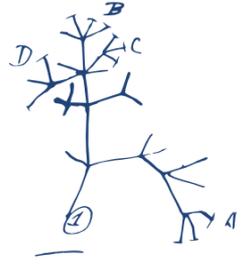




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Instituto de Biologia  
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia  
Evolutiva



# DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE VETORES DE MALÁRIA (DIPTERA: CULICIDAE) NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL



**Guilherme de Rezende Dias**

Rio de Janeiro  
2015

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Biologia  
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia  
Evolutiva

**DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE VETORES DE  
MALÁRIA (DIPTERA: CULICIDAE) NO ESTADO DO  
RIO DE JANEIRO, BRASIL**

**Guilherme de Rezende Dias**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Orientadora: Luísa Damazio Rona Pitaluga

Rio de Janeiro  
2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dias, Guilherme de Rezende

Diferenciação Genética De Vetores De Malária (Diptera: Culicidae) No Estado Do Rio De Janeiro, Brasil

Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Biologia, 2015. xiii .106 f.: il. 20 fig.

Orientadora: Luísa Damazio Rona Pitaluga

Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Rio de Janeiro, 2015.

Palavras-chave: 1. *Anopheles cruzii* 2. *Kerteszia* 3. Especiação  
4. Filogeografia 5. Genética de Populações 6. Mata Atlântica 7. Mosquitos  
8. Espécies Crípticas

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

# **DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE VETORES DE MALÁRIA (DIPTERA: CULICIDAE) NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

**Guilherme de Rezende Dias**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Antônio Mateo Solé Cava

---

Prof. Dr. Paulo César de Paiva

---

Dr. José Bento Pereira Lima

---

Dr. Luiz Guilherme Soares da Rocha Bauzer

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Maeda Takiya

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

## Agradecimentos

Ao longo dos últimos dois anos, por diversas vezes brinquei que a seção de agradecimentos seria a maior da minha dissertação, pois muitos foram os que me ajudaram na realização deste trabalho. Embora tal previsão tenha se mostrado exagerada, agradeço aqui a todos que tornaram este trabalho possível.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luísa Damazio Rona Pitaluga, por ter me aceitado como aluno — apesar da minha completa inexperiência na área de biologia molecular — e por toda a atenção dedicada a mim desde então. Obrigado por acreditar em meu potencial e pela paciente orientação, do primeiro PCR à revisão meticulosa do manuscrito final, me mostrando que é possível estar presente na vida de um aluno mesmo morando em outro estado. Admiro muito sua paixão e dedicação à pesquisa e à docência e espero que este seja apenas o primeiro de muitos trabalhos realizados em parceria.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar deste momento tão importante da minha formação acadêmica e pelas contribuições feitas a este trabalho.

Aos doutores Alexandre Afrânio Peixoto (*in memoriam*), Pedro Lagerblad de Oliveira e Yara Maria Traub-Csekö, por me receberem em seus laboratórios para que eu pudesse realizar os experimentos aqui apresentados. Obrigado por me proporcionarem, além das bancadas, reagentes e aparelhos, a convivência com vocês e seus alunos, a qual foi fundamental para minha formação científica e pessoal.

Aos doutores André Nóbrega Pitaluga e Carlos José de Carvalho-Pinto, pelo grande auxílio no trabalho de campo para coleta dos mosquitos aqui analisados. Agradeço também ao Dr. Carlos Pinto pela identificação do material coletado e ao Dr. André Pitaluga pela constante colaboração logística e intelectual ao longo da realização deste trabalho.

À amiga Thaís Tenório Soares, por todo o empenho dedicado ao meu trabalho. Obrigado pela parceria nesta empreitada e por todas as vezes que você foi à Fiocruz apenas para me ajudar com os experimentos.

Ao colega Bernardo Fogel, que realizou alguns dos experimentos cujos resultados foram aqui utilizados. Agradeço também pelo apoio em meus primeiros passos em um laboratório de Biologia Molecular.

Aos pesquisadores e colegas do Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos da UFRJ, onde trabalhei durante o primeiro ano do mestrado, os quais me receberam extremamente bem em seu local de trabalho. Obrigado por compartilharem pacientemente seus conhecimentos com um novato de bancada e por tornarem o trabalho sempre prazeroso. Agradeço, nominalmente, a: Pedro Lagerblad, Ana Bahia, Thiago Luiz “Cirilo”, Beatriz Barletta, Raquel Vionette, Marcos Sorgine, Octavio Talyuli, Gilbert Oliveira, Melina Guizzo, Ana Caroline Gandara, Rodrigo Nunes, Mabel Taracena e Vanessa Bottino,

Aos pesquisadores e colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores da FIOCRUZ, que me acolheram durante o segundo ano do mestrado. Obrigado por me receberem, me ensinarem, se interessarem por meu trabalho e permitirem que eu me sentisse em casa no laboratório. Agradeço, nominalmente, a: Yara Traub-Csekö, Tatiana Di Blasi, Marina Kubota, Bruno Tinoco, Gabriel Negreira, Antônio Tempone, Andrea Martins, Erich Telleria, Ilya Violeta, David Forrest, João Ortigão, Daisy Azevedo, Daniela Brandão, Thaís Silva, Bianca Carvalho e Daniel Borely

Aos doutores Fernando Monteiro e Marcio Pavan, da FIOCRUZ, por compartilharem comigo suas experiências e entusiasmo com a pesquisa em genética evolutiva de insetos vetores.

Aos professores do PPGBBE pelas excelentes disciplinas que eu tive o prazer de cursar ao longo do mestrado. Suas aulas foram fundamentais para o direcionamento deste trabalho, e por isso sou muito grato. Nominalmente, agradeço aos doutores: Daniela

Takiya, Paulo de Paiva, Antonio Solé, Carlos Guerra, Michelle Klautau, Claudia Russo, Wilson Costa, Eduardo Arcoverde, Haydée Cunha e José Ricardo Mermudes.

Ao grande Robson Costa da Silva, cujo coração e solicitude conseguem a proeza de serem ainda maiores do que sua imensa figura. Muito obrigado por todo apoio logístico, pelas conversas compartilhadas e, claro, por compartilhar comigo os segredos de manufatura das famosas células competentes do Robão.

Aos grandes amigos Luiz Felipe Lima da Silveira e Maurício da Rocha Martins. Fiz muitos amigos durante a graduação, mas poucos que sei que estarão sempre ao meu lado. Agradeço por serem esses caras e por todas as conversas (científicas ou não) e momentos compartilhados nos últimos anos, seja no CCS, no boteco, em Ibitipoca ou vestido de árvore de natal em um bloco na Uruguaiana.

Ao Dr. Lucas Siqueira Trindade, por uma longa conversa sobre envelhecimento e evolução ocorrida em um encontro casual nos corredores do CCS, a qual resultou neste mestrado. Agradeço também pela trilobita e pelo exemplo de senso crítico e ceticismo.

Aos meus pais, Antônio Carlos Maria Dias e Marlene Pereira de Rezende, por todo o apoio que sempre deram em minhas escolhas profissionais. Obrigado por serem um exemplo de dedicação e comprometimento e por sempre estarem ao meu lado e me proverem de tudo e mais um pouco que uma pessoa possa querer para ser feliz. Espero poder um dia ser para os meus filhos ao menos um pouco do que vocês são para mim.

Aos meus irmãos Gabriel e Gustavo de Rezende Dias, por sempre me apoiarem e se interessarem pelo meu trabalho, sendo duas das poucas pessoas não biólogas com as quais eu consigo conversar abertamente sobre o mesmo. Admiro a inteligência e a visão de mundo própria de cada um e sou muito grato pela oportunidade de ter sido criado com pessoas tão fantásticas.

À amiga Ioneide Maria da Conceição, por me manter abastecido de alimentos e café durante o período da dissertação. Obrigado por sempre zelar por mim e pelo excelente humor com o qual realiza o seu trabalho.

À minha grande companheira durante esses vorazes dois anos de mestrado, Luisa Menezes Leon Peres. Sou extremamente grato por ter ao meu lado uma pessoa tão inteligente, atenciosa, carinhosa e “pra cima”. Obrigado por aturar o meu frequente mau humor e pelos feriados e fins de semana “sacrificados” em prol deste trabalho. Obrigado também por todos os momentos e “memes” próprios compartilhados, os quais fizeram dos últimos anos tão leves e felizes. Não tenho dúvidas de que sem a sua constante presença, o caminho trilhado até aqui teria sido muito menos gratificante.

“O mosquito fêmea não ferroa de-dia; está dormindo, com a tromba repleta de maldades... Primo Ribeiro dormiu mal e o outro não dorme quase nunca. Mas ambos escutaram o mosquito a noite inteira. E o anofelino é o passarinho que canta mais bonito, na terra bonita onde mora a maleita. É de-tardinha, quando as mutucas convidam as muriçocas de volta para casa, e quando o carapanã rajado mais o moçorongo cinzento se recolhem, que ele aparece, o pernilongo pampa, de pés de prata e asas de xadrez. Entra pelas janelas, vindo dos cacos, das frinchas, das taiobeiras, das bananeiras, de todas as águas, de qualquer lugar.”

João Guimarães Rosa, em *Sagarana*

## Resumo:

Apesar de mais de 90% da malária no Brasil estar concentrada na região amazônica, existe transmissão da doença em outras áreas do país, particularmente nos estados cobertos pela Mata Atlântica, onde o principal vetor é o mosquito *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab, 1908. Essa espécie é altamente polimórfica e diferenças fixas são observadas entre populações ocorrentes no Sul, Sudeste e Nordeste do país, sugerindo a ocorrência de um complexo de espécies crípticas. Embora estudos prévios tenham identificado que em Itatiaia (RJ), duas linhagens evolutivamente independentes das de outros estados ocorram em simpatria, a diversidade genética do complexo ao longo de sua distribuição na Mata Atlântica fluminense permanecia desconhecida. O presente trabalho teve por objetivo preencher essa lacuna e investigou a diversidade genética do complexo *An. cruzii* no estado do Rio de Janeiro utilizando o gene *Clock* — um *locus* envolvido no controle de ritmos biológicos — como marcador molecular. Este estudo foi realizado através da análise molecular de indivíduos coletados em cinco localidades ao longo da Serra do Mar (Bocaina, Tinguá, Guapimirim e Sana) e na Serra da Mantiqueira (Itatiaia). Os resultados obtidos evidenciam a ocorrência de ao menos duas espécies crípticas (A e B) no estado, as quais apresentam distribuição geográfica, ecológica e altitudinal diferenciada. A espécie A ocorre ao longo da face litorânea da Serra do Mar, abaixo de 600 m de altitude, e é geneticamente indistinguível da espécie ocorrente em Florianópolis, no Sul do país. A espécie B, por sua vez, ocorre na Serra da Mantiqueira e no planalto da Bocaina, na porção continental da Serra do Mar, acima de 900 m. Sendo *An. cruzii* vetor primário de malária nesse ecossistema, o reconhecimento de que duas linhagens divergentes ocorrem na região é fundamental para que estudos melhor direcionados possam ser realizados a fim de entender o papel de tais organismos na transmissão da doença.

Palavras-chave: *Anopheles cruzii*, *Kerteszia*, Especiação, Filogeografia, Genética de Populações, Mata Atlântica, Mosquitos, Espécies Crípticas

**Abstract:**

More than 90% of Brazilian malaria cases occur in the Amazon Region, but the disease is still transmitted in other areas of the country; particularly in those states covered by the Atlantic Rainforest, where *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab, 1908 is the main vector. This species is highly polymorphic and fixed differences are observed between populations from different regions of the country, suggesting the occurrence of a cryptic species complex. Previous studies identified that two sympatric, evolutionarily independent lineages occurs in Itatiaia — a municipality in Serra da Mantiqueira mountains —, Rio de Janeiro, but no further investigations have been conducted to understand the genetic diversity in this state. The present work focuses on filling this gap and investigates the genetic diversity of the *An. cruzii* complex in Rio de Janeiro state using the gene *Clock* — a *locus* involved in the circadian rhythms control — as molecular marker. The study was conducted through molecular analysis of individuals sampled in five localities from the Serra do Mar (Bocaina, Tinguá, Guapimirim and Sana) and Serra da Mantiqueira (Itatiaia) mountains in Rio de Janeiro state. The results showed the occurrence of at least two cryptic species (A and B) in the state, each one of them showing different geographic, ecological and altitudinal distributions. Species A occurs along the coastal side of the Serra do Mar mountains, in localities up to 600 m above sea level, and is genetically indistinguishable from the species that occurs in Florianopolis, a municipality in Southern Brazil. Species B occurs in the Serra da Mantiqueira mountains and in Bocaina's Planalto, on the continental side of the Serra do Mar mountains, in localities above 900m high. Since *An. cruzii* is a main malaria vector within this ecosystem, the recognition of the occurrence of two divergent lineages in this region is a fundamental first step for future efforts aiming to understand the role of these organisms in the transmission of the disease.

**Key Words:** *Anopheles cruzii*, *Kerteszia*, Especiation, Phylogeography, Population Genetics, Atlantic Rainforest, Mosquitoes, Cryptic Species

## Sumário:

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Malária.....</i>	1
1.2. <i>Histórico da Malária no Brasil.....</i>	4
1.3. <i>O gênero Anopheles Meigen, 1818.....</i>	9
1.4. <i>Anopheles cruzii e a Malária na Mata Atlântica.....</i>	13
1.5. <i>Histórico da Descoberta e Descrição de An. cruzii.....</i>	18
1.6. <i>Diversidade de Anopheles (Kerteszia) cruzii.....</i>	25
1.7. <i>Conceituação e Delimitação de Espécies.....</i>	33
1.8. <i>Espécies Críticas e Complexos de Espécies.....</i>	36
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
2.1. <i>Justificativa.....</i>	40
2.2. <i>Objetivo geral:.....</i>	41
2.3. <i>Objetivos específicos:.....</i>	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1. <i>Procedência do material biológico utilizado:.....</i>	42
3.2. <i>Coleta de mosquitos no campo:.....</i>	44
3.3. <i>Análise molecular:.....</i>	46
3.3.1. <i>Extração de DNA genômico:.....</i>	46
3.3.2. <i>Reação em cadeia da polimerase com primers específicos (PCR)</i> <i>46</i>	
3.3.3. <i>Purificação dos fragmentos obtidos por PCR.....</i>	48
3.3.4. <i>Ligação dos fragmentos purificados ao vetor de clonagem.....</i>	49
3.3.5. <i>Transformação de bactérias competentes:.....</i>	49
3.3.6. <i>Inoculação e centrifugação das culturas.....</i>	50
3.3.7. <i>Mini preparação do DNA plasmidial.....</i>	50
3.3.8. <i>Reação de sequenciamento dos insertos.....</i>	51
3.4. <i>Análise das sequências obtidas:.....</i>	53
3.5. <i>Parâmetros populacionais calculados no DNASP:.....</i>	54
3.6. <i>Parâmetros interpopulacionais calculados no ProSeq.....</i>	55
<b>4. RESULTADOS:.....</b>	<b>57</b>
4.1. <i>Análise de polimorfismos e diferenciação entre as populações:.....</i>	58
4.2. <i>Análise Filogenética.....</i>	62
4.3. <i>Rede de Haplótipos.....</i>	67
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>

5.1.	<i>Diversidade de An. cruzii no Rio de Janeiro:</i> .....	70
5.2.	<i>Hipótese de Especiação Alopátrica:</i> .....	75
5.3.	<i>Hipótese de Especiação Parapátrica:</i> .....	78
5.3.1.	<i>Variação Climática:</i> .....	79
5.3.2.	<i>Variação Altitudinal:</i> .....	82
5.4.	<i>Delimitação das espécies de An. cruzii sensu lato:</i> .....	88
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES:</b> .....	<b>92</b>
<b>7.</b>	<b>Referências Bibliográficas:</b> .....	<b>93</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
8.1.	<i>Alinhamento de sequências de fragmento do gene Clock</i> .....	104

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Malária

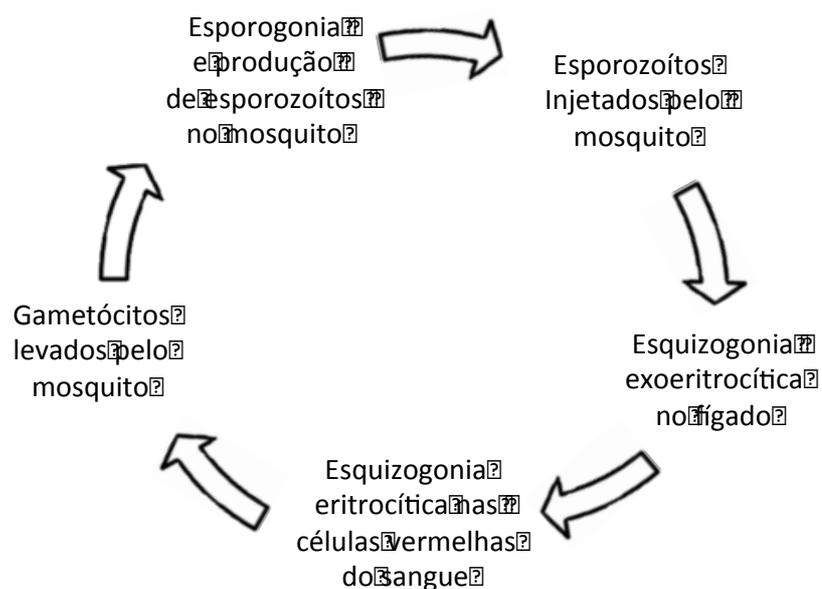
A malária, também conhecida como maleita ou paludismo, é uma doença infecciosa transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818 e causada por protozoários parasitas do gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885. Apesar da inicial incompreensão a respeito de suas causas e mecanismos de transmissão, essa doença é conhecida pelo homem desde a antiguidade, havendo relatos da mesma em documentos chineses datados de cerca de 2.700 A.C., tábuas de argila da Mesopotâmia de 2.000 A.C e papiros egípcios de 1.570 A.C. (COX, 2010).

Por mais de 2.500 anos, a ideia de que a malária era transmitida por “maus ares” que se elevavam de pântanos persistiu (provavelmente, dando origem ao nome da doença: do italiano *mal'aria*, maus ares). Apenas na segunda metade do séc. XIX, a partir dos trabalhos de Louis Pasteur e Robert Koch, os quais descobriram que algumas doenças infecciosas eram causadas por microrganismos e desenvolveram a teoria da infecção por germes, esforços passaram a ser feitos para compreender as causas dessa doença. Tais medidas levaram à descoberta dos protozoários parasitas, em 1880, por Charles Louis Alphonse Laveran e à incriminação de mosquitos como vetores, primeiro para malária aviária, por Ronald Ross em 1897 e, entre 1899 e 1900, para malária humana pelos italianos Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi e Ettore Marchiafava (COX, 2010).

A malária é causada por cinco espécies de protozoários parasitas que afetam humanos, todas pertencendo ao gênero *Plasmodium*: *P. falciparum* Welch 1897, *P. vivax* Grassi & Feletti, 1890, *P. ovale* Stephens, 1922, *P. malariae* Feletti & Grassi, 1889 e *P. knowlesi* Sinton & Mulligan, 1933. Dessas, *P. falciparum* e *P. vivax* são as de maior importância do ponto de vista da saúde pública. A malária causada por *P. falciparum* é a forma mais mortal da doença. *P. vivax*, no entanto, tem maior distribuição do que *P. falciparum* pois é capaz de se desenvolver em mosquitos vetores do gênero *Anopheles* em temperaturas mais baixas, e é capaz de sobreviver a maiores altitudes e a climas mais frios. Além disso, *P. vivax* possui um estágio dormente em que permanece no fígado do hospedeiro (conhecido como hipnozoíto) que permite a sobrevivência durante longos períodos em que os *Anopheles* vetores não estejam

presentes para dar continuidade à transmissão como, por exemplo, durante o inverno (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Os ciclos de vida dos plasmódios causadores da malária são, de maneira geral, bastante similares entre si. A infecção em humanos começa quando esporozoítos (estágio infectante do plasmódio) são injetados através da picada de um mosquito e transportados pelo corpo do hospedeiro humano até invadir hepatócitos do fígado, onde passam por uma etapa de multiplicação assexuada (esquizogonia exoeritrocítica), resultando na produção de diversos merozoítos uninucleados. Esses merozoítos passam, então, à corrente sanguínea e invadem células vermelhas do sangue, onde iniciam uma segunda fase de multiplicação assexuada (esquizogonia eritrocítica), resultando na produção de cerca de 8-16 merozoítos que invadem novas células vermelhas do sangue. Esse processo é repetido indefinidamente e é responsável pelas febres sintomáticas da malária. Com a progressão da infecção, alguns merozoítos jovens se desenvolvem em gametócitos machos ou fêmeas que circulam no sangue periférico até que sejam capturados por uma fêmea de anofelino que por ventura se alimente do sangue infectado. No mosquito, os gametócitos amadurecem em gametas masculinos e femininos, a fertilização ocorre e um zigoto móvel (ocineto) é formado no lúmen do tubo digestório do mosquito, começando o processo conhecido como esporogonia. O oocineto, então, penetra a parede do tubo digestório e se transforma em um oocisto, o qual passa por outra etapa de multiplicação assexuada, resultando na formação de esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito. Esses esporozoítos, por fim, são injetados pelo mosquito quando o mesmo vai se alimentar de sangue em um novo hospedeiro, reiniciando o ciclo (COX, 2010). Tais etapas do ciclo de vida dos plasmódios causadores da malária estão esquematizadas na Figura 1.



**Figura 1.** Esquema do ciclo de vida de *Plasmodium* spp. (adaptado de COX, 2010).

A malária é, atualmente, um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e no mundo, ocorrendo principalmente na África, Sudeste Asiático, e região amazônica da América do Sul (TAUIL, 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2013 houve transmissão contínua de malária em 97 países. Além disso, 7 países estão na fase de prevenção de reintrodução, levando a um total de 104 países e territórios em que a malária é considerada endêmica. Globalmente, estima-se que 3,4 bilhões de pessoas estejam em risco de contrair malária. A OMS estima que 207 milhões de casos (margem de incerteza: 135-287 milhões) e 627.000 mortes (margem de incerteza: 473.000-789.000) decorrentes de malária ocorreram no mundo em 2012. A maioria dos casos (80%) e mortes (90%) ocorreram na África, e a maioria das mortes (77%) em crianças com menos de 5 anos de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

## 1.2. Histórico da Malária no Brasil

No Brasil, a malária persiste como um importante problema de saúde pública, com aproximadamente 306.000 casos registrados em 2009. Embora tais números ainda sejam alarmantes, eles evidenciam o sucesso em estratégias de controle adotadas ao longo do séc. XX em todo o país: no início da década de 1940, cerca de seis milhões de casos eram registrados todos os anos. Atualmente, 99,8% do número total de casos da doença registrados no país estão restritos à região amazônica, onde diversos fatores combinados favorecem a transmissão da doença e dificultam a utilização de protocolos adequados de controle da mesma (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A primeira menção à malária em um documento histórico do Brasil, indicando sua presença no país, foi feita por Gabriel Soares de Souza, em 1587, em seu “Notícia do Brazil”. Nesse documento, são mencionadas febres terças e quartãs entre os índios tupinambás, sintomas hoje atribuídos à malária (DEANE, 1986). Não há, no entanto, menções à malária durante o período colonial e as atenções se voltaram à mesma apenas na segunda metade do séc. XIX. Nesse período, a malária estava presente no planalto central, na região amazônica e ao longo de toda a costa do país (PINA-COSTA et al., 2014). Na década de 1870, milhares de migrantes nordestinos indo trabalhar na extração de látex na região amazônica padeceram com a doença, muitos indo a óbito (DEANE, 1986; PINA-COSTA et al., 2014). Em decorrência da libertação dos escravos em 1888, diversas plantações e fazendas foram abandonadas do sudeste do Brasil, principalmente em São Paulo e na Baixada Fluminense, e se tornaram focos da doença nas décadas seguintes devido à deterioração de sistemas de drenagem e irrigação, os quais criaram um ambiente favorável à proliferação dos vetores (DEANE, 1986). Ainda no final do século XIX, surtos de malária em regiões serranas da mata atlântica, muito diferentes das habituais regiões de ocorrência da doença, levaram à descoberta da “malária de bromélia”, transmitida por vetores que se reproduziam em plantas armazenadoras de água (GADELHA, 1994). Tal episódio será descrito com mais detalhes na seção 1.5 desta dissertação.

Durante a primeira metade do século XX, três epidemias em grande escala ocorreram no país. A primeira delas, novamente na região amazônica, no início do século, ocorreu devido à migração de trabalhadores nordestinos para construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré (DEANE, 1986). A segunda, na década de 1930,

ocorreu de maneira violenta na região Nordeste do país, devido à introdução acidental do principal vetor de malária da África, *Anopheles (Cellia) gambiae* Giles 1902, nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará. Tais vetores provavelmente foram trazidos acidentalmente ao país por navios de guerra franceses que viajavam de Dakar, no Senegal, para Natal (RN), conduzindo estudos meteorológicos preparatórios para futuros voos transatlânticos. O surto epidêmico, um dos piores até então devido à alta taxa de infecção (cerca de 80-90% da população das áreas invadidas por *An. gambiae*) e às altas taxas de mortalidade (13%), se encerrou na década de 1940 com a total erradicação da espécie invasora no país (Figura 2) (DEANE, 1986; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; PINA-COSTA et al., 2014).

**Figura 2.** Expurgo domiciliar com compressor De Vilbiss, durante a campanha contra o *Anopheles gambiae* no nordeste brasileiro. Ceará, 1940. Arquivo Fundação Rockefeller, Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz. Adaptado de HOCHMAN, MELLO & SANTOS (2002).

O terceiro surto se deu em decorrência de uma terceira migração de cerca de 50.000 nordestinos à Amazônia, na década de 1940, a fim de aumentar a produção de borracha para suprir os Aliados na 2ª Guerra Mundial, tendo em vista que as plantações do oriente provedoras de tal recurso haviam sido tomadas pelos japoneses no pacífico (DEANE, 1986).

Em 1940, estimou-se a ocorrência de aproximadamente seis milhões de casos de malária no país (cerca de 15% da população total), resultando em um total de 80.000 mortes (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; PINA-COSTA et al., 2014). Desses casos, mais de 50% era proveniente de regiões fora da Amazônia, principalmente no vale do rio São Francisco e na Baixada Fluminense (DEANE, 1986).

Os números elevados da malária no país durante esse período motivaram a criação do Serviço Nacional de Malária (SNM) do Brasil em 1941. Tal serviço deu início a um bem sucedido programa de erradicação da doença, seguindo as recomendações da Organização Mundial de Saúde. As medidas adotadas pelo programa para o controle da malária variavam de soluções mais brandas, como a aplicação de DDT nas paredes internas de casas e tratamento de doentes com cloroquina (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010) a outras mais drásticas, como drenagem de áreas paludosas, desmatamento de matas nativas próximas a cidades a fim de eliminar possíveis criadouros de mosquitos e retirada manual e destruição de todas as bromélias encontradas dentro e próximo às cidades (REITZ, 1983). Sobre tais métodos extremos, Raulino Reitz, cuja

algunha de “Padre dos Gravatás” denuncia a ocupação de botânico contratado pelo SNM para estudo da associação entre bromélias e possíveis vetores em Santa Catarina, no sul do Brasil, escreveu:

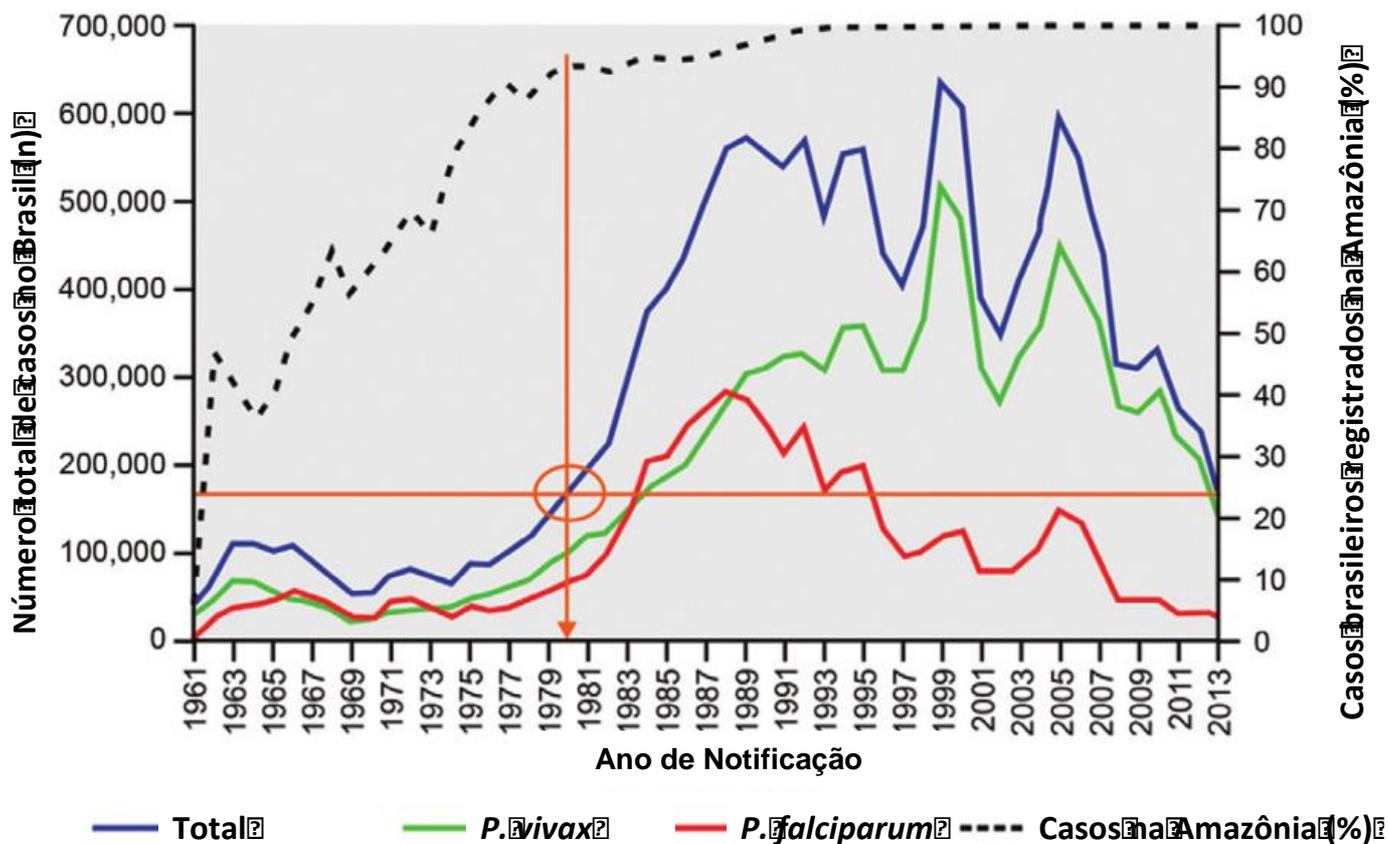
“Um exemplo de retirada manual de bromeliáceas, como método de profilaxia contra a malária, ocorreu nesta formosa cidade de Florianópolis, onde as bromeliáceas abundavam dentro e na periferia da cidade, sobre as árvores e, principalmente, sobre as rochas. A retirada manual destas plantas iniciou-se em 1944 e completou-se em 1950. Nos dois primeiros anos foram destruídas 14.059.810 bromeliáceas, e, em revisões feitas, nos anos seguintes, eliminaram-se mais 1.921.603, perfazendo, assim, um total de 15.981.413 bromeliáceas, em torno da cidade.” (REITZ, 1983, p. 55)

Tais medidas levaram à erradicação da doença em algumas áreas do país e a uma diminuição drástica no número de casos: no ano de 1960 foram registrados os menores índices de malária no Brasil, com aproximadamente 36,9 mil casos, dos quais a grande maioria ocorria na região da Amazônia. (PINA-COSTA et al., 2014)

Apesar de sua colonização ter começado efetivamente na década de 1940, foi só a partir do final da década de 1970 e início da década de 1980 que a rápida, intensa e desorganizada ocupação da região amazônica causou outra mudança drástica da situação epidemiológica da malária no Brasil. Os estados da Amazônia passaram a receber grandes números de migrantes em busca de projetos de colonização, ganhos financeiros e recursos naturais (PINA-COSTA et al., 2014). A exposição de um grande número de indivíduos não imunes resultou em novo aumento do número de casos e a malária, no final da década de 1980 e início da década de 1990, se tornou o principal problema de saúde associado a doenças comunicáveis no país, com cerca de 578.000 casos em 1989 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; TAUIL; DANIEL-RIBEIRO, 1998; TAUIL et al., 1985).

Diante dessa nova situação, em 1992 a Organização Mundial da Saúde realizou uma reunião em Amsterdam, Holanda, pressionando os Ministérios da Saúde de países onde a malária ainda era endêmica a adotar medidas integradas de controle, focando mais na diminuição da morbidez e fatalidade da doença do que em sua erradicação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993). O Plano Nacional de Controle da

Malária (PNCM) passou, então, a focar os esforços no diagnóstico rápido da doença e tratamento adequado dos casos, ao invés de aplicação de DDT e diagnóstico e tratamento de casos febris. Tal medida se mostrou eficaz e resultou, pela primeira vez, na diminuição da proporção de casos causados por *P. falciparum* (ver Figura 3). No entanto, o número de casos de malária ocasionados por infecção com *P. vivax* continuou a crescer até 1999, quando o governo decidiu intensificar as ações do PNCM, criando o PIACM (Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária), que levou à diminuição do número de casos nos primeiros anos da década de 2000. A incidência voltou a subir de 2003 a 2005, em um surto atribuído a fatores diversos como mudanças climáticas, movimentos de migração e ocupação desordenada devido a programas de reforma agrária e desmatamento de áreas florestais. Para tentar reverter tal quadro, o Ministério da Saúde promoveu uma mobilização multissetorial de forças, principalmente convocando administradores de saúde nos estados e municípios para coordenar movimentos populacionais e priorizar a vigilância, prevenção e controle da malária em suas agendas. Tais medidas levaram a uma redução substancial do número de casos de malária no país de 2006 em diante (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; PINA-COSTA et al., 2014). A Figura 3 ilustra tais oscilações no número de casos ocorridas desde a década de 1960 até o fim da década de 2010.



**Figura 3.** Número de casos de malária registrados anualmente de 1961 a 2013 no Brasil, de acordo com a espécie de *Plasmodium* responsável pela infecção. Após o baixo número registrado em 1961, houve um aumento em 1970, principalmente no número de casos na região amazônica, onde a maioria dos casos no país ocorreu de 1967 em diante. Na década de 1980 como resultado de uma intensa, rápida e desorganizada colonização da Amazônia, os números aumentaram drasticamente, atingindo mais de 573 mil casos em 1989. Dois picos de casos foram registrados em 1999 e 2005, apesar da tendência de diminuição de 1991 em diante. O círculo com as linhas em interseção mostra que o número de casos atual é similar ao observado em 1980. Notar a diminuição progressiva de casos devido a *P. falciparum* desde 1988. Adaptado de PINA-COSTA et al. (2014).

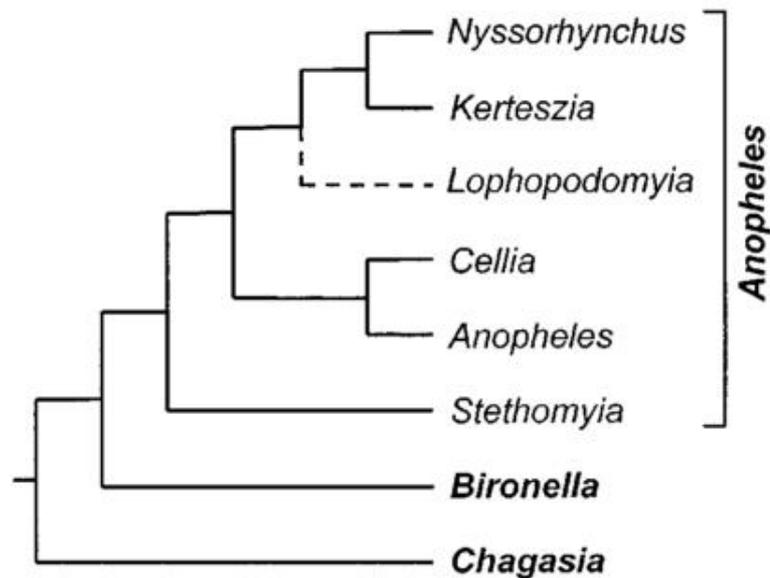
### 1.3. O gênero *Anopheles* Meigen, 1818

Os insetos vetores da malária são mosquitos (Diptera, Culicidae) pertencentes ao gênero *Anopheles* Meigen, 1818. Tal gênero é o maior dos três pertencentes à subfamília Anophelinae, à qual também fazem parte os gêneros *Bironella* Theobald, 1905 e *Chagasia* Cruz, 1906, compreendendo a linhagem com características morfológicas mais basais dentre os atuais culicídeos. Representantes das mais de 500 espécies de *Anopheles* atualmente descritas podem ser encontrados em todos os continentes do planeta, com exceção da Antártica (KRZYWINSKI; BESANSKY, 2003).

Devido a sua importância como vetores de malária, filarioses e arbovírus, o gênero *Anopheles* é um dos mais estudados do ponto de vista da taxonomia alfa. No entanto, a classificação e o posicionamento filogenético de grupos subgenéricos permanece como fonte de muitas dúvidas, pois exames críticos das relações evolutivas nos níveis intra e interespecíficos tem focado nas espécies com importância sanitária, as quais constituem uma minoria dentro do gênero (KRZYWINSKI; BESANSKY, 2003). Além disso, a descrição de espécies de anofelinos ao longo do século XX foi feita, muitas vezes, por pesquisadores com formação na área médica (malariologistas ou epidemiologistas), os quais estudavam a taxonomia dos mosquitos apenas devido a sua importância como vetores. Tal peculiaridade levou a diversos problemas na classificação e identificação de espécies desse grupo (PEYTON; WILKERSON; HARBACH, 1991). Somado a essas dificuldades está o fato de que muitas espécies de anofelinos são, na realidade, complexos de espécies crípticas (ver seção 1.8). Essa característica, acentuada no gênero *Anopheles*, levou KRZYWINSKI & BESANSKY (2003) a escreverem que “quando se trata de anofelinos, pode-se dizer que seu criador tinha um carinho especial por espécies crípticas”.

Atualmente, o gênero *Anopheles* é dividido em sete subgêneros (Figura 4), com diferentes distribuições geográficas: *Anopheles* Meigen, 1818 (cosmopolita); *Cellia* Theobald, 1902 (velho mundo); *Baimaia* Harbach, Rattanarithikul & Harrison, 2005 (sudeste asiático); *Kerteszia* Theobald, 1905, *Lophopodomyia* Antunes, 1937, *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902 e *Stethomyia* Theobald, 1902 (novo mundo) (DEANE, 1986; HARBACH; RATTANARITHIKUL;

HARRISION, 2005; KRZYWINSKI; BESANSKY, 2003).



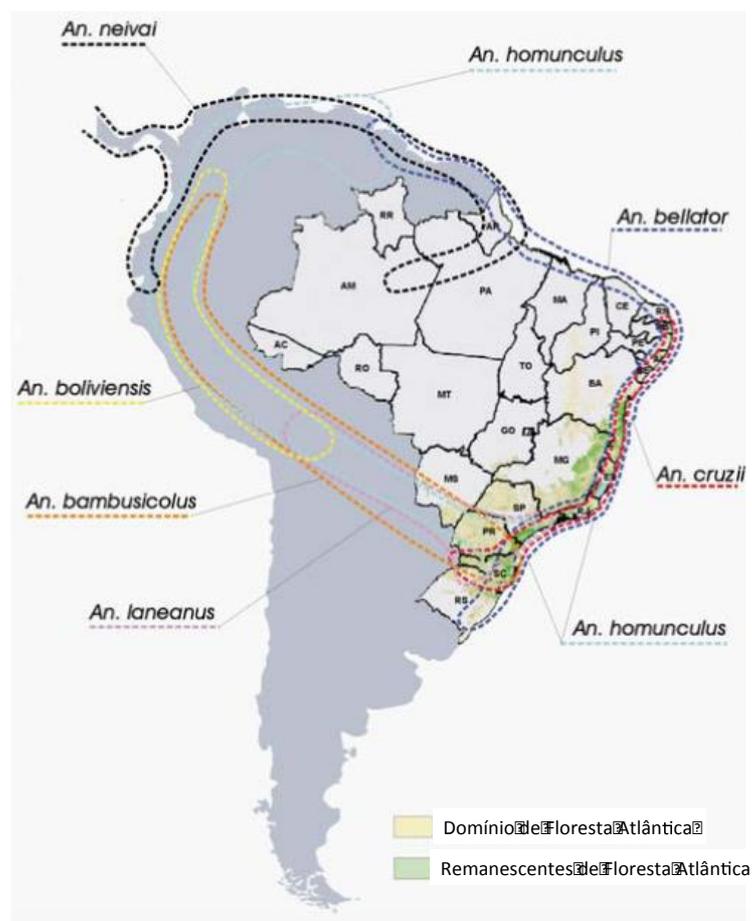
**Figura 4.** Relações filogenéticas hipotéticas dentro da subfamília Anophelinae. Apenas os gêneros (em negrito) e subgêneros estão representados. A linha pontilhada representa o posicionamento incerto do subgênero *Lophopodomyia*. O subgênero *Baimaia* não está incluído na figura, mas seu posicionamento é basal em relação aos demais subgêneros de *Anopheles*, constituindo a primeira linhagem a divergir das demais a partir de um ancestral comum às espécies do gênero (HARBACH; RATTANARITHIKUL; HARRISION, 2005). Modificado de KRZYWINSKI; BESANSKY (2003)

Segundo DEANE (1986) e CONSOLI & OLIVEIRA (1994), no Brasil, os vetores de malária pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. Esses dois grupos possuem diversas espécies com importância médica e foram classificados originalmente como gêneros (PEYTON; WILKERSON; HARBACH, 1991). Embora hoje sejam classificados em categorias subgenéricas, o monofiletismo de ambos os grupos e sua relação como táxons irmãos são sustentados tanto por dados morfológicos (COLLUCCI; SALLUM, 2003; PEYTON; WILKERSON; HARBACH, 1991; SALLUM; SCHULTZ; WILKERSON, 2000) quanto moleculares (SALLUM et al., 2002).

O subgênero *Nyssorhynchus* possui ampla distribuição no Neotrópico e abrange os principais responsáveis pela malária no país, compreendendo as seguintes espécies de vetores da doença: *An. (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926; *An. (Nys.) aquasalis* Curry, 1932; espécies do

complexo *An. (Nys.) albitarsis s. l.*; *An. (Nys.) marajoara* Galvão & Damasceno, 1942; *An. (Nys.) janconnae* Wilkerson & Sallum, 2009; *An. (Nys.) albitarsis s. s.* Rosa-Freitas & Deane, 1989; *An. (Nys.) deaneorum* Rosa-Freitas, 1989 e espécies do complexo *An. (Nys.) oswaldoi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O subgênero *Kerteszia*, tendo como peculiaridade o fato de suas larvas se desenvolverem em bromélias (à exceção de *Anopheles (K.) bambusicolus* Komp, 1937, que se desenvolve em bambus), apresenta distribuição ampla na América do Sul, com espécies ocorrendo principalmente em áreas costeiras dos oceanos Pacífico e Atlântico (Figura 5) (MARRELLI et al., 2007; ZAVORTINK, 1973). No Brasil, as principais espécies vetoras de malária pertencentes a esse subgênero são *An. (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab, 1908; *An. (K.) bellator* Dyar & Knab, 1906 e *An. (K.) homunculus* Komp, 1937 (DEANE, 1986; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).



**Figura 5.** Distribuição geográfica das espécies de *Kerteszia* na América do Sul. No Brasil, *An. cruzii*, *An. bellator* e *An. homunculus* são vetores da “malária de bromélia” na Mata Atlântica. Modificado de MARRELLI et al. (2007).

*Anopheles cruzii* e *An. bellator*, as espécies de *Kerteszia* com maior importância epidemiológica no Brasil, possuem ampla distribuição no país. Enquanto *An. cruzii* tem sua distribuição limitada às regiões sob domínio da Mata Atlântica, do sul ao nordeste do país, *An. bellator* tem distribuição mais ampla, embora descontínua, atingindo o estado do Amapá, o norte da América do Sul e Trinidad e Tobago. *An. homunculus*, por sua vez, pode ser encontrado em regiões mais ao sul do país, nos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo (MARRELLI et al., 2007).

*Anopheles cruzii*, principal vetor de malária da Mata Atlântica, é a espécie foco deste estudo e terá suas características detalhadas adiante.

#### 1.4. *Anopheles cruzii* e a Malária na Mata Atlântica

Apesar de mais de 99% da malária no Brasil estar concentrada na região amazônica, atualmente ainda existe transmissão esporádica em outras áreas do país, particularmente naqueles estados cobertos pela Mata Atlântica, onde coexistem o vetor, o homem e primatas não humanos portadores do *Plasmodium* infectante para humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; PINA-COSTA et al., 2014). Neste ecossistema, os principais vetores pertencem ao subgênero *Kerteszia*, que tem como criadouro as plantas da família Bromeliaceae (ver seção 1.3) (DEANE, 1986; PINA-COSTA et al., 2014; ZAVORTINK, 1973). A Mata Atlântica, cujas florestas são ricas em bromeliáceas epífitas e terrestres, provê um habitat adequado para a reprodução desses anofelinos (DEANE, 1992; GUIMARÃES; MELLO, 2000). *An. cruzii* (Figura 6) é um dos principais vetores nessa região, podendo ser diferenciado das demais espécies do bioma por características morfológicas diagnósticas (LORENZ et al., 2012; WILKERSON; PEYTON, 1991; ZAVORTINK, 1973). Essa espécie, conhecida por seu potencial como vetor da “malária de bromélia” desde o início do séc. XX (BENCHIMOL; SÁ, 2005; GADELHA, 1994), é considerada vetor primário da malária nas regiões sul e sudeste do país (ARAGAO, 1964; LORENZ et al., 2012; RACHOU, 1958).



**Figura 6.** *Anopheles cruzii*, principal vetor de malária humana e simiana na Mata Atlântica.

Foto de Genilton de Oliveira. Adaptado de PINA-COSTA et al. (2014)

Os casos de malária na Mata Atlântica são detectados entre janeiro e abril, coincidindo com a maior pluviosidade e frequência de picadas de *An. cruzii* (AZEVEDO, 1997; CURADO et al., 2006). Essa espécie de anofelino se destaca devido à grande abundância com a qual é encontrada em regiões de floresta atlântica (BONA; NAVARRO-SILVA, 2008; KIRCHGATTER et al., 2014; SANTOS-NETO; LOZOVEI, 2008; UENO; FORATTINI; KAKITANI, 2007). As fêmeas são altamente antropofílicas e picam preferencialmente durante a noite (AZEVEDO, 1997), podendo picar mais de um hospedeiro para completar a maturação de seus ovos, o que é epidemiologicamente relevante para a transmissão da malária (ARAGAO, 1964; CORREA et al., 1961; VELOSO; MOURA; KLEIN, 1956). A espécie tem pico de atividade de voo nas primeiras horas da noite (SANTOS-NETO; LOZOVEI, 2008) e os ovos são colocados na água armazenada em copos de bromélias, de preferência localizadas em locais sombreados onde a evaporação é mais lenta (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Embora *An. cruzii* seja essencialmente silvestre, há relatos de larvas encontradas em bromélias em áreas urbanas (MARQUES; FORATTINI, 2009) e peridomiciliares (KIRCHGATTER et al., 2014).

Durante seu ciclo de vida, anofelinos passam por quatro etapas de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 7). Cada fêmea de *An. cruzii* coloca de 20 a 40 ovos, os quais eclodem após 24 horas. O desenvolvimento dos indivíduos é lento, demorando cerca de 35 dias da postura dos ovos à fase adulta em condições de laboratório (WILKERSON; PEYTON, 1991). A maior parte desse período é passada nos estágios larvares, enquanto o desenvolvimento da pupa é rápido, durando aproximadamente 3 dias. Tal característica é contra intuitiva, tendo em vista a complexidade e extensão das mudanças necessárias à metamorfose. Como a pupa não se movimenta, sendo assim alvo fácil para predadores, hipotetiza-se que o curto período da fase de pupa é uma adaptação em resposta a uma pressão seletiva gerada pela predação. Os adultos sobrevivem em média por aproximadamente 10 dias, tempo suficiente para que a postura de ovos seja realizada (CHAHAD-EHLERS; LOZOVEI; MARQUES, 2007).

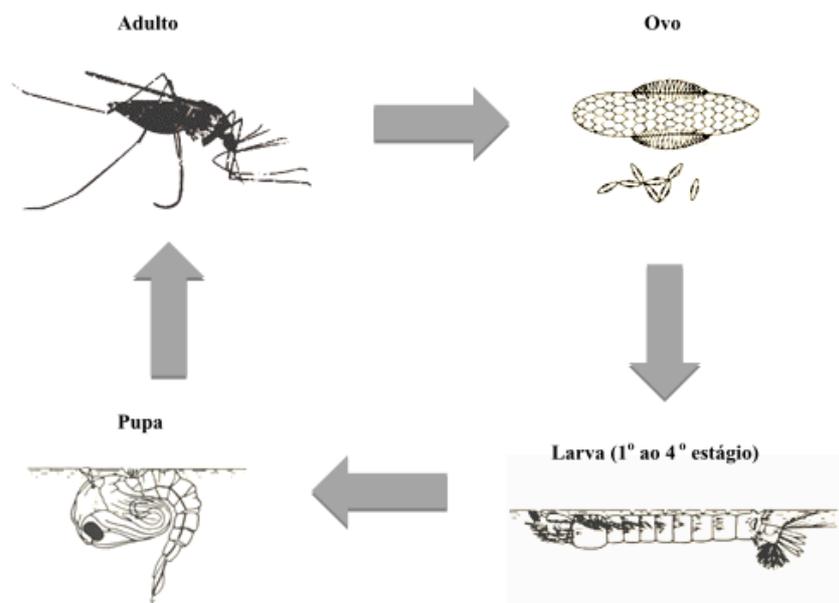


Figura 7. Ciclo de vida de *Anopheles cruzii*.

Os adultos de *Anopheles cruzii* são tradicionalmente descritos como acrodendrófilos (i.e. encontram-se preferencialmente nas copas das árvores) (DEANE, 1986; UENO; FORATTINI; KAKITANI, 2007), embora tenham capacidade de voar das copas arbóreas ao solo e vice-versa em busca de seus hospedeiros (DEANE; FERREIRA NETO; MOURA, 1984). No entanto, há evidências de que em algumas regiões do país a distribuição vertical de *An. cruzii* na mata é homogênea, sem clara preferência pelos estratos superiores (DEANE et al., 1971; SANTOS-NETO; LOZOVEI, 2008). Tal variabilidade é discutida em maiores detalhes na seção 1.6 deste trabalho.

No estado do Rio de Janeiro, onde *An. cruzii* é atualmente o principal vetor de malária, foram notificados mais de mil casos da doença de 1990 até 2008 (REZENDE et al., 2009) e 713 casos de 2009 a fevereiro de 2015 (Tabela 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Nos anos de 1993 a 1997, pequenos surtos de malária autóctone por *P. vivax* foram detectados (microscópica e/ou sorologicamente) nos vales montanhosos de Mata Atlântica da região de Nova Friburgo (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Muitos casos corresponderam a visitantes e veranistas que frequentaram áreas de mata ou pernoveram em locais próximos ao ambiente preservado. No entanto, raros casos de malária foram detectados em moradores permanentes destas mesmas áreas, embora avaliações sorológicas revelem elevada prevalência para anticorpos contra plasmódio nestes indivíduos, sugerindo que já tiveram contato com o parasito (AZEVEDO, 1997),

o que é epidemiologicamente relevante tendo em vista que humanos assintomáticos portadores do plasmódio são a principal fonte de infecção de anofelinos em áreas peridomiciliares da Mata Atlântica (KIRCHGATTER et al., 2014). De 2005 a 2014, casos autóctones de malária foram registrados nos municípios de Cachoeiras de Macacu, Campos dos Goytacazes, Casimiro de Abreu, Macaé, Magé, Paraty, Santa Maria Madalena, São Tomé, São Fidelis, Nova Friburgo, Rio das Flores, Petrópolis, Guapimirim e Sapucaia (MIGUEL et al., 2014).

Estudos entomológicos e de infecção natural demonstraram que *An. cruzii* é responsável pela transmissão da malária no Espírito Santo, através da detecção de *P. vivax* no tórax de membros do complexo, por meio de PCR (CERUTTI et al., 2007) reforçando a importância epidemiológica de *An. cruzii* como vetor de malária na região sudeste do Brasil.

**Tabela 1.** Casos confirmados notificados por estados da região extra-amazônica. Foram excluídas as recaídas, as notificações com parasitológico negativo ou não preenchido e os não residentes no Brasil. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015)

UF	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	TOTAL
Piauí	49	49	61	116	109	71	82	26	0	563
Ceara	60	21	33	53	33	30	19	13	0	262
Rio Grande do Norte	4	6	13	19	19	22	10	9	0	102
Paraíba	2	0	9	18	7	9	7	1	0	53
Pernambuco	28	29	32	17	30	20	24	11	0	191
Alagoas	6	3	9	9	6	7	7	3	0	50
Sergipe	2	3	5	8	7	6	5	5	0	41
Bahia	27	25	20	60	26	20	18	18	0	214
Minas Gerais	131	116	83	120	112	106	89	46	0	803
Espirito Santo	92	126	54	78	70	52	53	38	0	563
Rio de Janeiro	78	65	74	113	114	128	99	42	0	713
Sao Paulo	244	151	192	234	196	190	156	136	3	1502
Paraná	196	91	118	123	97	59	61	27	0	772
Santa Catarina	37	15	17	34	23	43	39	24	2	234
Rio Grande do Sul	17	13	11	25	18	17	13	22	0	136
Mato Grosso do Sul	41	33	37	28	30	26	19	12	0	226
Goiás	119	69	65	128	70	78	60	45	0	634
Distrito Federal	40	24	28	49	40	27	25	15	0	248
<b>Total</b>	<b>1173</b>	<b>839</b>	<b>861</b>	<b>1232</b>	<b>1007</b>	<b>911</b>	<b>786</b>	<b>493</b>	<b>0</b>	<b>7302</b>

Além de sua importância como vetor de malária humana, *An. cruzii* foi o primeiro

vetor natural de malária simiana descoberto nas Américas, transmitindo os dois plasmódios de macacos conhecidos no Brasil: *Plasmodium simium* Fonseca, 1951, hoje considerado sinônimo júnior (i.e. um novo nome para um táxon que já havia sido descrito previamente) de *P. vivax* e *Plasmodium brasilianum* Gonder & Berenberg-Gossler, 1908, hoje considerado sinônimo júnior de *P. malariae* (BONA; NAVARRO-SILVA, 2006; DEANE, 1992; NATAL; BARATA, 1997; WILKERSON; PEYTON, 1991). Tais plasmódios são frequentemente encontrados em macacos de gêneros comuns da Mata Atlântica como *Alouatta* (DUARTE et al., 2008; YAMASAKI et al., 2011) e *Cebus* (DE ALVARENGA et al., 2015). Como esses parasitas são os mesmos a infectar humanos, *An. cruzii* é também responsável pela transmissão de plasmódios entre homens e macacos (Figura 8) (DEANE et al., 1970, 1971). Sendo assim há necessidade de investigação se a malária autóctone nos vales montanhosos de Mata Atlântica pode ser uma zoonose e esforços vem sendo feitos a fim de elucidar tal questão (PINA-COSTA et al., 2014).



**Figura 8.** Em determinadas condições, *Anopheles (Kerteszia) cruzii* pode picar tanto no topo de árvores quanto próximo ao solo, o que pode favorecer a transmissão de plasmódios entre humanos e outros primatas. Adaptado de PINA-COSTA et al. (2014)

## 1.5. Histórico da Descoberta e Descrição de *An. cruzii*

Os primeiros exemplares do que hoje conhecemos como *An. (K.) cruzii* foram coletados no final do século XIX em São Paulo, na região Sudeste do Brasil, pelo médico e cientista brasileiro Adolpho Lutz, considerado o pai da medicina tropical e da zoologia médica no Brasil. As informações históricas a respeito do trabalho de Adolpho Lutz, as quais serão discutidas nos parágrafos que se seguem, foram retiradas prioritariamente de BENCHIMOL & SÁ, 2005.

Durante as obras de duplicação da linha ferroviária que ligava os centros produtores de café no interior paulista ao terminal de Santos, através da Serra do Mar, um surto de malária se difundiu entre os trabalhadores na região. O trecho em que a obra ocorria era coberto por matas que recobriam as montanhas e tal ambiente era bastante distinto das planícies encharcadas tradicionalmente associadas à doença. Em seu relatório de atividades de 1897, Adolpho Lutz escreveu que os casos “ocorriam tanto no alto da serra, como nas vertentes em lugares muito declives e completamente destituídos de pântanos, e não se observaram lá onde a linha atravessava os mangues”. Os aspectos intrigantes de tal epidemia levaram-no a passar algumas noites em uma casa de um engenheiro (Figura 9), situada no meio da estrada de ferro antiga, sobre as quais escreveu:

“Logo na primeira noite, que sucedeu a um dia muito quente, surgiram enquanto estávamos sentados junto a um lampião, numerosos insetos picadores. Incluíam o *Simulium pertinax* Kollar, alguns culicídeos, mais ou menos banais e meus conhecidos, e uma espécie que ainda não vira, caracterizada pelas asas maculadas e pela posição perpendicular esquisita que tomava ao sugar. Apesar da delicadeza e tamanho diminuto, deu provas de ser um sugador de sangue voraz, pousando sem hesitação alguma nas pessoas presentes e num cãozinho que também ali se achava, sem fazer zumbido prévio. As picadas desse mosquito são menos dolorosas que as de algumas outras espécies. Devido a essas circunstâncias, deixam de ser sentidas por certas pessoas de modo que a espécie, que voa principalmente durante o crepúsculo, passa facilmente despercebida. Tive imediatamente a certeza de ter encontrado o mosquito que procurava, muito embora naquela época ainda não fossem conhecidos os característicos dos transmissores da malária. Ao ser descoberto, pouco depois, que esses deveriam ser procurados entre as espécies do gênero *Anopheles*, vi com

satisfação que a nova espécie era, de fato, um *Anopheles*.”  
(LUTZ *apud* BENCHIMOL & SÁ (2005))

Tal trecho indica a descoberta, por Lutz, dos primeiros potenciais vetores de malária encontrados em regiões florestais de mata atlântica no sudeste do país.



**Figura 9.** Raiz da Serra, onde ficava a residência do engenheiro na qual Adolpho Lutz observou os primeiros exemplares do que viria a se chamar *Anopheles cruzii*. (BR. MN. Fundo Adolpho Lutz, caixa Malária – 23, maço 9). Modificado de BENCHIMOL & SÁ (2005).

Após a identificação dos adultos, descrita no trecho transcrito acima, colocou-se a ele o problema dos criadouros naturais da espécie em questão, tendo em vista que as larvas de tais mosquitos são aquáticas e que as escarpas íngremes da serra não favoreciam o acúmulo de poças d'água e charcos onde as mesmas poderiam se desenvolver. Nas palavras de Lutz, “o problema resumia-se, pois, em encontrar depósitos de água adequados para a sua criação” (BENCHIMOL; SÁ, 2005).

Lutz resolveu tal charada devido às suas habilidades como zoólogo e a uma importante experiência prévia. Entre os anos de 1889 e 1892, ele havia trabalhado com uma espécie de planta da família Pandanaceae nas ilhas do Havaí, a qual armazena água entre suas folhas e serve de hábitat para um pequeno crustáceo anfípode (*Oschestia*). Além disso, Lutz estava familiarizado com os trabalhos do naturalista alemão radicado no Brasil, Fritz Müller, realizados nos anos de 1879 e 1880, nos quais descrevera um

crustáceo Ostracoda da família Cytheridae (*Elpibium bromeliarum*), cujo ciclo de vida se completava na coluna de água armazenada por plantas da família Bromeliaceae nas matas de Santa Catarina, no Brasil. Lutz afirmou, então, que, se pequenos crustáceos e outros animais podiam se manter em copos de bromélias, “as larvas de mosquito, naturalmente, também poderiam viver” e, sendo assim, dispôs-se a examiná-las “cheio de esperança”. Após algum tempo, Lutz conseguiu localizar bromélias de fácil acesso nas quais poderia examinar a água acumulada, e nelas encontrou numerosas larvas do novo *Anopheles* e de outras espécies de mosquitos. Em 1903, relatando suas experiências na descoberta das espécies bromelícolas, Lutz escreveu que “os mosquitos típicos da floresta, quase sem exceção, passam a fase larval na água das bromeliáceas”(BENCHIMOL; SÁ, 2005).

O conhecimento da relação entre os parasitas causadores da malária e sua transmissão por vetores culicídeos era incipiente no início do século XX. O primeiro trabalho publicado evidenciando experimentalmente a relação entre os mosquitos *Anopheles* e a malária humana foi publicado no ano de 1889 (GRASSI; BIGNAMI; BASTIANELLI). Neste período, portanto, o estudo de mosquitos como vetores de doenças era um ramo pouco explorado da biologia e vinha sendo feito, às pressas, por médicos que muitas vezes não tinham a formação necessária para trabalhar com a biologia e sistemática dos mesmos. A ansiedade com que se passou a buscar culicídeos vetores de doenças levou a um aumento exponencial no conhecimento acerca deste grupo de insetos. No entanto, junto à grande quantidade de novas informações levantadas, muita confusão foi gerada devido à identificação equivocada e descrição de espécies sinônimas. Em face da grande descoberta e frente às dificuldades oriundas da ausência de conhecimento sobre os culicídeos, a Royal Society inglesa, a pedido do primeiro-ministro Joseph Chamberlain, formou uma comissão para estudar o controle da malária nas colônias britânicas. Dentro deste contexto, foi proposto um levantamento dos mosquitos existentes no mundo e uma coleção de dípteros foi formada no Museu Britânico de História Natural para assimilar os dados obtidos nessa empreitada. O zoólogo Frederick Theobald, que viria a ser o autor da espécie hoje conhecida como *An. cruzii*, foi então indicado para superintender o empreendimento (BENCHIMOL; SÁ, 2005).

Em 1899, Adolpho Lutz foi acionado no Brasil por intermédio do Consulado

Geral Britânico. A par da empreitada do governo inglês, Lutz enviou a Frederick Theobald, ainda neste ano, mais de 40 espécies de culicídeos que havia coletado recentemente. Dentre elas, estavam três exemplares de fêmeas da misteriosa espécie da floresta, coletadas no Rio de Janeiro, à qual ele atribuiu a transmissão de malária aos trabalhadores da via férrea. Theobald, então, homenageando o colaborador brasileiro que o cedeu os espécimes tipo, descreveu *Anopheles lutzii* em uma extensa monografia publicada em 1901, intitulada “A Monograph of the Culicidae, or Mosquitoes – Mainly Compiled from the Collections Received – Vol. 1” (Figura 10) (THEOBALD, 1901, pp.177-178).

24. ANOPHELES LUTZII. n. sp.

(Fig. 147, Pl. XXXVII.)

Thorax bluish-grey, with two broad dark lines on the mesonotum and also a thin median line; sides of the mesonotum dark, covered with scattered pale scales and golden hairs; abdomen dark brown, with slightly darker basal bands and golden hairs; the metatarsi with basal and apical white bands and a pale median band on fore and mid legs, some or all of the tarsi apically white; wings with the black costa with three large and two small basal pale spots, with the veins mostly clothed with long dark scales.

♀. Head black, with white scales in front and black ones behind; eyes dark purplish-black; palpi with long black scales, the last three joints with small apical bands of white scales;

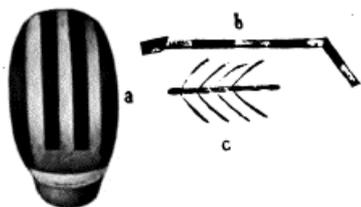


Fig. 50.

*Anopheles lutzii*, n. sp. (X. 20.)

a, Thorax; b, metatarsus; c, wing scales.

proboscis thin, deep black, with the tip dull brownish-yellow; antennae brown, with white pubescence, brown hairs, and testaceous basal joint.

Thorax dusky bluish-grey, with two broad longitudinal dark lines, and a thin faint median one; the sides of the mesonotum darker, with scattered white scales and pale golden hairs; scutellum tawny, uniform in colour; metanotum deep brown; pleurae dark brown, with pale markings.

Abdomen deep brown, with golden pubescence and darker brown basal bands and ventral surface.

Legs with the coxae and trochanters white; femora and tibiae yellow, covered by dark scales, tibiae very dark-scaled at the apex, with a patch of white scales beneath; fore and mid

metatarsi banded with white and dark scales—five distinct bands, the base and apex white; hind metatarsus apically and basally white; tarsi of the fore legs with broad white apical bands, except the last two joints, which are mostly dark-scaled; in the hind legs the same, but the last two joints are apically white.

Wings with the costa black-scaled, with three distinct pale spots and two smaller, often indistinct, basal ones; first longitudinal vein with five black areas beneath those of the costa, the greater part of the veins covered with dark scales of considerable length. Fringe at the tip of the wing yellow, and also at the tips of the veins after the anterior branch of the fourth long vein. Halteres with pale stems and dark knobs. (The pale fringe areas are not shown in the figure.)

Length.—3 to 3.5 mm.

Habitat.—Rio de Janeiro (Lutz) (4. 7. 1899).

Observations.—Described from three specimens, all ♀'s, which can at once be told by the five white and dark bands on the fore and mid metatarsi and by the linear ornamentation of the thorax.

Dr. Lutz, who sent this species, did not refer to it in any way, merely stating it is one of the three *Anopheles* found at Sao Paulo and Rio; but in a recent letter he tells me it is not very common.

25. ANOPHELES FUNESTUS. Giles.

(Hd. Bk. of Mosq. p. 162 (1900).)

(Fig. 13, Pl. IV.)

Thorax dark brown at the sides, grey in the middle, with pale scales. Abdomen blackish-brown, with scattered pale hairs. Legs dark brown to black, with, now and then, narrow apical banding by metatarsi and tarsi. Wings with the black costa broken by very pale creamy spots, the wing-field mottled with black and pale creamy scales, and the fringe with yellow spots; mid cross-vein nearer the apex than the supernumerary and posterior cross-veins.

♀. Head black, clothed with white upright forked scales in front, black ones at the sides and behind, with a bunch of long white scales projecting in front between the eyes; eyes black, with a narrow white margin; palpi black, with a white apex and two white rings, the one nearest the apex sometimes involving both sides of the last two joints; proboscis black, tes-

Figura 10. Descrição original de *Anopheles lutzii* (hoje *Anopheles (K.) cruzii*) por Theobald, a partir dos exemplares enviados por Adolpho Lutz. Modificado de THEOBALD (1901).

No entanto, também no ano de 1901, o famoso médico sanitário brasileiro Oswaldo Cruz, trabalhando no Brasil, também publicou a descrição de uma nova espécie de *Anopheles*, coletada na cidade do Rio de Janeiro, utilizando o epíteto *lutzii* em homenagem a Adolpho Lutz (CRUZ, 1901). Portanto, em 1901, foi estabelecido um caso de homonímia em relação ao nome *Anopheles lutzii*: o mesmo nome foi utilizado para designar espécies diferentes, uma descrita por Oswaldo Cruz e outra por Frederick Theobald a partir dos exemplares enviados por Lutz.

Em um trabalho publicado em 1902, Theobald dividiu o gênero *Anopheles* em seis novos gêneros, baseado em padrões morfológicos de escamas das asas, tórax e abdômen dos insetos (*Anopheles*, *Grassia*, *Cyclolepteron*, *Stethomyia*, *Howardia*, *Rossia*, *Leverania* e *Cellia*). Nessa ocasião, incluiu *Anopheles lutzii* como pertencente ao novo gênero *Laverania*. (THEOBALD, 1902). No entanto, ainda em 1902, BLANCHARD (1902) atentou para o fato de que alguns dos nomes genéricos propostos por THEOBALD (1902) já estavam previamente ocupados, e propôs algumas alterações nomenclaturais: *Myzomyia*, no lugar de *Grassia*; *Pyretophorus* no lugar de *Howardia*; *Nyssorhynchus* no lugar de *Laverania* e *Myzorhynchus* no lugar de *Rossia*. Dessa maneira, o exemplar enviado por Lutz para Theobald e descrito originalmente como *Anopheles lutzii* passaria a se chamar *Nyssorhynchus lutzii*. No entanto, no terceiro volume de sua obra “A Monograph of the Culicidae, or Mosquitoes”, publicada em 1903, Theobald classificou os mosquitos previamente classificados como *Anopheles lutzii* como pertencentes ao gênero *Myzomyia*, apresentando este como sinônimo de *Grassia* (THEOBALD, 1903).

Nesse mesmo período, a espécie de *Anopheles lutzii* descrita por CRUZ (1901) também sofreu reposicionamento taxonômico. Adolpho Lutz reposicionou a espécie no gênero *Pyretophorus* e seu aluno Celestino Bourrou o redescreveu em sua tese de doutorado, apresentada em 1904 (BOURROUL, 1904). No entanto, CHAGAS (1907) escreveu em seu trabalho “Novas Espécies de Culicídeos Brasileiros”, publicado em 1907:

“Nesta descrição houve o equívoco relativo ao colorido geral do mosquito, que ali é dado como tendo a cor de veado, e o da existência de escamas bifurcadas no occiput. Daí a criação, pelo prof. Theobald, de uma nova espécie de anophelina, com exemplares que lhe foram enviados, denominado *Myzorhynchella nigra* (THEOBALD, 1907). Manguinhos deseja reestabelecer a realidade dos fatos, reavendo a nova espécie de anophelina, sobre a qual tem direito de prioridade. O antigo *Pyretophorus lutzii* é uma anophelina de colorido geral escuro, quase negro, e, não apresenta escamas bifurcadas no occiput, deve, pelos outros caracteres, ser incluída no gênero *Myzorhynchella*, recentemente criado por Theobald. Essa anophelina é a mesma descrita por Theobald com a denominação *Myzorhynchella nigra*. (...) Assim, pois, julgamos poder concluir: *Pyretophorus lutzii* e *Myzorhynchella nigra* devem desaparecer, substituídas pela nova espécie, de Gonçalves Cruz, *Myzorhynchella lutzii*.” (CHAGAS, 1907)

No ano de 1907, portanto, o problema de homonímia instituído em 1901 havia sido desfeito: *Anopheles lutzii* Theobald, 1901 era, na ocasião, *Myzomiya lutzii* e *Anopheles lutzii* Cruz, 1901 se chamava *Myzorhynchella lutzii*.

Em 1908, os pesquisadores americanos Frederick Dyar & Harrison Gray Knab revisaram os trabalhos de Theobald e, analisando novos espécimes coletados no Brasil, chegaram à conclusão que *Myzomiya* e *Myzorhynchella* deveriam ser sinonimizados com *Anopheles*. Dessa maneira, tanto *Myzomiya lutzii* (Theobald, 1901) quanto *Myzorhynchella lutzii* (Cruz, 1901) deveriam voltar a se chamar *Anopheles lutzii*. Como reincidiriam em um caso de homonímia caso essa mudança fosse efetuada, DYAR & KNAB (1908) propuseram um novo nome para designar uma das espécies em questão. De acordo com o Princípio de Prioridade, instituído pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 1999), o nome *Anopheles lutzii* foi mantido para a *Myzorhynchella lutzii* (Cruz, 1901), tendo em vista que esta espécie havia sido descrita primeiro (homônimo sênior). *Anopheles lutzii* Theobald, 1901, por sua vez, por se tratar de um homônimo júnior, foi rebatizada como *An. cruzii*, em homenagem ao médico e cientista brasileiro Oswaldo Cruz. Pondo fim à questão de homonímia iniciada em 1901, após o trabalho de DYAR & KNAB (1908), as duas espécies referidas inicialmente como *Anopheles lutzii* passaram a portar o nome que as designam até os dias de hoje: *Anopheles lutzii* Cruz, 1901 e *An. cruzii* Dyar & Knab, 1908 (sinônimo de *Anopheles lutzii* Theobald, 1901).

Theobald não designou um holótipo dentre os três espécimes utilizados por ele na descrição da espécie. Portanto, *An. cruzii* permaneceu sem espécime tipo até 1968, quando os três espécimes coletados por Lutz em 1899 foram designados como lectótipos da espécie (BELKIN, 1968).

Diversos outros trabalhos foram publicados ao longo do séc. XX a respeito da taxonomia de *An. cruzii*, com a posterior descrição das larvas, genitália do macho e fêmeas de outras localidades. ZAVORTINK (1973) provê uma revisão taxonômica do grupo, resumindo o conhecimento acerca da espécie na ocasião e indicando as sinónimas e mudanças nomenclaturais ocorridas desde a descrição. Além disso, neste trabalho o autor também fornece uma breve redescrição da fêmea, das larvas e da genitália do macho, além de discutir o posicionamento sistemático da espécie, suas características bionômicas e distribuição geográfica. Desde então, diversos estudos demonstraram a variabilidade observada entre populações de *An. cruzii* ocorrentes em diferentes regiões. Tais trabalhos estão sumarizados a seguir.

## 1.6. Diversidade de *Anopheles (Kerteszia) cruzii*

No últimos cinquenta anos, diversos estudos mostraram que indivíduos de *An. cruzii* coletados em diferentes regiões do país apresentam alto polimorfismo, tanto em relação a caracteres comportamentais (DEANE et al., 1971) e morfológicos (LORENZ et al., 2014; ZAVORTINK, 1973) quanto a caracteres moleculares (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004; MALAFRONTTE et al., 2007, 1997; RAMÍREZ; DESSEN, 2000a; RAMIREZ; DESSEN; OTTO, 1994; RAMIREZ; DESSEN, 1994, 2000b; RONA; CARVALHO-PINTO; PEIXOTO, 2010, 2013; RONA et al., 2009, 2010). Tais trabalhos, os quais estão descritos a seguir, levaram à hipótese de que *An. cruzii* constitui um complexo de espécies crípticas (ver seção 1.8).

Em 1971, em um trabalho a respeito da transmissão de malária em primatas não humanos no Brasil, DEANE et al. observaram que *An. cruzii* em algumas áreas transmitia apenas a malária simiana enquanto em outras se mostrava um eficiente vetor tanto de parasitas humanos quanto simianos. Além disso, observaram diferenças comportamentais entre populações amostradas em diferentes regiões do país. Em São Paulo e no Espírito Santo, região Sudeste do país, onde a malária simiana era altamente incidente e praticamente holoenzoótica (i.e. todos os indivíduos amostrados na população se encontravam infectados), a população de *An. cruzii* apresentava-se predominantemente acrodendrofílica (vivendo no dossel da floresta), com alguns poucos espécimes indo se alimentar próximos ao solo. Em Santa Catarina, Sul do Brasil, o padrão encontrado foi diferente: na região de Joinville, apenas 58% dos indivíduos foram obtidos no dossel, enquanto 42% foram coletados próximos ao solo. Além disso, o padrão de transmissão de parasitas na região também era diferente: a malária simiana prevalecia (64% de taxa de infecção), mas a malária humana também era endêmica. DEANE et al. atribuíram tais diferenças a dois prováveis motivos: ou estavam relacionadas a diferenças de comportamento entre as populações de *An. cruzii* nos diferentes locais, ou devido ao hábitos das populações humanas (DEANE et al., 1971).

ZAVORTINK (1973) em uma revisão do subgênero *Kerteszia*, observou que larvas coletadas no Rio de Janeiro diferiam em muitos aspectos morfológicos das coletadas em Brusque, Santa Catarina. Tais diferenças levaram-no a duvidar da coespecificidade das mesmas.

Em 1994, o primeiro estudo sobre genética de *An. cruzii* foi publicado: a descrição do cariótipo e de cromossomos politênicos de indivíduos de uma população natural de Aldeia dos Índios, Peruíbe (SP) (RAMIREZ; DESSEN, 1994). No mesmo ano, um estudo populacional realizado na mesma região, a partir de 111 indivíduos, revelou um alto grau de polimorfismo genético: 14 inversões cromossômicas paracêntricas independentes foram encontradas (RAMIREZ; DESSEN; OTTO, 1994).

Posteriormente, uma nova análise sobre padrões de bandejamento do cromossomo X, comparando populações de *An. cruzii* de São Francisco do Sul (SC), Guaratuba (PR) e Cananéia (SP), levou à conclusão da ocorrência de duas formas divergentes na espécie, cada uma carregando um conjunto diferente de inversões, as quais foram nomeadas A e B. Devido à ausência de heterozigotos nas regiões onde as formas ocorriam em simpatria, a hipótese levantada foi de que as mesmas constituíam duas unidades evolutivas independentes. Além disso, cada uma das formas estava associada a um conjunto de inversões cromossômicas e a diferentes habitats: a forma A era predominante em regiões com altitude mais elevada, como Peruíbe (200 m), enquanto a forma B era predominante em florestas costeiras ao nível do mar, como em Guaratuba e São Francisco do Sul (RAMÍREZ; DESSEN, 2000a). Um novo estudo, realizando análises semelhantes em populações de Boracéia (860 m de altitude) e Juquitiba (580 m de altitude), ambos no estado de São Paulo, levou à descoberta de uma nova forma, batizada de C, a qual ocorria em simpatria com a forma A nas localidades amostradas. Novamente, heterozigotos não foram encontrados, levando-os à hipótese de que uma terceira linhagem evolutivamente isolada de *An. cruzii* estaria presente (RAMIREZ; DESSEN, 2000b). As informações sobre distribuição e frequência de ocorrência das formas cromossômicas A, B e C estão sumarizadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Localidade e frequência de ocorrência das formas cromossômicas A, B e C de *An. cruzii* nos estados de São Paulo e Santa Catarina. A forma A é mais abundante em locais de altitude mais elevada, como Juquitiba, Peruíbe e Boracéia (SP), enquanto a forma B é mais abundante em locais ao nível do mar, como Cananéia e Guaratuba (SP) e São Francisco do Sul (SC).

Localidade	Forma A	Forma B	Forma C
Cananéia (SP)	4,5%	95,5%	
Guaratuba (SP)	13,3%	86,7%	
Boracéia (SP)	86%	-	14%
Juquitiba (SP)	97%	-	3%
Peruíbe (SP)	100%	-	
São Francisco do Sul (SC)	-	100%	-

MALAFRONTA et al. (1997) encontraram um alto grau de polimorfismo estudando perfis de restrição de DNA ribossomal (ITS2) entre populações coletadas em cinco localidades do estado de São Paulo (Peruíbe e Cananéia, no litoral, e Juquiá, Shangrilá e Sete Barras, no interior), embora não tenha encontrado uma diferenciação clara entre linhagens ocorrentes nas diferentes localidades.

CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004) investigaram o fluxo gênico ocorrente entre populações de *An. cruzii* do Sul (Florianópolis), Sudeste (Cananéia (SP) e Nova Iguaçu (RJ)) e Nordeste (Jaguaribe (BA)) do país, através de uma análise de isoenzimas. Dessa maneira, os autores buscavam testar a hipótese de que *An. cruzii* consistia em um complexo de espécies crípticas, conforme sugerido pelos estudos supracitados. Tais análises levaram à conclusão de que os espécimes dos estados de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro são geneticamente mais próximos entre si do que quando comparados à população da Bahia. Não foram encontrados

padrões isoenzimáticos diferenciados entre as amostras do Sul e do Sudeste, conforme havida sido sugerido por RAMIREZ & DESSEN (2000 a,b). Os autores sugeriram que o fato da malária nunca ter sido atribuída a *An. cruzii* na Bahia (os casos registrados eram atribuídos a mosquitos do subgênero *Nyssorynchus*) poderia ser decorrente de diferenças na capacidade vetorial da espécie ocorrente na região, embora mais estudos devessem ser realizados para que tal conclusão pudesse ser aceita (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

CALADO, NAVARRO-SILVA & SALLUM (2006) examinaram a variabilidade genética de populações de *An. cruzii* utilizando PCR-RAPD e PCR-RLFP. Neste estudo, utilizaram mosquitos coletados em Santa Catarina (Florianópolis e São Francisco do Sul), Paraná (Morretes, Paranaguá e Guaratuba) e São Paulo (Cananéia). Os resultados mostraram que, embora *An. cruzii* seja uma espécie altamente polimórfica, a distância genética entre os indivíduos das diferentes populações não permitem inferir a presença de mais de uma espécie. Além disso, os autores sugeriram a ocorrência de fluxo gênico entre as populações.

MALAFRONTTE et al. (2007), usando sequências de ITS2, investigaram as relações entre populações de São Paulo (Juquitiba (Shangrilá e Juquiázinho), Peruíbe, Cananéia e Bertiooga) e Santa Catarina (São Francisco do Sul). Os resultados de tal investigação levaram à conclusão de que a população de Peruíbe é geneticamente isolada das demais, retendo caracteres diagnósticos ausentes nas demais populações

RONA et al. (2009) utilizaram sequências do gene *timeless*, relacionado ao controle do relógio biológico, a fim de avaliar a variabilidade intraespecífica e a divergência genética entre populações de seis localidades ao longo de quatro estados da costa brasileira: Santa Catarina (Florianópolis), São Paulo (Juquitiba e Cananéia), Rio de Janeiro (Itatiaia), Espírito Santo (Santa Teresa) e Bahia (Itaparica). Tal análise revelou a presença de diferenças fixas entre a população da Bahia e as demais, mesmo quando eram comparadas apenas a porção codificante das sequências, as quais tendem a ser mais conservadas. Além disso, os valores de  $F_{ST}$  calculados comparando a população da Bahia com as demais foi sempre acima 0,8, indicando grande estruturação dessa população. Tal resultado corroborou os dados de CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004) de que a linhagem ocorrente na Bahia é geneticamente diferente das demais, provavelmente constituindo uma espécie

diferente. Complementares a esses resultados foram as observações também realizadas por RONA et al. (2009) de que os haplótipos amostrados nessa população apresentavam certo grau de agrupamento na árvore filogenética (Neighbour-Joining) gerada nesse estudo, sugerindo um processo de diferenciação incipiente dessa linhagem. Além disso, Itatiaia foi a população menos polimórfica e a que apresentava maior proporção de homozigotos dentre as populações estudadas, sugerindo a presença de endogamia / deriva gênica. Os autores sugeriram que tal diferenciação poderia se dar pelo fato da população ter sido amostrada na Serra da Mantiqueira, contrastando com as demais, mais costeiras, coletadas ao longo do complexo da Serra do Mar (RONA et al., 2009).

Tendo em vista os trabalhos de RAMIREZ & DESSEN (2000 a,b), os quais utilizaram padrões de bandeamento do cromossomo X para identificar linhagens de *An. cruzii* no Sul e Sudeste do Brasil, RONA, CARVALHO-PINTO & PEIXOTO (2010) utilizaram sequências de um gene ligado ao cromossomo X (NADPH-citocromo P450 redutase — CPR) para testar as hipóteses levantadas pelo trabalho de RONA et al. (2009). Nesse estudo, foram novamente utilizados indivíduos de Santa Catarina (Florianópolis), São Paulo (Jquitiba e Cananéia), Rio de Janeiro (Itatiaia) e Espírito Santo (Santa Teresa). Embora os éxons do marcador utilizado tenham se mostrado conservados entre as populações analisadas, o íntron do fragmento em questão apresentou grande variabilidade, com *indels* e três polimorfismos de repetições de dinucleotídeos. Em todas as comparações realizadas com a população de Itatiaia, verificou-se diferenças fixas e poucos polimorfismos compartilhados. Os valores de  $F_{ST}$  calculados entre as populações mostraram grande estruturação entre a população de Itatiaia e as demais (variando entre ~0,6 e 0,8), corroborando a diferenciação dos indivíduos desta localidade. Além disso, um desvio acentuado do equilíbrio de Hardy-Weinberg e análises de redes de haplótipos e de polimorfismos de repetição dentre os indivíduos da população de Itatiaia levaram à hipótese de que dois grupos simpátricos isolados estariam ocorrendo na região. Para testar tal hipótese, os indivíduos foram separados de acordo com o subgrupo ao qual pertenciam (baseado em polimorfismos de repetição compartilhados), os quais foram denominados provisoriamente A e B, e o valor de  $F_{ST}$  entre os dois foi estimado. O resultado obtido ( $F_{ST} = 0,68$ ,  $P < 0,001$ ) denota a existência de duas linhagens geneticamente isoladas ocorrendo na região. RONA, CARVALHO-PINTO & PEIXOTO (2010) testaram ainda essa hipótese reanalisando as amostras de Itatiaia utilizadas em RONA et al. (2009) — utilizando um fragmento

do gene *timeless* — e obtiveram valores de  $F_{ST}$  significantes ( $F_{ST}=0,341$ ,  $P<0,001$ ) corroborando a hipótese de isolamento genético entre grupos simpátricos em Itatiaia.

RONA et al. (2010) utilizaram uma abordagem multilocus para investigar em mais detalhes a diferenciação entre as populações de Florianópolis (SC) e Itaparica (BA). Foram utilizados nesse estudo seis loci, sendo três de genes associados ao controle do relógio biológico (*Clock*, *Timeless* e *Cycle*) e três codificantes de proteínas ribossomais (RpS2, RpS29 e Rp49). Os resultados de tal análise corroboraram a hipótese de que as populações do Sul e do Nordeste do país constituem duas espécies crípticas do complexo *An. cruzii* (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004; RONA et al., 2009), pois altos valores de  $F_{ST}$  (~0,58 a 0,88) e diferenças fixas foram encontrados entre as duas populações em todos os marcadores utilizados no estudo, independentemente de sua função. Além disso, neste trabalho RONA et al. (2010) utilizaram um modelo de Isolamento com Migração para inferir a presença de fluxo gênico e realizar uma estimativa de tempo de divergência entre as populações estudadas. Os resultados demonstraram não haver presença de fluxo gênico atual entre as populações e o tempo de divergência estimado entre as linhagens foi de ~2,4 milhões de anos, correspondendo ao fim do Plioceno e início do Pleistoceno. Os autores levantaram então a hipótese de que o processo de especiação foi decorrente de eventos de glaciação durante o Pleistoceno, os quais levavam ao aumento da aridez em algumas regiões e consequente fragmentação de florestas da Mata Atlântica, o que favoreceria a especiação alopátrica das populações isoladas geograficamente.

Em 2013, RONA, CARVALHO-PINTO & PEIXOTO utilizaram a mesma abordagem *multilocus* de RONA et al. (2010) para investigar em maior detalhes a diferenciação genética entre as populações de Florianópolis (SC) e de Itatiaia (RJ) e testar as hipóteses levantadas por RONA, CARVALHO-PINTO & PEIXOTO (2010) sobre a possível ocorrência de duas espécies crípticas simpátricas em Itatiaia, RJ. Os resultados obtidos demonstraram valores altos de  $F_{ST}$  e significativos para alguns marcadores entre Itatiaia e Florianópolis e entre os subgrupos Itatiaia A e B. Corroborando tal resultado, as estimativas de tempo de divergência e fluxo gênico levaram à conclusão de que tais populações constituem unidades evolutivas independentes, levando os autores a propor a ocorrência de três espécies crípticas incipientes do complexo: uma em Florianópolis e duas em Itatiaia. O tempo de

divergência entre a linhagem de Florianópolis e Itatiaia foi estimado em 0,6 milhões de anos. Já entre as linhagens A e B de Itatiaia, o tempo de divergência foi estimado em 0,2 milhões de anos, sugerindo que o primeiro evento de cladogênese separou Itatiaia das demais populações do Sul/Sudeste e um segundo evento mais recente originou as duas espécies simpátricas de Itatiaia. Além disso, foram encontradas evidências de fluxo gênico assimétrico de Itatiaia B (espécie mais abundante) para Itatiaia A (espécie menos abundante), reforçando a hipótese de que o processo de especiação nessa localidade é incipiente e ainda não há isolamento reprodutivo completo, conforme sugerido por RONA, CARVALHO-PINTO & PEIXOTO (2010). No entanto, segundo MARSDEN et al. (2011) esse tipo de introgressão diferencial da espécie mais abundante para a menos abundante pode ser explicada por altos níveis de retrocruzamento entre os híbridos na espécie mais abundante, o que contribuiria para o processo de especiação pois evitaria a homogeneização, conservando polimorfismos únicos na forma mais comum (Itatiaia B) e evitando mistura na forma menos comum (Itatiaia A).

LORENZ et al. (2014) estudaram o fluxo gênico entre populações ao longo de um gradiente de altitude na Mata Atlântica em Cananéia (SP) e testaram se indivíduos coletados em diferentes altitudes (terras baixas (5-20m) e topo de morro (81-263m)) apresentavam homogeneidade morfológica (morfometria das asas) e genética (análise de sequências de COI). Os resultados demonstraram grande diversidade haplotípica, moderada diferenciação genética e padrões diferentes de asa entre as populações de terras baixas e de topo de morro, indicando que pode haver variação entre populações de *An. cruzii* ocorrentes em diferentes altitudes.

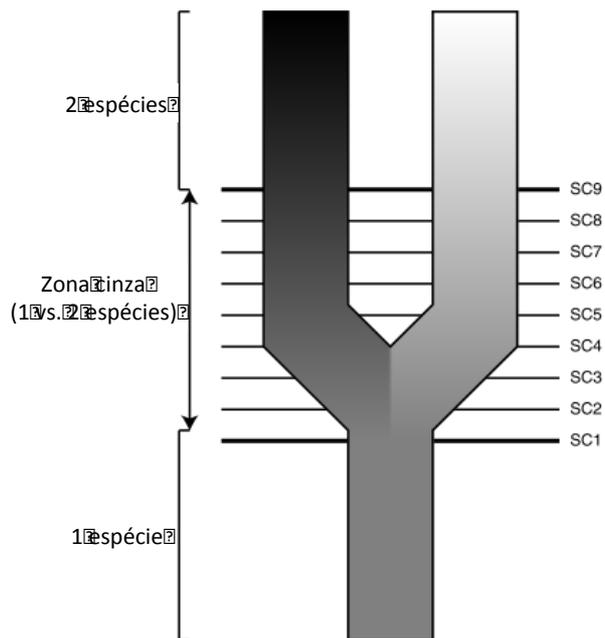
Embora tais estudos tenham demonstrado a diversidade de *An. cruzii* ao longo das diferentes localidades geográficas em que tal espécie ocorre no país, levantando a hipótese de que *An. cruzii* se trata de um complexo de espécies, nenhum trabalho apresentou uma proposta clara de delimitação das espécies e designação de novos nomes até o momento, limitando-se a sugerir a ocorrência de espécies crípticas e variedades geográficas. Além disso, embora o termo “espécies crípticas” seja recorrente na literatura sobre *An. cruzii*, nenhum trabalho apresenta uma definição clara do conceito de espécie adotado ao abordar essa questão. Para que se possa discutir a respeito da especiação dentro do complexo *An. cruzii*, será apresentada a seguir uma

breve introdução acerca da conceituação e delimitação de espécies, constante foco de debate dentro da Biologia.

## 1.7. Conceituação e Delimitação de Espécies

Apesar de sua clara importância para a taxonomia e a sistemática, a conceituação de espécie permanece como um tópico de grande discussão na comunidade científica. Charles Darwin, em seu livro “A Origem das Espécies”, se referiu a esse problema escrevendo que “nenhuma definição satisfaz até agora a todos os naturalistas; no entanto, todo naturalista sabe vagamente o que diz, quando fala de uma espécie.” (DARWIN, 1859, p. 52). MAYR (1998, pp. 285–336) provê uma detalhada descrição das mudanças de pensamento acerca dessa categoria taxonômica ao longo da história da Biologia.

Com a consolidação da Teoria da Evolução ao longo do século XX, diversos conceitos de espécie divergentes foram postulados por pesquisadores e filósofos da ciência de maneira a abranger a visão não fixista da natureza. DE QUEIROZ (2007) fornece uma revisão de alguns desses conceitos e explica que a divergência entre os mesmos está intimamente atrelada à questão operacional de delimitação de espécies na natureza a partir de dados empíricos. Sendo assim, a adoção de diferentes conceitos levará a diferentes conclusões em relação a limites e números de espécies a partir de um mesmo conjunto de observações. O autor argumenta que, no entanto, o conflito entre os diferentes conceitos é menos grave do que aparenta, tendo em vista que a grande maioria deles compartilha uma ideia em comum: a de que espécies são linhagens de uma metapopulação que estão evoluindo independentemente. Mantendo essa característica em comum, os diferentes conceitos divergem entre si apenas nos critérios operacionais utilizados para discriminar tais linhagens evolutivas independentes (Figura 11). Seguindo suas conclusões, o termo espécie é definido aqui, de acordo com o conceito unificado, como linhagens de uma metapopulação evoluindo independentemente (DE QUEIROZ, 2007). Superado o problema da conceituação, coloca-se em pauta uma outra questão: como delimitar tais linhagens?



**Figura 11.** Separação e divergência de linhagens (espeiação) e conceitos de espécie. Esse diagrama simplificado demonstra uma única linhagem (espécie) se separando e dando origem a duas linhagens (espécies). As graduações em tons de cinza representam a divergência das linhagens filhas ao longo do tempo e as linhas horizontais com legendas SC (*species criterion*) de 1 a 9 representam o tempo em que elas adquirem diferentes propriedades (i.e. quando elas se tornam feneticamente distinguíveis, diagnosticáveis, reciprocamente monofiléticas, reprodutivamente incompatíveis, ecologicamente distintas, etc). Esse conjunto de propriedades forma uma zona cinza na qual os diferentes conceitos de espécies entram em conflito entre si. Fora da zona cinza, eles são unânimes em relação ao número de espécies presentes. Antes da aquisição da primeira propriedade, todos concordariam com a ocorrência de apenas uma espécie e após a aquisição da última propriedade, todos concordariam que há duas espécies. Entre esses dois extremos, no entanto, há conflito entre os diferentes conceitos. A razão é que diferentes conceitos contemporâneos adotam diferentes propriedades (ilustrados pelas linhas horizontais) como seu critério para delimitação de espécies — isto é, seu ponto crítico para considerar que linhagens evoluindo separadamente se transformaram em espécies. Adaptado de DE QUEIROZ (2007).

Diversas abordagens utilizadas para delimitar espécies se baseiam em características diagnosticáveis que permitam identificar tais linhagens. Essas características são apomorfias, ou seja, estão presentes na linhagem em questão e ausente nas demais, tendo surgido em seu ancestral comum exclusivo (HENNIG, 1965). A maioria dos métodos tradicionais constitui em comparar características morfológicas entre linhagens geograficamente isoladas e delimitar quais populações se distinguem por características fixadas. Tais características permitem a correta atribuição de indivíduos às espécies nominais pois são diagnósticos de pertencimento a uma determinada linhagem (WIENS; SERVEDIO, 2000). No entanto, tal método de delimitação, de acordo com o conceito unificado, superestima a importância dos

caracteres morfológicos diagnosticáveis, tendo em vista que linhagens independentes podem demorar ou não vir a desenvolver tais características mesmo sendo reprodutivamente independentes (DE QUEIROZ, 2007). Sendo, assim, essas linhagens não seriam delimitadas como espécies diferentes, apesar de constituírem unidades evolutivas independentes.

Todas as espécies nominais são hipóteses. A melhor maneira de fazer com que essas hipóteses sejam robustas é analisar linhas de evidências independentes, de forma a testar as mesmas sob diferentes perspectivas. DAYRAT (2005) cunhou o termo “Taxonomia Integrativa”, definindo-o como a ciência focada em delimitar as unidades da diversidade da vida a partir de múltiplas e complementares perspectivas (*e.g.* filogeografia, morfologia comparativa, genética de populações, ecologia, desenvolvimento, comportamento, etc.), e defendeu que a adoção dessa abordagem na descrição de novas espécies reduziria muito os problemas nomenclaturais da taxonomia atual (*e.g.* embriologia, ecologia, genética, biogeografia, morfologia). Caso uma hipótese de espécie resista aos testes e demonstre homogeneidade em relação aos parâmetros observados, não podemos refutá-la e ela se torna mais robusta, com maior sustentação empírica. No entanto, se a análise de diferentes caracteres vier a denotar grande descontinuidade entre subgrupos dentro do universo amostrado, a hipótese passa a ser colocada em xeque, e novas observações se fazem necessárias para esclarecer a diversidade ali presente. Linhagens evolutivas independentes nas quais características morfológicas diagnósticas ainda não são identificadas são conhecidas como espécies crípticas, conforme discutido a seguir.

## 1.8. Espécies Crípticas e Complexos de Espécies

Dentro do contexto discutido na seção 1.7, espécies crípticas podem ser definidas como duas ou mais espécies que foram previamente classificadas como uma única espécie nominal devido à uniformidade morfológica. Dados moleculares (*e.g.* sequências de DNA) são frequentemente utilizados para descobrir e delimitar espécies crípticas, geralmente levando a posterior corroboração das mesmas por dados morfológicos ou ecológicos (BICKFORD et al., 2007). Em mosquitos do gênero *Anopheles*, abordagens baseadas em múltiplos marcadores se mostraram a melhor estratégia para a correta identificação de linhagens e relações interespecíficas (BICKFORD et al., 2007). Uma vez que as espécies crípticas são delimitadas, estudos posteriores podem focar na identificação de linhagens ou formas moleculares que podem exibir envolvimento diferencial na transmissão da malária (LOAIZA et al., 2012).

Conforme explicitado na seção 1.3, diversas espécies nominais do gênero *Anopheles* se enquadram na categoria de complexos de espécies crípticas: entre as cerca de 500 espécies de *Anopheles* conhecidas, há cerca de 170 táxons crípticos pertencendo a 30 complexos de espécies proximamente relacionadas (HARBACH, 2004). Na África, os principais vetores de malária fazem parte do complexo *An. gambiae* sensu lato, formado por um conjunto de ao menos nove espécies crípticas cujos adultos eram, a princípio, morfológicamente indistinguíveis entre si (COETZEE et al., 2013; HUNT; COETZEE; FETTENE, 2000; WHITE, 1974). No Brasil, muitas espécies de anofelinos com capacidade vetorial são atualmente reconhecidas como complexos de espécies crípticas, como *An. albitarsis* e *An. oswaldoi* (ROSA-FREITAS, 1998). A seguir, um breve histórico dos estudos acerca do complexo *An. gambiae* s.l. é fornecido, a fim de demonstrar como o conhecimento acerca dos complexos de espécies crípticas de anofelinos é importante para a prevenção e controle da malária.

*An. gambiae* s.l. representa o complexo de espécies crípticas de anofelinos melhor estudado devido ao seu papel central na transmissão de malária no continente africano (NEAFSEY et al., 2015). Até a década de 1960, o complexo era tratado como uma única espécie biológica, embora a literatura da época já apresentasse diversas evidências da grande variabilidade de habitats larvais, comportamento de fêmeas adultas e preferências alimentares (COETZEE; CRAIG; LE SUEUR, 2000). De 1940

a 1960, observações foram feitas de que as larvas de diferentes grupos de *An. gambiae* s.l. tinham habitats distintos: algumas se reproduziam em água salgada enquanto outras se reproduziam em água doce. Dentre as populações que se reproduziam em água salgada, uma forma estava restrita à costa Oeste da África enquanto a outra estava restrita à costa Leste e suas ilhas. O levantamento de diferenças morfológicas diagnósticas permitindo a identificação de indivíduos provenientes das duas populações de água salgada levou à descrição de *Anopheles melas* Theobald 1903 e *Anopheles merus* Dönitz 1902, os primeiros membros do complexo *An. gambiae* sensu lato a serem descritos com novos nomes (COLUZZI, 1964). Além disso, observou-se que machos híbridos gerados a partir do cruzamento de indivíduos de diferentes populações que se reproduziam em água doce eram estéreis, o que levou à delimitação de 3 espécies que foram temporariamente reconhecidas como A, B e C. (PATERSON, 1964).

Em 1965, portanto, eram reconhecidas 5 espécies do complexo, as quais apresentavam grande diversidade de habitats, distribuição, capacidade vetorial e resistência a pesticidas (DAVIDSON, 1965). Posteriormente, uma nova espécie foi descrita a partir de indivíduos cujas larvas eram provenientes de fontes geotermiais de Uganda. Além de apresentar características cromossômicas únicas, a F<sub>1</sub> gerada a partir do cruzamento dessa espécie com as cinco então conhecidas levava ao desenvolvimento de indivíduos inférteis, o que levou à delimitação da espécie provisoriamente denominada D (DAVIDSON; HUNT, 1973). Pelos próximos 35 anos, o complexo *An. gambiae* s.l. foi composto, então, por seis espécies nominais, quatro delas de água doce — *An. gambiae* sensu stricto Giles 1902 (antiga espécie A), *An. arabiensis* Patton, 1905 (antiga espécie B), *Anopheles quadriannulatus* Theobald 1911 (antiga espécie C) —, duas de água salgada — *An. melas* e *An. merus* —, e uma de água mineral salobra, proveniente de fontes geotermiais — *Anopheles bwambae* White 1985 (antiga espécie D). Em 1997, a descrição de *Anopheles comorensis* Brunhes, Le Goff & Geoffroy 1997 foi realizada a partir da descrição morfológica de um único espécime da ilha de Comores, próxima a Moçambique, e essa nova espécie foi associada ao complexo *An. gambiae* (BRUNHES; LE GOFF; GEOFFROY, 1997)

Uma série de estudos de polimorfismos cromossômicos do complexo *An. gambiae* demonstrou a distribuição não randômica de polimorfismos de inversão em *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis* e *An. melas*, indicando a descontinuidade genética

dentro dessas espécies (COLUZZI et al., 1979, 2002). Enquanto as discontinuidades genéticas de *An. arabienis* e *An. melas* envolvia populações alopátricas, *An. gambiae* s.s. apresentava 5 formas cromossômicas simpátricas e sintópicas, as quais foram denominadas Mopti, Savanna, Bamako, Forest e Bissau. Os diferentes arranjos cromossômicos, acredita-se, facilitaram a exploração de diferenciados nichos ecológicos, pois híbridos com arranjos cromossômicos heterozigotos tendem a produzir gametas disfuncionais e teriam, conseqüentemente, sucesso reprodutivo reduzido. Com a redução do fluxo gênico, genes com características favoráveis a diferentes condições tendem a se fixar, levando à adaptação local (AYALA; COLUZZI, 2005; COLUZZI et al., 2002).

A utilização de dados moleculares forneceu novas informações a respeito da diversidade do complexo *An. gambiae* s.s.. Em um estudo correlacionando genótipos de DNA e cariótipos cromossômicos, a observação de SNPs específicos em uma região de DNA ribossômico (IGS) distinguindo linhagens evolutivamente independentes, levou à delimitação de duas formas moleculares de *An. gambiae* s.s., as quais foram nomeadas M e S (DELLA TORRE et al., 2001). Embora a presença de híbridos entre as formas M e S seja extremamente baixa em locais onde ambas ocorrem em simpatria (< 1%), a falta de correlação entre as formas moleculares e cromossômicas evidenciou a não correspondência direta entre a constituição cromossômica — a qual, aparentemente, está relacionada à adaptação ecotípica — e a especiação do complexo (DELLA TORRE et al., 2001, 2002; DELLA TORRE; TU; PETRARCA, 2005).

Baseados em uma série de evidências publicadas ao longo da década de 2000 de que as formas moleculares supracitadas representam duas linhagens evolutivamente independentes, COETZEE et al. (2013) propuseram a manutenção do nome *Anopheles gambiae* Giles 1902 para a forma S e o nome *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson 2013 à forma M. Neste trabalho, propuseram ainda o nome *Anopheles amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee 2013 a uma espécie da Etiópia que até então vinha sendo chamada de *Anopheles quadriannulatus* B, a qual, através de cruzamentos realizados em laboratórios gerando híbridos estéreis, havia sido indicada como uma nova espécie do complexo *An. gambiae* s.l. (HUNT; COETZEE; FETTENE, 2000).

Dessa maneira, *An. gambiae* s.l. hoje é composto por 9 espécies nominais, conforme explicitado acima. Apesar da semelhança morfológica, o complexo envolve

espécies com características divergentes em diversos aspectos. Os diferentes membros do complexo apresentam características ecológicas distintas, as quais influenciam diretamente sua distribuição e seu ciclo de vida — *An. merus* e *An. melas*, por exemplo, se reproduzem preferencialmente em água salgada, enquanto as demais espécies do complexo (à exceção de *An. bwembae*) se reproduzem em água doce (COLUZZI et al., 1979). Além disso, as espécies variam em relação a características diretamente associadas à transmissão da doença, como o comportamento alimentar: espécies como *An. gambiae* s.s. e *An. arabiensis*, os principais vetores no continente, são mais antropofílicas enquanto *An. quadriannulatus* se alimenta preferencialmente de bovinos e, por isso, tem papel menor na transmissão de malária para humanos (COLUZZI et al., 1979). A distribuição geográfica dos membros do complexo no continente Africano também varia, bem como a densidade populacional dos mesmos em diferentes condições de pluviosidade (COETZEE; CRAIG; LE SUEUR, 2000). Como a evolução do genoma de anofelinos é bastante rápida (NEAFSEY et al., 2015), mesmo em espécies crípticas do complexo cujo processo de especiação é bastante incipiente e eventos de introgressão e hibridização são recorrentes (LEE et al., 2014; NWAKANMA et al., 2013), como *An. gambiae* s.s. e *An. coluzzi* (antigas formas S e M), há diferenças significativas na resistência a inseticidas (CHANDRE et al., 1999; TRIPET et al., 2007), resistência a dessecação das larvas (LEE et al., 2009), segregação do hábitat larval (GIMONNEAU et al., 2012a), diferenças na resposta comportamental das larvas a predadores (GIMONNEAU et al., 2012b) e diferenciação na forma da asa (SANFORD et al., 2011). O reconhecimento de tais peculiaridades de cada espécie é fundamental para que medidas de prevenção e controle da malária possam ser tomadas de maneira eficaz.

Considerando as evidências de que *An. cruzii* representa um complexo de espécies crípticas (ver seção 1.6), o conhecimento acerca de sua diversidade entre as localidades amostradas se faz necessário para determinar quais membros do complexo são verdadeiros vetores de malária. Assim como no complexo *An. gambiae* s.l., o reconhecimento e a delimitação dessas espécies são a base para que estudos sobre as peculiaridades ecológicas e etológicas de cada uma possam ser realizados, possibilitando a adoção de estratégias apropriadas de controle vetorial àquelas que realmente tem responsabilidade na transmissão da doença.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

### 2.1. Justificativa

Conforme discutido, *An. cruzii* apresenta grande diversidade ao longo de sua distribuição na Mata Atlântica brasileira e a hipótese de que o táxon representa um complexo de espécies crípticas foi levantada em diversos trabalhos (ver seção 1.6). No estado do Rio de Janeiro, onde casos de malária autóctone são registrados todos os anos (ver seção 1.4), pouco se conhece a respeito da diversidade genética de seu principal vetor: sabe-se que em Itatiaia ocorrem duas linhagens independentes entre si e diferentes de outras linhagens do sul e nordeste do país (RONA; CARVALHO-PINTO; PEIXOTO, 2013, 2010) e que a linhagem ocorrente em Nova Iguaçu apresenta homogeneidade quando comparada às populações do Sul do Brasil (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004). No entanto, os trabalhos que chegaram a tais conclusões foram realizados sob diferentes metodologias (análise *multilocus* de sequências de DNA e análise de isoenzimas, respectivamente) e apresentados de maneira independente, e não se sabe qual a relação entre as populações ocorrentes no estado. Além disso, os dados sobre o Rio de Janeiro apresentados na literatura estão restritos a uma pequena região próxima à Serra do Mar (Nova Iguaçu) e à Serra da Mantiqueira (Itatiaia) e não há investigações a respeito da diversidade genética de *An. cruzii* ao longo de sua distribuição na Mata Atlântica fluminense. Considerando que o conhecimento acerca da diversidade de vetores de malária é fundamental para que medidas eficazes possam ser tomadas em prol da prevenção e controle da doença (ver seção 1.8), o presente trabalho busca preencher essa lacuna, permitindo uma maior compreensão acerca desse importante vetor no estado do Rio de Janeiro.

## **2.2. Objetivo geral:**

Analisar a diversidade genética do complexo *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab, 1908 (Diptera: Culicidae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

## **2.3. Objetivos específicos:**

- Realizar coletas de *An. cruzii* em diferentes locais do estado do Rio de Janeiro onde a presença deste vetor é abundante;
- Analisar a diferenciação genética dessas populações utilizando o gene *Clock* — que está envolvido no controle do relógio circadiano e que já foi isolado em *An. cruzii* em trabalhos anteriores, mostrando-se um bom marcador — como marcador molecular para diferenciar as espécies crípticas do complexo;
- Ajudar a esclarecer a estrutura genética populacional desse complexo de espécies crípticas no estado, fornecendo base para futuros estudos ecológicos e/ou etológicos e, conseqüentemente, medidas mais eficientes de vigilância e prevenção da malária neste ecossistema.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

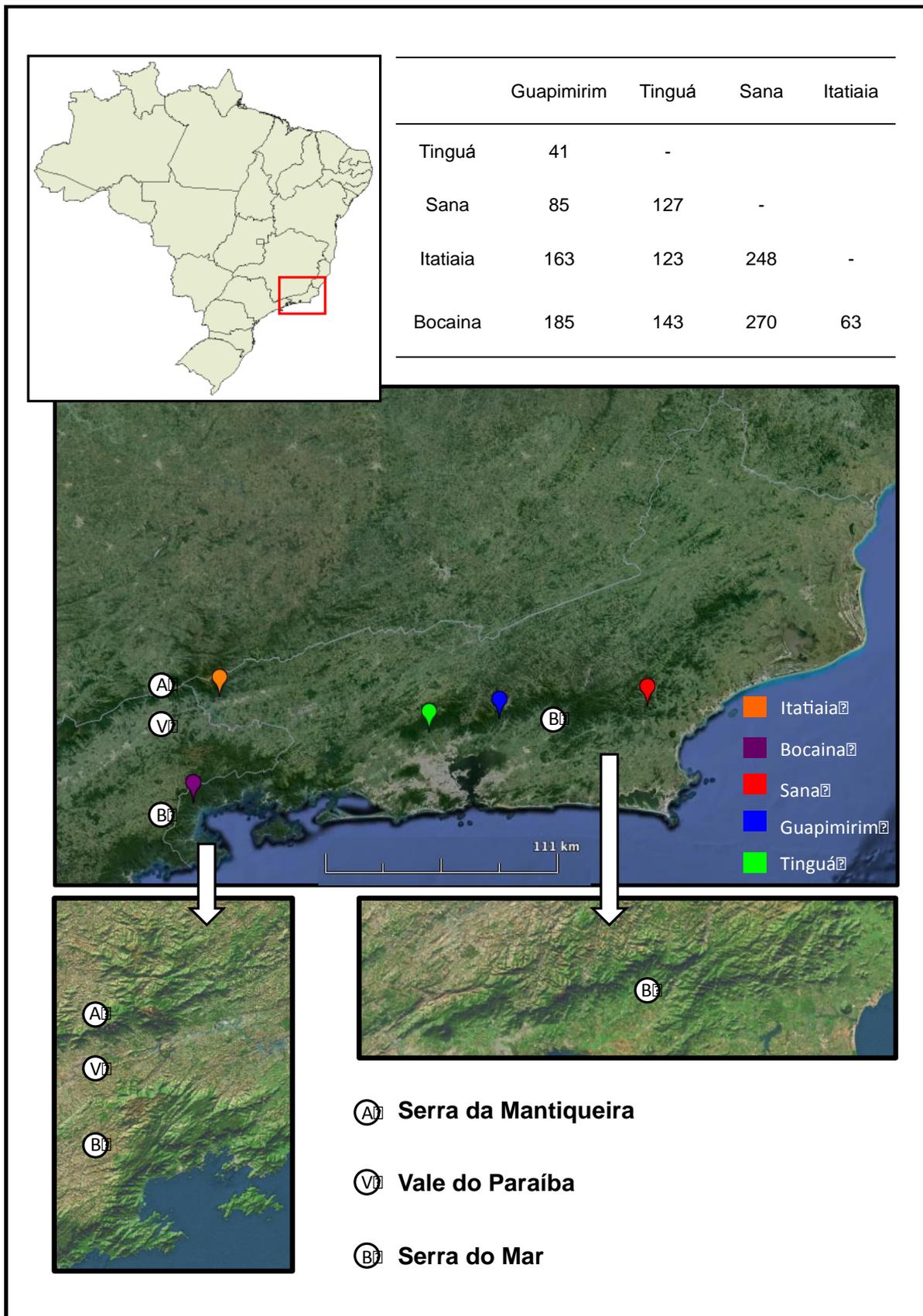
#### 3.1. Procedência do material biológico utilizado:

Indivíduos de *An. cruzii* foram coletados em diferentes locais do Estado do Rio de Janeiro onde a presença deste vetor é abundante (Figura 12):

- Tinguá – Nova Iguaçu (22°35'31.30"S e 43°26'8.27"O)
- Guapimirim – Serra Nacional dos Órgãos (22°30'30.72"S e 43° 0'36.30"O)
- Sana (22°24'0.00"S e 42°10'60.00"O)
- Itatiaia – Serra da Mantiqueira (22°27'46.74"S e 44°35'33.55"O)
- Serra da Bocaina (23° 1'26.87"S e 44°43'6.47"O)

Tinguá, Guapimirim, Sana e Bocaina se encontram na cadeia de montanhas da Serra do Mar, a qual se estende por 1.500 km, do Sul (SC) ao Sudeste (RJ), na costa brasileira. No entanto, há variação dessas localidades em relação à vertente da Serra da qual fazem parte: Tinguá, Guapimirim e Sana se encontram na face da Serra do Mar voltada para o Oceano Atlântico, enquanto a localidade da Bocaina onde os indivíduos foram coletados fica voltada para o Vale do Paraíba.

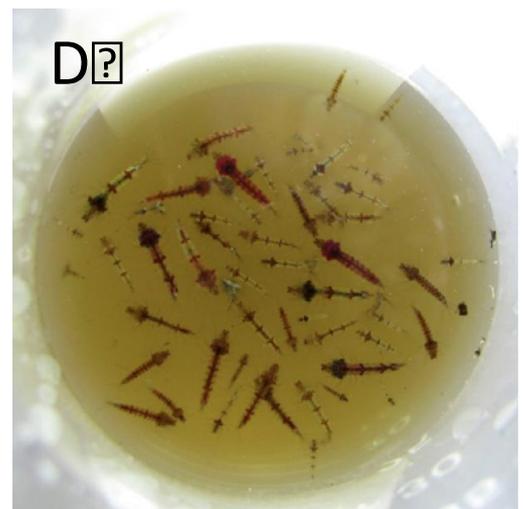
Itatiaia faz parte da Serra da Mantiqueira, cadeia montanhosa que se estende por São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Essa localidade é isolada das demais pelo Vale do Paraíba, que se estende de São Paulo ao Rio de Janeiro separando a Serra do Mar da Serra da Mantiqueira.



**Figura 12:** Localização dos pontos de coleta no estado do Rio de Janeiro, das Serras do Mar e da Mantiqueira e do Vale do Paraíba. Os valores na tabela representam a distância em quilômetros entre as diferentes localidades.

### **3.2. Coleta de mosquitos no campo:**

Larvas foram coletadas em água de bromélia com auxílio de sugador. A água das bromélias foi armazenada em garrafas e posteriormente despejada em uma bandeja para triagem das larvas, as quais foram capturadas com pipeta de Pasteur, transferidas para recipientes de plástico e transportadas ao insetário do Laboratório de Bioquímica de Insetos Hematófagos da UFRJ, onde foram criadas até atingir a fase adulta. As capturas de fêmeas adultas foram realizadas dentro da mata, com isca luminosa e aspirador manual. As coletas de adultos se iniciaram uma hora antes do pôr-do-sol, terminando duas horas após a finalização do mesmo. Após a captura, as fêmeas foram transferidas para gaiolas (10 cm de diâmetro por 10 cm de altura) de papelão ou plástico. Ao fim do período de captura, as fêmeas foram identificadas com auxílio de chave dicotômica de identificação (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) e transferidas para frascos contendo etanol a 70% para posterior extração do DNA. A Figura 13 apresenta algumas das etapas de coletas de anofelinos utilizadas neste estudo.



**Figura 13.** Coleta e triagem de mosquitos no campo. A- Coleta de água em bromélia epífita; B- Detalhe da coleta de água utilizando sugador; C- Triagem de larvas de anofelinos em bandejas de plástico D- Larvas de anofelinos separadas em um tubo de plástico. E- Gaiola utilizada para coleta de fêmeas adultas.

### 3.3. Análise molecular:

#### 3.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO:

O DNA genômico das fêmeas de *An. cruzii* adultas foi extraído individualmente utilizando o protocolo descrito por JOWETT (1998), com adaptações. Cada inseto foi macerado em 200µl de Tampão-SQ de extração (Tris-HCl 10mM, EDTA 2mM e Triton absoluto 0,2%) com o auxílio de um pistilo. Após a maceração, a mistura foi homogeneizada e posteriormente incubada em banho-Maria a 37°C por aproximadamente 1h na presença de 4µl de Proteinase K a 10mg/ml (Promega). Depois da incubação, os tubos foram colocados num banho seco a 100°C por 10min para desnaturar a Proteinase K. Após a extração, os tubos contendo o DNA genômico extraído foram armazenados no freezer.

#### 3.3.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COM *PRIMERS* ESPECÍFICOS (PCR)

A enzima *Pfu* DNA polimerase (BIOTOOLS) foi utilizada nas reações de PCR. Esta enzima possui atividade “*proof-reading*”, que minimiza os erros induzidos por PCR.

O iniciador utilizado foi previamente desenhado para amplificação de um gene codificante de fatores de transcrição relacionados ao controle do relógio biológico (*Clock*). O marcador escolhido mostrou-se eficiente em diferenciar as espécies crípticas do complexo em trabalhos anteriores (RONA; CARVALHO-PINTO; PEIXOTO, 2013; RONA et al., 2010).

As sequências de nucleotídeos dos *primers* específicos do gene *Clock* utilizados e as concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR estão especificados nas Tabelas 3 e 4.

**Tabela 3.** *Primers* utilizados nas reações de PCR

<b>Nome do <i>primer</i></b>	<b>Sequência do <i>primer</i></b>
5'cruziiclock	5'-TTGACGATCTGGAAAAGGTG-3'
3'cruziiclock	5'-CTTGGTCAGGAAGCGATAGT-3'

**Tabela 4.** Quantidades e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR com *primers* específicos:

<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
H <sub>2</sub> O milli-Q	23,6µl
Tampão de PCR com Mg (10x)	4,0µl
dNTP (25mM de cada nucleotídeo)	0,4µl
<i>Pfu</i> DNA polimerase (1 unidade / µl)	1,0µl
Oligo 5' (10 µM)	4,0µl
Oligo 3' (10 µM)	4,0µl
DNA genômico (~50ng/µl)	3,0µl
<b>Total</b>	<b>40,0µl</b>

Para cada reação, foi feito um tubo de controle negativo, contendo as mesmas concentrações de reagentes, mas substituindo o DNA genômico por H<sub>2</sub>O Milli-Q. Dessa forma, buscou-se assegurar a ausência de contaminações nos experimentos realizados.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador sob as seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 60seg e 72°C por 90seg. A visualização dos

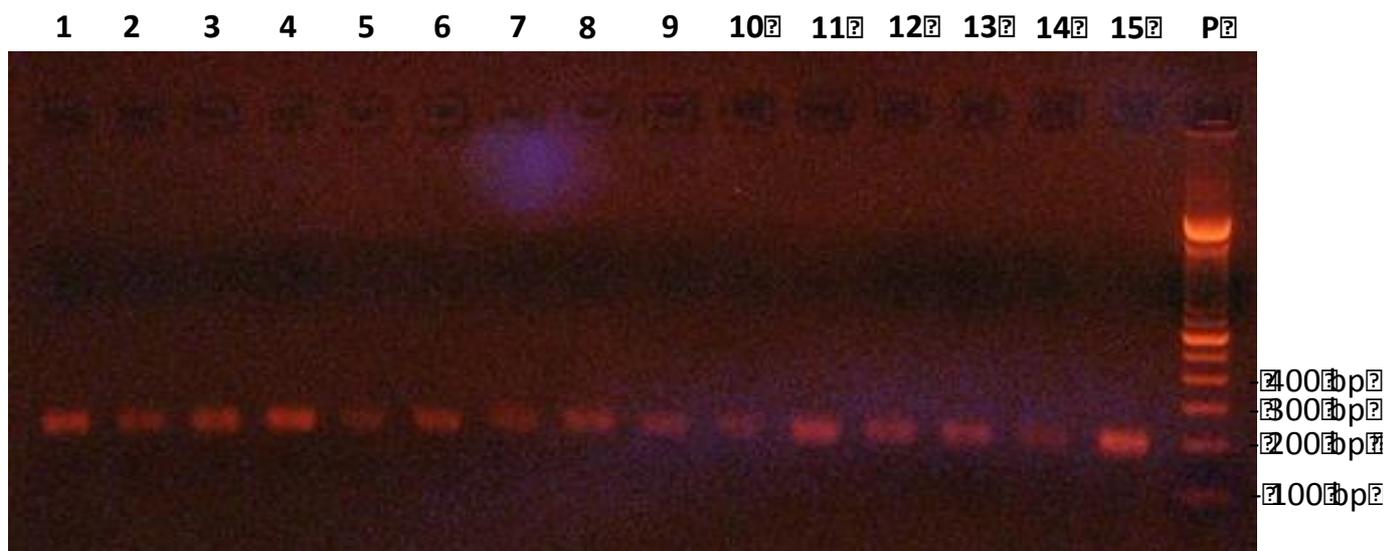
produtos amplificados na reação foi feita por eletroforese em gel de agarose. Os produtos de PCR gerados a partir da reação com os *primers* do gene Clock continham 224bp.

### 3.3.3. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS POR PCR

Para visualização dos fragmentos obtidos por PCR, géis de agarose (2%) foram carregados com 36µl do produto de PCR acrescidos de 4µL do corante de corrida Loading Dye 10x. A solução TAE 1x (TAE 50x - Tris base 242 g; ácido acético glacial 57,1 mL; EDTA - 0,5M pH 8.0 - 100 mL; H<sub>2</sub>O 1000 ml) foi utilizada como tampão de corrida. O intercalante Brometo de Etídio (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>), em uma concentração de 0,5µg/mL, foi adicionado à solução de agarose para permitir a visualização dos ácidos nucleicos em luz ultravioleta. Em todas as eletroforeses o padrão de peso molecular 100bp DNA Ladder (Invitrogen) foi incluído para comparação dos tamanhos das bandas.

Após a visualização em luz UV, as bandas obtidas foram cortadas do gel com estilete, separadas em tubos de 1.5 mL e pesadas para posterior purificação. Os fragmentos resultantes foram purificados utilizando kits de purificação de produtos de PCR “QIAquick Gel Extraction Kit” da marca QIAGEN conforme instruções do fabricante.

Após a purificação, novas corridas foram realizadas em géis de agarose (2%) com Brometo de Etídio sob as mesmas condições para verificar a presença de DNA (Figura 14).



**Figura 14.** Gel de agarose (2%) com as bandas referentes aos produtos de PCR purificados do fragmento do gene *Clock* (224bp). Os números (1-15) acima do gel identificam os indivíduos da população de Bocaina aos quais pertencia o DNA amplificado. P = padrão de 100 pb

#### 3.3.4. LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS PURIFICADOS AO VETOR DE CLONAGEM

Os fragmentos de PCR obtidos a partir dos oligos específicos foram clonados utilizando o kit “CloneJet™ PCR Cloning Kit” (Fermentas). Esse kit apresenta a seleção positiva original do clonagem vector pJET1.2/blunt. O vetor contém um gene de resistência à ampicilina e um gene letal que é interrompido pela ligação de um DNA inserido no sítio de clonagem. Após a transformação, apenas células com plasmídeos recombinantes podem se propagar. A reação de ligação continha 5µl de 2X Reaction Buffer, 0,5µl do pJET1.2/blunt Cloning Vector, 2µl do produto de PCR purificado, 2µl de água (nuclease-free) e 0,5µl de T4 DNA Ligase, formando um total de 10µl de solução final. O período de incubação foi de 5min a 22°C.

#### 3.3.5. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES:

Células quimiocompetentes DH5α foram transformadas utilizando os vetores

com as ligações. Três  $\mu\text{l}$  da reação de ligação foram adicionados a cerca de  $100\mu\text{l}$  de células de *Escherichia coli*. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada e posteriormente incubada por 30 minutos no gelo. Após a incubação, as células levaram um choque térmico de  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos e imediatamente foram colocadas no gelo por dois minutos. O meio LB líquido foi adicionado às células, as quais foram posteriormente incubadas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por uma hora. Após o período de crescimento, as células foram plaqueadas em meio de cultura sólido LB Ágar com ampicilina ( $100\mu\text{g/ml}$ ). As placas foram colocadas na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante uma noite para crescimento das colônias

### 3.3.6. INOCULAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO DAS CULTURAS

De cada placa foram selecionadas oito colônias, de forma a fornecer oito replicatas de produtos de PCR de cada indivíduo amostrado. As colônias selecionadas foram inoculadas em microplaca “deepwell” de 96 poços com  $1\text{mL}$  de meio de cultura Circle Grow (CG) líquido contendo ampicilina ( $100\mu\text{g/ml}$ ) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante uma noite em agitador (*shaker*) a 200 RPM. No dia seguinte, as culturas foram centrifugadas (4000 RPM) a  $20^{\circ}\text{C}$  em microplaca “deepwell” por 6 minutos e o sedimento celular (“*pellet*”) foi guardado em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até a mini-preparação do DNA plasmidial.

### 3.3.7. MINI PREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

A preparação do DNA plasmidial foi feita em placa de 96 poços. Primeiramente, a cada poço foram adicionados  $240\mu\text{l}$  de GET (glicose, EDTA, Tris) e as células foram ressuspensas com a pipeta. A placa foi centrifugada por 9 minutos, 4000 RPM, a  $20^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e a placa continuou invertida em papel absorvente por 5 minutos. Logo após, foram adicionados a cada poço  $80\mu\text{l}$  de GET (glicose, EDTA, Tris) e  $3\mu\text{l}$  de RNase A a  $10\text{mg/ml}$ , e as células foram ressuspensas. A suspensão de células foi transferida para a microplaca de  $250\mu\text{l}$  de polipropileno de fundo “V”. Em cada poço foram adicionados  $80\mu\text{l}$  de NaOH 0,2N/ SDS 1%. A placa foi selada com adesivo e misturada 30 vezes por inversão, centrifugada rapidamente (“spin” de até 2000 RPM) e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação,

foram adicionados a cada poço 80µl de KOAc 3 M gelado (acetato de potássio-estocado 4°C). A placa foi selada com um novo adesivo e misturada 30 vezes por inversão, incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada rapidamente (“spin” até 4000 RPM). Findando a primeira etapa, a placa foi deixada no freezer -20°C por uma noite.

No dia seguinte, após esperar a placa descongelar, a mesma foi centrifugada rapidamente (“spin” até 4000 RPM), e posteriormente incubada em estufa a 90°C por 30 minutos sem o adesivo. Após esse período, a placa foi colocada a -20°C até esfriar (com adesivo) e centrifugada por 9 minutos, 4000 RPM, 20°C. A uma placa Millipore (MAGV N22) fixada com fita adesiva a uma placa de fundo “V” de 250µl de polipropileno (placa para armazenar DNA) foi transferido todo o volume do sobrenadante. Posteriormente, a mesma foi centrifugada por 6 minutos, 4000 RPM, 20°C. A placa Millipore foi removida e descartada. Então, foi adicionado 100µl de isopropanol gelado (Merck) ao filtrado ficou na placa de fundo “V”. A mesma foi selada com adesivo e misturada 30 vezes por inversão. Após ser misturada, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugada por 45 minutos, 4000 RPM, 20°C, o sobrenadante foi descartado (invertendo a placa) e foram adicionados 200µl de etanol 70% (Merck) gelado. A placa foi selada novamente e centrifugada por 5 minutos, 4000 RPM, 20°C. O sobrenadante foi removido, imediatamente, invertendo a placa. Ainda invertida, a placa foi colocada sobre o papel absorvente e centrifugada rapidamente (“spin” até 900 RPM), a 20°C. Para que a placa secasse (virada para cima), a mesma foi encubada por 10 a 15 minutos a 60°C. Posteriormente, o DNA foi ressuscitado com 40µl de água MilliQ, a placa foi coberta com adesivo e deixada na geladeira pelo período de uma noite. No dia seguinte, a mesma foi transferida para o freezer -20°C.

### 3.3.8. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DOS INSERTOS

Para cada indivíduo, oito clones foram sequenciados para identificar os dois alelos e também para verificar possíveis erros induzidos por PCR. Os clones foram sequenciados no Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foram utilizados o sequenciador modelo ABI Prism 3730 DNA Sequencer” e o kit “ABI Prism Big Dye Terminator

Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). A composição das reações de sequenciamento está descrita na Tabela 5. As reações foram realizadas em termociclador ajustado às seguintes condições: 40 ciclos de 96°C/10seg, 50°C /5seg e 60°C /4min.

**Tabela 5.** Quantidades e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de sequenciamento.

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>
H2O milli-Q	4,0µl
Tampão para Ampli-Taq (diluidor de BigDye)	2,0µl
Oligo M13 forward (10µM)	1,0µl
Big Dye	2,0µl
DNA plasmidial (50-100ng)	1,0µl
<b>Total</b>	<b>10,0 µl</b>

Em seguida, os produtos de extensão foram precipitados colocando em cada poço da placa 40µl de isopropanol 65% (Big Dye 3.1), a temperatura ambiente, e vortexados. Deixou-se repousar a mistura por 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm, a temperatura ambiente (22-25°C). Descartou-se o sobrenadante virando num só movimento, sem sacudir (subindo e descendo a placa virada por 2 ou 3 vezes), deixou-se a placa virada sobre papel absorvente. Em seguida, foram colocados em cada poço 80µl de etanol 60%, a temperatura ambiente. A placa foi, então, centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm e descartou-se o sobrenadante repetindo o passo anterior. Posteriormente, deixou-se a placa secar a temperatura ambiente por 1 hora. A mesma foi, então, armazenada na geleira, sem congelar, a 4°C. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em formamida para a aplicação no sequenciador modelo ABI Prism 3730 DNA Sequencer.

### **3.4. Análise das sequências obtidas:**

A análise das sequências obtidas foi realizada utilizando os seguintes programas: DNASTar para edição e análise das sequências, as quais foram comparadas com os bancos de dados no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; ClustalX (THOMPSON; GIBSON, 1997) para o alinhamento das sequências; DNASP5.10.01 (ROZAS, 2009) e PROSEQ (FILATOV, 2002) para análise dos polimorfismos e a diferenciação entre as populações; DNASP5.10.01 (ROZAS, 2009) para detecção de blocos recombinantes; IM<sub>GC</sub> online ([http://hammerlab.biosci.arizona.edu/imgc\\_online.html](http://hammerlab.biosci.arizona.edu/imgc_online.html)) para a escolha do maior bloco não recombinante (WOERNER et al, 2007); JModelTest v2.1.4 (POSADA, 2008) para seleção de modelos de substituição nucleotídica utilizados na árvores de Máxima Verossimilhança e Estimativa Bayesiana. O Critério de Informação Bayesiana (BIC) foi adotado para escolher o modelo que melhor se adequa aos dados; MrBayes v.3.2.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) para as análises filogenéticas (Estimativa Bayesiana); FastGap (BORCHSENIUS, 2009) para criação da matriz binária a fim de incluir as informações de indels nas estimativas filogenéticas; FigTree v.1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) para visualização e edição das árvores geradas no MrBayes; Network (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) para construção da rede de haplótipos.

### 3.5. Parâmetros populacionais calculados no DNASP:

A caracterização da diversidade molecular observada em cada sítio coletado foi realizada a partir da estimativa dos seguintes parâmetros:

**S** = número de sítios polimórficos ou segregantes (sítios com dois ou mais nucleotídeos entre as seqüências);

**Eta** = número total de mutações;

$\pi$  = diversidade nucleotídica baseada na média das diferenças par-a-par entre as sequências. Todas as sequências são comparadas par-a-par e é calculado o número de diferenças nucleotídicas entre um par. Então, a média é feita através da soma das diferenças par-a-par dividida pelo número de pares, obtendo-se  $\pi$ . Ou seja,

$$\pi = \frac{1}{q} \sum_{i < j} x_i x_j d_{ij}, \text{ onde:}$$

$q$  = número total de alelos;

$x_i$  = frequência do alelo  $i$  na população;

$x_j$  = frequência do alelo  $j$  na população;

$d_{ij}$  = número de diferenças nucleotídicas por sítio entre os alelos  $i$  e  $j$ .

$\theta$  = diversidade nucleotídica baseada no número de sítios polimórficos.

$\theta = p_s / a_1$ , onde:

$p_s$  = número de sítios segregantes por sítio nucleotídico;

$a_1$  = número relacionado com o tamanho da amostra, onde  $a_1 = 1 + 2^{-1} + 3^{-1} + \dots + (m - 1)^{-1}$ ;

$m$  = número de seqüências randomicamente amostradas de uma população.

$\theta$  também é conhecido como parâmetro neutro porque  $\theta = 4N_e\mu$ , e segundo a teoria da

neutralidade de Kimura (1968) a variabilidade em um gene é proporcional ao produto entre o tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) e a taxa de mutações neutras ( $\mu$ ).

**Teste de Tajima** = calcula o teste estatístico D proposto por TAJIMA (1989) para testar a teoria neutra de evolução molecular (KIMURA, 1983). O teste é baseado no fato de que sob o modelo neutro, as estimativas  $\pi$  e  $\theta$  devem apresentar aproximadamente o mesmo valor. Se os dois valores divergem entre si dentro do esperado no caso de variação aleatória, a hipótese nula de neutralidade não é rejeitada (não há diferença significativa). Caso difiram mais do que o esperado pelo acaso, a hipótese nula de neutralidade é rejeitada. Dessa forma, a partir da relação entre  $\pi$  e  $\theta$ , o teste pode indicar a ocorrência de seleção purificadora ou expansão populacional, quando  $\pi < \theta$ , ou de seleção diversificadora ou balanceadora, quando  $\pi > \theta$ .

### 3.6. Parâmetros interpopulacionais calculados no ProSeq

$F_{ST}$  = grau de diferenciação genética. Pode ser calculado da seguinte maneira:

$$F_{ST} = \pi_T - \pi_S / \pi_T$$

Onde a diversidade nucleotídica média ( $\pi_S$ ) dentro das populações pode ser estimada por:

$$\pi_S = \sum_{k=1}^s w_k \pi_k, \text{ onde:}$$

$s$  = número de subpopulações;

$w_k$  = tamanho relativo da subpopulação  $k$  ( $w_k = 1 / s$ );

$\pi_k$  = estimativa de  $\pi$  na subpopulação  $k$ .

A diversidade nucleotídica para toda a população ( $\pi_T$ ) pode ser estimada por:

$$\pi_T = \frac{1}{q} \sum_{i,j} x_i x_j d_{ij}, \text{ onde:}$$

## q - 1

$x_i$  = frequência média do alelo  $i$  em toda a população;

$q$  = número total de alelos examinados.

$D_{xy}$  = divergência bruta entre duas populações, ou seja, média das diferenças par-a-par entre as sequências das duas populações (TAKAHATA; NEI, 1985; WAKELEY, 1996).

$$D_{xy} = \sum_{ij}^q x_i y_j d_{ij}, \text{ onde:}$$

$q$  = número de diferentes alelos;

$x_i$  = frequência do alelo  $i$  na população X;

$y_j$  = frequência do alelo  $j$  na população Y;

$d_{ij}$  = substituições nucleotídicas entre o alelo  $i$  da população X e o alelo  $j$  da Y.

$D_a$  = divergência líquida entre duas populações, ou seja, é a divergência bruta ( $D_{xy}$ ) menos a média dos “ $\pi$ ” das duas populações:

$$D_a = D_{xy} - (\pi_x + \pi_y) / 2$$

$\pi_x, \pi_y$  = número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências da população X e Y, respectivamente.

#### 4. RESULTADOS:

As coletas de *An. cruzii* foram realizadas em todos os locais previstos para este estudo em excursões realizadas em fevereiro de 2013. Após a extração do DNA, as reações de PCR foram realizadas. Diferentes parâmetros foram testados, como diferentes temperaturas de anelamento, diferentes concentrações de DNA genômico e diferentes quantidades da enzima. Esses experimentos foram realizados nos laboratórios de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos da UFRJ e no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores da FIOCRUZ. O número de indivíduos de cada população dos quais se conseguiu obter amostras através das ampliações dos genes *Clock* estão relacionados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Número de amostras de DNA amplificadas por PCR.

Marcador	Tinguá	Guapimirim	Sana	Itatiaia	Bocaina
<i>Clock</i>	10	10	10	12	16

A partir dos produtos de PCR, obteve-se duas sequências de DNA por indivíduo de cada marcador (referente aos dois alelos), conforme explicitado na seção Material e Métodos. O número de sequências obtidas para o gene *Clock* estão listadas na Tabela 7, somadas às sequências de Florianópolis (SC) e Itatiaia (RJ) previamente publicadas por RONA, CARVALHO-PINTO & PEIXOTO (2010, 2013). As sequências de Florianópolis foram introduzidas para comparação com as populações do estado do Rio de Janeiro.

**Tabela 7.** Número de sequências de DNA utilizadas:

Marcador	Tinguá	Guapimirim	Sana	Itatiaia	Bocaina	Florianópolis
<i>Clock</i>	20	20	20	40	32	24

#### 4.1. Análise de polimorfismos e diferenciação entre as populações:

Para as seis populações analisadas, foram estimados os seguintes parâmetros populacionais (Tabela 8): número de sítios polimórficos (**S**), número total de mutações (**Eta**), diversidade nucleotídica baseado no número de diferenças par-a-par ( $\pi$ ) e baseado no número total de mutações ( $\theta$ ). Foi realizado também um teste de neutralidade (TAJIMA, 1989) para testar a hipótese de evolução neutra das sequências. Nenhum dos valores obtidos para todas as populações foi estatisticamente significativo ( $p < 0.01$ ) para rejeitar a hipótese nula de neutralidade. Dessa forma, não há evidência de que haja seleção natural agindo sobre as sequências estudadas em nenhuma das populações. As populações de Tinguá e Guapimirim se mostraram as mais polimórficas, contendo o maior número de sítios polimórficos ( $S = 21$ ) e a maior diversidade nucleotídica ( $\pi > 0.027$ ). A população de Itatiaia é a menos polimórfica, apresentando diversidade nucleotídica de 0.0155.

Foi gerado, a partir do alinhamento original, um bloco ótimo de sequências não recombinantes. O bloco não-recombinante (NR) possui 111 sequências com 164 bp cada. A posição do bloco não recombinante (NR) no alinhamento original vai do nucleotídeo 44 ao 210 e as sequências recombinantes que foram removidas na formação deste bloco foram: Boc05a, Boc05b, Boc07b, Boc08b, Boc18a, Boc18b, Boc19a, Boc19b, Boc23b, Boc24a, Boc24b, Boc25a, Boc25b, Boc26a, Boc26b, Boc28a, Boc28b, Boc29a, Boc29b, Boc30a, Boc30b, Gua10Fa, Ita01Ta Ita01Tb, Ita02Ta, Ita02Tb, Ita03a, Ita06b, Ita07b, Ita16a, Ita16b, Ita17a, Ita17b, Ita18a, Ita18b, Ita19a, Ita19b, Sana04xa, Sana06a, Sana40a, Tin04Jb, Tin05Nb, Tin05Qb, Tin05Ta e Tin05Hb.

Os cálculos realizados a partir do bloco não recombinante resultaram em valores semelhantes ao do bloco total de sequências. A diferença mais acentuada foi observada na população da Serra da Bocaina: a diversidade nucleotídica ( $\pi = 0.0529$ ) do bloco não recombinante foi a maior observada dentre as populações amostradas, indicando maior polimorfismo das sequências analisadas. O teste de Tajima não apresentou valores significativos para rejeitar a hipótese de neutralidade das sequências.

**Tabela 8.** Polimorfismos observados nas seis populações de *An. cruzii* utilizadas neste estudo utilizando o gene Clock. Os valores entre parênteses foram calculados a partir do conjunto de sequências não recombinantes (NR).

Localidade	<i>n</i>	<i>S</i>	<i>Eta</i>	$\pi$	$\theta$	Tajima's <i>D</i>
1. Florianópolis	24(24)	10(9)	10(9)	0.01774(0.0268)	0.01717(0.0241)	0.11242(0.3735)
2. Bocaina	32(11)	15(10)	16(11)	0.02427(0.0529)	0.02943(0.0408)	-0.55398(1.2799)
3. Itatiaia	40(25)	16(12)	18(14)	0.01554(0.0259)	0.02939(0.0398)	-1.53938(-1.2085)
4. Tinguá	20(15)	21(13)	23(14)	0.02915(0.0369)	0.04156(0.0430)	-1.14811(-0.5619)
5. Guapimirim	20(19)	21(13)	22(15)	0.02750(0.0354)	0.03975(0.0429)	-1.18112(-0.6514)
6. Sana	20(17)	15(5)	15(5)	0.01617(0.0100)	0.02745(0.0150)	-1.51743(-1.0902)

A Tabela 9 mostra os valores de  $F_{ST}$  par-a-par entre as populações. Este índice indica o grau de diferenciação genética entre as seis populações estudadas. Os maiores valores de  $F_{ST}$  foram encontrados nas comparações realizadas com a população de Itatiaia ( $F_{ST} > 0.67$ ). Os valores encontrados nas comparações entre as diferentes populações (exceto Itatiaia) com a população da Bocaina também foram altos e significativos ( $F_{ST}$  variando entre 0.59 a 0.64). No entanto, quando Itatiaia e Bocaina foram comparadas entre si, não apresentaram diferenciação genética significativa ( $P(F_{ST}) > 0.05$ ).

Esta tabela também mostra a média de substituições nucleotídicas por sítios entre as populações de *An. cruzii*.  $D_{xy}$  é a medida de divergência entre as sequências das duas populações, baseado no número de diferenças par-a-par, que não exclui a variabilidade intra-populacional, ou seja, é a divergência bruta.  $Da$  é um índice que mede apenas a diferença entre as populações, ou seja, a diferença líquida. Os maiores valores de  $Da$  também foram encontrados nas comparações realizadas com as populações de Itatiaia e Bocaina, o que confirma as medidas de  $F_{ST}$ . A Tabela 9 também indica o número de polimorfismos compartilhados ( $Ss$ ) e de diferenças fixas ( $Sf$ ) entre as populações de *An. cruzii*. Utilizando o fragmento total, as únicas diferenças fixas foram encontradas nas comparações com a população de Itatiaia.

Também foram calculados os valores dos parâmetros de divergência entre as populações utilizando o conjunto de sequências não recombinantes. Os resultados

obtidos foram, em sua maioria, semelhantes aos da análise do bloco total. A única diferença acentuada foi observada na comparação entre as populações de Bocaina e Itatiaia: enquanto a análise do conjunto integral de sequências forneceu um  $F_{ST}$  de 0.034 ( $P(F_{ST})=0.0570$ ), sugerindo baixa estruturação, a análise do conjunto de sequências não recombinantes forneceu um  $F_{ST}$  de 0.449 ( $P(F_{ST})=0.000$ ), indicando alta estruturação entre as duas populações.

**Tabela 9.** Diferenciação genética entre as seis populações de *An. cruzii* utilizadas neste estudo utilizando o gene *Clock*. As significâncias nos valores de  $F_{ST}$  foram avaliados com 1000 permutações. Os *indels* foram ignorados na análise. Os valores entre parênteses foram calculados a partir do conjunto de sequências não recombinantes (NR).

<b>Localidades:</b>	$F_{ST}$	<b>P</b> ( $F_{ST}$ )	<b>Dxy</b>	<b>Da</b>	$S_s$	<b>Sf</b>
1. Florianópolis x Guapimirim	0.0010(0.0114)	0.3780(0.2790)	0.0266(0.0267)	0.0000(0.0003)	6(4)	0(0)
2. Tinguá x Florianópolis	0.0034(0.1113)	0.3500(0.3130)	0.0253(0.0273)	0.0001(0.0003)	06(4)	0(0)
3. Tinguá x Guapimirim	0.0081(0.0043)	0.2930(0.3910)	0.0270(0.0314)	0.0002(0.0001)	11(5)	0(0)
4. Sana x Tinguá	0.0321(0.0507)	0.0960(0.1370)	0.0212(0.0235)	0.0007(0.0012)	05(4)	0(0)
5. Bocaina x Itatiaia	0.0344(0.4498)	0.0570(0.0000)	0.0397(0.0644)	0.0014(0.0290)	20(7)	0(0)
6. Sana x Guapimirim	0.0576(0.0873)	0.0370(0.0240)	0.0303(0.0239)	0.0017(0.0021)	06(2)	0(0)
7. Sana x Florianópolis	0.1125(0.1113)	0.0010(0.0120)	0.0180(0.0196)	0.0020(0.0022)	02(2)	0(0)
8. Bocaina x Guapimirim	0.5911(0.4901)	0.0000(0.0000)	0.0955(0.0785)	0.0565(0.0385)	07(0)	0(1)
9. Bocaina x Tinguá	0.5936(0.4829)	0.0000(0.0000)	0.0927(0.0784)	0.0550(0.0379)	06(0)	0(1)
10. Bocaina x Sana	0.6152(0.5386)	0.0000(0.0000)	0.0899(0.0673)	0.0553(0.0362)	06(0)	0(1)
11. Bocaina x Florianópolis	0.6437(0.5254)	0.0000(0.0000)	0.0916(0.0751)	0.0589(0.0395)	01(0)	0(1)
12. Itatiaia x Guapimirim	0.6798(0.6500)	0.0000(0.0000)	0.1009(0.0749)	0.0686(0.0487)	05(0)	3(1)
13. Itatiaia x Tinguá	0.6853(0.6427)	0.0000(0.0000)	0.0982(0.0748)	0.0673(0.0481)	05(0)	3(1)
14. Itatiaia x Sana	0.7087(0.7294)	0.0000(0.0000)	0.0956(0.0636)	0.0678(0.0464)	05(0)	3(1)
15. Itatiaia x Florianópolis	0.7336(0.6947)	0.0000(0.0000)	0.0908(0.0715)	0.0712(0.0497)	00(0)	3(1)

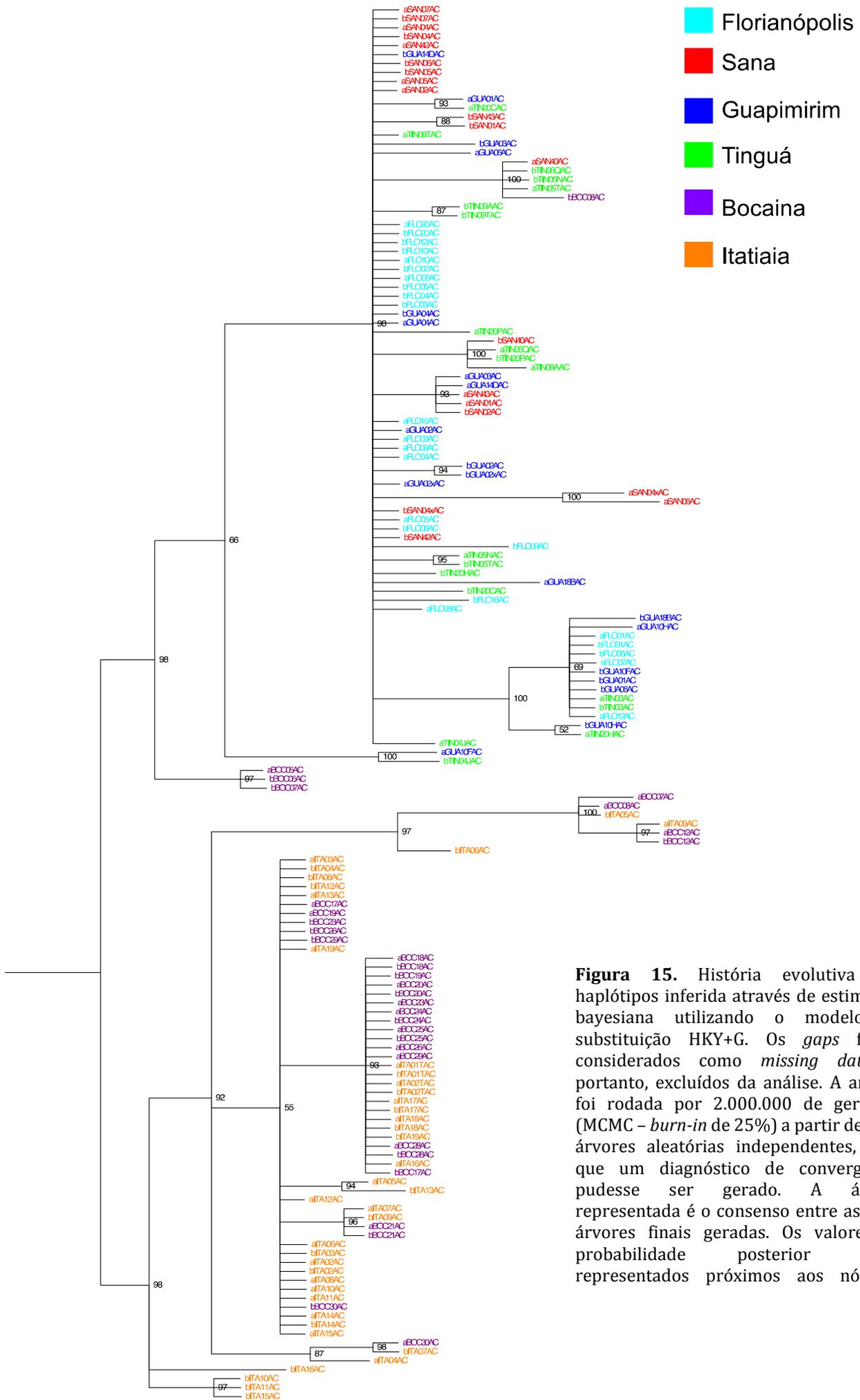
## 4.2. Análise Filogenética

Para testar as hipóteses de diferenciação genética e reconstruir a história evolutiva dos haplótipos obtidos nas diferentes localidades, foram geradas árvores evolutivas baseadas em Estimativa Bayesiana sob diferentes parâmetros.

A Figura 15 representa a história evolutiva dos haplótipos inferida através de Estimativa Bayesiana utilizando o modelo de substituição HKY+G. Nessa árvore, foram incluídas as sequências de Florianópolis para comparação com as amostradas no estado do Rio de Janeiro e os gaps foram desconsiderados da análise (o *default* do software MrBayes trata os gaps como missing data). A árvore gerada sob essas condições mostra uma grande separação das sequências provenientes de Bocaina e Itatiaia em relação às demais. Há apenas uma exceção (bBOC08AC, da Bocaina), a qual se apresentou bastante divergente e se agrupou com as sequências provenientes de Florianópolis, Guapimirim, Tinguá e Sana. Os valores de probabilidade posterior dos ramos principais contendo as sequências de Bocaina+Itatiaia são de 98 e 97%. O ramo contendo as sequências dos indivíduos das demais localidades (e um de Bocaina - bBOC08AC) também apresentou probabilidade posterior de 98%. Tal árvore é consistente com a hipótese gerada a partir dos dados de  $F_{ST}$ ,  $D_{xy}$  e  $D_a$  de que Bocaina e Itatiaia (B+I) e Tinguá, Sana e Guapimirim (T+S+G) formam grupos bastante diferenciados entre si. É possível observar, ainda, que os haplótipos provenientes dos indivíduos de Sana, Guapimirim e Tinguá agrupam com Florianópolis, e vários haplótipos são compartilhados entre essas populações.

Embora os haplótipos de Itatiaia e Bocaina agrupem entre si, tal clado não aparece como monofilético na árvore em questão. Os haplótipos provenientes dessas populações não compartilham um ancestral comum exclusivo entre si, aparecendo em dois cladogramas principais: um mais distante e um mais próximo dos provenientes de Tinguá, Sana, Guapimirim e Florianópolis, ambos com probabilidade posterior de 98%. Tal árvore sugere, portanto, a presença de dois grupos de haplótipos de Itatiaia e Bocaina: um geneticamente mais distinto dos demais e um mais relacionado às demais populações (T+S+G). No entanto, apesar da divergência apontada na árvore, existe um indivíduo (BOC07AC) que possui um haplótipo de cada grupo. A presença de um indivíduo da Bocaina (BOC08AC) portando um haplótipo geneticamente semelhante aos de indivíduos de Tinguá, Sana e Guapimirim levanta duas hipóteses: ou a presença

de tal haplótipo é consequência da manutenção de um polimorfismo ancestral, ou é uma evidência de que há ou houve fluxo gênico entre as duas localidades em um período recente. A ausência de mais haplótipos compartilhados, no entanto, demonstra que, caso haja fluxo gênico e eventos de hibridização entre indivíduos de I+B e T+S+G, tais eventos não são frequentes ou há seleção negativa contra os híbridos.

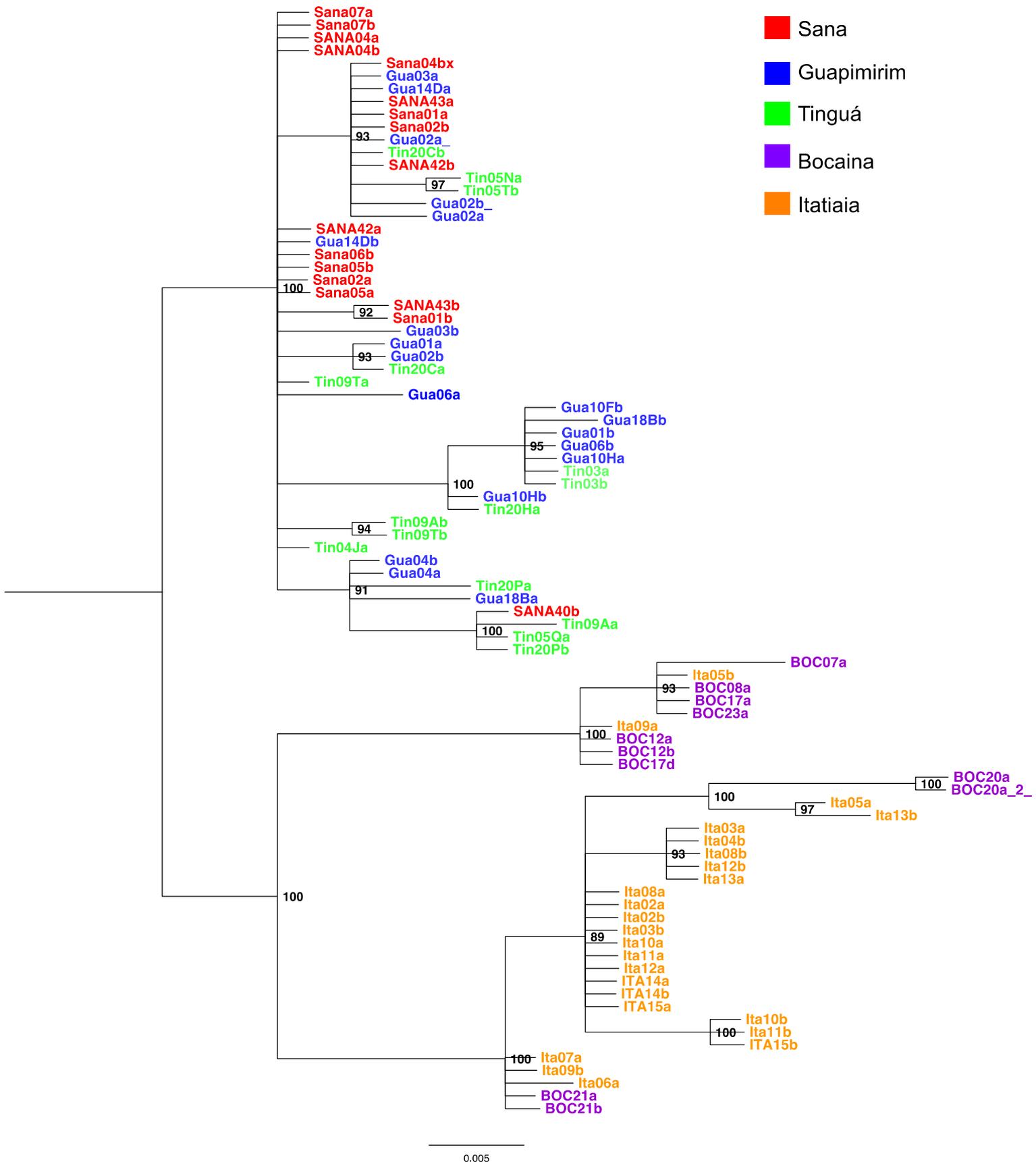


**Figura 15.** História evolutiva dos haplótipos inferida através de estimativa bayesiana utilizando o modelo de substituição HKY+G. Os *gaps* foram considerados como *missing data* e, portanto, excluídos da análise. A análise foi rodada por 2.000.000 de gerações (MCMC - *burn-in* de 25%) a partir de duas árvores aleatórias independentes, para que um diagnóstico de convergência pudesse ser gerado. A árvore representada é o consenso entre as duas árvores finais geradas. Os valores de probabilidade posterior estão representados próximos aos nós da

A fim de refinar a análise apresentada, uma nova filogenia foi gerada usando o bloco não recombinante, tendo em vista que a utilização de dados de sequências recombinantes em filogenias podem resultar, em alguns casos, em estimativas que divergem muito da filogenia real (POSADA; CRANDALL, 2002). Nessa segunda análise, a informação contida nos *gaps* foi incluída na análise através de sua codificação em matriz binária utilizando o programa FastGap. Além disso, as sequências provenientes de Florianópolis foram excluídas da análise para que se pudesse ter uma visão mais clara da relação entre os haplótipos coletados no estado do Rio de Janeiro. O resultado de tal análise é apresentado na Figura 16.

A árvore da Figura número 16 corrobora a hipótese de que os indivíduos provenientes de Itatiaia e Bocaina apresentam grande divergência em relação aos indivíduos coletados nas demais localidades do estado do Rio de Janeiro (Sana, Tinguá e Guapimirim). Nessa árvore, em oposição à apresentada na Figura 15, tal divergência é mais acentuada: ambos os clados (Itatiaia+Bocaina e Sana+Tinguá+Guapimirim) são monofiléticos (probabilidade posterior de 100%), com os haplótipos de cada um compartilhando ancestrais comuns exclusivos entre si. Isso indica que as duas linhagens estão bastante diferenciadas, não havendo presença de haplótipos compartilhados entre elas. A árvore demonstra ainda que há duas linhagens divergentes ocorrentes em Itatiaia e Bocaina, com grande diferenciação entre si. No entanto, a presença de um indivíduo híbrido (Ita05, contendo um haplótipo proveniente de cada linhagem) denota que ou não há isolamento completo entre as linhagens, ou que tal isolamento é mais recente, de maneira que alguns polimorfismos ancestrais ainda são compartilhados.

**Figura 16.** História evolutiva dos haplótipos (blocos não recombinantes) inferida através de estimativa bayesiana utilizando o modelo de substituição HKY+G. As informações dos *gaps* foram incluídas na análise através de sua codificação em matriz binária. A análise foi rodada por 2.000.000 de gerações (MCMC – *burn-in* de 25%) a partir de duas árvores aleatórias independentes, para que um diagnóstico de convergência pudesse ser gerado. A árvore representada é o consenso entre as duas árvores finais geradas. Os valores de probabilidade posterior estão representados próximos aos nós da árvore.



### 4.3. Rede de Haplótipos

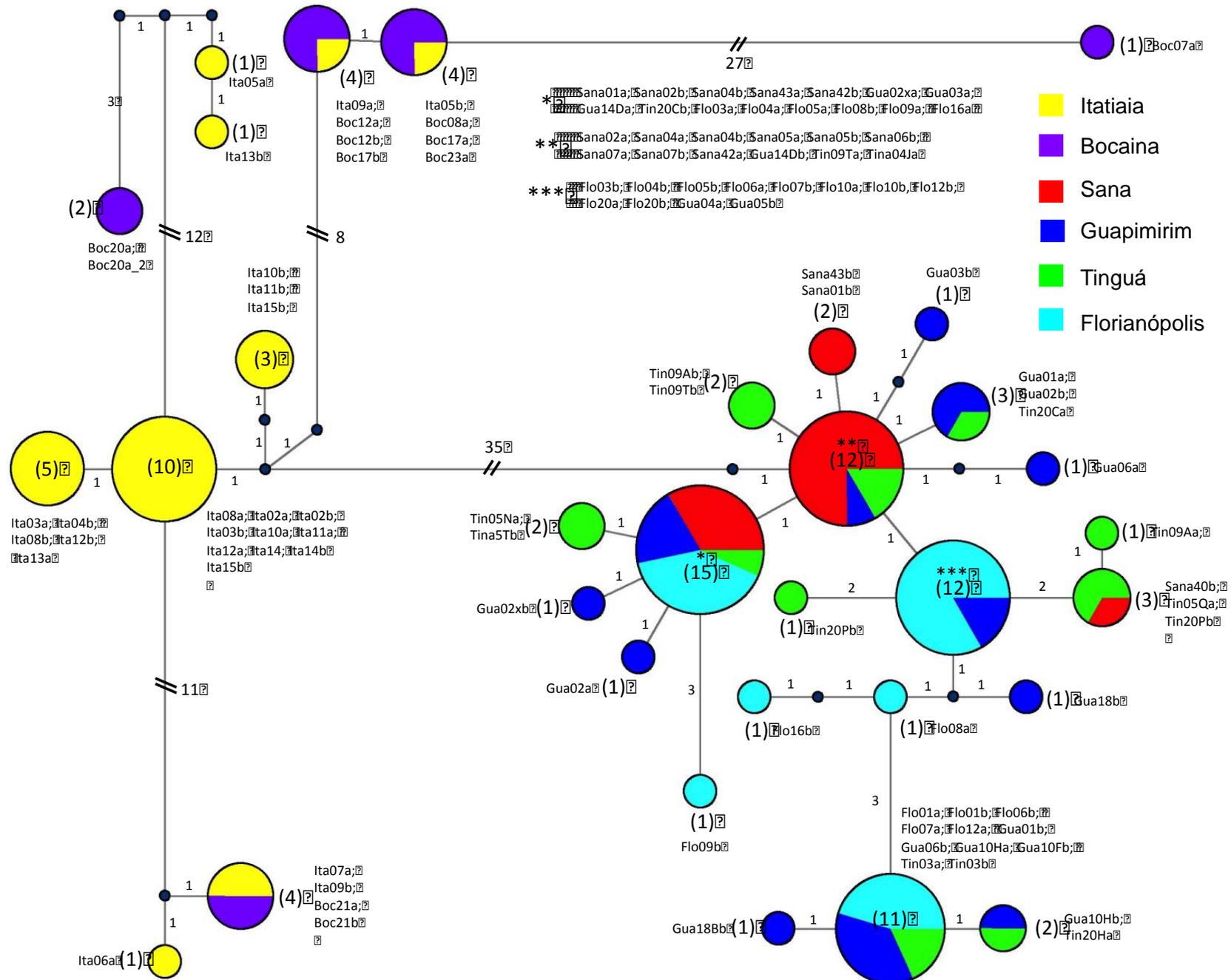
As redes de haplótipos, obtidas utilizando os blocos não recombinantes das sequências de DNA utilizadas neste estudo, corroboram a diferenciação observada nos cálculos de  $F_{ST}$  e na árvore filogenética.

Duas redes foram geradas no programa Network a fim de elucidar a relação entre os haplótipos: uma considerando os gaps como um 5º estado de nucleotídeo (Figura 17) e uma considerando-os como *missing data* (Figura 18). Embora as redes obtidas diverjam em relação à distância observada entre grupos de haplótipos, ambas forneceram a mesma topologia, corroborando a hipótese de que ao menos duas linhagens independentes ocorrem no estado do Rio de Janeiro.

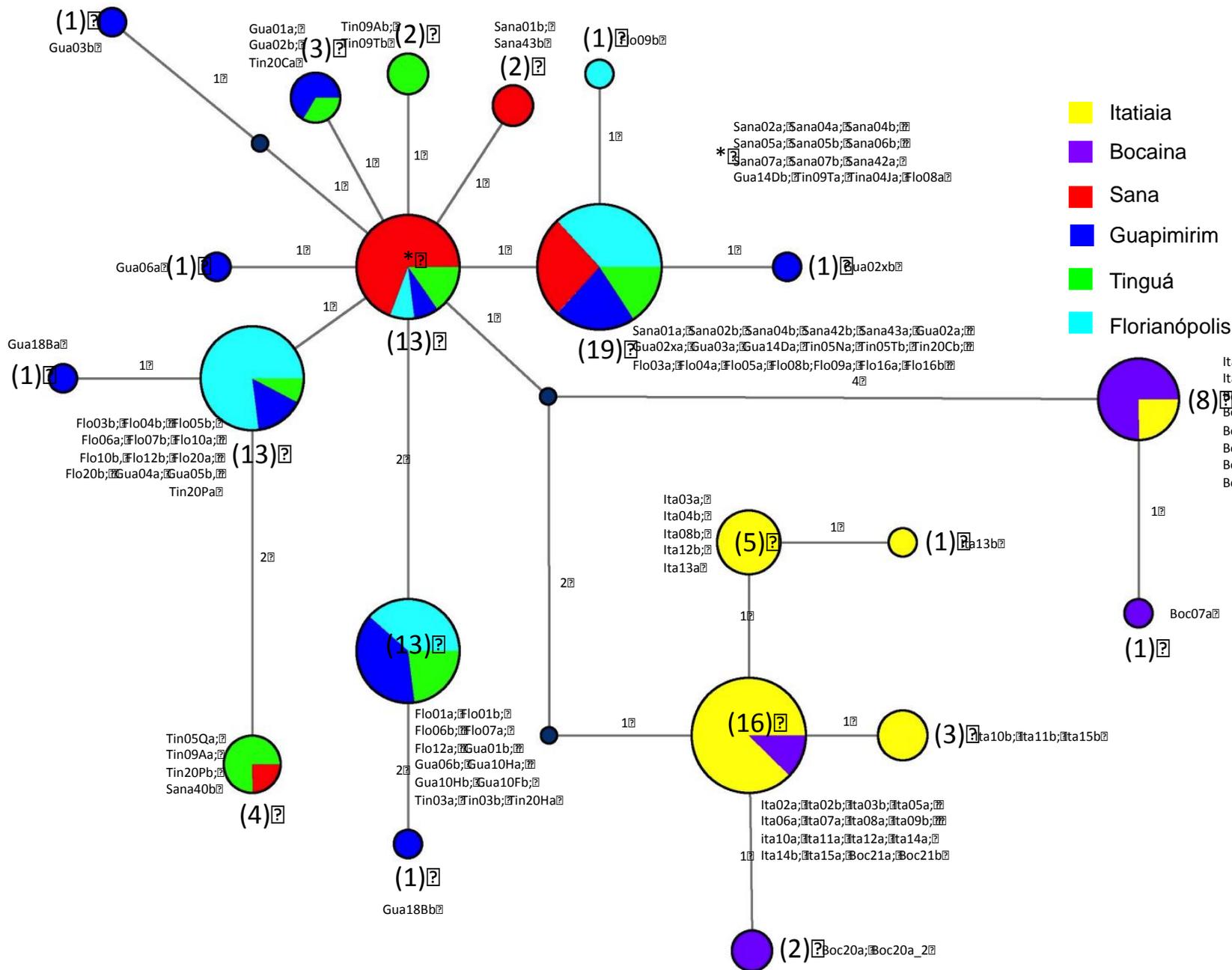
Nessas redes, pode-se observar grande separação entre as populações de Itatiaia e Bocaina em relação às populações de Tinguá, Guapimirim, Sana e Florianópolis. A presença de haplótipos compartilhados se dá apenas dentro de cada um dos grupos (B+I / T+S+G+F), indicando ausência de fluxo gênico e não compartilhamento de polimorfismos ancestrais entre as duas linhagens, o que denota que houve tempo suficiente desde a separação das duas para que tais haplótipos se fixassem.

As duas redes evidenciam ainda a separação da linhagem ocorrente em Itatiaia e Bocaina em duas, conforme sugerido pela árvore da Figura 16 e pelos valores de  $F_{ST}$  calculados entres os blocos de sequências não recombinantes. No entanto, tal separação não parece ser geográfica, pois apesar da distância entre os haplótipos das duas linhagens, eles ocorrem nas duas localidades.

**Figura 17.** Rede de Haplótipos de sequências do gene *Clock* inferida por Median-Joining no programa Network v4.6. Os *gaps* foram considerados um 5º estado nucleotídico. Cálculos pós-processamento foram realizados sob o critério de máxima parcimônia para procurar a árvore com menor número de passos. Cada círculo representa um haplótipo diferente com tamanhos proporcionais à sua relativa frequência. Os números entre parênteses indicam a quantidade de sequências de cada haplótipo. Cada cor representa uma localidade amostrada. Os pontos escuros representam haplótipos intermediários não amostrados. O número de substituições nucleotídicas entre dois haplótipos está indicado no traço que os liga. Os riscos perpendiculares cortando uma ligação entre dois haplótipos indica que tal linha foi encurtada manualmente para que se adequasse melhor ao gráfico, não estando, portanto, proporcional ao número de substituições nucleotídicas observadas.



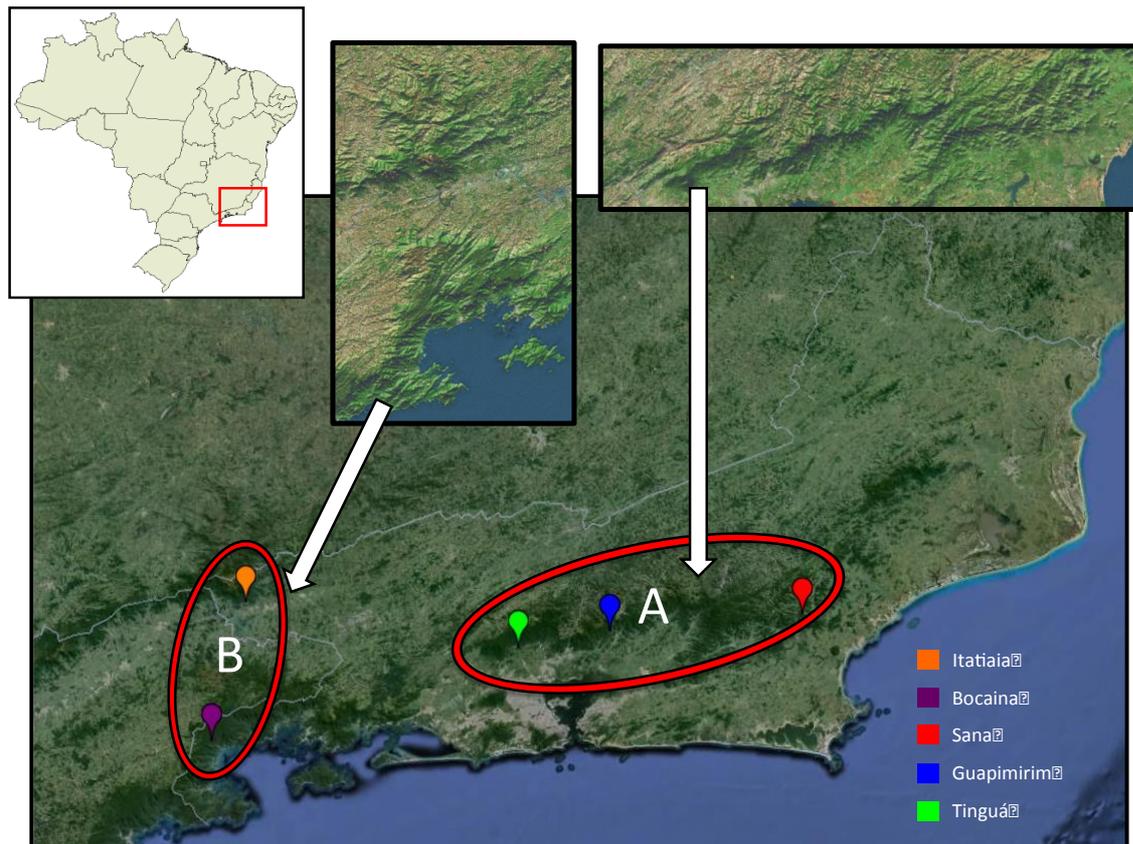
**Figura 18.** Rede de Haplótipos de sequências do gene *Clock* inferida por Median-Joining no programa Network v4.6. Os *gaps* foram considerados como *missing data* e, portanto, excluídos da análise. Cálculos pós-processamento foram realizados sob o critério de máxima parcimônia para procurar a árvore com menor número de passos. Cada círculo representa um haplótipo diferente com tamanhos proporcionais à sua relativa frequência. Os números entre parênteses indicam a quantidade de sequências de cada haplótipo. Cada cor representa uma localidade amostrada. Os pontos escuros representam haplótipos intermediários não amostrados. O número de substituições nucleotídicas entre dois haplótipos está indicado no traço que os liga.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Diversidade de *An. cruzii* no Rio de Janeiro:

Os dados apresentados mostram grande diferenciação entre as populações de Bocaina e Itatiaia e as populações de Florianópolis, Tinguá, Guapimirim e Sana. Embora a distância geográfica induza *a priori* à ideia de que haveria maior divergência da população de Florianópolis em relação às demais, esta apresentou baixa estruturação quando comparada às populações de Tinguá, Guapimirim e Sana, as quais estão situadas na face litorânea do complexo de montanhas da Serra do Mar. Itatiaia, situada na Serra da Mantiqueira e Bocaina, situada na Serra do Mar (na face voltada para o Vale do Paraíba), por sua vez, mostraram-se bastante diferenciadas das demais. Dessa forma, pode-se inferir a presença de ao menos dois grupos geneticamente distintos no estado do Rio de Janeiro, os quais serão aqui tratados como formas A (ocorrente em Tinguá, Guapimirim e Sana) e B (ocorrente em Bocaina e Itatiaia) (Figura 19).

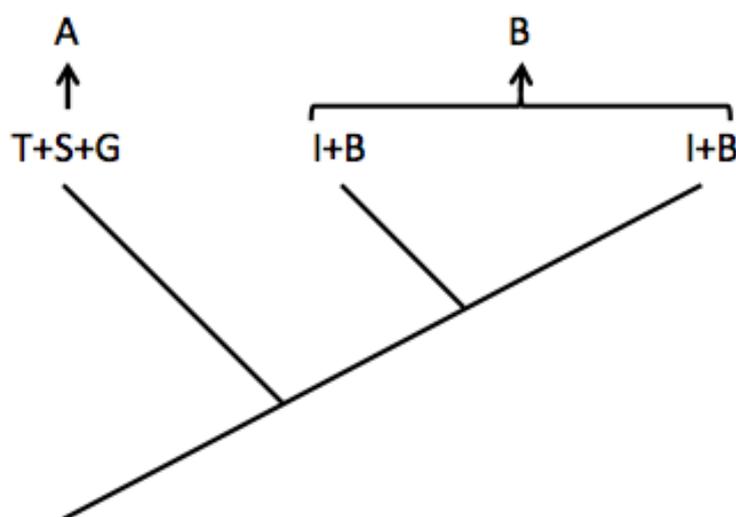


**Figura 19.** Ao menos duas formas geneticamente distintas (A e B) ocorrem no estado do Rio de Janeiro com diferentes distribuições. A forma A é encontrada na vertente costeira da Serra do Mar (Sana, Guapimirim e Tinguá) e a forma B é encontrada no planalto da Serra da Bocaina e na Serra da Mantiqueira (Itatiaia).

Os resultados obtidos a partir do bloco não recombinante sugerem também a ocorrência de duas linhagens em processo de diferenciação incipiente ocorrendo dentro da forma B, já que as sequências de Bocaina e Itatiaia não aparecem randomicamente distribuídas na árvore filogenética (Figura 16) nem na rede de haplótipos (Figura 18). Apesar do alto valor de  $F_{ST}$  (0.449;  $P=0.0000$ ) encontrado entre as sequências não recombinantes provenientes da Bocaina e de Itatiaia, o que sugere estruturação entre as populações, aparentemente os haplótipos pertencentes às duas linhagens incipientes encontradas dentro da forma B ocorrem em ambas as localidades. A princípio, uma dessas linhagens incipientes possui a maioria dos seus haplótipos provenientes da Bocaina e a outra possui mais haplótipos provenientes de Itatiaia (Figura 16). Apesar da diferenciação, tal separação parece ser recente, tendo em vista a presença de indivíduos híbridos (Ita05 e Ita09) portando haplótipos de ambas as linhagens. Esse fato denota que não há isolamento reprodutivo completo entre as mesmas, embora

aparentemente esteja ocorrendo um processo de diferenciação recente.

Os resultados aqui apresentados sugerem a presença de ao menos duas linhagens diferenciadas no estado do Rio de Janeiro: **A**, ocorrendo em Tinguá, Sana e Guapimirim e **B**, ocorrendo em Itatiaia e na Bocaina. A forma A parece ser a mesma que ocorre em Florianópolis (SC), enquanto a B é bastante diferenciada desta. Além disso, pode-se observar a divergência incipiente de duas linhagens —  $B_1$  e  $B_2$  — dentro de B, embora tal separação não seja tão bem marcada a partir dos dados de sequências do gene *Clock* (Figura 20).



**Figura 20.** Ao menos duas formas bastante diferenciadas (A e B) ocorrem no estado do Rio e Janeiro. Análises do bloco não recombinante sugerem uma separação incipiente da forma B em duas linhagens ( $B_1$  e  $B_2$ ).

Os resultados obtidos são condizentes com RONA, CARVALHO-PINTO & PEIXOTO (2010, 2013), que haviam sugerido a ocorrência de duas espécies crípticas simpátricas — diferentes da encontrada em Florianópolis — em Itatiaia a partir de uma análise *multilocus*. Além disso, o fato da forma A encontrada em Tinguá ser geneticamente igual à encontrada em Florianópolis corrobora os resultados de CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004), os quais, a partir de uma análise de isoenzimas, concluíram não haver diferenças significativas entre uma população de Nova Iguaçu (onde fica Tinguá) e uma de Florianópolis.

Diversas hipóteses foram propostas para explicar a origem da exuberante biodiversidade das florestas tropicais. Na Mata Atlântica, um dos cinco maiores *hot*

*spots* de biodiversidade do planeta (CÂMARA, 2003; MITTERMEIER et al., 2004; MYERS et al., 2000; ZACHOS; HABEL, 2011), aparentemente um conjunto de fatores levou à diversificação acentuada em diversos táxons. Muitos eventos podem ter levado ao isolamento de populações ao longo do tempo histórico — como a ocorrência de rios que podem representar barreiras ao fluxo gênico (WALLACE, 1852), a atividade tectônica que moldou a topografia acidentada da Mata Atlântica (PETRI AND FULFARO 1983; RICCOMINI ET AL. 1989; CABANNE ET AL. 2008) e o isolamento de populações em refúgios florestais gerados em períodos de mudanças climáticas ocorridas no Pleistoceno (BEHLING, 2002; AB’SABER, 1979; CARNAVAL & MORITZ, 2008; CARNAVAL et al., 2009). Além disso, a Mata Atlântica apresenta grande variação altitudinal, topográfica, longitudinal e latitudinal, o que resulta em grande variação climática e diferentes fitofisionomias ao longo de sua distribuição e provê uma grande diversidade de habitats disponíveis, favorecendo a adaptação local (CÂMARA 2003; RIBEIRO et al. 2009).

A explicação para os padrões de distribuição das linhagens A e B de *An. cruzii* aqui encontrados são discutidos adiante sob a luz de duas hipóteses. A primeira delas, chamada aqui de hipótese de especiação alopátrica (seção 5.2), envolve a ocorrência de barreiras geográficas que teriam isolado as duas linhagens e permitido o isolamento reprodutivo e conseqüente divergência genética. A segunda, chamada de hipótese de especiação parapátrica (seção 5.3), explica a divergência genética de *An. cruzii* como fruto de uma seleção disruptiva ocasionada pela preferência de diferentes populações ancestrais a diferentes condições observadas ao longo dos gradientes ambientais da Mata Atlântica.

Embora sigam linhas diferentes de argumentação e se baseiem em diferentes evidências, as duas hipóteses não são conflitantes e é possível que o processo que levou à diferenciação aqui observada tenha sido ocasionado por elementos apresentados em ambas. Tendo em vista que o processo resultante na diferenciação de táxons na Mata Atlântica em geral não é decorrente de apenas um evento de vicariância ou mudança climática (COSTA, 2003), explicações alternativas se complementam na compreensão dos padrões observados. Sendo assim, os argumentos são aqui apresentados como uma forma de mostrar quais evidências suportam cada uma das hipóteses, pretendendo, dessa maneira, estimular futuros estudos que as possam testar a fim de obter conclusões mais refinadas sobre as causas da diversidade atual.

Após essa discussão, retorna-se, na seção 5.4, ao problema da conceituação e delimitação de espécies para discutir se A e B devem ou não ser consideradas espécies diferentes. Concluindo, são propostas futuras medidas para resolução dessa questão.

## 5.2. Hipótese de Especiação Alopátrica:

RONA, CARVALHO-PINTO; PEIXOTO (2013) estimaram, utilizando uma abordagem *multilocus*, o tempo de diferenciação e parâmetros de migração — com o objetivo de detectar a ocorrência de fluxo gênico — entre linhagens de *An. cruzii* ocorrentes em Itatiaia (RJ) e em Florianópolis (SC), no sul do Brasil. Neste trabalho, encontraram grande diferenciação entre os indivíduos coletados nas duas localidades e estimaram o tempo de divergência das linhagens entre 510 e 620 mil anos atrás. Além disso, os autores não encontraram nenhum indício de fluxo gênico recente, indicando que as duas linhagens estão sexualmente isoladas. Tais estimativas levaram os autores à conclusão de que os ciclos de glaciações e interglaciações ocorridos no Pleistoceno (~2,5Ma-0,01Ma), foram importantes no processo que levou à diferenciação das linhagens ocorrentes nas duas localidades. Tendo em vista a homogeneidade da forma A identificada neste estudo em relação à população de Florianópolis (valores de  $F_{ST}$  variando de 0.001 a 0.112), pode-se inferir que o evento responsável pela diferenciação entre as formas A e B ocorrentes no estado do Rio de Janeiro foi o mesmo que diferenciou as populações de Itatiaia e Santa Catarina. Sendo assim, a separação entre as formas A e B pode ser estimada entre 510 e 620 mil anos.

De acordo com a hipótese dos ciclos glaciais, a especiação de diversos táxons da Mata Atlântica é fruto da vicariância de populações isoladas em refúgios florestais ao longo da costa no Pleistoceno (HAFFER 1969; GRAZZIOTIN ET AL. 2006; CARNAVAL & BATES 2007) e do isolamento de populações em ilhas continentais devido a mudanças no nível dos mares decorrentes de mudanças climáticas no Plioceno (MARQUES ET AL. 2002; GRAZZIOTIN ET AL. 2006; BRASILEIRO ET AL. 2007 a, b, c). Os eventos glaciais resultaram em períodos secos durante o Quaternário, causando ciclos alternados de contração e expansão de fragmentos florestais. Períodos repetidos de isolamento podem ter contribuído com a diversificação de espécies adaptadas às micro condições de cada fragmento e aos campos abertos que os intercalavam (HAFFER 1969; VANZOLINI & WILLIAMS 1981; HAFFER & PRANCE 2001). Como a densidade populacional de mosquitos do gênero *Anopheles* é sensível às variações nas condições de temperatura (UENO; FORATTINI; KAKITANI, 2007) e disponibilidade de água em bromélias nas quais a larva se desenvolve (MARQUES et al., 2012), pode-se supor que mudanças ambientais que

isolaram fragmentos de floresta possam ter motivado a separação das linhagens, tendo em vista que, quando duas populações separadas geograficamente estão evoluindo independentemente, alelos diferentes tendem a ser fixados em cada uma delas, seja por deriva gênica ou por adaptação a ambientes diversos (RIDLEY, 2004).

CARNAVAL & MORITZ (2008) e CARNAVAL et al. (2009) desenvolveram modelos de distribuição da Mata Atlântica durante os períodos de glaciação do Pleistoceno, identificando a ocorrência de refúgios florestais estáveis em Pernambuco (NE), na Bahia (NE) e em São Paulo (SE). Tais modelos explicam a diferenciação entre uma linhagem de *An. cruzii* ocorrente na Bahia e as linhagens ocorrentes no Sul e Sudeste do país (RONA et al., 2009, 2010), mas não é suficiente para explicar a separação das linhagens A e B apresentadas neste estudo em face da distribuição atual destes táxons.

De acordo com os dados aqui apresentados, a distribuição da forma A parece estar restrita à porção costeira da Serra do Mar, desde o sudeste até Santa Catarina. A forma B, em contrapartida, parece ocorrer na porção continental da Serra do Mar e na Serra da Mantiqueira. Embora todas as localidades nas quais os indivíduos utilizados neste estudo foram coletados sejam classificadas como Florestas Pluviais (ou Ombrófilas Densas) (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000), as matas encontradas em Bocaina e Itatiaia, possuem maior similaridade entre si (NETTENSHEIM, et al 2010) quando comparadas às demais, embora sejam atualmente isoladas pelo Vale do Paraíba. Em pequenas bacias acima de 800 m a Serra do Mar (particularmente na Serra da Bocaina) e acima de 1.200 m na Serra da Mantiqueira ocorrem fragmentos de Matas de Araucária, as quais são caracterizadas pela presença de coníferas *Araucaria angustifolia*, algumas vezes associadas com coníferas do gênero *Podocarpus* (SAFFORD & MARTINELLI, 2000). Segundo BEHLING (2002), as Matas de Araucária do Sudeste deram lugar a campos de gramíneas durante os eventos de glaciação do Pleistoceno. Dessa forma, fragmentos de mata Ombrófila nos lados continental e costeiro da Serra do Mar teriam sido isolados durante os períodos de glaciação por corredores de campos de gramíneas em locais mais altos. Como a datação da divergência das formas A e B (RONA, CARVALHO-PINTO; PEIXOTO, 2013) coincide com a ocorrência de tais eventos, pode-se supor, então que a fragmentação da Mata Atlântica no Pleistoceno devido aos ciclos de glaciações tenha gerado um

processo de especiação alopátrica, isolando os indivíduos da Serra da Mantiqueira (Itatiaia) e da Serra do Mar Continental (Bocaina) dos indivíduos da Serra do Mar Litorânea. Os indivíduos da porção litorânea da Serra do Mar, a qual se estende até Santa Catarina, teriam se mantido com distribuição homogênea ao longo desses períodos de glaciação, e por isso a forma A hoje ocorre do Sul ao Sudeste na região costeira do país, conforme demonstrado aqui e em CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004).

A hipótese de especiação alopátrica motivada pela ocorrência dos ciclos glaciais e formação de refúgios florestais é sustentada pela observação de padrões semelhantes encontrados em diversos outros táxons. Diversos animais da Mata Atlântica apresentam variabilidade genética e geográfica que parecem ter sido moldadas por eventos climáticos do Pleistoceno. Tais padrões foram observados, por exemplo, em espécies de planárias (ALVAREZ-PRESAS et al., 2014), opiliões (PINTO-DA-ROCHA et al., 2005), serpentes (GRAZZIOTIN et al., 2006), anuros (CARNAVAL; HICKERSON; HADDAD, 2009; FITZPATRICK et al., 2009; MARTINS, 2011; THOMÉ et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2014), primatas (BUCKNER et al., 2014; CORTÉS-ORTIZ et al., 2003; MARROIG; CROPP; CHEVERUD, 2004), roedores (VALDEZ; D'ELÍA, 2013) e aves (CABANNE; SANTOS; MIYAKI, 2007; D'HORTA et al., 2011; CHAVES et al., 2015; DANTAS et al., 2014). Os padrões de distribuição e divergência de diversos táxons de insetos com importância médica — *e.g. Rhodnius prolixus* Stål 1859 (vetor da Doença de Chagas), *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Lutz & Neiva, 1912) (vetor da Leishmaniose), *An. darlingi*, *An. albopictus* s.l., *An. albimanus* e *An. nuneztovari* — também podem ser explicados por um conjunto de elementos das hipótese de refúgios do Pleistoceno e incursões marítimas do Plioceno, levando à conclusão de que esses fatores podem ter tido papel na especiação desses táxons (CONN; MIRABELLO, 2007; MIRABELLO; CONN, 2008; LOAIZA et al., 2010, 2012).

Embora haja clara diferenciação entre as formas A e B, na árvore utilizando todas as sequências com recombinação e não apenas os blocos não recombinantes, há alguns haplótipos da Bocaina agrupando com Sana, Guapimirim e Tinguá enquanto a maioria agrupa com Itatiaia (Figura 15). Pode-se levantar a hipótese de retenção de polimorfismo ancestral ou da ocorrência ocasional de fluxo gênico entre indivíduos da

Bocaina e outros da Serra do Mar, tendo em vista que eles são geograficamente mais próximos e há continuidade de floresta entre as duas regiões. Tal observação não anularia a hipótese de especiação alopátrica de A e B, apenas indicaria que o isolamento reprodutivo ainda não está completo entre as linhagens. No entanto, como a utilização de dados de sequências recombinantes em filogenias podem resultar, em alguns casos, em estimativas que divergem muito da filogenia real (POSADA; CRANDALL, 2002), tal observação pode ser apenas um artefato da análise. Novos estudos utilizando outros marcadores devem ser realizados para eximir a dúvida nesse ponto.

### **5.3. Hipótese de Especiação Parapátrica:**

Segundo FUTUYMA (1998), especiação parapátrica é a evolução do isolamento reprodutivo entre populações que são distribuídas continuamente no espaço, fazendo com que haja substancial movimentação de indivíduos e, portanto, fluxo gênico entre eles. Com a presença de fluxo gênico, a seleção natural atuante na diversificação das linhagens deve ser mais acentuada, portanto uma maior diferença entre os ambientes ocupados é esperada para que ocorra esse tipo de especiação entre duas populações. A Mata Atlântica é caracterizada pela grande diversidade de habitats proporcionada pela grande variação climática e fitofisionômica ao longo de sua distribuição (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000). Tais características resultam da grande variedade de condições altitudinais, topográficas, longitudinais e latitudinais neste bioma (CÂMARA 2003; RIBEIRO ET AL. 2009). Tendo em vista a especificidade de habitat e a suscetibilidade de anofelinos do subgênero *Kerteszia* a condições de temperatura (UENO; FORATTINI; KAKITANI, 2007) e disponibilidade de água em bromélias nas quais a larva se desenvolve (MARQUES et al., 2012), talvez as diferenças micro climáticas ao longo de gradientes altitudinais e espaciais na Mata Atlântica possam ter um papel importante na diferenciação parapátrica das linhagens de *An. cruzii* mesmo na ausência de barreiras geográficas que permitam o isolamento das linhagens.

Os fragmentos florestais em que as formas A e B de *An. cruzii* foram coletadas neste estudo pertencem a diferentes regiões fitofisionômicas da Mata Atlântica Fluminense (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000). Embora todas as localidades apresentem predominantemente florestas classificadas como Florestas Pluviais (ou Ombrófilas

Densas), as condições climáticas e altitudinais — as quais podem ter um papel na especiação das linhagens gerando pressões seletivas diferenciadas nos diferentes fragmentos —, variam entre as localidades amostradas, conforme discutido a seguir.

### 5.3.1. VARIAÇÃO CLIMÁTICA:

Sistemas tradicionais de classificação da vegetação brasileira (*e.g.* IBGE; VELOSO et al. 1991) usualmente classificam as fitofisionomias florestais baseados essencialmente no regime de chuvas e na temperatura, a qual é inferida de acordo com a latitude e a altitude. OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000 classificaram fragmentos de Mata Atlântica do sudeste a partir da perspectiva florística como pertencentes a duas categorias principais: Florestas Pluviais (ou Ombrófilas Densas) ou Florestas Semi-Decídua. Cada categoria é dividida em quatro classes altitudinais, resultando em oito principais tipos de formações florestais. As áreas ao norte da latitude 23°20' S (climas tropicais) ou acima de 700 m de altitude (clima montanhoso) foram classificadas como Florestas Pluviais (estação seca menor que 30 dias) ou Semi-Decíduas (estação seca durando de 40 a 160 dias). As áreas situadas ao sul da latitude 23°20' S e abaixo de 700 m (clima subtropical não montanhoso) foram classificados como Semi-Decíduas (chuva total anual entre 1500 e 2000 mm) ou Florestas Pluviais (chuva total anual entre 2000 e 3600 mm).

Todos os fragmentos florestais amostrados neste estudo se encontram ao norte de 23°20' S. Logo, seguindo a classificação de OLIVEIRA-FILHO & FONTES (2000), todos os locais de coleta apresentam predominantemente matas classificadas como Florestas Pluviais (ou Ombrófilas Densas). No entanto, sob a influência de climas sempre úmidos, pequenas variações na quantidade de precipitação podem alterar a fenologia das plantas, modificando padrões como, por exemplo, a periodicidade da perda de folhas (MORELATTO et al 2000; DAUBENMIRE, 1972). Segundo BERTONCELLO et al (2011), a fitofisionomia das florestas costeiras e das florestas continentais do sudeste se dividem em grupos que correspondem às diferenças climáticas na sazonalidade das chuvas, com precipitação mais homogênea ao longo do ano em áreas costeiras e um período de seca mais acentuado em florestas mais internas no continente.

Levando em consideração que a precipitação e a temperatura apresentam correlação

com a determinação florística das matas no Sudeste (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000) é importante que tais aspectos das localidades em que as formas A e B foram encontrados sejam levantados para investigar se há algum padrão ecológico de preferência de hábitat inerente a cada uma das formas de *An. cruzii*. O critério de classificação climática Köppen-Geiger define o clima de uma região baseado em critérios objetivos, como as médias anuais de temperatura e precipitação (KOTTEK et al, 2007). Aplicando tais critérios a dados provenientes das localidades amostradas neste estudo, pode-se observar um padrão de distribuição climática diferenciada entre as formas A e B de *An. cruzii*.

As localidades de Tinguá (IBAMA, 1996), Guapimirim (BERNARDES, 1952) e Sana (INMET/FGS/Interpolação), onde ocorre a forma A, são caracterizados, de acordo com a classificação de KOTTEK et al (2007) por climas do tipo Tropical —Tropical com Floresta Pluvial (*Af*) nas duas primeiras e Tropical de Monção (*Am*) na última. Tais áreas se localizam na face da Serra do Mar voltada para o Oceano Atlântico, a qual experimenta condições de maior pluviosidade quando comparada às porções continentais da mesma cadeia de montanhas (BEHLING & LICHTER 1997).

Por sua vez, as localidades de ocorrência da forma B possuem, de acordo com a definição de KOTTEK et al (2007), climas do tipo Temperado. O Parque Nacional de Itatiaia — localizado na Serra da Mantiqueira, a maior cadeia contínua de montanhas no porção leste da América do Sul, ocorrendo do Norte de São Paulo, passando pelo Rio de Janeiro e Minas Gerais até se fundir à Serra do Espinhaço — apresenta clima Temperado sem Estação Seca e Verão Ameno (*Cfb*) nas partes baixas de encosta (onde os indivíduos aqui utilizados foram coletados) e clima Temperado com Inverno Seco e Verão Ameno (*Cwb*) nas partes altas acima de 1.600 m de altitude (ICMBio - Plano de Manejo do PNI). A precipitação anual no Parque está em torno de 2400 mm, tendo janeiro a maior intensidade, com média de 27 dias e 388 mm de pluviosidade. As chuvas ficam mais escassas do final de abril até outubro, sendo que, em agosto, ocorrem em média 8 dias de chuva com 58 mm de pluviosidade. Nos meses de junho e julho, a umidade relativa do ar não ultrapassa 70% em média. A umidade máxima absoluta ocorre em dezembro, com 83%, e a mínima em junho, com 62%; a média é de 75,2% (IBDF, 1982).

O planalto da Bocaina também possui clima do tipo Temperado com Inverno Seco

e Verão Ameno (*Cwb*) (ICMBio – Plano de Manejo do PNB). O regime pluviométrico nas áreas do Parque Nacional da Bocaina e de sua Zona de Amortecimento caracteriza-se pela ocorrência dos maiores índices de chuva nas áreas do litoral, vertente oceânica e planalto da Bocaina, com totais anuais médios superiores a 2.000 mm, ocorrendo, frequentemente, períodos com índices máximos próximos ou superiores a 3.000 mm anuais. No entanto, a média regional cai para 1.700 mm anuais, devido às áreas menos chuvosas situadas nas vertentes voltadas para o vale do rio Paraíba do Sul (ICMBio), como é o caso da localidade em que os indivíduos do presente estudo foram coletados. A localização em áreas situadas nos reversos da Serra do Mar resulta em menores índices pluviométricos e distribuição mais irregular da precipitação ao longo do ano (MORELLATO ET AL. 1989, LEITÃO FILHO 1992, MMA/IBAMA 2004). Enquanto o lado costeiro de montanhas recebe grande quantidade de chuva (até 4.000 mm por ano), a face voltada para o continente experimenta uma “sombra de chuva”, e vales como o Paraíba do Sul recebem cerca de 1/3 desse volume de precipitação (BEHLING & LICHTTE 1997).

Sendo assim, pode-se evidenciar a separação das formas A e B quanto à preferência climática: a forma A ocorre em regiões com clima do tipo Tropical enquanto a forma B ocorre em regiões com clima do tipo Temperado. A rede de haplótipos (figura 18) e a árvore filogenética (figura 16) apresentadas na seção z demonstram que a forma B parece estar em processo de especiação incipiente, denotando uma diferenciação entre dois clados dentro dessa linhagem ( $B_1$  e  $B_2$ ). Embora tal diferenciação não seja tão evidente no marcador utilizado neste estudo, pode-se notar que, a princípio, os haplótipos de uma dessas linhagens é mais frequente em Itatiaia e os haplótipos da outra é mais frequente na Bocaina. A diferença climática entre as duas localidades — Bocaina apresenta clima do tipo Temperado com Inverno Seco e Verão Ameno (*Cwb*) e Itatiaia apresenta clima do tipo Temperado sem Estação Seca e Verão Ameno (*Cfb*) na localidade amostrada — pode ter um papel na diferenciação das linhagens, tendo em vista que *An. cruzii* é, devido ao seus hábitos bromelícolas, diretamente influenciado por condições variáveis de precipitação e temperatura (MARQUES et al., 2012; UENO; FORATTINI; KAKITANI, 2007). Os dados de variação climática entre as localidades aqui discutidos estão sumarizados na tabela 10.

### 5.3.2. VARIAÇÃO ALTITUDINAL:

Em relação às categorias altitudinais, a Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro apresenta quatro formações florestais principais: Floresta das Terras Baixas (5-300 metros), Floresta Submontana (300-700 metros), Floresta Montana (700-1.110 metros) e Floresta Alto-Montana (acima de 1.100 metros) (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000). Tais formações decorrem de variações do solo, da topografia, da umidade e, sobretudo, da altitude, ocorrendo de forma contínua — com ecótonos nem sempre bem definidos — ao longo dos maciços das serras do Mar e da Mantiqueira, os quais definem, em grande parte, a topografia do estado do Rio de Janeiro (AMADOR, 1997; RADAMBRASIL, 1983; VELOSO; RANGEL FILHO; A, 1991)

As localidades em que a forma A foi amostrada se localizam em altitudes menos elevadas (Guapimirim e Tinguá: 200 m; Sana = 600 m), pertencendo dessa maneira às formações Floresta de Terras Baixas e Floresta Submontana. Em contrapartida, os indivíduos coletados em Itatiaia (900 m) e na Bocaina (1.500 m) pertencem a ambientes de Floresta Montana e Floresta Alto-Montana, respectivamente. Tais dados estão sumarizados na Tabela 10.

**Tabela 10.** As diferentes formas de *An. cruzii* do Rio de Janeiro ocorrem em áreas com características distintas. Todas pertencem a Florestas Ombrófilas Densas, mas a espécie A está restrita às Florestas Sub Montana e de Terras Baixas (altitude < 700 m) em clima Tropical, enquanto a espécie B ocorre em áreas de Floresta Montana e Floresta de Alto Montana (altitude > 700 m) em clima Temperado. As legendas referentes ao clima estão definidas de acordo com o sistema de classificação Köppen-Geiger (KOTTEK et al, 2006).

Localidade	Espécie	Forma predominante	Altitude (m)	Clima (Köppen-Geiger)*	Tipo de formação florestal
Bocaina	B	B <sub>1</sub>	1.500	Cwb	Floresta Alto Montana
Itatiaia	B	B <sub>2</sub>	900	Cwb / Cfb	Floresta Montana
Sana	A	-	300-600	Af	Floresta Sub Montana
Guapimirim	A	-	200	Af	Floresta de Terras Baixas
Tinguá	A	-	200	Am	Floresta de Terras Baixas

\***Legenda:** **Cwb** = Temperado com Inverno Seco e Verão Ameno ; **Cfb** = Temperado sem Estação Seca e Verão Ameno ; **Af** = Tropical com Floresta Pluvial ; **Am** = Tropical de Monção.

Tendo em vista que as linhagens A e B parecem ter se separado há pouco tempo (~200 mil anos) (RONA, CARVALHO-PINTO; PEIXOTO, 2013) e levando em consideração a semelhança morfológica e aparente capacidade de fluxo gênico (embora o mesmo não seja frequente a ponto de homogeneizar as linhagens) entre elas, pode-se considerar que o ancestral comum às duas provavelmente habitava uma determinada faixa altitudinal e que o processo de especiação resultante na estruturação das linhagens tenha sido impulsionado pela necessidade de adaptação a um novo hábitat. Nesse caso, estaríamos diante de um caso de especiação parapátrica, na qual uma das espécies teria dado origem a duas devido à disponibilidade de ocupação de um novo nicho contíguo e à seleção natural atuante nesse processo, que levaria à adaptação ao novo ambiente e consequente diferenciação da linhagem original. Com o tempo, as diferenças (ecológicas, geográficas, genéticas e morfológicas) tendem a aparecer até o ponto em que cessa a capacidade de reprodução entre as duas linhagens, ocasionando total isolamento reprodutivo.

O fato de que maiores extensões de elevação promovem especiação devido à especialização de hábitat e isolamento altitudinal, o qual promove o endemismo e, conseqüentemente, a discrepância entre a riqueza de espécies entre sítios em uma região é bem documentado em florestas de montanhas (HADDAD & PRADO, 2005; LOMOLILO, 2001; RAHBEK & GRAVES, 2001; RUGGIERO & HAWKINS, 2008). Para que a especiação possa ocorrer, nesses casos, é necessário que haja heterogeneidade de hábitats entre dois ambientes contíguos, tendo em vista a necessidade de que a seleção natural se sobreponha à homogeneização populacional decorrente do fluxo gênico constante. Tal heterogeneidade está presente ao longo dos gradientes de altitude da Mata Atlântica, influenciando a distribuição de diversos táxons, conforme discutido a seguir.

A composição de espécies de árvores em Florestas Pluviais Tropicais é altamente influenciada pela altitude e pela temperatura associada a essa variação (OLIVEIRA-FILHO & FONTES, 2000, SANCHEZ et al., 2013), seguindo um padrão observado em vegetações de montanhas em todo o mundo (HUGGET, 1995). A heterogeneidade ambiental comumente se eleva com o aumento do desnível de superfície, o qual afeta o solo e as condições climáticas que potencialmente influenciam a composição e diversidade de espécies de árvores (LIEBERMAN ET AL., 1985; SARR ET AL., 2005). Adicionalmente, a variação topográfica contribui na formação da grande diversidade de hábitats em florestas de montanhas (HOMEIER ET AL., 2010). Diversos estudos investigaram a variação em pequena escala em Florestas Pluviais, observando o papel do ambiente físico na determinação de mudanças ao longo de gradientes altitudinais (GIVNISH, 1999; KESSLER, 2000, 2001; LIEBERMAN ET AL., 1996; PENDRY AND PROCTOR, 1996; WRIGHT ET AL., 1997). Mudanças na composição florística em montanhas tropicais em resposta a fatores afetados diretamente pela variação altitudinal (HEMP, 2006; KESSLER, 2000) e a fatores não relacionados à altitude, como o grau e aspecto da inclinação de vertentes (GENTRY, 1995; VÁZQUEZ AND GIVNISH, 1998) também são bem documentas para diversas espécies de árvores e outros grupos de plantas. Dessa forma, vegetações ocupando semelhantes extratos altitudinais ao longo da Mata Atlântica tendem a apresentar comunidades vegetais semelhantes. Bocaina e Itatiaia, por exemplo, possuem grande similaridade em suas Matas (NETTENSHEIM, et al 2010) embora as mesmas sejam separadas pelo Vale do Paraíba, corroborando a hipótese de que a evolução de espécies

de plantas é influenciada por fatores limitantes impostos pela altitude regional e pela variação de temperatura associada a esse fator (WEBSTER, 1995; NETTENSHEIN et al, 2010).

Além de influenciar a composição das comunidades de plantas, a variação altitudinal determina também a distribuição de diversos animais da Mata Atlântica. Padrões de substituição influenciados pela altitude são encontrados, por exemplo, em opiliões (ALMEIDA-NETO et al., 2006), anfíbios (GIARETTA et al. 1999) e aves (CHAVES et al., 2015). Em um trabalho investigando a distribuição de espécies de opiliões ao longo de três gradientes altitudinais na Mata Atlântica, ALMEIDA-NETO et al. (2006) observaram que a temperatura e a umidade têm influência na densidade e abundância de espécimes. GAREY et al, 2014 atribuíram a grande diversidade de anuros encontrada no Parque Nacional da Serra da Bocaina à sua grande variação altitudinal, a qual favorece a substituição na composição de espécies ao longo de gradientes de altitude.

A distribuição de espécies de insetos é influenciada por fatores abióticos (*e.g.* quantidade de chuva, umidade e temperatura), bióticos (*e.g.* plantas hospedeiras, pedradadores/parasitoides) e fisiológicos (PRICE 1975, SZUKECKI 1987). Em montanhas tropicais, fatores abióticos parecem ter um efeito maior na estrutura das comunidades, de maneira que padrões de flutuação populacional similares aos de regiões subtropicais e temperados podem emergir, com períodos de ocorrência de insetos bem definidos ao longo do ano (FLINTE et al., 2011). O aumento da altitude traz temperaturas mais baixas, aumento da precipitação (chuva ou neve), menor pressão parcial de gases, maior velocidade e turbulência do vento e extremos de radiação (BARRY, 1992). Combinados, esses fatores podem produzir uma redução na complexidade estrutural de habitats de insetos, assim como variações na qualidade nutricional e disponibilidade de plantas hospedeiras (FLINTE et al. 2011). Em um estudo investigando a distribuição altitudinal de sete espécies de besouros crisomelídeos na Serra dos Órgãos (RJ), FLINTE et al. (2011) demonstraram que seis delas apresentam distribuições restritas a faixas altitudinais específicas, com apenas uma ocorrendo ao longo do gradiente completo. Para ao menos quatro dessas espécies, a distribuição altitudinal pareceu estar fortemente relacionada à disponibilidade de plantas hospedeiras.

A divergência entre linhagens de *An. cruzii* ocorrentes em diferentes altitudes já havia sido notada em trabalhos prévios em outras regiões do país: RAMÍREZ & DESSEN (2000 a,b) notaram que a distribuição das formas cromossômicas batizadas por eles de A, B e C no Sul e Sudeste do país variava de acordo com a altitude amostrada: enquanto a forma B era predominante ao nível do mar, a forma A era mais abundante acima de 200 m e a forma C só foi encontrada em localidades acima de 500 m de altitude. Além disso, um estudo ecológico mostrou que a densidade populacional de *An. cruzii* na Serra do Mar varia de acordo com a altitude da localidade em que os indivíduos são coletados e tem correlação significativa com o volume de água encontrados nas bromélias (*Vriesea* e *Nidularium*), sendo maior em locais com bromélias de tanque cheio (MARQUES et al., 2012). Como tal variável está diretamente relacionada às condições microclimáticas de cada região, pode-se inferir que variações em tais condições ao longo do gradiente de altitude em uma serra impõe diferentes pressões seletivas às populações de mosquitos.

Baseados nesses dados, LORENZ et al. (2014) levantaram a hipótese de que o fluxo gênico não estaria distribuído de maneira homogênea entre populações ao longo de um gradiente de altitude e testaram se indivíduos coletados em diferentes altitudes (terras baixas (5-20m) e topo de morro (81-263m)) apresentavam homogeneidade morfológica (morfometria das asas) e genética (análise de sequências de COI). Os resultados demonstraram grande diversidade haplotípica, moderada diferenciação genética e padrões diferentes de asa entre as populações de terras baixas e de topo de morro, indicando que pode haver variação entre populações de *An. cruzii* ocorrentes em diferentes altitudes. Como o volume de água de bromélias em terras baixas tende a ser maior do que em topos de morro, a temperatura varia ao longo do gradiente de altitude e as densidades populacionais de *An. cruzii* estão diretamente correlacionadas a esses parâmetros (MARQUES et al., 2012; UENO; FORATTINI; KAKITANI, 2007), a preferência das populações pelos diferentes habitats pode levar à reprodução preferencial dentro de cada uma delas, resultando em fluxo gênico limitado e, conseqüentemente, diferenciação das linhagens. Tais fatores levariam, com o tempo, a espécies divergentes, cada uma adaptada a um diferente extrato altitudinal da Mata Atlântica, sem necessidade de uma barreira geográfica que impedisse o fluxo gênico.

Eventos de especiação parapátrica e adaptação local a diferentes nichos são bem documentados em anofelinos. Conforme descrito na seção 1.8, o complexo de vetores africanos *An. gambiae* s.l., o qual possui espécies adaptadas a diversos nichos diferentes — *e.g.* *An. merus* e *An. melas* se reproduzem em água salgada e *An. bwambiae* em água salobra — apresenta grande incidência de polimorfismos de inversão cromossômica (COLUZZI et al., 1979, 2002). As diferentes formas cromossômicas ocorrem em diferentes frequências em espécies adaptadas a diferentes condições ecológicas, o que denota o papel de tais inversões na adaptação local (AYALA; COLUZZI, 2005; COLUZZI et al., 2002; DELLA TORRE et al., 2001, 2002; DELLA TORRE; TU; PETRARCA, 2005). A presença de polimorfismos de inversão cromossômica evidenciados em *An. cruzii* e a ocorrência majoritária de diferentes formas cromossômicas em diferentes altitudes (RAMÍREZ & DESSEN (2000 a,b)) sugerem que tais inversões podem ter um papel na adaptação às diferentes condições encontradas ao longo de extratos altitudinais da Mata Atlântica, o que daria suporte à hipótese de especiação parapátrica relacionada à exploração de extratos altitudinais com condições variáveis.

LOHSE et al. (2015) discutiram o papel de inversões cromossômicas na especiação a partir de testes utilizando genomas completos de espécies de *Drosophila* e argumentaram que *loci* diferenciando espécies estão concentrados dentro ou próximos de inversões, permitindo genes localmente adaptados a se acumularem em *linkage*. Dessa forma, corroboraram as predições de que inversões podem sobrepor o efeito homogeneizante do fluxo gênico e permitir o aumento da divergência nos estágios iniciais da especiação (NAVARRO & BARTON, 2003; RIESEBERG, 2001). As formas cromossômicas de *An. cruzii* descritas por RAMÍREZ & DESSEM (2000 a,b) apresentam padrões de bandeamento nos cromossomos X e 3. O gene *Clock*, utilizado no presente estudo, codifica fatores de transcrição associados aos ciclos circadianos de insetos (STANEWSKY, 2003). Dessa forma, a divergência acentuada observada no presente estudo pode ser decorrente da presença de tal gene em regiões com polimorfismos de inversão, os quais podem acelerar o desenvolvimento do isolamento reprodutivo (NAVARRO & BARTON, 2003), “prendendo” múltiplos *loci* benéficos em *linkage* em estágios iniciais da divergência (KIRKPATRICK & BARTON, 2006), embora novos experimentos devam ser realizados para testar tais previsões.

Para testar a hipótese de que o mecanismo de especiação parapátrica decorrente da variação ambiental altitudinal pode ter tido um papel na separação das linhagens A e B de *An. cruzii*, seria interessante aumentar o esforço amostral em outras regiões ao longo do gradiente altitudinal da Serra do Mar fluminense. Para tanto, novas coletas poderiam ser realizadas em lugares de altitude elevada, como a Pedra do Sino, na Serra dos Órgãos (2.260 m) e o Pico do Desengano (1.761 m), onde se esperaria encontrar a forma B, e locais de Mata Atlântica de baixada, como a Reserva Biológica da União, em Casemiro de Abreu, onde se esperaria encontrar indivíduos pertencentes à forma A.

#### **5.4. Delimitação das espécies de *An. cruzii* sensu lato:**

Diversos estudos mostraram diferenciação significativa de linhagens de *An. Cruzii* no Brasil. No presente estudo, conforme demonstrado, uma alta diferenciação genética foi encontrada entre as formas A e B ( $F_{ST}$  variando de 0,59 a 0,73), as quais possuem distribuição geográfica, ecológica e altitudinal diferenciada. Essa diferenciação observada é maior do que a esperada dentro de uma única linhagem evolutiva em que não haja nenhum tipo de isolamento reprodutivo, e estimativas na literatura sugerem um valor crítico de  $F_{ST}$  de 0,35 acima do qual as entidades analisadas deveriam ser identificadas como espécies diferentes (HEY & PINHO, 2012).

A comparação com sequências de indivíduos de Florianópolis evidenciou a semelhança genética entre a forma A fluminense e essa população, levando à hipótese de que ambas pertencem à mesma linhagem. RONA, CARVALHO-PINTO & PEIXOTO (2013) estimaram, através de uma abordagem *multilocus*, a divergência entre linhagens de Florianópolis e Itatiaia em 0,6 milhões de anos, o que nos permite inferir que a divergência entre as formas A e B ocorrentes no Rio de Janeiro podem também datar do mesmo evento de separação. SOARES et al. (2015, dados não publicados), utilizaram sequências do gene *cpr* (NADPH-citocromo p450 redutase) para investigar a diversidade genética das mesmas populações analisadas neste trabalho. Essa análise corroborou a conclusão aqui apresentada de que ao menos duas formas geneticamente distintas ocorrem no estado do Rio de Janeiro, obtendo valores elevados de  $F_{ST}$  (0,34 a 0,699) quando comparando populações das formas A (Sana, Guapimirim e Tinguá) e B (Itatiaia e Bocaina). Além da estruturação elevada e da

divergência observada entre as formas A e B, foi possível também detectar diferentes linhagens dentro da forma B, com valores de diferenciação altos e significativos entre elas.

Diante das diversas divergências entre as linhagens A e B discutidas acima, coloca-se a questão da delimitação de espécies: devem tais formas ser classificadas como espécies diferentes? Os resultados apresentados sugerem que *An. cruzii* está na “zona cinza” do processo de especiação (ver Figura 11), conforme discutido na seção 1.7. Como os conceitos de espécie são variáveis e apresentam diferentes limites para delimitação das mesmas (DE QUEIROZ, 2007), a adoção de diferentes conceitos pode levar a diferentes conclusões acerca do número de espécies de *An. cruzii* ocorrendo na Mata Atlântica fluminense. Baseado nos dados aqui apresentados, de acordo com alguns conceitos (*e.g.* conceito fenético) haveria apenas uma espécie no estado do Rio de Janeiro e de acordo com outros (*e.g.* conceito filogenético) haveria pelo menos duas. Seguindo o conceito unificado de que espécies são linhagens de metapopulações evoluindo independentemente (DE QUEIROZ, 2007), a hipótese de que A e B pertencem a duas espécies diferentes é sustentada, pois há linhas de evidências independentes (*e.g.* genéticas, geográficas e ecológicas) que a corroboram.

Para que uma nova espécie nominal seja descrita é necessário que os indivíduos provenientes das diferentes linhagens possam ser corretamente identificados, de maneira inambígua, através de caracteres diagnósticos que permitam a correta atribuição de indivíduos aos diferentes táxons (DAYRAT, 2005). Os dados apresentados no presente trabalho fornecem alguns sítios com caracteres os quais estão fixados nas formas A e B, além de evidenciarem a diferenciação entre as duas espécies estimada através de estatísticas probabilísticas. GOLDSTEIN & DESALLE (2011) argumentam que, para que dados de sequência possam ser usados em diagnósticos de espécies, eles devem apresentar sítios com características fixadas que permitam a atribuição correta de indivíduos às diferentes espécies. Caso tais caracteres diagnósticos não estejam disponíveis embora haja monofilia recíproca dos táxons, os grupos devem ser melhor investigados em busca de outras fontes de evidência que permitam a descrição inequívoca dos mesmos. Embora sítios fixados separando as espécies A e B sejam observados no *locus* utilizado neste estudo, novas investigações utilizando outros *loci* podem prover mais caracteres diagnósticos nos quais basear uma descrição.

Sendo assim, embora aqui se infira a ocorrência de duas espécies de *Anopheles cruzii* no estado do Rio de Janeiro, novas investigações em busca de mais caracteres, sejam eles morfológicos, ecológicos ou genéticos (*e.g.* SNPs, padrões de bandeamento de cromossomos), devem ser realizadas para que a descrição das mesmas seja feita de forma sólida. DAYRAT (2005) cunhou o termo “Taxonomia Integrativa”, definindo-o como a ciência focada em delimitar as unidades da diversidade da vida a partir de múltiplas e complementares perspectivas (*e.g.* filogeografia, morfologia comparativa, genética de populações, ecologia, desenvolvimento, comportamento, etc.), e defendeu que a adoção dessa abordagem na descrição de novas espécies reduziria muito os problemas nomenclaturais da taxonomia atual. O presente trabalho se valeu dessa perspectiva, investigando aspectos ecológicos e geográficos associados às linhagens geneticamente diferenciadas e evidenciando peculiaridades das duas espécies. Seguindo essa linha de pensamento, quanto mais caracteres diagnósticos das espécies A e B de *An. cruzii* forem levantados a partir de diferentes linhas de observação, mais completa será a descrição das mesmas e mais inequívocos serão os futuros esforços de identificação de indivíduos coletados no estado.

Caso as espécies A e B venham, futuramente, a ser descritas formalmente em publicações voltadas a esse fim, o nome *An. cruzii* deverá permanecer com aquela a cujo o exemplar original pertencer, de acordo com o Princípio de Prioridade (ICZN, 1999). Os lectótipos de *An. cruzii*, designados por BELKIN (1968), são três fêmeas coletadas em 1899 por Adolpho Lutz e descritas por Theobald em 1901, as quais estão depositadas na coleção de Diptera do British Museum of Natural History, no Reino Unido. Todavia, a localidade da coleta dos exemplares, escrita a mão na etiqueta dos espécimes tipo, está referida apenas como “Rio de Janeiro” (BELKIN, 1968). No entanto, LUTZ (1903) menciona que a coleta dos mesmos se deu em um trecho da Serra do Mar, a cerca de 900 m, na ocasião da construção da estrada de ferro ligando São Paulo a Santos. Tal referência leva à suposição de que os indivíduos coletados por Lutz, devido à proximidade e continuidade da região descrita com a Serra da Bocaina e à altitude de coleta, pertençam à espécie *An. cruzii* B identificada neste estudo. Contudo, uma análise criteriosa dos tipos e de novos exemplares será necessária para que tal afirmação seja feita em uma futura descrição. Caso essa suposição se mostre profícua, *An. cruzii* B permanecerá com o nome que a designa atualmente e *An. cruzii* A deveria receber um novo nome. Neste caso, sugiro aqui o nome *An. peixotoi*, em homenagem

ao pesquisador Alexandre Afrânio Peixoto, falecido em 2013, que foi pioneiro na investigação da diversidade genética do complexo *An. cruzii* no estado do Rio de Janeiro.

## 6. CONCLUSÕES:

A partir dos dados analisados neste estudo, pode-se sugerir que as populações de *An. cruzii* provenientes do estado do Rio de Janeiro pertencem a duas linhagens evolutivamente independentes, indicando a ocorrência de duas espécies crípticas, referidas aqui como A e B, na Mata Atlântica fluminense. Essas duas espécies possuem distribuição geográfica, ecológica e altitudinal distintas: a espécie B ocorre em Itatiaia (Serra da Mantiqueira) e na Bocaina (face da Serra do Mar voltada para o continente), em Florestas Montanas e Alto Montanas de clima Temperado e a espécie A ocorre em Tinguá, Sana e Guapimirim, na face da Serra do Mar voltada para o Oceano Atlântico, em Florestas de Terras Baixas e Sub Montanas de clima Tropical.

Os dados apresentados aqui reforçam, ainda, a hipótese já disposta na literatura de que duas linhagens simpátricas ocorrem em Itatiaia. Embora este estudo expanda a distribuição conhecida dessas espécies à face continental da Serra do Mar (Bocaina) e discuta que as condições climáticas e fitofisionômicas variam entre as duas regiões (ver tabela 10) em que ocorrem, o marcador aqui utilizado não é adequado para que mais inferências possam ser feitas a respeito desse processo incipiente de especiação.

Sendo *An. cruzii* vetor primário de malária na Mata Atlântica fluminense, a subestimação da diversidade desses mosquitos pode levar à incompreensão acerca de aspectos epidemiológicos da doença no estado do Rio de Janeiro. Dessa forma, o reconhecimento de que ao menos duas linhagens divergentes ocorrem na região é fundamental para que estudos melhor direcionados possam ser realizados a fim de entender melhor o papel de tais organismos na transmissão da doença. Portanto, a identificação desses táxons de vetores pode vir a prover um importante diferencial no combate à doença no estado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AMADOR, E. S. **Baía da Guanabara e ecossistemas periféricos: homem e natureza**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- ARAGAO, M. Distribuição geográfica e abundância das espécies de Anopheles (Kerteszia)(Diptera, Culicidae). **Rev Bras Malariol Doen Trop**, v. XVI, p. 1–11, 1964.
- AYALA, F. J.; COLUZZI, M. Chromosome speciation: humans, Drosophila, and mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102 Suppl , p. 6535–6542, 2005.
- AZEVEDO, A. L. **Aspectos da Epidemiologia da Malária e da Biologia de Anopheles (Kerteszia) cruzii Dyar & Knab em Vales Montanhosos do Sistema de Mata Atlântica**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 1997.
- BELKIN, J. The type specimens of New World mosquitoes in European museums. **Contribution of the American Entomological Institute**, v. 3, p. 1–72, 1968.
- BENCHIMOL, J. L.; SÁ, M. R. **Adolpho Lutz, Obra Completa: Febre amarela, malária & protozoologia / Yellow Fever, Malaria & Protozoology**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 3, p. 148–55, mar. 2007.
- BLANCHARD, R. Nouvelle Note Sur Les Moustiques. **Comptes rendus de la Société de Biologie**, p. 793–795, 1902.
- BONA, A.; NAVARRO-SILVA, M. A. Diversity of Culicidae during the crepuscular periods in Atlantic Forest biome and parity of Anopheles cruzii (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 1, p. 40–48, 2008.
- BONA, A.; NAVARRO-SILVA, M. A. M. Anopheles cruzii parity in dense rain forest in Southern Brazil. **Revista de saude publica**, v. 40, n. 6, p. 1118–1123, 2006.
- BORCHSENIUS, F. **FastGap 1.2** Department of Biosciences, Aarhus University, Denmark., , 2009. Disponível em: <[http://www.aubot.dk/FastGap\\_home.htm](http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm)>
- BOURROUL, C. Mosquitos do Brasil. p. 78, 1904.
- BRUNHES, J.; LE GOFF, G.; GEOFFROY, B. Afrotropical Anopheles .1. Description of New Species and Modification of Taxonomical Status (Diptera:Culicidae). **Annales de la Societe Entomologique de France**, v. 33, n. 2, p. 173–183, 1997.

- BUCKNER, J. C. et al. Biogeography of the marmosets and tamarins (Callitrichidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, n. May, 2014.
- CABANNE, G. S.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): Vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, n. 1, p. 73–84, 2007.
- CALADO, D.; NAVARRO-SILVA, M. A.; SALLUM, M. A. M. **PCR-RAPD and PCR-RFLP polymorphisms detected in *Anopheles cruzii* (Diptera, Culicidae)** *Revista Brasileira de Entomologia*, 2006.
- CÂMARA, I. DE G. Brief History of Conservation in the Atlantic Forest. In: GALINDO-LEAL, C.; CAMARA, I. DE G. (Eds.). . **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**. Washington: CABS and Island Press, 2003. p. 31–42.
- CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B. Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. **Science**, v. 323, n. February, p. 785–789, 2009.
- CARVALHO-PINTO, C. J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Isoenzimatic analysis of four *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 471–475, 2004.
- CERUTTI, C. et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Malaria journal**, v. 6, p. 33, jan. 2007.
- CHAGAS, C. *Novas Espécies de Culicídios Brasileiros*. 1907.
- CHAHAD-EHLERS, S.; LOZOVEI, A. L.; MARQUES, M. D. Reproductive and post-embryonic daily rhythm patterns of the malaria vector *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii*: aspects of the life cycle. **Chronobiology international**, v. 24, p. 289–304, 2007.
- CHANDRE, F. et al. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 3, p. 230–234, 1999.
- CHAVES, A. V. et al. Biogeographic patterns, origin and speciation of the endemic birds from eastern Brazilian mountain tops: a review. **Systematics and Biodiversity**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2015.
- COETZEE, M. et al. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. **Zootaxa**, v. 3619, n. 3, p. 246–274, 2013.
- COETZEE, M.; CRAIG, M.; LE SUEUR, D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. **Parasitology Today**, v. 16, n. 2, p. 74–77, 2000.

COLLUCCI, E.; SALLUM, M. Phylogenetic analysis of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological characters. **Insect Systematics & Evolution**, **34**, **4**, v. 34, n. 4, p. 361–372, 2003.

COLUZZI, M. Morphological Observations on the *Anopheles gambiae* Complex. 1964.

COLUZZI, M. et al. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 5, p. 483–497, 1979.

COLUZZI, M. et al. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. November, p. 1415–1418, 2002.

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [s.l: s.n.].

CORREA, R. R. et al. Observations on the flight of *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzei* and of *A. (K.) bellator*, vectors of malaria (Diptera, Culicidae). **Arq Hig Saude Publica**, 1961.

CORTÉS-ORTIZ, L. et al. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 26, p. 64–81, 2003.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & vectors**, v. 3, n. Figure 1, p. 5, 2010.

CURADO, I. et al. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Acta tropica**, v. 100, n. 1-2, p. 54–62, nov. 2006.

DANTAS, G. P. M. et al. Population genetic structure of the Atlantic Forest endemic *Conopophaga lineata* (Passeriformes: Conopophagidae) reveals a contact zone in the Atlantic Forest. **Journal of Ornithology**, v. 156, n. 1, p. 85–99, 2014.

DARWIN, C. **On the Origin of Species: By Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life**. Illustrate ed. New York: Sterling Publishing Co., Inc, 1859.

DAVIDSON, G. the Problem of the *Anopheles Gambiae* Complex (Diptera). 1965.

DAVIDSON, G.; HUNT, R. H. The crossing and chromosome characteristics of a new, sixth species in the *Anopheles gambiae* complex. **Parassitologia**, v. 15, p. 121–128, 1973.

- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, n. 3, p. 407–415, 24 jun. 2005.
- DE ALVARENGA, D. A. M. et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. **Malaria Journal**, v. 14, 2015.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879–86, dez. 2007.
- DEANE, L. et al. On the transmission of simian malaria in Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 13, n. 5, p. 311–319, 1971.
- DEANE, L. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. II, p. 5–14, 1986.
- DEANE, L. M. Simian Malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 1–20, 1992.
- DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. L.; MOURA, M. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzi* in a forest in southern Brazil suggests that human cases of malaria of simian origin might be expected. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 461–463, 1984.
- DELLA TORRE, A et al. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s. s. in West Africa. **Insect molecular biology**, v. 10, n. February 2000, p. 9–18, 2001.
- DELLA TORRE, A. et al. Speciation within *Anopheles gambiae*--the glass is half full. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5591, p. 115–7, 4 out. 2002.
- DELLA TORRE, A.; TU, Z.; PETRARCA, V. On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 755–769, 2005.
- DUARTE, A. M. R. D. C. et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 179–85, ago. 2008.
- DYAR, H. G.; KNAB, F. Descriptions of some new mosquitoes from tropical America. **Proceedings U.S. National Museum**, v. 35, n. 1632, p. 53–70, 1908.
- FILATOV, D. ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. **Molecular Ecology Notes**, p. 621–624, 2002.
- FITZPATRICK, S. W. et al. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic Coastal Forest frog reveals regional differences in habitat stability. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 13, p. 2877–2896, 2009.

- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 3<sup>a</sup>. ed. [s.l.] FUNPEC-Editora, 1998.
- GADELHA, P. From “forest malaria” to “bromeliad malaria”: a case-study of scientific controversy and malaria control. **Parassitologia**, v. 36, p. 175–195, 1994.
- GIMONNEAU, G. et al. Larval habitat segregation between the molecular forms of the mosquito *Anopheles gambiae* in a rice field area of Burkina Faso, West Africa. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, p. 9–17, 2012a.
- GIMONNEAU, G. et al. Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 65, 2012b.
- GOLDSTEIN, P. Z.; DESALLE, R. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 33, n. 2, p. 135–47, fev. 2011.
- GRASSI, B.; BIGNAMI, A.; BASTIANELLI, G. Resoconto degli studi fatti sulla malaria durante il mese di gennaio. 1889.
- GUIMARÃES, A.; MELLO, R. Ecology of mosquitoes (Diptera: culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of Sao Paulo, Brazil. I-monthly frequency and climatic factors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 1–16, 2000.
- HARBACH, R. E. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bulletin of entomological research**, v. 94, p. 537–553, 2004.
- HARBACH, R. E.; RATTANARITHIKUL, R.; HARRISION, B. A. Baimaia, a new subgenus for *Anopheles kyondawensis* abraham, a unique crabhole-breeding anopheline in Southeastern Asia. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 107, n. 4, p. 750–761, 2005.
- HENNIG, W. Phylogenetic Systematics. **Annual review of entomology**, v. 10, p. 97–116, 1965.
- HEY, J.; PINHO, C. Population genetics and objectivity in species diagnosis. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 66, n. 5, p. 1413–29, maio 2012.
- HOCHMAN, G.; MELLO, M. T. B. DE; SANTOS, P. R. E. DOS. A malária em foto: imagens de campanhas e ações no Brasil da primeira metade do século XX. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 9, p. 233–273, 2002.
- [HTTP://TREE.BIO.ED.AC.UK/SOFTWARE/FIGTREE/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). **Figtree v.1.4.2**, [s.d.].

- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754–755, 2001.
- HUNT, R. H.; COETZEE, M.; FETTENE, M. The Anopheles gambiae complex: a new species from Ethiopia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 1998, p. 231–235, 2000.
- ICZN, I. C. ON Z. N. **International Code of Zoological Nomenclature - 4th edition** London International Trust for Zoological Nomenclature, , 1999.
- JOWETT, T. **Drosophila, a Practical Approach**. [s.l.] IRL Press, Oxford, 1998.
- KIMURA, M. **The Neutral Theory of Molecular Evolution**. New York: Cambridge University Press, 1983.
- KIRCHGATTER, K. et al. Anopheles (Kerteszia) cruzii (Diptera: Culicidae) in Peridomestic Area During Asymptomatic Malaria Transmission in the Atlantic Forest: Molecular Identification of Blood-Meal Sources Indicates Humans as Primary Intermediate Hosts. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 403–409, set. 2014.
- KRZYWINSKI, J.; BESANSKY, N. J. Molecular systematics of Anopheles: from subgenera to subpopulations. **Annual review of entomology**, v. 48, p. 111–39, jan. 2003.
- LEE, Y. et al. Desiccation resistance among subpopulations of Anopheles gambiae s.s. from Selinkenyi, Mali. **Journal of medical entomology**, v. 46, p. 316–320, 2009.
- LEE, Y. et al. A new multiplex SNP genotyping assay for detecting hybridization and introgression between the M and S molecular forms of Anopheles gambiae. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, p. 297–305, 2014.
- LOAIZA, J. R. et al. Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–12, jan. 2012.
- LORENZ, C. et al. Morphometrical diagnosis of the malaria vectors Anopheles cruzii, An. homunculus and An. bellator. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 257, jan. 2012.
- LORENZ, C. et al. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector Anopheles cruzii ( Diptera:Culicidae ). **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, 2014.
- LUTZ, A. Waldmosquitoes und Waldmalaria. **Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten**, v. 33, n. 4, p. 282–292, 1903.

MALAFRONTE, R. D. S. et al. Intraspecific variation of second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA among populations of *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzi* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 3, p. 538–542, 2007.

MALAFRONTE, R. S. et al. Polymorphism in the second internal transcribed spacer (ITS2) of *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzi* (Diptera: Culicidae) from the State of São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. Suppl.1, p. 306, 1997.

MARQUES, G. R. A. M.; FORATTINI, O. P. *Anopheles cruzii* larvae found in bromelias in an urban area on the Brazilian coast. **Revista de saude publica**, v. 43, n. 2, p. 369–372, 2009.

MARQUES, T. C. et al. Mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages associated with *Nidularium* and *Vriesea* bromeliads in Serra do Mar, Atlantic Forest, Brazil. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 41, jan. 2012.

MARRELLI, M. T. et al. *Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. **Malaria journal**, v. 6, p. 127, jan. 2007.

MARROIG, G.; CROPP, S.; CHEVERUD, J. M. Systematics and Evolution of the *Jacchus* Group of Marmosets (Platyrrhini). **American Journal of Physical Anthropology**, v. 123, n. May 2002, p. 11–22, 2004.

MARTINS, F. D. E. M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval – Moritz model of Pleistocene refugia : what do phylogeographical studies tell us ? p. 499–509, 2011.

MIGUEL, R. B. et al. Malaria in the state of Rio de Janeiro, Brazil, an Atlantic Forest area: an assessment using the health surveillance service. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 634–640, 13 ago. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Malária - Descrição da Doença**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11342-descricao-da-doenca>>. Acesso em: 21 fev. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **No Title**.

MITTERMEIER, R. et al. **Hotspots revisited**. Monterrey: CEMEX, 2004.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. February, p. 853–858, 2000.

NATAL, D.; BARATA, J. M. S. O papel de *Anopheles* (*Kerteszia*) como vetor da malária em áreas do ecossistema da Mata Atlântica no Brasil. **Fundação Nacional da Saúde. Implementação do Controle Seletivo de Vetores da Malária Na Região Amazônica**, p. 29–34, 1997.

- NEAFSEY, D. E. et al. Highly evolvable malaria vectors: The genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. **Science**, 2015.
- NWAKANMA, D. C. et al. Breakdown in the process of incipient speciation in *Anopheles gambiae*. **Genetics**, v. 193, n. April, p. 1221–1231, 2013.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria journal**, v. 9, p. 115, jan. 2010.
- PATERSON, H. E. Direct Evidence for the Specific Distinctness. **Riv. Malariologia**, v. 43, p. 191–196, 1964.
- PEYTON, E.; WILKERSON, R.; HARBACH, R. Comparative analysis of the subgenera *Kerteszia* and *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera:Culicidae). v. 296, 1991.
- PINA-COSTA, A. DE et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–633, ago. 2014.
- POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–6, jul. 2008.
- RACHOU, R. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 10, p. 145–181, 1958.
- RADAMBRASIL. **Projeto Radambrasil: Levantamento de Recursos Naturais**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- RAMÍREZ, C. C.; DESSEN, E. M. B. Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles cruzii*. **Genome**, v. 43, n. 1, p. 143–151, 2000.
- RAMIREZ, C.; DESSEN, E. Cytogenetics Analysis of a Natural Population of *Anopheles cruzii*. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 17, n. 1, p. 41–46, 1994.
- RAMIREZ, C.; DESSEN, E. Chromosome differentiated populations of *Anopheles cruzii* : evidence for a third sibling species. **Genetica**, v. 108, p. 73–80, 2000.
- RAMIREZ, C.; DESSEN, E.; OTTO, P. Inversion polymorphism in a natural population of *Anopheles cruzii*. **Caryologia**, v. 47, n. 2, p. 121–130, 1994.
- REITZ, R. **Bromeliáceas e a Malária - Bromélia Endêmica**. [s.l.] Flora Ilustrada Catarinense, 1983.
- REZENDE, H. R. et al. Entomological characterization and natural infection of anophelines in an area of the Atlantic Forest with autochthonous malaria cases in mountainous region. **Neotropical ...**, n. April, p. 272–280, 2009.

- RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, jun. 2009.
- RONA, L. D. P. et al. Assessing the molecular divergence between *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzi* populations from Brazil using the timeless gene: further evidence of a species complex. **Malaria journal**, v. 8, p. 60, jan. 2009.
- RONA, L. D. P. et al. Estimation of divergence time between two sibling species of the *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzi* complex using a multilocus approach. **BMC evolutionary biology**, v. 10, p. 91, jan. 2010.
- RONA, L. D. P.; CARVALHO-PINTO, C. J.; PEIXOTO, A. A. Evidence for the occurrence of two sympatric sibling species within the *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzi* complex in southeast Brazil and the detection of asymmetric introgression between them using a multilocus analysis. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 207, jan. 2013.
- RONA, L. D. P.; CARVALHO-PINTO, C. J.; PEIXOTO, A. A. Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzi* complex in south-east Brazil. **Malaria journal**, v. 9, p. 33, jan. 2010.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 11 ago. 2003.
- ROSA-FREITAS, M. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p. 651–655, 1998.
- ROZAS, J. DNA Sequence Polymorphism Analysis Using DNASP. In: POSADA, D. (Ed.). **Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 537p. 337–350.
- SALLUM, M. A M. et al. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. **Systematic Entomology**, v. 27, p. 361–382, 2002.
- SALLUM, M. A M.; SCHULTZ, T. R.; WILKERSON, R. C. Phylogeny of Anophelinae (Diptera Culicidae) Based on Morphological Characters. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 93, p. 745–775, 2000.
- SANFORD, M. R. et al. Morphological differentiation may mediate mate-choice between incipient species of *Anopheles gambiae* s.s. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.
- SANTOS-NETO, L. G. DOS; LOZOVEI, A. L. **Aspectos ecológicos de *Anopheles cruzii* e *Culex ribeirensis* (Diptera, Culicidae) da Mata Atlântica de Morretes, Paraná, Brasil** *Revista Brasileira de Entomologia*, 2008.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 595, n. 3, p. 585–595, 1989.

TAKAHATA, N.; NEI, M. Gene Genealogy and Variance of Interpopulational Nucleotide Differences. **Genetics**, p. 325–344, 1985.

TAUIL, P. et al. A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, 1985.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 275–277, 2006.

TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**, v. 58, p. 163–167, 1998.

THEOBALD, F. V. **A Monograph of the Culicidae or Mosquitoes. Mainly Compiled from the Collections Received at the British Museum from Various Parts of the World (Vol. I)**. [s.l: s.n.].

THEOBALD, F. V. The Classification of the Anophelina. **The Journal of Tropical Medicine**, p. 181–183, 1902.

THOMÉ, M. T. C. et al. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 3, p. 1018–1031, 2010.

THOMPSON, J.; GIBSON, T. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids ...**, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997.

TRIPET, F. et al. Longitudinal survey of knockdown resistance to pyrethroid (KDR) in Mali, West Africa, and evidence of its emergence in the Bamako form of *Anopheles gambiae* s.s. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 1, p. 81–87, 2007.

UENO, H. M.; FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I. Vertical and seasonal distribution of *Anopheles* (*Kerteszia*) in Ilha Comprida, Southeastern Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 41, n. 2, p. 269–275, 2007a.

UENO, H. M.; FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I. Distribuição vertical e sazonal de *Anopheles* (*Kerteszia*) em Ilha Comprida, SP. Vertical and seasonal distribution of *Anopheles* (*Kerteszia*) in Ilha Comprida, Southeastern Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 41, n. 2, p. 269–275, 2007b.

VALDEZ, L.; D'ELÍA, G. Differentiation in the Atlantic Forest: phylogeography of *Akodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae) and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia. **Journal of Mammalogy**, v. 94, n. 4, p. 911–922, 2013.

VASCONCELOS, T. S. et al. Biogeographic Distribution Patterns and Their Correlates in the Diverse Frog Fauna of the Atlantic Forest Hotspot. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104130, 2014.

VELOSO, H.; MOURA, J.; KLEIN, R. Delimitação ecológica dos anofelíneos do subgênero *Kerteszia* na região costeira do sul do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo** ..., p. 517–534, 1956.

VELOSO, R. B.; RANGEL FILHO, A. L. R.; A, L. J. C. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: [s.n.].

WAKELEY, J. The variance of pairwise nucleotide differences in two populations with migration. **Theoretical population biology**, v. 49, n. 0002, p. 39–57, 1996.

WHITE, G. *Anopheles gambiae* Complex and Disease Transmission in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 278–298, 1974.

WIENS, J. J.; SERVEDIO, M. R. Species delimitation in systematics : inferring diagnostic differences between species. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 267wiens, n. November 1999, p. 631–636, 2000.

WILKERSON, R.; PEYTON, E. The Brazilian malaria vector *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzei*: life stages and biology (Diptera: Culicidae). **Mosquito Systematics**, v. 23, n. 2, p. 110–122, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Implementation of the global malaria control strategy. Report of a WHO Study Group on the Implementation of the Global Plan of Action for Malaria Control 1993-2000**. World Health Organization - Technical Report Series, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report** Nature, 8 ago. 2013.

YAMASAKI, T. et al. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. **Journal of medical primatology**, v. 40, n. 6, p. 392–400, dez. 2011.

ZACHOS, F.; HABEL, J. **Biodiversity Hotspots: Distribution and Protection of Conservation Priority Areas**. [s.l.] Springer, 2011.

ZAVORTINK, T. J. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXIX. A Review of the SubGenus *Kerteszia* of *Anopheles*. **Contrib. Amer. Ent. Inst.**, v. 9, n. 3, 1973.





