<i>pereyrai</i>	<i>ribeirensis</i>	<i>vaxus</i>	<i>durhamii</i>	<i>indubitans</i>	<i>titillans</i>	<i>ferox</i>	<i>reversa</i>	<i>confusa</i>	<i>edwardsi</i>	<i>oblita</i>	<i>serratoria</i>	
Grupo 1	<i>Ae. crinifer</i>	x	73%	97%	100%	95%	100%	97%	100%	100%	90%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	
	<i>Ae. serratus</i>	77%	x	90%	100%	95%	91%	100%	100%	100%	87%	90%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
	<i>Ae. terreus</i>	97%	93%	x	90%	97%	90%	96%	100%	100%	97%	70%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%
	<i>Cq. albifera</i>	100%	100%	100%	x	100%	100%	100%	95%	100%	80%	80%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	95%
	<i>Cx. (Mel.) sp</i>	100%	97%	97%	100%	x	82%	97%	91%	100%	97%	80%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	<i>Cx. pereyrai</i>	97%	87%	83%	100%	95%	x	80%	73%	100%	97%	100%	100%	100%	90%	100%	100%	100%	95%
	<i>Cx. ribeirensis</i>	100%	100%	100%	100%	95%	82%	x	91%	100%	93%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	<i>Cx. vaxus</i>	97%	100%	97%	100%	88%	73%	80%	x	100%	100%	70%	100%	100%	100%	100%	95%	100%	100%
	<i>Li. durhamii</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	x	100%	100%	100%	100%	100%	97%	100%	85%	100%
	<i>Ma. indubitans</i>	93%	97%	100%	85%	98%	82%	97%	100%	100%	x	50%	100%	100%	100%	100%	100%	95%	100%
	<i>Ma. titillans</i>	93%	87%	90%	95%	98%	100%	100%	82%	85%	63%	x	96%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	<i>Ps. ferox</i>	100%	97%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	93%	90%	x	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	<i>Ru. reversa</i>	100%	100%	100%	100%	100%	91%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	x	100%	90%	85%	100%
	<i>Wy. confusa</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	x	86%	95%	100%
	<i>Wy. edwardsi</i>	100%	100%	100%	100%	100%	91%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	90%	87%	x	90%	89%
	<i>Wy. oblita</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	92%	100%	90%	100%	100%	100%	100%	x	78%
<i>Wy. serratoria</i>	100%	100%	100%	100%	98%	100%	100%	95%	96%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	65%	x	

Tabela 5: Resultados do teste de reclassificação cruzada do subgênero *Melanoconion*.

		Grupo 2			
		<i>Culex (Mel.) sp</i>	<i>Cx. pereyrai</i>	<i>Cx. ribeirensis</i>	<i>Cx. vaxus</i>
Grupo 1	<i>Culex (Mel.) sp</i>	x	90%	97%	91%
	<i>Cx. pereyrai</i>	95%	x	80%	73%
	<i>Cx. ribeirensis</i>	95%	82%	x	91%
	<i>Cx. vaxus</i>	88%	55%	100%	x

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados expostos aqui refletem a eficácia da MGA na identificação de culicídeos. Os oito gêneros e dezesseis espécies incluídos nas análises foram possíveis de serem identificados pela forma da asa, e o mesmo resultado foi obtido nas análises dos subgêneros, quando presentes.

O teste de reclassificação cruzado obteve altos valores na maioria das comparações, o que expressa o alto grau de confiabilidade das análises. Nessa análise é possível observar valores diferentes nas duas diagonais, sendo a diagonal abaixo referente a comparação do grupo 1 vs grupo 2 e a diagonal acima referente a comparação do grupo 2 vs grupo 1. Isso se dá devido a variação natural encontrada nas asas das espécies. Quando as espécies compartilham padrões semelhantes de forma da asa, mas uma das categorias tem níveis mais altos de variabilidade da forma da asa e a outra espécie tem níveis mais baixos, a primeira produzirá valores mais altos no teste de reclassificação cruzado, enquanto a segunda irá produzir valores mais baixos (de Souza et al., 2020 – apêndice B).

Normalmente apenas fêmeas são utilizadas em análises morfométricas, entretanto, seis indivíduos machos foram adicionados as análises, com intuito de aumentar o número amostral de três espécies (*Cx. pereyrai*, *Ma. indubitans* e *Cq. albifera*). Foram feitas também análises sem esses indivíduos, a fim de identificar se haveria divergências nos resultados de identificação devido à presença desses espécimes. Os valores do teste de reclassificação demonstraram que não foram observadas diferenças nos resultados e a tabela com os valores obtidos pelo teste está no apêndice A.

As espécies foram agrupadas nas CVA de acordo com o gênero e subgênero nas espécies, sendo possível observar algumas sobreposições entre alguns táxons, que são similares entre si. Esse resultado é corroborado com a análise de *neighbor-joining*. Na CVA de gêneros é possível observar cinco grupamentos principais, um correspondente aos gêneros *Aedes*, *Coquillettidia* e *Mansonia*, fazendo sobreposições entre si, o segundo formado por sobreposição dos gêneros *Wyeomyia* e *Runchomyia* e outros três grupos formados pelos gêneros *Culex*, *Psorophora* e *Limatus*, sendo esses os gêneros que não fizeram sobreposição

alguma com outros *clusters*, formando três grupamentos completamente separados na análise. A classificação tradicional de Culicidae é fenética, conseqüentemente, todos os níveis de classificação são agrupamentos arbitrários com base na interpretação subjetiva da semelhança anatômica (Harbach 2007). As tribos taxonômicas foram originalmente organizadas de acordo com as semelhanças morfológicas entre os gêneros, portanto é esperado que gêneros de uma mesma tribo compartilhem caracteres morfológicos entre si.

Reinert (2004) e Liria e Navarro (2014) pontuam as similaridades morfológicas vistas entre o gênero *Aedes* e os gêneros da tribo Mansoniini (*Coquillettidia* e *Mansonia*), essa similaridade também é vista na forma da asa, com a sobreposição entre esses gêneros na CVA. *Psorophora*, gênero incluso na tribo Aedini, não realiza sobreposição com espécie alguma, mesmo com *Aedes*, o outro gênero da tribo presente no estudo. Sobre as espécies da tribo Aedini, Harbach pontua:

“As espécies da tribo Aedini são extremamente variadas e muitas são difíceis de identificar a nível de gênero devido à sobreposição características anatômicas compartilhadas. Portanto, combinações de caracteres são necessárias para definir a maioria dos gêneros, subgêneros e espécies (Harbach, 2007, tradução do autor)”.

Sobre Mansoniini é correto dizer que *Coquillettidia* e *Mansonia* compartilham diversos caracteres morfológicos (Harbach e Reinert, 1998), inclusive a forma na asa, como visto nos resultados da CVA.

Foi observada uma sobreposição entre alguns membros da tribo Sabethini presentes no estudo, *Wyeomyia* e *Runchomyia*, sendo *Limatus* o único representante da tribo que não fez sobreposição alguma. Embora a tribo possua uma infinidade de caracteres potencialmente úteis na classificação, recebeu pouca atenção dos taxonomistas (Judd, 1996). A classificação de Sabethini é tida como caótica e a dependência de "caracteres adultos externos superficiais" e a "negligência de caracteres larvais e pupais" seriam responsáveis pelos problemas vistos na classificação da tribo e há dificuldade de caracterizar seus membros (Judd, 1996; Harbach, 2007). *Limatus*, em sua forma adulta, é o sabetíneo de identificação



mais fácil – são os únicos a ter uma única garra nas patas traseiras e diferem de todos os outros mosquitos da tribo por terem escamas na área pré-respiratória em vez de cerdas - entretanto compartilha similaridades notáveis com *Wyeomyia* (Judd, 1996; Harbach, 2007). Este fato é também observado na forma da asa, com a MGA, visto que não houve sobreposição do gênero com nenhum outro presente nas análises.

Com base na história taxonômica e associações morfológicas, os gêneros dos “sabetíneos do novo mundo” formaram dois grupos: o Grupo Trichoprosopon, que incluiu *Isostomyia*, *Johnbelkinia*, *Runchomyia*, *Shannoniana* e *Trichoprosopon* e o Grupo Sabethes, que incluía *Phoniomyia*, *Limatus*, *Sabethes* e *Wyeomyia* (Harbach, 2007). É importante salientar que após essa classificação, *Phoniomyia* foi colocado como subgênero de *Wyeomyia* (não tendo mais o status de gênero) e *Onirion*, um novo gênero, foi descoberto em Sabethini (Harbach e Peyton, 2000; Harbach, 2007). *Wyeomyia* e *Runchomyia* não estão no mesmo grupo, de acordo com essa classificação, compartilhando os caracteres morfológicos que pertencem as generalidades da tribo, entretanto é possível ver certa similaridade entre eles no que diz respeito aos padrões alares, observado no gráfico CVA, devido a sobreposição observada no morfo-espço

*Culex*, o único representante da tribo Culicini presente do estudo, não fez sobreposição com nenhum outro gênero. A tribo tem quatro gêneros (*Culex*, *Deinocerites*, *Galindomyia* e *Lutzia*), sendo *Culex* o maior e mais diverso dentre esses, tendo sua classificação particularmente problemática, baseada quase que inteiramente em caracteres da morfologia externa do adulto, principalmente por meio de análise da genitália masculina; os caracteres da larva e da pupa são negligenciados, mas podem ser também informativos (Harbach et al., 2012). Dentre os vinte e seis subgêneros de *Culex*, *Melanoconion* e *Culex* são dois exemplos de subgêneros que apresentam grandes problemas na identificação por meio dos métodos de identificações tradicionais, baseadas na morfologia externa (Sallum e Forattini, 1996; Laurito et al., 2013).

Alguns gêneros, além das similaridades morfológicas descritas na literatura, compartilham também similaridades na forma da asa, entretanto a MGA é capaz de realizar a identificação correta destes. Todos os valores obtidos no teste de

reclassificação cruzada dos gêneros foram maiores que 90% em todas as comparações possíveis, indicando alto grau de confiabilidade na identificação desses gêneros, demonstrando a eficácia da ferramenta na identificação dos gêneros em questão.

Na CVA produzida pelos representantes do gênero *Aedes* é possível observar dois grupamentos principais, um formado por *Aedes (Protomacleaya) terreus* e um segundo formado pelos outros dois representantes do subgênero *Ochlerotatus* contido nesse estudo, *Aedes crinifer* e *Aedes serratus*, sendo possível observar uma pequena sobreposição entres essas duas espécies, causada apenas por um único espécime.

*Aedes crinifer* permanece com importância epidemiológica desconhecida até o momento e poucos são os estudos que trabalham com a espécie. Orlandin et al. (2017) concluíram que a presença de *Ae. crinifer* indica ambientes em diferentes níveis de regeneração e que mais estudos com a espécie são necessários, uma vez que a presença desta é comum em ambientes naturais e modificados, e para avaliar sua importância epidemiológica (Gomes et al., 2009). Em estudos realizados na Argentina, essa espécie se mostrou positivamente associada a florestas secundárias, entretanto é um mosquito altamente antropofílico, podendo ser um grande fator de incômodo nas áreas em que são encontrados e pode representar perigo caso seja associado a transmissão de algum patógeno, devido aos seus hábitos alimentares – sabidamente essa espécie realiza repasto em primatas não-humanos e também em aves, podendo servir de ponte para algum possível patógeno (Loetti et al., 2007; Cardo et al., 2011).

*Aedes serratus* é incriminado como vetor de diversos arbovírus, portanto a identificação correta da espécie se faz importante para o estabelecimento do padrão de transmissão das doenças as quais esta espécie de culicídeo está relacionada e, por ser amplamente encontrado no peridomicílio e estar adaptado a alterações antrópicas no ambiente, essa espécie pode ser ponte para diversos patógenos (Vasconcelos et al., 1998b; Guimarães et al., 2000; Figueiredo, 2007; Segura e Castro, 2007; Mourão et al., 2009; Cardoso et al. 2010a, 2010b; Laporta et al., 2012). Sabe-se que *Ae. serratus* é morfologicamente semelhante a *Ae. nubilus*, podendo haver problemas na identificação e diferenciação destas espécies em

locais nos quais as duas são encontradas no mesmo ambiente, portanto estudos adicionais que visam utilizar a MGA na diferenciação destas duas espécies são necessários. Entretanto, os resultados aqui refletidos mostram a eficácia da ferramenta na identificação da espécie *Ae. serratus*.

*Aedes crinifer* e *Ae. serratus* pertencem ao subgênero *Ochlerotatus*, entretanto não são espécies crípticas, porém, por pertencerem ao mesmo subgênero compartilham algumas similaridades morfológicas entre si. Existem controvérsias entre grupos de pesquisadores acerca de *Ochlerotatus*, sobre sua colocação como gênero ou subgênero de *Aedes*, entretanto essas colocações são feitas com base em caracteres da morfologia externa, sobretudo da genitália masculina e feminina (Reinert, 2000; Savage e Strickman, 2004; Harbach, 2007; Soghigian ,et al. 2017). A similaridade morfológica entre os representantes de *Ochlerotatus* é vista também na forma da asa, com proximidade das duas espécies em questão nas análises. A sobreposição observada na CVA entre essas espécies é possivelmente causada devido a variação natural observada nas asas de espécies, sendo inviável, exclusivamente por meio de caracteres morfométricos, fazer a reclassificação deste espécime de *Ae. serratus* para *Ae. crinifer* (de Souza et al., 2020 – apêndice B). Apesar desta sobreposição pontual, a MGA foi capaz de separar as duas espécies, com alto grau de confiabilidade, sendo corretamente empregada na separação dessas espécies.

*Aedes terreus* têm hábitos silvestres, entretanto Calado e Silva (2001) encontraram imaturos da espécie colonizando recipientes artificiais introduzidos em ambiente rural, o que demonstra que a espécie tem capacidade de se adaptar a modificações antrópicas no ambiente. Esse comportamento pode estreitar o contato homem-mosquito e aumentar as chances de transmissão de patógenos os quais esse culicídeo pode estar relacionado. Até o dado momento, *Ae terreus* se mostrou competente para infecção de ambas cepas do vírus causador da Chikungunya circulantes nas Américas, fato que acende um alerta ao possível estabelecimento do ciclo silvestre da doença na região, uma vez que *Ae. terreus* é um mosquito de hábitos alimentares primatófilico e “se os primatas não humanos locais puderem amplificar o vírus para infectar mosquitos primatófilicos selvagens” a espécie pode participar do ciclo de transmissão desta doença na região (Lourenço-de-

Oliveira e Failloux, 2017). No presente estudo a MGA foi capaz de separar completamente *Ae. terreus* das demais espécies do gênero *Aedes* incluídas nas análises.

A espécie *Psorophora ferox* está associada a diversos patógenos causadores de encefalites, como WNV, Rocio, além de Mayaro, febre amarela e outras arboviroses (De Lopes et al., 1981; Mitchell et al., 1986; Bernard et al., 2001; Segura e Castro, 2007; Moreno et al., 2011). Muitos estudos destacam a dificuldade em estudar o gênero *Psorophora* devido à falta de caracteres diferenciais no grupo “principalmente devido à taxonomia muito confusa do grupo e à escassez de material”, sobretudo quando se trata do subgênero *Janthinosoma* (Belkin et al., 1970; Harrison et al., 2008). Algumas espécies do grupo compartilham muitas similaridades, sendo encontradas em certas ocasiões ocupando o mesmo habitat, como é o caso de *Ps. ferox* e *Ps. horrida* em regiões dos Estados Unidos da América (Harrison e Whitt, 1996). Por isso o uso de caracteres específicos para diferenciar as espécies se faz importante, a fim de fazer o estabelecimento do padrão epidemiológico das doenças as quais podem estar associadas. Belkin et al. (1970) pontuam que mais estudos sobre o gênero *Psorophora* devem ser realizados, sobretudo no que concerne o subgênero *Janthinosoma* e Harrison et al. (2008) reiteram que “caracteres morfológicos de diagnose estão presentes e aguardam ser encontrados em espécies de *Psorophora*”. No presente estudo *Ps. ferox* foi completamente separada das demais espécies, inclusive dos demais Aedini, sendo corretamente identificada pela forma da asa, quando comparada as espécies aqui utilizadas. Mais estudos com outros representantes do gênero e do subgênero utilizando MGA são necessários para elucidar o uso da ferramenta na identificação desse subgênero, a fim de obter mais um caractere a ser utilizado em sua diagnose.

*Psorophora* e *Aedes* são representantes da tribo Aedini. A classificação desta tribo é feita basicamente por meio da morfologia do adulto e as espécies da tribo são extremamente variadas e muitas são difíceis de identificar por gênero, já que compartilham alguns caracteres morfológicos, sendo necessário a combinação de caracteres para definir a maioria dos gêneros, subgêneros e espécies (Reinert et al., 2004; Harbach, 2007). Isso explica a proximidade desses gêneros nas análises, vista com bastante ênfase na CVA e na NJ, porém, ainda assim é possível separar

completamente as quatro espécies dos dois gêneros desta tribo incluídas no estudo pela forma da asa – *Ae. crinifer*, *Ae. serratus*, *Ae. terreus* e *Ps. ferox*.

No presente estudo foram também analisadas três espécies do gênero *Culex*, ambas do subgênero *Melanoconion*, que tem grande problemática acerca da identificação de seus representantes, devido as semelhanças entre as fêmeas, que “impedem qualquer identificação precisa examinando apenas os traços morfológicos”, sendo os caracteres taxonômicos mais confiáveis encontrados na genitália masculina, essas estruturas exigem protocolos específicos de preparação de lâminas e taxonomistas bem treinados para as dissecações necessárias (Torres-Gutierrez e Sallum, 2015).

Apenas metade das espécies do subgênero tem chaves disponíveis para imaturos, podendo ser insuficiente para a identificação dos espécimes, devido ao baixo número de descrições (Forattini 2002). O subgênero é considerado de importância médica, visto que diversas espécies já foram incriminadas como vetoras comprovadas ou potenciais de vírus incluídos no complexo da Encefalite Equina Venezuelana (Togaviridae) e vírus do Nilo Ocidental (Flaviviridae), vírus da Encefalite Equina Oriental e de outros arbovírus (Bunyaviridae e Flaviviridae) (Sallum e Forattini, 1996; Torres-Gutierrez e Sallum, 2015).

Devido à dificuldade de identificação a nível de espécie, por vezes o isolamento viral é associado ao nome genérico do subgênero, não sendo possível associar o patógeno a real espécie, como visto em alguns estudos (Turell et al., 2005). Identificações errôneas já foram relatadas no grupo, como o caso de *Culex ribeirensis*, que anteriormente era assinalado como *Cx. crybda* (Forattini e Sallum, 1985; Forattini, 2002). *Melanoconion* é separado em duas seções, *Spissipes* e *Melanoconion*, sendo *Spissipes* a seção com maior importância epidemiológica, tendo o maior número de isolamentos associados a espécies desta seção, porém este fato se dá possivelmente a dificuldade de identificação e a insuficiência de dados disponíveis vistos nesse grupo (Forattini, 2002; Weaver et al., 2004). Considerando estes fatos, descobrir novos caracteres que auxiliam na identificação deste grupo é importante para elucidar os problemas na taxonomia de *Melanoconion*.

Na CVA feita com os representantes de *Culex (Melanoconion)* formou três agrupamentos separados, referentes as três espécies aqui utilizadas, demonstrando a eficácia da ferramenta da identificação do subgênero. Esse resultado foi confirmado pelos valores observados na tabela de reclassificação de espécie, que obteve valores altos em todas as comparações das espécies.

Quando comparadas posteriormente com espécimes do mesmo subgênero *Melanoconion*, as quais não foi possível realizar a identificação a nível de espécie, as três espécies não fizeram sobreposição alguma com o novo grupamento que fora adicionado a análise. Esse fato indica que os quarenta e dois espécimes coletados no Zoológico de São Paulo não são correspondentes a nenhuma das três espécies adicionadas anteriormente no estudo, *Cx. ribeirensis*, *Cx. pereyrai* e *Cx. vaxus*. Outras análises devem ser realizadas com esses espécimes a fim de realizar a identificação a nível de espécie, inclusive utilizando a morfologia geométrica alar, fazendo a comparação com outros *Culex (Melanoconion)*.

A MGA também foi eficaz na identificação das espécies do gênero *Wyeomyia* incluídas no estudo. É observado no morfo-espaco três agrupamentos principais, de acordo com os subgêneros, quando existente. *Wyeomyia (Prosopolepis) confusa* e *Wy. (Phoniomyia) edwardsi* não formam nenhuma sobreposição na CVA, enquanto *Wy. (Miamiya) oblita* e *Wy. serratoria* formaram uma sobreposição entre si. O subgênero de *Wy. serratoria* ainda deve ser elucidado e sua proximidade com *Wy. oblita* indica similaridades entre essas espécies, inclusive na forma da asa, bem como com as demais espécies da tribo Sabethini, como *Li. durhamii* e *Ru. reversa* (Harbach, 2007; de Souza et al., 2020 – apêndice B)

O gênero *Wyeomyia* tem importância epidemiológica mais restrita e não são incriminados como vetores confirmados de doenças, entretanto arbovírus já foram isolados de alguns representantes do gênero, o que demonstra que este pode estar envolvido no ciclo epidemiológico de alguns patógenos na natureza, entretanto esse papel ainda deve ser investigado (Roca-Garcia, 1944; Turell, 1999; Auguste et al., 2010; Chowdhary et al., 2012; Harbach, 2018; Barrio-Nuevo, 2019; de Melo Ximenes et al., 2020)

*Limatus durhamii* foi o sabetíneo com maior dissimilaridade em todas as análises, sendo corretamente identificado pela forma da asa com alto grau de confiabilidade. Diversos arbovírus já foram isolados de espécimes de *Li. durhamii*, como Zika vírus e outros arbovírus que não estão associados a grandes surtos (Segura e Castro, 2007; Barrio-Nuevo, 2019), entretanto seu papel no ciclo epidemiológicos desses patógenos também permanece a ser elucidado. *Runchomyia reversa* também foi corretamente identificada pela MGA e até o momento permanece com importância epidemiológica desconhecida e nenhum isolamento viral foi associado a espécie.

Como já é descrito na literatura, há grandes problemas na caracterização de sabetíneos adultos, entretanto são facilmente distinguidos em sua forma imatura (Motta e Lourenço-de-Oliveira, 2000). Um exemplo dessa problemática é vista na espécie *Wy. confusa*, que em sua forma adulta são muito semelhantes às de outras espécies de *Wyeomyia* na ornamentação geral e nos detalhes estruturais, o que é consistente com a homogeneidade relativa desse gênero de mosquitos (Lourenço-de-Oliveira et al., 1999) portanto novos caracteres para a identificação são necessários para facilitar este processo. No presente estudo foi demonstrado que a forma da asa, por meio da MGA é uma ferramenta eficaz para os sabetíneos aqui incluídos, sendo feita corretamente a identificação de gênero, subgênero e espécies.

*Mansonia titillans*, *Ma. indubitans* e *Cq. albifera* pertencem a tribo Mansoniini e compartilham diversas características morfológicas, entretanto com a MGA foi possível distinguir as três espécies. Mesmo com alguns valores pontuais de reclassificação baixos obtido no teste de reclassificação cruzado, as comparações com as demais espécies contidas no estudo foram altas (de Souza et al., 2020 – Apendice B). Na CVA feita com as espécies da tribo é possível observar apenas uma sobreposição pontual entre *Ma. titillans* e *Ma. indubitans*. De acordo com Lane (1992) “as preparações de lâminas da terminália feminina são úteis para a identificação de espécies *Mansonia* (*Mansonia*) e essenciais para a identificação precisa de *Ma. indubitans* e *Ma. titillans*”, o que pode dificultar a identificação dessas espécies por meio da identificação tradicional e a MGA pode, em partes, auxiliar neste processo (De Souza et al., 2020, apêndice B).

O vírus da Encefalite Equina do Leste, vírus do oeste do Nilo e outros arbovírus que causam doenças febris já foram isolados de espécimes de *Mansonia titillans* e *Ma. indubitans* foi moderadamente suscetível a infecção de quatro cepas de encefalite equina venezuelana (Turell et al., 2000; Méndez et al., 2001; Cardoso et al., 2010b; Unlu et al. 2010; Deardorff et al., 2011). A dificuldade de identificação das espécies é vista em estudos que colocam dentre as espécies o táxon “*Mansonia indubitans/Mansonia titillans*”, sem a identificação precisa a nível de espécie, o que faz com que o isolamento viral não seja associado inteiramente a nenhuma das espécies (Unlu et al., 2010).

*Ma. indubitans* e *Ma. titillans* compartilham a mesma distribuição geográfica na América do sul, são hematófagas vorazes e, além de estarem associadas a isolamentos virais, são potenciais vetores de filariose (Torretta, et al. 2006). *Ma titillans* tem hábitos alimentares ornitofílicos, além de realizar repasto no homem e em outros mamíferos, é fortemente atraída por isca humana e devido a esta alta gama de hospedeiros, a sua distribuição e seus hábitos pode levar a transmissão de patógenos de outros animais para o homem (Lorosa et al., 2010; Stein et al., 2013). Sobre a identificação das espécies de *Mansonia*, Barbosa et al. (2007) relata que:

Separar espécies de *Mansonia* (*Mansonia*) permanece problemático, principalmente devido polimorfismos, semelhanças morfológicas e caracteres sobrepostos entre as espécies congênicas. Além disso, algumas espécies são conhecidas apenas em um estágio de vida e, como consequência, é possível que essas espécies pouco conhecidas e potencialmente novas tenham sido erroneamente identificadas como outras espécies de *Mansonia* (*Mansonia*) na literatura (Barbosa et al. 2007).

As fêmeas de *Cq. albifera* são indistinguíveis daqueles de *Cq. (Rhy.) chrysonotum*, mas essas espécies podem ser facilmente separadas pela genitália masculina” (Alencar et al., 2019). No presente estudo, apenas espécies de *Cq. albifera* foram utilizados para as análises morfométricas, fazendo necessário a análise dessa espécie com *Cq. chrysonotum* e demais representantes do



subgênero *Rhyncotaenia* para elucidar o uso da MGA para esse subgênero. Entretanto, entre os Mansoniini aqui incluídos, *Cq. albifera* foi corretamente identificada na comparação com as espécies desta e das demais tribos. Até o momento nenhum isolamento viral foi associado a esta espécie.

A análise *Neighbor-Joining* revelou padrões similares àqueles vistos nas CVAs e no teste de reclassificação cruzada. É possível ver grupamentos referentes a tribo Mansoniini, com *Mansonia titillans* e *Ma. indubitans* sendo agrupadas no mesmo nó, o mesmo padrão é visto no gênero *Aedes*, com os representantes de *Ochlerotatus* sendo agrupados entre si com maior grau de similaridade. Os representantes de *Culex* foram agrupados no mesmo ramo, com maior similaridade entre *Culex vaxus* e *Culex ribeirensis*. Os sabetíneos também foram agrupados e certas espécies demonstram mais similaridades entre si – *Wyeomyia oblita* e *Wy. serratoria* estão no mesmo nó e, em um segundo nó temos *Wy. edwarsi* e *Wy. confusa*. *Runchomyia reversa* demonstra similaridade aos outros sabetíneos, mas não compartilha o ramo com nenhuma outra espécie da tribo.

Na NJ construída com os espécimes de *Melanoconion* capturados no Parque zoológico de São Paulo é possível ver a proximidade destes com a espécie *Cx. vaxus*, como visto no teste de reclassificação, que obteve um valor menor nessa comparação (contudo ainda considerado alto, indicando que, por mais que essas espécies tenham algum grau de similaridade, não são correspondentes) e na CVA, entretanto as análises demonstram que essa espécie não é correspondente a nenhuma que estava anteriormente incluída no estudo.

*Limatus durhamii* e *Ps. ferox* foram completamente separados das demais espécies em todas as análises feitas. Na árvore de NJ estas espécies foram as mais distintas, destacando a habilidade da MGA em identificar corretamente as duas espécies (de Souza et al., 2020 – apêndice B).

A MGA já foi aplicada em diversos estudos e grupos biológicos, em estudos de microevolução, para acessar a influência da urbanização em espécies de mosquitos, acessar estrutura populacional, dentre outras aplicações, não só em culicídeos, mas também em outros insetos de importância em saúde pública, como

visto anteriormente (Dujardin, 2008; Vidal e Suesdek, 2012; Garros e Dujardin, 2013; Lorenz et al., 2014; Multini et al., 2019)

Recentemente, em estudo conduzido por Lorenz e Suesdek (2020), a MGA foi utilizada a fim de observar se a ferramenta seria eficaz para filogenia de Culicidae. Os autores usaram algumas espécies também incluídas no presente estudo (*Cx. vaxus*, *Cx. ribeirensis*, *Cq. albifera*, *Ps. ferox*, *Li. durhamii*, *Ma. titillans* e *Wy. confusa*) e demonstram a robustez e aplicabilidade da MGA em estudos com culicídeos.

Fora pontuado anteriormente o uso de caracteres moleculares para identificação de espécies de mosquitos, entretanto essas técnicas são particularmente caras e requerem equipamentos e conhecimentos específicos (Toma et al., 2000; Calado e Navarro-Silva, 2005; Beebe et al., 2007; Garros e Dujardin, 2013; Engdahl et al., 2014; Lorenz et al., 2017a; Weeraratne et al., 2018). Os problemas na identificação de culicídeos são citados na literatura, tanto devido à similaridade entre espécies e a identificação laboriosa quanto a perda de alguns caracteres importantes para o processo de identificação, como pontuado por Andrews et al. (2014):

“Devido ao status taxonômico não resolvido, alguns membros de *Culex*, subgêneros *Melanoconion* e *Culex*, foram identificados apenas para subgênero ou espécie [...] respectivamente da mesma forma, devido à perda de caracteres-chave, alguns mosquitos só foram identificados a gênero ou subgênero: *Anopheles* (Nys.), *Coquillettidia* (Rhy.), *Aedes*, *Sabethes* ou *Wyeomyia*.”

Esse fato demonstra a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas alternativas para a identificação de espécies de mosquitos. A MGA pode ser usada juntamente a outras técnicas de identificação justamente para minimizar esses problemas. Além disso, os resultados deste e de outros estudos refletem a eficácia desta ferramenta, provando que a MGA é útil e informativa, além de ser uma técnica considerada barata em termos de custo, e rápida (Jaramillo-O et al., 2015; Lorenz et al., 2017a; de Souza et al., 2020 – apêndice B)

## 6 CONCLUSÃO

- A MGA foi capaz de confirmar a identificação dos oito gêneros de culicídeos com alto grau de acurácia e, com menor grau de acurácia, também foi eficaz em identificar as dezesseis espécies analisadas.
- Conforme os resultados refletidos neste, corroborado com estudos feitos anteriormente com a ferramenta, a MGA se mostrou uma ferramenta acessória eficaz durante o processo de identificação de culicídeos, em casos que a identificação tradicional é inviável, seja devido à falta de caracteres de diagnose específicos ou a perda destes.
- De acordo com os resultados obtidos aqui, os quarenta e dois espécimes de *Culex (Melanoconion) sp* coletados no Parque Zoológico de São Paulo não correspondem a nenhuma das espécies do subgênero incluídas anteriormente no estudo. Comparações com outras espécies de *Culex (Melanoconion)* são necessárias para realizar a identificação desses espécimes.
- Estudos futuros são necessários para otimizar a MGA para a identificação taxonômica de espécies de mosquitos.

## 7 REFERÊNCIAS

- Achee NL, Grieco JP, Vatandoost H, Seixas G, Pinto J, Ching-NG L, et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. Kittayapong P, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2019 Jan 3;13(1):e0006822.
- Acorn JH, Adams ME, Adler PH. Encyclopedia of Insects. 2nd ed. Resh VH, Cardé RT, editors. Encyclopedia of Insects. Elsevier; 2009.
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution.' Ital J Zool. 2004 Jan;71(1):5–16.
- Alencar J, Gil-Santana HR, De Mello CF, Marcondes CB, Santos-Mallet Jr Dos. Ultrastructure and morphometry of the egg of *Coquillettidia albifera* (Prado) with illustrations of male genitalia (Diptera: Culicidae). Zootaxa. 2019 Mar 7;4565(1):145.
- Andrews ES, Schoeler GB, Gozalo AS, Carbajal F, Lopez-sifuentes V, Turell MJ. Species Diversity, Seasonal, and Spatial Distribution of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Captured in Aotus Monkey-Baited Traps in a Forested Site Near Iquitos. J Med Entomol. 2014;51(6):1127–35.
- Auguste AJ, Adams AP, Arrigo NC, Martinez R, Travassos da Rosa APA, Adesiyun AA, et al. Isolation and Characterization of Sylvatic Mosquito-Borne Viruses in Trinidad: Enzootic Transmission and a New Potential Vector of Mucambo Virus. Am J Trop Med Hyg. 2010 Dec;83(6):1262–5.
- Barbosa AA, da Silva MAN, Sallum MAM. *Mansonia (Mansonia) iguassuensis* sp. nov. (Diptera: Culicidae) from Brasil. Zootaxaootaxa. 2007;52(May):45–52.
- Barrio-Nuevo KM. Estudo da fauna de mosquitos (Diptera: Culicidae) com simultânea investigação de infecção natural por Flavivirus em duas Unidades de Conservação da Mata Atlântica, Estado de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2019.
- Beebe NW, Whelan PI, Van Den Hurk AF, Ritchie SA, Corcoran S, Cooper RD. A polymerase chain reaction-based diagnostic to identify larvae and eggs of container mosquito species from the Australian region. J Med Entomol. 2007;44(2):376–80.
- Belkin JN, Heinemann SJ, Page W. The Culicidae of Jamaica (Mosquito studies. XXI). Contrib Am Entomol Inst. 1970;6:1–458.
- Benelli G, Beier JC. Current vector control challenges in the fight against malaria. Acta Trop. 2017;174(July):91–6.
- Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kauffman EB, Ebel GD, Dupuis AP, et al. West Nile Virus Infection in Birds and Mosquitoes, New York State, 2000. Emerg Infect Dis. 2001 Aug;7(4):679–85.
- Börstler J, Lühken R, Rudolf M, Steinke S, Melaun C, Becker S, et al. The use of morphometric wing characters to discriminate female *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. J Vector Ecol. 2014;39(June):204–12.
- Calado DC, Navarro-Silva MA. Identificação de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab e *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera, Culicidae, Anophelinae) através de marcadores moleculares (RAPD e RFLP). Rev Bras Zool. 2005;22(4):1127–33.

Calado DC, Silva MAN Da. Comunidade de mosquitos (Diptera, Culicidae) em recipientes antrópicos introduzidos em área rural e urbana da região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. *Rev Bras Zool.* 2001;18:51–60.

Calle L DA, Quiñones ML, Erazo HF, Jaramillo O N. Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Dec;97(8):1191–5.

Cardo M V., Vezzani D, Carbajo AE. Environmental Predictors of the Occurrence of Ground Water Mosquito Immatures in the Paraná Lower Delta, Argentina. *J Med Entomol.* 2011 Sep 1;48(5):991–8.

Cardoso J da C, de Almeida MAB, dos Santos E, da Fonseca DF, Sallum MAM, Noll CA, et al. Yellow Fever Virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* Mosquitoes, Southern Brazil, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2010a Dec;16(12):1918–24.

Cardoso J da C, Paula MB de, Fernandes A, Santos E dos, Almeida MAB de, Fonseca DF da, et al. Novos registros e potencial epidemiológico de algumas espécies de mosquitos (Diptera, Culicidae), no Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010b Oct;43(5):552–6.

de Carvalho GC, dos Santos Malafronte R, Miti Izumisawa C, Souza Teixeira R, Natal L, Marrelli MT. Blood meal sources of mosquitoes captured in municipal parks in São Paulo, Brazil. *J Vector Ecol.* 2014 Jun;39(1):146–52.

de Carvalho GC, Vendrami DP, Marrelli MT, Wilke ABB. Wing variation in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) in urban parks. *Parasit Vectors.* 2017 Dec 18;10(1):423.

Chagas CRF. *Plasmodium* spp. em aves silvestres da Fundação Parque Zoológico de São Paulo : identificação de espécie por microscopia e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b [tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2016.

Chowdhary R, Street C, Travassos da Rosa A, Nunes MRT, Tee KK, Hutchison SK, et al. Genetic characterization of the Wyeomyia group of orthobunyaviruses and their phylogenetic relationships. *J Gen Virol.* 2012 May;93(Pt\_5):1023–34.

Consoli RAGB, Lourenço de Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Cad Saúde Pública.* 1994 Mar;11(1):157–8.

Cracraft J. Comments on Homology and Analogy. *Syst Zool.* 1967 Dec;16(4):355.

Deardorff ER, Estrada-Franco JG, Freier JE, Navarro-Lopez R, Da Rosa AT, Tesh RB, et al. Candidate vectors and rodent hosts of Venezuelan equine encephalitis virus, Chiapas, 2006-2007. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(6):1146–53.

Duarte AMR, Pereira DM, de Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, Ribeiro AF, et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic forest in Brazil. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):58.

Dujardin J-P. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol.* 2008 Dec;8(6):875–90.

Dujardin J-P AL, Kaba D, Henry AB. The exchangeability of shape. *BMC Res Notes.* 2010 Dec 22;3(1):266.

- Engdahl C, Larsson P, Näslund J, Bravo M, Evander M, Lundström JO, et al. Identification of Swedish mosquitoes based on molecular barcoding of the COI gene and SNP analysis. *Mol Ecol Resour.* 2014 May;14(3):478–88.
- Etienne C, Espinal MA, Santos T dos. Zika Virus Disease in the Americas: A Storm in the Making. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(November 2016):16–8.
- Evangelista E. Estudo das variações nas assembleias de culicídeos (Diptera: Culicidae) nos diferentes estratos da vegetação e sua relação com hábitos alimentares [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2018.
- Falcone R, Ribeiro AR, Oliveira J de, Mendonça VJ, Graminha M, Rosa JA da. Differentiation of *Rhodnius neglectus* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by multiple parameters. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20190503.
- Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM. “Bird Biting” Mosquitoes and human Disease: A Review of the Role of *Culex Pipiens* Complex Mosquitoes in. *Infect Genet Evol.* 2011;11(7):1577–85.
- Faria NR, Azevedo RSS, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science (80-).* 2016 Apr 15;352(6283):345–9.
- Faria NR, Quick J, Claro IM, Thézé J, de Jesus JG, Giovanetti M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature.* 2017 May;546(7658):406–10.
- Figueiredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007 Apr;40(2):224–9.
- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, et al. Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. *Science (80- ).* 2004 Mar 5;303(5663):1535–8.
- Forattini OP. *Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia.* 2nd ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2002.
- Forattini OP, de Castro Gomez A, Natal D, Kakitani I, Marucci D. Preferências alimentares de mosquitos Culicidae no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1987;21:171–87.
- Forattini OP, Gomes AC, Kakitani I, Marucci D. Observações sobre domiciliação de mosquitos *Culex (Melanoconion)*, em ambiente com acentuadas modificações antrópicas. *Rev Saúde Pública.* 1991;25(4):257–66.
- Forattini OP, Sallum MAM. A new species of *Culex (Melanoconion)* from Southern Brazil (Diptera: Culicidae). *Rev Saude Publica.* 1985 Apr;19(2):171–82.
- Forattini OP, Sallum MAM. Taxonomic study of some aspects of the Educator Group of *Culex (Melanoconion)* (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst.* 1993;25(2)(90):89–109.
- Gaffigan T V., Wilkerson RC, Pecor JE, Stoffer JA, Anderson T. *Systematic Catalog of Culicidae.* The Walter Reed Biosystematics Unit. 2001.
- Garros C, Dujardin J-P. Genetic and Phenetic Approaches to *Anopheles* Systematics. In: Manguin S, editor. *Anopheles mosquitoes - New insights into*

malaria vectors. Rijeka: InTech; 2013. p. 13.

Gil-Santana HR, Zeraik SO. Novo sítio de ocorrência de *Coquillettidia (Rhynchoetaenia) albifera* (Prado, 1931) (Diptera: Culicidae). 2002.

Giordani BF, Andrade AJ, Galati EAB, Gurgel-Golçalves R. The role of wing geometric morphometrics in the identification of sandflies within the subgenus *Lutzomyia*. *Med Vet Entomol*. 2017 Dec;31(4):373–80.

Giovanetti M, de Mendonça MCL, Fonseca V, Mares-Guia MA, Fabri A, Xavier J, et al. Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016–2019. Pfeiffer JK, editor. *J Virol*. 2019 Oct 9;94(1):2016–9.

Godoy RE, Shimabukuro PHF, Santos TV dos, Pessoa FAC, Cunha AEFL da, Santos FKM, et al. Geometric morphometry of the head in sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an alternative approach to taxonomy studies. *Zootaxa*. 2018 Oct 26;4504(4):566.

Golding N, Wilson AL, Moyes CL, Cano J, Pigott DM, Velayudhan R, et al. Integrating vector control across diseases. *BMC Med*. 2015;13(1):1–6.

Gomes A de C, Torres MAN, Paula MB de, Fernandes A, Marassá AM, Consales CA, et al. Ecologia de *Haemagogus* e *Sabethes* (Diptera: Culicidae) em áreas epizooticas do vírus da febre amarela, Rio Grande do Sul, Brasil. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2010;19(2):101–13.

Gomes AC, Paula MB, Vitor Neto JB, Borsari R, Ferraudo AS. Culicidae (Diptera) em área de barragem em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. *Neotrop Entomol*. 2009 Aug;38(4):553–5.

Gubler DJ. Dengue, urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21st Century. *Trop Med Health*. 2011;39(4):S3–11.

Guedes MLP. Culicidae (Diptera) No Brasil: Relações Entre Diversidade, Distribuição E Enfermidades. *Oecologia Aust*. 2012;16(2):283–96.

Guimarães AÉ, Gentile C, Lopes CM, Mello RP de. Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. II - Habitat distribution. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000 Jan;95(1):17–28.

Gurgel-Gonçalves R, Ferreira A JBC, Rosa AF, Bar ME, Galvão C. Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Med Vet Entomol*. 2011 Mar;25(1):84–93. x

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron*. 2001;4(1):1–9.

Harbach R, Peyton E. Systematics of *Onirion*, a new genus of *Sabethini* (Diptera: Culicidae) from the Neotropical region. *Bull Nat Hist Museum*. 2000;69(November):115–69.

Harbach RE. The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*. 2007;(1668):591–638.

Harbach RE. Mosquito Taxonomic Inventory [Internet]. 2018. Available from: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>

- Harbach, Ralph E. 2020. Valid Species List. Mosquito Taxonomic Inventory, no. April: 1–60. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list>.
- Harbach RE, Kitching IJ, Culverwell CL, Dubois J, Linton Y-M. Phylogeny of mosquitoes of tribe Culicini (Diptera: Culicidae) based on morphological diversity. *Zool Scr.* 2012 Sep;41(5):499–514.
- Harbach RE, Reinert JF. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Syst Entomol.* 1998 Oct;23(4):327–70.
- Harrison BA, Varnado W, Whitt PB, Goddard J, Harrison BA, Varnado W, et al. New diagnostic characters for females of *Psorophora (Janthinosoma)* species in the United States, with notes on *Psorophora mexicana* (Bellardi) (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol.* 2008;33(2):232–7.
- Harrison BA, Whitt PB. Identifying *Psorophora horrida* females in North Carolina (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc.* 1996;12(4):725–7.
- Iversson LB. Situação atual do conhecimento eco-epidemiológico sobre arbovírus patogênicos para o homem na região da Mata Atlântica do Estado de São Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994 Aug;36(4):343–53.
- Jaramillo-O N, Dujardin JP, Calle-Londoño D, Fonseca-González I. Geometric morphometrics for the taxonomy of 11 species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* mosquitoes. *Med Vet Entomol.* 2015 Mar;29(1):26–36.
- Judd D. Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Syst Entomol.* 1996 Apr;21(2):129–50.
- Klingenberg CP. MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Mol Ecol Resour.* 2011;11(2):353–7.
- Lane, C. John. 1953. Neotropical Culicidae. São Paulo: University os São Paulo.
- Lane CJ. On a Collection of Culicinae (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Mosq Syst.* 1992;24(1):16–22.
- Laporta GZ, Ribeiro MC, Ramos DG, Sallum MAM. Spatial distribution of arboviral mosquito vectors (Diptera, Culicidae) in Vale do Ribeira in the South-eastern Brazilian Atlantic Forest. *Cad Saude Publica.* 2012;28(2):229–38.
- Laurito M, Oliveira TM, Almiron WR, Sallum MAM. COI barcode versus morphological identification of *Culex (Culex)* (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(suppl 1):110–22.
- Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica.* 2016;50:1–7.
- Liria J, Navarro J, Zoología LM De, Experimental F, Ciencias D, Carabobo U De. Phylogenetic relationships in the genus *Psorophora* Robineau-Desvoidy (Diptera: Culicidae), based on morphological characters. *Entomol Appl Sci Lett.* 2014;4(November):22–50.
- Loetti V, Burrioni N, Vezzani D. Seasonal and daily activity patterns of human-biting mosquitoes in a wetland system in Argentina. *J Vector Ecol.* 2007;32(2):358.



Lopes J, da Silva MA, Borsato AM, de Oliveira VD, Oliveira FJ. *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* L. e a culicidaeofauna associada em área urbana da região sul, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1993;27(5):326–33.

De Lopes OS, De Sacchetta L abreu, Francly DB, Jakob WL, Calisher CH. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. *Am J Epidemiol*. 1981 Feb;113(2):122–5.

Lorenz C, Almeida F, Almeida-Lopes F, Louise C, Pereira SN, Petersen V, et al. Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured? *Infect Genet Evol*. 2017a Oct;54:205–15.

Lorenz C, Azevedo TS, Virginio F, Aguiar BS, Chiaravalloti-Neto F, Suesdek L. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. Carvalho MS, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017b, Sep

Lorenz C, Marques T, Sallum MAM, Suesdek L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. *Parasit Vectors*. 2012;5(1):257. Available from:

Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. 2014 Dec 16;7(1):581

Lorenz C, Suesdek L. The use of wing shape for characterising macroevolution in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Infect Genet Evol*. 2020; 77(September 2019):104052.

Lorosa ES, Faria MS, De Oliveira LCM, Alencar J, Marcondes CB. Blood Meal Identification of Selected Mosquitoes in Rio De Janeiro, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc*. 2010 Mar;26(1):18–23.

Lourenço-de-Oliveira R, Failloux A-B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. Vasilakis N, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jun 29;11(6):e0005698.

Lourenço-de-Oliveira R, Harbach RE, Castro MG, Motta MA, Peyton EL. *Wyeomyia* (*Prosopelepis*) *confusa* (Lutz): subgeneric validation, species description, and recognition of *Wyeomyia fluid* (Bonne-Wepster and Bonne) as the senior synonym of *Wyeomyia kerri* del Ponte and Cerqueira. *J Am Mosq Control Assoc*. 1999;15(2):200–12.

Márquez E, Jaramillo-O N, Gómez-Palacio A, Dujardin J-P. Morphometric and molecular differentiation of a *Rhodnius robustus*-like form from *R. robustus* Larousse, 1927 and *R. prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Trop*. 2011 Oct;120(1–2):103–9.

de Melo Ximenes M de FF, de Araújo Galvão JM, Inacio CLS, Macêdo e Silva VP, Pereira RL do N, Pinheiro MPG, et al. Arbovirus expansion: New species of culicids infected by the Chikungunya virus in an urban park of Brazil. *Acta Trop*. 2020 Sep; 209:105538.

Méndez W, Liria J, Navarro J-C, García CZ, Freier JE, Salas R, et al. Spatial Dispersion of Adult Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a Sylvatic Focus of Venezuelan Equine Encephalitis Virus. *J Med Entomol*. 2001 Nov 1;38(6):813–21.

- Mitchell CJ, Forattini OP, Miller BR. Vector competence experiments with Rocio virus and three mosquito species from the epidemic zone in Brazil. *Rev Saude Publica*. 1986;20(3):171–7.
- Montes Joyce. Fauna de Culicidae da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 2005; 39( 4 ): 578-584
- Moreno ES, Rocco IM, Bergo ES, Brasil RA, Siciliano MM, Suzuki A, et al. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(3):290–6.
- Motta MA, Lourenço-de-Oliveira R. The Subgenus *Dendromyia* Theobald: A Review with Redescriptions of Four Species (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(5):649–83.
- Mourão MPG, Bastos MS, Gimaque JBL, Mota BR, Souza GS, Grimmer GHN, et al. Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008. *Emerg Infect Dis*. 2009 Dec;15(12):2063–4.
- Multini LC, Wilke ABB, Marrelli MT. Urbanization as a driver for temporal wing-shape variation in *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). 2019; 190:30–6.
- Nasci, R.S. 1981. A Lightweight Battery-Powered Aspirator for Collecting Resting Mosquitoes in the Field. *Mosquito News*.
- Natal, Délsio, and Daniel Marucci. 1984. Aparelho de Sucção Tipo Aspirador Para Captura de Mosquitos. *Revista de Saúde Pública* 18 (5): 418–20.
- Nattero J, Piccinali RV, Macedo Lopes C, Hernández ML, Abrahan L, Lobbia PA, et al. Morphometric variability among the species of the Sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. *Parasit Vectors*. 2017 Dec 6;10(1):412.
- Nunes MRT, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MUG, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*. 2015 Dec 30;13(1):102.
- Nunes PCG, Daumas RP, Sánchez-Arcila JC, Nogueira RMR, Horta MAP, dos Santos FB. 30 years of fatal dengue cases in Brazil: a review. *BMC Public Health*. 2019 Dec 21;19(1): 329.
- Orlandin E, Santos EB, Piovesan M, Favretto MA, Schneeberger AH, Souza VO, et al. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from crepuscular period in an Atlantic Forest area in Southern Brazil. *Brazilian J Biol*. 2017 Mar;77(1):60–7.
- Pan American Health Organization/World Health Organization - PAHO/WHO. Reported Cases of Dengue Fever in The Americas. 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>
- Paules CI, Fauci AS. Yellow Fever — Once Again on the Radar Screen in the Americas. *N Engl J Med*. 2017 Apr;376(15):1397–9.
- Petrarca V, Sabatinelli G, Toure YT, di Deco MA. Morphometric multivariate analysis of field samples of adult *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* s.s.(Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1998;35(1):16–25.

Ravindra K, Dayanand N. N. Multivariate Data Reduction and Discrimination with SAS® Software. Wiley InterScience.; 2000.

Reinert JF. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. J Am Mosq Control Assoc. 2000;16(3):175–88.

Reinert JF, Harbach RE, Kitching IJ. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. Zool J Linn Soc. 2004 Nov;142(3):289–368.

Roca-Garcia M. The isolation of three neurotropic viruses from forest mosquitoes in eastern colombia. J Infect Dis. 1944;75(2):160–9.

Rohlf FJ. The tps series of software. Hystrix. 2015;26(1):1–4.

Sallum MAM, Forattini OP. Revision of the Spissipes Section of *Culex* (*Melanoconion*) (Diptera: Culicidae). J Am Mosq Control Assoc. 1996;12(3):517–600.

Sallum MAM, Kobayashi KM, Forattini OP. Description of Immature Stages of *Culex ocosa* Dyar & Knab, *Culex delpontei* Duret and *Culex pereyrai* Duret of the *Melanoconion* Subgenus (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(7):927–43.

Santos-Neto LG Dos, Lozovei AL. Aspectos ecológicos de *Anopheles cruzii* e *Culex ribeirensis* (Diptera, Culicidae) da Mata Atlântica de Morretes, Paraná, Brasil. Rev Bras Entomol. 2008;52(1):105–11.

dos Santos EB dos, Favretto MA, Muller GA. Mosquitos (Diptera : Culicidae ) do Parque Natural Municipal do Vale do Rio do Peixe , Joaçaba, Santa Catarina, Brasil, com novos. 2014;(July 2016):21–34.

São Paulo: Secretaria do Verde e do Meio Ambiente. Plano de Manejo do Parque Estadual da Cantareira. 2009.

São Paulo: Secretaria do Verde e do Meio Ambiente. Plano de Manejo - Área de Proteção Ambiental Capivari-Monos. 2011. p. 346.

Savage HM, Strickman D. The genus and subgenus categories within culicidae and placement of *Ochlerotatus* as a subgenus of *Aedes*. J Am Mosq Control Assoc. 2004;20(2):208–14.

Segura M de N de O, Castro FC. Atlas de culicídeos na Amazônia brasileira: características específicas de insetos hematófagos da família Culicidae. Atlas de Culicídeos na Amazônia. Belém: Instituto Evandro Chagas; 2007.

Shannon, Raymond C. 1939. "Methods for Collecting and Feeding Mosquitoes in Jungle Yellow Fever Studies 1." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene s1-19 (2): 131–40.

Silveira BE Da. Morfometria geométrica comparativa de asas de Sarcophagidae (Diptera) de interesse forense: uma ferramenta eficaz para a identificação? [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2011.

Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M,

- et al. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors*. 2012;5(1):69.
- Soghigian J, Andreadis TG, Livdahl TP. From ground pools to treeholes: Convergent evolution of habitat and phenotype in *Aedes* mosquitoes. *BMC Evol Biol*. 2017;17(1):1–13.
- Sontigun N, Sukontason KKL, Zajac BK, Zehner R, Sukontason KKL, Wannasan A, et al. Wing morphometrics as a tool in species identification of forensically important blow flies of Thailand. *Parasit Vectors*. 2017 Dec 10;10(1):229.
- de Souza ALS, Multini LC, Marrelli MT, Wilke ABB. Wing geometric morphometrics for identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) of neglected epidemiological importance. *Acta Trop*. 2020 Jun;105593.
- Stein M, Zalazar L, Willener JA, Ludueña Almeida F, Almirón WR. Culicidae (Diptera) selection of humans, chickens and rabbits in three different environments in the province of Chaco, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(5):563–71.
- Sudia, W.D., and R.W Chamberlain. 1988. Battery-Operated Light Trap, an Improved Model. By W. D. Sudia and R. W. Chamberlain, 1962. *Journal of the American Mosquito Control Association* 4 (4): 536–38.
- Toma T, Miyagi I, Crabtree MB, Miller BR. Identification of *Culex vishnui* Subgroup (Diptera: Culicidae) Mosquitoes from the Ryukyu Archipelago, Japan: Development of a Species-Diagnostic Polymerase Chain Reaction Assay Based on Sequence Variation in Ribosomal DNA Spacers. *J Med Entomol*. 2000;37(4):554–8.
- Torres-Gutierrez C, Sallum MAM. Catalog of the subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae) for South America. *Zootaxa*. 2015;4028(1):1–50.
- Torretta JP, Mulieri PR, Patitucci LD, Sander VA, Rodríguez PL, Schweigmann N. Winter survival of immature instars of *Mansonia indubitans* Dyar & Shannon and *Mansonia titillans* Walker (Diptera: Culicidae), in Buenos Aires, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(6):591–6.
- Turell MJ. Vector Competence of Three Venezuelan Mosquitoes (Diptera: Culicidae) for an Epizootic IC Strain of Venezuelan Equine Encephalitis Virus: Table 1. *J Med Entomol* . 1999 Jul 1;36(4):407–9.
- Turell MJ, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Coleman RE, Watts DM, et al. Vector Competence of Peruvian Mosquitoes (Diptera: Culicidae) for Epizootic and Enzootic Strains of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. *J Med Entomol*. 2000 Nov 1;37(6):835–9.
- Turell MJ, O’Guinn ML, Jones JW, Sardelis MR, Dohm DJ, Watts DM, et al. Isolation of viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in the Amazon Basin region of Peru. *J Med Entomol*. 2005;42(5):891–8.
- Unlu I, Kramer WL, Roy AF, Foil LD. Detection of West Nile Virus RNA in Mosquitoes and Identification of Mosquito Blood Meals Collected at Alligator Farms in Louisiana. *J Med Entomol*. 2010 Jul 1;47(4):625–33.
- Vasconcelos P, Travassos da Rosa A, Pinheiro F, Shope R, Travassos da Rosa J, Rodrigues S, et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. An Overv Arbovirology Brazil Neighb countries. 1998;72–99.

- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, Rodrigues SG, Dégallier NT da RE. An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries. In: Travassos da Rosa A, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, editors. An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries. Evandro Chagas Institute; 1998. p. 72–99. Av
- Vidal PO, Peruzin MC, Suesdek L. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). Rev Bras Entomol. 2011 Mar;55(1):134–7.
- Vidal PO, Suesdek L. Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. Infect Genet Evol. 2012 Apr;12(3):591–6.
- Weaver SC, Ferro C, Barrera R, Boshell J, Navarro JC. Venezuelan Equine Encephalitis. Annu Rev Entomol. 2004; 49:141–74.
- Weeraratne TC, Surendran SN, Parakrama Karunaratne SHP. DNA barcoding of morphologically characterized mosquitoes belonging to the subfamily Culicinae from Sri Lanka. Parasit Vectors. 2018 Dec 25;11(1):266.
- White GB. Anopheles gambiae complex and disease transmission in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1974 Jan;68(4):278–98.
- Wilk-da-Silva R, de Souza Leal Diniz MMC, Marrelli MT, Wilke ABB. Wing morphometric variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from different urban built environments. Parasit Vectors. 2018 Dec 26;11(1):561.
- Wilke ABB, Christie R de O, Multini LC, Vidal PO, Wilk-da-Silva R, de Carvalho GC, et al. Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. Moreira LA, editor. PLoS One. 2016 Aug 23;11(8):e0161643.
- Wilkerson RC, Linton Y. Elevation of Pseudoskusea, Rusticoidus and Protomacleaya to valid subgenera in the mosquito genus Aedes based on taxon naming criteria recently applied to other members of the Tribe Aedini (Diptera: Culicidae). Parasit Vectors. 2015;8–11.
- Wilson AL, Courtenay O, Kelly-Hope LA, Scott TW, Takken W, Torr SJ, et al. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. Barrera R, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2020 Jan 16;14(1):e0007831.
- World Health Organization - WHO. Neglected tropical diseases - Mosquito-borne diseases [Internet]. World Health Organization. 2017a [cited 2019 Jan 23]. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/vector\\_ecology/mosquito-borne-diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/en/)
- World Health Organization - WHO. Global vector control response 2017–2030. WHO, World Health Organization. Geneva; 2017b.
- Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Jun 9;110(4):569–72.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A: Tabela de reclassificação cruzada das dezesseis espécies sem os espécimes machos

		Grupo 2															
		Ae. <i>crinifer</i>	Ae. <i>serratus</i>	Ae. <i>terrens</i>	Cq. <i>albifera</i>	Cx. <i>pereyrai</i>	Cx. <i>ribeirensis</i>	Cx. <i>vaxus</i>	Li. <i>durhamii</i>	Ma. <i>indubitans</i>	Ma. <i>titillans</i>	Ps. <i>ferox</i>	Ru. <i>reversa</i>	Wy. <i>confusa</i>	Wy. <i>edwardsi</i>	Wy. <i>oblita</i>	Wy. <i>serratoria</i>
Grupo 1	Ae. <i>crinifer</i>	x	73	97	100	75	97	100	100	90	100	100	100	100	100	95	100
	Ae. <i>serratus</i>	77	x	90	100	100	100	100	100	93	90	100	100	100	100	100	100
	Ae. <i>terrens</i>	97	93	x	95	88	97	100	100	93	70	100	100	100	100	95	100
	Cq. <i>albifera</i>	100	100	100	x	88	100	95	100	90	90	100	100	100	100	85	89
	Cx. <i>pereyrai</i>	90	97	80	100	x	73	82	100	100	100	100	77	93	100	100	100
	Cx. <i>ribeirensis</i>	100	100	100	100	75	x	90	100	93	100	100	100	100	100	100	100
	Cx. <i>vaxus</i>	97	100	97	95	62	80	x	100	100	70	100	100	100	95	100	100
	Li. <i>durhamii</i>	100	100	100	100	100	100	100	x	100	100	100	100	97	100	85	100
	Ma. <i>indubitans</i>	97	97	97	84	100	97	100	100	x	50	100	100	100	100	95	100
	Ma. <i>titillans</i>	97	87	90	95	100	100	82	85	59	x	97	100	100	100	100	100
	Ps. <i>ferox</i>	100	97	100	100	87	100	100	100	93	90	x	100	100	100	100	100
	Ru. <i>reversa</i>	100	100	100	100	87	100	100	100	100	100	100	x	100	90	85	95
	Wy. <i>confusa</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	97	x	86	95	100
	Wy. <i>edwardsi</i>	100	100	100	95	100	100	100	100	100	100	100	90	87	x	90	89
	Wy. <i>oblita</i>	100	100	100	100	100	100	100	92	100	90	100	100	100	100	x	79
	Wy. <i>serratoria</i>	100	100	100	89	100	100	95	96	97	100	100	100	100	100	65	x

$P < 0.001$ . Valores dados em porcentagem

# APÊNDICE B - Artigo publicado na revista Acta Tropica. “Wing geometric morphometrics for identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) of neglected epidemiological importance” – DE SOUZA, ALS et al., 2020

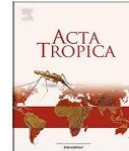
Acta Tropica 211 (2020) 105593



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)



## Wing geometric morphometrics for identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) of neglected epidemiological importance

Ana Letícia da Silva de Souza<sup>a</sup>, Laura Cristina Multini<sup>b</sup>, Mauro Toledo Marrelli<sup>a,b</sup>, André Barretto Bruno Wilke<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Tropical Medicine of São Paulo, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup> Department of Public Health Sciences, Miller School of Medicine, University of Miami, 1120 Northwest 14th Street, Miami, FL 33136, USA



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Culicidae  
Neglected species  
Wing geometric morphometrics

### ABSTRACT

Culicidae comprises more than 3500 species, some of which are responsible for the spread of various human diseases, causing millions of deaths worldwide. Correct identification of these species is essential for the development of surveillance and control strategies. The most common method of mosquito identification is based on specific traits of the external morphology of species. However, identification of mosquitoes by morphological characters can be inaccurate or even unfeasible if the specimen is damaged or there is a lack of distinguishing features, as in the case of cryptic species complexes. Wing geometric morphometrics is a reliable, affordable tool for the identification of mosquito species, including sibling species. More importantly, it can be used in addition to both traditional morphologic identification methods as well as genetic approaches. Here, wing geometric morphometrics was used to identify sixteen mosquito species from eight genera: *Aedes*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Limatus*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Runchomyia*, and *Wyeomyia*. The 390 specimens used here were collected in São Paulo, Brazil using CDC traps, aspiration, and Shannon traps. Allometry was assessed by multivariate regression of the Procrustes coordinates on centroid size followed by canonical variate analysis and a pairwise cross-validated reclassification test. A Neighbor-Joining tree based on Mahalanobis distances was constructed with 1,000 bootstrap replicates using MorphoJ 1.02 and Past 2.17c. The canonical variate analysis of genera resulted in distinct clusters for *Culex*, *Limatus*, and *Psorophora* and partial overlapping between *Aedes*, *Coquillettidia*, and *Mansonia*, and between *Runchomyia* and *Wyeomyia*. Pairwise cross-validated reclassification tests indicated that genera were identified with an accuracy of at least 99% and subgenera with a mean accuracy of 96% and that in 160 of the 240 possible comparisons species were identified with an accuracy of 100%. Our results show that the eight genera in the study were correctly distinguished by wing shape, as were subgenera and most species, demonstrating that wing geometric morphometrics can be used for the identification of the mosquito species studied here.

### 1. Introduction

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) belong to a large group of insects, with more than 3,500 described and validated species (Harbach, 2018; Orlandin et al., 2017). Some mosquito species are obligatory blood feeders and play a significant role in the transmission of vector-borne diseases (VBDs) (Harbach, 2018; WHO, 2017a). Malaria, dengue, Zika, yellow fever, and chikungunya endanger individuals living in endemic areas, i.e., roughly 80% of the world's population. The majority of endemic areas are in developing countries and poor regions of the world, where pathogens transmitted by mosquitoes cause millions of cases of these diseases every year (Benelli and Beier, 2017; Etienne et al., 2017;

Faria et al., 2017; Gubler, 2011; Paules and Fauci, 2017; Sinka et al., 2012; Wilke et al., 2019; World Health Organization - WHO, 2017b).

The presence of many arboviruses has been documented in Brazil. Dengue, Zika, yellow fever, and chikungunya viruses are the most commonly found and have the greatest epidemiological relevance. However, many other neglected arboviruses are circulating under the radar such as Mayaro, Oropouche, and Rocio viruses (Lima-Camara, 2016; Lorenz et al., 2017b; Mourão et al., 2009).

Major outbreaks caused by different arboviruses have been reported in Brazil in the recent past. Between 2016 and 2018 a major yellow fever outbreak resulted in approximately 2000 human cases. Even though *Ae. aegypti* is acknowledged as the main yellow fever vector in

\* Corresponding author.

E-mail address: [axb1737@med.miami.edu](mailto:axb1737@med.miami.edu) (A.B.B. Wilke).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105593>

Received 29 April 2020; Received in revised form 18 June 2020; Accepted 18 June 2020

Available online 20 June 2020

0001-706X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.