

**Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**  
**Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP**  
**“Dr. Antônio Guilherme de Souza”**  
**Superintendência de Controle de Endemias**

**Gabriella Ricomini Caetano Clemente**

**Avaliação comparativa da identificação de espécimes de *Culex (Culex)* sp por  
DNA *barcode* e morfometria geométrica alar**

**São Paulo**  
**2021**

**Gabriella Ricomini Caetano Clemente**

**Avaliação comparativa da identificação de espécimes de *Culex (Culex)* sp por  
DNA *barcode* e morfometria geométrica alar**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado a Superintendência de 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.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Karin Kirchgatter

Coorientador: Dr André Barreto 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

Clemente, Gabriella Ricomini Caetano

Avaliação comparativa da identificação de espécimes *de Culex (Culex) sp* por DNA *barcode* e morfometria geométrica alar / Gabriella Ricomini Caetano Clemente. – 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(a). Dr(a). Karin Kirchgatter.

Co-orientador: André Barreto Bruno Wilke

1. Culicidae/genética. 2.Código de barras de DNA taxonômico/classificação. 4. Classificação. 5. Reação em cadeia da polimerase/veterinária. 6. Análise de sequência de DNA/tendências.

SES/CCD/SUCEN - 99/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli 8/9275

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais e à minha irmã por sempre me apoiarem em absolutamente tudo o que eu faço.

Agradeço à minha orientadora Karin Kirchgatter, sem a paciência dela esse trabalho provavelmente não teria ficado assim.

Ao meu coorientador André Barretto Bruno Wilke que da mesma forma que minha orientadora teve uma paciência gigantesca comigo e me ensinou e ajudou muito.

À professora Regiane Maria Tironi de Menezes que me ensinou muito sobre identificação morfológica e estatística.

Aos meus colegas do laboratório Lilian, Eli, Bruno, Carol, Vini, Rose, Wilson, Evelyn e Jéssica por estarem sempre apoiando e ensinando com muita paciência e dedicação.

Ao meu melhor amigo Bruno por estar sempre me apoiando e ouvindo meus choros e ao meu amigo Guilherme por me dar muito apoio nesse ano tão desafiador.

E a todos que direta ou indiretamente me influenciaram de alguma forma para eu ser o que sou hoje.

## RESUMO

CLEMENTE, Gabriella Ricomini Caetano. **Avaliação comparativa da identificação de espécimes de *Culex (Culex) sp* por DNA *barcode* e morfometria geométrica alar**. 2021 51 p. 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 (Diptera, Culicidae) são um grupo grande e abundante de distribuição cosmopolita, com 3.578 espécies existentes classificadas em duas subfamílias, Anophelinae e, a maior com 11 tribos, Culicinae. *Culex* é de longe o maior gênero da tribo Culicini, com 768 espécies formalmente reconhecidas, divididas em 26 subgêneros. O subgênero *Culex* inclui 198 espécies. Mosquitos do gênero *Culex* são considerados vetores de muitos patógenos, incluindo diferentes arbovírus, o que faz a identificação correta das espécies essencial para o desenvolvimento de estratégias que visem o controle de doenças. Tradicionalmente, a identificação das espécies de mosquitos se baseia em caracteres morfológicos externos que não raras vezes podem estar danificados. Neste trabalho, indivíduos identificados como *Culex (Culex) sp.* pela taxonomia clássica foram avaliados por DNA *barcode* e morfometria geométrica alar (MGA) com o intuito de identificar as espécies. Os resultados foram comparados por análise de correspondência e teste qui-quadrado e mostraram uma fraca correspondência. A identificação por DNA *barcode* ainda é a melhor opção para situações de identificação incompleta, mas *Cx. coronotar* foi identificado com confiabilidade por MGA. Nossos resultados mostraram também a necessidade de ampliação do banco de asas para que mais espécies possam ser avaliadas e como é vital que a técnica de MGA seja aprimorada e testada em outras plataformas, tornando-a autossuficiente na identificação de espécimes.

**Palavras-chave:** Culicidae. Código de barras de DNA. Taxonomia. Classificação. Reação em cadeia da polimerase. Análise de sequência de DNA

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	6
1.1 OS MOSQUITOS	6
1.2 IDENTIFICAÇÃO	11
1.2.1 Taxonomia Clássica	11
1.2.2 Morfometria Geométrica Alar	13
1.2.3 Identificação Molecular	17
1.3 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	19
1.4 A CIDADE DE SÃO PAULO E PARQUES URBANOS	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	22
<b>3. METODOLOGIA</b>	22
3.1 AMOSTRAS	22
3.2 MGA	25
3.3 DNA BARCODE	26
3.3.1. Maceração Das Amostras	26
3.3.2. Extração do DNA Genômico	26
3.3.3. PCR do Gene Mitocondrial Citocromo C Oxidase I (COI)	27
3.3.4. Sequenciamento	28
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
3.5. ASPECTOS ÉTICOS	29
<b>4. RESULTADOS</b>	29
4.1 DNA BARCODE	29
4.1.1 PCR e Eletroforese	29
4.1.2 Sequenciamento e Porcentagem de Similaridade no Basic Local Alignment Search Tool (Blast)	30
4.2 IDENTIFICAÇÃO POR MGA	32
4.2.1 Fluxograma da Análise	32
4.3 COMPARAÇÃO	36
<b>5. DISCUSSÃO</b>	39
<b>6. CONCLUSÕES</b>	43
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	44
<b>ANEXOS</b>	
Anexo 1: Banco de Dados	50

# 1. INTRODUÇÃO

Mosquitos são insetos que, do ponto de vista do ser humano, são incômodos. Sabe-se que eles convivem no nosso entorno e nas florestas há muito tempo. Na América existem relatos desde a época colonial, onde Colombo e seus homens, em sua segunda expedição para a América, descreveram casos de febre amarela, quando tiveram que se refugiar dentro da mata em uma ilha do Haiti. Os mosquitos podem ter grande impacto na saúde humana e animal, quando hematófagos, principalmente por seu potencial para transmitir agentes infecciosos (FRANCO, 1969; FORATTINI, 1996; WILKE et. al. 2016).

A taxonomia surgiu com a necessidade de classificar e ordenar a vida existente no planeta e, em conjunto com a ecologia de insetos, dá base para a entomologia médica (FORATTINI, 1996). A entomologia médica surgiu no Brasil por iniciativa principalmente de médicos que se dedicavam à pesquisa de microrganismos relacionados a doenças importantes para a saúde pública. As questões relativas a esta ciência ganharam então importância crucial no Brasil por força da febre amarela no ano de 1901 (BENCHIMOL, 2011).

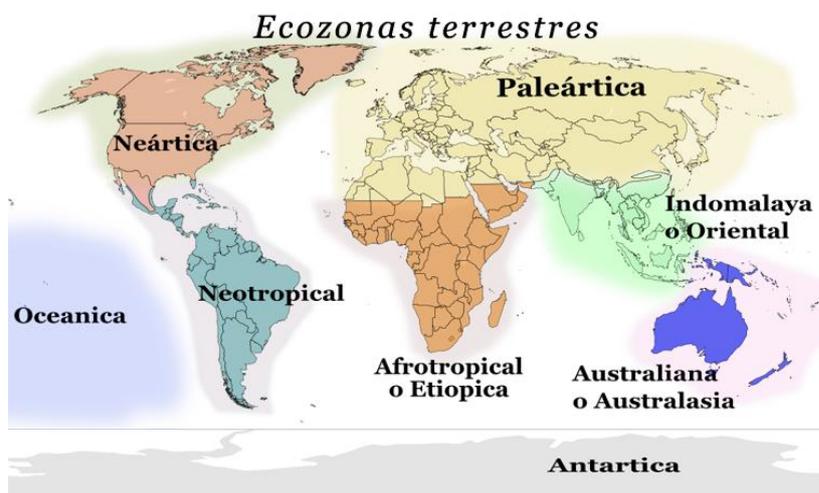
## 1.1 OS MOSQUITOS

Os mosquitos, família Culicidae (do latim culex = mosquito), pertencem à ordem Diptera, subordem Nematocera. Os culicídeos são um grupo grande e abundante que é de distribuição cosmopolita. A família inclui 3.578 espécies existentes classificadas em duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae e 113 gêneros. Os espécimes da subfamília Culicinae são separados em 11 tribos (HARBACH, 2008; HARBACH, 2011; FORATTINI, 1996).

*Culex* é de longe o maior gênero da tribo Culicini, o gênero inclui 768 espécies formalmente reconhecidas, divididas em 26 subgêneros. O subgênero *Culex* inclui 198 espécies (LAURITO et. al., 2013; SIMÕES et. al., 2020; HARBACH, 2011).

Os gêneros dominantes no Novo Mundo, determinados pelo número de espécies, são os mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*. Na região Neártica o gênero *Aedes* predomina, já na Neotropical o gênero *Culex* é predominante, não há outra região do mundo em que o gênero *Culex* é tão diversificado, é possível ver as regiões biogeográficas na Figura 1 (BRAM, 1967). O subgênero *Culex*, assim como a família da qual eles pertencem, é cosmopolita, mas se vê uma maior concentração nas regiões tropicais onde o ambiente úmido e o clima quente ajudam no rápido desenvolvimento do adulto (BRAM, 1967; SILVA, 2009).

A região neotropical, que compreende as Américas do sul e central, é o principal centro de origem e de dispersão dos mosquitos, pois possui formas endêmicas e em grande número. Isso ocorre pois, ao longo do tempo, as populações foram evoluindo juntas, sofrendo os efeitos das flutuações geoclimáticas, convivendo juntamente com espécies mais recentes e também as de caráter migratório (FORATTINI, 1996, 2002).



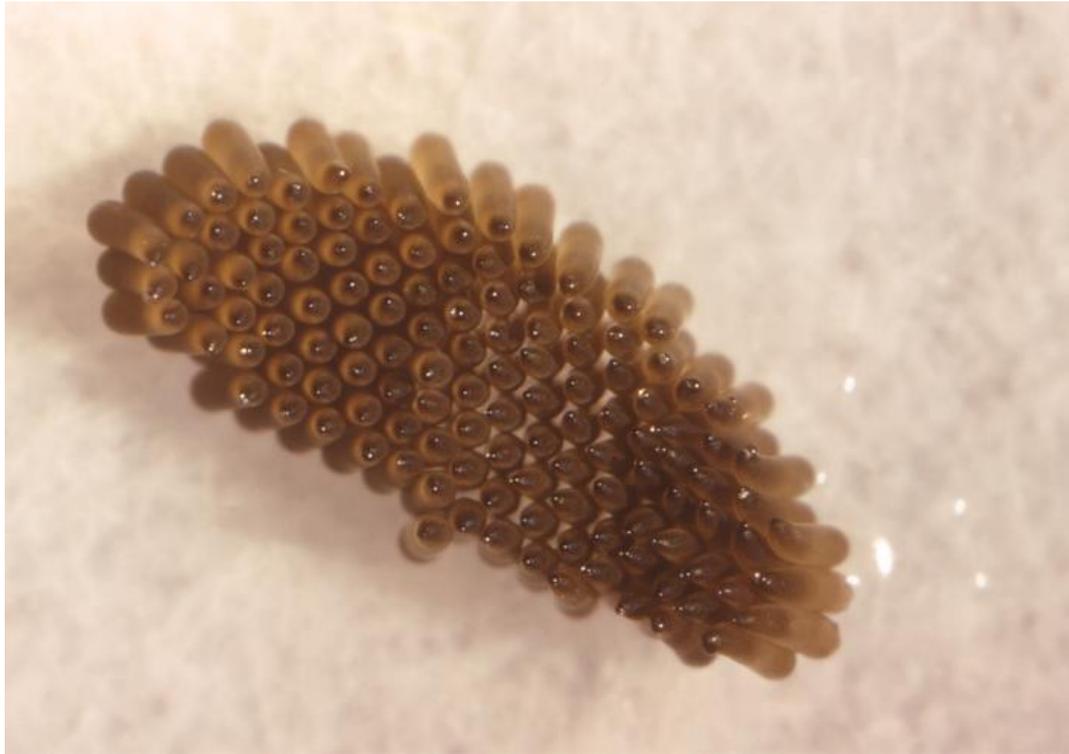
**Figura 1-** Regiões biogeográficas do mundo. Fonte: <http://www.megatimes.com.br/2014/05/zoogeografia-e-as-regioes-faunisticas.html>

São reconhecidos 14 subgêneros de *Culex* nas Américas, são eles: *Culex* Linnaeus, 1758; *Lutzia* Theobald, 1903; *Melanoconion* Theobald, 1903; *Aedinus* Lutz, 1904; *Carrollia* Lutz, 1905; *Neoculex* Dyar, 1905; *Micraedes* Coquillett, 1906; *Tinolestes* Coquillett, 1906; *Microculex* Theobald, 1907; *Anoedioporpa* Dyar, 1923; *Allimanta* Casal & Garcia, 1968; *Belkinomyia* Adames & Galindo, 1973; *Phenacomyia* Harbach & Peyton, 1992; *Nicaromyia* Broche & Rodríguez, 2001 e *Phytotelmatomyia* Rossi e Harbach, 2008. A maior parte das espécies conhecidas da Região Neotropical pertence aos subgêneros *Melanoconion* e *Culex* (FORATTINI, 2002; SILVA, 2009).

Conhecidos popularmente como pernilongos, muriçocas, ou carapanãs os mosquitos apresentam metamorfose completa, passando pelos estágios de ovo, larva (4 estágios) e pupa, sendo que todas as fases imaturas apresentam o seu desenvolvimento na água e adultos. Logo, são tipicamente aquáticos, quando larvas, e terrestres, quando adultos, pois se desenvolvem em coleções hídricas e em diversos ambientes de água doce, o que lhes permite resultados positivos de sobrevivência ao meio antropizado, facilitando a interação desses insetos com o ser humano (FORATTINI, 2002, 1996; SAYÃO, 2019; CONSOLI & LOURENÇO- DE-OLIVEIRA, 1994).

Os mosquitos *Culex*, em algumas espécies, não são tão seletivos em relação à coleção hídrica que fazem a oviposição, as larvas desses mosquitos podem ser encontradas em criadouros com água suja, em cidades de pequeno porte ou na periferia de centros urbanos maiores. Em grandes centros urbanos e em coleções de água altamente poluída, com despejos de esgoto, com muita matéria orgânica em decomposição e total ausência de oxigênio livre, geralmente é encontrado o *Cx. (Cux.) quinquefasciatus* Say (MORAIS e NATAL, 2020; GARCIA, 2009).

Os ovos, com exceção de algumas espécies de *Melanoconion*, se aglutinam de forma justaposta, tomando a forma de uma barca ou jangada. A estrutura da jangada é côncava dorsalmente (Figura 2). Os ovos são subfusiformes; isto é, alongados na forma de fuso, com uma das extremidades mais estreita que o centro (MORAIS e NATAL, 2020; SILVA, 2009).



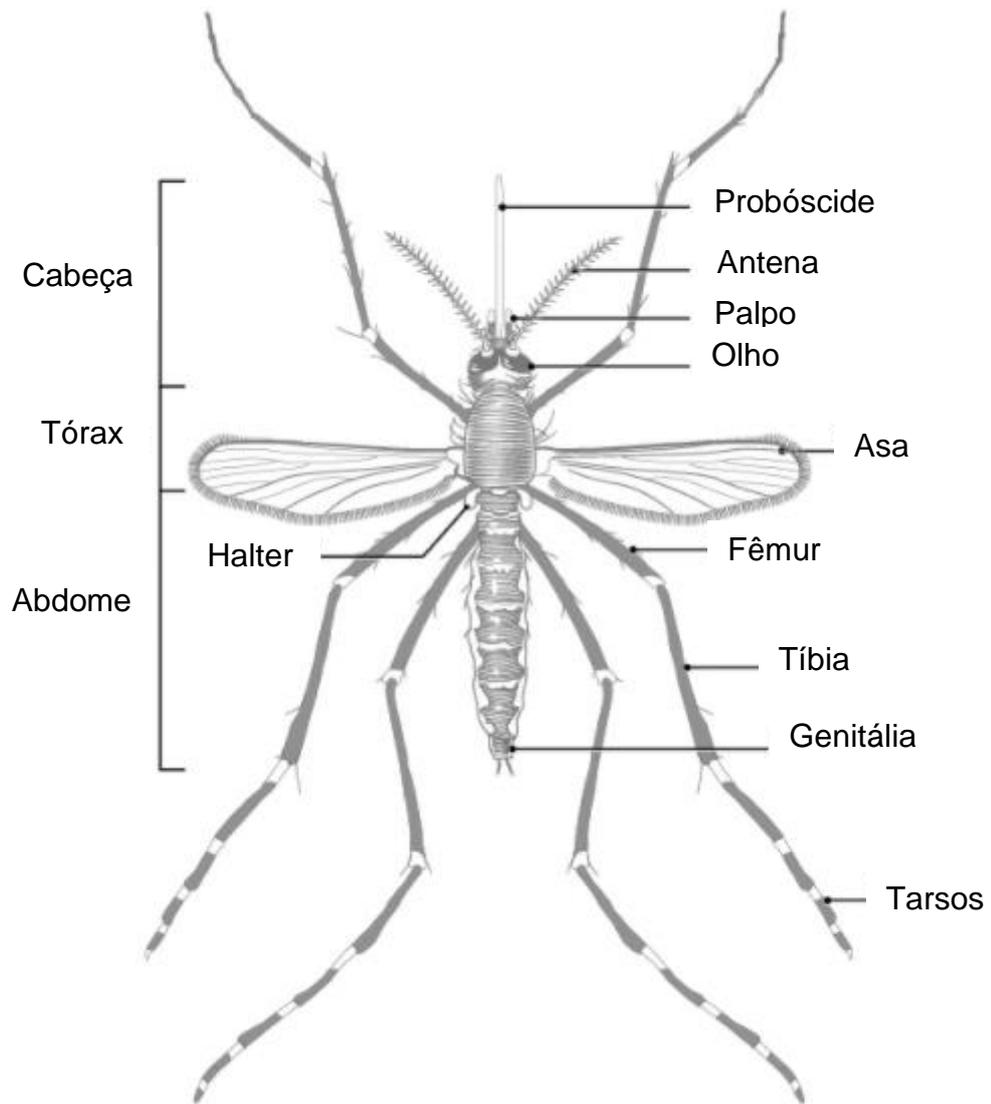
**Figura 2** - Ovos em jangada.

Fonte: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/culex.html>

Os adultos são insetos delicados, alados, possuem pernas e antenas longas e, na sua grande maioria são hematófagos. São classificados como de atividade crepuscular. A alimentação é feita por substâncias açucaradas nos indivíduos masculinos e os indivíduos femininos também são hematófagos. Os vertebrados de sangue quente são uma fonte comum de sangue para a maioria das espécies. Algumas espécies de mosquitos são oportunistas porque em meios urbanos se alimentam em seres humanos e, em meios mais silvestres, são encontrados também se alimentam em animais e dessa forma se tornam vetores de arbovírus e outros agentes patogênicos (FORATTINI, 2002; HARBACH, 2018; SAYÃO, 2019; MORAIS e NATAL, 2020).

O corpo é dividido em cabeça, tórax e abdome e, são reconhecidos pela sua longa probóscide e pela presença de escamas ao longo do corpo (Figura 3). Tem seu corpo caracterizado por possuir exoesqueleto, o esqueleto externo lhes confere uma proteção ao suporte, à mobilidade e aos apêndices articulados, sendo composto por uma camada de cutícula, uma camada acelular composta principalmente por uma substância polissacarídea chamada quitina, que juntamente com uma outra

substância, dessa vez, proteica chamada esclerotina, responsável pela coloração escura, confere um revestimento rígido (CONSOLI & LOURENÇO- DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI,1996).



**Figura 3:** Desenho do mosquito adulto

Fonte: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/what-is-a-mosquito.html>

## 1.2 IDENTIFICAÇÃO

São usadas diversas formas para a identificação de mosquitos, (i) a taxonomia clássica, onde a morfologia do corpo é usada; (ii) a identificação por morfometria geométrica alar, que usa a asa desses insetos como ferramenta; e (iii) a identificação molecular, que analisa o DNA.

### 1.2.1 Taxonomia Clássica

A taxonomia pode ser definida como a teoria e a prática do reconhecimento, delimitação e identificação dos organismos, com base no estudo da biodiversidade, que usa chaves morfológicas para esses objetivos, onde essas são a expressão dos genes, juntamente com a avaliação geográfica de distribuição no local em pesquisa, comportamentais, e fisiológicos desses animais (FORATTINI, 1996).

A taxonomia descritiva é muito ampla, seu produto é muito mais do que um inventário da biodiversidade do planeta, abrangendo todo o alcance da vida. A descrição precisa das espécies e um conhecimento aprofundado da variação geográfica são essenciais para o controle de vetores. Por esse motivo é um dos ramos mais complexos e que é muito difícil encontrar um profissional que compreenda todas as variantes que interferem em uma identificação precisa (MITCHELL et al., 2002; WILSON, 2003).

A maioria das espécies descritas de mosquitos foram reconhecidas através da morfo-taxonomia tradicional usando morfologia diferencial como Linnaeus originalmente pretendia. Chaves morfológicas detalhadas e técnicos entomológicos qualificados são frequentemente necessários para separar espécies coletadas em armadilhas de mosquitos adultos ou como larvas em seu ambiente aquático, e o conhecimento regional é extremamente importante para este trabalho (BEEBE, 2018; SIMÕES et. al., 2020).

A identificação morfológica muitas vezes é limitada a determinado nível de identificação. Uma das desvantagens mais sérias de usar apenas características morfológicas para identificação de espécies é o fato de que alguns traços ou caracteres são aparentes apenas durante certos estágios do ciclo de vida. Além disso, as variações fenotípicas nem sempre estão relacionadas à variação genotípica, portanto, as relações corretas podem ser difíceis de determinar. A variação morfológica dentro das espécies e a sobreposição de caracteres diagnósticos baseados em estruturas clássicas muitas vezes não permitem uma identificação correta. Esse tipo de identificação também pode ser demorada e não chegar em nível de espécie. O uso de chaves muitas vezes exige um nível tão alto de especialização que diagnósticos incorretos ou incompletos são comuns (HERBERT, 2003; CYWINSKA, HUNTER & HERBERT, 2006; MURUGAN et. al., 2016; GARZÓN, 2020).

Espécies crípticas são espécies dificilmente diferenciáveis sob o ponto de vista puramente morfológico. Para tais casos, têm-se utilizado o rótulo de complexo de espécies. Dentro desses complexos, tornou-se possível identificar populações com acentuadas diferenças de comportamento, inclusive no que diz respeito ao papel vetorial epidemiologicamente significativo. Atualmente observa-se o desenvolvimento e emprego de variada tecnologia adaptada à finalidade taxonômica, objetivando assim a diferenciação dessas espécies crípticas (FORATTINI, 2002).

Um outro ponto relevante, que muitos autores como Wilke (2016), Garzon (2020) também destacam, é que muitos caracteres morfológicos importantes como escamas e pernas dos culicídeos são perdidos em coletas de campo, impossibilitando uma identificação precisa desses indivíduos. Um dos motivos para perda de material é a presença de insetos maiores no local de coleta e a entrada dos mesmos nas armadilhas, pois eles batem contra os mosquitos levando à perda de escamas e pernas. A forma que esses insetos são acondicionados também é um empecilho, dificultando a correta identificação. Dessa forma percebemos que mesmo sendo muito utilizada, a identificação morfológica pode ser problemática em determinados pontos, quando se trata de diferenciações muito complexas e/ou imperceptíveis.

Dada a escassez de taxonomistas muitos grupos e áreas geográficas e os fundos insuficientes para estudos taxonômicos, uma abordagem multidisciplinar da

taxonomia que inclua dados morfológicos, moleculares e de distribuição é essencial o uso de metodologias integradas é cada vez mais necessário e há um apelo realmente forte para a implantação da “Taxonomia Integrativa”. Segundo Dayrad (2005), esta nova abordagem envolve perspectivas múltiplas e complementares (filogeografia, morfologia comparativa, genética, ecologia, desenvolvimento, comportamento, entre outras) e tem auxiliado com sucesso a morfologia tradicional em estudos sobre biodiversidade (BELLAFRONTTE, 2013).

### 1.2.2 Morfometria Geométrica Alar

O ser humano tenta medir e definir formas ao seu redor desde muito tempo, onde inicialmente era chamado de “medida da terra” pelos babilônicos e egípcios em torno de 624-548 a.C. posteriormente esse termo foi traduzido para o grego como “geometria”, sendo estudada ao longo de toda a história da humanidade, porém, mais recentemente René Descartes (1596-1650) que com suas ideias de coordenadas une geometria e matemática. Ou seja, descreve a geometria em termos de álgebra, e permite o surgimento do cálculo diferencial e integral e a ideia de espaço curvo. O que permite toda a fundamentação para a morfometria geométrica (FORNEL,2012).

Ainda segundo Fornel (2012), o estudo da forma dos organismos, determinada como morfologia, é muito antigo onde este termo usado no século XVIII ganha força quando juntamente com as correlações entre medidas de distâncias em estruturas biológicas dá início ao estudo da morfometria ou biometria no fim do século XIX. Apenas com a junção da estatística é que passou a ser utilizada.

A morfometria geométrica é uma área de pesquisa na fronteira entre biologia, estatística e geometria. A partir de 1993 ganhou força com o desenvolvimento de programas para essa análise por causa de Rohlf e Marcus em “A Revolution in Morphometrics” (FORNEL,2012).

Os dados utilizados em morfometria geométrica se baseiam em coordenadas cartesianas chamadas “marcos anatômicos”, descritos por Fred L. Bookstein (1984), que definem a variação no alvo dos estudos, para o aperfeiçoamento da técnica de análise. Estas coordenadas podem ser definidas num plano e ter duas dimensões ( $x, y = 2D$ ) ou em um espaço de três dimensões ( $x, y, z = 3D$ ). As coordenadas cartesianas são distâncias especiais (em relação à origem de um referencial) que preservam toda a informação geométrica entre um conjunto de pontos (FORNEL,2012). Possibilitando a análise da variância desses marcos entre indivíduos.

Esses marcos anatômicos são marcados digitalmente por técnico treinado e então são geradas as coordenadas cartesianas. Após essas etapas a sobreposição ou superposição dos marcos anatômicos é a etapa que gera as variáveis a serem analisadas (tamanho e forma). Essa sobreposição é dada graças à análise generalizada de Procrustes, que de forma muito simplificada, minimiza as diferenças entre marcos anatômicos correspondentes e a deformação de placas finas (thin-plate splines) que demonstra as deformações em uma grade de forma um objeto em outro (FORNEL, 2012).

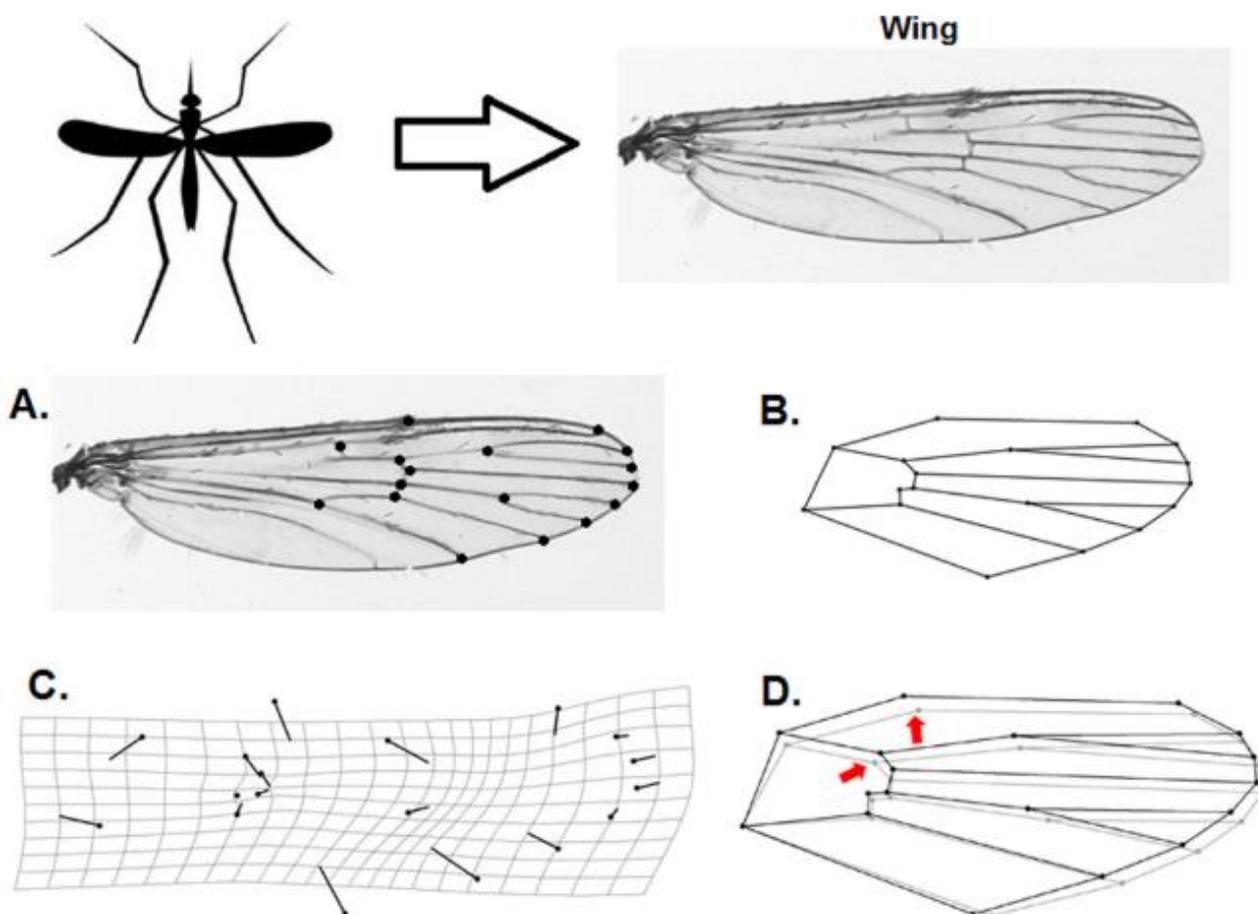
O termo Procrustes vem da mitologia grega onde Procrusto, personagem da mitologia grega que ajustava o tamanho de suas vítimas a uma cama de ferro em que esticava as vítimas pequenas e amputava ou decapitava as de maior estatura (FORNEL, 2012). A análise generalizada de Procrustes gera um espaço curvo chamado de “espaço de forma de Kendall” que não se pode aplicar as análises multivariadas em um espaço curvo, para utilizá-los se faz uma aproximação do espaço de forma por meio de uma projeção da forma num espaço tangente euclidiano, no qual pode-se então aplicar análise estatística linear permitindo então que as análises estatísticas possam ser aplicadas e interpretadas (ROHLF, 1999).

As asas dos mosquitos são um saco colabado, de paredes finas e membranosas que se soldam pelas faces internas, sendo percorridas por formações tubulares denominadas genericamente de veias, que permitem a sustentação da asa. Suas próprias paredes consistem nos mesmos elementos que a parede do corpo, ou seja, cutícula, epiderme e membrana basal, e seu lúmen contém nervos, traqueias e o fluido

corporal. A disposição dessas veias recebe o nome de venação (SNODGRASS, 1993; FORATTINI, 1996).

Nas asas dos insetos, pode-se distinguir uma área de articulação basal, rígida e uma extensão distal venosa, mais flexível. Possuem músculos alares especializados, do tipo sincrônico, permitindo o voo (SNODGRASS, 1993; MORAIS e NATAL, 2020). O desenvolvimento das características das asas pode ser variável entre as espécies, assim como na manifestação do dimorfismo alar. O padrão de veias das asas apresenta características peculiares, de modo a auxiliar na identificação das espécies (LIMA e SERRA, 2008; MORAIS e NATAL, 2020).

A morfometria geométrica alar (MGA) é a junção entre geometria, biologia e estatística aplicado no estudo de asas. Onde nesta junção é possível o estudo multivariado da forma de estruturas biológicas em duas ou três dimensões espaciais. Esta técnica permite várias avaliações biométricas estatísticas e também a representação gráfica da forma e do tamanho, além de preservar a integridade física da forma e evitar o colapso em medidas lineares que não representam a estrutura como um todo, como pode ser visto na Figura 4 (LORENZ et. al., 2017; FONSECA, 2018).



**Figura 4:** Morfometria geométrica alar. **A.** Marcos anatômicos (landmarks) de uma asa de mosquito, 18 no total; **B.** Diagrama da asa no programa, não faz parte dos dados é apenas uma representação para facilitar a visualização das interações entre os pontos; **C.** Gráfico que mostra o espaço curvo e as setas mostram a variação dos marcos; **D.** Diagrama mostrando o evento de sobreposição, as setas indicam os marcos mais variáveis nesta comparação. \*As figuras foram montadas apenas para facilitar a visualização do processo e não tem relação umas com as outras (LORENZ et. al., 2017).

Os estudos com dados morfométricos da forma e nervuras das asas de mosquitos Culicidae são feitos geralmente com fêmeas na fase adulta, por apresentarem maior diversidade morfométrica, em comparação aos machos e por serem as mais coletadas (MORAIS e NATAL, 2020).

A MGA tem muitas vantagens pois permite vários tipos de estudo como análises intraespecíficas, interespecíficas, o dimorfismo sexual, variações causadas por estresse ambiental, poluição, urbanização dos mosquitos e deformação laboratorial nas asas (LORENZ et. al., 2017; OLIVEIRA-CHRISTE et al, 2020).

Utilizada para auxiliar a identificação morfológica a MGA, pode ser usada para identificar mosquitos vetores de importância epidemiológica, espécies irmãs e espécies crípticas, cuja identificação por outras técnicas se mostra problemática (WILKE et. al., 2016).

A MGA está sendo comprovada como uma ferramenta eficiente para ser usada, junto com a tradicional identificação por chaves morfológicas e molecular de mosquitos, é relativamente barata, não exige que uma pessoa muito treinada a execute e requer apenas que pelo menos uma asa esteja intacta (SIMÕES et. al., 2020; LORENZ et. al., 2017). É uma técnica de fácil utilização e aplicabilidade, levando em consideração que as asas são estruturas onde não ocorrem tantas perdas nas coletas.

### 1.2.3 Identificação Molecular

Nas últimas duas décadas houve um aumento exponencial no reconhecimento de espécies crípticas, com o avanço e uso de ferramentas moleculares. Essas têm ganhado seu espaço na taxonomia e, cada vez mais, têm sido usadas para estudos filogenéticos e para indivíduos que são de difícil identificação (HERBERT et. al, 2003; MEIER et. al, 2006).

Em 1983, a Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) foi descrita por Kary Mullis revolucionando a genética molecular. A reação de PCR possibilitou uma nova estratégia na análise dos genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de sequências específicas de DNA *in vitro*. A PCR permite o uso do DNA genômico, contido dentro do núcleo celular, como o DNA citoplasmático das células, encontrado nas organelas, aumentando o leque de estudos (HERBERT et. al, 2003; SILVA, 2009).

A PCR tornou possível o estudo de espécimes incompletos ou danificados, difíceis de serem identificados morfológicamente, assim como de exemplares depositados em museus, espécies de pequeno porte e animais fossilizados. Também é possível que para a identificação seja necessário apenas uma pequena parte do

espécime, já que a sensibilidade da PCR é muito alta (SILVA, 2009; WALTON et al, 1999).

A mitocôndria é uma das organelas contidas no citoplasma das células, é alongada, contém cromossomos próprios de herança materna e é responsável pela disponibilização de energia para a célula. Dentro dessas organelas tem um genoma, separado da cromatina nuclear, conhecido como DNA mitocondrial (DNAMt), usado em estudos de filogenética molecular, que é relativamente simples, O DNAMt é constituído, na grande maioria dos casos, por uma dupla fita circular contendo 37 genes, dos quais dois codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam RNAs transportadores e 13 codificam proteínas. Além desses genes, o DNAMt possui uma região não-codificante, que é responsável pelo controle da replicação e transcrição do genoma da mitocôndria (BOORE, 1999; SAYÃO, 2019).

As informações que podem ser tiradas da sequência do DNA são ricas e dificilmente levam a erros. Um fragmento do gene mitocondrial da subunidade I do gene do citocromo c oxidase (*coi*), tem sido amplamente empregado como marcador molecular para a identificação de diversos grupos de invertebrados e vertebrados, por sua divergência genética (HERBERT et. al., 2004; LAURITO et al., 2013; BICKFORD et al., 2006).

O gene *coi* codifica uma proteína pequena e muito conservada, situada na face externa da membrana interna da mitocôndria (a proteína heme). É periférica e seu tamanho e mobilidade permitem-lhe cumprir sua função na cadeia de transporte de elétrons para a molécula de oxigênio (HERBERT et al, 2003; SAYÃO, 2019).

Uma desvantagem do DNA *barcode* é que é uma técnica que pode ter limitações em identificar espécies separadas recentemente, já que o gene *coi* é um gene de evolução lenta (HERBERT et al, 2003; LAURITO et al, 2013). O uso do algoritmo de *Best Close Match* (BCM) de Meier et al. (2006) permite melhorar a interpretação no momento de ver a similaridade da sequência.

### 1.3 IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Vários são os fatores que podem influenciar a capacidade e a competência de um inseto na transmissão de patógenos como a abundância, a longevidade e a suscetibilidade para a infecção. Bem como fatores que influem no contato do mosquito com os humanos, como a tendência à antropofilia ao adentrar nas habitações para alimentação de sangue e o comportamento da espécie após a alimentação (MORAIS, S.A.; NATAL, D, 2020; FORATTINI, 2002).

Membros do complexo *Culex pipiens* Linnaeus são vetores responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos causadores de filariose linfática, o vírus da encefalite de Saint Louis e da encefalite eqüina. *Culex quinquefasciatus* é vetor dos vírus do Nilo Ocidental, vírus Mayaro e vírus Oropouche (KASAI et al., 2008; HOCH, PINHEIRO, ROBERTS, GOMES, 1987).

De maneira genérica, membros do subgênero *Culex* tem capacidade vetora de transmissão das seguintes doenças: Vírus da Encefalite Equina Oriental (EEEV), Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Vírus do Nilo Ocidental (WNV), Vírus Chikungunya (CHIKV), Vírus Everglades (EVEV), Vírus Keystone (KEYV), Mayaro Vírus (MAYV), Vírus Oropouche (OROV), Vírus Rocio (ROCV), Vírus Zika (ZIKV) e Tensaw (TENV) (SIMÕES et. al., 2020).

Mosquitos pertencentes a um pouco menos do que 150 espécies compreendidas nos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* são a causa indireta de mais morbidade e mortalidade entre os humanos do que qualquer outro grupo de organismos, mostrando sua importância para a saúde pública, assim como a necessidade de mais estudos sobre eles (HARBACH,2008; SILVA, 2009; MURUGAN et. al., 2016).

### 1.4 A CIDADE DE SÃO PAULO E PARQUES URBANOS

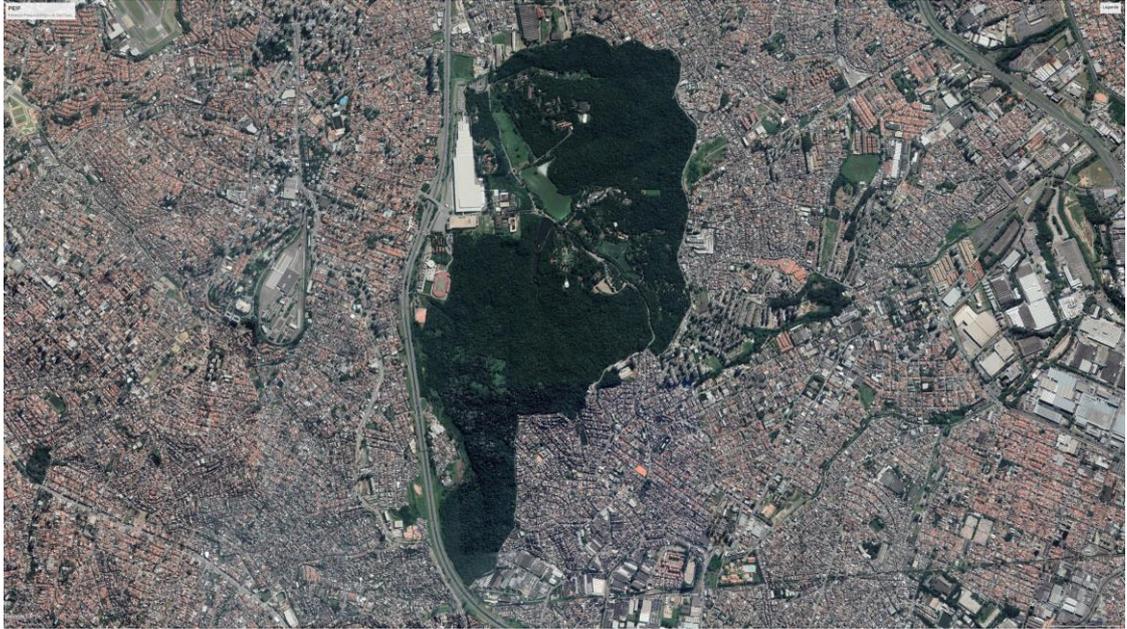
A cidade de São Paulo, considerada a maior metrópole do Brasil, com uma população estimada de 12.325.232 milhões de habitantes pelo Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatística (IBGE) em 2020. É a maior metrópole do país e faz parte da Região Metropolitana de São Paulo, terceira maior mancha urbana do mundo. A cidade está inserida na região de Mata Atlântica do sudeste brasileiro e hoje ainda restam alguns remanescentes de mata pela cidade (PDUI, 2015; MEDEIROS SOUSA, 2014).

A cidade de São Paulo possui mais de 100 parques públicos que preservam fragmentos da vegetação original, comportam lagos, servem de abrigo para aves e mamíferos silvestres, utilizados pela população como espaços para o lazer, prática de atividades físicas e contato com a natureza (MEDEIROS SOUSA, 2014; SAYÃO, 2019).

Estes parques podem ser considerados como “ilhas verdes urbanas” por se distinguirem como manchas de áreas verdes incrustadas na malha urbana, com diferentes características em termos de tamanho e forma da área, localização (periféricos ou centrais), vegetação e fauna presentes, corpos d’água (lagos, córregos, represas, tanques, etc.) e estrutura socioeconômica da população humana do entorno. A heterogeneidade destes ambientes pode refletir em diferenças consideráveis na riqueza, abundância e composição das populações de culicídeos (MEDEIROS SOUSA, 2014; SAYÃO, 2019).

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo está inserida no PEFI – Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – considerado o maior fragmento florestal de Mata Atlântica em área urbana na região metropolitana da cidade de São Paulo, a mancha de Mata Atlântica causada pelo PEFI pode ser vista na Figura 5 (ZOOLOGICO DE SÃO PAULO, 2019).



**Figura 5:** Visualização da mancha de Mata Atlântica causada pelo PEFI e Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Medeiros Sousa et. al, (2013) e Medeiros Sousa, (2014) também relatam as espécies desses culicídeos que sabidamente vivem nos parques municipais da cidade de São Paulo e em regiões mais distantes, que são: *Ae. (Och.) fluviatilis* Lutz, *Ae. (Och.) scapularis* Lynch Arribalzaga, *Ae. aegypti* Linnaeus, *Ae. albopictus* Skuse, *Cx. (Cux.) bidens* Dyar, *Cx. (Cux.) chidesteri* Dyar, *Cx. (Cux.) lygrus* Root, *Cx. (Cux.) quinquefasciatus*, *Cx. (Cux.) dolosus* Lynch Arribalzaga, *Cx. (Cux.) nigripalpus* Theobald, *Cx. (Cux.) declarator* Dyar & Knab, *Coquillettidia (Rhynchotaenia) venezuelensis* Theobald, *An. (Anopheles) fluminensis* Root, *An. (Nyssorhynchus) strodei* Root, *An. (Nys.) evansae* Brèthes, *An. (Nys.) albitarsis* Lynch Arribalzaga. Também foram encontrados espécimes dos gêneros *Toxorhynchites* sp. Theobald, *Psorophora* sp. Robineu-Desvoidy, *Mansonia* sp. Blanchard, *Limatus* sp. Theobald, *Uranotaenia* sp. Lynch Arribalzaga, *Wyeomyia* sp. Theobald, *Trichoprosopon* sp. Theobald e *Lutzia* sp. Theobald.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Comparar os resultados da identificação por morfometria geométrica alar com os da identificação por DNA *Barcode* de espécimes de *Culex* do subgênero *Culex*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar, por DNA barcode, espécimes que na identificação morfológica não foi possível chegar no nível de espécie;
- Fazer a identificação dos mesmos espécimes pelo método da morfometria geométrica alar;
- Avaliar o uso DNA barcode para identificação de espécies de *Culex* do subgênero *Culex*;
- Avaliar o uso de MGA para identificação de espécies de *Culex* do subgênero *Culex*.

## 3. METODOLOGIA

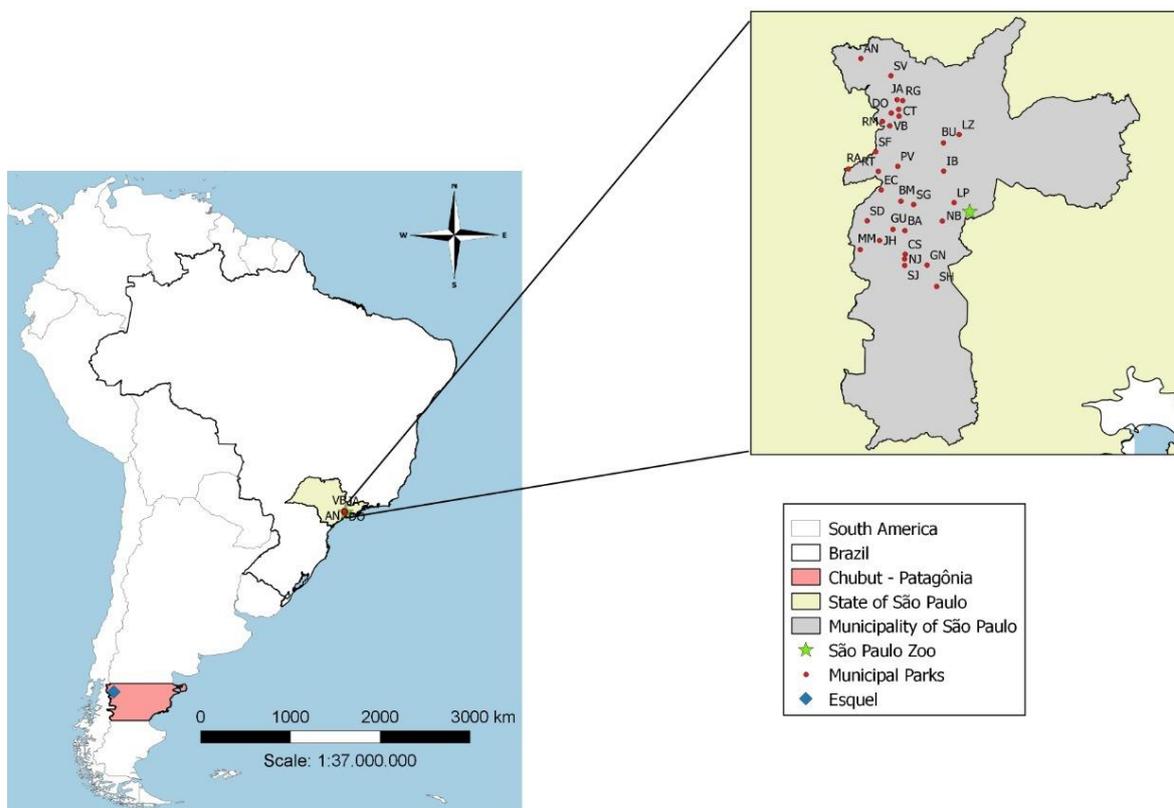
### 3.1 AMOSTRAS

Os exemplares de culicídeos usados foram coletados na Fundação Parque Zoológico de São Paulo no período do mês de março de 2015 para o projeto FAPESP nº12/51427-1, para a busca de aves hospedeiras de malária aviária, e em um segundo momento passou a buscar as espécies dos mosquitos vetores. O referido trabalho coletou esses exemplares com armadilhas luminosas CDC, com isca de CO<sub>2</sub> (gelo seco). As armadilhas do CDC foram instaladas 1,5 m acima do solo e passaram um

total de 12 horas no local, abrangendo o crepúsculo noturno e matutino. Esses mosquitos posteriormente formaram o banco de asas usado na MGA.

Os mosquitos foram coletados em:

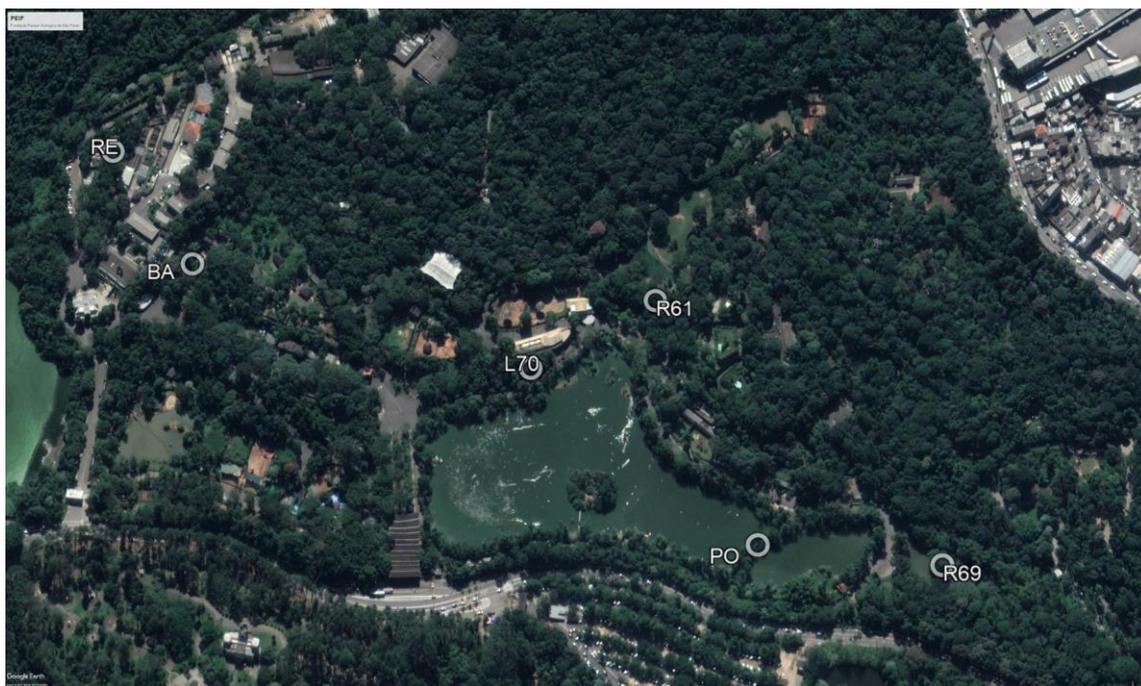
- i. Parques Municipal da cidade de São Paulo, Brasil: Anhanguera, Barragem, Burle Marx, Buenos Aires, Castelo, Cidade Toronto, São Domingos, Eucaliptos, Ganhembu, Guarapiranga, Ibirapuera, Jacinto Alberto, Jardim Felicidade, Jardim Herculano, Lina e Paula Raia, Luz, M. Boi Mirim, Nabuco, Nove de Julho, Previdência, Cohab Raposo Tavares, Rodrigo de Gasperi, Vila dos Remédios, Raposo Tavares, Santos Dias, Colina de São Francisco, Severo Gomes, Shangrilá, São José, Senhor do Vale, Orlando Villas-Boas;
- ii. Zoológico de São Paulo (Fundação Parque Zoológico de São Paulo—FPZSP);  
e
- iii. Estepe florestal perto da cidade de Esquel, Argentina. (Figura 6)



**Figura 6:** Locais de coleta dos espécimes das 11 espécies de *Culex* do subgênero *Culex* que compõem o banco de asas. Anhanguera (AN), Barragem (BA), Burle Marx (BM), Buenos Aires (BU), Castelo (CS), Cidade Toronto (CT), São Domingos (DO), Eucaliptos (EC), Ganhembu (GN), Guarapiranga (GU), Ibirapuera (IB), Jacinto Alberto (JA), Jardim Felicidade (JF), Jardim Herculano (JH), Lina e Paula Raia (LP), Luz (LZ), M. Boi Mirim (MM), Nabuco (NB), Nove de Julho (NJ), Previdência (PV), Cohab Raposo Tavares (RA), Rodrigo de Gasperi (RG), Vila dos Remédios (RM), Raposo Tavares (RT), Santos Dias (SD), Colina de São Francisco (SF), Severo Gomes (SG), Shangrilá (SH), São José (SJ), Senhor do Vale (SV), Orlando Villas-Boas (VB), São Paulo ZOO (☆), and Esquel— Argentina (♦) (SIMÕES et. al, 2020)

Esses indivíduos passaram por identificação morfológica usando as chaves de Forattini 1965 e 2002 e estavam armazenados a -20 °C no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Superintendência de Controles de Endemias. Um total de 529 indivíduos foram identificados apenas como *Culex (Culex)* sp neste projeto FAPESP, dentre esses, apenas 194 tiveram suas asas separadas e preparadas para a MGA, entre essas 108 amostras o abdômen, porção do mosquito usada no trabalho, ainda estavam armazenados e neste trabalho foram usadas 96. Após a análise molecular restaram 63 exemplares.

Esses 63 exemplares são provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, onde a disposição das armadilhas foi: Bosque das Aves (BA), Lago 70 (LG70), Recinto 61 (R61), Recinto 69 (R69), Extra (RE) e Ponte (PO), a disposição desses pontos podem ser visualizadas na Figura 7.



**Figura 7:** Distribuição dos pontos de coleta pela Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Os símbolos (○) representam o local de montagem das armadilhas.

### 3.2. MGA

Para a MGA, a asa direita de cada espécime foi separada do corpo e montada entre uma lâmina de microscópio e uma lamínula com bálsamo do Canadá. Cada asa foi fotografada com uma ampliação de 40x com uma câmera digital Leica DFC320 acoplada a um estereomicroscópio Leica S6 e, posteriormente, 18 marcos anatômicos foram digitalizados usando o software TpsDig V1.40, como em Wilke et al. 2016.

Esses exemplares de *Culex (Culex) sp* foram analisados em software MorphoJ 1.02 contra um banco de asas de 11 espécies desse subgênero, previamente estabelecido (SIMÕES et al., 2020). São elas: *Cx. (Cux.) acharistus*, *Cx. (Cux.) ameliae*, *Cx. (Cux.) bidens*, *Cx. (Cux.) chidesteri*, *Cx. (Cux.) coronator*, *Cx. (Cux.) declarator*, *Cx. (Cux.)*

*dolosus*, *Cx. (Cux.) eduardoi*, *Cx. (Cux.) habilitator*, *Cx. (Cux.) nigripalpus* e *Cx. (Cux.) quinquefasciatus*. A análise foi realizada com cinco espécimes de *Cx. (Cux.)* sp. e foi discriminatória através de um morfoespaço definido pela análise de variável canônica (CVA) para cada uma das 11 espécies. Por exclusão das espécies mais distantes dentro do morfoespaço foi definido a qual espécie aquele indivíduo pertencia. Essa análise possibilitou a identificação por MGA das espécies de cada exemplar. Essa identificação foi então confrontada na análise molecular através do DNA *Barcode* como descrito a seguir.

### 3.3 DNA *BARCODE*

Para a avaliação molecular dos mosquitos foi usada apenas a porção referente ao abdômen dos exemplares já identificados como descrito no item 3.1.

#### 3.3.1. Maceração das Amostras

Os exemplares foram macerados individualmente usando o robô FastPrep-96™ (MP Biomedicals). Em cada microtubo foi adicionado 1g esferas de cerâmica de 1,4mm (MagNA Lyser Green Beads - Roche Molecular Systems) em combinação com 2 esferas de cerâmica revestidas com óxido de zircônio de 6,35 mm (MP Biomedicals) e o tampão de lise Master Mix do Kit comercial Wizard® SV GenomicDNA Purification System (Promega) para extração de gDNA de tecidos sem a Proteinase K (200µl de Nuclei Lysis Solution, 50µl de EDTA 0.5M com pH 8.0, 5µl RNase A Solution). O material foi agitado 3 minutos a 1800 rpm. Após a agitação no robô as amostras foram centrifugadas por 5 min a 14000 rpm em temperatura ambiente e estavam prontas para a próxima etapa da extração de gDNA.

#### 3.3.2. Extração do DNA Genômico

Neste estudo foi usado o Wizard® SV GenomicDNA Purification System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante para extração de DNA de

tecidos. Imediatamente após a maceração, as amostras receberam 20µl de proteinase K (20mg/ml), e foram acondicionadas em um termobloco à 55°C de 16 a 18h. Após esse período, com a amostra ainda aquecida, foi adicionado 250 µl de Wizard® SV Lysis Buffer e homogeneizado. A amostra foi então transferida para sua posição na Wizard® SV 96 Binding Plate, devidamente encaixada no aparato de vácuo, que foi aplicado até o material passar pelas membranas. Neste ponto foi iniciada a etapa de lavagem das membranas adicionando 800µl de Wash Solution mais Etanol em cada poço da Wizard® SV 96 Binding Plate e aplicado vácuo. Essa lavagem foi realizada 4 vezes. Após a última lavagem foi aplicado apenas vácuo por 5 min, a fim de aspirar/secar qualquer resquício de tampão de lavagem (Wash Solution) ou etanol. Para coletar a amostra, a Wizard® SV 96 Binding Plate foi transferida para uma placa coletora com capacidade de 2 ml (Deep well plate) com o adaptador específico para o uso do aparato de vácuo. Anteriormente a isso, qualquer resto de material que possa estar na placa foi removido pressionando gentilmente a placa contra um papel absorvente. Uma vez na placa coletora foi adicionado 50 µl de água livre de Nuclease e incubado por 2 min a temperatura ambiente. Terminada a incubação foi aplicado o vácuo e a amostra foi transferida para a placa coletora. A amostra permaneceu armazenada a -20 °C até o uso.

### 3.3.3. PCR do Gene Mitocondrial Citocromo C Oxidase I (COI)

A PCR seguiu o protocolo descrito por Ruiz et al. (2010) com os oligonucleotídeos descritos por Folmer et al., 1994, LCO1490 (5' – GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3') e HCO2198 (5' – TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3') que amplificam um fragmento de 710 pb da subunidade I do gene mitocondrial *coi* em invertebrados. A PCR foi realizada em 25 µl, com 1µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 2,5µl de Tampão para PCR 10X, 1,25µl de mistura de dNTPs 10mM, 0,75µl de cada oligonucleotídeo, 0,4µl de enzima *Taq* Platinum DNA Polymerase 5U/µl (Invitrogen), 16,35µl de H<sub>2</sub>O Ultra pura e 2µl de DNA purificado. A amplificação ocorreu com um ciclo a 95 °C por 5 min para a desnaturação inicial do DNA e ativação da enzima, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 seg (desnaturaçã), 48 °C por 30 seg

(anelamento) e 72 °C por 45 seg (extensão); terminando com um ciclo a 72 °C por 10 min para a extensão final.

O produto da PCR foi visualizado em um gel de Agarose 1%, onde dez microlitros deste foram aplicados com Tampão de Carregamento 1X. O fragmento de DNA foi revelado usando um intercalante de DNA GelRed™ (Uniscience) e seu tamanho foi dado em comparação ao padrão de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder - Thermo Scientific). O perfil de corrente elétrica empregado foi 90V por 60 min.

### 3.3.4. Sequenciamento

Os produtos gerados pela PCR foram sequenciados diretamente em um sequenciador ABI Genetic Analyser (ABI, USA) usando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) empregando os mesmos oligonucleotídeos usados nas PCRs. Na reação foi usado 1µL de oligonucleotídeo 5pmol, 3,25 µL do tampão de Reação, 0,75µL de BigDye, 1µL do produto da PCR e 4,5µL de água ultrapura. A amplificação ocorreu empregando inicialmente 96°C por 60 seg, seguindo para 40 ciclos de 96°C por 15 seg e 50°C por 4min. O material foi precipitado adicionando 9µL de isopropanol 66% e mantido à temperatura ambiente por 15 min. Após esse período foi centrifugado por 20 min a 12000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o material passou por uma lavagem com 150 µL de isopropanol 75% e centrifugado a 12000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o isopropanol foi removido e a amostra permaneceu à temperatura ambiente até completa evaporação do álcool. Antes de ser aplicada no sequenciador a amostra recebeu 10 µL de formamida, sendo desnaturada e então aplicada no sequenciador de capilar 3500 (Applied Biosystems) multiusuário do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

Ambas as fitas foram sequenciadas e as sequências foram corrigidas e alinhadas no programa SeqMan (DNASTAR Lasergene versão 7.0.0) para obtenção da sequência consenso. As sequências obtidas foram identificadas por comparação com o banco de dados de sequências de DNA do GenBank® ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)). Identificação positiva e atribuição de espécies

foi feita quando correspondências exatas ou quase exatas (> 98%) fossem obtidas utilizando o algoritmo BCM.

### 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos na identificação de espécies pelos dois métodos (MGA e DNA barcode) foram comparados por teste qui-quadrado e a concordância foi avaliada por análise de correspondência obtida no programa R.

### 3.5. ASPECTOS ÉTICOS

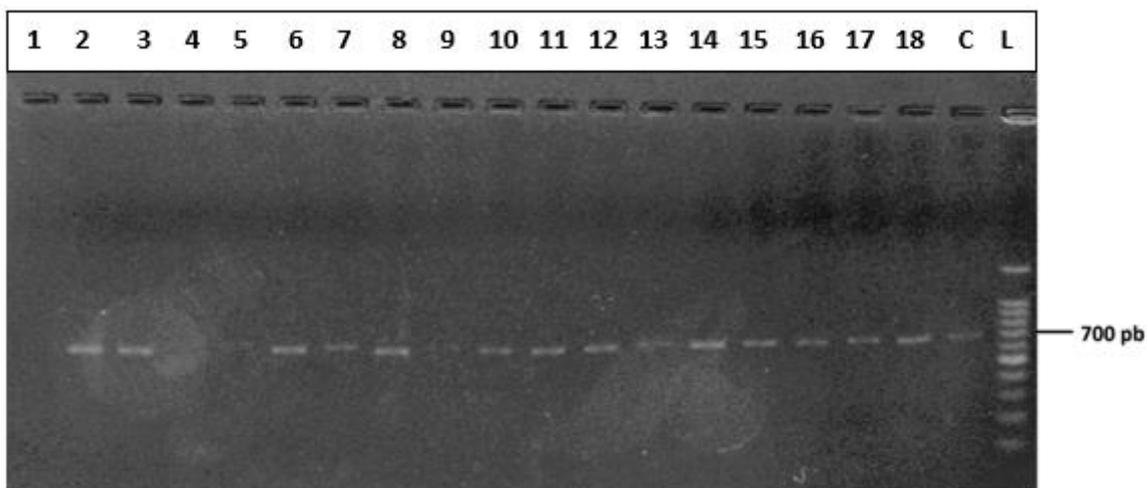
Esse projeto foi realizado de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal, tem aprovação de Comitê de Ética do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (CPE-IMT / 193 e CPE-IMT / 371A), e Ministério do Meio Ambiente (SISBIO 34605-4).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DNA *BARCODE*

#### 4.1.1 PCR e Eletroforese

A reação da PCR foi feita como descrito anteriormente, com 96 amostras, sendo 67 positivas. O produto, de uma parcela das amostras, da PCR pode ser visto na Figura 8.



**Figura 8:** Foto de um dos géis de eletroforese para visualização do produto da PCR com os *primers* que amplificam o gene *coi* de invertebrados com cerca de 710 pb. Os números representam as amostras, (C) representa o controle positivo e o (L) marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp DNA Ladder - Thermo Scientific).

#### 4.1.2 Sequenciamento e Porcentagem de Similaridade no Basic Local Alignment Search Tool (Blast)

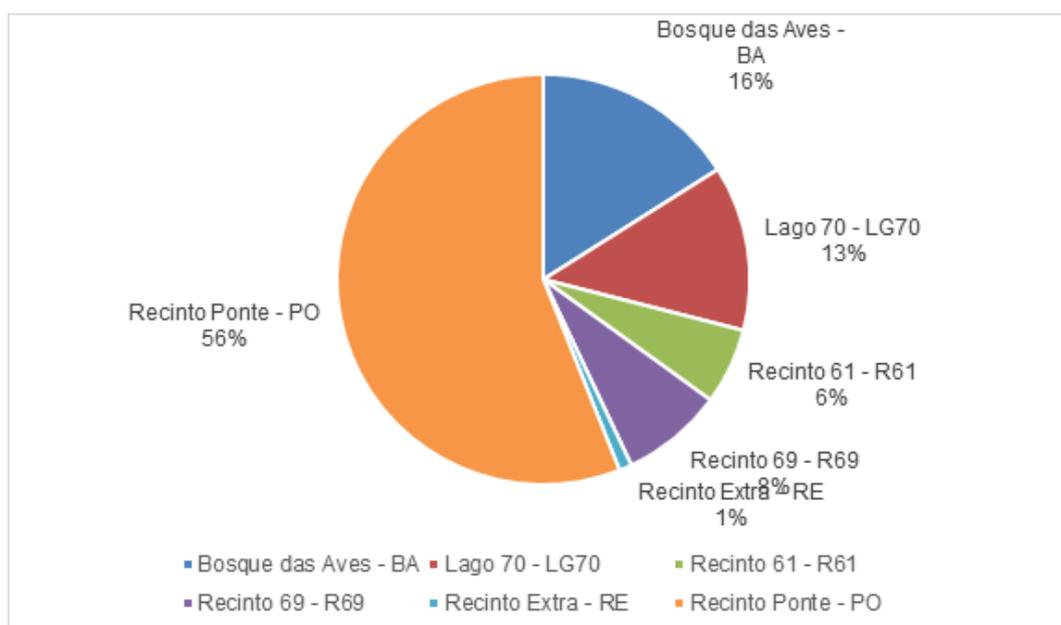
Das 67 amostras positivas na PCR com fragmento sequenciado, em 4 não foram obtidas sequências de gene *coi* de *Culex* de qualidade para análise, sendo então 63 espécimes identificados com sucesso.

Todas as sequências obtidas tiveram fragmentos maiores que 600 pb, quando colocadas para serem alinhadas com as sequências depositadas no GenBank®, usando o BCM para selecionar a espécie mais próxima. Utilizamos porcentagens entre 99 e 100% de similaridade, permitindo assim uma confiabilidade maior no resultado. O resultado dos 63 espécimes pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Porcentagem da identificação pelo DNA *Barcode*

<b>Espécie</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	11	17%
<i>Cx. (Cux.) chidesteri</i>	1	2%
<i>Cx. (Cux.) coronator</i>	2	3%
<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	25	40%
<i>Cx. (Cux.) lygrus</i>	2	3%
<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	20	32%
<i>Cx. (Cux.) saltanensis</i>	1	2%
<i>Cx. (Mel.) aureonotatus</i>	1	2%
<b>TOTAL</b>	<b>63</b>	<b>100%</b>

A porcentagem de espécimes coletados em cada ponto pode ser vista na Figura 9. O ponto de coleta mais importante em termos de quantidade é o ponto PO, localizado entre dois lagos existentes na Fundação Parque Zoológico de São Paulo com uma porcentagem expressiva de 56% de todos os *Culex (Culex)* sp. usados neste trabalho.



**Figura 9:** Porcentagem de mosquitos por armadilha.

## 4.2 IDENTIFICAÇÃO POR MGA

Como no nosso banco para a criação do morfoespaço existem 11 espécies [*Cx. (Cux.) acharistus*, *Cx. (Cux.) ameliae*, *Cx. (Cux.) bidens*, *Cx. (Cux.) chidesteri*, *Cx. (Cux.) coronator*, *Cx. (Cux.) declarator*, *Cx. (Cux.) dolosus*, *Cx. (Cux.) eduardoi*, *Cx. (Cux.) habilitator*, *Cx. (Cux.) nigripalpus* e *Cx. (Cux.) quinquefasciatus*], os exemplares que deram espécies diferentes no resultado da identificação molecular foram tirados da comparação. Então 59 espécimes foram comparados.

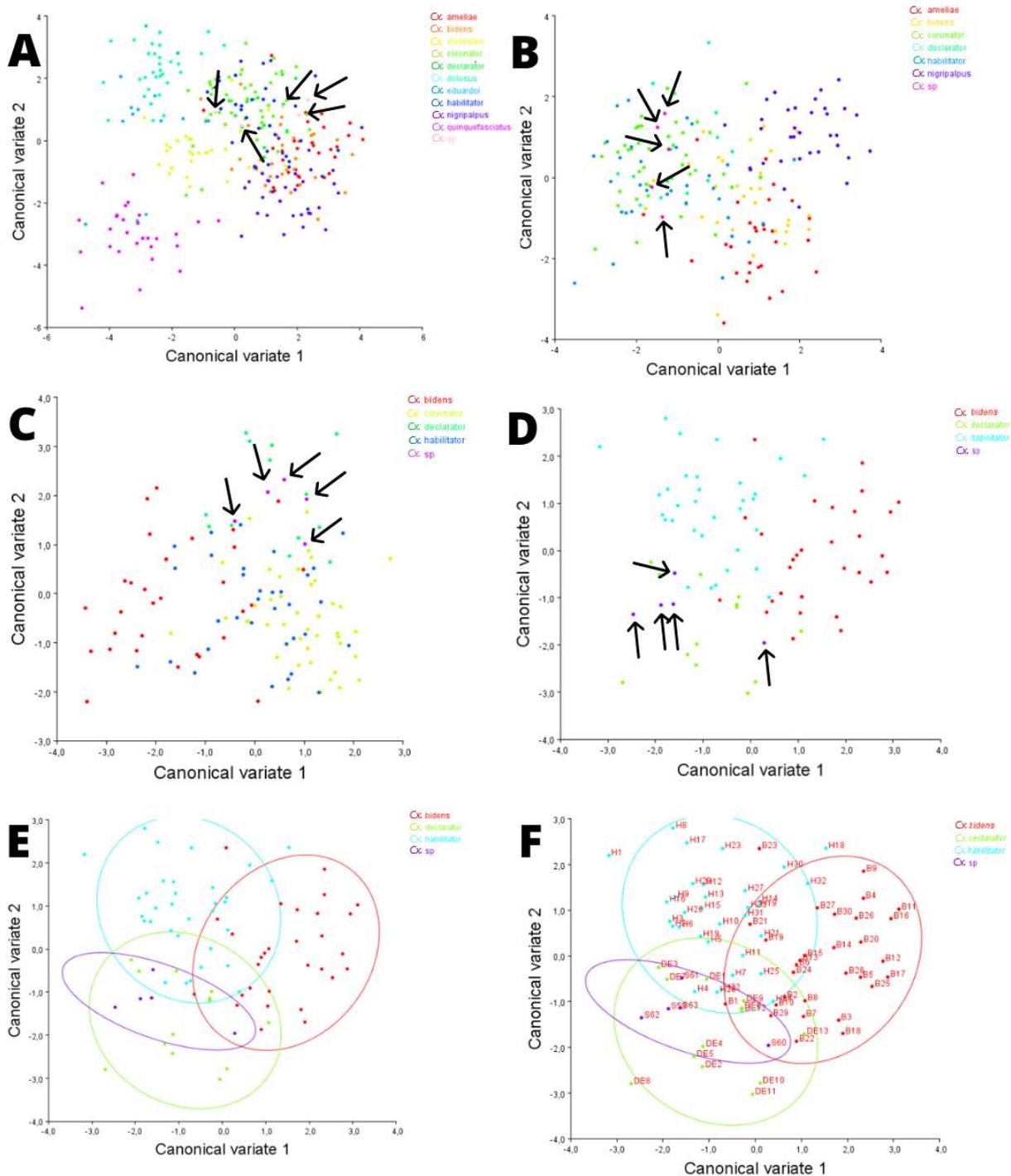
Os resultados da identificação pela análise por exclusão da CVA podem ser vistos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Porcentagem de espécies identificadas pelo MGA

<b>Espécie</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<i>Cx. (Cux.) ameliae</i>	1	2%
<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	7	12%
<i>Cx. (Cux.) coronator</i>	6	10%
<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	19	32%
<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>	22	37%
<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	4	7%
Total	59	100%

### 4.2.1 Fluxograma da Análise

A análise por exclusão pelo posicionamento do indivíduo *Culex (Culex)* sp. no morfoespaço pode ser observada na Figura 10. As análises foram sendo feitas com 5 espécimes por vez, sendo gerada uma nova CVA toda vez que ocorria uma exclusão de espécie.



**Figura 10: Fluxograma da identificação por MGA.** **A.** Cinco indivíduos de *Culex sp.* foram colocados na CVA com o banco de asas e as setas indicam onde eles se localizaram no morfoespaço. Foram excluídas as espécies *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. dolosus*, *Cx. eduardoi* e *Cx. chidesteri* para a próxima análise; **B.** O morfoespaço foi alterado e os *Culex sp.* se localizaram em outros locais, apontados pelas setas, porém se mantiveram próximos das mesmas espécies de antes. Foi possível excluir nesta etapa as espécies *Cx. nigripalpus* e *Cx. ameliae*; **C.** Nesta etapa, seguindo todo o processo anterior, foi excluída para a próxima CVA a espécie *Cx. coronator*; **D.** Os *Culex sp.* se localizaram entre as espécies restantes; **E.** A mesma CVA da figura anterior, porém com elipses delimitando as espécies; **F.** Assim, foi possível fazer a identificação de qual espécie cada indivíduo se aproximou mais.

Após a identificação dos exemplares pela CVA foi feito um teste de reclassificação de validação cruzada e os resultados estão na Tabela 3.

**Tabela 3:** Teste de reclassificação de validação cruzada.

	<i>Cx. (Cux.) meliae</i> (%)	<i>Cx. (Cux.)</i> sp (%)
<b>Reclassificação</b>	65	62
	<i>Cx. (Cux.) bidens</i> (%)	<i>Cx. (Cux.)</i> sp (%)
<b>Reclassificação</b>	43	37
	<i>Cx. (Cux.) coronator</i> (%)	<i>Cx. (Cux.)</i> sp (%)
<b>Reclassificação</b>	69	14
	<i>Cx. (Cux.) declarator</i> (%)	<i>Cx. (Cux.)</i> sp (%)
<b>Reclassificação</b>	53	38
	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i> (%)	<i>Cx. (Cux.)</i> sp (%)
<b>Reclassificação</b>	60	40
	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i> (%)	<i>Cx. (Cux.)</i> sp (%)
<b>Reclassificação</b>	58	40

É possível observar que as porcentagens de reclassificação de cada espécie comparada par-a-par com grupos contendo mosquitos *Culex* sp previamente identificados pela CVA foram moderados, variando de 37% a 69%. No entanto, os valores de reclassificação dos mosquitos *Culex* sp. comparados a mosquitos *Cx. coronator* resultaram em apenas 14% de reclassificação correta indicando altos níveis de similaridades entre os mosquitos *Culex* sp. e *Cx. coronator*. Também foi usado em uma nova CVA o resultado do DNA *barcode* como classificador para a validação da identificação anterior. Os resultados podem ser vistos nas Figuras 11 e 12.

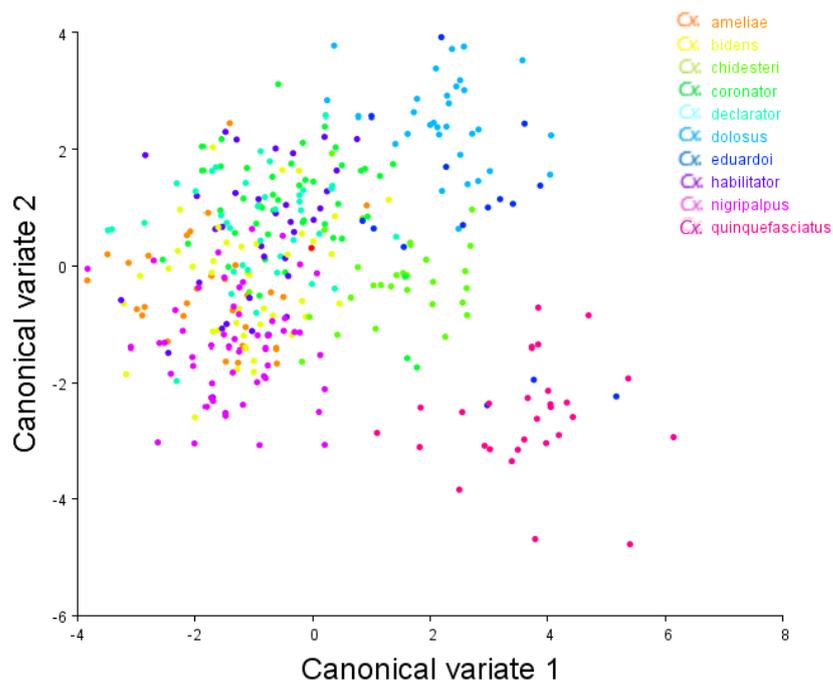


Figura 11: CVA utilizando o resultado do DNA *barcode* como classificador.

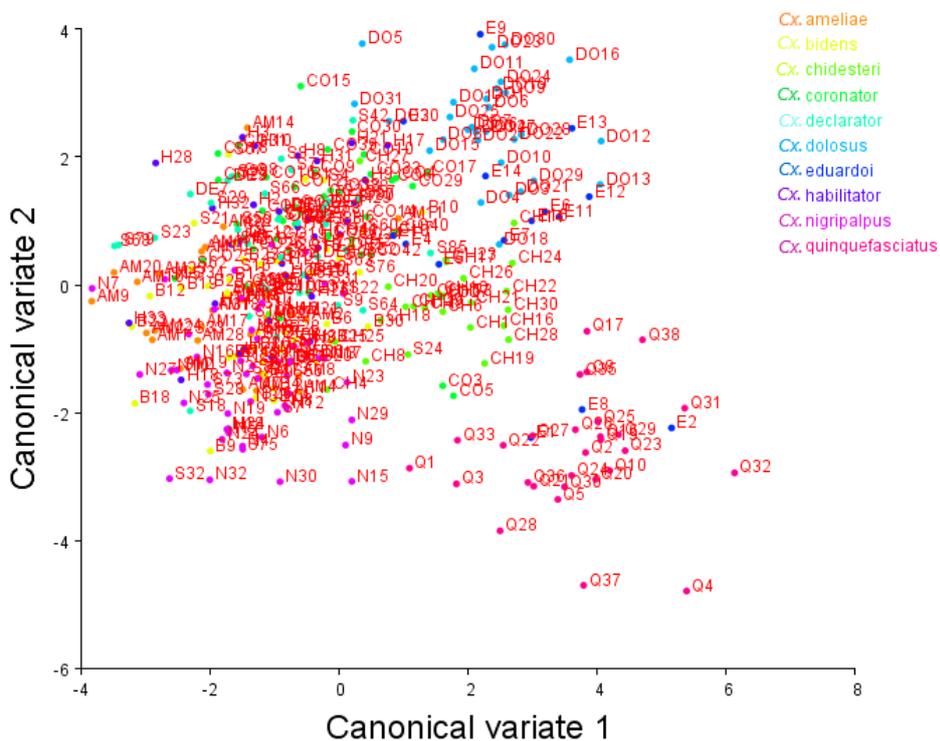
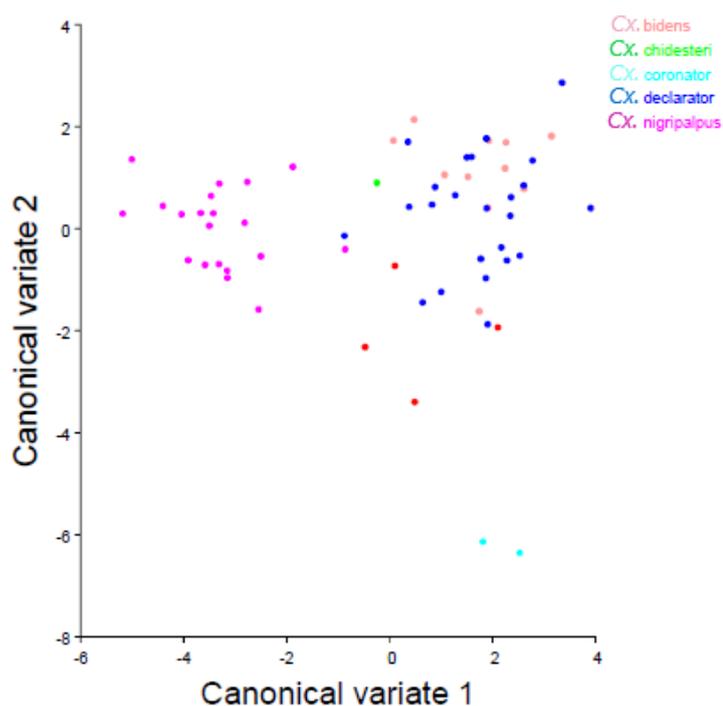


Figura 12: CVA com o resultado do DNA *barcode* contendo os rótulos

Nos que foi possível a leitura por conta da sobreposição de rótulos, observou-se que os resultados foram mais direcionados, pois as espécies se atraem e os rótulos também.

Foi feita uma CVA apenas com os *Culex (Cux.)* sp. já classificados com a identificação da análise molecular, e o resultado pode ser visto na Figura 13, onde observa-se que algumas espécies se distanciaram e outras se agruparam e até se sobrepueram no espaço.



**Figura 13:** CVA mostrando o agrupamento dos *Culex (Cux.)* sp. classificados.

#### 4.3 COMPARAÇÃO

Os 63 exemplares de *Culex (Culex)* sp. foram identificados como sendo parte de um total de 10 espécies diferentes, sendo elas: *Cx. (Cux.) ameliae* Casal, *Cx. (Cux.) bidens*, *Cx. (Cux.) chidesterei*, *Cx. (Cux.) coronator* Dyar & Knab, *Cx. (Cux.) declarator*, *Cx. (Cux.) habilitator* Dyar & Knab, *Cx. (Cux.) lygrus*, *Cx. (Cux.) nigripalpus*, *Cx. (Cux.) saltanensis* Dyar e *Cx. (Mel.) aureonotatus* Duret & Barreto.

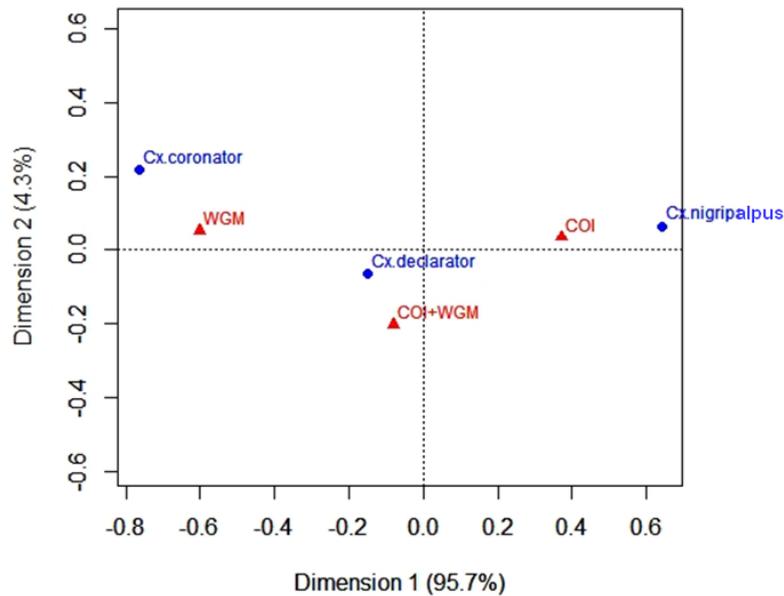
Os valores totais e percentuais de cada espécie em cada teste podem ser vistos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Valores totais e percentuais de cada espécie em cada teste

<b>Espécie</b>	<b>n COI</b>	<b>COI %</b>	<b>n MGA</b>	<b>MGA %</b>
<i>Cx. (Cux.) ameliae</i>	0	0%	1	2%
<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	11	17%	7	11%
<i>Cx. (Cux.) chidesteri</i>	1	2%	0	0%
<i>Cx. (Cux.) coronator</i>	2	3%	6	10%
<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	25	40%	19	32%
<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>	0	0%	22	39%
<i>Cx. (Cux.) lygrus</i>	2	3%	0	0%
<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	20	32%	4	6%
<i>Cx. (Cux.) saltanensis</i>	1	2%	0	0%
<i>Cx. (Mel.) aureonotatus</i>	1	2%	0	0%

O teste qui-quadrado para k amostras independentes foi feito por espécies. As que continham o valor zero no critério de resultados semelhantes foram desconsideradas, resultando em 17.108 e o valor do qui quadrado crítico foi de 9,49. Assim, a hipótese de nulidade foi rejeitada e a hipótese alternativa, que é a que os dois testes não se correspondem, foi aceita. O valor de *P* foi de 0.001842, indicando que os resultados foram significativos ( $P < 0.05$ ).

A análise de correspondência pode ser vista na Figura 14 que mostra que para a espécie *Cx. (Cux.) nigripalpus* o resultado pelo DNA *barcode* é mais confiável. Já para *Cx. (Cux.) coronator* foi mais confiável o resultado por MGA, que na imagem é representado pela sigla WGM que vem do inglês (Wing Geometric Morphometric). Por fim, para *Cx. (Cux.) declarator* a análise mostra que ainda é necessária a utilização das duas técnicas.



**Figura 14:** Mapa da análise de correspondência entre os testes MGA (WGM, *Wing Geometric Morphometric*) e COI (DNA *barcode*).

Os resultados do DNA barcode, que foram usados na comparação, resultaram em 5 espécies diferentes, sendo elas *Cx. (Cux.) bidens*, *Cx. (Cux.) chidesteri*, *Cx. (Cux.) coronator*, *Cx. (Cux.) declarator* e *Cx. (Cux.) nigripalpus*. (Tabela 5)

**Tabela 5:** Correlação da identificação por COI e MGA

COI		MGA						
GenBank	N	<i>Cx. bidens</i>	<i>Cx. habilitator</i>	<i>Cx. declarator</i>	<i>Cx. chidesteri</i>	<i>Cx. coronator</i>	<i>Cx. nigripalpus</i>	<i>Cx. ameliae</i>
<i>Cx. bidens</i>	11	0	7	4				
<i>Cx. chidesteri</i>	1				0	1		
<i>Cx. coronator</i>	2			1		1		
<i>Cx. declarator</i>	25		9	11		4	1	
<i>Cx. nigripalpus</i>	20	7	6	3			3	1
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>7</b>	<b>22</b>	<b>19</b>		<b>6</b>	<b>4</b>	<b>1</b>

Os resultados pela MGA resultaram na diferenciação da identificação em grupos de mosquitos pertencentes a 6 espécies diferentes, em comparação com os resultados do DNA *barcode*, a espécie que se acrescentou foi a *Cx. (Cux.) ameliae*. Todos esses resultados podem ser vistos no Anexo 1.

## 5. DISCUSSÃO

Mosquitos do gênero *Culex* são considerados vetores de muitos patógenos, incluindo diferentes arbovírus, o que faz a identificação correta das espécies essencial para o desenvolvimento de estratégias que visem o controle de doenças. Tradicionalmente, a identificação das espécies de mosquitos se baseia em caracteres morfológicos externos, que não raras vezes podem estar danificados. Neste trabalho, 96 indivíduos identificados como *Culex (Culex)* sp. pela taxonomia clássica foram avaliados por DNA *barcode* e morfometria geométrica alar com o intuito de identificar as espécies.

Os mosquitos foram coletados em 2015 como parte de um estudo de vetores de malária aviária na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. As armadilhas foram distribuídas em oito pontos de coleta cobrindo a extensão do parque. Para este trabalho, o ponto de coleta mais importante foi o PO, com 57% de todos os *Cx. (Cux.)* sp. Essa armadilha foi instalada em uma área entre dois lagos, o que explica a alta porcentagem. A água no entorno serve de local para a oviposição. Logo após a passagem da fase de pupa para a adulta o mosquito vai à procura de alimentação. Como as armadilhas tinham o gelo seco como atrativo, esses espécimes foram rapidamente atraídos. Isso mostra que devemos ter uma atenção especial para áreas com coleções hídricas, já que a chance de haver uma maior concentração de mosquitos nessas áreas é grande. Segundo Ceretti-Junior et al (2015), populações que vivem no entorno de parques públicos estão mais propensas a entrarem em contato com mosquitos, pois o parque dispõe de muitos criadouros naturais.

Dentre os resultados do DNA *barcode*, 40% deles foram da espécie *Cx. (Cux.) declarator*, seguido por *Cx. (Cux.) nigripalpus* com 32% e *Cx. (Cux.) bidens* com 17%. Essas porcentagens mostram quais são as espécies que mais se perdem em relação à identificação morfológica por chaves. A entrada de insetos maiores nas armadilhas luminosas do tipo CDC pode contribuir para danos nos insetos menores. Nesse momento, caracteres importantes podem ser perdidos. O mesmo pode ocorrer para situações de coleta de muitos mosquitos. Cabe ressaltar que no local PO foram coletados mais de 300 mosquitos em um só dia. Por fim, é importante mencionar que

também existe um viés de identificação relacionado ao taxonomista, por prática, experiência e forma de trabalho.

Apesar do *coi* ser um gene mitocondrial de fácil amplificação e com muitas cópias no genoma, 30% das amostras não tiveram PCR positiva. Duas explicações são possíveis: excesso de DNA (novos testes serão realizados com diluições das amostras de DNA) que pode inibir a PCR ou pode ter ocorrido alguma degradação do material genético, potencializada pelo tempo de armazenamento das amostras (5 anos). Entretanto, de um modo geral, a identificação molecular foi bastante eficiente, identificando *Cx. (Cux.) declarator* em 40% das amostras. Taípe-Lagos e Natal (2003) também acharam esta espécie como uma das mais abundantes em um parque da cidade de São Paulo. A segunda espécie mais encontrada na identificação molecular foi *Cx. (Cux.) nigripalpus*, também tem sido frequentemente encontrada em parques municipais da cidade de São Paulo (CONSOLI & LOURENÇO- DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1995; TAÍPE-LAGOS E NATAL, 2003; FORATTINI, 2002; MEDEIROS-SOUSA et. al, 2013; SAYÃO, 2019;). Ambas as espécies têm importância epidemiológica na transmissão de diversas encefalites (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1995; DEMARI, 2009; DE CARVALHO et. al, 2017; SAYÃO, 2019;). As duas espécies criam-se em condições semelhantes com densidade não muito influenciada pelas chuvas, proporcionando fêmeas que picam durante todo o ano (CONSOLI & LOURENÇO- DE-OLIVEIRA, 1994)

A terceira espécie mais encontrada na identificação molecular foi *Cx. (Cux.) bidens*, mas estudos mostram que essa espécie pode ser confundida com *Cx. (Cux.) declarator* no DNA *barcode* (LAURITO et al., 2013). Sayão (2019) relata que a identificação molecular das duas espécies não pode ser comprovada apenas através de biologia molecular com marcadores nucleares e mitocondriais. As diferenças, até o momento, são confirmadas por uma única característica na genitália masculina (TAÍPE-LAGOS & NATAL, 2003; LAURITO & HOYOS-LÓPEZ, 2018; SAYÃO, 2019;). Essa dificuldade foi vista também por Sayão (2019) e pode ser explicada pela evolução lenta do gene alvo como Herbert e el al. (2003) e Laurito et al. (2013) já afirmaram. Quanto ao espécime identificado por DNA *barcode* como *Cx. (Mel.) aureonotatus*, a explicação para uma diferença tão grande na classificação é por perdas de caracteres importantes para uma identificação precisa, já que a separação entre os subgêneros não é algo difícil de ser feito.

Dentre os resultados da MGA, 37% dos 59 espécimes estudados nessa técnica foram classificados como *Cx. (Cux.) habilitator*, seguido por *Cx. (Cux.) declarator* representando 32% e 12% sendo *Cx. (Cux.) bidens*. Observou-se que essas espécies estão muito próximas na CVA e chegam a se sobrepor nas CVAs onde o banco todo foi incluído.

*Cx. (Cux.) habilitator* foi a de maior frequência nas identificações por MGA, mas isso pode ser explicado pela sua ampla distribuição no morfoespaço criado. Essa espécie sempre se sobrepõe com pelo menos 2 espécies, confundindo a identificação principalmente com *Cx. (Cux.) coronator* e *Cx. (Cux.) declarator*, o que pode ter levado a identificações errôneas. Da mesma forma, *Cx. (Cux.) bidens* também tem sobreposições e compartilha intimamente a distribuição no morfoespaço da CVA com *Cx. (Cux.) ameliae*.

Uma facilidade foi vista na identificação pela MGA com *Cx. (Cux.) nigripalpus*. Assim como *Cx. (Cux.) quinquefasciatus*, *Cx. (Cux.) dolosus* e *Cx. (Cux.) eduardoi*, se mantém bem agrupada e ligeiramente distante das outras espécies citadas acima.

Nos testes de reclassificação realizados na MGA, dois grupos são comparados e reclassificados de acordo com a similaridade. Os grupos comparados foram os de *Cx. (Cux.)* sp que foram identificados como sendo de determinada espécie e a mesma espécie do banco de asas. Os valores medianos de porcentagem de reclassificação obtidos dos indivíduos no seu próprio grupo mostram que os grupos comparados eram similares, pois quanto menor a porcentagem de reclassificação, mais parecidos são os grupos, validando as identificações.

A identificação por MGA apresentou algumas limitações intrínsecas ao software usado, o qual prevê o uso de classificadores. Quando o resultado do DNA *barcode* foi usado como classificador, os indivíduos se agruparam de forma melhor em relação ao espaço da sua respectiva espécie. É uma limitação existente no programa, pois ele ainda depende da identificação taxonômica ou molecular para dar um resultado confiável. Uma opção para trabalhos futuros é fazer esse teste com outros softwares de análise da MGA. Sidiq et al. (2020) mostra que ainda não é possível fazer a identificação ao nível de espécie usando apenas a MGA, mas sim como uma ferramenta complementar.

É importante mencionar que para *Cx. (Cux.) quinquefasciatus* não houve identificação em nenhuma das duas técnicas. Possivelmente isso ocorre pelo fato de

morfologicamente a espécie ser de fácil identificação. Devido sua importância epidemiológica, *Cx. quinquefasciatus* é uma das espécies mais estudadas, permitindo chaves taxonômicas bem definidas.

Cabe ressaltar também que o banco utilizado para a identificação molecular não contém sequências da espécie *Cx. ameliae*, o que acaba sendo uma limitação no uso desta técnica já que ela também depende de um banco usado na comparação, assim como a técnica do MGA.

Na análise de correspondência, apenas três espécies puderam ser comparadas com significância, sendo que para cada uma há um teste que funciona melhor na identificação. *Cx. coronator* mostrou, pela análise de correspondência, ter uma identificação confiável pelo método da MGA e, mesmo com poucos espécimes, se posiciona afastado dos outros *Culex (Cux.)* sp. classificados como outras espécies. Por outro lado, *Cx. nigripalpus* tem mais confiabilidade no resultado vindo do DNA *barcode*. Isso pode ser melhor explicado quando observamos os que foram identificados como *Cx. nigripalpus* pela identificação molecular. Na MGA, esses mesmos espécimes deram cinco espécies diferentes e de vinte apenas três foram identificados igualmente pelas duas técnicas.

Já para o *Cx. declarator*, nenhum teste foi definido como mais confiável. Essa é uma espécie muito complexa de se identificar tanto pela MGA como pelo DNA *barcode*. Laurito et al. (2013) mostrou que essa espécie é de difícil identificação pelo método do DNA *barcode*, e pela MGA essa dificuldade também se mantém por sobreposição das espécies na CVA.

Vários trabalhos têm sido publicados com o uso de MGA na identificação de culicídeos (WILKE et al, 2016; SIMÕES et al, 2020; SIDIQ et al, 2020). Entretanto, em todos a MGA foi realizada com espécimes classificados até espécie de acordo com a taxonomia clássica. Este estudo visou utilizar a ferramenta para uma identificação de fato até espécie, utilizando espécimes identificados apenas até subgênero. Os resultados foram bons, mas a metodologia utilizada na MGA precisa ser aprofundada e testada com outros métodos e programas. Espécimes identificados como *Cx. (Cux.)* sp. não geram informações precisas aos estudos epidemiológicos. Métodos alternativos, baratos e que não exigem a expertise necessária para as chaves taxonômicas, são importantes e cada vez mais urgentes em decorrência da diminuição na formação de taxonomistas clássicos.

## 6. CONCLUSÕES

O uso do DNA *barcode* com o gene *coi* é uma opção adequada para o uso em identificação de espécies.

A identificação por DNA *barcode* ainda é a melhor opção para situações de identificação incompleta.

A técnica de MGA mostrou alta confiabilidade na identificação de espécimes de *Cx. coronator*.

Os espécimes de *Cx. nigripalpus* identificados por DNA *barcode* foram os que mostraram maior confiabilidade na identificação por esta metodologia.

As duas técnicas são de difícil comparação, provavelmente porque uma utiliza o fenótipo e outra o genótipo do organismo.

É importante ampliar o banco da MGA para que mais espécies possam ser avaliadas.

É importante também ampliar o banco do GenBank para que mais espécies possam ser avaliadas.

É vital que a técnica de MGA seja aprimorada e testada em outras plataformas, tornando-a autossuficiente na identificação de espécimes.

## 7. REFERÊNCIAS

Beebe NW. DNA barcoding mosquitoes: advice for potential prospectors. *Parasitology*. 2018 Apr;145(5):622-633. doi: 10.1017/S0031182018000343. Epub 2018 Mar 22. Erratum in: *Parasitology*. 2020 Jan;147(1):126. PMID: 29564995.

Bellafronte E, Mariguela T, Pereira L, Oliveira C, Moreira-Filho O. DNA barcode of Parodontidae species from the La Plata river basin - applying new data to clarify taxonomic problems. 2013 *Neotropical Ichthyology*. 11. 497-506. 10.1590/S1679-62252013000300003.

Benchimol J. Mosquitos, doenças e ambientes em perspectiva. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE HISTÓRIA, 26., 2011, São Paulo. Anais... São Paulo: Associação Nacional de História, 2011a. p. 1-15.

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PK, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol*. 2007 Mar;22(3):148-55. doi: 10.1016/j.tree.2006.11.004. Epub 2006 Nov 28. PMID: 17129636.

Bookstein FL. A statistical method for biological shape comparisons. *J Theor Biol*. 1984 Apr 7;107(3):475-520. doi: 10.1016/s0022-5193(84)80104-6. PMID: 6738086.

Boore JL. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1999 Apr 15;27(8):1767-80. doi: 10.1093/nar/27.8.1767. PMID: 10101183; PMCID: PMC148383.

Bram RA. 1967. "Classification of Culex Subgenus Culex in the New World (Diptera: Culicidae)." *Proceedings of the United States National Museum*. 120 (3557):1–122, 33 figures, 3 tables. <https://doi.org/10.5479/si.00963801.120-3557.1>

Carvalho GC, Ceretti-Junior W, Barrio-Nuevo KM, Wilk-da-Silva R, Christe RO, Paula MB, Vendrami DP, Multini LC, Evangelista E, Camargo AA, Souza LF, Wilke ABB, Medeiros-Sousa AR, Marrelli MT. (2017). Composition and diversity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban parks in the South region of the city of São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica*, 17(2), e20160274. Epub July 13, 2017. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2016-0274>

Carvalho GC, Vendrami DP, Marrelli MT, Wilke ABB. Wing variation in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) in urban parks. *Parasit Vectors*. 2017 Sep 18;10(1):423. doi: 10.1186/s13071-017-2348-5. PMID: 28923116; PMCID: PMC5604421.

Ceretti-Junior W, de Oliveira Christe R, Rizzo M, Strobel RC, de Matos Junior MO, de Mello MH, Fernandes A, Medeiros-Sousa AR, de Carvalho GC, Marrelli MT. Species Composition and Ecological Aspects of Immature Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Bromeliads in Urban Parks in the City of São Paulo, Brazil. *J Arthropod Borne Dis*. 2015 Jun 27;10(1):102-12. PMID: 27047978; PMCID: PMC4813398.

Cywinska A, Hunter FF, Hebert PD. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med Vet Entomol.* 2006 Dec;20(4):413-24. doi: 10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x. PMID: 17199753.

Dayrat B. Toward integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* *Biological Journal of the Linnean Society The Linnean Society of London Biological Journal of the Linnean Society.* 2005; 85. 407-415. 10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x.

Edward OW., *The encyclopedia of life, Trends in Ecology & Evolution, Volume 18, Issue 2, 2003, Pages 77-80, ISSN 0169-5347, https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)00040-X.*

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 Oct;3(5):294-9. PMID: 7881515.

Fonseca FV. Morfometria geométrica e banco de dados na investigação de problemas biológicos em Culicidae. 2018. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/T.42.2019.tde-06062018-150917. Acesso em: 2021-01-23.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 2. Immature stages research at a rice irrigation system location in south-eastern Brazil. *Rev Saude Publica.* 1993 Aug;27(4):227-36. doi: 10.1590/s0034-89101993000400001. PMID: 7911592.

Forattini OP. *Culicidologia Médica. vol. 1. Princípios Gerais, Morfologia, Glossário Taxonômico.* Editora da Universidade de São Paulo - Edusp, São Paulo SP, 548p. 1996.

Forattini OP. *Culicidologia Médica. vol. 2. Identificação, Biologia, Epidemiologia.* Editora da Universidade de São Paulo - Edusp, São Paulo SP, 860p. 2002.

Forattini, O.P. *Entomologia Médica, vol.2: Culicini: Culex, Aedes e Psorophora;* Edusp: São Paulo, Brazil, 1965.

Fornel R, Estrela P. MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E A QUANTIFICAÇÃO DA FORMA DOS ORGANISMOS. 2012; doi: 10.13140/2.1.1793.1844.

Franco O. História da febre-amarela no Brasil [History of the Yellow fever in Brazil]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop.* 1969 Apr-Jun;21(2):315-512. Portuguese. PMID: 4906976.

Garcia M. Instituto Oswaldo Cruz. Pesquisador aponta diferenças entre *A. aegypti* e pernilongo doméstico - *Ciência e Saúde desde 1900.* Rio de Janeiro, 2009.

Garzón MJ, Grech M, Lizuain A, Schweigmann N. Geometric morphometrics for the differentiation of females of the *Pipiens* Assemblage in Argentina. *J Vector Ecol.* 2020 Jun;45(1):150-154. doi: 10.1111/jvec.12385. PMID: 32492268.

Harbach RE. 2018. Mosquito Taxonomic Inventory. Available at: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>.

Harbach RE. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): the foundation for molecular systematics and phylogenetic research. *Acta Trop*. 2011 Oct-Nov;120(1-2):1-14. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.06.005. Epub 2011 Jun 29. PMID: 21741350.

Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 12;101(41):14812-7. doi: 10.1073/pnas.0406166101. Epub 2004 Oct 1. PMID: 15465915; PMCID: PMC522015.

Herbert PDN, Cywinska A, Ball S, Dewaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, 2003; Series B, 270, 313 – 321*

Hoch AL, Pinheiro FP, Roberts DR, Gomes ML. Laboratory transmission of Oropouche virus by *Culex quinquefasciatus* Say. *Bull Pan Am Health Organ*. 1987;21(1):55-61. PMID: 3607353.

James RF, Marcus LF. A revolution morphometrics. *Trends Ecol Evol*. 1993 Apr;8(4):129-32. doi: 10.1016/0169-5347(93)90024-J. PMID: 21236128

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. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30240573.

Laurito M, Oliveira TM, Almirón WR, Sallum MA. 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. PMID: 24473810; PMCID: PMC4109187.

Lima P, Serra A. Análise morfológica comparada da venação de asas da ordem Diptera (Linnaeus, 1758 – Arthropoda, Insecta). *ConScientiae Saúde*. 7. 2008. doi: 10.5585/conssaude.v7i4.742.

Lopes G, Reis-Castro L. A Vector in the (Re)Making: A History of *Aedes aegypti* as Mosquitoes that Transmit Diseases in Brazil. In: Lynteris C. (eds) *Framing Animals as Epidemic Villains. Medicine and Biomedical Sciences in Modern History*. Palgrave Macmillan, Cham. 2019; doi:10.1007/978-3-030-26795-7\_6

Lorenz C, Almeida F, Almeida-Lopes F, Louise C, Pereira SN, Petersen V, Vidal PO, 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. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28673547.

Medeiros-Sousa AR, Ceretti W Jr, Urbinatti PR, de Carvalho GC, de Paula MB, Fernandes A, Matos MO Jr, Orico LD, Araujo AB, Nardi MS, Marrelli MT. 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. PMID: 24199502.

Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Junior W, Urbinatti PR, Natal D, Carvalho GC, Paula MB, Fernandes A, Mello MSH, Oliveira RC, Orico LD, Gonçalves EFB, Marrelli MT. (2013). Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques da cidade de São Paulo I. *Biota Neotropica*, 13(1), 317-321. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000100030>

Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PK. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst Biol.* 2006 Oct;55(5):715-28. doi: 10.1080/10635150600969864. PMID: 17060194.

Mitchell A, Sperling FAH, Hickey D. Higher-level phylogeny of mosquitoes (Diptera: Culicidae): mtDNA data support a derived placement for Toxorhynchites. Refereed Article. *Insect Systematics and Evolution*; 163-174; Vol 33; 2. DOI: 10.1163/187631202X00118

Morais AS, Natal D. *Culex o mosquito da cidade*. Chapecó: Câmara Brasileira do Livro, 2020.

Murugan K, Vadivalagan C, Karthika P, Panneerselvam C, Paulpandi M, Subramaniam J, Wei H, Aziz AT, Alsalhi MS, Devanesan S, Nicoletti M, Paramasivan R, Parajulee MN, Benelli G. DNA barcoding and molecular evolution of mosquito vectors of medical and veterinary importance. *Parasitol Res.* 2016 Jan;115(1):107-21. doi: 10.1007/s00436-015-4726-2. Epub 2015 Sep 11. PMID: 26358100.

Oliveira-Christe R, Wilke ABB, Marrelli MT. Microgeographic Wing-Shape Variation in *Aedes albopictus* and *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) Populations. *Insects.* 2020 Dec 3;11(12):862. doi: 10.3390/insects11120862. PMID: 33287264; PMCID: PMC7761735.

PDUJ. São Paulo, 2015. RMSP. Disponível em: <[https://www.pduj.sp.gov.br/rmsp/?page\\_id=56](https://www.pduj.sp.gov.br/rmsp/?page_id=56)>

Ruiz F, Linton YM, Ponsonby DJ, Conn JE, Herrera M, Quiñones ML, Vélez ID, Wilkerson RC. Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010 Nov;105(7):899-903. doi: 10.1590/s0074-02762010000700010. PMID: 21120360; PMCID: PMC4438775.

Sayão, LFS. Análise do DNA BARCODE em mosquitos (Diptera: Culicidae) neotropicais em parques da cidade de São Paulo e correlação com a paisagem. 2019. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. doi:10.11606/T.6.2019.tde-28082019-152107. Acesso em: 2021-01-11.

Sidiq SN, Mujiyono M, Supto PS, Arif SP, Triwibowo AG. Wing Geometry analysis as a potential tool for species identification for *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Indonesia. *Serangga* 2020, 25(1):93-104. ISSN: 1394-5130

Silva, BD. Estudos taxonômicos de espécies do gênero *Culex* (Diptera: Culicidae) da região neotropical, utilizando a subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase. 2009. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública,

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. doi:10.11606/D.6.2009.tde-28012010-105230. Acesso em: 2021-02-01

Simões RF, Wilke ABB, Chagas CRF, Menezes RMT, Suesdek L, Multini LC, Silva FS, Grech MG, Marrelli MT, 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. PMID: 32854183; PMCID: PMC7563313.

Sousa ARM. Estudo dos padrões de diversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) em parques urbanos da cidade de São Paulo, SP. 2014. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/D.6.2014.tde-09052014-163758. Acesso em: 2021-02-06.

Taipe-Lagos CB, Natal D. Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas [Culicidae mosquito abundance in a preserved metropolitan area and its epidemiological implications]. *Rev Saude Publica*. 2003 Jun;37(3):275-9. Portuguese. doi: 10.1590/s0034-89102003000300002. Epub 2003 Jun 3. PMID: 12792675.

Walton C, Sharpe RG, Pritchard SJ, Thelwell NJ, Butlin RK, Molecular identification of mosquito species, *Biological Journal of the Linnean Society*, Volume 68, Issue 1-2, September 1999, Pages 241–256, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01168.x>

Wilke AB, Christe Rde O, Multini LC, Vidal PO, Wilk-da-Silva R, de Carvalho GC, Marrelli MT. Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. *PLoS One*. 2016 Aug 23;11(8):e0161643. doi: 10.1371/journal.pone.0161643. PMID: 27551777; PMCID: PMC4995034.

Wilke ABB, de Carvalho GC, Marrelli MT. Retention of ancestral polymorphism in *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2018 Nov;65:333-339. doi: 10.1016/j.meegid.2018.08.017. Epub 2018 Aug 22. PMID: 30142383.

ZOOLÓGICO DE SÃO PAULO. 2019. A Fundação. Disponível em: <<http://www.zoologico.com.br/a-fundacao/>>

## ANEXO 1 – Banco de Datos

Amostra	Barcode	tps	MGA
1229	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S3	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1230	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S4	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1254	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S6	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1256	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S7	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>
1258	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S8	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1260	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S9	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1261	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S10	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1263	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S12	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1265	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S14	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>
1267	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S15	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1268	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S16	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1270	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S18	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>
1276	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S19	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1278	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S20	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1307	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S21	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1308	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S22	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>
1309	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S23	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1310	<i>Cx. (Cux.) chidesteri</i>	S24	<i>Cx. (Cux.) coronator</i>
1311	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S25	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>
1313	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S27	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>
1314	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S28	<i>Cx. (Cux.) ameliae</i>
1315	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S29	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1317	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S31	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>
1320	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S32	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1323	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S33	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1371	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S41	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1372	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S42	<i>Cx. (Cux.) coronator</i>
1378	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S46	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>
1393	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S51	<i>Cx. (Cux.) coronator</i>
1394	<i>Cx. (Cux.) coronator</i>	S52	<i>Cx. (Cux.) coronator</i>
1415	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S56	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>
1417	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S57	<i>Cx. (Cux.) coronator</i>
1420	<i>Cx. (Cux.) coronator</i>	S59	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1423	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S60	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1436	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S62	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1438	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S64	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1440	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S65	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1441	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S66	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1442	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S67	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>

Continua

<b>Amostra</b>	<b>Barcode</b>	<b>tps</b>	<b>MGA</b>
			Continuação
1443	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S68	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1445	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S69	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>
1446	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S70	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1450	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S71	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1454	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S72	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1465	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S73	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>
1468	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S74	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1469	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S75	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1470	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S76	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1471	<i>Cx. (Cux.) nigripalpus</i>	S77	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1474	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S78	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1476	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S79	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1477	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S80	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1500	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S82	<i>Cx. (Cux.) coronator</i>
1551	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S85	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1555	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S88	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1619	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S92	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1633	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S96	<i>Cx. (Cux.) habilitator</i>
1636	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>	S98	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>
1671	<i>Cx. (Cux.) bidens</i>	S101	<i>Cx. (Cux.) declarator</i>