

**VINICIO RODRIGUES DE LIMA**

**O uso da morfometria geométrica alar para análise de simetria  
bilateral em mosquitos *Culex* subgênero *Culex***

Orientador: Dr. Gerson Laurindo Barbosa

Co-orientador: Dr. André Barretto Bruno Wilke

**São Paulo**  
2021

**VINICIO RODRIGUES DE LIMA**

**O uso da morfometria geométrica alar para análise de simetria  
bilateral em mosquitos *Culex* subgênero *Culex***

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado a Superintendência no Controle de Endemias, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários”.

Orientador: Dr. Gerson Laurindo Barbosa

Co-orientador: Dr. André Barretto Bruno Wilke

**São Paulo  
2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Lima, Vinicio Rodrigues de

O uso da morfometria geométrica alar para análise de simetria bilateral em mosquitos *Culex* subgênero *Culex* / Vinicio Rodrigues de Lima. – 2021.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários .

Orientação: Prof. Dr. Gerson Laurindo Barbosa.

Co-orientador: Dr. André Barretto Bruno Wilke

1. Culicidae/anatomia & histologia. 2. Entomologia/classificação. 3. Biometria/método. 4. Asas de animais/anatomia & histologia.

SES/CCD/SUCEN - 108/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli 8/9275

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha família, que me ofereceu suporte e incentivo desde o início.

Agradeço à todos os professores pela paciência e pelas lições durante todo o período do curso de pós-graduação.

Agradeço em especial aos professores envolvidos neste trabalho, meu orientador Dr. Gerson Laurindo Barbosa e ao meu co-orientador, Dr. André Barretto Bruno Wilke, agradeço também à Dra. Karin Kirchgatter, por todo apoio, paciência e por terem sido tão tranquilizadores nos momentos mais complicados.

Agradeço aos alunos de pós-doutorado, doutorado e mestrado da Dra. Karin Kirchgatter, Dra. Lilian de Oliveira Guimarães, Biol. Eliana Ferreira Monteiro, Biol. Roseli França Siõmes, Biol. Bruno da Silva Mathias e Biol. Carolina Clares dos Anjos, pela prontidão em ajudar e pelo empenho em transmitir conhecimento, como pela convivência agradável e pela amizade.

Por fim, agradeço aos meus colegas de curso, por todo companheirismo.

## RESUMO

DE LIMA, Vinicio Rodrigues. **O uso da morfometria geométrica alar para análise de simetria bilateral em mosquitos *Culex* subgênero *Culex***. 31p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; SUCEN, São Paulo, 2021.

Os mosquitos da ordem Diptera e família Culicidae, configuram um grupo expressivo dentre os insetos. O gênero *Culex* é composto por 768 espécies divididas em 26 subgêneros. A estratificação vertical das espécies do gênero *Culex* varia de acordo com as tendências alimentares e sua oferta, entretanto, as fêmeas necessitam de aporte sanguíneo para a maturação dos ovos. Essa hematofagia faz com que os culicídeos sejam importantes vetores de arboviroses e outras doenças transmitidas pela picada destes insetos. Estudos demonstram que o gênero *Culex* é de extrema importância epidemiológica, sendo necessária a identificação correta dos insetos em regiões endêmicas como uma ferramenta vital de vigilância. A Morfometria Geométrica Alar (WGM) entra como um reforço, ou mesmo como alternativa, uma vez que tem obtido êxito em identificar corretamente espécies de mosquitos, provando ser uma técnica tão eficiente quanto a taxonomia clássica e a biologia molecular. A Simetria Bilateral usando WGM nos fornece a Assimetria Flutuante como um importante dado derivado, que pode ser definida por pequenos desvios de uma simetria bilateral perfeita para uma determinada característica morfológica. Neste estudo foram utilizadas asas de mosquitos culicídeos do gênero *Culex*, subgênero *Culex* previamente armazenadas de coletas realizadas na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Parques Municipais de São Paulo no Brasil e Patagônia, Argentina, entre os anos de 2015 a 2020. Após a identificação taxonômica, ambas as asas foram coletadas e posteriormente fixadas em lâmina e lamínula com Bálsamo do Canadá. Imagens foram capturadas através de lupa estereoscópica Leica com câmera acoplada. Nos resultados observamos que *Culex habitator* e *Culex coronator* apresentaram maior simetria entre as duas asas, enquanto as asas de *Culex acharistus* e *Culex habitator* apresentaram assimetrias mais acentuadas. A árvore fenética agrupou os pares de asas como o esperado, com exceção das asas de *Culex habitator* coletadas no ano de 2015. Comparativamente, os *Culex habitator* coletados em 2020 apresentaram mais simetria alar do que os coletados em 2015, e valores de reclassificação superiores. Esses resultados indicam que a técnica de WGM aplicada a simetria bilateral se mostra uma ferramenta versátil, permitindo a realização de diferentes testes estatísticos e morfológicos baseado nos mesmos 18 pontos já utilizados para identificação de mosquitos, porém evidenciando de forma mais sensível a influência sofrida por cada população amostrada pelo seu ambiente. Tendo as amostras de *Culex bidens* e *Culex coronator* como referências de Assimetria Flutuante mais próximas do ideal, observamos nas amostragens de *Culex acharistus* variações importantes, porém esperadas, por se tratar de uma população coletada em ambiente menos favorável para o desenvolvimento do mosquito. Também observamos variações importantes dentro das amostragens de *Culex habitator*, que podem ter sido causadas por erro de identificação taxonômica ou ação de herbicida, porém essas duas possibilidades precisam ser melhor investigadas.

**Palavras-chave:** Culicidae; entomologia; biometria; asas de animais.

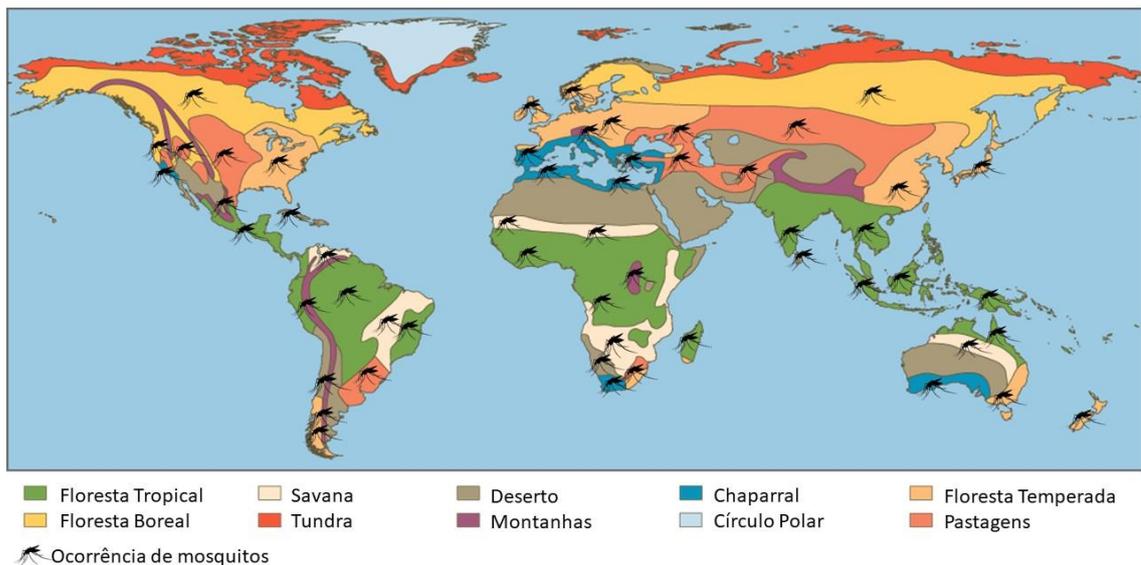
## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO.....	12
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	12
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	15
3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS, WGM E FA.....	15
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

## 1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos da ordem Diptera e família Culicidae, configuram um grupo expressivo dentre os insetos com mais de 3.500 espécies descritas (HARBACH, 2018; ORLANDIN *et al.*, 2017). O gênero *Culex* é composto por 768 espécies divididas em 26 subgêneros (HARBACH, 2011).

Os culicídeos formam um grupo extremamente grande e cosmopolita, presentes em toda a cobertura tropical e temperada do planeta, ocorrendo também além do Círculo Ártico, em regiões mais frias (como ilustrado na figura 1), entretanto, seu desenvolvimento e diversidade são proeminentes em regiões de floresta tropical (HARBACH, 2007).



**Figura 1.** Oito principais biomas terrestres, bem como montanhas e paisagens. (BEAR *et al.*, 2016 - Adaptado)

A estratificação vertical de mosquitos do gênero *Culex* depende muito das tendências alimentares de cada espécie e sua disponibilidade. Machos e fêmeas de algumas espécies se alimentam de fontes líquidas vegetais como seivas, néctar e frutas. Entretanto, na maior parte das espécies, as fêmeas necessitam de aporte sanguíneo proveniente de vertebrados de sangue quente em sua maioria, e/ou outros animais de sangue frio como cobras, anfíbios e até mesmo vermes e sanguessugas, para completar a maturação de seus ovos (HARBACH, 2007). Essa hematofagia

acaba transformando os culicídeos em importantes vetores de arboviroses e outras doenças transmitidas pela picada destes insetos (HARBACH, 2018; WHO, 2017).

Algumas espécies do gênero *Culex* são vetores responsáveis pela transmissão de doenças de importância médica como a filariose linfática, o vírus da encefalite de Saint Louis e da encefalite equina (KASAI *et al.*, 2008), além disso a espécie *Culex quinquefasciatus* merece destaque, por ser um vetor competente para transmissão do vírus do Nilo Ocidental, vírus Mayaro e vírus Oropouche (SERRA *et al.*, 2016). Guedes e colaboradores (2016) mostraram em seu estudo a capacidade vetorial de *C. quinquefasciatus* para disseminação do vírus Zika (ZIKAV), em áreas urbanas com alta incidência de microcefalia em Recife, Brasil. Além do *Culex. quinquefasciatus* outras espécies também já foram relatadas com esta infecção na glândula salivar como *Culex. restuans*, *Culex. Tarsalis* e *Culex. coronator* (VIVEIROS-ROSA *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que o gênero *Culex* é de grande importância epidemiológica, sendo necessária a identificação correta dos insetos em regiões endêmicas, uma vez que para o controle de determinada espécie, é preciso entender a biologia e ecologia do animal, e para isso ser feito da forma mais eficiente, a identificação precisa é a ferramenta mais valiosa da vigilância (SIMÕES *et. al.*, 2020).

A forma mais comum de identificação desses insetos é feita com base nos seus caracteres morfológicos de exemplares adultos, junto de chaves taxonômicas. Entretanto a sistemática é complexa e limitada a poucas diferenças anatômicas evidentes no subgênero *Culex*, que em algumas espécies, a diferenciação dos indivíduos adultos se restringe a identificação do órgão sexual masculino. Estes conjuntos de características estas podem se perder durante todo o manuseio do animal até chegar às mãos de um taxonomista qualificado para realizar essa identificação da forma mais precisa (SIMÕES *et al.*, 2020).

Menos utilizada do que a taxonomia clássica, a biologia molecular simplifica essas análises, uma vez que é necessário apenas um fragmento do animal para que seu DNA seja extraído, amplificado e analisado. Não apenas isso, mas por não depender de estruturas morfológicas em perfeitas condições, a biologia molecular entra como uma ferramenta importante na diferenciação de espécies crípticas (SIMÕES *et. al.*, 2020).

Ambas as técnicas possuem vantagens e desvantagens. A taxonomia sendo um procedimento relativamente pouco custoso, mas de difícil acesso pelo número limitado de profissionais, e a biologia molecular sendo um procedimento custoso, o uso conjunto das duas técnicas quando necessário é ideal (SIMÕES *et. al.*, 2020)

A Morfometria Geométrica Alar (WGM, sigla em inglês para *Wing Geometric Morphometrics*) entra como um reforço, ou mesmo como alternativa, uma vez que tem obtido êxito em identificar corretamente espécies de mosquitos, provando ser uma técnica tão eficiente quanto a taxonomia clássica e a biologia molecular (WILKE *et. al.*, 2019; SIMÕES *et. al.*, 2020). Por fazer uso de poder computacional barato e aplicações de digitalização de imagem simples, esta técnica se mostra uma ferramenta versátil, pois é uma técnica amigável para usuários menos experientes, dispensa o uso de estruturas complexas e tem baixo custo de execução, necessitando apenas de uma asa para a sua realização (LORENZ *et. al.*, 2017).

Além da identificação de mosquitos, o WGM tem se mostrado nos últimos anos uma ferramenta importante para distinguir diferentes populações de uma mesma espécie e processos micro evolutivos pela característica hereditária das venações alares nos mosquitos, variações inter e intraespecíficas, dimorfismo sexual e presença de parasitas (MULTINI *et. al.*, 2019).

A Simetria Bilateral medida usando WGM nos fornece um dado derivado muito importante, a Assimetria Flutuante (FA, sigla em inglês para *Fluctuating Asymmetry*), que pode ser definida como pequenos desvios de uma simetria bilateral perfeita para uma determinada característica morfológica. Além de altos níveis de homozigose na população, estresses ambientais como temperaturas extremas, disponibilidade de alimentos, competição e poluição química na fase larval já demonstrou causar níveis mais elevados de Assimetria Flutuante das asas na fase adulta dos mosquitos (MPHO *et. al.*, 2001; MPHO *et. al.*, 2002; ALVES *et. al.*, 2020).

Nas últimas décadas o uso de morfometria geométrica tem se expandido dentro das ciências da ecologia e da evolução, e ao mesmo tempo a linguagem estatística da plataforma R de programação também tem se popularizado e se tornado padrão de qualidade dentro das análises realizadas pelas mais variadas ciências biológicas. Pacotes como Geomorph podem realizar todas as análises já feitas por outros

programas dedicados, porém com maior versatilidade e liberdade de manipulação pelo usuário (ADAMS & OTÁROLA-CASTILLO, 2013).

Outra inovação que tem crescido dentro do campo da WGM é o uso de inteligência artificial, através de redes neurais artificiais (ANN - *Artificial Neural Network*), que são modelos computacionais capazes de realizar o aprendizado de máquina bem como o reconhecimento de padrões, mirando justamente em refinar as análises estatísticas e a classificação dos animais baseando-se nas suas características morfométricas, fazendo com que o uso da taxonomia do animal não se restrinja apenas a taxonomistas, e essas informações sejam utilizadas de forma precisa por outros profissionais (LORENZ *et. al.*, 2015).

A técnica de Morfometria Geométrica Alar (WGM) representa uma nova abordagem para estudar a variação morfológica e tem sido utilizada com sucesso na identificação de insetos de interesse em saúde pública. A WGM funciona como complemento às técnicas já utilizadas, com a vantagem de depender apenas das asas do inseto, estruturas mais simples, que costumam se preservar nas coletas (CALLE *et. al.*, 2002; WILKE *et. al.*, 2016), além disso, a técnica é pouco dispendiosa financeiramente, necessitando apenas de uma lupa estereoscópica, uma câmera digital e um computador. Estas mesmas técnicas podem ser aplicadas sem nenhum custo adicional para as análises de simetria bilateral, que fornece ainda informações valiosas sobre o histórico de vida da população e desenvolvimento no ambiente (ALVES *et. al.*, 2020).

A importância epidemiológica de Culicidae é conhecida e descrita em diversos estudos. Espécies que formam um complexo, mesmo sendo similares morfológicamente, podem desempenhar papéis diferentes na transmissão de patógenos, fazendo com que a identificação correta se faça crucial para estabelecer os padrões da doença. A identificação tradicional, por caracteres morfológicos da espécie, pode ser comprometida de acordo com a integridade do espécime a ser identificado. Sendo assim o emprego da morfometria alar pode auxiliar no esclarecimento dessas lacunas como é o caso do subgênero *Culex*, que apesar de apresentar precisão de 82% a 100% na identificação da maior parte das espécies analisadas no trabalho norteador deste projeto (SIMÕES *et. al.*, 2020), algumas

espécies pertencentes a esses subgêneros e sobrepõem nas análises, gerando precisões de até 50% na identificação.

Estudos recentes demonstram que a simetria bilateral alar em *C. quinquefasciatus* pode ser alterada de acordo com interferências ambientais provenientes de stress físico, como mudanças climáticas e exposição a altas temperaturas, como também pelo uso de inseticidas, o mais comum, a ivermectina e outros organofosforados, principalmente na fase larval do inseto (ALVES *et. al.*, 2020), mas mantendo a disposição das venações alares. De acordo com o estudo realizado por Alves e colaboradores (2020), populações que sofrem de maior stress ambiental e genético apresentam maior Assimetria Flutuante (FA) apontando para uma flutuação natural nessa assimetria, se mostrando uma ferramenta promissora de bioindicador de estresses ambientais específicos, sendo mais competente para apontar stress químico, como inseticidas (MPHO *et. al.*, 2001).

As espécies do gênero *Culex*, apesar de semelhantes, possuem biologia particular, e interpretar como determinada população interage com o ambiente onde está inserida, avaliar o estresse que sofre durante seu desenvolvimento e mapear ao longo do tempo utilizando combinadas duas técnicas relativamente simples e baratas, comprovadas por diversos autores, se mostra como um caminho promissor (MPHO *et. al.*, 2002), uma vez que a análise da variação do formato da asa também mostrou ser capaz de detectar variações no fenótipo de populações pressionadas pelo avanço descontrolado da urbanização em áreas de oviposição de *Anopheles cruzii*, demonstrado pela variação do formato da asa, e não apenas do seu tamanho, um traço sabidamente determinado pela genética do animal (MULTINI *et. al.*, 2019).

Este projeto se propõe a entender a análise, anteriormente realizada com apenas uma asa, para um estudo da eficácia da implementação da simetria bilateral alar e Assimetria Flutuante na avaliação do desenvolvimento populacional de mosquitos *Culex* (Cux.), e propor ferramentas de programação (ADAMS & OTÁROLA-CASTILLO, 2013), mais flexíveis e moldáveis, para a realização dos testes.

## 2. OBJETIVO

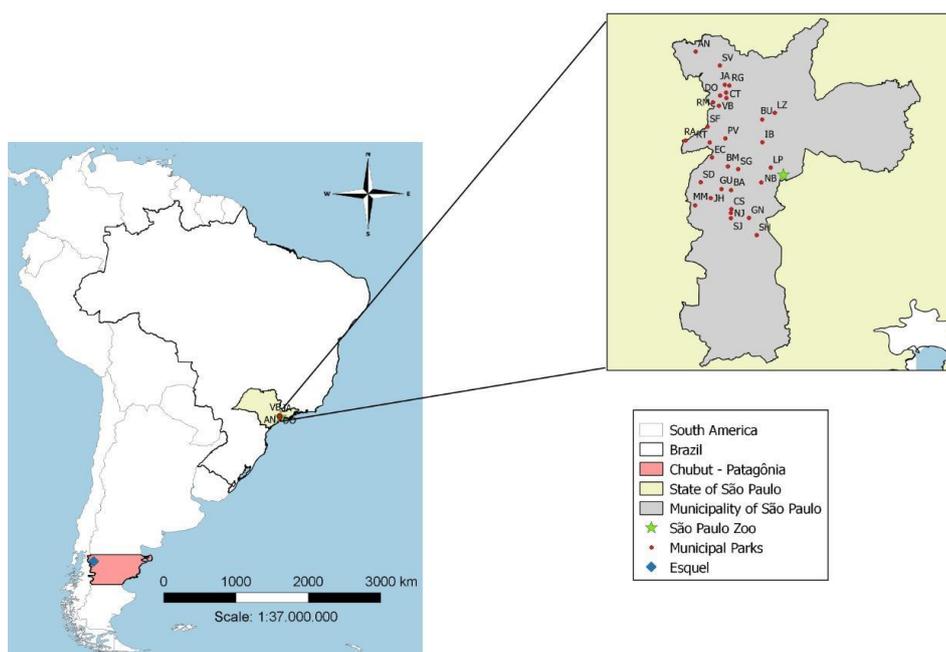
Esse trabalho tem como objetivo verificar a eficiência da morfometria geométrica alar para a análise da simetria bilateral nas diferentes espécies de mosquitos *Culex* subgênero *Culex*.

### 2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Identificar o agrupamento gerado a partir da técnica de morfometria alar das espécies de mosquitos do gênero *Culex* subgênero *Culex* obtidas com esta técnica, aplicados a simetria bilateral por sobreposição no método Procrustes.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas asas de mosquitos culicídeos do gênero *Culex*, subgênero *Culex* (Tabela 1) previamente armazenadas de coletas realizadas na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e Patagônia, Argentina (Figura 2), entre os anos de 2015 a 2020.



**Figura 2:** Enquadramento geográfico dos locais de coleta de amostras.

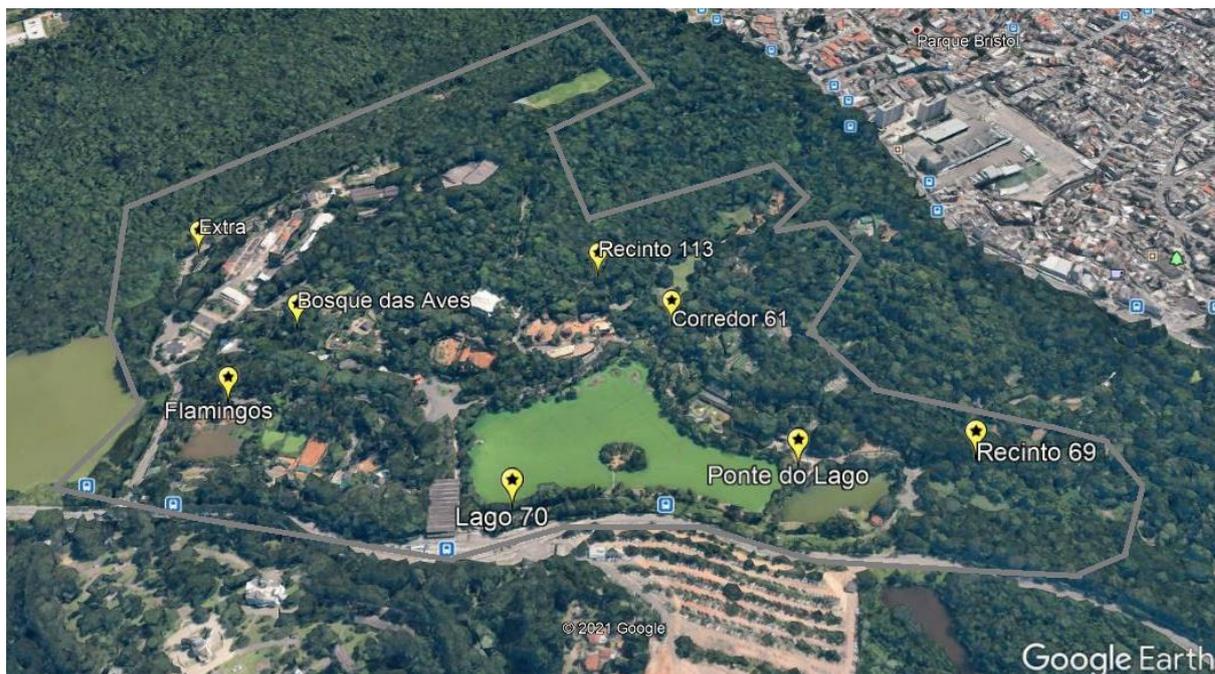
**Tabela 1.** Informações sobre as espécies de mosquitos e ano de coleta

Espécies	Nº	Local de coleta	Ano de coleta
<i>Culex (Cux.) acharistus</i>	26	Patagônia	2016/2017
<i>Culex (Cux.) bidens</i>	27	FPZSP	2015
<i>Culex (Cux.) coronator</i>	43	FPZSP	2015
<i>Culex (Cux.) habilitator</i>	32	FPZSP	2015
<i>Culex (Cux.) habilitator</i>	26	FPZSP	2020

As coletas foram realizadas com a utilização de armadilhas luminosas CDC Miniatura com isca de CO<sub>2</sub>, instaladas a dois metros do chão, nos galhos das árvores, no decorrer do crepúsculo vespertino, sendo retiradas na manhã do dia seguinte, funcionando pelo período de 12 horas, nos locais descritos na Tabela 2 e indicados na Figura 3.

**Tabela 2.** Localização das coletas na FPZSP

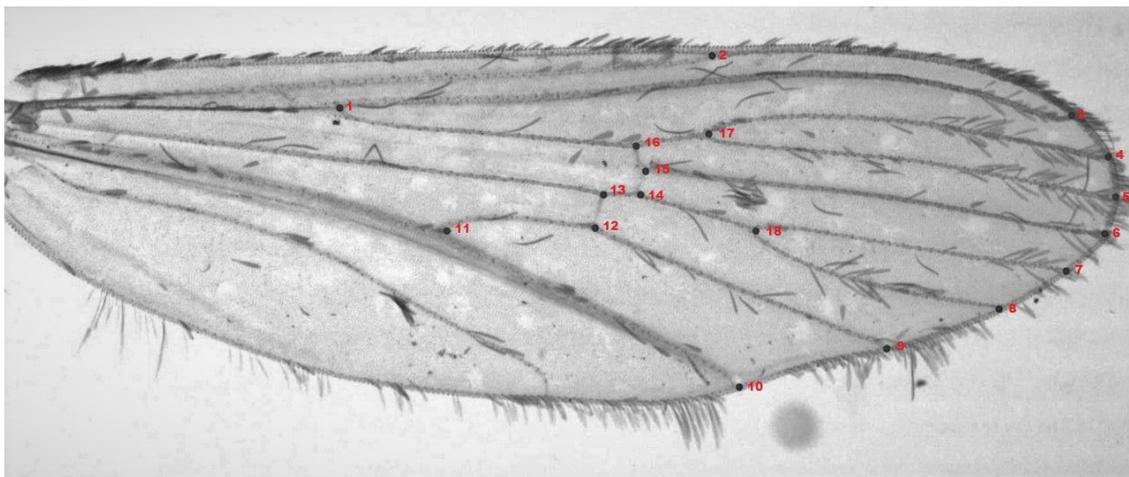
Local	Observações	Coordenadas
1- Flamingos	Em frente ao recinto do serval	23°64'86.7"S 46°62'13.2"W
2- Ponte do Lago	Árvore ao lado da lanchonete	23°65'22.4"S 46°61'77.6"W
3- Lago 70	À direita do portão principal da bilheteria	23°65'11.2"S 46°61'99.6"W
4- Recinto 113	Recinto Harpia Cachoeira - Rapinantes	23°64'95.3"S 46°61'77.4"W
5- Corredor 61	Atrás dos Grows e Flamingos	23°65'04.1"S 46°61'74.9"W
6- Recinto 69	Área de piquenique - Lago 69	23°65'31.2"S 46°61'65.7"W
7- Bosque das Aves	Recinto Tucano	23°64'83.4"S 46°37'13.4"W
8- Extra	Árvore na rua próxima à placa do Espaço D. Pedro	23°64'67.2"S 46°62'06.7"W



**Figura 3:** Distribuição dos pontos de coleta dentro da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Os espécimes coletados foram congelados em gelo seco, triados e transportados ao laboratório em nitrogênio líquido. No laboratório foram acondicionados em recipientes plásticos, mantidos em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até a identificação em mesa fria, por meio de lupa estereoscópica. Para todas as identificações foram utilizadas chaves e descrições taxonômicas (FORATTINI, 1965; 2002).

Após a identificação, ambas as asas foram destacadas com auxílio de pinça de ponta fina e acondicionadas em micro tubos, imersas em ETOH 70%, rotuladas e armazenadas. Sua posterior fixação foi feita com o posicionamento isolado de cada asa em lâmina e lamínula para microscopia, fixada com Bálsamo do Canadá. Imagens foram capturadas através de câmera fotográfica digital da marca Leica, modelo DFC320, acoplada em lupa estereoscópica marca Leica, modelo S6, no aumento de 40x. Para a marcação dos 18 pontos anatômicos foi utilizado o programa “tpsDig 1.4” (Figura 4) (SIMÕES *et. al.*, 2020).



**Figura 4.** Foto da asa direita digitalizada de *Culex coronator*, mostrando os 18 pontos de encontro das nervuras marcados em vermelho e numeradas, utilizados na análise da morfometria geométrica alar.

### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto realizado de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal. O projeto ao qual este complementa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (CPE-IMT / 193 e CPE-IMT / 371A) e pelo Ministério do Meio Ambiente (SISBIO 34605-4).

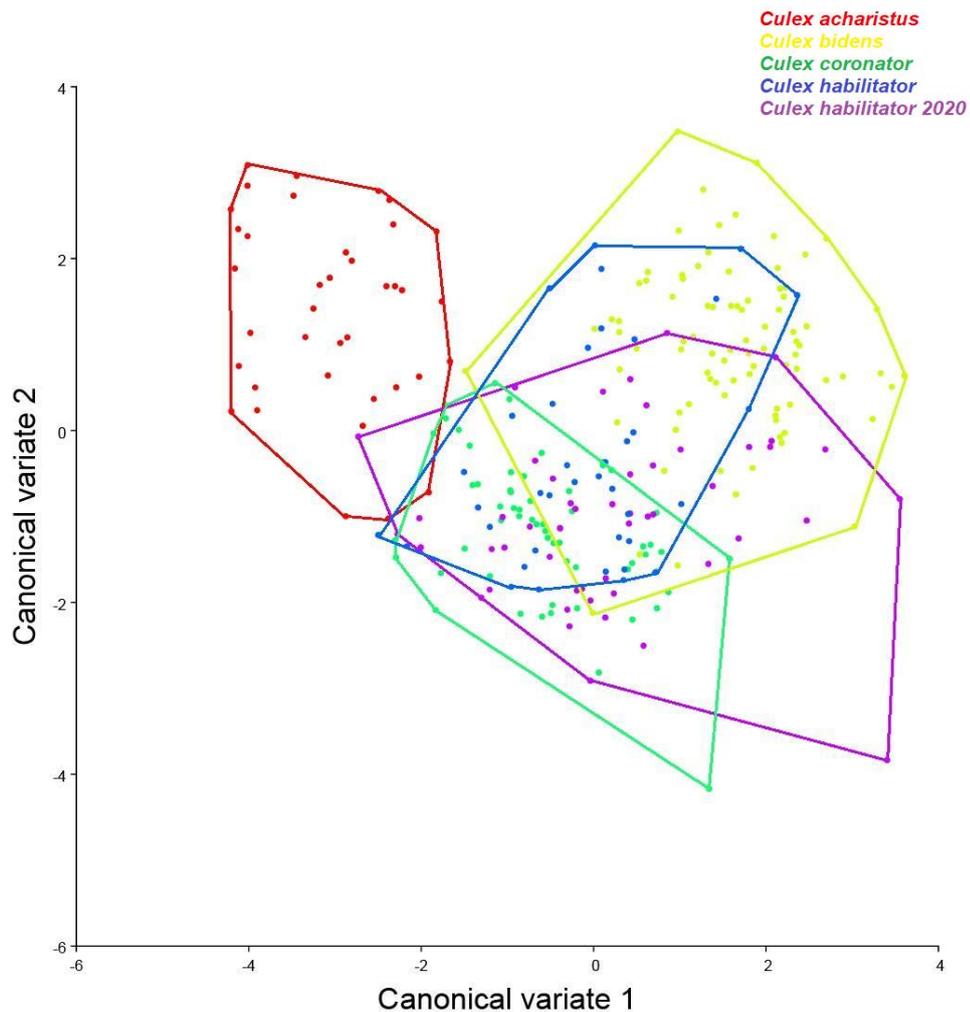
### 3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS, WGM E FA

A alometria (influência do tamanho na forma) foi calculada através de regressão multivariada das coordenadas de Procrustes contra o tamanho do centroide usando um teste de permutação com 10000 randomizações (WILKE *et al.*, 2016). Análise discriminante foi realizada para explorar o grau de similaridade da forma das asas direitas e esquerdas dos indivíduos de cada espécie no morfoespaço produzido pela análise de variáveis canônicas (CVA). A análise foi feita pelo programa MorphoJ, utilizando as duas asas dos 137 (centro e trinta e sete) indivíduos presentes nesse

estudo. As distâncias de Mahalanobis foram calculadas por meio da CVA. Cada indivíduo foi então reclassificado usando o teste de reclassificação cruzada e agrupado utilizando a distância de Mahalanobis (LORENZ & SUESDEK, 2020; VIDAL & SUESDEK, 2011). Uma árvore Neighbor Joining foi construída com 1.000 cópias de bootstrap baseadas na distância Mahalanobis para ilustrar os padrões de Assimetria Flutuante das populações.

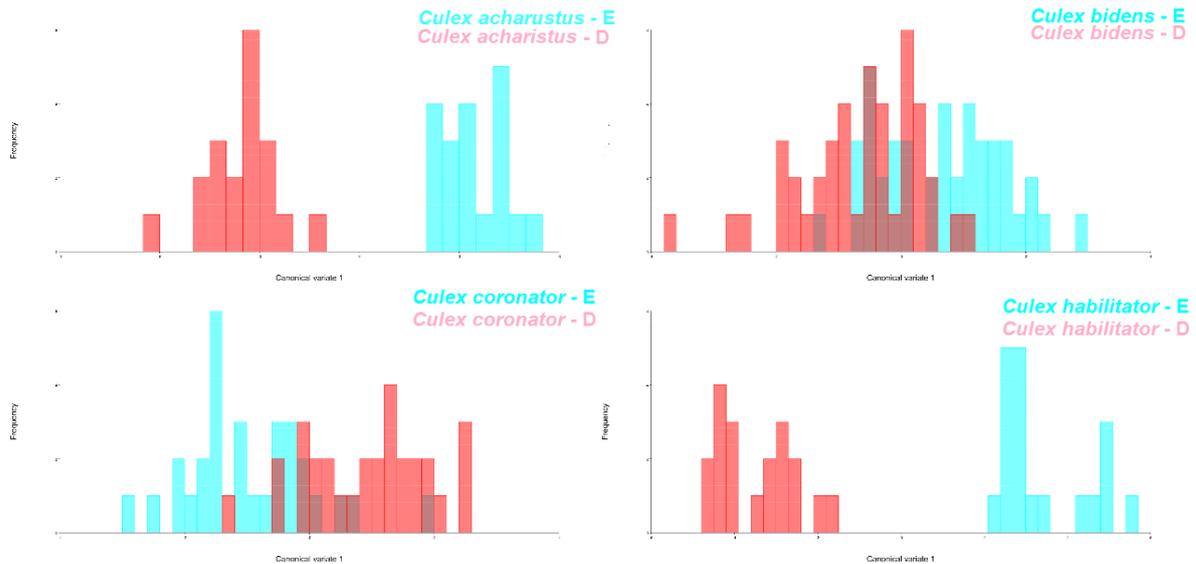
#### 4. RESULTADOS

Os resultados para CVA de todas as espécies de *Culex* amostradas se distanciam de forma bastante evidente das amostras de *C. acharistus*, enquanto a variação alar dos espécimes de *C. habilitator* de 2015 e de 2020, *C. coronator* e *C. bidens* apresentou sobreposição de forma generalizada. Como mostra a Figura 5, podemos ver uma intersecção no morfo espaço entre todas as espécies de *Culex* coletadas na FPZSP.



**Figura 5.** Morfoespaço produzido pelas duas primeiras variantes canônicas para os espécimes de *Culex*, baseado nos 18 pontos morfométricos.

A comparação morfológica das asas direitas e esquerdas de cada uma das espécies aponta o grau de simetria entre as asas dos indivíduos. As espécies *C. bidens* e *C. coronator* apresentaram maior simetria entre as asas com sobreposição evidente entre as asas, enquanto os espécimes analisados de *C. acharistus* e *C. habilitator* demonstraram assimetria bilateral clara, sem nenhum ponto de sobreposição entre asas direitas e esquerdas. Podemos ver ainda na Figura 6, que a Assimetria apresentada por *C. habilitator* é superior à apresentada por *C. acharistus* neste estudo.



**Figura 6.** Diagrama de forma alar da primeira variante canônica para comparação par-a-par das asas direitas e esquerdas das espécies amostradas de *Culex* baseadas nos 18 pontos morfométricos. Eixo-X: primeira variante canônica; Eixo-Y: frequência. ; “E” para asas esquerdas; “D” para asas direitas..

A árvore UPGMA (Figura 7) mostra o agrupamento de asas por proximidade morfológica, direitas e esquerdas dentro do mesmo grupo. Os pares de *Culex acharistus* se colocou separado das outras espécies. Os pares de asas de *C. bidens*, *C. habitator* e *C. habitator* (coleta de 2020) formaram grupos da mesma forma, com exceção das asas de *C. habitator* coletados no ano de 2015, onde as asas direitas foram identificadas como morfológicamente mais próximas das asas de *C. coronator* do que das asas esquerdas da própria espécie.



**Figura 7.** Dendrograma (UPGMA) para as asas direitas e esquerdas para as espécies de *Culex* baseadas nas distâncias de Mahalanobis com 1000 bootstraps.

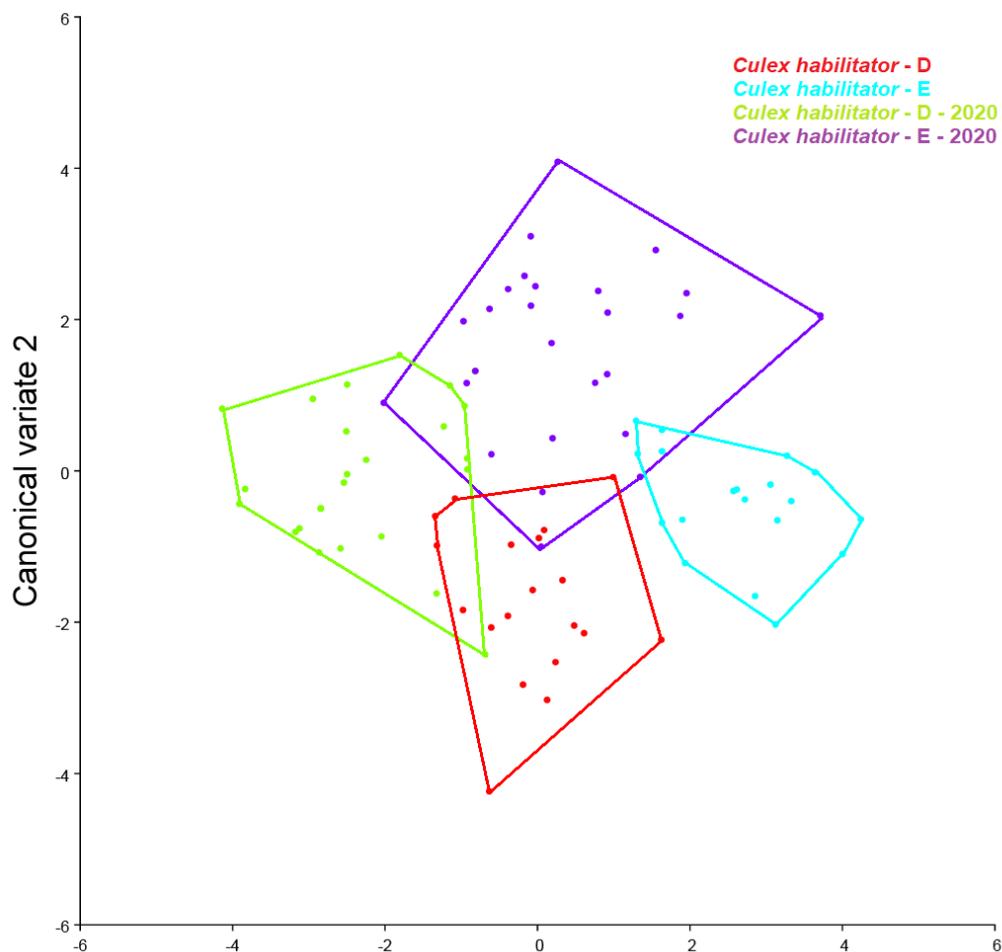
Os valores de reclassificação (tabela 3) nas amostras não se diferenciaram de forma expressiva, porém nas amostras de *C. habilitator* (coleta de 2015) os valores se mostraram distintivamente maiores que nas outras espécies analisadas,

reclassificando 63% das asas direitas corretamente e 31% das asas esquerdas corretamente.

**Tabela 3.** Reclassificação das asas direitas sobre as esquerdas, e esquerdas sobre as direitas nas espécies de *Culex* coletadas em 2015.; “E” para asas esquerdas; “D” para asas direitas.

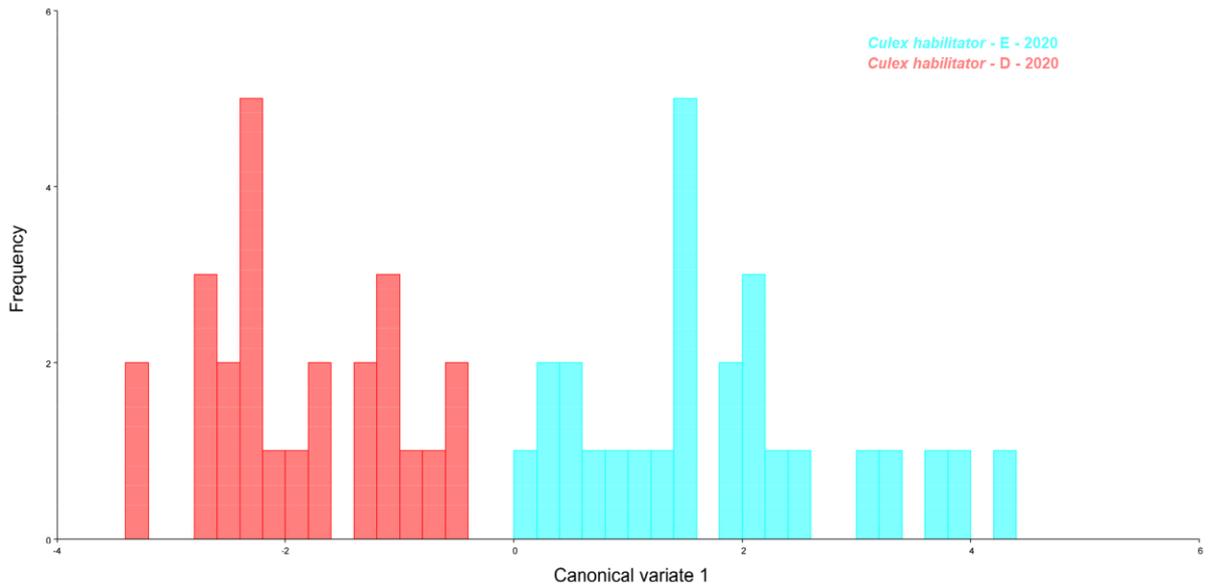
	Reclassificação	Valor de Reclassificação (%)
<i>Culex (Cux.).</i>	<i>D vs E</i>	52
<i>acharistus</i>	<i>E vs D</i>	52
<i>Culex (Cux.).</i>	<i>D vs E</i>	39
<i>bidens</i>	<i>E vs D</i>	44
<i>Culex (Cux.).</i>	<i>D vs E</i>	46
<i>coronator</i>	<i>E vs D</i>	50
<i>Culex (Cux.).</i>	<i>D vs E</i>	63
<i>habilitator</i>	<i>E vs D</i>	31

Comparando as asas direitas e esquerdas por CVA das duas coletas de *C. habilitator*, fica evidenciado que não há sobreposição alguma das asas direitas e esquerdas nas amostras de 2015, o que acontece em algum grau com as amostras de 2020. A Figura 8 também mostra um espalhamento maior no morfoespaço das asas esquerdas do ano de 2020, que também é o único agrupamento com intersecção com as asas esquerdas de 2015.



**Figura 8.** Morfoespaço produzido pelas duas primeiras variantes canônicas para as asas direitas e esquerdas de *C. habilitator* coletados nos anos de 2015 e 2020.

A comparação morfológica entre as asas direitas e esquerdas nos espécimes de *Culex habilitator* coletados em 2020, apesar de não apresentarem sobreposição de forma como as outras espécies coletadas no Parque Zoológico em 2015, apresentam menor assimetria quando comparadas com os espécimes de 2015 (figura 6). Assim como na Figura 8, as asas esquerdas também mostram uma variedade ligeiramente maior na figura 9.



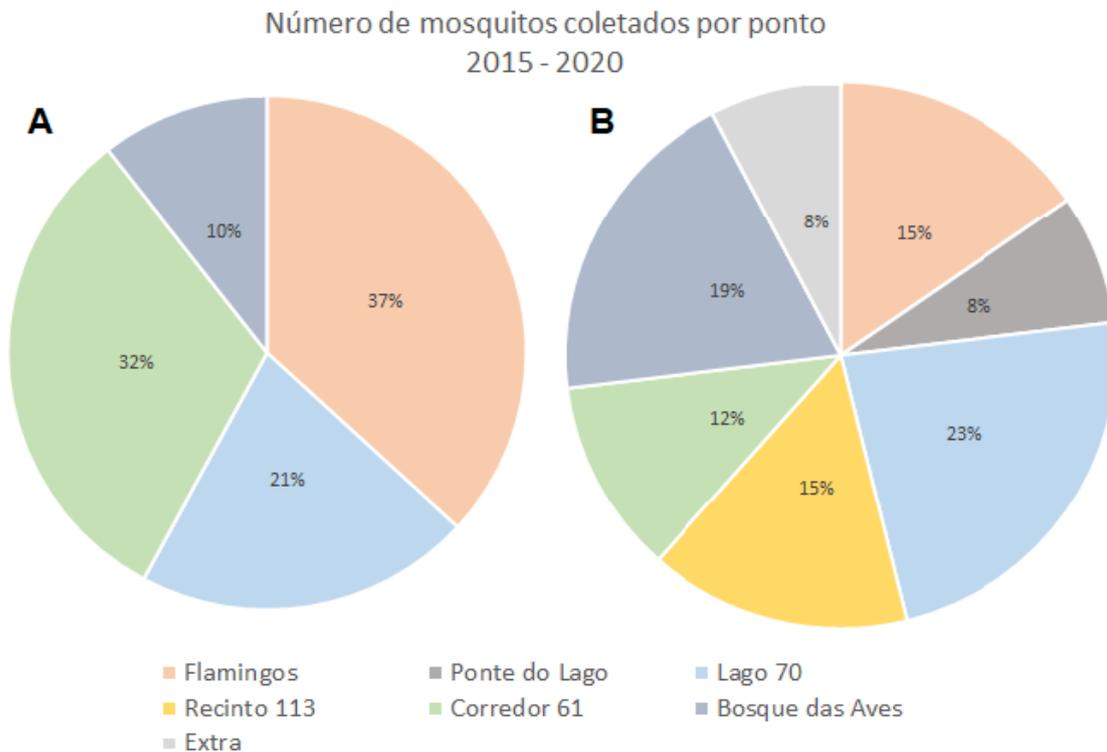
**Figura 9.** Diagrama de forma alar da primeira variante canônica para comparação par-a-par das asas direitas e esquerdas de *C. habilitator* coletados em 2020, baseadas nos 18 pontos morfométricos. Eixo-X: primeira variante canônica; Eixo-Y: frequência. ; “E” para asas esquerdas; “D” para asas direitas.

Quando comparado com os valores de 2015, as amostras de *C. habilitator* de 2020 apresentam um valor de reclassificação maior, próximo dos valores de *C. acharistus*, de 53% de correta reclassificação para asas direitas, como para asas esquerdas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Reclassificação das asas direitas sobre as esquerdas, e esquerdas sobre as direitas das duas amostragens de *Culex habitator* utilizadas neste trabalho.

	Reclassificação	Valor de Reclassificação (%)
<i>Culex</i> (Cux.). <i>habilitator</i> 2015	<i>D vs E</i> <i>E vs D</i>	63 31
<i>Culex</i> (Cux.). <i>habilitator</i> 2020	<i>D vs E</i> <i>E vs D</i>	53 53

Comparando o número de *C. habitator* coletados nos anos de 2015 e 2020, os gráficos das Figuras 10(A) e 10(B) mostram concentrações maiores no Lago dos Flamingos e Corredor 61 na coleta de 2015, enquanto a coleta realizada no ano de 2020 apresentou dispersão mais homogênea entre os pontos de coleta, e espécimes coletados em um número maior de pontos de coleta.



**Figura 10.** Percentual de indivíduos coletados por recinto na FPZSP nos anos de 2015 (A) e de 2020 (B).

## 5. DISCUSSÃO

A técnica de WGM aplicada a simetria bilateral se mostra uma ferramenta muito versátil, permitindo a realização de diferentes testes estatísticos e morfológicos baseado nos mesmos 18 pontos já utilizados para identificação de mosquitos, porém evidenciando de forma mais sensível a influência sofrida por cada população amostrada pelo seu ambiente.

Tendo as amostras de *C. bidens* e *C. coronator* como as referências de AF mais próxima do ideal neste trabalho, podemos observar variações importantes nas outras amostragens. *C. acharistus*, por se tratar de uma população coletada na Patagônia, região de habitat extremo para a maior parte dos insetos, e comprovadamente hostil para *Culex sp.* (KIBUTHU *et. al.*, 2016), também sendo a espécie morfogenicamente mais afastada das demais (SIMÕES *et.al.*, 2020), se mostrou discrepante de todos os outros grupos na CVA (figura 5), como também assimetria acentuada, sem nenhum ponto de sobreposição de forma entre as asas direita e esquerda (figura 6). Porém, as asas foram reclassificadas com 52% de precisão quando comparados os grupos Asas Esquerdas e Asas direitas (tabela 3), e distribuídos corretamente na árvore fenética (figura 7).

Foram anteriormente apresentados, trabalhos que evidenciam o estresse ambiental relacionado a condições climáticas na fase larval de *Culex sp.* refletindo sobre dados de AF das asas. Estresse este demonstrado por Grech e colaboradores (2019), que pode corroborar os dados de assimetria em *C. acharistus* apresentados neste trabalho.

Os dados referentes às populações amostradas de *C. bidens* e *C. coronator* se apresentaram dentro de condições esperadas para espécimes presentes em trecho preservado de Mata Atlântica, ambiente favorável para o seu desenvolvimento. Observando a árvore fenética (figura 7), as populações amostradas de *C. coronator* se relacionam com mais proximidade de *C. habilitator* (neste caso independente do ano amostrado de *C. habilitator*), e *C. bidens* externo ao grupo formado pelas outras duas espécies, da mesma forma que apresentado por SIMÕES e colaboradores (2020).

Para os espécimes de *C. coronator* e *C. bidens*, os valores de reclassificação apresentados na Tabela 3, não apresentam valores expressivos. Para *C. bidens*, obtivemos 39% de reclassificação correta das asas direitas e 44% das asas esquerdas, enquanto para *C. coronator*, os números são ligeiramente superiores, 46% e 50% para asas direitas e esquerdas, respectivamente.

Para as amostras de *C. habilitator* coletadas nos anos de 2015 e 2020, os dados apresentados no morfoespaço representado na Figura 5, mostram sobreposição com todas as populações amostradas dentro do Parque Zoológico, sendo a amostragem de 2020 morfologicamente mais diversa.

Quando comparamos a Assimetria mostradas nas Figuras 6 e 9, observamos uma alteração visivelmente importante nas informações, pois enquanto a população amostrada em 2015 apresenta valores de assimetria superiores aos apresentados por *C. acharistus*, espécie evidentemente pressionada pelo seu ambiente. A mesma espécie amostrada em 2020, mesmo não apresentando Assimetria Flutuante mais próxima do esperado para a população presente em fragmento de Mata Atlântica, não apresentando sobreposição morfológica, já apresenta um dado mais próximo das outras espécies coletadas no mesmo local, e assimetria inferior a evidenciada em *C. acharistus*.

Podemos ver na Figura 8 a dispersão das asas direitas e esquerdas de *C. habilitator* separadamente no morfoespaço. A imagem nos mostra sobreposição de pontos referentes a asas de mesmo lado nos dois anos, de asa direita com esquerda nas amostras de 2020, porém o mesmo não ocorre com as asas amostradas em 2015. A dispersão dos pontos na amostragem de 2020 é maior, porém isso se deve a um número amostral superior também.

O dendrograma (Figura 7), a FA de *C. habilitator* de 2015 apresentou dados que fogem do esperado. De acordo com o trabalho de 2020 de SIMÕES e colaboradores, se espera que ao representar os dados morfométricos, *C. habilitator* e *C. coronator* sejam agrupados próximos, uma espécie da outra. Porém, morfométricamente, as análises identificaram as asas esquerdas de *C. habilitator* (coleta de 2015) mais próximas morfológicamente das asas de *C. coronator* do que das asas da própria espécie, indiferente ao ano de coleta.

A tabela de reclassificação (Tabela 3) evidencia uma baixa reclassificação das asas esquerdas dos *C. habilitator* coletados no ano de 2015, apenas 31%, o valor mais baixo de reclassificação observado, indo de encontro com os dados apresentados para as asas esquerdas da mesma amostragem nas Figuras 7 e 8. Comparativamente, a Tabela 4 já coloca dados de reclassificação mais sólidos para os mosquitos coletados em 2020, apontando 53% de reclassificação correta para ambas as asas.

Foram levantadas algumas hipóteses para as disparidades envolvendo as amostras relacionadas às amostras de *C. habilitator* coletadas no ano de 2015. A primeira delas foi investigar junto aos responsáveis pela aplicação de químicos.

Fomos então informados, muito atenciosamente por Marcelo Takashi Misato, chefe do Setor de Gestão Ambiental do Parque Zoológico de São Paulo, que entre os anos de 2015 a 2020 “não houve alteração significativa no uso de inseticidas na área de controle de pragas, mantendo os mesmos princípios ativos sempre utilizados”. Misato ainda informou que “o único produto de dispersão que foi interrompido em 2015 foi o Glifosato, utilizado para controle de ervas daninhas nas áreas internas e de visitação”. Essa possibilidade poderia explicar, em um estudo direcionado, a expressiva assimetria nas amostras de *C. habilitator* de 2015, e uma possível recuperação apresentada na amostra do ano de 2020, reforçado pela variedade de pontos de coleta inferiores também no ano de 2015, como mostram as Figuras 10(A) e 10(B). Porém não explica a variação alar normal das outras espécies coletadas no mesmo período, e os pontos de coleta onde os espécimes de 2015 não se apresentam em relação aos espécimes de 2020 também são variados, acontecendo tanto próximos de áreas de visitação, quanto em áreas de maior cobertura arbórea e vegetal no geral.

A segunda possibilidade levantada é um possível erro de identificação taxonômica de indivíduos de *C. habilitator* identificados em 2015. O dendrograma apresentado na Figura 7 levanta o principal dado para esta suspeita, uma vez que mesmo morfologicamente próximos, o grupo inteiro de asas esquerdas ser classificado mais próximo dos grupos de asas de *C. coronator*, pode indicar um erro na classificação das asas, baseado na identificação de um ou mais espécimes. A confirmação, no entanto, não é mais possível, uma vez que as amostras não existem

mais na sua forma original. O que poderia ainda ser feito para elucidar esta possibilidade, seria a identificação da amostra por meio de biologia molecular. Mas de qualquer forma, a informação taxonômica já não existe.

## **6. CONCLUSÕES**

A utilização de dados de AF conjuntamente com WGM permitiu novas explorações, apresentando novas óticas referentes a amostras já existentes, e já utilizadas em outros trabalhos. Isso evidencia a utilidade e praticidade de aplicar apenas mais alguns passos nas análises estatísticas e morfométricas, e a importância de se preservar as duas asas dos animais coletados, e não apenas uma, como a morfometria alar já o faz.

Isso permitiu que neste trabalho fossem levantadas questões sobre a influência do ambiente no desenvolvimento dos mosquitos, possíveis interferências externas e até mesmo possíveis problemas de identificação, como foi amplamente apresentado. Existem ainda questões a serem aprimoradas e testadas, como a aplicação de plataformas de programação como R, que chegaram a ser experimentadas, mas pela falta de tempo hábil para o melhor entendimento dos parâmetros e linguagem do pacote escolhido, o Geomorph, não foi possível incluir os ensaios neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, D.C.; OTAROLA-CASTILLO, E.. Geomorph: an R Package For the Collection and Analysis of Geometric Morphometric Shape ata. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 393–399, 2013.

ALVES, S.N.; PUJONI, D.G.F.; MOCELIN, G.; MELO, A.L.; SERRÃO, J.E.. Evaluation of *Culex quinquefasciatus* Wings Asymmetry after Exposure of Larvae to Sublethal Concentration of Invermectin. *Environmental Science and Pollution Research* volume 27, pages 3483–3488, 2020.

BEAR, R.; RINTOUL, D.; SNYDER, B.; SMITH-CALDAS, M.; HERREN, C.; HORNE, E. "Principles of Biology" (2016). *Open Access Textbooks*. 1. <https://newprairiepress.org/textbooks/1>

CALLE, D.A.; QUIÑONES, M.L.; ERAZO, H.F.; JARAMILLO, N..Morphometric Discrimination of Females of Five Species of Anopheles of the Subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (ISSN: 1678-8060) Vol 97 Num 8, 2002.

FORATTINI, O.P.. *Entomologia médica*. Vol. II. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1965.

FORATTINI, O.P.. *Culicidaeologia médica*. Vol. II. São Paulo Editora: da Universidade de São Paulo; 2002.

GRECH, M.G.; MANZO, L.M.; EPELE L.B.; LAURITO, M.; CLAVERIE, A.Ñ.; LUDEÑA-ALMEIDA, F.F.; MISERENDINO, M.L.; ALMIRÓN, W.R.. Mosquito (Diptera: Culicidae) Larval Ecology in Natural Habitats in the Cold Temperate Patagonia Region of Argentina. *Parasites & Vectors*, 2019.

GUEDES, D.R.; PAIVA, M.H.; DONATO, M.M.; BARBOSA, P.P.; KROKOVSKY, L.; ROCHA, S.W.D.S.; et al. Zika Virus Replication in The Mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect*; 6: e 69. pmid: 28790458, 2017.

HARBACH, R.E.. Classification Within The Cosmopolitan Genus *Culex* (Diptera: Culicidae): The Foundation for Molecular Systematics and Phylogenetic Research. *ActaTropica*, Volume 120, Issues 1–2, October–November 2011, Pages 1-14, 2011.

HARBACH, R.E.. Mosquito Taxonomic Inventory, 2018. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>, acessado em 10/02/2021.

Harbach, R.E.. TheCulicidae (Diptera): A Review Of Taxonomy, Classification And Phylogeny \*. *Zootaxa*. 1668. 591-638. 10.5281/zenodo.180118, 2007

KASAI, S. ET AL. PCR-based Identification of *Culex pipiens* Complex Collected in Japan. *JapaneseJournalofInfectiousDiseases*, V. 61, n. 3, p. 184-191, 2008.

KIBUTHU, T.W.; NJENGA, S.M.; MBUGUA, A.K.; MUTURI, E.J.. Agricultural Chemicals: Life Changer for Mosquito Vectors in Agricultural Aandscapes? *Parasites and Vectors*, 9, 2016

LORENZ, C.; ALMEIDA, F.; ALMEIDA-LOPES, F.; LOUISE, C.; PEREIRA, S.N.; PETERSEN, V.; VIDAL P.O.; VIRGÍNIO, F.; SUESDEK, L.. Geometric Morphometric in Mosquitoes: What has been Measured? *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 2017.

LORENZ, C.; FERRAUDO, A.S.; SUESDEK, L.. Artificial Neural Network Applied as a Methodology od Mosquito Species Identification. *Acta Tropica*, 152, 2015.

LORENZ, C.; SUESDEK, L.. The Use of Wing Shape for Characterising Macroevolution in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 77, 2020.

MEDEIROS-SOUSA, A.R.; CERETTI-JUNIOR, W.; URBINATTI, P.R.; NATAL, D.; CARVALHO, G.C.; PAULA, M.B.; MARRELLI, M.T. Biodiversidade de Mosquitos (Diptera: Culicidae) nos Parques da Cidade de São Paulo I. *Biota Neotropica*, 13(1), 317–321, 2013.

MPHO, M.; HOLLOWAY G.J.; CALLAGHAN A.. A Comparison of The Effects of Organophosphate Insecticide Exposure and Temperature Stress on Fluctuating Asymmetry and Life History Traits in *Culexquinquefasciatus*. *Chemosphere*, 2001.

MPHO, M.; HOLLOWAY G.J.; CALLAGHAN A.. Effects of Temperature and Genetic Stress on Life History and Fluctuating Wing Asymmetry in *Culex pipiens* Mosquitoes, 2002.

MULTINI, L.C.; WILKE, A.B.B.; MARRELLI, M.T.. Urbanization as a Driver for Temporal Wing-shape Variation in *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 190: 30-36, 2019.

ORLANDIN, E., SANTOS, E.B., PIOVESAN, M., FAVRETTO, M.A., SCHNEEBERGER, A.H., SOUZA, V.O., MULLER, G.A., WAGNER, G.. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) From Crepuscular Period in a Atlantic Forest Area in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 77, 60–67, 2017.

SERRA, O.P.; CARDOSO, B.F.; RIBEIRO, A.L.M.; SANTOS, F.A.L.; SLHESARENKO, R.D.. Mayaro virus and dengue 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiaba, state of Mato Grosso, Brasil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 1, p. 20-29, 2016.

SIMÕES, R.F.; WILKE, A.B.B.; CHAGAS, C.R.F.; DE 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*, 11;9, 2020.

SIMÕES, R.F.; WILKE, A.B.B.; CHAGAS, C.R.F.; MENEZES, R.M.T.; SUESDEK, L.; MULTINI, L.C.; SILVA, F.S.; GRACH, 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*, 11, 567, 2020.

VIVEIROS-ROSA, S.G.; REGIS E.G.; SANTOS W.C.. Vector Competence of *Culex* Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Zika Virus Transmission: an Integrative Review. *Rev Panam Salud Publica*; 44: e7, 2020.

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. 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2017. Neglected tropical diseases -  
Mosquito-borne diseases.Disponível em:  
[http://www.who.int/neglected\\_diseases/vector\\_ecology/mosquito-borne-diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/en/)