ROSELI FRANÇA SIMÕES

Mosquitos (Diptera, Culicidae) em área de transmissão de malária aviária: identificação de potenciais vetores de hemosporídeos do gênero *Culex*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical
Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Profª Drª Karin Kirchgatter

São Paulo

2021

ROSELI FRANÇA SIMÕES

Mosquitos (Diptera, Culicidae) em área de transmissão de malária aviária: identificação de potenciais vetores de hemosporídeos do gênero *Culex*

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical
Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Profª Drª Karin Kirchgatter

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Simões, Roseli França
Mosquitos (Diptera, Culicidae) em área de transmissão de malária aviária : identificação de potenciais vetores de hemosporídeos do gênero Culex / Roseli França Simões. -- São Paulo, 2021.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Medicina Tropical. Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.
Orientadora: Karin Kirchgatter.

Descritores: 1.Malária 2.Plasmodium 3.Hemosporídeos aviários 4.Culex 5.Morfometria geométrica alar

USP/FM/DBD-059/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha pequena grande família, mãe e irmão que estão sempre me apoiando e incentivando em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me mostrar que o choro pode durar uma noite, mas a alegria vem pela manhã.

A minha orientadora, Profª Drª Karin Kirchgatter, pela amizade, pelo carinho, pelo respeito, pelas muitas oportunidades, por me guiar com excelência durante essa jornada, por sempre estar aberta a escutar meus medos e anseios, pelos conselhos e pelos puxões de orelha. Obrigada por acreditar em mim. Você é o meu exemplo de conduta profissional e pessoal, minha inspiração dentre muitas mulheres na ciência.

Aos meus amigos e parceiros de trabalho biólogos Eliana Monteiro, Bruno Mathias, Calorina Anjos a Ms. Kiba Jamila, Drª Carolina Chagas e a Drª Lilian Guimarães, obrigada pela amizade, pela paciência, pela troca de experiência, pela torcida e pelos momentos felizes que passamos juntos.

A Drª Regiane Maria Tironi, por ser essa pessoa incrível, pela disponibilidade de me auxiliar com a identificação dos mosquitos, pelos ensinamentos e principalmente por me fazer descobrir uma paixão pela entomologia, em especial pelos mosquitos. Obrigada pela oportunidade de poder trabalhar com você, eu sou muito grata por todo conhecimento que compartilhou comigo durante esse um ano que passamos juntas.

A Drª Rosa Maria Tubaki, por me receber de braços abertos em seu laboratório e me permitir aprender sobre o mundo da entomologia.

A Ms. Fabiana Santos, pelo auxílio no trabalho de campo e identificação dos mosquitos.

A Drª Maria Anice Mureb Sallum, pela troca de experiência e pela disponibilidade de ajudar quando as coisas começaram a sair do eixo.

Ao Dr. Mauro Toledo Marrelli, por me receber de braços abertos no seu laboratório e por toda contribuição nesse trabalho.

Ao Dr. Lincoln Suesdek e ao Dr. André Barretto Bruno Wilke, pelos ensinamentos compartilhados com a morfometria alar.

A Dr. Laura Multini e a Ms. Ana Letícia Sousa, pela ajuda e conhecimento compartilhado com as asas dos mosquitos.

A banca de qualificação, Profª. Drª Tamara Lima Camara e ao Dr. Luis Filipe Mucci, pelas críticas e contribuições no momento crucial do trabalho.

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo, pelo apoio ao projeto permitindo a coleta dos mosquitos, pois sem esse apoio nada disso seria possível.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo concedida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da complementação de bolsa no segundo ano do mestrado.

As minhas amigas, Pollyana, Ednéia, Juliane, Elisa, Raquel e Anna Kalinny por todas as orações, apoio, torcida e incentivo, sempre.

A todos que contribuíram de alguma maneira para realização desse sonho.

Meu Muito Obrigada!

Este trabalho contou com o apoio financeiro da FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2017/23407-0) e da CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Processo no. 88882.376667/2019-01).

"A primeira lei da natureza é a tolerância, já que temos todos uma porção de erros e fraquezas"

Voltaire

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 12

LISTA DE GRÁFICOS 13

LISTA DE TABELAS 14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 15

RESUMO 16

ABSTRACT 17

1. INTRODUÇÃO 18

1.1 Malária Aviária 18

1.1.1 Histórico 18

1.1.2 Taxonomia e Morfologia 20

1.1.3 Ciclo de vida de *Plasmodium* e *Haemoproteus* 22

1.2 Família Culicidae 24

1.2.1 Gênero *Culex* Subgênero *Culex* LINNAEUS, 1758 27

1.2.2 Classificação Morfológica 32

1.2.3 Morfometria geométrica aplicada no estudo de asas 33

1.2.4. Identificação de espécies baseada em sequências do DNA mitocondrial 35

2. OBJETIVOS 39

2.1 Objetivo geral 39

2.2 Objetivos específicos 39

3. MATERIAL E MÉTODOS 40

3.1 Locais de estudo e coleta de amostras 40

3.1.1 Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) 41

3.1.2 Parques Municipais de São Paulo 45

3.1.3 Patagônia 46

3.2 Extração de gDNA dos mosquitos e detecção de *Plasmodium* 47

3.3 PCR para detecção de *Plasmodium* 48

3.4 Extração de gDNA dos mosquitos ingurgitados e identificação da fonte de repasto sanguíneo 49

3.5 DNA *barcoding* 49

3.6 Morfometria geométrica alar 50

3.6.1 Montagem das lâminas e aquisição dos dados 50

3.6.2 Analises dos dados 52

3.7 Aspectos éticos 53

4. RESULTADOS 54

4.1 Levantamento de Culicidae no Parque Zoológico de São Paulo 54

4.2 Características da paisagem e a biodiversidade de mosquitos 57

4.3 Detecção de *Plasmodium* em mosquitos do gênero *Culex* 58

4.4 Detecção de *Plasmodium* e *Haemoproteus* nas demais espécies de Culicidae coletados na FPZSP 60

4.5 Identificação de repasto sanguíneo 63

4.6 Morfometria Geométrica Alar 65

4.6.1 Variável Canônica 65

4.6.2 Árvore fenética 66

4.6.3 Teste de reclassificação cruzada 68

5. DISCUSSÃO 70

5.1 Detecção de *Plasmodium* e *Haemoproteus* em mosquitos da família Culicidae no Zoológico de SP 70

5.2 Identificação de repasto sanguíneo 73

5.3 Morfometria geométrica alar de *Culex* 74

6. CONCLUSÕES 78

REFERÊNCIAS 79

APÊNDICE A - Artigo publicado na revista Insects. “Wing Geometric Morphometrics as a Tool for the Identification of *Culex* Subgenus Mosquitoes of *Culex* (Diptera: Culicidae)”. Simões et al., 2020. 91

APÊNDICE B - Artigo publicado na revista Insects. “Assessing Diversity, *Plasmodium* Infection and Blood Meal Sources in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from a Brazilian Zoological Park with Avian Malaria Transmission”. Guimarães et al., 2021. 92

ANEXO A – Parecer Comitê de Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical (CEP/371A). 93

ANEXO B – Autorização para atividades com finalidade científica. SISBIO 34605 ... 94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida de *Plasmodium* spp que infectam aves..... 23
Figura 2- Ciclo de vida de *Haemoproteus* spp 24
Figura 3- Diferentes estádios do ciclo gonotrófico de uma fêmea de *Aedes aegypti*.... 26
Figura 4- Ciclo de vida de *Culex* sp. 28
Figura 5-Enquadramento geográfico dos locais de coleta de amostras..... 40
Figura 6- Enquadramento geográfico dos locais de coleta de amostras na FPZSP..... 41
Figura 7- Locais de estudo no Zoológico de São Paulo.....42
Figura 8- Fluxograma do estudo..... 47
Figura 9- Foto da asa direita digitalizada de Culex sp. mostrando os 18 pontos de encontro das nervuras, utilizados na análise da morfometria geométrica alar. Software tpsDig 52
Figura 10- Frequência de *Culex* (a) e *Aedes* (b) coletados em áreas de edificação no Zoológico de São Paulo..... 58
Figura 11- Espaço Morfológico produzido pelas duas primeiras variáveis canônicas para espécies de *Culex* baseado em 18 marcos anatômicos de asa. 66
Figura 12- Árvore fenética construída pelo método de Neighbor-Joining baseado na distância de Mahalanobis com *bootstrap* de 1000 repetições.....67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Curva de acumulação de espécies de Culicidae por local de coleta no zoológico de São Paulo. 54
Gráfico 2- Ocorrência dos gêneros de mosquitos da família Culicidae coletados na FPZSP 55
Gráfico 3- Riqueza de gêneros de Culicidae coletados na FPZSP por ponto de coleta. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número de espécimes das 11 espécies de mosquitos, local e ano das coletas 51
Tabela 2 - Métricas da paisagem para cada local de coleta dos mosquitos no Zoológico de São Paulo. 57
Tabela 3 - Informações sobre nº de mosquitos do gênero *Culex* subgênero *Culex* coletado e analisados da FPZSP..... 59
Tabela 4- Informações sobre as demais espécies de mosquitos da família Culicidae coletadas na FPZSP. 61
Tabela 5 - Dados das amostras positivas para hemosporídeos nos mosquitos coletados na FPZSP.....62
Tabela 6- Fonte de repasto sanguíneo identificadas nas fêmeas ingurgitadas.....64
Tabela 7- Resultados de testes de reclassificação cruzada de espécies em pares (%).....69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA	Bosque das Aves
FM	Recinto dos Flamingos
EX	Recinto Extra
R113	Recinto 113
R61	Recinto 61
R69	Recinto 69
LG70	Lago 70
PO	Ponte
Cytb	Citocromo b
COI	Citocromo c oxidase 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
MalAvi	*Avian Malaria Initiative*
CVA	Análise Variável Canônica
WGM	Morfometria geométrica alar
An.	*Anopheles*
Cx.	*Culex*
Ae.	*Aedes*
Ma.	*Mansonia*

RESUMO

Simões RF. *Mosquitos (Diptera, Culicidae) em área de transmissão de malária aviária: identificação de potenciais vetores de hemosporídeos do gênero* Culex [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Parasitas da malária aviária são parasitas disseminados, transmitidos por insetos Culicidae pertencentes a diferentes gêneros. Embora vários estudos tenham sido realizados recentemente, ainda faltam informações sobre os potenciais vetores de *Plasmodium*, principalmente nas regiões Neotropicais. Estudos anteriores com animais de vida livre e cativos no Zoológico de São Paulo mostraram a presença de várias espécies de *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Em 2015, um estudo piloto foi realizado no zoológico para coletar mosquitos a fim de descobrir (i) quais espécies de Culicidae estão presentes na área de estudo, (ii) quais são suas fontes de alimentação de sangue, e (iii) quais espécies podem ser vetores potenciais para *Plasmodium*. Ao mesmo tempo, considerando que *Culex* é o maior subgênero dentro do gênero *Culex* com importantes vetores de doenças e que a correta identificação de mosquitos é fundamental para estratégias de controle eficazes, um método alternativo de identificação foi testado. Assim, os mosquitos foram identificados morfologicamente, molecularmente e por morfometria geométrica de asas (WGM). A fonte de repasto sanguíneo e o DNA de parasitas hemosporídeos foram identificados usando protocolos moleculares. Um total de 25 espécies de Culicidae foi identificado, com seis positivas para DNA de *Plasmodium* ou *Haemoproteus*. Dez espécies de mosquitos tiveram sua fonte de alimentação de sangue identificada, principalmente aves, incluindo algumas espécies que foram positivas para hemosporídeos no estudo anterior mencionado. O WGM foi usado para onze espécies de *Culex* de São Paulo, Brasil, e uma de Esquel, Argentina. A análise de variável canônica (CVA) foi realizada e uma árvore de *neighbor-joining* (NJ) foi construída para ilustrar os padrões de segregação de espécies. Um teste de reclassificação com validação cruzada também foi realizado. De 110 comparações no teste de reclassificação com validação cruzada, 87 produziram valores superiores a 70%, com 13 comparações gerando pontuações de reclassificação de 100%. *Culex quinquefasciatus* apresentou os maiores escores de reclassificação entre as espécies analisadas, corroborando com os resultados obtidos pela CVA, onde *Cx. quinquefasciatus* foi a espécie mais distinta. Os altos valores obtidos no teste de reclassificação com validação cruzada e na análise de NJ, bem como a segregação observada na CVA, possibilitaram distinguir entre espécies de *Culex* com alto grau de confiança, sugerindo que WGM é uma ferramenta confiável para identificar essas espécies. Além disso, este estudo nos permitiu expandir a lista de vetores potenciais de parasitas da malária aviária e melhorar nosso conhecimento sobre as relações evolutivas e ecológicas entre as comunidades altamente diversas de pássaros, parasitas e vetores presentes no Zoológico de São Paulo.

Descritores: Malária; *Plasmodium;* Hemosporídeos aviários; *Culex;* Morfometria geométrica alar.

ABSTRACT

Simões RF. *Mosquitoes (Diptera, Culicidae) in avian malaria transmission area: identification of potential vector species of* Culex *genus* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Avian malaria parasites are widespread parasites transmitted by Culicidae insects belonging to different genera. Even though several studies have been conducted recently, there is still a lack of information about potential vectors of *Plasmodium* parasites, especially in Neotropical regions. Former studies with free-living and captive animals in São Paulo Zoo showed the presence of several *Plasmodium* and *Haemoproteus* species. In 2015, a pilot study was conducted at the zoo to collect mosquitoes in order to find out (i) which species of Culicidae are present in the study area, (ii) what are their blood meal sources, and (iii) to which *Plasmodium* species might they be potential vectors. At the same time, considering that *Culex* is the largest subgenus within the genus *Culex* with important vectors of diseases and that the correct identification of mosquitoes is critical for effective control strategies, an alternative identification method was tested. Thus, mosquitoes were identified morphologically, molecularly and by wing geometric morphometrics (WGM). Blood meal source and haemosporidian DNA were identified using molecular protocols. A total of 25 Culicidae species were identified, and six of them were positive for *Plasmodium/Haemoproteus* DNA. Ten mosquito species had their source of blood meal identified, which were mainly birds, including some species that were positive for haemosporidian parasites in the former study mentioned. WGM was used for eleven *Culex* species from São Paulo, Brazil, and one from Esquel, Argentina. The canonical variate analysis (CVA) was performed and a Neighbor-joining (NJ) tree was constructed to illustrate the patterns of species segregation. A cross-validated reclassification test was also carried out. From 110 comparisons in the cross-validated reclassification test, 87 yielded values higher than 70%, with 13 comparisons yielding 100% reclassification scores. *Culex quinquefasciatus* yielded the highest reclassification scores among the analyzed species, corroborating with the results obtained by the CVA, in which *Cx. quinquefasciatus* was the most distinct species. The high values obtained at the cross-validated reclassification test and in the NJ analysis as well as the segregation observed at the CVA made it possible to distinguish among *Culex* species with high degrees of confidence, suggesting that WGM is a reliable tool to identify *Culex* species of the subgenus *Culex*. Moreover, this study allowed us to expand the list of potential vectors of avian malaria parasites and to improve our knowledge of the evolutionary and ecological relationships between the highly diverse communities of birds, parasites, and vectors present at São Paulo Zoo.

Descriptors: Malária; *Plasmodium*; Avian haemosporidian parasites; *Culex;* Wing geometric morphometrics.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária Aviária

1.1.1 Histórico

A malária aviária é uma doença infecciosa causada por hematozoários transmitidos por mosquitos hematófagos, que acomete aves de vida livre e de cativeiro de diversas espécies. Essa doença desempenha um papel importante como fator limitante na distribuição e abundância de aves florestais nativas (Rueda, 2008). Pesquisas experimentais com hematozoários de aves passaram a ter relevância após a descoberta da similaridade entre esses parasitas e os da malária humana.

Em 1885, o zoologista russo Vassily Danilewsky descobriu parasitas intraeritrocíticos no sangue de anfíbios, aves e répteis, descrevendo em detalhes a morfologia das diferentes formas observadas (Danilewsky, 1886). Ainda nesse estudo ele observou que os parasitas das aves eram diferentes dos animais de sangue frio e que eram muito parecidos com os parasitas da malária descritos por Charles Louis Alphonse Laveran, cinco anos antes da sua descoberta. Ainda em sua pesquisa com aves infectadas, Danilewsky observou que elas desenvolviam sintomas clínicos como anemia aguda, hepatomegalia, baço e acúmulo de pigmento (Danilewsky, 1886).

Graczyk et al. (1995) e Harr (2006) também observaram alterações laboratoriais tais como anemia hemolítica, leucocitose, hemoglobinúria e modificações na bioquímica sérica (proteínas e suas frações e enzimas hepáticas).Hoje já se sabe que a infecção por *Plasmodium* em aves pode ocasionar óbito (Valkiūnas et al., 2005; Atkinson, 2008;Vanstreels, 2014).

Danilewsky ainda foi o responsável por descrever as principais características do grupo Haemosporida e pela identificação dos três principais gêneros de parasitas intraeritrocíticos em aves (hoje conhecidos como *Plasmodium, Haemoproteus e Leucocytozoon*) (Cox, 2010; Sá, 2011). Em 1890, o bacteriologista alemão Walther Krause (1864-1943), dando seguimento aos achados de Danilewsky, descreveu três novas espécies do gênero *Haemoproteus*: *H. danilewskii, H. columbae e H. passeris.* Os parasitos do gênero *Haemoproteus* são transmitidos por dípteros das famílias Hippoboscidae e Ceratopogonidae (Atkinson e Van Riper, 1991).

Já o pesquisador e médico inglês Ronald Ross em 1898 desvendou o ciclo do parasita da malária aviária, *Proteosoma relictum (Plasmodium relictum),* em mosquitos do gênero *Culex,* além de também comprovar que a fase sexuada do parasita ocorria no sistema digestivo do mosquito e que a transmissão ocorria pela picada de fêmeas adultas (Sá, 2011).

Desde então esses parasitos vêm sendo estudados porque os membros do gênero *Plasmodium* têm graves impactos sobre a saúde humana e de animais selvagens especialmente em países tropicais, onde causam a malária (Van Riper III et al., 1986; Breman, 2001; Valkiūnas et al., 2005; Snow et al., 2005). Os parasitos do gênero *Plasmodium* são transmitidos por mosquitos da família Culicidae, sendo o gênero *Anopheles* o vetor responsável pela malária humana e os gêneros *Culex*, *Mansonia*, *Culiseta* e *Aedeomyia* considerados vetores competentes assim como *Aedes*, *Anopheles* e *Armigeres* com capacidade vetorial para transmissão do parasita para aves (Valkiūnas 2005; Atkinson 2008; Forrester e Greiner, 2008).

Em 1944, Paraense já testava a capacidade vetora de *Culex quinquefasciatus* para o *Plasmodium juxtanucleare,* identificado e caracterizado primeiramente no estado de Minas Gerais, no Brasil (Paraense, 1944). Posteriormente, Christensen et al. (1983) examinaram 124 mosquitos de *Cx. pipiens* e 61 mosquitos de *Cx. tarsalis,* conseguindo recuperar 98% de oocistos e/ou esporozoítos e 68% respectivamente para as duas espécies de *Culex*. Os esporozoítos invadiram as glândulas salivares primeiro no *Cx. tarsalis* (6 dias) quando comparado a *Cx. pipiens* (7 dias). Ambas as espécies foram capazes de transmitir o *Plasmodium kempi* de forma natural. Bueno et al. (2010) relatam a presença de *Plasmodium relictum* em pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no zoológico de São Paulo, onde foi encontrada um espécime de *Culex* sp. infectado. Chagas et al. também relataram a presença de *Plasmodium (Novyella) nucleophilum* em um ganso do Egito (*Alopochen aegyptiacus*) no mesmo parque. Nos dois estudos os espécimes vieram a óbito. *Cx. quinquefasciatus,* também foi o maior responsável pela infecção de *P. relictum* de aves, em um arquipélago no Havaí, reduzindo o número de indivíduos no local (Van Riper III et al.1986; Van Riper III et al. 1991).

O Brasil e a Colômbia são considerados os países da América do Sul com maiores riquezas de avifauna do planeta (Sick, 1997; Remsen et al., 2015), sendo estimadas mais de 1900 espécies segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2018). No Brasil, as aves estão principalmente distribuídas em diferentes biomas: Cerrado,

Amazônia, Pampa, Mata Atlântica e Caatinga (Silvia et al., 2005). Essa alta diversidade nos faz refletir sobre a necessidade de melhor conhecer a ecologia dessas espécies, além dos fatores que influenciam na dinâmica de transmissão dos parasitos, pois uma vez que a ave se infecta, mantém o parasito por muitos anos ou pela vida toda, atuando como fonte de infecção para os vetores (Valkiunas, 2005).

1.1.2 Taxonomia e Morfologia

Os plasmódios aviários possuem cinco subgêneros que foram divididos com base na morfologia e biologia dos estágios eritrocíticos e exo-eritrocítico e são taxonomicamente classificados na seguinte forma segundo (Valkiunas, 2005):

Reino Protista (Haeckel,1899)

Filo Apicomplexa (Levine, 1970)

Ordem Haemosporida (Danilewsky, 1885)

Família Plasmodiidae (Mesnil, 1903)

Gênero *Plasmodium* (Marchiafava; Celli, 1885)

Subgênero *Haemamoeba* (Grassi; Feletti, 1890): *Plasmodium relictum* (Grassi; Feletti,1891), *Plasmodium cathemerium* (Hartman, 1927), *Plasmodium gallinaceum* (Brumpt, 1935), *Plasmodium matutinum* (Huff, 1937), *Plasmodium lutzi* (Lucena, 1939), *Plasmodium giovannolai* (Corradetti; Verolini; Neri, 1963), *Plasmodium griffihsi* (Garnham, 1966), *Plasmodium tejerai* (Gabaldon; Ulloa, 1977), *Plasmodium coturnixi* (Bano; Abbasi, 1983), *Plasmodium subpraecox* (Grassi; Felletti, 1892)

Subgênero *Giovannolaia* (Corradetti, Garnham; Laird, 1963): *Plasmodium leanucleus* (Huang, 1930), *Plasmodium fallax* (Schwetz, 1930), *Plasmodium circumflexum* (Kikuth,1931), *Plasmodium polare* (Manwell, 1934), *Plasmodium lophurae* (Coggeshall, 1938), *Plasmodium durae* (Herman, 1941), *Plasmodium pedioecetae* (Shilinger, 1942), *Plasmodium pionottii* (Muniz; Soares, 1954), *Plasmodium formosanum* (Manwell, 1962), *Plasmodium gundersi* (Bray, 1962), *Plasmodium anasum* (Manwell; Kuntz, 1965), *Plasmodium garnhami* (Guingy;

Hoogtrall; Mohammed, 1965), *Plasmodium hegneri* (Manwell; Kuntz, 1966), *Plasmodium octamerium* (Manwell, 1968)

Subgênero *Novyella* (Corradetti; Garnham; Laird, 1963): *Plasmodium vaughani* (Novy; MacNeal, 1904), *Plasmodium columbae* (Carini, 1912), *Plasmodium rouxi* (Sergent; Sergent; Catanei, 1928), *Plasmodium hexamerium* (Huff, 1935), *Plasmodium nucleophilum* (Manwell, 1935), *Plasmodium paranucleophilum* (Manwell; Sessler, 1971), *Plasmodium dissanaike* (Jong, 1971), *Plasmodium bertii* (Gabaldon; Ulloa, 1981), *Plasmodium Kempi* (Christensen; Barnes; Rowley, 1983)

Subgênero *Huffia* (Corradetti; Garnham; Laird, 1963): *Plasmodium elongatum* (Huff, 1930), *Plasmodium huffi* (Muniz; Soares; Batista, 1951), *Plasmodium hermani* (Telford; Forrester, 1975)

Subgênero *Bennettini* (Valkiunas, 1997): *Plasmodium juxtanucleare* (Versiani; Gomes, 1941)

O subgênero *Haemamoeba* tem sido o mais estudado. As espécies desse grupo são caracterizadas por apresentarem esquizontes eritrocíticos grandes e arredondados, gametócitos arredondados e merogonia exo-eritrocítica no sistema fagocítico mononuclear (Garnham, 1966).

O subgênero *Giovannolaia* é caracterizado por apresentar parasitos com esquizontes eritrocíticos de tamanho moderado a grande, geralmente encontrado em eritrócitos imaturos. Uma característica importante desses parasitos são os gametócitos de forma alongada, permitindo a diferenciação entre os subgêneros *Giovannolaia* e *Haemamoeba* (Garnham, 1966, Van Ripper III et al., 1994).

O subgênero *Novyella* é considerado o mais evoluído, pois houve uma adaptação do parasito em relação aos hospedeiros vertebrados e invertebrados reduzindo o seu tamanho e o número de merozoítos, além de distorção da célula hospedeira. Esse grupo é caracterizado por apresentar merontes pequenos com pouco citoplasma, com no máximo oito merozoítos e gametócitos alongados e os estágios assexuados possuem pouco citoplasma (Bennet. 1970; Garnham, 1966; Van Ripper III et al., 1994).

O subgênero *Huffia* é caracterizado por apresentar esquizontes eritrocíticos relativamente pequenos, com dez ou menos merozoítos. Os gametócitos são alongados e

a merogonia exo-eritrocítica profusa e contínua nas células do sistema hematopoiético, principalmente nas células precursoras dos eritrócitos (Garnham, 1966; Van Ripper III et al., 1994).

O subgênero *Bennettinié* caracterizado por apresentar merontes pequenos, arredondados com pouco citoplasma, de dois a seis merozoítos, ocupando a posição próxima ao núcleo do eritrócito. Já os gametócitos têm formas variáveis, podendo ser ovalados ou alongados (Van Ripper III et al., 1994; Valkiunas,1997).

1.1.3 Ciclo de vida de *Plasmodium* e *Haemoproteus*

O ciclo de vida dos hemosporídeos é obrigatoriamente heteróxeno, sendo composto por um hospedeiro vertebrado (as aves) e um hospedeiro invertebrado (fêmeas de dípteros hematófagos) (Valkiunas, 2005).

O ciclo do *Plasmodium* (Figura 1) se inicia quando fêmeas de dípteros hematófagos da família Culicidae se alimentam de uma ave infectada e ingerem formas sexuadas denominadas gametócitos, dando início ao processo de gametogênese. Esse processo forma os oocinetos que assumem uma forma arredondada e se transformam em oocistos no intestino médio do vetor. Esse processo de transformação do oocisto é chamado de esporogonia. Após a esporogonia, os esporozoítos desenvolvidos nos oocistos são liberados na cavidade celomática em direção às glândulas salivares do vetor. Os esporozoítos são as formas infectantes para as aves e são injetados no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo.

Os esporozoítos podem penetrar ou serem fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), originando nestas células, por meio de esquizogonia, a primeira geração de merozoítos. Os merozoítos ganham a circulação sanguínea, e atingem novas células endoteliais e mononucleares fagocíticas como, pulmão, baço, fígado e medula óssea e outros órgãos. Por meio de esquizogonias dão origem a novos merozoítos que penetram nas hemácias maduras e imaturas, dando início ao ciclo eritrocítico. Essa fase é possível ser observada em exames de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, com o auxílio de um microscópio óptico no aumento de 1000X. Essa fase éimportante para fazer a diferenciação taxonômica entre as espécies. A característica mais importante que se irá observar é a quantidade de merozoítos presentes nos merontes eritrocitários e, através de uma chave taxonômica, será possível a identificação morfológica das espécies. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, alguns trofozoítos se diferenciam e

originam as formas eritrocíticas sexuadas – os gametócitos masculinos e femininos que serão ingeridos pelo vetor (Valkiunas, 2005).

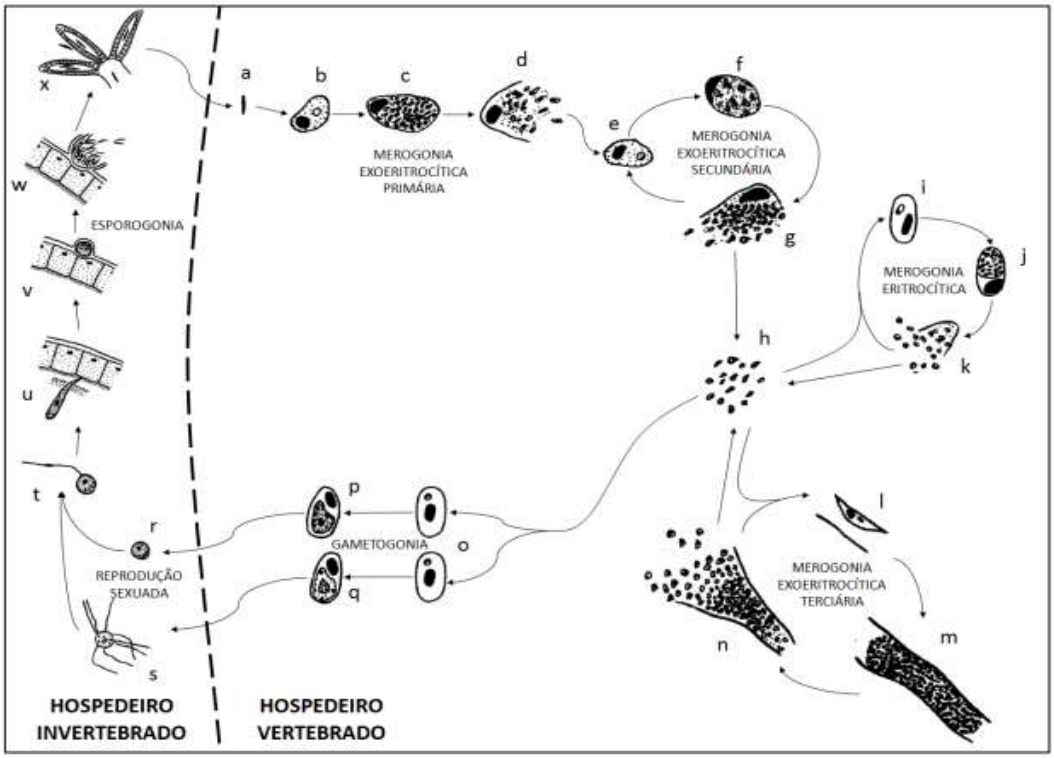


Figura 1- Ciclo de vida de *Plasmodium* spp que infectam aves, sendo o ciclo no hospedeiro invertebrado representado no lado esquerdo e o ciclo no hospedeiro vertebrado no lado direito da figura. FONTE: Valkiunas, 2005.

Legenda: (a) esporozoíto, (b) criptozoíto jovem, (c) criptozoíto maduro, (d) criptozoíto rompe-se liberando merozoítos, (e) metacriptozoíto jovem, (f) metacriptozoíto maduro, (g) metacriptozoíto rompe-se liberando merozoítos, (h) merozoítos, (i) trofozoítos, (j) meronte eritrocítico, (k) meronte eritrocítico rompe-se liberando merozoítos, (l) fanerozoíto jovem, (m) fanerozoíto maduro, (n) fanerozoíto rompe-se liberando merozoítos, (o) trofozoítos, (p) macrogametócito, (q) microgametócito, (r) macrogameta, (s) microgameta exflagelado, (t) zigoto móvel ou oocineto, (u) invade lâmina basal, (v) oocisto, (w) oocisto maduro liberando esporozoítos, (x) esporozoítos instalam-se nas glândulas salivares.

O ciclo de vida de *Haemoproteus* (Figura 2) é semelhante ao de *Plasmodium.* A principal diferença é que apenas *Plasmodium* realiza a merogonia eritrocítica. Em *Haemoproteus* a reprodução assexuada ocorre nas células endoteliais e mononucleares fagocíticas, e não nos eritrócitos. Além disso, o subgênero *Haemoproteus* é transmitido por moscas da Família *Hippoboscidae* (Diptera), tais como: *Pseudolynchia, Ornithomyia, Stilbometopa, Lynchia e Mycolynchia*. O subgênero *Parahaemoproteus* é veiculado por “mosquitos-

pólvora" (*Culicoides*) pertencentes à Família Ceratopogonidae (Diptera) (Valkiunas, 2005).

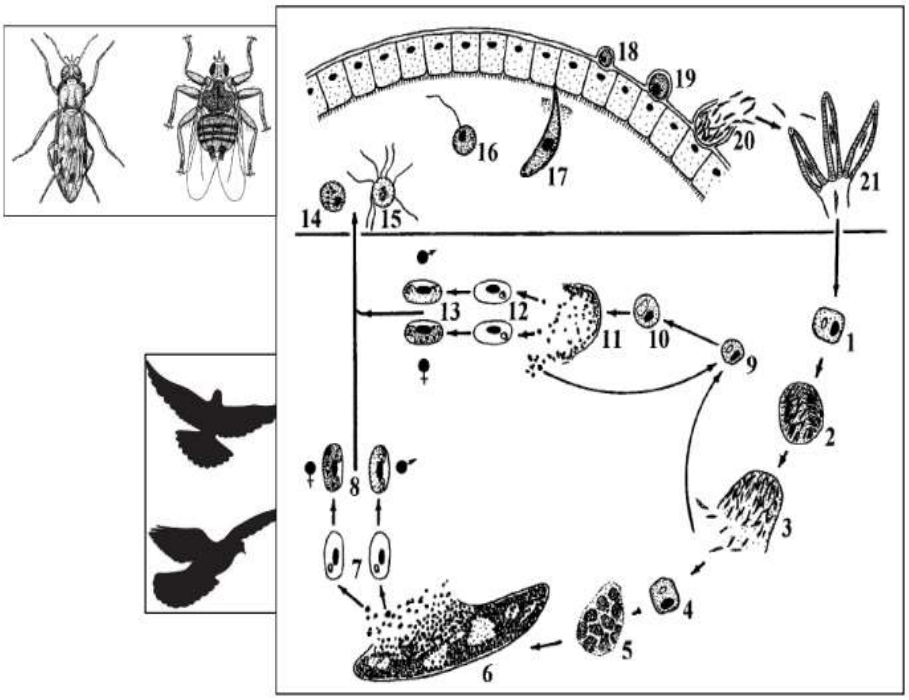


Figura 2- Ciclo de vida de *Haemoproteus* spp. FONTE: Adaptado de Valkiunas, 2005.

Legenda: Ave: 1-13; Vetor: 14-21; 1 – esporozoítos na célula endotelial; 2; 3 – merontes exoeritrocíticos de primeira geração com merozoítos alongados; 4 – merozoítos na célula endotelial; 5, 6 – megalomerontes nas células musculares esqueléticas; 12 – merozoítos em eritrócitos; 13 – gametócitos maduros; 14 – macrogametócito; 15 – exflagelação do microgametócito; 16 – fertilização do macrogametócito; 17 – oocineto penetrando na membrana peritrófica; 18 – oocisto jovem; 19, 20 – esporogonia; 21 – esporozoítos na glândula salivar do vetor (adaptado de Valkiunas, 2005).

1.2. Família Culicidae

A família Culicidae (Meigen 1818) é representada por um grupo amplo e abundante de insetos dípteros comumente conhecidos por mosquitos, muriçocas, carapanãs ou pernilongos. São inseridos na ordem Diptera, subordem Nematocera, que é diferenciada dos demais dípteros por possuírem escamas que recobrem as veias alares (Forattini, 2002; Neves et al., 2011). São insetos de pequeno porte, corpo delgado e pernas longas. A grande maioria das fêmeas são hematófagas, enquanto as formas imaturas são aquáticas, ou seja, o desenvolvimento pós-embrionário se faz por holometabolia, que implica em metamorfose completa (Papavero e Guimarães 2000).

O local onde ocorre a oviposição e o desenvolvimento até a forma adulta recebe o nome de criadouro ou foco, podendo ser natural ou artificial. Na maioria das espécies, os mosquitos copulam logo após emergirem. Normalmente a união sexual ocorre durante o voo, bastando uma única inseminação dos machos nas fêmeas para elas fertilizarem toda a sua postura por toda sua vida. As fêmeas respondem a vários estímulos quando estão à procura de alimento, reagindo à luz, umidade, odor e calor, mostrando uma capacidade discriminatória na procura de um hospedeiro conveniente (Gouveia De Almeida, 2011).

Após o repasto sanguíneo o abdômen ganha um aspecto dilatado e cor avermelhada. Durante a digestão do sangue ingerido o abdômen vai ganhando um avermelhado mais escuro. Quando o sangue foi completamente digerido, a fêmea encontra-se grávida e, geralmente, pronta para ovipor. Esse ciclo é conhecido como gonotrófico e completa-se em 48h em mosquitos do gênero *Aedes*, e em mosquitos do gênero *Culex* o tempo estimado é de uma semana (Forattini, 2002). Assim, a oviposição e a procura da fonte alimentar para o repasto sanguíneo seguinte se repetem a cada 2-3 dias (Figura 3) (Lima-Camara et al., 2007; Service, 2012; Santos et al., 2019). Nesse período as fêmeas ingurgitadas precisam encontrar abrigos para realizar a digestão e esses abrigos são chamados pré-prandiais (Forattini, 2002). Desde os primórdios os mosquitos vêm sendo apontados como importantes na transmissão de agentes etiológicos de doenças que afetam o homem e/ou outros animais (Forattini, 2002). Sendo assim a família Culicidae ganha um espaço maior na pesquisa entomológica pelo fato de transmitir doenças que causam altas taxas de mortalidade e morbilidade (Becker et al., 2010).

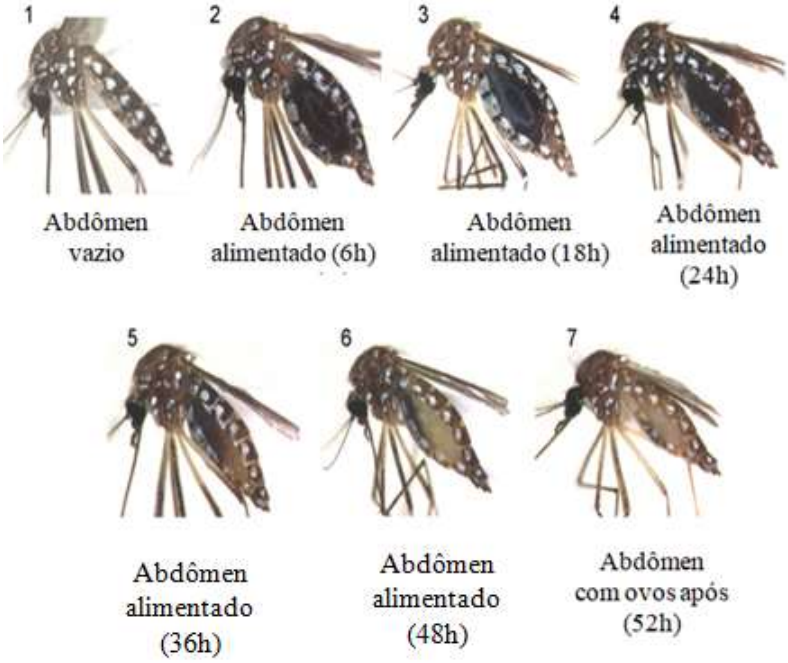


Figura 3- Diferentes estadios do ciclo gonotrófico de uma fêmea de *Aedes aegypti*. FONTE: Adaptado de Santos et al., 2019.

A família Culicidae (Meigen, 1818) apresenta 3.565 espécies, sendo encontrada em quase todas as regiões do mundo, exceto aquelas que são permanentemente congeladas (Rueda, 2008; Harbach, 2019). Ela é dividida em 110 gêneros, compondo 11 tribos, agrupadas em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae (Forattini 2002; Harbach 2019).

A primeira é composta pelos anofelinos, principais vetores de *Plasmodium* que infectam humanos no mundo. As principais características morfológicas das fêmeas dessa subfamília são: palpos de comprimento semelhante ao da probóscide, margem posterior do escutelo arredondada (exceto no gênero *Chagasia*) e primeiro tergito abdominal sem escamas. Já as larvas não possuem sifão respiratório. A subfamília Anophelinae reúne três gêneros: *Anopheles*, cosmopolita, *Chagasia*, restrito à região neotropical e *Bironella*, existente apenas na região australiana (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Rueda, 2008; Harbach, 2009).

A segunda inclui os culicíneos, vetores responsáveis pela transmissão de muitos agentes patogênicos como dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), filárias,

vírus da febre amarela, chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV), assim como mais de 150 arbovírus (Luz e Lourenço-de-Oliveira, 1996). As fêmeas dessa subfamília se diferem da anterior por terem palpos muito mais curtos que a probóscide, margem posterior do escutelo sempre trilobada e o primeiro tergito abdominal com escamas. Já as larvas possuem um sifão respiratório que lhes permite suspender na superfície da água, posicionadas para baixo. Dentro da tribo Culicini existem 795 espécies distribuídas em quatro gêneros: *Culex* Linnaeus, 1758; *Deinocerites* Theobald, 1901, *Galindomyia* e *Lutzia*. *Culex* se destaca por ser o maior gênero, com 770 espécies, dividido em 26 subgêneros (Harbach, 2019).

1.2.1 Gênero *Culex* Subgênero *Culex* LINNAEUS, 1758

Normalmente, os indivíduos deste subgênero têm porte médio, coloração do corpo marrom escuro ou claro, sem brilho metálico e asas com escamas escuras em sua totalidade. Considerando que esse gênero possui o maior número de espécies reunidas, não há uma característica muito marcante na morfologia das fêmeas, tornando muito difícil a identificação sem a genitália masculina (Forattini, 2002).

Os indivíduos são geralmente noturnos e a maioria das espécies brasileiras é ornitofílica, embora também se alimentem do sangue de mamíferos, inclusive do homem. Usam criadouros muitos diversificados como poças de água, valas, esgotos, tanques, bromélias epífitas, piscinas temporárias etc., mostrando não serem muito exigentes quanto à água utilizada para oviposição (Forattini, 2002). Dessa forma, os ovos são depositados na superfície da água (com exceção de algumas espécies de *Cx.* do subgênero *Melanoconion*) têm aspecto de jangada (Figura 4). O ciclo biológico tem duração de aproximadamente 15 dias, quando em condições ambientais favoráveis com elevada temperatura e umidade, além das características relacionadas com a presença de matéria orgânica em decomposição e detritos nos criadouros (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Brito, 2003).

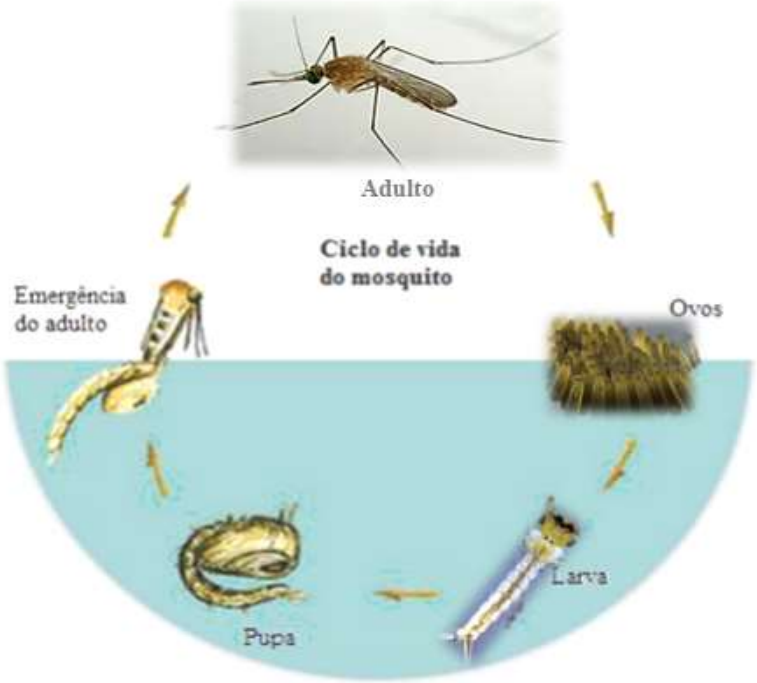


Figura 4- Ciclo de vida de *Culex* sp. FONTE: Adaptado de http://winnipeg.ca/publicworks/bugline/mosquitoes/mosquito_information.stm. Acessado em abril de 2020.

Nas Américas, *Culex* é dividido em 14 subgêneros: *Culex* Linnaeus, 1758; *Lutzia* Theobald, 1903; *Melanoconion* Theobald, 1903; *Aedinus* Lutz, 1904; *Carrollia* Lutz, 1905; *Neoculex* Dyar, 1905; *Micraedes* Coquillet, 1906; *Tinolestes* Coquillett, 1906; *Microculex* Theobald, 1907; *Anoedioporpa* Dyar, 1923; *Allimanta* Casal e Garcia, 1968; *Belkinomyia* Adames e Galindo, 1973; *Phenacomyia* Harbach e Peyton, 1992 e *Nicaromyia* Broche e Rodriguez, 2001 (Forattini, 2002).

A taxonomia e sistemática do subgênero *Culex* é bastante escassa e controversa, uma vez que as relações filogenéticas são pouco compreendidas (Harbach, 2007), deixando lacunas no processo de identificação. Mosquitos desse subgênero podem constituir complexos de espécies crípticas, com destaque para dois, devido sua importância epidemiológica: o Complexo Pipiens (*Cx. quinquefasciatus* Say, *Cx. pipiens* L., *Cx. australicus* Dobrotworsky e Drummond e *Cx. pallens* Coquillett), e o Complexo Coronator (*Cx. coronator*, *Cx. ousqua*, *Cx. usquatus*, *Cx. camposi*, *Cx. usquatissimus*) (Bram, 1967; Forattini, 2002). No entanto esses dois complexos possuem limitações

quanto às características morfológicas utilizadas para identificação, elas são baseadas na comparação das estruturas da genitália dos machos, sendo as fêmeas morfologicamente indistinguíveis (Forattini, 2002).

Em um levantamento realizado por Glaizoit (2012), o Complexo Pipiens pode atuar como agente etiológico da malária aviária na Europa, Japão e América do Norte. Outras espécies do gênero *Culex* também têm sido descritas como vetores na transmissão de *Plasmodium: Cx. quinquefasciatus* no Japão, Havaí e México; *Culex restuans* na América do Norte; *Culex* seção (*Melanoconion)* no Panamá; *Culex neavei*, *Culex perfidiosus*, *Culex poicilipes e Culex guiarti* em Camarões; *Culex sitiens e Culex annulirostris* nas ilhas do sudoeste do Pacífico e por fim *Culex saltanensis* no Brasil. Esse foi encontrado naturalmente infectado na cidade do Rio de Janeiro no bairro de Jacarepaguá com *Plasmodium juxtanucleare* em granjas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Culex saltanensis (Dyar, 1928), ocorre na região Neotropical do globo e foi registrado pela primeira vez na Argentina. Já no Brasil a espécie foi encontrada pela primeira vez na cidade do Rio de Janeiro com bastante abundância entre o final da primavera e verão (Lourenço-de-Oliveira et al., 1985). Lourenço-de-Oliveira et al. (1996) ainda observaram que as fêmeas são altamente ornitofílicas. Essa espécie pode ser um potencial vetor de agentes etiológicos por ser considerado vetor primário de *P. juxtanucleare* e *P. cathemerium* em pardais (Gabaldon et al., 1988). Sibajev et al. (1993) descreveram uma nova espécie de tripanossomatídeo, *Crithidia ricardoi*, considerado um parasito exclusivo de *Cx. saltanensis*.

Cx. saltanensis foi descrito por Dyar em 1928, baseado em uma genitália masculina. Mais tarde Anduze (1943) descreveu a fêmea adulta com um tamanho médio, coloração marrom com escamas douradas e pernas marcadas com anéis brancos. Entretanto a descrição correta da espécie é um tanto confusa, pois a morfologia é semelhante à de outras espécies de *Culex*, como *Cx. coronator*, na qual só é possível a diferenciação das espécies utilizando a genitália masculina ou estágio larval. Rotraut e Oliveira (1994) afirmam que o mesômero e o escudo de *Cx. saltanensis* são mais escuros do que em *Cx. coronator*. A coloração como característica para distinguir os indivíduos é um problema, pois pode ocorrer variável entre os espécimes e em exemplares mais antigos (Laurito, 2008).

O Complexo Coronator encontra-se amplamente distribuído na região Neotropical. As fêmeas adultas que compõem esse complexo são predominantemente noturnas. Podem apresentar diferentes preferências alimentares, ingerindo sangue de grandes mamíferos ou de aves (Lane, 1953; Mackay et. al., 2010).

Alto et al. (2014) sugerem que a escolha do hospedeiro pode influenciar na biologia de *Cx. coronator,* no qual o sangue das aves fornece maior nutrição quando comparado ao sangue de mamíferos, desse modo mosquitos que se alimentam do sangue de aves tendem a ter uma maior fecundidade e podem ter efeitos diretos nos parâmetros da capacidade vetorial como sobrevivência maior de um adulto.

Pouco se sabe sobre a capacidade vetora de *Culex coronator*, entretanto o interesse epidemiológico ocorre pelo fato de *Cx. coronator* ter sido encontrado naturalmente infectado por alguns arbovírus, incluindo o Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) no Brasil e em Trinidad e Tobago o Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) no México e Vírus do Nilo Ocidental (VNO) nos Estados Unidos (CDC 2019, Unluet al., 2010). Ainda no Brasil isolaram o Vírus de Mucambo na região amazônica brasileira (Forattini, 2002, 1998).

Culex quinquefasciatus (Say, 1823) é uma das espécies do complexo *pipens* e distribui-se pelas regiões tropicais e subtropicais, são essencialmente noturnos e o seu desenvolvimento é maior em áreas urbanas carentes de saneamento básico, por concentrarem locais contendo água poluída com grande quantidade de matéria orgânica em decomposição e microrganismos, habitat ideal para o desenvolvimento das larvas (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002). A forma adulta tem hábitos sinantrópicos, entretanto alimentam–se preferencialmente do sangue de aves, que são reservatórios naturais de diversos arbovírus (Forattini, 2002). O mosquito *Cx. quinquefasciatus* é o principal vetor do agente etiológico da elefantíase, causada pelo verme nematóide *Wuchereria bancrofti* (Deane, 1951; Rachou, 1956; Forattini, 2002). *Cx. quinquefasciatus* pode transmitir também os vírus causadores de encefalite St. Louis, encefalite do Oeste do Nilo, encefalites equinas e a filariose canina (Deane, 1951; Rachou, 1956; Forattini, 2002). Consoli e Lourenço-de-Oliveira, (1994) também atribuíram a transmissão do vírus da Oropouche ao *Cx. quinquefasciatus.*

Culex nigripalpus (Theobald, 1901) é encontrado desde o Trópico de Câncer, na América do Norte, até o Trópico de Capricórnio, na América do Sul. O hábito alimentar dessa espécie é bem diversificado. Entretanto vários estudos mostraram que as aves são

a fonte mais importante para o repasto sanguíneo da espécie sendo reportada transmissão de zoonoses aviárias (Edman; Webber 1975; Guimarães et al., 1987). Na América do norte, ele é considerado um dos principais vetores enzoóticos do Vírus do Nilo Ocidental (VNO) e Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) (Nasci et al. 2001b, Mitchell et al.1980). Na América do sul, mais precisamente no Vale do Ribeira (Brasil), ele também foi considerado vetor potencial para SLEV (Forattini, 1995). Além disso, já foi isolado Vírus da Estomatite vesicular (EV) em Nova Jersey dessa espécie (Calisher *apud* Webb; Holbrook, 1988).

Culex bidens, Dyar 1922, pode ser encontrado em países como Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, México, Nicarágua, Paraguai, Uruguai e Venezuela, tem sido implicado na transmissão de arbovírus na Argentina, sendo considerado o principal vetor do vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) e em países neotropicais incluindo o Brasil (Laurito, 2015; Pisano et al., 2010; Laurito, 2018).

Bram (1967) após estudos das genitálias masculina dos espécimes verificaram que *Cx. bidens* compartilha as mesmas características taxonômicas de *Cx. declarator*. Lane (1953) descreveu as duas espécies como *Cx. virgultus.* Entretanto, Stone et al. (1956) analisaram a genitália dos espécimes e verificou que a associação foi feita indevidamente, sendo assim Belkin (1968) reconheceu que *Cx. virgultus* era de fato *Cx. bidens* tendo um nome duplo. Laurito (2018) mostrou em seus estudos que marcadores nucleares ou mitocondriais não foram capazes de diferenciar essas duas espécies. Apenas uma única característica na genitália masculina é capaz de separá-las. Com isso a autora relata a importância da identificação correta entre *Cx. bidens* e *Cx. declarator,* pois *Cx. declarator* também foi incriminado na transmissão de vários arbovírus como SLEV em países como Brasil e Colômbia. Além do vírus do Nilo Ocidental (VNO) nos Estados Unidos e o vírus do Oropouche no Brasil (Figueiredo, 2000).

Culex declarator, Dyar e Knab, é essencialmente exófilo, com preferência ornitófila (Forattini, 2002). Estudos sobre o ciclo do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) na Região Amazônica mostram *Cx. declarator* e *Cx. coronator* como vetores do vírus e aves silvestres, macacos, preguiças, tatus e marsupiais como reservatórios do vírus (Figueiredo, 2000).

Culex eduardoi (Casal e Garcia, 1968) tem distribuição geográfica no Brasil, Argentina, Costa Rica e Anguilla. Em relação à sua biologia, as variações de abundância

sazonal são descritas para formas imaturas no sul do Brasil (Costa Riveiro et al., 2002) e formas adultas em Buenos Aires (Balseiro, 1981). Ainda não se sabe a importância epidemiológica dessa espécie, no entanto, seus criadouros são frequentemente encontrados próximos a áreas urbanas (Visintin 2012).

Culex dolosus (Lych Arribálzaga, 1891) geralmente é comparado com *Cx. eduardoi* com base em características morfológicas, sendo muito semelhantes e separadas por características larvais (Rossi, 2006).

Culex chidesteri, Dyar, 1921, apresenta hábitos ecléticos, com nível acentuado de competição com *Cx. quinquefasciatus* no ambiente urbano. É considerada uma espécie vetora de alguns arbovírus que podem causar infecção ao homem e os animais domésticos (Forattini et al., 2002). A literatura também descreve a confusão morfológica entre fêmeas adultas de *Cx. chidesteri e Cx. declarator*. Todavia as larvas de *Cx. chidesteri* possuem características diferentes sendo possível a separação (Darsieet al., 2010).

1.2.2 Classificação Morfológica

A correta identificação taxonômica é um componente crucial para qualquer estudo faunístico e epidemiológico, uma vez que se torna importante para a vigilância e controle dos vetores. A identificação das espécies Culicidae é predominantemente realizada através da chave taxonômica, na qual se analisa a morfologia externa do espécime. Entretanto, esse método se torna inviável quando o exemplar se encontra danificado por algum motivo ou quando se tratam de espécies crípticas (Forattini 2002; Wilke et al., 2016). São consideradas espécies crípticas duas ou mais espécies que apresentam características morfológicas semelhantes, sendo indistinguíveis (Bickford et. al, 2006). Procedimentos taxonômicos baseados na morfologia tradicional consomem tempo e nem sempre são suficientes para a identificação do nível de espécie. Portanto, é essencial uma abordagem multidisciplinar da taxonomia, que inclua dados morfológicos, moleculares e de distribuição (Krzywinski e Besansky, 2003; Hebert et al., 2003).

A literatura sobre taxonomia e sistemática do gênero e subgênero *Culex* é escassa, todavia necessária, pois *Culex* representa um grupo de insetos de grande importância epidemiológica. Das poucas fontes encontradas destaca-se até hoje, o trabalho de Bram (1967), baseado principalmente em estruturas da genitália masculina que permite o reconhecimento da maioria das espécies em questão (Almirón et al., 1996). Apesar dessa revisão, muitas espécies são pouco conhecidas e de difícil identificação. Esses dados nos

indicam o quanto é necessário o trabalho taxonômico nesse subgênero. Alguns estudos sugerem que *Culex* pode ser um gênero polifilético (Harbach, 1998; Kichinh, 1998).

1.2.3 Morfometria geométrica aplicada no estudo de asas

A morfometria geométrica pode ser conceituada como o estudo estatístico multivariado das estruturas biológicas (Monteiro & Reis, 1999) ou também como a análise e mensuração de um componente complexo multidimensional chamado forma (Moraes, 2003). Essa ferramenta permite a comparação de padrões corporais a partir de caracteres multivariados, ou seja, considerando-se simultaneamente várias características de uma estrutura corporal complexa (Rohlf, 1993; Monteiro & Reis, 1999). Evolutivamente forma e tamanho refletem a função da estrutura, deste modo a morfometria é capaz de elucidar relações taxonômicas, populacionais, evolutivas ou de fenômenos específicos como especiação ou relações entre espécies crípticas (Moraes, 2003; Fornel, 2005).

Na entomologia as asas dos insetos são adequadas para realização de estudos morfométricos, por apresentarem características ideais como bidimensionalidade e a ampla quantidade de marcos anatômico ou *landmarks* do tipo I (encontro entre dois tecidos) possíveis de serem inseridos nas veias alares (Monteiro e Reis, 1999; Bookstein, 1991). Além disso, elas guardam informações importantes sobre questões hereditárias, geográficas e evolutivas. Nos dados coletados são utilizados os pontos anatômicos, que são referência da estrutura corporal da população estudadas. As coordenadas posicionais são tomadas sobre um plano cartesiano que recria a estrutura corporal, e a partir desses dados podem ser feitos estudos estáticos da variação morfométrica, comparar a magnitude das variações, entre outras abordagens (Bookstein, 1997; Rohf, 1993; Monteiro e Reis, 1999). O formato alar é analisado pela sobreposição de Procrustes (*partial warps*) e TPS para gerar variáveis de tamanho do centróide. Em mosquitos existe variação na quantidade de pontos marcados podendo ser de 10 a 26 dependendo do estudo dos autores (Lorenz et al., 2017).

Entretanto, nos trabalhos realizados com culicíneos, a sequência de 18 pontos tem sido mais utilizada. Embora não seja um conjunto de dados universal, tem mostrado bons resultados para identificação de espécies crípticas e/ou pertencentes ao mesmo complexo (Vidal et al., 2011; Lorenz et al., 2012, 2015; Wilke et al. 2016). Na literatura vamos encontrar vários trabalhos que empregam o uso dessa técnica para resolução de problemas

taxonômicos, sistemáticos e morfológicos, em dípteros de importância médica/veterinária, mostrando a validade da técnica Wilke et al. (2016) realizaram um estudo utilizando alguns gêneros e espécies de culicídeos no qual obteve sucesso na identificação taxonômica, Laurito et al. (2015) revelaram padrões alares diferenciados entre as espécies de *Cx. bidens* X *Cx. interfor* e *Cx. mollis* X *Cx. tatoi*. Demari-Silva et al. (2014) revelaram padrões alares distintos entre as espécies de *Cx. coronator*. Vidal et al. (2011) observaram em seus estudos a separação entre as espécies de *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* revelando que é possível a identificação das espécies apenas com os caracteres das asas. Lorenz et al. (2012) aplicaram a técnica com o objetivo da separação das espécies entre *Anopheles cruzii, An. homunculus e An. bellator*. Lebbe et al. (1991) caracterizaram trinta e duas espécies de flebotomíneos, assim como Dujardin et al. (1999) obtiveram sucesso na separação das espécies de *Psathyromya runoides* da Bolívia, entre outros trabalhos.

A morfometria também tem sido aplicada para analisar o dimorfismo sexual em dípteros. Virginio et al. (2015) realizaram uma avaliação comparativa das asas em dez espécies de culicídeos dos gêneros *Culex, Aedes, Anopheles* e *Ochlerotatus* coletados no Brasil, indicando que a expressão fenotípica da forma da asa nos mosquitos é realmente específica para o sexo. Christe et al. (2016) encontraram resultados semelhantes em analises com a espécie *Aedes fluviatilis.* Devicari et al. (2011) também obtiveram resultados satisfatório com 100% de acurácia em exemplares de *Aedes scapularis* coletados na cidade de São Paulo e Pariquera-Açu (Estado de São Paulo).

A principal vantagem dessa técnica, em diferenciar as espécies, é rapidez com que os dados são coletados, além do baixo custo, podendo ser útil na ausência de um laboratório molecular em campo, por exemplo, uma vez que os dados podem facilmente ser obtidos tanto de exemplares secos, quanto frescos (Borstler et al., 2014; Lyra et al., 2010). Análises moleculares tem sido a ferramenta mais utilizada, junto a taxonomia para discriminação de espécies, todavia demanda mais tempo, equipamentos específicos reagentes custosos, além de haver necessidade de experiência para interpretação dos dados (Calle et al., 2008). Entretanto o uso da morfometria geométrica como ferramenta complementar facilita a identificação do espécime em conjunto com a análise da sequência de DNA.

1.2.4. Identificação de espécies baseada em sequências do DNA mitocondrial

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA e são herdados geneticamente (Ferreira et al., 1998). Muitos desses marcadores são genes do DNA mitocondrial (mtDNA), pois ele apresenta algumas vantagens quando comparado ao DNA nuclear que permitem que mesmo espécies próximas sejam discriminadas, como herança predominantemente uniparental materna, alta taxa de mutação de alguns genes e ausência de recombinação gênica, com raras exceções além de ter fácil isolamento (Rubinoff, 2006; Wolstenholme, 1992).

O DNA mitocondrial dos metazoários é de organização simples sendo constituído por uma molécula pequena e circular de dupla hélice com tamanho variável (14 a 40 Kb). O conteúdo gênico é extremamente conservado, não possui histonas, nem sistemas de reparo. Apresentam dois genes para subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 codificam RNAs transportadores (tRNA), três codificam as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III), um codifica o citocromo B, dois as subunidades de ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase (Moritz et al., 1987; Chinnery et al., 2000).

Para identificação de Haemosporida em aves, o primeiro protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) tinha como alvo sequências da 18S rRNA) (Feldman et al., 1995), mas funcionava apenas para um grupo pequeno de espécies de *Plasmodium* (Bensch et al., 2009). Atualmente, protocolos com diferentes sequências alvo são utilizados com a grande maioria no gene mitocondrial citocromo b (*cytb*).

Na entomologia, a taxonomia que se utiliza do DNA (DNA *taxonomy*) vem sendo empregada para identificação de espécies. Essa técnica utiliza o DNA como referência taxonômica usando mais de uma característica de separação na análise de identificação da espécie, assim como na separação da ordem (Tautz et al., 2003; Sunnucks, 2000). Pensando nessa problemática de identificação de espécies, Hebert et al (2003) propuseram o uso de um fragmento de 650 pb do gene citocromo oxidase I (*coi*) do mtDNA como solução, denominado DNA *barcoding*. Desde então o gene COI tem sido bastante utilizado em análise de genética populacional, identificação de espécies crípticas, filogenia e filogeografia de diversos grupos da família Culicidae (Bracco et al., 2007; Caldera et al., 2013; Zawani et al., 2014; Lunt et al., 1996; Sallum et al., 2002; Scarpassa

e Conn, 2006; Saeng et al. 2007; Patsoula et al., 2007; Scarpassa et al., 2008; Silva et al., 2011). A identificação das espécies por esse método é feita pela comparação de sequências de *coi* de táxons previamente identificados com a sequência da amostra que se pretende identificar (Hebert et al., 2003, 2004; Kerr et al., 2007; Ward et al., 2005).

Todavia, como qualquer técnica existem suas desvantagens e a utilização de um gene mitocondrial, pode não ser eficiente na identificação de híbridos, em alguns casos pode não apontar fluxo gênico levado pelo macho uma vez que se trata de uma herança uniparental, além de não poder ter uma taxa evolutiva rápida o suficiente para fornecer dados ao nível de espécie (Chen et al., 2010).

O DNA *barcoding* surgiu na tentativa da padronização de marcadores utilizados na identificação molecular de espécies animais. Desde então pesquisadores das diversas áreas que envolvem a biodiversidade, propuseram a criação de um sistema diagnóstico universal, baseado em um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (pb), a partir da base 58 da extremidade 5´do gene *coi* (Hebert et al., 2003).

Em maio de 2004 foi então definido o consórcio CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*), com o objetivo de estabelecer um banco público com informações dos códigos de barras de DNA de todas as espécies de plantas e animais existentes. Além disso, esse banco também permite associar outros tipos de dados as amostras como: I) fotos de espécimes (*vouchers*); II) Informações de campo tais como: ponto de coletas, coletor e data de coleta; III) número de espécimes e instituição no qual esse material foi depositado; IV) dados taxonômicos; V) informações moleculares, como eletroferogramas das sequências, quais *primers* foram utilizados na amplificação e no sequenciamento. Esse banco de dados tem sido abastecido preferencialmente por informações de amostras identificadas por taxonomistas de museus e diversas outras instituições (Ratnasinghan e Hebert, 2007).

Cywinska et al. (2006) foram um dos primeiros a fornecer código de barras de DNA mitocondrial usando um fragmento de gene *COI* de 37 espécies de mosquitos canadenses. Desde então pesquisadores de todo o mundo tem utilizado essa ferramenta para investigar a biodiversidade uma vez que a técnica tem apresentado alta taxa de sucesso na identificação rápida de diversos grupos de artrópodes, aves, peixes, anfíbios, parasitas e identificando questões forenses (Hebert et al., 2003, 2004; Kerr et al., 2007; Ward et al., 2005; Smith et al., 2008a).

Esse sucesso se deve, não apenas pela identificação, mas também pela utilização do conjunto de três inovações taxonômicas como: a biologia molecular que emprega o uso de um marcador discriminador, a bioinformática que auxilia no uso dos programas e a padronização que utiliza a mesma metodologia para todos os organismos, podendo variar o gene para grupos de plantas, fungos e animais (Casiraghi et al., 2010a).

Um banco semelhante foi criado para depositar sequências de hemosporídeos de aves MalAvi (Avian Malaria Initative). Assim como CBOL é um banco de dados público criado com o objetivo de centralizar e padronizar as informações destes parasitas, em relação às sequências gênicas, nomenclatura das linhagens, informações de hospedeiros e localização geográfica (Glaizot et al., 2012).O banco de dados tem sido abastecido constantemente pela submissão das informações geradas por diversos pesquisadores que trabalham com esses parasitos.

Kerr et al. (2009) analisaram a diversidade genética de 500 espécies de aves da região Neotropical - Argentina e comparou padrões da diversidade genética com a avifauna da América do Norte. O resultado obtido mostrou que 98,8% das espécies foram identificadas corretamente. Esse resultado corrobora com os encontrados por Gonçalves et al. (2009) que analisaram 228 espécies de aves Neotropicais coletadas no Brasil e obtiveram um total de 92,5% das espécies identificadas corretamente. Chagas et al. (2015) em seu estudo com aves de vida livre no Parque Zoológico de São Paulo identificou 14 linhagens de *Plasmodium* spp., sendo seis consideradas novas.

Um estudo realizado na Costa Rica utilizando dados morfológicos e comportamentais em conjunto com o DNA *barcoding* indicou que a espécie de borboleta *Astraptes fulgerator* pode ser, na verdade, um complexo de aproximadamente dez espécies crípticas (Hebert et al., 2004).

Podemos citar também diversos estudos da família Culicidae, como o realizado por Laurito et al. (2013) que utilizou o gene *coi* para identificar 22 espécies de *Culex* (*Culex*) da Argentina e do Brasil. Os resultados mostraram que COI foi capaz de identificar com sucesso 69% de todas as espécies. Um estudo similar foi realizado por Demari-Silva et al. (2011), que usou um fragmento de 478 pares de base do gene COI para diferenciar espécies de *Culex* do Brasileverificar as relações filogenéticas do gênero *Lutzia* em relação a *Culex* e o status taxonômico do subgênero *Fenacomia* dentro do gênero *Culex.* Os resultados das análises mostraram alta variação intraespecífica, revelando a presença de complexos de espécies dentro de *Culex.*

Santiago et al. (2012) mostraram oito espécies vetoras de malária aviária da família Culicidae infectados por plasmódio sendo o gênero *Culex* o que mais se destaca, com vinte e uma espécies descritas: *Cx. ocossa, Cx. sitiens, Cx. annulirostris, Cx. perturbans, Cx. anulata, Cx. univittatus, Cx. antennatus, Cx. restuans, Cx. morsitans, Cx. longiareolata, Cx. pipens pallens, Cx. mineticus, Cx. tritaeniorhynchus, Cx. whitmorei, Cx gelidus, Cx. stigmatosana, Cx. tarsalis, Cx. salinanus, Cx. pipens, Cx. saltanensis e Cx. quinquefasciatus*. De todas as espécies citadas apenas *Cx. quinquefasciatus e Cx. saltanensis* são encontrados no Brasil. Esses dados sugerem que o gênero *Culex* pode ser o maior responsável pela transmissão de *Plasmodium* aviários.

Segundo alguns autores, os plasmódios aviários têm causado extinção e declínio populacional de diversas espécies de aves em diferentes regiões do mundo (Van Riper et al., 1986; Atkinson et al., 2000; Massey et al., 1996). Chagas et al. (2015) mostraram a presença de hemosporídeos circulando em aves migratórias no Zoológico de São Paulo e discutiram o risco que essa problemática traz para aves cativas.

Dentro desse contexto, o presente estudo visa identificar os vetores da malária aviária que são pouco estudados na ecologia das doenças silvestres. A maioria dos estudos sobre malária aviária concentra-se nos seus hospedeiros vertebrados, as aves. Esse viés deixa uma lacuna significativa em nossos conhecimentos sobre os vetores do patógeno.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar as espécies de mosquitos potencialmentevetoras de *Plasmodium* spp.em aves da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP).

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a incidência de *Plasmodium* spp. em mosquitos culicídeos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP);
- Comparar a positividade para *Plasmodium* na população de culicídeos de diferentes regiões do parque, buscando áreas com diferentes intensidades de transmissão;
- Identificar as fontes de repasto sanguíneo das fêmeas ingurgitadas coletadas na FPZSP;
- Analisar as populações de mosquitos do subgênero *Culex* obtidas com morfometria alar;
- Realizar identificação molecular dos mosquitos positivos para *Plasmodium*/*Haemoproteus* coletados na FPZSP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de estudo e coleta de amostras

Os mosquitos utilizados neste estudo são provenientes de três diferentes áreas: Zoológico da cidade de São Paulo (Fundação Parque Zoológico de São Paulo - FPZSP); Parques municipais na cidade de São Paulo, Brasil; e um ecótono de estepe florestal próximo à cidade de Esquel, sul da Argentina (Figura 5). Mais detalhes das localidades são apresentados a seguir.

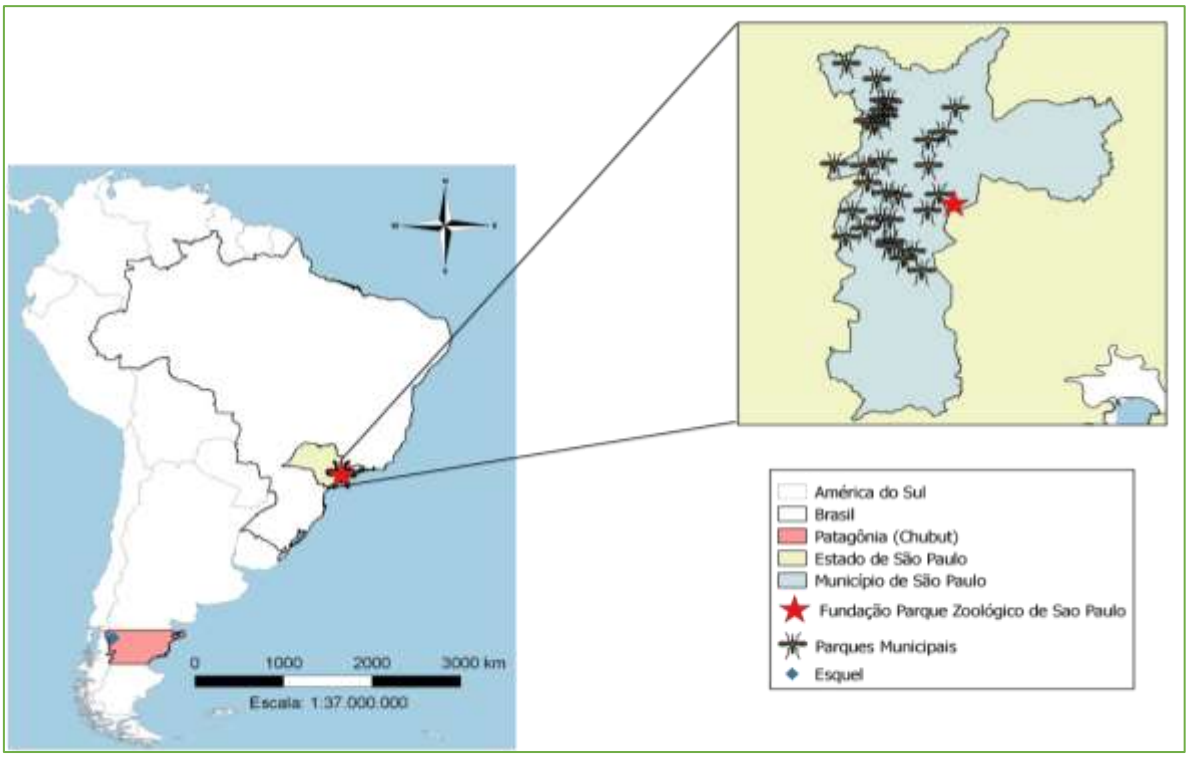


Figura 5 - Enquadramento geográfico dos locais de coleta de amostras. Os ícones em formato de mosquitos representam os 25 parques municipais na cidade de São Paulo, a estrela representa a Fundação Parque Zoológico de São Paulo e o losango o fragmento de floresta em Esquel na Patagônia.

3.1.1 Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP)

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) (23°39′03″S 46°37′14″W) está localizada no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI), Unidade de Conservação do Estado de São Paulo, situada em um pequeno fragmento de Mata Atlântica (Figura 6a). A FPZSP abriga em torno de 2.000 animais cativos, dentre aves, répteis, mamíferos, anfíbios e invertebrados, dentre espécies nativas e exóticas (http://www.zoologico.com.br/nossos-animais/).

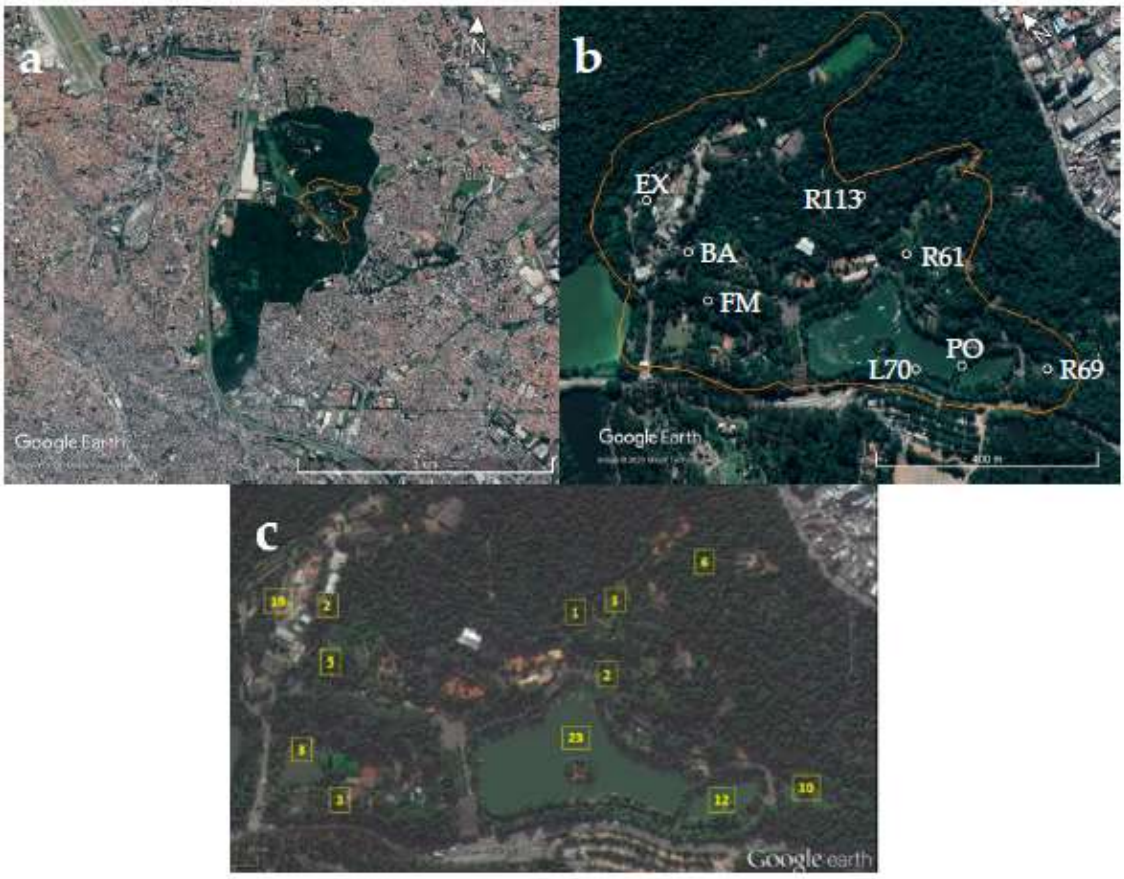
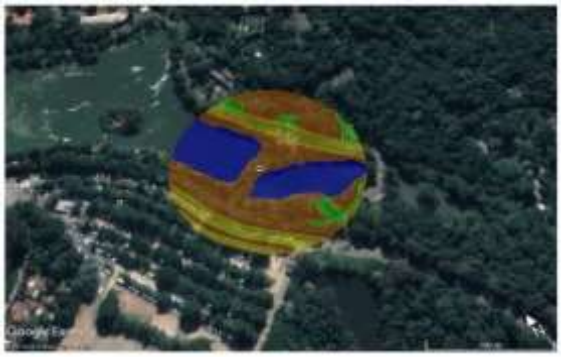


Figura 6- Enquadramento geográfico dos locais de coleta de amostras na FPZSP. Mapa de localização do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) em São Paulo, Brasil (a). Em detalhe aproximado (b) o Zoológico de São Paulo e as áreas de amostragem (círculos brancos) escolhidos considerando o número de indivíduos infectados distribuídos de acordo com seus prováveis locais de infecção, após avaliação da história clínica e parasitológica das aves infectadas que foram analisadas em um estudo anterior (Chagas et al., 2017) (c). FONTE: Guimarães et al., 2021.

Devido à grande área compreendida pela FPZSP (824.529m²), a escolha dos locais para realização das capturas entomológicas foi feita considerando-se os prováveis locais de transmissão dos hemosporídeos (Figura 6c). Para isso foi realizado um levantamento dos recintos através de anotações de ficha de manejo animal da Divisão de Veterinária e do Setor de Aves. Foi considerado local LPI o recinto em que o animal esteve nos 30 dias que antecederam a detecção da infecção. A partir desses dados foram escolhidos oito pontos para capturas dos mosquitos com a utilização de armadilhas luminosas CDC Miniatura com isca de CO_2 (Figura 6b). Essas foram instaladas a 2 m do chão nos galhos das árvores, no decorrer do crepúsculo vespertino, sendo retiradas pela manhã do dia seguinte, ficando em funcionamento por um período de 12 horas. Já quando o objetivo foi capturar fêmeas de mosquitos em repouso, concluindo as etapas da digestão sanguínea em seus abrigos pós-prandiais (Relazione, 1920) utilizou-se a técnica de aspiração com o Aspirador de Nasci em quatro pontos no período da manhã (Nasci, 1981).

A composição da paisagem e suas configurações métricas foram calculadas e utilizadas como variáveis para investigar se o ambiente pode ter influência na abundância das espécies de culicídeos. A área compreendida em um diâmetro de 200 m ao redor de cada local onde as armadilhas do CDC foram instaladas foi utilizada a fim de definir a paisagem circundante (Figura 7). A composição da paisagem foi medida pelo software através de polígonos desenhados sobre uma camada composta por um mapa geomarcado em escala adequada do Zoológico de São Paulo, para identificar as áreas de pavimentação e edificação, e sobre uma camada de imagem de satélite para identificar as diferentes classes de áreas naturais. Seis classes de vegetação ou uso do solo foram observadas: comprimento da borda da área de floresta, área de floresta com árvores altas, área de lago, edificação, pavimentação e área de mato/areia/grama (Figura 7).

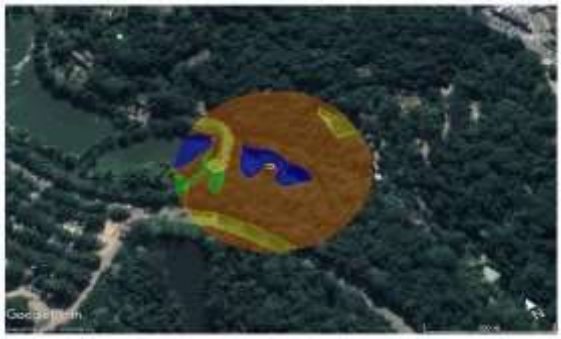


Recinto Ponte (PO)

Tipo de armadilha- CDC

Coordenada geográfica-

23° 39’ 08’’ S / 46° 37’04’’ W

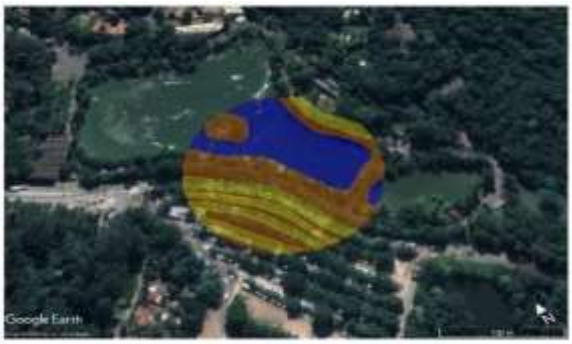


Recinto 69 (R69)

Tipo de armadilha- CDC

Coordenada geográfica-

23° 39’ 11’’ S / 46° 37’07’’ W

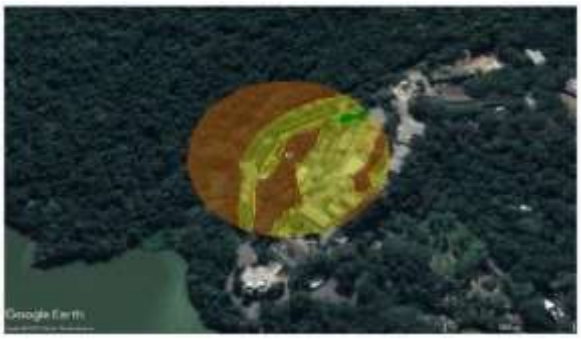


Lago 70 (LG70)

Tipo de armadilha- CDC / Nasci

Coordenada geográfica-

23° 39’ 07’’ S / 46° 37’06’’ W

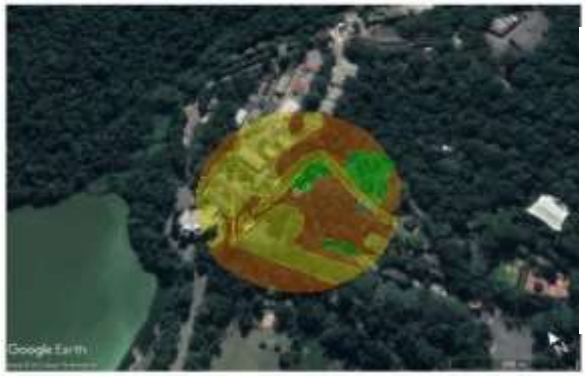


Extra (EX)

Tipo de armadilha- CDC

Coordenada geográfica-

23° 38’ 49’’ S / 46° 37’14’’ W

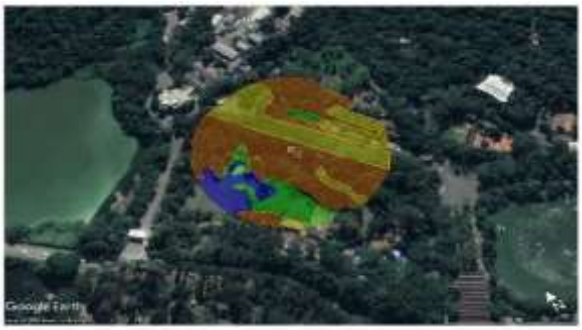


Bosque das Aves (BA)

Tipo de armadilha- CDC / Nasci

Coordenada geográfica-

23° 38’ 53’’ S / 46° 37’14’’ W



Recinto Flamingo (FM)

Tipo de armadilha- CDC / Nasci

Coordenada geográfica-

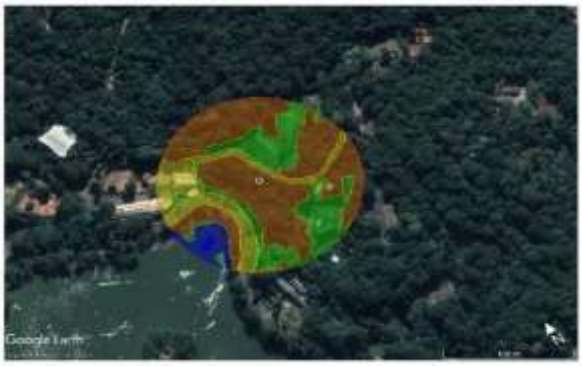
23° 38’ 56’’ S / 43° 37’ 15’’W

Recinto 113 (R113)

Tipo de armadilha- CDC / Nasci

Coordenada geográfica-

23° 38’ 57’’ S / 46° 37’03’’ W



Recinto 61 (R61)

Tipo de armadilha- CDC

Coordenada geográfica-

23° 39’ 01’’ S / 46° 37’03’’ W

Figura 7- Locais de estudo no Zoológico de São Paulo. O amarelo representa áreas onde há atividade humana (pavimentação e edificação); a azul área do lago, o verde mostra as áreas de mata/areia/grama; laranja mostra a cobertura florestal. Os pequenos círculos no centro indicam as coordenadas geográficas dos locais de instalação das armadilhas CDC. FONTE: Guimarães et al., 2021.

Os espécimes coletados foram mortos com vapor de clorofórmio, e triados. Os mesmos foram devidamente acondicionados em recipientes plásticos e transportados em gelo reciclável para o Laboratório de Entomologia Médica da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), onde foram mantidos em freezer -20°C até a identificação das espécies em mesa fria, por meio de microscópio estereoscópico. Para todas as identificações foram utilizadas chaves e descrições taxonômicas (Forattini, 1965, 2002; Lane, 1953).

Para realização da análise do hábito alimentar foram consideradas fêmeas com repleção abdominal até as que apresentavam apenas um traço de sangue visualizado pelo lado ventral do abdome, ou seja, dos esternitos abdominais.

Após a identificação das espécies de mosquitos, separou-se cada exemplar em 3 porções: (i) cabeça e tórax, (ii) abdômen e (iii) asas. Cada porção foi acondicionada em tubos de 1,5 ml, identificados de acordo com a espécie e local de captura e armazenados

a -20 °C. Após cada dissecação as pinças eram lavadas com hipoclorito, álcool 70% e água destilada e secada com gazes descartáveis, para evitar contaminação.

3.1.2 Parques Municipais de São Paulo

Em São Paulo há parques municipais que preservam resquícios da vegetação original, comportam lagos, servem de abrigo para diversas espécies de animais e são visitados continuamente pela população em momentos de lazer. Desde modo outros vinte e cinco parques municipais do estado de São Paulo foram locais de coleta de mosquitos (Figura 5). Essas coletas foram realizadas pela equipe de pesquisa do Dr. Mauro Marrelli da Faculdade de Saúde Pública – USP, no projeto de pesquisa "Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques municipais da cidade de São Paulo" (Processo FAPESP 10/51230-8).

As coletas foram realizadas entre outubro de 2010 a fevereiro de 2011 em período diurno. Os mosquitos adultos foram capturados em seus abrigos por aspirador elétrico (bateria de 12V) no período matutino por 20 minutos. A identificação e catalogação de espécimes foram feitas no Laboratório de Entomologia da Faculdade de Saúde Pública, USP. A identificação morfológica baseou-se em Lane (1953), Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) e Forattini (2002). As coletas foram feitas em 35 parques distribuídos na região sul, norte e centro-oeste da cidade, coletando um total de 5.129 espécimes distribuídos em 11 gêneros e 41 categorias taxonômicas. Nesse estudo foram utilizadas asas de mosquitos capturados em 25 parques **Anhanguera** (23°25'05.8"S 46°46'56.1"W), **Barragem** (23°40'40.1"S 46°42'59.0"W), **Burle Marx** (23°38'00.2"S 46°43'20.6"W), **Buenos Aires** (23°32'43.7"46°39'31.5"W), **Castelo** (23°42'48.2"S 46°42'57.6"W), **Cidade Toronto** (23°30'19.1"S 46°43'30.7"W), **São Domingos** (23°30'02.3"S 46°44'12.4"W), **Eucaliptos** (23°36'59.5"S 46°45'06.5"W), **Ganhembu** (23°43'47.2"S 46°40'59.5"W), **Guarapiranga** (23°40'33.1"S 46°44'03.7"W), **Ibirapuera** (23°35'16.9"S 46°39'30.3"W), **Jacinto Alberto** (23°28'49.4"S 46°43'41.0"W), **Jardim Felicidade** (23°29'42.2"S 46°43'32.5"W), **Jardim Herculano** (23°41'33.9"S

46°45'15.7"W), **Lina e Paula Raia** (23°38'08.2"S 46°38'34.1"W), **Luz** (23°31'58.8"S 46°38'06.9"W), **M. Boi Mirim** (23°42'22.8"S 46°47'00.1"W), **Nabuco** (23°39'48.1"S 46°39'37.4"W), **Nove de Julho** (23°43'14.1"S 46°43'00.4"W), **Previdência** (23°34'51.1"S 46°43'37.9"W), **Cohab Raposo Tavares** (23°35'05.5"S 46°48'03.3"W), **Rodrigo de Gasperi**(23°28'54.9"S 46°43'10.7"W), **Vila dos Remédios** (23°30'47.9"S 46°45'00.7"W), **Raposo Tavares** (23°35'18.5"S 46°45'22.3"W), **Santos Dias** (23°39'46.8"S 46°46'22.6"W), **Colina de São Francisco** (23°33'32.4"S 46°45'36.1"W), **Severo Gomes** (23°38'18.2"S 46°42'12.3"W), **Shangrilá** (23°45'43.4"S 46°40'08.2"W), **São José** (23°43'48.9"S 46°43'00.1"W), **Senhor do Vale** (23°26'39.8"S 46°44'14.3"W), **Orlando Villas-Boas** (23°31'11.5"S 46°44'20.7"W) (Medeiros-Sousa et al., 2013).

3.1.3 Patagônia

Também foram incluídas nesse estudo asas de *Culex acharistus* coletadas em um fragmento florestal perto da cidade de Esquel, sul da Argentina (42°55'00.0"S 71°21'00.0"W). As coletas foram realizadas com armadilhas luminosas CDCs Miniatura, Luz ultravioleta e isca de CO_2. A inclusão dessas asas justifica-se pelo fato de que, embora *Culex acharistus* tenha sido encontrado na FPZSP e nos Parques Municipais de São Paulo, não havia asas disponíveis dessas coletas para este estudo.

Na figura 8 é apresentado um fluxograma resumindo as análises realizadas com o material obtido das diferentes origens.

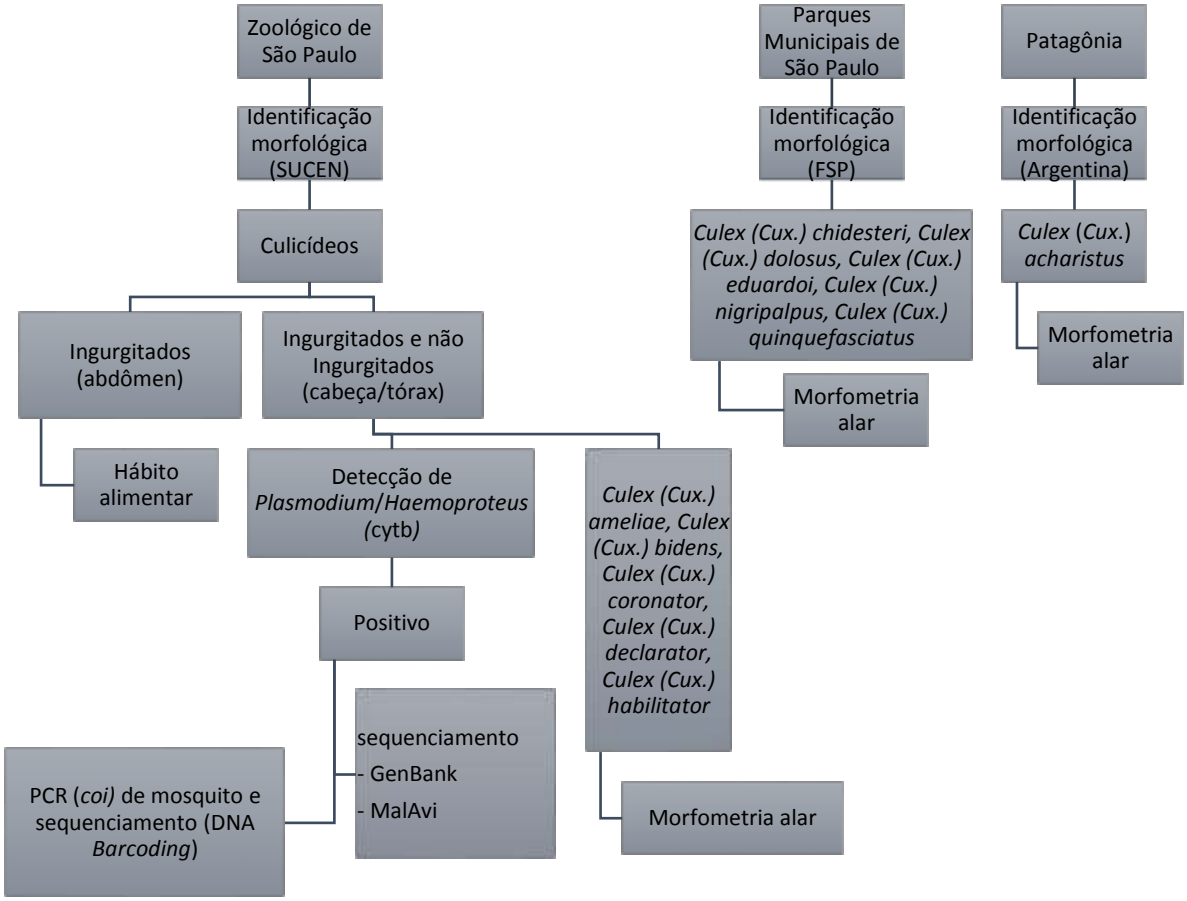


Figura 8 -Fluxograma do estudo.

3.2 Extração de gDNA dos mosquitos e detecção de *Plasmodium*

O DNA genômico das fêmeas dos mosquitos foram extraídos da porção cabeça/tórax com o intuito de detectar parasitas presentes na glândula salivar, identificando possíveis vetores. Os mosquitos identificados foram separados em pools de até 11 indivíduos tentando manter o mesmo dia e local de coleta, entretanto houve algumas exceções, além de amostras extraídas individualmente. Os pools foram macerados utilizando FastPrep-96TM (MP Biomedicals, Ohio, EUA) com esferas de cerâmicas de 1,4 mm (MagNA Lyser Green Beads – Roche Molecular Systems) em combinação com 2 esferas de cerâmicas revestidas com óxido de Zircônio de 6,35 mm

(MP Biomedicals) em tampão de lise Master Mix (200ul de Nuclei Lysis Solution, 50ul de EDTA 0,5M com pH 8,0, 20ul de proteinase K com 20mg/ml e 5ul RNase A Solution) por 3 minutos a 1800 rpm, depois centrifugadas por 5 minutos a 1400 rpm em temperatura ambiente. A extração do DNA foi seguida usando o Kit Wizard SV 96 Genomic DNA Purification System (Promega), que permite a extração de gDNA de 96 amostras simultaneamente. Os lisados foram transferidos para as colunas e lavados de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 100ul de Nuclease-FreeWater e armazenado a -20°C.

3.3 PCR para detecção de *Plasmodium*

A PCR para detecção de *Plasmodium* é a mesma realizada para o sangue de aves (Hellgren et al., 2004). Foi utilizada uma *nested* PCR tendo como alvo um fragmento do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*) (~500 pb), usando os primers HaemNFI (5'– CAT ATA TTA AGA GAA ITA TGG AG – 3') e HaemNR3 (5' – ATA GAA AGA TAA GAA ATA CCA TTC – 3') na primeira reação e HaemF (5' – ATG GTG CTT TCG ATA TAT GCA TG – 3') e HaemR2 (5' – GCA TTA TCT GGA TGT GAT AAT GGT – 3') na segunda reação (Hellgren et al., 2004). Na primeira PCR foram usados 5 µl de gDNA e na *nested* PCR 2µl do produto da primeira reação. Ambas as reações foram realizadas em 25µl com 1,5mM $MgCl_2$, Tampão de PCR 1X, 1,25mM de cada dNTP, 0,6mM de cada primer e 0,5 U *Taq* DNA Polimerase de alta fidelidade (Platinum™ Taq DNA Polymerase – Thermo Fisher Scientific). A primeira reação de amplificação empregou 94 °C por 3 min (desnaturação inicial), seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 30 seg. (desnaturação), 50 °C por 30 seg. (anelamento) e 72°C por 45 seg. (extensão); por último foi realizada uma extensão final com 72 °C por 10 min. Na reação de *nested* PCR alterou-se o número de repetições para 35 ciclos e a temperatura de anelamento para 55°C. Os produtos obtidos na reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen) dissolvida em TBE 1x (Tris, Borato, EDT). A corrida eletroforética foi efetuada juntamente como marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder™ Invitrogen) por 40 minutos a 110 V. As bandas foram marcadas com GelRed™ (Biotium) e observadas em transluminador UV.

Os produtos de PCR foram sequenciados com kit Big Dye Terminator v3 em ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer utilizando os oligonucleotídeos da PCR. As sequências

foram alinhadas, editadas e analisadas com software SeqMan do pacote DNA Star. As linhagens foram identificadas por comparação com o banco de dados de sequencias de DNA do GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e MalAvi (http://130.235.244.92/Malavi/blast.html).

3.4 Extração de gDNA dos mosquitos ingurgitados e identificação da fonte de repasto sanguíneo

O gDNA dos mosquitos ingurgitados foi extraído individualmente da porção do abdômen com o Kit Wizard SV 96 Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, USA), seguindo as recomendações do fabricante para extração de DNA de tecidos.

Para amplificação do DNA da fonte de repasto sanguíneo, foram utilizados *primers* capazes de amplificar fragmentos de 300 bp no gene mitocondrial *cytb*, em vários grupos de vertebrados, incluindo mamíferos, aves, anfíbios, répteis e peixes (Kocher et al., 1989). Esta metodologia tem sido utilizada com sucesso para identificar fontes de repasto sanguíneo em mosquitos do Zoológico de São Paulo durante foco de malária em pinguins (Bueno et al., 2010), assim como em área peridomiciliar durante transmissão de malária assintomática na Mata Atlântica (Kirchgatter et al., 2014).

Os fragmentos amplificados foram sequenciados diretamente com *primers* flanqueadores correspondentes, utilizando kit Big Dye Terminator v3 em ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer. As sequências foram alinhadas, editadas e analisadas com software SeqMan do pacote DNA Star. As sequencias foram identificadas por comparação com o banco de dados de sequencias de DNA do GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).Identificação positiva e atribuição da espécie fonte do repasto sanguíneo foram realizadas quando uma sequência exata ou com >99% de identidade foi obtida.

3.5 DNA *barcoding*

Para confirmar as espécies de mosquitos identificadas morfologicamente, foi realizada uma identificação molecular das amostras positivas para *Plasmodium* e *Haemoproteus* usando DNA *barcoding* através de PCR com *primers* universais para

amplificação de um fragmento de 710 pb da subunidade I do gene mitocondrial citocromo C oxidase I (COI) de invertebrados. A amplificação por PCR foi realizada usando os *primers* descritos por Folmer et al. (1994) (LCO1490:5'– GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G – 3´ e HC02198: 5' –TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3')e as condições da PCR utilizada foram descritas por Ruiz et al. (2010) com algumas modificações. A reação ocorreu em um volume de 25ul com 2mM de $MgCl_2$, Tampão de PCR 1X, 0,5 mM de cada dNTP, 0,3 uM de cada primer, 0,2 U de Taq DNA Polimerase de alta fidelidade (Platinum™ Taq DNA Polymerase – Thermo Fisher Scientific) e 5 µL de DNA. A ciclagem iniciou com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min repetindo por 34 vezes; 95°C por 30 seg. (desnaturação), 48°C por 30 seg. (anelamento) e 72°C por 45 seg. (extensão); terminando com um ciclo de extensão final com 72°C por 10min.Os produtos obtidos na reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen) dissolvida em TBE 1x (Tris, Borato, EDT). A corrida eletroforética foi efetuada juntamente como marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder™ Invitrogen) por 40 minutos a 110 V. As bandas foram marcadas com GelRed™ (Biotium) e observadas em transluminador UV.

Os produtos de PCR foram sequenciados com kit Big Dye Terminator v3 em ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer utilizando oligonucleotídeos da PCR. As sequências foram identificadas por comparação com o banco de dados de sequencias de DNA GenBank. Identificação positiva e atribuição de espécies de Culicidae foram feitas quando as sequências eram exatas ou com >99% de identidade.

3.6 Morfometria geométrica alar

3.6.1 Montagem das lâminas e aquisição dos dados

Para a análise morfométrica, após a identificação do espécime, as asas foram destacadas do corpo como auxílio de pinça de ponta fina e acondicionadas em microtubos com álcool a 70% em temperatura ambiente. Os microtubos foram rotulados com as informações necessárias. Informações sobre espécies dos mosquitos, coordenadas do local de coleta e ano de coleta são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1- Número de espécimes das 11 espécies de mosquitos, local e ano das coletas.

Espécie	N°	Local de Coleta	Ano de Coleta
Culex (Cux.) chidesteri	30	Parques Municipais de São Paulo	2010/2011
Culex (Cux.) dolosus	32	Parques Municipais de São Paulo	2010/2011
Culex (Cux.) eduardoi	15	Parques Municipais de São Paulo	2010/2011
Culex (Cux.) nigripalpus	34	Parques Municipais de São Paulo	2010/2011
Culex (Cux.) quinquefasciatus	57	Parques Municipais de São Paulo	2010/2011
Culex (Cux.) ameliae	30	Parque Zoológico de São Paulo	2015
Culex (Cux.) bidens	27	Parque Zoológico de São Paulo	2015
Culex (Cux.) coronator	43	Parque Zoológico de São Paulo	2015
Culex (Cux.) declarator	13	Parque Zoológico de São Paulo	2015
Culex (Cux.) habilitator	32	Parque Zoológico de São Paulo	2015
Culex (Cux.) acharistus	26	Patagônia	2017

Os métodos de morfometria geométrica seguiram em linhas gerais as descritas por Rocha (2005). Asas direitas de cada fêmea após a remoção das escamas foram montadas com Bálsamo do Canadá, lâmina e lamínula, para analise morfométrica. Imagens dessas asas foram capturadas através de uma câmera fotográfica digital Leica DFC320 acoplada a um microscópio estereoscópio Leica S6, no aumento de 40X e as imagens foram armazenadas em banco de dados. Com o auxílio do software tpsDig V.1.40 (Rohlf, 2015), 18 pontos anatômicos foram marcados em cada imagem sobre um plano cartesiano (Figura 9) e as análises pertinentes foram feitas no programa MorphoJ (Klingenberg, 2011) e Past (Hammer et al., 2001).

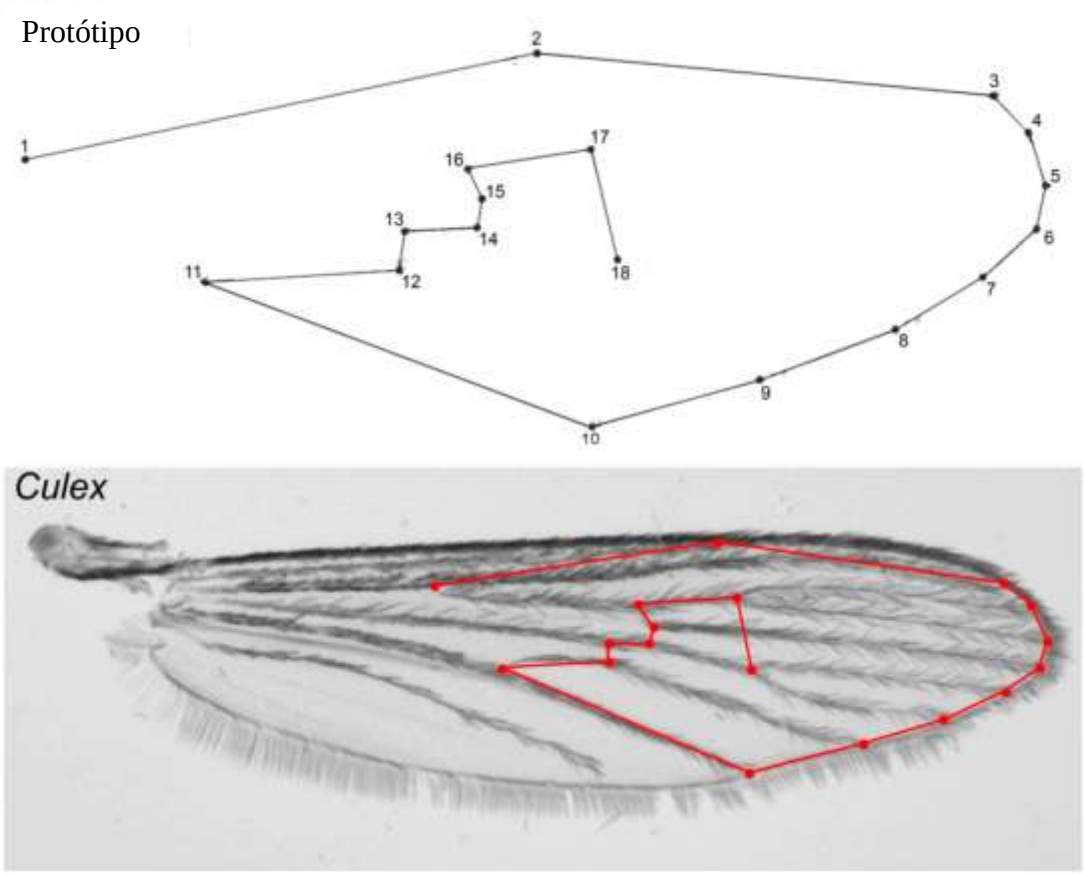


Figura 9 - Foto da asa direita digitalizada de *Culex* sp. mostrando os 18 pontos de encontro das nervuras, utilizados na análise da morfometria geométrica alar. Software tpsDig. FONTE: Simões et al., 2020.

3.6.2 Análises 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 (Wilkeet al., 2016). Análise discriminante foi realizada para explorar o grau de similaridade da forma da asa entre as espécies no morfoespaço produzido pela análise de variáveis canônicas (CVA). A análise foi feita pelo programa MorphoJ (Klingenberg, 2011) utilizando os trezentos e trinta e nove indivíduos presentes nesse estudo. As distancias de Mahalanobis foram calculadas por meio da CVA. Cada indivíduo foi então reclassificado usando o teste de reclassificação cruzada utilizando a distância de Mahalanobis (Lorenz Cet, 2012; VidalPO, SuesdekL, 2011; Dujardin, 2008). Uma árvore Neighbor Joining foi construída com 1.000cópias de bootstrap baseadas na distância

Mahalanobis para ilustrar os padrões de segregação das espécies (30 espécimes de *Aedes aegypti* foram usados como um outgroup). As análises foram realizadas e gráficos plotados com TpsUtil 1.29 (RohlfF, 2008), TpsRelw 1.39. MorphoJ 1.02 [39] e Past 2.17c (Hammer; Harper; Ryan, 2001).

3.7 Aspectos éticos

O presente projeto foi realizado de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (CPE-IMT / 371A, Anexo A) e pelo Ministério do Meio Ambiente (SISBIO 34605, Anexo B).

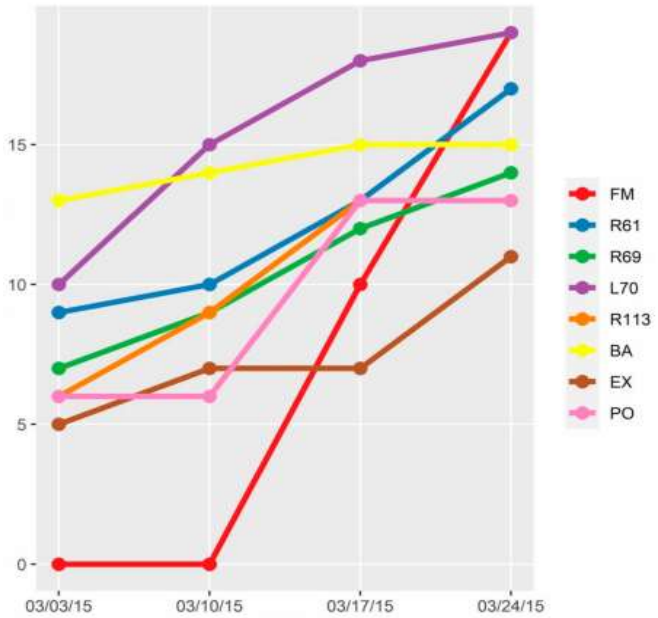
4. RESULTADOS

4.1 Levantamento de Culicidae no Parque Zoológico de São Paulo

Devido à grande área compreendida pela FPZSP (824.529m²), a escolha dos locais para realização das capturas entomológicas foi feita considerando-se os prováveis locais de transmissão dos hemosporídeos. Foi capturado um total de 2.039 fêmeas de mosquitos da Família Culicidae em março de 2015 (Chagas et al., 2015), sendo que desse valor 760 espécimes foram identificados a nível de subgênero e 1.279 a nível de espécie.

O valor do índice H foi 2,0 para o recinto PO, 2,1 para o recinto 69, 2,3 para o recinto EX**,** 2,3 para o R61, 2,3 para o recinto BA, 2,4 para o recinto LG70, 2,4 para o R113 e 2,6 para FM. A classificação das áreas foram feitas seguindo os critérios sugeridos por Baliton et al. (2017). Das áreas do estudo, apenas o recinto dos Flamingos (FM) foi classificado como biodiversidade moderada. As outras sete áreas foram classificadas com uma baixa biodiversidade (Gráfico 1).

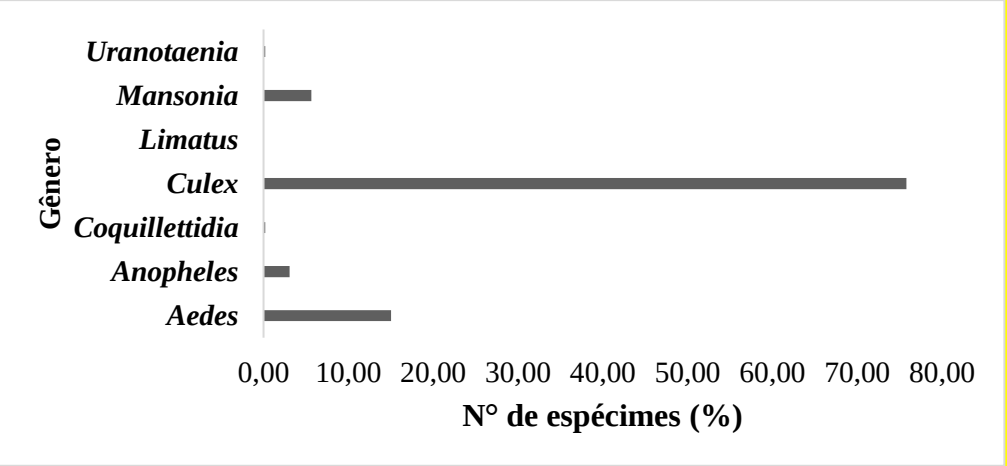
Gráfico 1- Curva de acumulação de espécies de Culicidae por local de coleta no zoológico de São Paulo. O número absoluto de espécies (eixo Y) é mostrado em cada ponto da curva eo número de acumulação de especies por semana de coleta (eixo X).



FONTE: Guimarães et al. 2021.

Dentre os sete gêneros registrados para a família Culicidae observa-se que o maior percentual de exemplares foi registrado para *Culex* (75,8%) seguido pelo gênero *Aedes (*15%). Os demais gêneros apresentaram um percentual menor de indivíduos: *Mansonia* (5,6%), *Anopheles* (3,1%), *Coquillettidia* (0,2%), *Uranotaenia* (0,2%) *e Limatus* (<0,1%) (Gráfico 2).

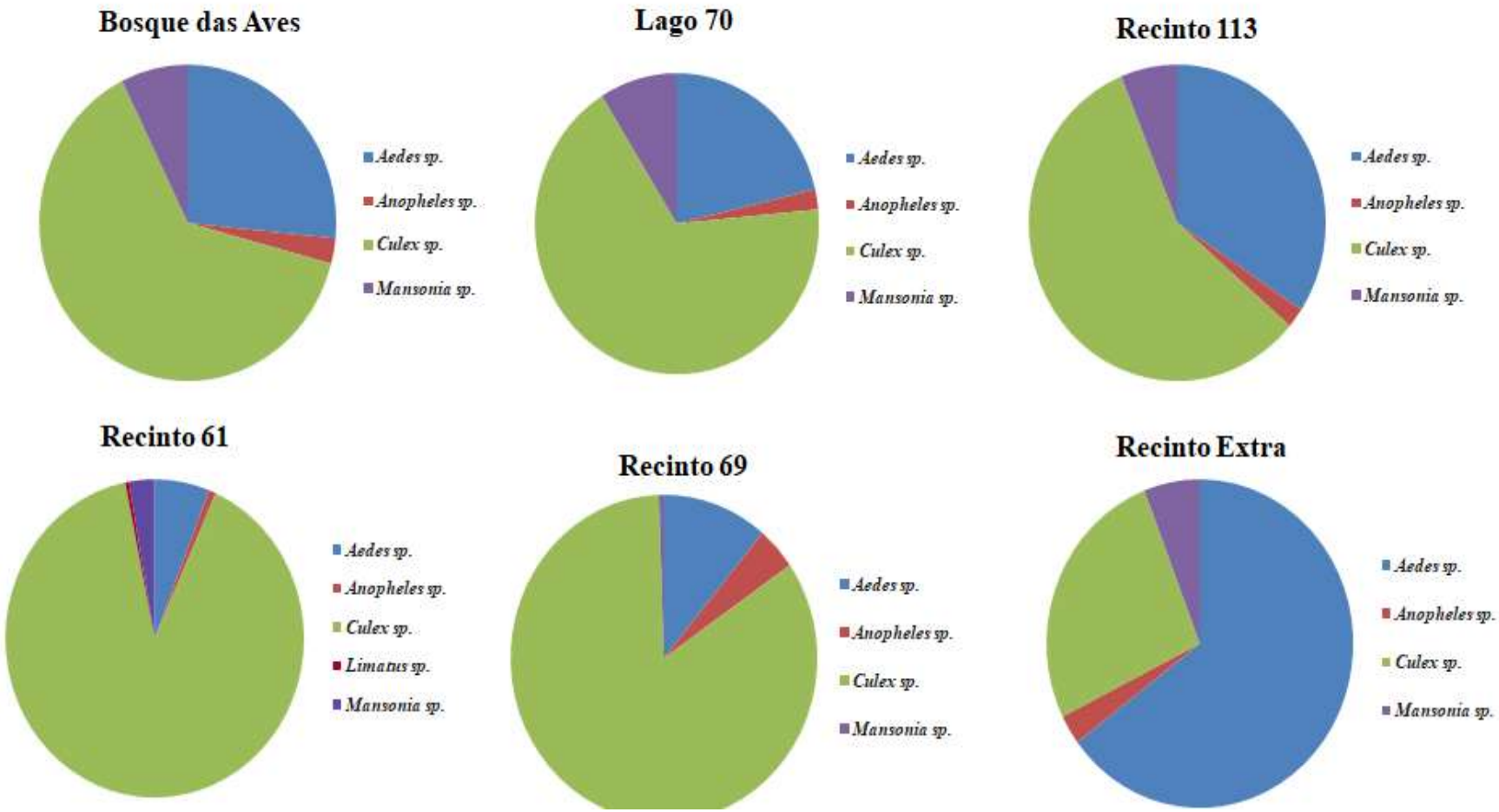
Gráfico 2- Ocorrência dos gêneros de mosquitos da família Culicidae coletados na FPZSP. FONTE: Guimarães et al., 2021.



O gênero com maior riqueza de espécie foi *Culex,* considerado por diversos autores o principal gênero vetor de *Plasmodium.* Dentre as espécies ou grupo de espécies identificadas para o subgênero *Culex (Cux.)* destaca-se 529 exemplares de *Culex (Cux.)* spp., seguido por 225 *Culex (Cux.)* Complexo Coronator, 209 *Culex (Cux.) bidens*, 136 *Culex (Cux.) declarator*, 65*Culex (Cux.) habilitator*, 65 *Culex ameliae, 37 Culex (Cux.) chidesteri, 28 Culex (Cux.) scimitar, 10 Culex (Cux.) nigripalpus, 5 Culex (Cux.) dolosus, 2 Culex (Cux.) saltanensis e 1 Culex (Cux.) quinquefasciatus*.

Culex foi encontrado abundantemente em todos os pontos, com ressalva para o recinto Extra, onde o gênero *Aedes* se destacou (Gráfico3). Os lagos que existem no Zoológico são considerados eutrofizados devido à grande quantidade de matéria orgânica presente em seu corpo d´água, ambiente ideal para *Culex* ovipor e para as larvas se desenvolverem. A maioria dos pontos de coleta fica próxima a esses lagos, o que também pode ter favorecido a coleta de indivíduos do gênero.

Gráfico 3- Riqueza de gêneros de Culicidae coletados na FPZSP por ponto de coleta.



4.2 Características da paisagem e a biodiversidade de mosquitos

Em relação às métricas da paisagem, o R113 apresentou valores maiores de cobertura florestal e valores menores de áreas submetidas a alterações antrópicas do que os outros recintos. Contudo o recinto EX se destacou com valores maiores de mudanças antropogênicas e valores mais baixos em relação à cobertura florestal do que outros locais de coleta. A Tabela 2mostra as métricas das paisagens para as áreas próximas a cada local de coleta.

Tabela 2- Métricas da paisagem para cada local de coleta dos mosquitos no Zoológico de São Paulo.

Recinto	Comprimento (m) da área de borda no fragmento da floresta	Área florestal (árvores altas) (m^2)	Lago (m^2)	Edificação (m^2)	Pavimentação (m^2)	Arbusto / areia/ grama (m^2)	Não Classificado (m^2)
PO	1647	12556	7034	0	4355	1277	224
R69	1340	19495	2295	0	2709	633	314
LG70	1792	10928	8247	0	5541	0	730
EX	1093	13382	0	7438	4142	285	199
BA	1832	10972	0	5348	5565	2302	1256
FM	1305	12323	2006	220	6531	2370	1996
R113	181	24530	0	0	569	328	19
R61	1602	14144	963	1533	2432	6124	249

Em relação às espécies de mosquitos obtidas em cada local de coleta e a respectiva composição paisagística, pode-se observar que nos locais de coleta com menores alterações antropogênicas (aqui no estudo usado como “urbanização”, pois inclui áreas de edificação e pavimentação), *Culex* se destaca por ser a espécie mais coletada, enquanto nos locais com maior alteração, espécies do gênero *Aedes* foram mais encontradas. Isso fica mais evidente quando olhamos para o recinto EX, localizado em uma área mais urbanizada, onde coletamos uma menor e maior quantidade de *Culex* e *Aedes*, respectivamente. No entanto, embora os resultados encontrados no modelo linear possam

indicar graficamente a tendência, não é suportado por teste estatístico (Im Urban~Aedes: *p*-value: 0.1885 e Pearson = 0,2419) (Figura 10).

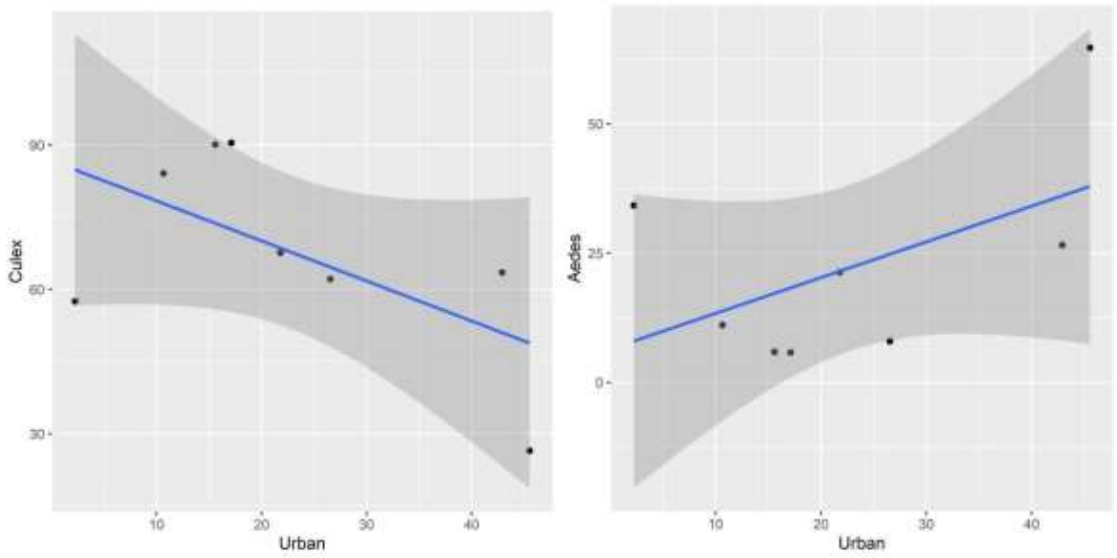


Figura 10- Frequência de *Culex* (a) e *Aedes* (b) coletados em áreas de edificação no Zoológico de São Paulo. FONTE: Guimarães et al., 2021.

4.3 Detecção de *Plasmodium* em mosquitos do gênero *Culex*

Foi analisado um total de 1.013 mosquitos do gênero *Culex*, sendo 219 do subgênero *Melanoconion*, 5 do subgênero *Microculex* e o restante (e grande maioria) do subgênero *Culex*. Desses, *Cx. coronator* foi a espécie mais abundante com 221 indivíduos, seguido de *Cx. bidens* com 206. O parasita foi detectado em duas amostras individuais (morfologicamente identificados como *Cx. acharistus* e *Cx. dolosus*) e três *pools* (morfologicamente identificados como dois *Cx. coronator* e um *Cx. acharistus*) (Tabela 3). Entretanto, essas identificações não foram confirmadas por DNA *barcoding* (ver item 4.4).

Tabela 3- Informações sobre nº de mosquitos do gênero *Culex* subgênero *Culex* coletado e analisado da FPZSP.

Espécies	**Total coletado**	**Total analisado**	**Analise individual**	**Amostras Positivas**	***Pools***	**Total de amostras em *Pools***	***Pools* positivos**
Cx. (Cux.) acharistus	8	8	5	1	1	3	1
Cx. (Cux.) ameliae	65	65	10	0	7	55	0
Cx. (Cux.) bidens	209	206	21	0	20	185	0
Cx. (Cux.) chidesteri	36	35	6	0	4	29	0
Cx. (Cux.)* complexo *coronator	225	221	56	0	19	165	2
Cx. (Cux.) declarator	136	135	41	0	11	94	0
Cx. (Cux.) dolosus	5	5	5	1	0	0	0
Cx. (Cux.) habilitator	66	64	49	0	2	15	0
Cx. (Cux.) nigripalpus	10	10	5	0	2	5	0
Cx. (Cux.) quinquefasciatus	1	1	1	0	0	0	0
Cx. (Cux.) saltanensis	2	2	0	0	1	2	0
Cx. (Cux.) scimitar	28	28	0	0	3	28	0
***Cx. (Cux.)* spp.**	529	9	9	0	0	0	0
Cx. (Mcx.) imitator imitator	5	5	0	0	1	5	0
Cx. (Mel.) Melanoconion	220	219	61	0	19	158	0

4.4 Detecção de *Plasmodium* e *Haemoproteus* nas demais espécies de Culicidae coletados na FPZSP

Foram analisados outros seis gêneros da família Culicidae somando 493 indivíduos, dos quais *Ae. (Och.) scapularis* se destaca com 294 espécimes identificados, seguida de *Ma. (Man.) indubitans* com 65 indivíduos (Tabela 4). Parasitas foram detectados em oito amostras, sendo cinco *Ae. (Och.) scapularis*, um *Ae. (Stg.) albopictus* e uma *Ma. (Man.) indubitans* analisados individualmente, além de um *pool* de *Ma. (Man.) indubitans*.

A identificação das espécies usando sequências do citocromo c oxidase I subunidade I (COI) mostrou que os espécimes do gênero *Ae.* foram identificados corretamente. Sendo possível identificar em *Ae. Scapularis* os parasitas *Plasmodium nucleophilum* (pDENPET03), *Haemoproteus (Parahaemoproteus)* sp. (hAEDSCA01) e *Plasmodium* spp (pCULMAX01, pCULEX05 e pCULEX06). Dos positivos, sete foram coletados no mesmo dia (3de março de 2015) e 50% deles foram coletados no Recinto "Bosque das Aves". As sequências de hemosporídeos obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank (números de acesso MW492356 -MW492368). (Tabela 5)

Tabela 4 - Informações sobre as demais espécies de mosquitos da família Culicidae coletadas na FPZSP.

Espécies	**Total coletado**	**Total analisado**	**Análise individual**	**Amostras positivas**	***Pools***	**Total de amostras por *pools***	***Pools* positivos**
Aedes (Och.) scapularis	294	294	160	5	16	134	0
Aedes (Stg.) albopictus	15	15	6	1	2	9	0
Anopheles (Nys.) evansae	33	33	8	0	3	25	0
Anopheles (Nys.) galvaoi	3	3	3	0	0	0	0
***Anopheles (Nys.)* sp.**	5	5	5	0	0	0	0
Anopheles (Nys.) strodei	22	22	6	0	2	16	0
Coquillettidia (Rhy.) nigricans	1	1	1	0	0	0	0
Coquillettidia (Rhy.) hermanoi	2	2	0	0	1	2	0
***Coquillettidia (Rhy.)* sp.**	1	1	1	0	0	0	0
Limatus durhamii	1	1	1	0	0	0	0
Mansonia (Man.) indubitans	65	65	21	1	6	44	1
Mansonia (Man.) pseudotitillans	18	17	5	0	2	12	0
***Mansonia (Man.)* sp.**	5	5	5	0	0	0	0
Mansonia (Man.) titillans	25	25	14	0	2	11	0
Uranotaenia (Ura.) pulcherrima	4	4	0	0	1	4	0

Tabela 5 - Dados das amostras positivas para hemosporídeos nos mosquitos coletados na FPZSP.

Espécie identificada morfologicamente	Espécie identificada por DNA *Barcoding*	Data da coleta	Ponto de coleta	Linhagem/Parasita/Acesso GenBank
Aedes (Stg.) albopictus	*Aedes (Stg.) albopictus*	03/03	EX	*P. nucleophilum*/ pDENPET03/MW492356
Mansonia (Man.) indubitans	† *Mansonia (Man.) sp.*	03/03	R113	*P. nucleophilum*/ pDENPET03/MW492358
Aedes (Och.) scapularis	*Aedes (Och.) scapularis*	03/03	BA	*P. nucleophilum*/ pDENPET03/MW492359
Aedes (Och.) scapularis	*Aedes (Och.) scapularis*	03/03	BA	*P. nucleophilum*/ pDENPET03/MW492360
Aedes (Och.) scapularis	*Aedes (Och.) scapularis*	03/03	BA	*P. nucleophilum*/ pDENPET03/MW492361
Aedes (Och.) scapularis	*Aedes (Och.) scapularis*	03/03	BA	*P. nucleophilum*/ pDENPET03/MW492362
Aedes (Och.) scapularis	*Aedes (Och.) scapularis*	30/06	BA	*Haemoproteus (Parahaemoproteus)* sp.
Mansonia (Man.) indubitans	*Mansonia (Man.)* spp. †	17/03 24/03 10/03	R61 R113 L70	*Haemoproteus (Parahaemoproteus)* sp. / hMYISWA01/MW492366
Culex (Cux.) acharistus	*Culex (Cux.) coronator*	03/03	EX	*P. nucleophilum*/ pDENPET03/MW492357
Culex (Cux.) dolosus	*Culex (Cux.) maxi*	10/03	EX	*Plasmodium* sp./ pCULMAX01/MW492363
Culex (Cux.) acharistus	*Culex (Cux.) nigripalpus*	17/03	R61	*Plasmodium* sp./ pVIOLI03/MW492365
Culex (Cux.) complexo *coronator*	*Culex (Cux.)* spp. †	03/03	BA	*Plasmodium* sp./ pCULEX05/MW492367
Culex (Cux.) complexo *coronator*	*Culex (Cux.)* spp. †	17/03	R61	*Plasmodium* sp./ pCULEX06/MW492368

† Espécie não identificada

4.5 Identificação de repasto sanguíneo

Para a avaliação da fonte de repasto sanguíneo de Culicidae, foram analisadas 32 fêmeas que se apresentavam ingurgitadas ou com traços de sangue no abdômen. O gênero com maior destaque foi *Culex*, com dez exemplares de *Cx. declarator*, cinco indivíduos de *Cx. coronator* e cinco exemplares de *Culex* (*Culex*) sp. Todos apresentaram sangue de mamíferos e aves basicamente na mesma proporção. Os demais mosquitos ingurgitados ficaram igualmente distribuídos entre os gêneros *Aedes*, *Mansonia* e *Uranotaenia*. Os espécimes foram coletados em todos os locais de captura, entretanto o Bosque das aves (BA) foi o local que mais se destacou, com 35,7% dos indivíduos coletados (Tabela 6). Das 11 espécies de aves identificadas como sendo fonte de repasto sanguíneo, cinco (45% - *Spizaetus ornatus, Cygnus atratus, Balearica regulorum, Pavo muticus, e Rhea americana*) são cativas da FPZSP, um pode ser encontrado tanto em cativeiro quanto em vida livre (*Pipile jacutinga*), e as outras cinco espécies são de vida livre (*Anser anser, Ardea herodias, Nycticorax nycticorax, Cathartes melambrotus*, e *Turdus rufiventris*). Todas as espécies de mamíferos detectadas são de vida livre.

A fonte de repasto sanguíneo mais encontrada foi *Homo sapiens*, estando presente em 10 mosquitos, seguida por *Nycticorax nycticorax* (Socó-dorminhoco) presente em 3 mosquitos. Também foram identificadas como fontes de repasto sanguíneo: *Pipile jacutinga* (jacutinga), *Spizaetus ornatus* (gavião-de-penacho), *Cygnus atratus* (cisne-preto), *Pavo muticus* (pavão-verde), *Didelphis aurita* (gambá-de-orelha-branca), *Ardea herodias* (garça-grande-branca), *Anser anser* (marreco-de-bico-laranja), *Turdus rufiventris* (sabiá-laranja), *Canis lupus familiaris* (cão doméstico) e *Cathartes melambrotus* (urubu-da-mata) (Tabela 6).

Cx. declarator teve dois exemplares nos quais foram encontradas sequências para pelo menos duas fontes de repasto: aviária e humana (*Pipile jacutinga, Cathartes melambrotus e Homo sapiens*). Em um exemplar de *Cx. coronator* foram encontradas sequências de *Cygnus atratus e Homo sapiens* (Tabela 6).

Tabela 6- Fontes de repasto sanguíneo identificadas nas fêmeas ingurgitadas, de acordo com local de coleta, espécie de mosquito e hospedeiro vertebrado.

Local de coleta	Espécie de Mosquito	Espécie fonte de repasto*	N
BA	*Aedes (Och.) scapularis*	*Homo sapiens*(M)	1
	Culex (Cux.) chidesteri	*Homo sapiens*(M)	1
	Culex (Cux.) complexo *coronator*	*Cygnus atratus*(A)	1
	Culex (Cux.) complexo *coronator*	*Homo sapiens*(M)	1
	Culex (Cux.) complexo *coronator*	*Pavo muticus*(A)	1
	Culex (Cux.) declarator	*Didelphis aurita*(M)	1
	Culex (Cux.) declarator	*Homo sapiens*(M)	2
	Culex (Cux.) declarator	*Nycticorax nycticorax*(A)	1
	Culex (Cux.) declarator	*Spizaetus ornatus*(A)	1
EX	*Mansonia (Man.) titillans*	*Homo sapiens*(M)	1
FM	*Culex (Cux.) declarator*	*Canis lupus familiaris*(M)	1
	Culex (Cux.) declarator	*Cathartes melambrotus*(A)	1
	Culex (Cux.) declarator	*Homo sapiens*(M)	1
	Culex (Cux.) declarator	*Pipile jacutinga*(A)	1
	Uranotaenia (Ura.) pulcherrima	*Homo sapiens*(M)	1
	Culex (Cux.) declarator	*Balearica regulorum*(A)	1
L70	*Culex (Cux.) habilitator*	*Anser anser*(A)	1
	Culex (Mel.) Seção Melanoconion	*Ardea herodias* (A)	1
	Culex (Mel.) Seção Melanoconion	*Nycticorax nycticorax*(A)	1
	Culex (Cux.) sp.	*Homo sapiens*(M)	2
PO	*Culex (Cux.)* sp.	*Cygnus atratus*(A)	1
	Culex (Cux.) sp.	*Nycticorax nycticorax*(A)	1
	Culex (Mel.) Seção Melanoconion	*Homo sapiens*(M)	1
R61	*Culex (Cux.)* complexo *coronator*	*Homo sapiens*(M)	1
R69	*Anopheles (Nys.) evansae*	*Homo sapiens*(M)	1
	Culex (Cux.) ameliae	*Cygnus atratus*(A)	1
	Culex (Cux.) complexo *coronator*	*Turdus rufiventris*(A)	1
	Culex (Cux.) sp.	*Homo sapiens*(M)	1
	Culex (Mel.) Seção Melanoconion	*Rhea americana* (A)	1
R113	*Culex (Cux.) scimitar*	*Homo sapiens*(M)	1

* M = mamífero; A = ave.

4.6 Morfometria Geométrica Alar

4.6.1 Variável Canônica

Para a análise das diferenças entre os subgêneros de *Culex* foi empregada a análise das variáveis canônicas (CVA), função discriminante linear de Fisher (FDF) e distância de Mahalanobis.

A CVA fornece uma descrição das diferenças entre os grupos especificados a *priori* em um conjunto de dados multivariados. Através da CVA é possível verificar a relação da magnitude de diferenças entre os grupos e aquela dentro de cada grupo. Deste modo os subgêneros de *Culex* foram ordenados usando a análise de variável canônica. A influência alométrica do tamanho da variação da forma da asa foi 0,72% (P= 0.031) e, embora tenha sido pequena, não foi retirada da análise por considerá-la parte do processo de identificação das espécies (Dujardin, 2008; Wilke et al., 2016).

Todos os espécimes foram reclassificados de acordo com a similaridade das asas. Os resultados da CVA para todas as espécies de *Culex* mostraram substancial segregação da forma média de cada grupo (grupo 1 vs. grupo 2 e grupo 2 vs. grupo 1). Observamos nessa validação que *Cx. quinquefasciatus,* quando comparado a todas as outras espécies, ficou isolado, sendo parcialmente sobreposto apenas com *Cx. eduardoi*. Resultados semelhantes também foram encontrados para *Cx. dolosus*, parcialmente sobreposto com *Cx. eduardoi* e em muito menor grau com *Cx. chidesteri* (Simões et al., 2020).

Cx. nigripalpus foi completamente separado de *Cx. acharistus, Cx. coronator, Cx. quinquefasciatus, Cx. eduardoi* e *Cx. dolosus*, e foi parcialmente sobreposto com *Cx. chidesteri*. *Cx. acharistus* se sobrepõe muito ao *Cx. chidesteri* e *Cx. declarator* e, em menor grau, a *Cx. habilitador* e *Cx. eduardoi* (Figura 11).

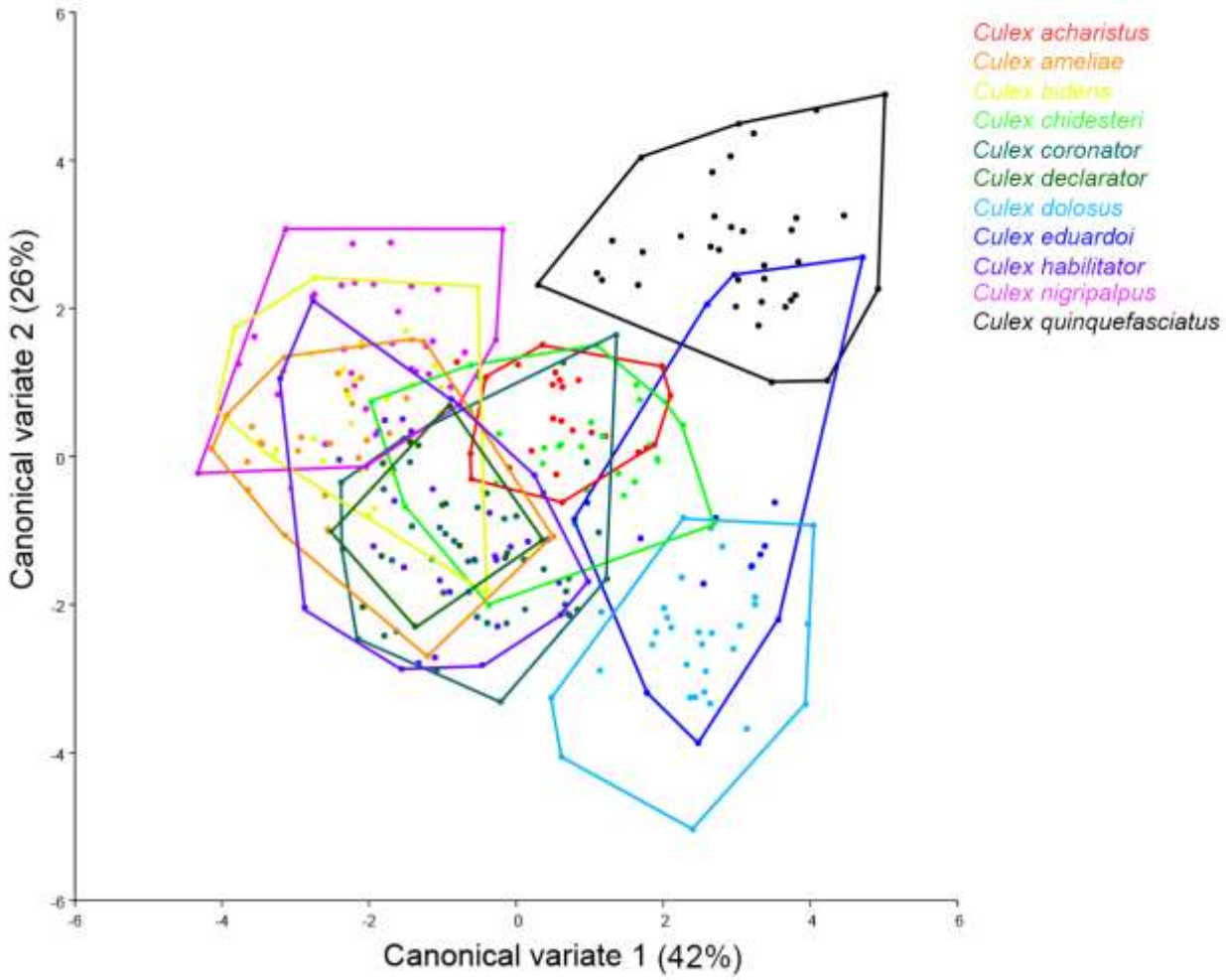


Figura 11- Espaço Morfológico produzido pelas duas primeiras variáveis canônicas para espécies de *Culex* baseados em 18 marcos anatômicos de asa. FONTE: Simões et al., 2020.

4.6.2 Árvore fenética

A árvore Neighbor - Joining mostra a segregação dos subgêneros com altos valores de *bootstrap* (>80) para todas as espécies (Figura 12). Esse resultado corrobora com os resultados encontrados na CVA. *Cx. quinquefasciatus* resultou no valor mais elevado (100), sendo segregado de todas as outras espécies. A segregação de *Cx. quinquefasciatus* ocorreu em um único ramo mostrando que ele é diferente de todas as outras espécies de *culex* da árvore. O mesmo ocorreu com *Cx. nigripalpus, Cx. chidesteri, Cx. declarator e Cx. acharistus* que foram segregados em um único ramo com altos valores de bootstrap (> 94). Algumas espécies agruparam com altos valores de bootstrap

(> 95): *Cx. dolosus e Cx. eduardoi, Cx. ameliae e Cx. bidens e Cx. coronator e Cx. habilitador*.

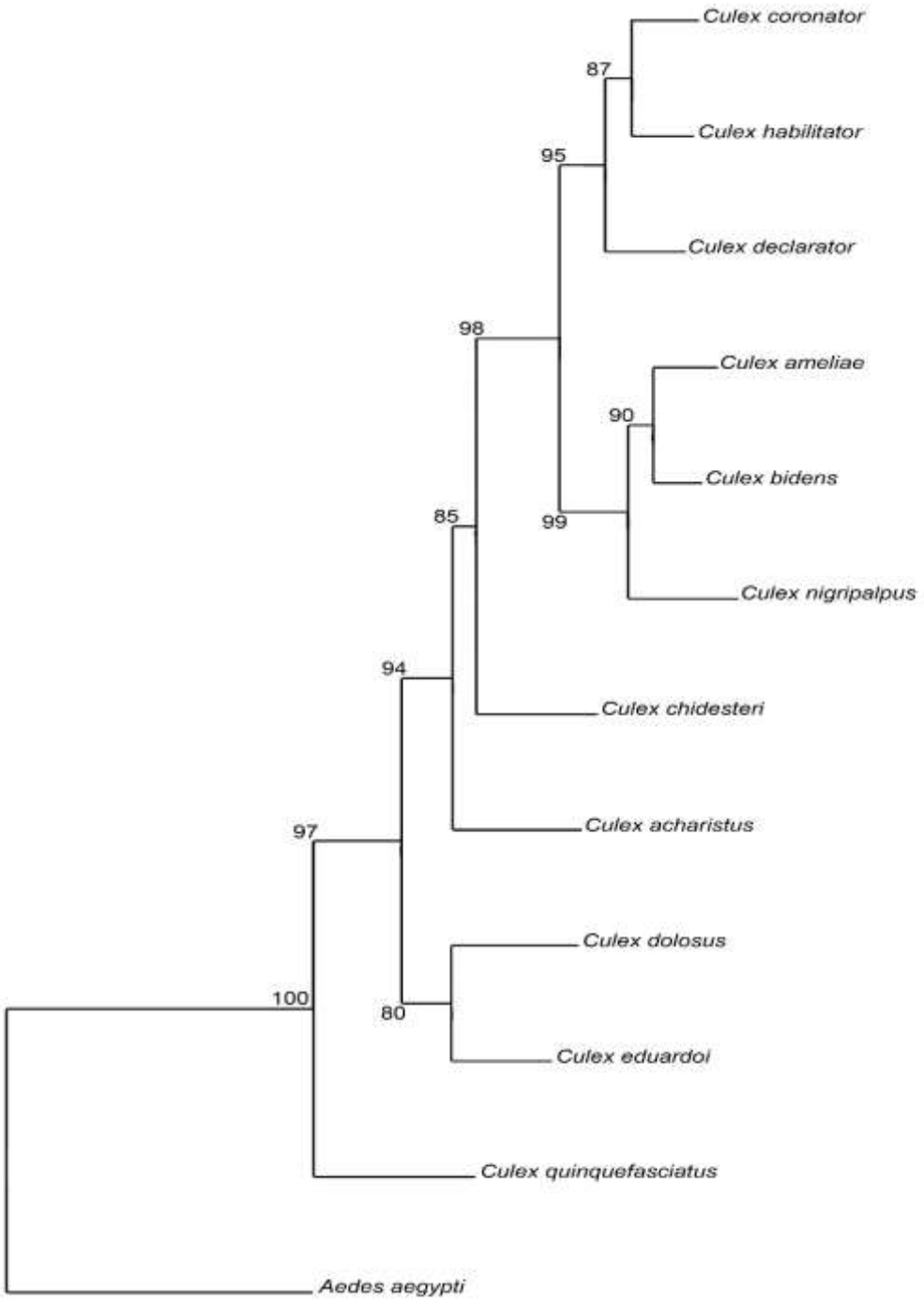


Figura 12- Árvore fenética construída pelo método de Neighbor-Joining baseado na distância de Mahalanobis com *bootstrap* de 1000 repetições. FONTE: Simões et al., 2020.

4.6.3 Teste de reclassificação cruzada

O teste de reclassificação cruzada resultou em valores altos com 82% de precisão (Tabela 7). Dos 110 testes possíveis, 13 atingiram 100% de precisão, 45 foram superiores a 90% e apenas seis apresentaram valores abaixo de 50% de precisão. *Cx. quinquefasciatus* se destaca por obter os maiores escores, com média de 94% de precisão, seguido por *Cx. dolosus* com 89% de precisão e *Cx. acharistus* com 87%. *Cx. declarator* teve a menor média de reclassificação com 73% de precisão. Os menores escores de reclassificação foram obtidos pela comparação entre *Cx. bidens* versus *Cx. ameliae* (44%) de precisão. A comparação entre *Cx. declarator* VS *Cx. acharistus*, *Cx. declarator* VS *Cx. bidens* e *Cx. habilitator* VS *Cx. declarator* mostrou 46% de acerto.

Tabela 7-Resultados de testes de reclassificação cruzada de espécies em pares (%).

	Culex acharistus	*Culex ameliae*	*Culex bidens*	*Culex chidesteri*	*Culex coronator*	*Culex declarator*	*Culex dolosus*	*Culex eduardoi*	*Culex habilitator*	*Culex nigripalpus*	*Culex quinquefasciatus*
Culex acharistus	0	90	89	89	83	46	97	73	91	88	91
Culex ameliae	88	0	44	83	74	77	100	100	66	74	91
Culex bidens	84	57	0	79	81	46	100	87	69	62	94
Culex chidesteri	92	87	96	0	93	62	91	80	94	91	89
Culex coronator	88	83	67	72	0	62	84	67	47	88	91
Culex declarator	64	80	48	59	81	0	94	73	59	82	94
Culex dolosus	100	93	93	90	91	77	0	53	97	100	94
Culex eduardoi	72	97	81	86	91	92	63	0	81	94	71
Culex habilitator	96	73	67	86	58	46	88	67	0	85	94
Culex nigripalpus	100	77	63	79	81	85	100	93	78	0	97
Culex quinquefasciatus	92	100	100	100	91	100	100	60	100	97	0

Valores abaixo da diagonal correspondem aos mosquitos do grupo 1 em comparação ao grupo 2 e identificados corretamente; valores acima da diagonal correspondem aos mosquitos do grupo 2 em relação ao grupo 1 e identificados corretamente. Valor P (paramétrico): <0,0001.

5 DISCUSSÃO

5.1 Detecção de *Plasmodium* e *Haemoproteus* em mosquitos da família Culicidae no Zoológico de SP

Compreender a biodiversidade das espécies de mosquitos e sua associação com ações antrópicas em área florestal é extremamente importante para o conhecimento das mudanças nas populações de mosquitos, além de entender a transmissão de patógenos (Abella-Medrano et al., 2015; Loaiza et al., 2019).

A diversidade de vetores de hemosporídeos de aves é pouco estudada na região Neotropical e mais especificamente aqui na Mata Atlântica. No presente estudo coletamos mosquitos da família Culicidae semanalmente no mês de março de 2015, sendo oito locais diferentes que incluem as áreas de LPI por *Plasmodium/Haemoproteus* realizada em um estudo anterior do nosso grupo (Chagas et al., 2017). O mês de março foi escolhido por ser fim de verão/início do outono no hemisfério sul. Embora alguns estudos tenham mostrado que o número de mosquitos capturados no verão seja maior, é no outono que a positividade para parasitas hemosporídeos atinge o ápice (Ferraguti et al., 2013).

O índice H mostrou que a biodiversidade de Culicidae na área estudada é em média classificada como baixa principalmente devido à abundância de poucas espécies de mosquitos como *Ae. scapularis* e *Culex* spp. Entretanto, esses grupos de espécies são conhecidos como importantes vetores de diversos arbovírus e outros parasitas e, aliado à presença de diversas espécies de aves residentes e migratórias, sugere a área estudada com potencial entrada para doenças emergentes na cidade de São Paulo.

A maior parte (três quartos) dos mosquitos coletados neste estudo foi identificada como gênero *Culex* e esse fato pode explicado tanto pelo método quanto pelo período de captura, uma vez que *Culex* são considerados mosquitos noturnos, horário de funcionamento das armadilhas (Talken et al., 2013; Martínez et al.; 2015).

Além disso, foi possível identificar uma diferença na prevalência de espécies de mosquitos dependendo do local de amostragem, com tendência de encontrar mais espécies de *Culex* em áreas com menos alterações antrópicas. Cinco espécies foram identificadas como potenciais vetores de parasitas de *Plasmodium* aviários, três deles pertencentes ao gênero *Culex*. Esses achados, aliados ao alto grau de preferência alimentar ornitofílica encontrada nos mosquitos desse estudo, corroboram com a ideia de que este deve ser de fato o principal gênero de vetores desses parasitas em aves da região.

É importante notar que, para analisar se uma espécie de Culicidae é um vetor competente do *Plasmodium*, é necessário que os esporozoítas, estágio infectante dos parasitas dos hemosporídeos sejam detectados nas glândulas salivares dos insetos (Njabo et al., 2009.), cuja a analise requer dissecção dos insetos e preparação de lâminas (Žiegytė e Valkiunas, 2014). Sendo assim é importante analisar cuidadosamente a porção cabeça/tórax, onde se encontra o DNA do parasita. Nesse presente estudo 13 amostras pertencentes a cinco espécies [*Ae. (Stg.) albopictus, Ae. (Och.) scapularis, Cx. (Cux.) maxi, Cx. (Cux.) nigripalpus e Culex (Cux.)* complexo *coronator*] e dois subgêneros sem identificação de espécie [*Ma. (Man.)* sp *e Cx. (Cux.)* sp] foram positivos na PCR para *Plasmodium/Haemoproteus*.

Poucas espécies de mosquitos são atualmente consideradas competentes para a transmissão de *Plasmodium* a pássaros embora vários gêneros como *Aedes, Anopheles, Culex e Culiseta* têm sido mostrados como os vetores mais importantes (Lapointe et al., 2005; Valkiūnas, 2005; Santiago-Alarcon et al., 2012). Das espécies encontradas positivas, apenas *Ae. albopictus* e *Cx. (Cux.) nigripalpus* já foram relatados abrigando infecção por hemosporídeos na literatura (Santiago-Alarcon et al., 2012; Martínez-de la Puente et al., 2015). Assim, nesse estudo, expandimos a lista de potenciais vetores da malária aviária, com as primeiras detecções de DNA de *Plasmodium* em *Ae. scapularis, Cx. maxi e Cx. (Cux.) coronator.*

No Brasil foi relatada a ocorrência de linhagens de *Plasmodium* aviário em duas espécies de mosquitos (*Mansonia titillans* e *Mansonia pseudotitillans*) (Ferreira et al., 2016). Contudo, é provável que as espécies de *Mansonia* desempenhem algum papel na transmissão da malária aviária no país, porém são necessários mais estudos para confirmar este achado, bem como as espécies envolvidas neste processo. Além disso, sobre a descoberta de DNA de *Haemoproteus (Parahaemoproteus)* em *Mansonia (Man.)* sp. e *Aedes scapularis*, é importante notar que esses parasitas são transmitidos por mosquitos do gênero *Culicoides* (Ceratopogonidae) e não por mosquitos (Valkiūnas, 2005; Santiago-Alarcon et al., 2012).*Parahaemoproteus* é o grupo mais diverso de hemosporídeos de aves (Valkiūnas, 2005; Bensch et al., 2009), entretanto as espécies vetoras foram determinadas apenas para um pequeno número de parasitas (Santiago-Alarcon et al., 2012; Bukauskaite et al, 2019). Embora a presença de DNA de *Haemoproteus* em Culicidae já tenha sido relatada (Ishtiaq et al., 2008; Njabo et al., 2011; Valkiūnas et al., 2013; Martínez-de la Puente et al., 2015), isso não significa que esses

insetos possam desempenhar um papel na sua transmissão. Modelos experimentais de mosquitos e aves infectadas por *Haemoproteus* demonstraram que esses parasitas são incapazes de se desenvolver em mosquitos (Valkiūnas et al., 2013; Gutiérrez-López et al., 2016).

Valkiunas et al., (2013) relataram o desenvolvimento de duas espécies de *Haemoproteus* em mosquitos *Ochlerotatus cantans*, mostrando que o desenvolvimento de oocistos ocorre em todo o trato digestivo do mosquito (cabeça, tórax e abdômen), resultado na presença de DNA do parasita que pode servir como molde em protocolos de PCR. Em saliva de mosquitos expostos a aves infectadas por *Plasmodium* e *Plasmodium/Haemoproteus* foi encontrado apenas DNA de *Plasmodium*, confirmando que os insetos Culicidae não suportam o desenvolvimento esporogônico de parasitas *Haemoproteus* (Gutiérrez-López et al., 2016). Esse fato mostra a importância da combinação de protocolos morfológicos e moleculares em estudos de vetores (Valkiunas et al., 2011).

Plasmodium nucleophilum (pDENPET03) foi a principal linhagem de parasitas detectada no presente estudo, mostrando que várias espécies de mosquitos podem transmiti-la. Essa mesma espécie de *Plasmodium* foi detectada em estudos anteriores conduzidos pelo nosso grupo, no local do estudo, sendo a espécie mais comum e relatada (Chagas et al., 2013, 2017).Além disso, a linhagem pCULMAX01, detectada em *Culex (Cux.) maxi*, apresentou 99% de identidade com pDENPET03 (apenas uma substituição de nucleotídeo).

A linhagem pVIOLI03 foi detectada nesse estudo em *Culex (Cux.) nigripalpus*, mas não foi detectada em aves nos estudos anteriores (Chagas et al., 2013, 2016, 2017). Uma hipótese para esse fato é que esta linhagem infecta principalmente passeriformes que foram pouco amostrados anteriormente, embora haja muita diversidade na área (principalmente de Turdidae) (Perrella et al., 2018). Em outro estudo realizado na região de Mata Atlântica foi possível observar que a linhagempVIOLI03 também foi encontrada em passeriformes de Vireonidae e Trochilidae (Anjos et al., 2021).

As linhagens pCULEX05 e pCULEX06 são novos registros no banco de dados MalAvi. No entanto, elas apresentaram 99% de identidade com pTUMIGO3, uma linhagem de *Plasmodium unalis.* Este parasito foi descrito na Colômbia em Turdidae (Mantilla et al., 2013), sendo também comumente encontrado na família de passeriformes, inclusive na Mata Atlântica (Anjos et al., 2021). Porém pTUMIGO3

também pode infectar pássaros de outras famílias na América do Sul e do Norte (http://130.235.244.92/Malavi/index.html). Além disso, essa linhagem foi encontrada em *Mansonia pseudotitillans* na Caatinga (Ferreira et al., 2016).

A linhagem hAEDSCA01 é um novo *Haemoproteus (Parahaemoproteus)* sp. no banco de dados MalAvi. Está relacionada à linhagem hELAALB01 que foi relatada na Mata Atlântica em *Elaenia albiceps*, uma espécie de passeriforme migratória (Anjos et al.; 2021). A linhagem hMYISWA01, também de *Haemoproteus (Parahaemoproteus)* sp., encontrada no presente estudo, já foi relatada no Brasil (Fecchio et al. 2017, 2019) porém em outros dois biomas brasileiros: Cerrado e Caatinga. Assim, com esses achados, estamos ampliando a área de ocorrência desta linhagem de hemosporídeo no território brasileiro.

5.2 Identificação de repasto sanguíneo

A fonte de repasto sanguíneo de uma das fêmeas ingurgitadas desse estudo mostrou que uma das sequencias detectada obteve 99% (353/358bp) de identidade com uma das sequencias de *Ardea herodias* (GenBank #AY509650), um pássaro da família *Ardeidae* com distribuição geográfica na América Central e do Norte (IUCN, 2020). Em um estudo recente de avifauna realizado no local do estudo, esta espécie de ave não foi relatada (Perrella et al., 2018). Situação semelhante pode ser observada na sequência do urubu-de-cabeça-amarela *(Cathartes melambrotus)* detectado no *Cx. (Cux.) declarator*. Esta espécie de Cathartidae ocorre na Região Amazônica não sendo encontrada na cidade de São Paulo. É importante salientar que no período de coleta desses mosquitos, o Zoológico de São Paulo não mantinha nenhuma dessas espécies em cativeiro. Esses relatos podem ser explicados pelo simples fato de que nem todas as espécies de aves brasileiras possuem registros de sequencias de *cytb* depositadas no banco de dados do GenBank, dificultando a identificação precisa das espécies por comparação.

Vale ressaltar que DNA de *Pipile jacutinga e Pavo muticus* foram detectados em fontes de repasto sanguíneo em mosquitos coletados no recinto BA, onde ficam localizadas essas aves. Estas duas espécies de pássaros foram consideradas positivas no passado, com *P. jacutinga* abrigando infecções por *P. nucleophilum* pDENPET03 (Chagas et al., 2017). Já nos recintos R69 e PO, que ficam localizados nas margens dos lagos, foram detectados mosquitos que se alimentaram de *Cygnus atratus*. Ainda, no BA foi possível identificar um mosquito que realizou repasto sanguíneo em *Spizaetus*

ornatos, uma espécie encontrada apenas nos recintos Extra ou recinto 113, a 300 m de distância. Por fim, a detecção de sangue de *Nycticorax nycticorax* em mosquitos da família Culicidae reforça a possibilidade de os parasitas serem transmitidos entre aves cativas e de vida livre.

5.3 Morfometria geométrica alar de *Culex*

A filogenia e taxonomia das espécies do gênero *Culex* é bastante complexa e tem sido tema de discussão nas últimas décadas (Harbachet al., 2012). Os processos micro evolutivos e de especiação tornam mais complexo a correta identificação dessa espécie (Suesdek, et al.; 2019.). Espécies crípticas como *Cx. quinquefasciatus, Cx. pipiens* e o complexo *coronator,* necessitam de ferramentas taxonômicas adicionais para identificação correta das espécies de *Culex* (Morais et al., 2010; Wilke et al., 2014).

No presente estudo, identificamos 11 espécies simpátricas do subgênero *Culex* com altos graus de confiança usando a técnica WGM com base em análises quantitativas de caracteres de venação da asa dos mosquitos. É importante salientar, que, com exceção de *Cx. quinquefasciatus*, todas as espécies de *Culex* utilizadas nesse estudo não são fáceis de identificar, mesmo para os entomologistas com alguma experiência. Entretanto, embora o WGM seja uma ferramenta muito útil para identificar populações, em alguns casos não é capaz de encontrar padrões de diferenciação clara (Vidal et al., 2014) e isso também pode acontecer com as espécies crípticas, sendo necessário o uso de WGM aliado a outras técnicas taxonômicas para aumentar substancialmente a acurácia e os *scores* da análise.

Neste estudo, analisamos 73% (11/15) das espécies do subgênero *Culex* coletadas (Medeiros-Sousa et al., 2013; Chagas, 2016). Considerando que todas as análises foram feitas para espécies do mesmo subgênero e, portanto, uma variação pequena seria esperada, pois a classificação das análises WGM foi confiável. Tanto o teste de reclassificação com a validação cruzada e os valores de bootstrap encontradas nas análises no NJ resultou em valores altos, mesmo comparados aos encontrados para espécies de diferentes gêneros (Wilke et al., 2016). Os resultados obtidos pelo teste de reclassificação foram altos, com valor médio de precisão de 82%. De todas as comparações aproximadamente 50% desses resultados produziram valores acima de 90%. Além disso, considerando que a menor média de reclassificação entre todas as comparações foi encontrada para *Cx. declarator* (73% de precisão), e apenas algumas comparações

pontuais resultaram em valores inferiores a 50%, acreditamos que esses resultados são confiáveis para serem usados em operações de rotina para controle dos mosquitos.

Em muitos estudos de variação interespecífica, WGM tem sido usado para identificar espécies baseado na reclassificação e nos scores. Analisando três espécies de *Aedes* da Tailândia, foram encontrados valores de 73 a 93% (Sumruaphol et al.; 2016) e em duas espécies de *Haemagogus* do Brasil, os valores foram de 67 a 81% (Silva, et al.; 2019). Ainda no Brasil, *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* pode ser distinguido pela forma da asa com taxas de precisão variando de 85 a 100% (Vidal, et al.; 2011) e para quatro espécies de *Culex (Cux.)* da Argentina, a reclassificação foi 100% em *Cx. bidens* e *Cx. mollis*, 89% em *Cx. interfor* e 94% em *Cx. tatoi* (Laurito et. al.; 2015). A validação cruzada e a reclassificação mostraram que WGM é um método analítico eficaz para distinguir as espécies de *Anopheles (Kerteszia) bellator, An. cruzii* e *An. homunculus* com índice de confiabilidade de 78 a 88% (Lorenz et al., 2012).

Todavia, quando a análise foi realizada com um número maior de espécies, mas especificamente 11 *Anopheles* da Colômbia, como aqui no estudo usando *Culex* os escores de reclassificação foram mais baixos chegando a menos de 80% para seis espécies e menos 75% para oito espécies, entretanto tiveram pontuações de 46%, 66% e 69%, para *An. benarrochi, An. oswaldoi e A. strodei* (Jaramillo et al., 2015).

O valor de *bootstrap* mais baixo na análise NJ foi 80 para *Cx. dolosus* e *Cx. eduardoi.* Estas espécies são particularmente desafiadoras para identificar por caracteres morfológicos tradicionais, uma vez que os espécimes na fase adulta são difíceis de distinguir e os estágios larvais têm apenas algumas diferenças que podem ser utilizadas para correta identificação (Harbach et al., 2012).Além disso, vale a pena considerar que o menor número de amostra de *Cx. eduardoi* (n = 15) e sua alta heterogeneidade no morfoespaço podem ser fatores limitantes para interpretações envolvendo esta espécie.

Fêmeas de *Cx. bidens* e de *Cx. ameliae* são morfologicamente muito semelhantes, e tais semelhanças resultam em uma maior dificuldade na separação dessas espécies, o que pode explicar a proximidade entre elas na árvore de NJ. Contudo neste estudo, conseguimos fazer a diferenciação morfológica pelas escamas presentes no occipício. A proximidade das fêmeas de *Culex* do complexo *coronator* com as fêmeas de *Cx. habilitator* na árvore de NJ pode ser explicada por elas apresentarem os tarsos semelhantemente bem marcados. As duas espécies apresentam semelhanças morfológicas relacionadas à cobertura de escamas de apêndices da cabeça, como palpos, probóscides e

partes do escudo no tórax. A maioria das fêmeas de *Cx. habilitator* coletadas aqui nesse estudo apresentava tarsos pouco marcados de cor clara, característica que inclui esses espécimes na chave taxonômica junto com *Cx. pseudojanthinosoma*, e não com *Culex* do complexo *coronator*, e em dicotomia com *Cx. scimitar*. Entretanto, esta é a única característica semelhante. Outras características semelhantes para *Cx. habilitador* e *Cx. pseudojanthinosoma* referem-se às escamas da tromba e do tórax, sendo as mesmas do complexo Coronator.

Cx. quinquefasciatus e *Cx. nigripalpus* são os principais vetores do vírus do Nilo Ocidental (WNV), Encefalite Equina Oriental (EEE) e filariose linfática (LF) (Turell et al., 2001; Samy et al., 2016). Juntas, essas doenças afetam milhões de pessoas em todo o mundo e colocam em risco quase metade da população mundial (Kramer et al., 2008; Cano et al., 2014). *Cx. quinquefasciatus* e *Cx. nigripalpus* pode ser encontrado em grande número em ambientes urbanos.

Os países em desenvolvimento que passaram por processos caóticos de urbanização muitas vezes carecem de saneamento básico, resultando em rios poluídos e esgotos não tratados. Esses recursos são intensamente explorados por algumas espécies de mosquitos que são capazes de se desenvolver em tais condições, nas quais se alimentam de sangue a maioria das vezes os hospedeiros são humanos, para maturação dos ovos e fazem a ovoposição em habitats altamente poluídos, ricos em matéria orgânica e livres de predadores naturais (Who, 2012; Lizzi et al., 2014; Darsie et al., 2000; Forattini, 2002; Santiago-Alarcon et al., 2012).

As espécies do subgênero *Culex* também são capazes de transmitir a malária aviaria a pássaros de várias espécies em todo o mundo, incluindo espécies ameaçadas de extinção (Cosgrove, 2004). A correta identificação dos mosquitos *Culex* ao nível de espécie é fundamental para permitir o melhor mapeamento dos riscos de infecção, desenvolver estratégias eficazes de controle desses mosquitos, além de aumentar nosso conhecimento sobre a interação patógeno-hospedeiro.

Embora WGM tenha se mostrado uma ferramenta útil para identificar espécies de mosquitos, alguns obstáculos ainda precisam ser superados antes que essa técnica possa ser usada na rotina de controle de mosquitos. O futuro desenvolvimento e manutenção de bancos de dados confiáveis ajudariam muito a desenvolver e validar as diretrizes e protocolos do WGM, impactando diretamente sua utilidade e eficácia em identificação de espécies de mosquitos em escala global. Contudo, em sua forma atual, os padrões de

identificação do WGM podem ser consideravelmente úteis para identificar espécies cuja identificação tradicional é difícil. WGM também pode ser usado em conjunto com as técnicas tradicionais e moleculares servindo como uma opção ao invés de uma estratégia antagônica.

6 CONCLUSÕES

- Expandimos a lista de potenciais vetores da malária aviária, com as primeiras detecções de DNA de *Plasmodium* em *Aedes scapularis*, *Culex (Cux.) maxi* e *Culex (Cux.)* complexo *coronator*.

- Identificamos quatro novas linhagens de hemosporídeos nos mosquitos sendo pDENPET03 a linhagem mais comum em circulação na área do Zoológico de São Paulo.

- A detecção de sangue de *Nycticorax nycticorax* em mosquitos da família Culicidae reforça a possibilidade de os parasitas serem transmitidos entre aves cativas e de vida livre.

- A técnica WGM é uma ferramenta útil para identificar espécies do subgênero *Culex*.

- Os altos valores obtidos do teste de reclassificação com validação cruzada e na análise de NJ bem como a segregação observada na análise de variável canônica mostraram que é possível distinguir as espécies de *Culex* utilizadas neste estudo com alto grau de confiança para maioria das espécies.

- A identificação molecular, em conjunto com outras técnicas de identificação é importante para conhecemos melhor o vetor e conseguirmos identificar molecularmente esses parasitos em mosquitos brasileiros.

REFERÊNCIAS

Abella-Medrano, C.A.; Ibáñez-Bernal, S.; MacGregor-Fors, I.; Santiago-Alarcon, D. Spatiotemporal variation of mosquito diversity (Diptera: Culicidae) at places with different land-use types within a neotropical montane cloud forest matrix. Parasit Vectors. 2015 Sep 24;8:487. doi: 10.1186/s13071-015-1086-9.

Almirón, W.R.; Harbach, R.E. Taxonomy and biology of *Culex* (*Culex*) *maxi* Dyar (Diptera: Culicidae) in South America. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996;91(5), 579–588. doi:10.1590/s0074.

Alto, B.W.; Connelly, C.R.; O'Meara, G.F.; Hickman, D.; Karr, N. Reproductive biology and susceptibility of Florida *Culex coronator* to infection with West Nile virus. Vector Borne Zoonotic Dis. 2014 Aug;14(8):606-14. doi: 10.1089/vbz.2013.1501.

Anjos, C.C.; Chagas, C.R.F.; Fecchio, A.; Schunck, F.; Costa-Nascimento, M.J.; Monteiro, E.F.; Mathias, B.S.; Bell, J.A.; Guimarães, L.O.; Comiche, K.J.M.; Valkiūnas, G.; Kirchgatter, K. Avian Malaria and Related Parasites from Resident and Migratory Birds in the Brazilian Atlantic Forest, with Description of a New *Haemoproteus* Species. Pathogens. 2021 Jan 21;10(2):103. doi: 10.3390/pathogens10020103.

Atkinson, C.T.; Dusek, R.J.; Woods, K.L.; Iko, W.M. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. J Wildl Dis. 2000 Apr;36(2):197-204. doi: 10.7589/0090-3558-36.2.197.

Atkinson, C.T.; Van Riper III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon, and Haemoproteus. In: Loye, J. E.; Zuk, M. Bird-parasite interactions: ecology, evolution and behaviour. New York: Oxford University Press, p. 19-48, 1991.

Atkinson, C.T. Avian Malaria. In: Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB. Parasitic diseases of wild birds. Ames: Wiley-Blackwell. Publishing; 2008. P. 35-53.

Baliton, R.S.; Wulandari, C.; Landicho, L.D.; Cabahug, R.E.D.; Paelmo, R.F.; Comia, R.A.; Visco, R.G.; Budiono, P.; Herwanti, S.; Rusita, Castillo AKSA. 2017. Ecological services of agroforestry landscapes in selected watershed areas in the Philippines and Indonesia. Biotropia 2017, 24, 71-84.

Balseiro, E. Análisis de la actividad nocturna de *Culex* (*C.*) *eduardoi* García y Casal y *Aedes* (*O.*) *crinifer* (Theobald) (Diptera, Culicidae), mediante el empleo de un atractivo lumínico. Rev. Soc. Entomol. Argent.1981;40: 211-219.

Belkin, J. N.; Schick, R. X.; Heineman, S. J. (1968) Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XI. Mosquitoes originally described from Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Perú and Uruguay. Contributions of the American Entomological Institute, 4 (1), 9–29.

Bensch, S.; Hellgren, O.; Pérez-Tris, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian host based on mitochondrial cytochome b lineages. Mol Ecol Resour. 2009;9(5):1353-8.

Bookstein, F.L. 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press, Cambridge, p-455.

Börstler, J.; Lühken, R.; Rudolf, M.; Steinke, S.; Melaun, C.; Becker, S.; Garms, R.; Krüger, A. The use of morphometric wing characters to discriminate female *Culex pipiens* and *Culex torrentium*. J Vector Ecol. 2014 Jun;39(1):204-12. doi: 10.1111/j.1948-7134.2014.12088.x. PMID: 24820574.

Bracco, J.E.; Capurro, M.L.; Lourenco-De-Oliveira, R.; Mureb Sallum, M.A. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102;102:573-80.

Bram, R.A. Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera, Culicidae). Proc. U. S. Natl. Mus. 1967, 120, 1–122.

Bueno, M.G.; Lopez, R.P.; de Menezes, R.M.; Costa-Nascimento, M.J.; Lima, G.F.; Araújo, R.A.; Guida, F.J.; Kirchgatter, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. Vet Parasitol. 2010 Oct 11;173(1-2):123-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.026.

Bukauskaitė D, Iezhova TA, Ilgūnas M, Valkiūnas G. High susceptibility of the laboratory-reared biting midges *Culicoides nubeculosus* to *Haemoproteus* infections, with review on *Culicoides* species that transmit avian haemoproteids. Parasitology 2019, 146, 333-341.

Caldera, S.M.; Jaramillo, M.C.; Cochero, S.; Pérez-Doria, A.; Bejarano, E.E. Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municípios Del norte de Colombia, com baja y alta incidência de dengue. Biomédica. 2013;33:89-98.

Cano, J.; Rebollo, M.P.; Golding, N.; Pullan, R.L.; Crellen, T.; Soler, A.; Kelly-Hope, L.A.; Lindsay, S.W.; Hay, S.I.; Bockarie, M.J.; Brooker, S.J. The global distribution and transmission limits of lymphatic filariasis: past and present. Parasit Vectors. 2014 Oct 11;7:466. doi: 10.1186/s13071-014-0466-x.

Casiraghi, M.; Labra, M.; Ferri, E.; Galimbert, A.; De Mattia, F. DNA barcoing: a sis-question tour to improve users´ awareness about the method. Briefings In Bioinformatics., 11 (4), pp. 440-453. 2010.

CDC. Center for Disease Control and Prevention – Division of Vector Borne Infectious Diseases – West Nile Vírus [acessado em 05-02-2019]. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnilo/mosquitoSpecies.#06,2019.

Chagas, C.R.; Valkiūnas, G.; Nery, C.V.; Henrique, P.C.; Gonzalez, I.H.; Monteiro, E.F.; Guimarães, L.de O.; Romano, C.M.; Kirchgatter, K. *Plasmodium* (*Novyella*) *nucleophilum* from an Egyptian Goose in São Paulo Zoo, Brazil: microscopic confirmation and molecular characterization. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2013 Oct 3;2:286-91. doi: 10.1016/j.ijppaw.2013.09.008.

Chagas, C.R.; Guimarães, L.O.; Monteiro, E.F.; Valkiūnas, G.; Katayama, M.V.; Santos, S.V.; Guida, F.J.; Simões, R.F.; Kirchgatter, K. Hemosporidian parasites of free-living birds in the São Paulo Zoo, Brazil. Parasitol Res. 2016 Apr;115(4):1443-52. doi: 10.1007/s00436-015-4878-0.

Chagas, C.R.; Valkiūnas, G.; de Oliveira Guimarães, L.; Monteiro, E.F.; Guida, F.J.; Simões, R.F.; Rodrigues, P.T.; de Albuquerque Luna, E.J.; Kirchgatter K. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. Malar J. 2017 Feb 17;16(1):83. doi: 10.1186/s12936-017-1729-8.

Chagas, C.R.F. *Plasmodium* spp. em aves Silvestres da Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Identificação de Espécies por Microscopia e Sequenciamento do Gene Mitocondrial Citocromo b. Ph.D. Tese, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2016.

Chinnery, P.F.; Thorburn, D.R.; Samuels, D.C.; White, S.L.; Dahl, H.M.; Turnbull, D.M.; Lightowlers, R.N.; Howell, N. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? Trends Genet. 2000 Nov;16(11):500-5. doi: 10.1016/s0168-9525(00)02120-x.

Christe, R.O.; Wilke, A.B.B.; Vidal, P.O.; Marrelli, M.T. Wing sexual dimorphism in *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). Infect Genet Evol. 2016 Nov;45:434-436. doi: 10.1016/j.meegid.2016.10.007.

Christensen, B.M.; Barnes, H.J.; Rowley, W.A. Vertebrate host specificity and experimental vectors of *Plasmodium* (*Novyella*) *kempi* sp. n. from the eastern wild turkey in Iowa. J Wildl Dis. 1983 Jul;19(3):204-13. doi: 10.7589/0090-3558-19.3.204.

Clark, N.J.; Clegg, S.M.; Lima, M.R. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. Int. J. Parasitol. 2014;44(5);329-38.

Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de-Oliveira, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1994.

Cosgrove, C. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia—Gediminas Valkiunas; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2004; 932p, ISBN 0-415-30097-5.

Costa Ribeiro, M.C.V.; Tissot, A.C.; Silva, M.A.N. Distribuição sazonal de *Culex* (*Culex*) *eduardoi* Casal & Garcia (Diptera, Culicidae) em criadouros antrópicos introduzidos em mata residual degradada, área urbana de Curitiba, Paraná, Brasil. Revta Bras. Zool. 2002;19(Supl. 1): 149-155.

Cox, F.E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasit Vectors. 2010 Feb 1;3(1):5. doi: 10.1186/1756-3305-3-5.

Danilewsky B. Zur Parasitologie des Blutes. Biologisches Zentralblatt, Leipzig, n.5, p.529-537. 1886.

Darsie, R.F. Jr; Taylor, D.S.; Prusak, Z.A.; Verna, T.N. Checklist of the mosquitoes of the Bahamas with three additions to its fauna and keys to the adult females and fourth instars. J Am Mosq Control Assoc. 2010 Jun;26(2):127-34. doi: 10.2987/09-5982.1.

Darsie, R.F.; Morris, C.D. Keys to the Adult Females and Fourth Instar Larvae of the Mosquitoes of Florida (Diptera, Culicidae), 1st ed.; Technical Bulletin of the Florida Mosquito Control Association; Florida Mosquito Control Association, Inc.: Fort Myers, FL, USA, 2000.

Demari-Silva, B.; Foster, P.G.; de Oliveira, T.M.; Bergo, E.S.; Sanabani, S.S.; Pessôa, R., Sallum, M.A. Mitochondrial genomes and comparative analyses of *Culex camposi*, *Culex coronator*, *Culex usquatus* and *Culex usquatissimus* (Diptera: Culicidae), members of the coronator group. BMC Genomics. 2015 Oct 21;16:831. doi: 10.1186/s12864-015-1951-0.

Demari-Silva, B.; Vesgueiro, F.T.; Sallum, M.A,; Marrelli, M.T. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. J Med Entomol. 2011 Mar;48(2):272-9. doi: 10.1603/me09293.

Devicari, M.; Lopes, A.R.; Suesdek, L. Dimorfismo sexual alar em *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae). Biota Neotropica 2011;11(2), 165–169.

Dujardin, J.P. Morphometrics applied to medical entomology. Infect Genet Evol. 2008 Dec;8(6):875-90. doi: 10.1016/j.meegid.2008.07.011.

Fecchio, A.; Chagas, C.R.F.; Bell, J. A.; Kirchgatter, K. Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. Acta Trop. 2020, 204, 105364.

Fecchio, A.; Ellis, V.A.; Bell, J.A.; Andretti, C.B.; D'Horta, F.M.; Silva, A.M.; Tkach, V.V.; Weckstein, J.D. Avian malaria, ecological host traits and mosquito abundance in southeastern Amazonia. Parasitology. 2017 Jul;144(8):1117-1132. doi: 10.1017/S003118201700035X.

Fecchio, A.; Wells, K.; Bell, J.A.; Tkach, V.V.; Lutz, H.L.; Weckstein, J.D.; Clegg, S.M.; Clark, N.J. Climate variation influences host specificity in avian malaria parasites. Ecol Lett. 2019 Mar;22(3):547-557. doi: 10.1111/ele.13215.

Feldman, R.A.; Freed, L.A.; Cann, R.L. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. Mol Ecol. 1995;4(6):663-73.

Ferraguti, M.; Martínez-de la Puente, J.; Muñoz, J.; Roiz, D.; Ruiz, S.; Soriguer, R.; Figuerola, J. Avian *Plasmodium* in *Culex* and *Ochlerotatus* Mosquitoes from Southern Spain: Effects of Season and Host-Feeding Source on Parasite Dynamics. PLoS One. 2013 Jun 18;8(6):e66237. doi: 10.1371/journal.pone.0066237.

Ferreira, F.C. Jr.; Rodrigues, R.A.; Sato, Y.; Borges, M.A.; Braga, É.M. Searching for putative avian malaria vectors in a Seasonally Dry Tropical Forest in Brazil. Parasit Vectors 2016, 9, 587.

Ferreira, I.B.; Pereira, L.E.; Rocco, I.M.; Marti, A.T.; de Souza, L.T.; Iversson, L.B. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest Region, State of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1994 May-Jun;36(3):265-74. doi: 10.1590/s0036-46651994000300011.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadoresmoleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

Figueiredo, L.T. The Brazilian flaviviruses. Microbes Infect. 2000 Nov;2(13):1643-9. doi: 10.1016/s1286-4579(00)01320-4.

Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994, 3, 294–299.

Forattini, O. P. Culicidologia Médica: identificação, biologia e epidemiologia. São Paulo: EDUSP; 2002.

Forattini, O.P.; Kakitani, I.; Massad, E.; Marucci, D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 10- Survey of adult behaviour of *Culex nigripalpus* and other species of *Culex* (*Culex*) in south-eastern Brazil. Rev Saude Publica. 1995 Aug;29(4):271-8. doi: 10.1590/s0034-89101995000400003.

Forattini, O.P. Breve nota sobre variações em espécies de *Anopheles* (Diptera:Culicidae). Rev Bras Ent. 1964, 11, 139-40.

Forattini, O.P. Culicidologia médica. Identificação, biologia, epidemiologia.v. 2 São Paulo: Edusp; 2002.

Forrester, D. J.; Greiner, E. C. Leucocytozoonosis. In: Atkinson, C. T.; Thomas, N. J.; Hunter, D. B. Parasitic diseases of wild birds. Ames: Wiley- Blackwell, p. 54-107, 2008.

Glaizot, O.; Fumagalli, L.; Iritano, K.; Lalubin, F.; Van Rooyen, J.; Christe, P. High prevalence and lineage diversity of avian malaria in wild populations of great tits (*Parus major*) and mosquitoes (*Culex pipiens*). Plos One. 2012;7(4):e34964.

Gouveia De Almeida, A.P. Os mosquitos em Portugal século XX. Acta Med Port. 2011; 24(6):961-974.

Graczyk, T.K.; Brossy, J.J.; Plös, A.; Stoskopf, M.K., 1995. Avian malaria seroprevalence in Jackass penguins (*Spheniscus demersus*) in South Africa. Journal of Parasitology 81, 703–707.

Grech, M.; Visintin, A.; Laurito, M.; Estallo, E.; Lorenzo, P.; Roccia, I.; Korin, M.; Goya, F.; Ludueña-Almeida, F.; Almirón, W. New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Neuquén and La Rioja provinces, Argentina. Rev Saude Publica. 2012 Apr;46(2):387-9. doi: 10.1590/s0034-89102012005000007.

Greiner, E.L.; Ritchie, B.W. Parasites. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. Avian medicine: principles and application. Lake Worth: Wingers Publishing; 1994.p.1007-29.

Guimarães, L.O.; Simões, R.F.; Chagas, C.R.F.; Menezes, R.M.T.; Silva, F.S.; Monteiro, E.F.; Holcman, M.M.; Bajay, M.M.; Pinter, A.; Camargo-Neves, V.L.F.; Kirchgatter, K. Assessing Diversity, *Plasmodium* Infection and Blood Meal Sources in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from a Brazilian Zoological Park with Avian Malaria Transmission. Insects. 2021; 12(3):215. https://doi.org/10.3390/insects12030215

Gutiérrez-López, R.; Martínez-de la Puente, J.; Gangoso, L.; Yan, J.; Soriguer, R.C.; Figuerola, J. Do mosquitoes transmit the avian malaria-like parasite *Haemoproteus*? An experimental test of vector competence using mosquito saliva. Parasit Vectors.2016,28,609.

Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser. 1999, 41, 95–98.

Hammer, O.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica, v. 4(1), n. 1, p. 1–9, 2001.

Harbach, R.E. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): The foundation formolecular systematics and phylogenetic research. Acta Trop. 2011**,** 120, 1–14.

Harbach, R.E.; Kitching, I.J.; Culverwell, C.L.; Dubois, J.; Linton, Y.M. Phylogeny of mosquitoes of tribeculicini (Diptera: Culicidae) based on morphological diversity. Zool. Scr. 2012, 41, 499–514.

Harr, K.E. Diagnostic Value of Biochemistry. In: HARRISON, G.J.; LIGHTFOOT, T.L. Clinical Avian Medicine. Spix Publishing, Inc., Florida. Cap. 23 p. 616, 2006.

Hebert, P.D.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; deWaard, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 2003 Feb 7;270(1512):313-21. doi: 10.1098/rspb.2002.2218.

Hebert, P.D.; Ratnasingham, S.; deWaard, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci. 2003 Aug 7;270 Suppl 1(Suppl 1):S96-9. doi: 10.1098/rsbl.2003.0025.

Hebert, P.D.N.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Janzen, D.H.; Hallwachs, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101, 14812- 14817.

Hellgren, O; Waldenström, J.; Bensch, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. J Parasitol. 2004, 90, 797–802.

International Union for Conservation of Nature and National Resources. The IUCN red list of threatened species. [Accessed 19 October 2020]. Version 2020-2. Available online: https://www.iucnredlist.org./.

Ishtiaq, F.; Guillaumot, L.; Clegg, S.M.; Phillimore, A.B.; Black, R.A.; Owens, I.P.; Mundy, N.I.; Sheldon, B.C. Avian haematozoan parasites and their associations with mosquitoes across Southwest Pacific Islands. Mol Ecol. 2008 Oct;17(20):4545-55. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03935.x.

Jaramillo, O.N.; Dujardin, J.P.; Calle-Londono, D.; Fonseca-González, I. Geometric morphometrics for the taxonomy of 11 species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) mosquitoes. Med. Vet. Entomol. 2015, 29, 26–36.

Kerr, K.C.R.; Lijtmaer, D.A.; Barreira, A.S.; Hebert, P.D.N.; Tubaro, P.L. Probing evolutionary patterns in neotropical birds though DNA barcodes. PlosOne. 2009, 4, 1-6.

Kerr, K.C.R.; Stoeckle, M.Y.; Dove, C.J.; Weidt, L.A.; Francis, C.F.; Hebert P.D.N. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. Mol. Notes 2007, 7, 535-543.

Kirchgatter, K.; Tubaki, R.M.; Malafronte, R.S.; Alves, I.C.; Lima, G.F.; Guimarães, L.O.; Zampaulo, R.A.; Wunderlich, G. *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* (Diptera: Culicidae)

in peridomiciliary area during asymptomatic malaria transmission in the Atlantic Forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014 Sep-Oct;56(5):403-9. doi: 10.1590/s0036-46652014000500006.

Klingenberg, C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Mol Ecol Resour. 2011 Mar;11(2):353-7. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x.

Kocher, T.D.; Thomas, W.K.; Meyer, A.; Edwards, S.V.; Pääbo, S.; Villablanca, F.X.; Wilson, A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Aug;86(16):6196-200. doi: 10.1073/pnas.86.16.6196.

Kramer, L.D.; Styer, L.M.; Ebel, G.D. A global perspective on the epidemiology of West Nile Virus. Annu. Rev. Entomol. 2008, 53, 61–81.

Lane, J. 1953. Neotropical Culicidae. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1112 pp.

La Pointe, D.A.; Goff, M. L.; Atkinson, C. T. Comparative susceptibility of introduced forest-dwelling mosquitoes in Hawai'i to avian malaria, *Plasmodium relictum*. J Parasitol. 2005, 91, 843-849.

Laurito, M.; Almirón, W.R.; Ludueña-Almeida, F.F. Discrimination of four *Culex* (*Culex*) species from the Neotropics based on geometric morphometrics. Zoomorphology 2015, 1611, 447–455.

Laurito, M.; Oliveira, T.M.; Almirón, W.R.; Sallum, M.A. 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(Suppl 1):110-22. doi: 10.1590/0074-0276130457.

Laurito, M.; Hoyos-López, R. First record of *Culex* (*Culex*) *bidens* (Diptera: Culicidae) in Colombia: Taxonomic and epidemiological implications. Acta Trop. 2018 Dec;188:251-257. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.09.010.

Laurito, M.; Visintin, A.M.; Almirón, W.R. *Culex saltanensis* morphological redescription of the immature and adult stages. J Am Mosq Control Assoc. 2008 Jun;24(2):203-10. doi: 10.2987/5641.1.

Lima-Camara, T.N.; Honório, N.A.; Lourenço-de-Oliveira, R. Parity and ovarian development of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) in metropolitan Rio de Janeiro. J Vector Ecol. 2007 Jun;32(1):34-40. doi: 10.3376/1081-1710(2007)32[34:paodoa]2.0.co;2.

Lizzi, K.M.; Qualls, W.A.; Brown, S.C.; Beier, J.C. Expanding Integrated Vector Management to promotehealthy environments. Trends Parasitol. 2014, 30, 394–400.

Loaiza, J.R.; Rovira, J.R.; Sanjur, O.I.; Zepeda, J.A.; Pecor, J.E.; Foley, D.H.; Dutari, L.; Radtke, M.; Pongsiri, M.J.; Molinar, O.S.; Laporta, G.Z. Forest disturbance and vector

transmitted diseases in the lowland tropical rainforest of central Panama. Trop Med Int Health. 2019 Jul;24(7):849-861. doi: 10.1111/tmi.13244.

Lorenz, C.; Almeida, F.; Almeida-Lopes, F.; Louise, C.; Pereira, S.N.; Petersen, V.; Vidal P.O.; Virginio, F.; Suesdek, L. Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured? Infect Genet Evol. 2017 Oct;54:205-215. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.029.

Lorenz, C.; Marques, T.C.; Sallum, M.A.M.; Suesdek, L. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*. Parasites Vectors 2012, 5, 257.

Lorenz, C.; Patané, J.S.; Suesdek, L. Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*. Infect Genet Evol. 2015 Oct;35:144-52. doi: 10.1016/j.meegid.2015.08.011.

Lunt, D.H.; Zhang, D.X.; Szymura, J.M.; Hewitt, G.M. The insect cytocrome oxidase I gene: evolucionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Mol Biol. 1996, 5, 153-165.

Luz, S.L.; Lourenço-de-Oliveira, R. Forest Culicinae mosquitoes in the environs of Samuel hydroeletric plant, State of Rondônia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996 Jul-Aug;91(4):427-32. doi: 10.1590/s0074-02761996000400008.

Mackay, A.J.; Kramer, W.L.; Meece, J.K.; Brumfield, R.T.; Foil, L.D. Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in East Baton Rouge Parish, Louisiana. J Med Entomol. 2010 Mar;47(2):238-48. doi: 10.1603/me09168.

Mantilla, J.S.; González, A.D.; Valkiūnas, G.; Moncada, L.I.; Matta, N.E. Description and molecular characterization of *Plasmodium* (*Novyella*) *unalis* sp. nov. from the Great Thrush (*Turdus fuscater*) in highland of Colombia. Parasitol Res.2013, 112, 4193-4204.

Martínez-de la Puente, J.; Muñoz, J.; Capelli, G.; Montarsi, F.; Soriguer, R.; Arnoldi, D.; Rizzoli, A.; Figuerola, J. Avian malaria parasites in the last supper: identifying encounters between parasites and the invasive Asian mosquito tiger and native mosquito species in Italy. Malar J. 2015 Jan 28;14:32. doi: 10.1186/s12936-015-0571-0.

Medeiros-Sousa, A.R.; Ceretti, W.Jr.; Urbinatti, P.R.; de Carvalho, G.C.; de Paula, M.B.; Fernandes, A.; Matos, M.O.Jr.; Orico, L.D.; Araujo, A.B.; Nardi, M.S.; Marrelli, M.T. Mosquito fauna in municipal parks of São Paulo City, Brazil: a preliminary survey. J Am Mosq Control Assoc. 2013 Sep;29(3):275-9. doi: 10.2987/12-6304R.1.

Meier, R.; Shiyang, K.; Vaidya, G.; Ng, P.K.L. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. Syst Biol. 2006, 55: 715-728.

Mitchell, C.J.; Francy, D.B.; Monath, T.P. 1980. Arthropod vectors. In: Monath TB ed. Sl. Louis encephaljtjs Washington, DC: American Public Health Association. p 313-379.

Monteiro, L.R.; Reis, S.F. 1999. Princípios de Morfometria Geométrica. Ribeirão Preto, Holos Editora Ltda, X+188p.

Moraes, D.A. (2003) A Morfometria Geométrica e a “Revolução na Morfometria”: localizando mudanças na forma dos organismos. Available from:

https://www.ufpe.br/mastozoologia/images/documentos/astua_de_moraes_2003_morfmetria_geometrica.pdf (accessed 29 March 2012)

Morais, S.A; Moratore, C.; Suesdek, L.; Marrelli, M.T. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2010, 105, 672–676.

Moritz, C.; Dowling, T.E.; Brown, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 1987;18:269-292.

Magurran, A.E.; Measuring Biological Diversity. Oxford, UK: Blackwell, 2004.

Nasci, R.S. A lightweight batterypowered aspirator for collecting resting mosquitoes in the Field. Mosq News. 1981;41:808-11.

Njabo, K.Y.; Cornel, A.J.; Bonneaud, C.; Toffelmier, E.; Sehgal, R.N.; Valkiūnas, G.; Russell, A.F.; Smith, T.B. Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. Mol Ecol. 2011 Mar;20(5):1049-61. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04904.x.

Njabo, K.Y.; Cornel, A.J.; Sehgal, R.N.; Loiseau, C.; Buermann, W.; Harrigan, R.J.; Pollinger, J.; Valkiūnas, G.; Smith, T.B. *Coquillettidia* (Culicidae, Diptera) mosquitoes are natural vectors of avian malaria in Africa. Malar J. 2009 Aug 10;8:193. doi: 10.1186/1475-2875-8-193.

Panayotova-Pencheva, M.S. Parasites in captive animals: a review of studies in some European zoos. Zool Garten. 2013, 82, 60–71.

Paraense, W.L. Infecção experimental do *Culex quinquefasciatus* pelo *Plasmodium juxtanucleare*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1944;41:535-540. doi: 10.1590/S0074-02761944000600010.

Patsoula, E.; Samanidou-Voyadjoglou, A.; Spanakos, G.; Kremastinou, J.; Nasioulas, G.; Vakalis, N.C. Molecular characterization of the *Anopheles maculipennis* complex during surveillance for the 2004 Olympic Games in Athens. Med Vet Entomol. 2007 Mar;21(1):36-43. doi: 10.1111/j.1365-2915.2007.00669.x.

Perrella, D.F.; Ferrari, D.S.; Katayama, M.V.; Paiva, R.V.; Guida, F.J. A Avifauna do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, um remanescente de Mata Atlântica imerso na área urbana de São Paulo, SP. Ornithologia 2018**,** 10, 4-16.

R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org/, 2020.

Ratnasingham, S.; Hebert, P.D. BOLD: The Barcode of Life Data System (http://www.barcodinglife.org). Mol Ecol Notes. 2007 May 1;7(3):355-364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.

Remsen, J. V.Jr.; Areta J. L.; Cadena, C. D.; Jaramillo, A.; Nores, M; Pacheco, J.F. et al. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists´Union, 2015.

Rohlf, F. J. The tps series of software. Hystrix, v. 26, n. 1, p. 1–4, 2015.

Rohlf, F.J. Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings. Pages 131–159 in L. F. Marcus, E. Bello and A. García-Valdecasas, (eds.), Contribution to morphometrics. Monografias del Museo Nacional de Ciencias Naturales 8, Madrid, 1993.

Rossi, G.C. Occurrence of extra and anomalous setae on pupal abdominal segment VIII of the Dolosus Complex of *Culex* (Diptera: Culicidae). J Am Mosq Control Assoc. 2006 Mar;22(1):1-4. doi: 10.2987/8756-971X(2006)22[1:OOEAAS]2.0.CO;2.

Rubinoff, D. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. Conserv Biol. 2006 Aug;20(4):1026-33. doi: 10.1111/j.1523-1739.2006.00372.x.

Rueda, L.M. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. Hydrobiologia. V. 595, p. 477-487, 2008.

Ruiz, F.; Linton, Y.M.; Ponsonby, D.J.; Conn, J.E.; Herrera, M.; Quiñones, M.L. et al. Molecular comparison of topotypic specimens confirms Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2010, 105, 899–903.

Sá, M.R. (2011). Os estudos em malária aviária e o Brasil no contexto científico internacional (1907-1945). História, Ciências, Saúde-Manguinhos, 18(2), 499–518.

Sá, M.R. The tropical medicine in Brazil: the discovery of Trypanosoma cruzi in the German School of Protozoology. Parassitologia, Roma, 2005, 47, 309-317.

Sallum, M.A.M.; Schultz, T.R.; Foster, P.G.; Aronstein, K.; Wirtz, R.A.; Wilkerson, R. C. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. Syst Entomol. 2002; 27(3): 361-82.

Samy, A.M.; Elaagip, A.H.; Kenawy, M.A.; Ayres, C.F.J.; Peterson, A.T.; Soliman, D.E. Climate changeinfluences on the global potential distribution of the mosquito Culex quinquefasciatus, vector of West Nilevirus and lymphatic filariasis. PLoS ONE 2016, 11, e0163863.

Santiago-Alarcon, D.; Palinauskas, V.; Schaefer, H.M. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. Biol Rev CambPhilos Soc. 2012, 87, 928–964.

Santos, C.S.; Pie, M.R.; da Rocha, T.C.; Navarro-Silva, M.A. Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil.PLoS One. 2019 Feb 19;14(2):e0212517. doi: 10.1371/journal.pone.0212517.

Scarpassa, V.M.; Cardoza, T.B.; Cardoso Junior, R.P. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. AM J Trop Med Hyg. 2008; 78(6): 895-903.

Scarpassa, V.M.; Conn, J.E. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2008; 78(6); 895-903.

Sella, M. Relazione della campagna anti-anofelica di Flumicino (1919) com speciale riguardo Allá biologia degli Anofelied agli Anofeli infetti. Ann Ig 30. 1920.

Sick, H. Birds in Brazil: a natural history. Princeton University Press, Princeton, NJ, 1993.

Silva, J.M.C; Leal, I.R.; Tabarelli, M. Ecologia E Conservação Da Caatinga. Ed. Universitária Da Ufpe, 2° Ed., Cap.5, 2005.

Silva, S.O.F.; Fuente, A.L.C.; Mello, C.F.; Alencar, J. Morphological differentiation between seven Brazilian populations of Haemagogus capricornii and Hg. janthinomys (Diptera: Culicidae) using geometric morphometry of the wings. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2019, 52, e20180106.

Simões, R.F.; Wilke, A.B.B.; Chagas, C.R.F.; Menezes, R.M.T.; Suesdek, L.; Multini, L.C.; Silva, F.S.; Grech, M.G.; Marrelli, M.T.; Kirchgatter, K. Wing Geometric Morphometrics as a Tool for the Identification of *Culex* Subgenus Mosquitoes of *Culex* (Diptera: Culicidae). Insects. 2020 Aug 25;11(9):567. doi: 10.3390/insects11090567.

Stone, A. Corrections in the taxonomy and nomenclature of mosquitoes (Diptera: Culicidae). Proc. Entomol. Soc. Wash., 1956, 58, 33-344.

Sudia, W.D.; Chamberlain, R.W. Battery-operated light trap, an improved model. Mosq. News,1962, 22, 126-129.

Suesdek, L. Microevolution of medically important mosquitoes—A review. Acta Trop. 2019, 191, 162–171.

Sumruayphol, S.; Apiwathnasorn, C.; Ruangsittichai, J.; Sriwichai, P.; Attrapadung, S.; Samung, Y.; Dujardin, J.P. DNA barcoding and wing morphometrics to distinguish three *Aedes* vectors in Thailand. Acta Trop. 2016 Jul;159:1-10. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.03.010.

Tautz, D.; Arctander, P.; Minelli, A.; Thomas, R.H.; Vogler, A.P. A plea for DNA taxonomy. Trends Ecol. Evol. 2003, 18, 70-74.

Takken, W.; Verhulst, N.O. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. Annu. Rev. Entomol. 2013, 58,433-453.

Turell, M.J.; Guinn, M.L.O.; Dohm, D.J.; Jones, J.W. Vector competence of North American mosquitoes forWest Nile Virus. J. Med. Entomol. 2001, 38, 130–134

Unlu, I.; Wayne, L.; Kramer W. L.; Roy, A. F.; Foil, L. D. Detection of West Nile Virus RNA in Mosquitoes and Identification of Mosquito Blood Meals Collected at Alligator Farms in Louisiana. J. Med. Entomol. 2010, 47: 625-633.

Valkiūnas, G. Avian malaria parasites and other Haemosporidia. New York: CRC Press; 2005.

Valkiūnas, G. Haemosporidian vector research: marriage of molecular and microscopical approaches is essential. Mol Ecol. 2011, 20, 3084-3086.

Valkiūnas, G.; Kazlauskienė, R.; Bernotienė, R.; Palinauskas, V.; Iezhova, T.A. Abortive long-lasting sporogony of two *Haemoproteus* species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the mosquito *Ochlerotatus cantans*, with perspectives on haemosporidian vector research. Parasitol Res. 2013, 112, 2159–2169.

Van Riper III, C. The impacto f introduced vectors and avian malaria on insular passeriform bird population in Hawaii. Bull. Soc. Vector Ecol. 1991; 16:59-83.

Van Riper III, C.; Van Riper III, S.G.; Goff, M.L.; Laird, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. Ecol Monogr.1986;56(4):327-44.

Vanstreels, R.E.; Parsons, N.J. Malária aviária e outras hemosporidioses aviárias. In: Cubas, Z.S.; Silva, J.C.R.; Catão-Dias, J.L. Tratado de animais selvagens:medicina veterinária. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2014. P. 1427-43.

Vidal, P.O.; Peruzin, M.C.; Suesdek, L. Wing diagnostic characters for *Culex quinquefasciatus* and *Culex nigripalpus* (Diptera, Culicidae). Rev. Bras. Entomol. 2011, 55, 134-137.

Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R.; Hebert, P.D.N. DNA barcoding Australia´s fish species. Phil. Trans. R. Soc. B. 2005, 360, 1847-1857.

Webb, P.A.; Holbrook, F.R. Vesicular stomatitis. In: Monatth, T. P. ed. The arboviruses: epidemiology and ecology. Boca Raton, CRC Press Inc, 1988. v.5, p. 1-29.

Wilke, A.B.B.; Christe, R.O.; Multini, L.C.; Vidal, P.O.; Wilk-da-Silva, R.; de Carvalho, G.C.; Marrelli, M.T. Morphometric wing characters as a tool for mosquito identification. PLoS ONE 2016, 11, e0161643.

Wilke, A.B.B.; Vidal, P.O.; Suesdek, L.; Marrelli, M.T. Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasit Vectors 2014, 7, 468.

Wolstenholme, D.R. Animal mitochondrial DNA: struture and evolution. In: Wolstenholme, D.R.; Jeon, K.W. (Ed.). International review of Cytology: A survey of Cell Biology- Mitocondrial Genomes. v. 141. New York: Academic Press, 1992. p. 173-216.

World Health Organization.Handbook on Integrated Vector Management; WHO: Geneva Switzerland, 2012.

Zawani, M.K.N.; Abu, H.A.; Sazaly, A.B.; Zary, S.Y.; Darlina, M.N. Population genetic structure of *Aedes albopictus* in Penang, Malaysia. Genet Mol Res GMR. 2014;13(4):8184-96.

Žiegytė, R.; Valkiūnas, G. Recent advances in vector studies of avian haemosporidian parasites. Ekologija. 2014, 60, 73–83.

APÊNDICE A - Artigo publicado na revista Insects. "Wing Geometric Morphometrics as a Tool for the Identification of *Culex* Subgenus Mosquitoes of *Culex* (Diptera: Culicidae)". Simões et al., 2020.

insects MDPI

Article

Wing Geometric Morphometrics as a Tool for the Identification of *Culex* Subgenus Mosquitoes of *Culex* (Diptera: Culicidae)

Roseli França Simões [1,†], André Barretto Bruno Wilke [2,†], Carolina Romeiro Fernandes Chagas [3,4], Regiane Maria Tironi de Menezes [5], Lincoln Suesdek [1,6], Laura Cristina Multini [7], Fabiana Santos Silva [1,5], Marta Gladys Grech [8], Mauro Toledo Marrelli [1,7] and Karin Kirchgatter [1,5,*]

1 Institute of Tropical Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP 05403-000, Brazil; rosefs@usp.br (R.F.S.); lincoln.suesdek@butantan.gov.br (L.S.); fabinss30@gmail.com (F.S.S.); mmarelli@usp.br (M.T.M.)
2 Department of Public Health Sciences, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL 33136, USA; axb1737@med.miami.edu
3 Institute of Ecology, Nature Research Centre, Vilnius 08412, Lithuania; crfchagas@gmail.com
4 Applied Research Department, Zoological Park Foundation, São Paulo, SP 04301-905, Brazil
5 Department of Specialized Laboratories, Superintendence for Endemic Disease Control, SUCEN, São Paulo, SP 01027-000, Brazil; rmtironi@gmail.com
6 Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil
7 Department of Epidemiology, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, SP 01246-904, Brazil; lauramultini@usp.br
8 Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP), CONICET and UNPSJB, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Sede Esquel, Esquel 9200, Chubut, Argentina; mgrech@comahue-conicet.gob.ar
* Correspondence: karink@usp.br
† These authors contributed equally to this work.

Received: 18 July 2020; Accepted: 21 August 2020; Published: 25 August 2020

check for updates

Simple Summary: Different mosquito species have different ecology and behaviors. Therefore, the correct identification of vector mosquito species is essential for the development of targeted mosquito control operations. Traditionally, the identification of mosquitoes to species relies on differences in their external morphological characters. Identifying mosquitoes can be challenging if the specimen is either damaged or if only a few morphological characters can be used to sort them apart. For this reason, this study focused on the use of wing geometric morphometrics to identify *Culex* species from the subgenus *Culex* that are not easily identified by their external morphology. We analyzed the wing shape variation of 11 different species. Our results indicated that the species in this study were identified with high degrees of confidence based on their wing shape variation. From all possible comparisons in the cross-validated reclassification test, 87 yielded values higher than 70%, with 13 comparisons yielding 100% reclassification scores. Overall, our results are suggesting that wing geometric morphometrics is a reliable tool to identify *Culex* species of the subgenus *Culex*.

Abstract: *Culex* is the largest subgenus within the genus *Culex* that includes important vectors of diseases. The correct identification of mosquitoes is critical for effective control strategies. Wing geometric morphometrics (WGM) has been used to identify mosquito species alongside traditional identification methods. Here, WGM was used for eleven *Culex* species from São Paulo, Brazil, and one from Esquel, Argentina. Adult mosquitoes were collected using CDC (Centers for Disease Control) traps, morphologically identified and analyzed by WGM. The canonical variate analysis (CVA) was performed and a Neighbor-joining (NJ) tree was constructed to illustrate the patterns of species segregation. A cross-validated reclassification test was also carried out.

APÊNDICE B - Artigo publicado na revista Insects. "Assessing Diversity, *Plasmodium* Infection and Blood Meal Sources in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from a Brazilian Zoological Park with Avian Malaria Transmission". Guimarães et al., 2021.

insects MDPI

Article

Assessing Diversity, *Plasmodium* Infection and Blood Meal Sources in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from a Brazilian Zoological Park with Avian Malaria Transmission

Lilian de Oliveira Guimarães [1,†], Roseli França Simões [2,†], Carolina Romeiro Fernandes Chagas [3,4], Regiane Maria Tironi de Menezes [1], Fabiana Santos Silva [1,2], Eliana Ferreira Monteiro [2], Marcia Moreira Holcman [1], Miklos Maximiliano Bajay [5], Adriano Pinter [1], Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves [1] and Karin Kirchgatter [1,2,*]

[1] Superintendence for Endemic Disease Control, SUCEN, São Paulo SP 01027-000, Brazil; lilianguima@gmail.com (L.d.O.G.); rmtironi@gmail.com (R.M.T.d.M.); fabinss30@gmail.com (F.S.S.); marciaholcman@gmail.com (M.M.H.); adrianopinter@gmail.com (A.P.); vlfcn@hotmail.com (V.L.F.d.C.-N.)
[2] Institute of Tropical Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo SP 05403-000, Brazil; rosefs@usp.br (R.F.S.); elianafmonteiro@usp.br (E.F.M.)
[3] Nature Research Centre, 08412 Vilnius, Lithuania; crfchagas@gmail.com
[4] Applied Research Department, Zoological Park Foundation, São Paulo SP 04301-905, Brazil
[5] State University of Santa Catarina, Laguna SC 88790-000, Brazil; mmbajay@gmail.com
* Correspondence: karink@usp.br
† These authors contributed equally to this work.

Citation: Guimarães, L.d.O.; Simões, R.F.; Chagas, C.R.F.; Menezes, R.M.T.d.; Silva, F.S.; Monteiro, E.F.; Holcman, M.M.; Bajay, M.M.; Pinter, A.; Camargo-Neves, V.L.F.d.; et al. Assessing Diversity, *Plasmodium* Infection and Blood Meal Sources in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from a Brazilian Zoological Park with Avian Malaria Transmission. *Insects* **2021**, *12*, 215. https://doi.org/10.3390/insects12030215

Academic Editor: Corey Brelsfoard

Received: 21 January 2021
Accepted: 25 February 2021
Published: 3 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Simple Summary: Zoological gardens in forest areas host a large diversity of vertebrate species (exotic and indigenous, free-living and captive, migrant and resident), resulting in an artificial proximity of animal species that would never share the same environment in natural conditions. The presence of mosquitoes enables the transmission of vector-borne pathogens, as is the case with avian malaria parasites. The mild infections in some bird species may become a serious threat to others that do not possess a natural resistance. Thus, the identification of the potential vectors of these parasites is important for future control of these agents, aiming at the bird species conservation. In this study, we collected over 2000 mosquitoes in São Paulo Zoo and analyzed them through molecular methods. Six different mosquito species yielded positive for the targeted parasite DNA. We demonstrated that these culicids had fed mainly on bird species and we reported three mosquito species that have never been previously incriminated as potential vectors of these parasites, enabling the use of more specific measures for vigilance and mosquito control.

Abstract: Avian malaria parasites are widespread parasites transmitted by Culicidae insects belonging to different genera. Even though several studies have been conducted recently, there is still a lack of information about potential vectors of *Plasmodium* parasites, especially in Neotropical regions. Former studies with free-living and captive animals in São Paulo Zoo showed the presence of several *Plasmodium* and *Haemoproteus* species. In 2015, a pilot study was conducted at the zoo to collect mosquitoes in order to find out (i) which species of Culicidae are present in the study area, (ii) what are their blood meal sources, and (iii) to which *Plasmodium* species might they be potential vectors. Mosquitoes were morphologically and molecularly identified. Blood meal source and haemosporidian DNA were identified using molecular protocols. A total of 25 Culicidae species were identified, and 6 of them were positive for *Plasmodium/Haemoproteus* DNA. Ten mosquito species had their source of blood meal identified, which were mainly birds, including some species that were positive for haemosporidian parasites in the former study mentioned. This study allowed us to expand the list of potential vectors of avian malaria parasites and to improve our knowledge of the evolutionary and ecological relationships between the highly diverse communities of birds, parasites, and vectors present at São Paulo Zoo.

Keywords: *Aedes*; captive; *Culex*; haemosporidian parasites; vectors; wildlife

ANEXO A – Parecer Comitê de Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical (CEP/371A).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 06 de outubro de 2017

Ilmo(a)
Dr(a). Karin Kirchgatter
(aos cuidados de Roseli França Simões)

A Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, **APROVOU** o projeto classificado sob o número CPE-IMT 371A e intitulado "Mosquitos *(Culicidae, Diptera)* em área de transmissão de malária aviária: identificação de potenciais espécies vetoras".

Atenciosamente,

Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

ANEXO B – Autorização para atividades com finalidade científica. SISBIO 34605

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 34605-7	Data da Emissão: 27/10/2016 20:54	Data para Revalidação*: 26/11/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Karin Kirchgatter	CPF: 127.822.158-17
Título do Projeto: Plasmodium spp. em aves silvestres da Fundação Parque Zoológico de São Paulo: identificação de espécie por microscopia e código de barras de DNA	
Nome da Instituição : Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de sangue/realização dos esfregaços sanguíneos	08/2012	07/2015
2	Exame dos esfregaços	08/2012	07/2016
3	Extração de DNA	06/2013	08/2016
4	Amplificação de cytb e SSU por PCR	07/2013	09/2016
5	Sequenciamento dos fragmentos em ABI3100	07/2013	09/2016
6	Análise dos dados	07/2013	11/2016
7	Relatório	12/2014	12/2016
8	Redação do artigo científico	01/2015	02/2017
9	Coleta de Culicidae	03/2015	03/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	O sangue coletado não deve ultrapassar o equivalente a 1% da massa corporal da ave. Em coletas consecutivas, não deve ultrapassar 2% a cada 14 dias. Não deve ser utilizada punção cardíaca e não é recomendado corte de unha (exceto para Trochilidae).

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Fernanda Junqueira Vaz Guida	coleta de amostras	278.404.658-38	24.106.226-3 ssp-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 11658294

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 34605-7	Data da Emissão: 27/10/2016 20:54	Data para Revalidação*: 26/11/2017

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Karin Kirchgatter	CPF: 127.822.158-17
Título do Projeto: Plasmodium spp. em aves silvestres da Fundação Parque Zoológico de São Paulo: identificação de espécie por microscopia e código de barras de DNA	
Nome da Instituição : Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

SISBIO

2	Carolina Romeiro Fernandes Chagas	exames microscópios e moleculares	324.700.598-60	330812191 SSP-SP	Brasileira
3	Regiane Maria Tironi de Menezes	coleta de culicideos	065.443.298-86	122958068 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		SP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aves
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Culicidae (*Qtde: 1000)

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

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta(pelos tÃ©cnico da FPZSP, seguindo protocolo da instituÃ§Ã£o)
3	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Outros métodos de captura/coleta(aspirador de Nasci, armadilha de Shannon e armadilha luminosa CDC mini UV)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLÓGICO DE SÃO PAULO	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 11658294