



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Iara Carolini Pinheiro

**Genética populacional de *Anopheles bellator*, um dos principais vetores de
bromélia-malária na Mata Atlântica**

Florianópolis

2023

Iara Carolini Pinheiro

**Genética populacional de *Anopheles bellator*, um dos principais vetores de
bromélia-malária na Mata Atlântica**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador(a): Prof.(a) Luísa Damazio Rona Pitaluga, Dr.(a)

Florianópolis

2023

Pinheiro, Iara Carolini

Genética Populacional de *Anopheles bellator*, um dos principais vetores de bromélia-malária na Mata Atlântica / Iara Carolini Pinheiro ; orientadora, Luísa Damazio Rona Pitaluga, 2023.

105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator*. 3. Filogenia . 4. Genética Populacional . 5. Evolução. I. Damazio Rona Pitaluga, Luísa . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Iara Carolini Pinheiro

Genética populacional de *Anopheles bellator*, um dos principais vetores de bromélia-malária na Mata Atlântica

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 14 de julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Norma Machado, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Guilherme De Toledo e Silva, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Carlos José de Caralho Pinto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Guilherme de Rezende Dias, Dr.
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação
Prof.(a) Juliana Dal-Ri Lindenau, Dr.(a)



Prof.(a) Luísa Damazio Rona Pitaluga, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre colocaram meus estudos em primeiro lugar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina por me proporcionar todos esses anos de aprendizados e experiências, pôr em muitos dias ter sido minha casa. Tenho orgulho de ter escolhido e permanecido nesta instituição. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento e todos os professores que participaram desta dissertação, seja através das aulas ou conversas didáticas pelos corredores. Agradeço ao UNIEDU pela bolsa de fomento, sem qual não teria sido possível o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca Prof.^a Dr.^a Norma Machado, Prof. Dr. Carlos José Pinto, Prof. Dr. Guilherme De Toledo e Dr. Guilherme Rezende por aceitarem o convite para avaliar este trabalho. A contribuição de todos será de extrema importância para finalização deste trabalho e de trabalhos futuros.

Agradeço ao Laboratório Rona-Pitaluga e todos os seus membros que me acolheram e me proporcionaram aprendizados que levarei comigo. Em especial a professora Luísa Rona que foi uma excelente professora e orientadora, participou ativamente de todo o processo. Certamente esse trabalho e tudo que aprendi não teria sido possível sem ela. Agradeço também ao professor André Pitaluga por todo o aprendizado e, principalmente, pelos ensinamentos de coleta. Aos amigos que aqui fiz aqui, André Akira, Sabrina Fernandes, Natália Valério e João Victor, muito obrigada por toda a parceria, todos os cafés que tomamos juntos e todas as conversas, científicas ou não, que tivemos. É reconfortante saber que tenho amigos tão especiais como vocês. Certamente, trabalhar em um laboratório tão unido quanto o nosso faz toda diferença.

Agradeço à minha família, aos meus pais, principalmente, por sempre incentivarem meus estudos e por terem me bancado quando eu estava sem bolsa, proporcionando minha dedicação exclusiva ao mestrado. Agradeço ao meu amigo Bernardo Cima, que mesmo de longe se fez presente. Agradeço aos amigos que conheci durante esse período e que levarei para vida, Andressa, Gabriel Cipriani, Leonardo, Matheus Paqui, Tainara e Isabela, vocês tornaram todo esse processo divertido e prazeroso. Obrigada.

Nada na Biologia faz sentido exceto à luz da Evolução. (DOBZHANSKY,
Theodosius, 1973)

RESUMO

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles*. No ano de 2021 ocorreram aproximadamente 247 milhões de casos de malária no mundo, resultando em 619 mil mortes. Dos 247 milhões de casos, 163 mil ocorreram no Brasil, que possui dois sistemas principais de transmissão da malária, um relacionado à floresta amazônica que abriga mais de 90% dos casos, e outro associado à Mata Atlântica, onde as principais espécies envolvidas na transmissão da doença são *Anopheles cruzii* e *Anopheles bellator*. Acredita-se que *An. bellator*, assim como *An. cruzii*, sejam um complexo de espécies crípticas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi esclarecer a estrutura genética populacional da espécie *An. bellator* neste bioma. Os mosquitos foram coletados no Município de Camacan e na Ilha de Itaparica no Estado da Bahia, em Ilha Grande, Município de Angra dos Reis no Estado do Rio de Janeiro e no Município de Florianópolis em Santa Catarina. Amostras do Município de Cananéia (São Paulo), Município de Antonina e Ilha do Mel (Município de Paranaguá, Paraná) foram incluídas para complementar as análises. Os mosquitos foram identificados morfológicamente e fotografados individualmente. O DNA das amostras foi extraído individualmente e um fragmento do gene COI foi amplificado, purificado e enviado para sequenciamento através do método Sanger. Com base nas sequências obtidas foram realizadas as identificações moleculares nos bancos de dados BOLD e NCBI, calculadas as medidas intra e inter-populacionais, a montagem da rede de haplótipos e árvore filogenética. Os mosquitos foram identificados morfológicamente como *An. bellator*. Os mosquitos de Camacan (BA) apresentaram o maior nível de divergência genética em todas as análises deste trabalho quando comparado com as demais populações, apresentando baixa porcentagem de identificação molecular com a espécie *An. bellator* (93 – 95%), altos valores de F_{ST} (0,9) e isolamento na rede de haplótipos e árvores filogenéticas, além de apresentarem uma pequena diferença na coloração das patas. A população presente em Itaparica (BA) também apresentou diferenças significativas em relação as populações do Sul e Sudeste (F_{ST} : ~ 0,75) e da população de Camacan (F_{ST} : 0,89). Diferentes de outros trabalhos, encontramos um alto valor de F_{ST} entre a população de Ilha Grande (RJ) quando comparada com as demais populações do Sul e Sudeste (~0,8), levando ao isolamento desta população na árvore filogenética e rede de haplótipos. Com base nos resultados deste trabalho, concluímos que há pelo menos quatro espécies de *An. bellator* na Mata Atlântica, duas localizadas no Estado da Bahia, uma em Camacan e outra em Itaparica, uma espécie distribuída no Sul (Paraná e Florianópolis) e a quarta população em Ilha Grande (Rio de Janeiro). Segundo o teste de Mantel, as diferenças genéticas encontradas neste trabalho não podem ser explicadas com base na distância geográfica entre as populações. Portanto, acredita-se que os diferentes nichos ecológicos nos quais as espécies habitam e as mudanças paleoclimáticas, podem ter ocasionado a ausência de fluxo gênico e, conseqüentemente, o processo de especiação dessas espécies.

Palavras-chave: *Anopheles (Kerteszia) bellator*; Citocromo C Oxidase (COI); Complexo de espécie; Filogenia.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease caused by protozoaires of the genus *Plasmodium*, that is transmitted by mosquitoes of genus *Anopheles*. According to World Health Organization, in 2021 there were around 247 million malaria cases in the World, causing 619 thousand deaths. Of the 247 million malaria cases, 163 thousand occurred in Brazil, which has two main systems of malaria transmission, one in the Amazon Forest, with 90% malaria cases, and the other in the Atlantic Forest, where the main species involved in malaria transmission is *Anopheles cruzii* and *Anopheles bellator*. Some studies have suggested that *An. bellator* is a specie complex, as well as *An. cruzii*. The purpose of this study was to clarify the populational structure genetic of *An. bellator* specie in this biome. The mosquitoes were captured in: Camacan and Itaparica (Bahia), Ilha Grande (Rio de Janeiro) and Florianópolis (Santa Catarina). Samples of Cananéia (São Paulo), Antonina and Ilha do Mel (Paraná) was included to complement the analyzes. The mosquitoes were identified based on their morphology and each mosquito was individually photographed. The DNA was extracted from each mosquito and the gene COI fragment was amplified by *PCR*, purified, and sequenced by the Sanger method. Sequences from the COI gene were used for molecular identification in NCBI and BOLD database, to calculate intra-population and inter-populational statistics, haplotype network and phylogenetic trees were constructed. Camacan mosquitoes (BA) showed a high level of genetic differentiation in all analyses when compared to other populations, with the lowest molecular identification values with *An. bellator* specie (93 – 95%), the highest F_{ST} values (0.9), and the formation of group isolate in haplotype network and phylogenetic trees. The Itaparica population (BA) also showed a significant genetic differentiation when compared to southern and southeast populations (F_{ST} : ~0.75) and the Camacan population (F_{ST} : 0.89). This study shows for the first time a higher F_{ST} value between the Ilha Grande population and other south and southeast populations (~0.8), leading to the isolation of these mosquitoes in the haplotype network and phylogenetic trees. Evidence was presented here suggesting the existence of at least four *An. bellator* specie in Atlantic Forest, two species in Bahia State, one in Camacan and the other in Itaparica, one specie distributed in the south (Paraná e Florianópolis), and the fourth population in Ilha Grande (Rio de Janeiro). According to the Mantel test, the differences genetics found in this study cannot be explained by the geographic distance between the population. Therefore, the different ecological niches that species inhabit, and the paleoclimate changes may have caused the absence of gene flow and, consequently, the speciation process of these species.

Keywords: *Anopheles (Kerteszia) bellator*; *Cytochrome C Oxidase* (COI); Specie complex; Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida dos protozoários de gênero <i>Plasmodium spp.</i> O ciclo de vida é composto pela fase assexuada, na qual o protozoário se desenvolve no hospedeiro vertebrado, e a fase sexuada, onde os protozoários se reproduzem no inseto vetor.....	18
Figura 2 – Mapa representando as localizações das amostras de <i>An. bellator</i> utilizadas neste estudo em quatro Estados do Brasil (SC: Santa Catarina, PR: Paraná, SP: São Paulo, RJ: Rio de Janeiro, BA: Bahia).	32
Figura 3 – Mapa com os pontos onde foram realizadas as coletas de <i>Anopheles bellator</i> em Florianópolis, Santa Catarina.....	40
Figura 4 – Figura mostrando a região da cabeça e tórax de uma fêmea e um macho da espécie <i>Anopheles bellator</i> (1: palpos / 2: probóscides).	42
Figura 5 – Escudo de <i>Anopheles bellator</i> . A: Imagem do escudo completo. B: Escudo ampliado e listras numeradas de 1 a 4. C: Desenho ilustrativo do escudo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).....	43
Figura 6 – Pata pertencente ao terceiro par (posterior) de <i>Anopheles bellator</i> com o último tarso (V) completamente preto. A: imagem da terceira pata completa. B: imagem da pata ampliada, com foco no último tarso. C: Desenho ilustrativo da pata (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).....	43
Figura 7 – Fotografias dos caracteres morfológicos para identificação do gênero, subgênero, espécie e sexo de mosquitos Anophelinos de Itaparica (Macho) e Camacan (Fêmea)) – BA, utilizados nesse estudo.	44
Figura 8 – Fotografias dos caracteres morfológicos para identificação do gênero, subgênero, espécie e sexo de mosquitos Anophelinos de Ilha Grande – RJ (Fêmea) e Florianópolis – SC (Fêmea) utilizados nesse estudo.....	45
Figura 9 – Imagem ilustrativa da comparação de coloração da veia R4+5 nas espécies <i>Anopheles bellator</i> , <i>Anopheles cruzii</i> e <i>Anopheles homúnculos</i>	46
Figura 10 – Análise da proporção de branco e preto na veia R4+5 nas asas dos mosquitos <i>Anopheles bellator</i> presentes na Mata Atlântica.	47
Figura 11 – Comparação morfológica da última pata de mosquitos da espécie <i>An. bellator</i> das populações analisadas no estudo.	48

Figura 12 – A presença de uma mancha clara basal é o caráter morfológico usado para diferenciar <i>An. minimus</i> (A) e <i>An. harrisoni</i> (B) na Tailândia. A mancha está presente apenas em <i>An. harrisoni</i> (seta).....	49
Figura 13 – Teste de padronização dos primers mitocondriais KERT 1, KERT 2, UEA e KUM em gel de agarose 1% com amostras de <i>Anopheles bellator</i>	50
Figura 14 – <i>PCR</i> realizada com o par de <i>primers</i> KERT 1 nas amostras de <i>Anopheles bellator</i> (C-: controle negativo, PM: peso molecular).....	51
Figura 15 – Produto de <i>PCR</i> após a purificação do DNA demonstrando que não houve perda do material genético durante o processo de purificação.	51
Figura 16 – Árvore de máxima verossimilhança das sequências de <i>Anopheles bellator</i> , utilizando um fragmento do gene COI, obtida com o modelo evolutivo <i>TPM+F+I</i>	55
Figura 17 – Rede de haplótipos de sequências do gene mitocondrial COI para as populações de Florianópolis (SC), Ilha do Mel e Antonina (PR), Ilha Grande (RJ), Camacan e Itaparica (BA). O tamanho de cada círculo é proporcional à frequência do haplótipo. A numeração entre parênteses corresponde à quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos.....	57
Figura 18 – Árvores filogenéticas com os genes <i>timeless</i> e <i>Clock</i> do trabalho de Voges <i>et al.</i> (2019).	58
Figura 19 – Árvore de máxima verossimilhança das sequências de <i>Anopheles bellator</i> , utilizando um fragmento do gene <i>timeless</i> , obtida com o modelo evolutivo <i>TNe+G4</i>	61
Figura 20 – Árvore de máxima verossimilhança das sequências de <i>Anopheles bellator</i> , utilizando um fragmento do gene <i>Clock</i> , obtida com o modelo evolutivo <i>TNe+G4</i>	63
Figura 21 – Mapa topográfico do Estado da Bahia mostrando a diferença de altitude entre Itaparica e Camacan.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – *Primers* utilizados para padronização da amplificação de um fragmento do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase I* (COI) em *Anopheles bellator*.34

Quadro 2 – Amostras coletadas neste estudo e suas respectivas informações sobre identificação, sexo, localidade, coordenadas e o método de captura do mosquito.....38

Quadro 3 – Amostras utilizadas neste estudo que já estavam com o DNA extraído no laboratório e suas respectivas informações sobre identificação, sexo, localidade, coordenadas e método de captura do mosquito.39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação de <i>PCR (Polymerase Chain Reaction)</i> e suas respectivas quantidades/concentrações para 1 (uma) amostra. ...	35
Tabela 2 – Porcentagem de similaridade com as sequências de <i>Anopheles bellator</i> obtidas nos bancos de dados <i>BOLD Systems (Barcode of Life)</i> e <i>NCBI (National Center for Biotechnology Information)</i>	52
Tabela 3 – Medidas intrapopulacionais do gene <i>COI</i> das populações de <i>Anopheles bellator</i> analisadas.....	65
Tabela 4 – Medidas inter-populacionais entre as populações de <i>Anopheles bellator</i> analisadas utilizando o gene <i>COI</i>	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	MALÁRIA	16
1.2	<i>PLASMODIUM</i> SPP.....	17
1.3	GÊNERO <i>ANOPHELES</i> MEIGEN, 1818.....	19
1.4	SUBGÊNERO <i>KERTESZIA</i> THEOBALD, 1905	19
1.5	COMPLEXOS DE ESPÉCIES NO GÊNERO <i>ANOPHELES</i> MEIGEN, 1818 20	
1.5.1	<i>Anopheles Gambiae sensu lato s.l.</i>	21
1.5.2	<i>Anopheles funestus s.l.</i>	22
1.5.3	O complexo <i>Anopheles cruzii</i>	23
1.5.4	<i>Anopheles bellator</i>, um complexo de espécies crípticas?.....	25
1.6	<i>CITOCROMO C OXIDASE I</i> (COI) E A TÉCNICA DE DNA BARCODING ..26	
1.7	<i>CITOCROMO C OXIDASE</i> (COI) E SUA UTILIZAÇÃO EM COMPLEXOS DE ESPÉCIES E GENÉTICA POPULACIONAL	27
1.8	OBJETIVOS	30
1.8.1	Objetivo Geral.....	30
1.8.2	Objetivos Específicos	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1	COLETA, PROCESSAMENTO E REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS AMOSTRAS	31
2.2	AMOSTRAS INCLUÍDAS NESTE TRABALHO.....	31
2.3	EXTRAÇÃO DE DNA.....	32
2.4	PADRONIZAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	34
2.5	AMPLIFICAÇÃO DO DNA	35
2.6	ELETROFORESE DO PRODUTO DE <i>PCR</i>	36
2.7	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	36
2.8	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	36
2.9	ANÁLISES POPULACIONAIS	37
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1	COLETA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS NESTE ESTUDO 38	
3.2	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	41

3.3	ENSAIOS MOLECULARES	50
3.4	ANÁLISES MOLECULARES.....	52
3.5	FILOGENIAS.....	54
3.6	ANÁLISE INTRA-POPULACIONAL	65
3.7	ANÁLISE INTER-POPULACIONAL	66
4	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles*, e que ocorre em 91 países de regiões tropicais e subtropicais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Evidências mostram que a malária é uma doença antiga, tendo suas primeiras descrições encontradas em antigos registros médicos chineses de 7.700 a.C. Antigamente, acreditava-se que a doença era causada por forças sobrenaturais e divinas como forma de castigo a população. Posteriormente, no século VI a.C., Hipócrates descreveu a doença como consequência da inalação da fumaça gerada pela evaporação dos pântanos. Entretanto, apenas em 1880, o cirurgião Charles Laveran observou pela primeira vez o agente causador da doença no sangue de pacientes com malária. Além de observar o parasita, o médico conseguiu identificar as diferentes fases do ciclo de vida na sua fase assexuada. Essa descoberta resultou em sua premiação no Nobel em 1907 (ADITYA *et al.*, 2013; TALAPKO *et al.*, 2019). Ainda hoje, após mais de 100 anos do descobrimento do parasita causador da malária por Laveran, essa doença continua sendo um grande problema de saúde global. Segundo a *World Health Organization* (2022), no ano de 2021, ocorreram aproximadamente 247 milhões de casos de malária no mundo e 619 mil óbitos, em sua maioria crianças menores de 5 anos.

Os sintomas da malária pode ser leves, como uma febre branda e sem complicações. Nesses casos, o próprio sistema imunológico do corpo consegue combater a infecção. Em outros casos, a doença pode se manifestar com febres altas, podendo levar a complicações e, conseqüentemente, a óbito. Crianças com menos de 5 anos são mais suscetíveis à doença, enquanto em adultos, crianças maiores e adolescentes, as manifestações clínicas e a probabilidade de agravamento da doença são mais incomuns, sugerindo que as pessoas que vivem em áreas endêmicas desenvolvem imunidade adquirida ao longo do tempo. Desta forma, diversas infecções assintomáticas podem ocorrer durante a vida de um único indivíduo e, conseqüentemente, esse indivíduo tornar-se um reservatório do parasita, auxiliando na manutenção da doença na região (HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011; MILLER *et al.*, 2013).

Se não tratada, a doença pode persistir de três a cinco anos e, dependendo da espécie de protozoário, pode regredir. Permanência assintomática do protozoário no corpo do hospedeiro (em diferentes estágios de vida) já foi verificada em infecções causadas por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*, e isso pode levar a recidiva da doença meses ou anos após a primeira infecção (MILLER *et al.*, 2013).

Em 1950 a Organização Mundial da Saúde e outras organizações internacionais assumiram o compromisso de erradicar a malária no mundo, e para isso têm empregado uma série de medidas de combate aos parasitas e vetores. Para combater mosquitos adultos, foram utilizados diferentes métodos, como o uso de inseticidas, sendo o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) o mais eficiente, além de redes/mosquiteiros tratadas com inseticidas (ITNs), redes/mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração (LINs), pulverização residual interna (IRS), pulverização espacial e óleos/cremes repelentes. Além do combate aos adultos, métodos visando o controle de larvas também foram utilizados, como ovitrampas, ovitrampas com regulador de crescimento de insetos e larvicidas (KROGSTAD, 1996; RAGHAVENDRA *et al.*, 2011). Para que os programas de combate à malária sejam eficientes, é preciso identificar corretamente os vetores. No entanto, essa tarefa pode ser difícil, já que é comum haver complexos de espécies crípticas no gênero *Anopheles* (LOUGHLIN, 2020).

1.2 *PLASMODIUM* SPP.

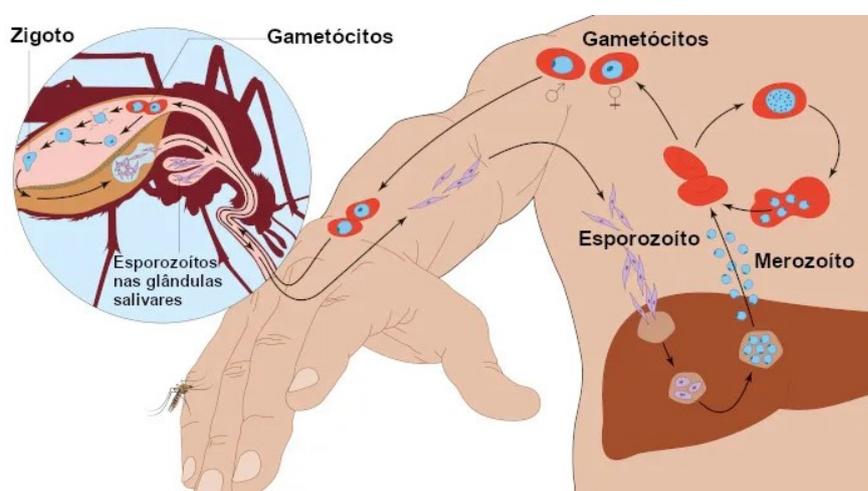
O gênero *Plasmodium* abriga mais de 120 espécies, dentre elas parasitas de aves, mamíferos e répteis, onde apenas seis são responsáveis por infectar humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium cynomolgi* (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018; HARTMEYER *et al.*, 2019). No Brasil, três espécies de *Plasmodium* são predominantemente relacionadas às infecções humanas, sendo elas *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (MULTINI; WILKE; MARRELLI, 2020). O ciclo de vida do *Plasmodium* (Figura 1) é composto por duas fases, a fase assexuada, onde encontra-se em um hospedeiro vertebrado, e a fase sexuada, na qual habita um hospedeiro invertebrado, o mosquito (SCHUSTER, 2002).

Na fase assexuada, tendo como exemplo o hospedeiro humano, após ser picado por um mosquito infectado, o hospedeiro é inoculado por muito esporozoítos de uma ou mais espécies de *Plasmodium*. Esses esporozoítos têm como alvo

células do fígado e permanecem nelas durante o período de maturação até tornarem-se trofozoítos e, posteriormente, esquizontes multinucleares que darão origem a uma grande quantidade de merozoítos. Os merozoítos por sua vez, sairão das células hepáticas para a corrente sanguínea infectando as hemácias. A partir do momento que ocorre a infecção das células sanguíneas, inicia-se de fato a fase assexuada, conhecida como ciclo esquizogônico. O tempo até a infecção das células sanguíneas (ciclo esquizogônico) pode variar semanas, meses e até anos. Uma vez que as células sanguíneas estão infectadas por gametócitos (forma sexuais), o hospedeiro torna-se um reservatório do parasita e tem a capacidade de infectar mosquitos (HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011; CASTELLI; TOMASONI, 2022).

A partir do momento que o mosquito faz o repasto sanguíneo de um hospedeiro infectado, ingerindo as formas sexuais, inicia-se a fase sexuada do ciclo, conhecida como ciclo esporogônico. O ciclo inicia-se no intestino do mosquito, onde ocorre a formação do zigoto e do oocineto, e no espaço celomático, onde oocistos contendo uma grande quantidade de esporozoítos migram para as glândulas salivares, podendo ser transmitidos para novos hospedeiros durante a alimentação (HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011; CASTELLI; TOMASONI, 2022).

Figura 1 – Ciclo de vida dos protozoários de gênero *Plasmodium* spp. O ciclo de vida é composto pela fase assexuada, na qual o protozoário se desenvolve no hospedeiro vertebrado, e a fase sexuada, onde os protozoários se reproduzem no inseto vetor.



Fonte: (SANTOS, [s. d.]

Disponível em: < <https://mundoeducacao.uol.com.br/doencas/malaria.htm> > Acesso em: 21 jan. 2023.

1.3 GÊNERO *ANOPHELES* MEIGEN, 1818

O gênero *Anopheles* Meigen, 1818 é um dos três gêneros que compõem a subfamília *Anophelinae*, junto com *Bironella* Theobald, 1905 e *Chagasia* Cruz, 1906. Atualmente, o gênero *Anopheles* conta com, aproximadamente, 500 espécies, sendo o gênero mais abundante da família *Anophelinae* (KRZYWINSKI; BESANSKY, 2003) (KARIMIAN *et al.*, 2014).

Assim como os outros membros da subfamília *Anophelinae*, esses mosquitos adultos, tanto machos quanto fêmeas, possuem os palpos maxilares do mesmo comprimento probóscide e antenas mais curtas com presença de pelos. O dimorfismo sexual verifica-se através das antenas, pois os machos possuem antenas com um maior número pelos e mais longos do que as fêmeas. Diferente de outros Culicídeos, as larvas não apresentam sifão respiratório no segmento VIII, desta forma, assumem postura horizontal na superfície da água. Já os adultos, ao posarem sob alguma superfície, mantêm a probóscide e o corpo em linha reta (OSWALDO PAULO FORATTINI, 2002). As fêmeas possuem hábitos hematófagos, ou seja, alimentam-se de sangue, e é nesse momento que ocorre tanto a transmissão do protozoário para o hospedeiro, quanto a própria infecção da fêmea com o parasita. Os mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles* diferem em sua morfologia dos demais mosquitos da subfamília *Anophelinae* por possuírem um escutelo arredondado na margem superior (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; SHAW; MARCENAC; CATTERUCCIA, 2022). Eles possuem ampla distribuição, sendo encontrados em todas as regiões biogeográficas, principalmente em zonas tropicais. As espécies desse gênero estão distribuídas em sete subgêneros: *Anopheles* Meigen, 1818, *Cellia* Theobald, 1902, *Stegomyia* Theobald, 1902, *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902, *Kerteszia* Theobald, 1905, *Lophopodomyia* Antunes, 1937 e *Baimaia* Harbach, 2005 (FORATTINI, 2002; HARBACH; RATTANARITHIKUL; HARRISION, 2005; KARIMIAN *et al.*, 2014).

1.4 SUBGÊNERO *KERTESZIA* THEOBALD, 1905

O subgênero *Kerteszia* Theobald, 1905 é composto por 12 espécies formalmente reconhecidas, sendo elas: *Anopheles auyantepuiensis*, *Anopheles bambusicolus*, *Anopheles bellator*, *Anopheles boliviensis*, *Anopheles cruzii*, *Anopheles gonzalezrincones*, *Anopheles homunculus*, *Anopheles laneanus*, *Anopheles lepidotus*, *Anopheles neivai*, *Anopheles pholidotus* e *Anopheles rollai*.

Elas estão distribuídas desde o Sul do México, passando pela América Central e em toda a América do Sul, tanto na costa do Pacífico quanto do Atlântico, estando ausente apenas nas Ilhas das Índias Ocidentais (exceto Trinidad e Tobago) e em grande parte da Amazônia (MULTINI; WILKE; MARRELLI, 2020). As espécies pertencentes a esse subgênero preferem florestas úmidas e ricas em plantas da família Bromeliaceae, como por exemplo a Mata Atlântica, pois as fêmeas depositam seus ovos na água acumulada nas axilas foliares destas plantas. Sendo assim, quanto maior a quantidade de bromélias e de umidade, maior a densidade populacional de anofelinos do subgênero *Kerteszia*. Faz exceção a essa regra *An. bambusicolus* que deposita seus ovos na água encontrada nos internódios de bambus. Os mosquitos deste subgênero possuem algumas características próprias como, são de pequeno porte, quando comparado com os demais anofelinos, possuem um escudo com quatro faixas escuras longitudinais e pernas aneladas em branco e preto (OSWALDO PAULO FORATTINI, 2002; MULTINI; WILKE; MARRELLI, 2018).

Na região de Mata Atlântica, as principais espécies envolvidas na transmissão de malária são *An. cruzii* e *An. bellator*, onde o primeiro também é considerado vetor natural de malária simiana. *Anopheles cruzii* se distribui do Sul (Rio Grande do Sul) ao Nordeste (Sergipe) do Brasil, seguindo a área de Mata Atlântica (ZAVORTINK, 1973). Além do território nacional, a espécie já foi notificada no sudeste da Venezuela (BERTI *et al.*, 2015). A distribuição geográfica de *An. bellator* é semelhante à de *An. cruzii*, onde a espécie ocorre do leste da Venezuela até o Sul do Brasil. Entretanto, não há registros da espécie em alguns estados costeiros do Norte e Nordeste, como Pará, Piauí, Maranhão e Ceará, apresentando distribuição descontínua dentro do território nacional (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2003).

1.5 COMPLEXOS DE ESPÉCIES NO GÊNERO *ANOPHELES* MEIGEN, 1818

Os complexos de espécie crípticas são comuns dentro do gênero *Anopheles* (LOUGHLIN, 2020). Espécies crípticas são aquelas onde duas ou mais espécies possuem a mesma morfologia, não sendo possível realizar a identificação através dos seus caracteres morfológicos com o uso das chaves disponíveis. No entanto, mesmo sendo idênticas morfológicamente, as espécies crípticas têm estruturas genéticas bastante distintas, e como resultado, é possível observar diferenças no

comportamento, nos hábitos alimentares e na capacidade vetorial entre elas. Desta forma, temos o seguinte cenário: mosquitos morfologicamente idênticos distribuídos por toda uma região (como por exemplo, o continente africano ou a Mata Atlântica), mas eles não pertencem à mesma espécie e, portanto, têm ecologias diferentes e nem todos são capazes de transmitir a malária. Sendo assim, estudos populacionais que auxiliem a identificação correta das espécies responsáveis pela transmissão da doença se faz necessário para um combate efetivo da malária (ALLGAYER; HILLER; VALIATI, 2021).

1.5.1 *Anopheles Gambiae sensu lato s.l.*

Atualmente, o complexo de espécies mais conhecido e estudado é *Anopheles gambiae sensu lato (s.l.)*. No passado, *An. gambiae* correspondia a uma única espécie e era conhecido como o maior vetor de malária no continente africano, apresentando ampla distribuição geográfica e hábitos ecológicos diversos como, diferentes fontes alimentares, humanos e/ou gado, sendo que a alimentação poderia ocorrer em ambientes abertos ou fechados, assim como seu repouso, as larvas eram depositadas tanto em água doce, quanto em água salgada, e os reservatórios eram de diferentes tipos, como poças de chuva, açudes ou arrozais (COETZEE *et al.*, 2013).

Vários estudos revelaram que os indivíduos pertencentes a *An. gambiae s.l.*, coletados em diferentes regiões do continente africano, demonstram elevado grau de polimorfismo em relação tanto aos caracteres comportamentais quanto aos caracteres moleculares. Hoje, *An. gambiae s.l.* é considerado um complexo de nove espécies crípticas, sendo seis de água doce - *Anopheles gambiae sensu stricto (s.s.)*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles amharicus*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles fontenillei* e *Anopheles quadriannulatus* -, duas espécies de água salgada - *Anopheles melas* e *Anopheles merus* - e uma de água salobra - *Anopheles bwambae* (COETZEE *et al.*, 2013; BARRÓN *et al.*, 2019).

Esses mosquitos estão distribuídos em grande parte do continente africano, por exemplo, *An. gambiae s.s.* já foi registrado na África Ocidental, África Oriental e África Central, estando principalmente em zonas com maior pluviosidade, ao contrário de *An. arabiensis*, que prefere zonas mais secas, estando localizado na África Ocidental, África Oriental e África Setentrional. A espécie *An. quadriannulatus* possui distribuição em todas as regiões do continente, entretanto, os mosquitos que

estão na África Meridional aparentam habitar regiões com um maior número de chuvas, já os mosquitos que estão África Setentrional, habitam regiões com baixo nível de chuvas. Assim como *An. quadriannulatus*, *An. bwambae*, *An. melas* e *An. merus* foram registrados em todas as regiões da África. Até o momento, a presença de *An. amharicus* foi registrada apenas na Etiópia (África Oriental) e *An. fontenillei* apenas em Gabão (África Central) (COETZEE; CRAIG; LE SUEUR, 2000) (COETZEE *et al.*, 2013) (BARRÓN *et al.*, 2019).

Com base nas informações citadas acima, é possível observar que (i) as espécies do complexo *An. gambiae s.l.* possuem ampla distribuição pelo continente africano, (ii) elas conseguem ocupar diferentes nichos ecológicos, (iii) indivíduos de uma mesma espécie conseguem viver em ambientes diferentes dependendo da região que estão, como por exemplo, *An. gambiae s.s.* habita grande parte da África Ocidental, em áreas com grandes volumes de chuva, entretanto, a espécie já foi encontrada em regiões secas da África Setentrional.

Além de habitarem nichos ecológicos diferentes, os mosquitos possuem fontes alimentares diversas, e nem todas são consideradas vetores de malária (COETZEE *et al.*, 2013; BARRÓN *et al.*, 2019). *Anopheles quadriannulatus*, por exemplo, não é considerado vetor da doença, ao contrário das espécies *An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii* e *An. arabiensis* que são os principais vetores em várias regiões da África (HUESTIS; LEHMANN, 2014).

1.5.2 *Anopheles funestus s.l.*

Além de *An. gambiae s.l.*, o continente africano possui outro complexo de espécies do gênero *Anopheles*, o complexo *Anopheles funestus s.l.*, vetor secundário de malária e composto por nove espécies muito semelhantes morfológicamente quando em fase adulta: *Anopheles funestus s.s.*, *Anopheles vaneedeni*, *Anopheles parensis*, *Anopheles aruni*, *Anopheles lesoni*, *Anopheles confusus*, *Anopheles rivulorum*, *Anopheles brucei* e *Anopheles fuscivenosus*. Das espécies que formam o complexo, *An. funestus s.t.* é altamente antropofílico e vetor de malária em toda a sua distribuição. As demais espécies possuem hábitos principalmente zoofílico, portanto, são de baixo impacto na transmissão da doença (COETZEE; FONTENILLE, 2004).

Além de possuírem mais de uma espécie de morfologia igual ou muito semelhante, outra característica comum entre esses complexos é a capacidade

vetorial de seus membros. Nos complexos citados, a capacidade vetorial e fonte alimentar, difere entre as espécies. Os diferentes estudos, sejam eles morfológicos ou moleculares, ajudaram na identificação das espécies e seus hábitos ecológicos. A partir dessas informações, as estratégias de combate aos vetores tornam-se mais eficientes, visto que sabendo quais espécies são verdadeiras transmissoras da doença e suas peculiaridades, pode-se elaborar medidas apropriadas para o combate de cada uma.

1.5.3 O complexo *Anopheles cruzii*

Atualmente, *An. cruzii* é considerado um complexo de espécies crípticas no Brasil. Estudos citogenéticos em populações do Sul e Sudeste do país, sugeriram que *An. cruzii* é um complexo de espécies composto por pelo menos três diferentes grupos, cada um carregando um conjunto diferente de inversões no cromossomo X (RAMÍREZ; DESSEN, 2000). Análises com isoenzimas mostraram que as populações do Estado de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro são geneticamente mais próximas entre si, quando comparadas com a população presente na Bahia (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

Rona *et al.* (2009), utilizando o gene *timeless* mostrou que a população de *An. cruzii* da Bahia apresenta muitas diferenças fixas e baixa quantidade de polimorfismos compartilhados com as populações do Sul e Sudeste. Em seguida, Rona *et al.* (2010), utilizando uma abordagem *multilocus*, verificou que populações de *An. cruzii* da Ilha de Itaparica (BA) e Florianópolis (SC) possuem um alto nível de diferenciação em todos os genes analisados, sendo consideradas espécies diferentes. O estudo ainda mostra que não há fluxo gênico entre as populações desde a sua separação, que aconteceu aproximadamente entre 1,1 e 3,6 milhões de anos atrás.

Posteriormente, Rona; Carvalho-Pinto; Peixoto (2010), analisando repetições de dinucleotídeos em sequências do gene nuclear *cpr* (NADPH citocromo P450 redutase), encontraram um alto valor de diferenças fixas na população de *An. cruzii* presente em Itatiaia (RJ) quando comparada com as populações de Florianópolis (SC), Cananéia (SP), Juquitiba (SP) e Santa Teresa (ES). Além das diferenças com as demais populações do Brasil, os mosquitos de Itatiaia apresentaram diferenças dentro da população, sendo possível separá-la em dois grupos, Itatiaia A e Itatiaia B.

Um estudo mais voltado para a população de *An. cruzii* de Itatiaia (RJ) e Florianópolis (SC) foi realizado a fim de compreender melhor a estrutura populacional destas regiões. O trabalho realizou uma abordagem *multilocus* usando seis genes, sendo três constitutivos e três envolvidos no relógio circadiano. Com base nas análises, foi possível observar altos valores de diferenciação genética entre Florianópolis e Itatiaia para alguns dos *loci* utilizados e uma estimativa de tempo de divergência entre as populações de aproximadamente 0,6 Ma. As análises voltadas apenas para a população de Itatiaia (RJ) mostraram a presença de duas espécies incipientes que vivem em simpatria, Itatiaia A e Itatiaia B, corroborando com os dados de Rona *et al.* (2010). Além disso, o trabalho mostrou que essas duas espécies em Itatiaia se separaram há aproximadamente 0,2 Ma (RONA; CARVALHO-PINTO; PEIXOTO, 2013).

Ferreira (2017), com base nos marcadores mitocondriais COI e ND4, relatou a presença de pelo menos duas espécies crípticas de *An. cruzii* no Nordeste do Brasil, uma estando localizada em Itaparica e outra em Camacan, ambas no Estado da Bahia, e uma terceira espécie irradiando na região Sul e Sudeste. De Rezende Dias *et al.* (2018), utilizando os genes *cpr* e *Clock*, analisaram populações de *An. cruzii* presentes na Serra do Mar e Serra da Mantiqueira e compararam com outras populações do Brasil, como Florianópolis (SC) e Bocaina (SP). O estudo aponta a presença de duas linhagens distintas, uma ocorrendo no lado litorâneo da Serra do Mar, sendo composta por indivíduos de Florianópolis, Tinguá, Sana e Guapimirim, e a outra linhagem estando localizada no interior da Serra do Mar (parte voltada para o continente) e na Serra da Mantiqueira, sendo composto por indivíduos de Itatiaia e Bocaina.

Kirchgatter *et al.* (2020) utilizando os genes COI (*Citocromo c Oxidase I*) e ND4, ambos do DNA mitocondrial, apontou a existência de subpopulações de *An. cruzii*: i) uma na Serra da Cantareira (São Paulo / SP) e ii) outra na Serra do Mar (Caraguatatuba, Campos do Jordão, Itanhaém e São Paulo / SP), iii) e uma terceira população na Serra da Mantiqueira (Itatiaia / RJ).

Com base nos estudos disponíveis, é possível observar que no Brasil o complexo *An. cruzii* é composto por pelo menos cinco espécies distribuídas ao longo da Mata Atlântica. A primeira espécie, possui distribuição ampla no litoral das regiões Sul e Sudeste do país. Ainda na região Sudeste, ao menos duas espécies crípticas são encontradas entre a Serra do Mar e a Serra da Mantiqueira. As duas

últimas espécies estão localizadas no Nordeste do país, uma em Itaparica (BA) e outra em Camacan (BA).

1.5.4 *Anopheles bellator*, um complexo de espécies crípticas?

Na Mata Atlântica, além de *An. cruzii*, alguns estudos sugerem que *An. bellator* seja também um complexo de espécies crípticas. Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2003) com base em estudos utilizando isoenzimas, sugeriram que a população de *An. bellator* da Ilha de Trinidad é geneticamente distante das outras populações brasileiras analisadas provenientes de Florianópolis (SC), Cananéia (SP) e Itaparica (BA), o que pode ser explicado pelo isolamento geográfico entre elas. Já entre as populações brasileiras analisadas, São Paulo e Santa Catarina estão geneticamente mais próximas entre si em comparação com a população da Bahia. Um estudo mais recente encontrou a mesma diferença genética entre mosquitos da espécie *An. bellator* de Trinidad e São Paulo utilizando o gene mitocondrial COI (BOURKE *et al.*, 2023). Voges *et al.* (2019) utilizando os genes *timeless* e *Clock* como marcadores moleculares, relatou que a população de *An. bellator* de Camacan (BA) está distante geneticamente das populações do Sul e Sudeste (Ilha Grande - RJ, Cananéia - SP e Ilha do Mel - PR), corroborando com os resultados de Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2003), e sugerindo assim a existência de dois grupos estruturados na Mata Atlântica, um grupo com distribuição na região Sul e Sudeste, e outro grupo da Bahia.

Apesar dos resultados de Voges *et al.* (2019) estarem de acordo com aqueles encontrados por Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2003), mostrando que as maiores distâncias genéticas são encontradas entre as amostras da Bahia e as outras populações provenientes do Sul e Sudeste do Brasil, a população da Bahia utilizada por Voges *et al.* (2019) (Camacan) fica a 300 Km de distância (sentido Sul) daquela utilizada por Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2003) (Itaparica), o que levanta novas questões como: *An. bellator* é um complexo de espécies crípticas distribuídas na região da Mata Atlântica, composto por pelo menos três espécies distintas, uma formada pelas populações do Sul e Sudeste, e duas presentes na Bahia, estando uma em Camacan e outra em Itaparica? Ou será que *An. bellator* de Camacan pertence ao mesmo grupo de *An. bellator* de Itaparica? Ainda, existem outras espécies de *An. bellator* na Mata Atlântica?

Nossa hipótese é de que *An. bellator* de Camacan seja geneticamente diferente de *An. bellator* da Ilha de Itaparica, já que de acordo com Ferreira (2017) utilizando os genes mitocondriais COI e ND4 em diferentes populações de *An. cruzii*, as comparações entre Ilha de Itaparica e Camacan mostraram altos índices de diferenciação genética ($F_{ST} = 0,60547$ para ND4, e $F_{ST} = 0,93693$ para COI). Levando em consideração os trabalhos de Ferreira (2017), acredita-se que o mesmo processo de especiação de *An. cruzii* nessas duas localidades, pode ter ocorrido também com *An. bellator*, devido a um mesmo evento vicariante, que de acordo com Rona *et al.* (2009) e Rona *et al.* (2010) ocorreu no final do Plioceno entre a população da Ilha de Itaparica e as populações do Sul/Sudeste de *An. cruzii*.

A comparação entre as populações de *An. bellator* provenientes de Camacan e de Itaparica nunca foi realizada. Portanto, estudos populacionais nessas duas regiões do Brasil, juntamente com populações do Sul e sudeste, vão proporcionar um melhor entendimento da estrutura populacional de *An. bellator* ao longo da Mata Atlântica. Esses estudos são essenciais para determinar quais unidades genéticas do complexo são verdadeiros vetores da malária. Informações como essas facilitarão nossa compreensão da epidemiologia da doença no Brasil e auxiliarão na implementação de estratégias de controle dos vetores àquelas espécies que estão realmente envolvidas na transmissão da malária.

1.6 CITOCCROMO C OXIDASE I (COI) E A TÉCNICA DE DNA BARCODING

Até o momento, a maior parte das espécies de mosquitos descritas foi identificada a partir de morfotaxonomia tradicional, usando caracteres morfológicos, como proposto por Linnaeus. Ainda hoje, a maneira mais fácil de identificar um mosquito adulto é através de sua morfologia. Entretanto, além da baixa quantidade de chaves morfológicas detalhadas e profissionais entomológicos qualificados e com conhecimento regional, a grande perda de caracteres morfológicos do animal, como as escamas ou patas, durante a coleta ou armazenamento, dificulta na identificação adequada desses organismos. Outro ponto importante que dificulta a identificação das espécies de mosquitos, é o fato de haver diversos complexos de espécies crípticas com espécies isomórficas. Um outro meio de identificação de espécies é através do cruzamento, onde é possível observar barreiras pré ou pós-zigóticas.

Entretanto, essa metodologia requer o estabelecimento de colônias, o que pode levar algum tempo (BEEBE, 2018).

Desde o século passado (décadas de 70 e 80), o DNA mitocondrial vem sendo vastamente utilizado em estudos populacionais, filogenético e de compreensão biológica e evolutiva de inúmeros seres vivos (MORITZ; DOWLING; BROWN, 1987). A utilização em grande escala desse genoma ocorre devido às suas características genéticas e estruturais, como: tamanho reduzido, possuir apenas 37 genes, sendo 13 codificadores de proteínas, 22 de RNA transportador e 2 de subunidades ribossômicas, apresenta herança materna, não possui recombinação genética (na maioria das vezes), alto número de cópias por células, é um genoma conservado, apresenta uma alta taxa evolutiva quando comparado ao DNA nuclear e está presente em todos os eucariotos (ARIAS; FRANCISCO; SILVESTRE, 2003).

A utilização de um fragmento do gene mitocondrial *Citocromo C Oxidase I* (COI) tem sido amplamente empregada na identificação de espécies e complexos de espécies crípticas através da técnica de DNA *barcoding*. A técnica, proposta por Hebert *et al.* (2003), tem como objetivo utilizar uma região padronizada para a identificação de espécies, conhecida como “DNA *barcode*”, a qual pode ser um gene, pedaço de um gene ou uma região inter-gene. Para grande parte dos metazoários, é utilizado um fragmento do gene COI de, aproximadamente, 655 pares de base (pb), iniciando na base 58 da extremidade 5' do gene (HEBERT *et al.*, 2003). Devido à facilidade e rapidez na identificação de espécies, a utilização de DNA *barcodes* vem se mostrando uma ferramenta de grande importância na conservação da biodiversidade, permitindo a identificação rápida de organismos por outros pesquisadores além do taxonomista. A aplicação do método tem apresentado resultados expressivos na identificação de espécies crípticas, na descoberta de novas espécies e até mesmo de novos táxons (KRESS *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017). Essa região específica do genoma mitocondrial é envolta por sequências bem conservadas quando comparada com os demais genes mitocondriais de animais, tornando-a uma área excelente para anelamento de *primers* universais (FOLMER *et al.*, 1994).

1.7 CITOCROMO C OXIDASE (COI) E SUA UTILIZAÇÃO EM COMPLEXOS DE ESPÉCIES E GENÉTICA POPULACIONAL

A utilização de técnicas baseadas em DNA tem facilitado e ampliado estudos taxonômicos e sistemáticos de mosquitos. O uso do marcador molecular COI, juntamente com a técnica de DNA *barcoding*, tem sido amplamente utilizado na identificação de novas espécies pertencentes a complexos de espécies crípticas.

A variabilidade de polimorfismos no gene COI, possibilitou a identificação de quatro membros do complexo *Anopheles dirus s.l.* na Tailândia, viabilizando as medidas de manejo no controle de malária no país. O complexo *An. dirus s.l.* é composto por 7 espécies, *Anopheles dirus s.s.*, *Anopheles cracens*, *Anopheles scanloni*, *Anopheles baimaii*, *Anopheles nemophilous*, *Anopheles elegans* e *Anopheles takasagoensi*. Das sete espécies que formam o complexo, cinco – *An. dirus*, *Anopheles cracens*, *Anopheles scanloni*, *An. baimaii* e *Anopheles nemophilous* – são idênticas morfológicamente, entretanto, apenas duas, *An. dirus s.s.* e *An. baimaii*, são vetores de malária. As cinco espécies idênticas vivem em regiões diferentes do país, *An. dirus s.s.* é a única com distribuição em todo território tailandês. A semelhança morfológica entre as espécies e as diferentes distribuições no país, tem dificultado o controle de transmissão da malária e a aplicação de medidas específicas de combate à doença (OBSOMER; DEFOURNY; COOSEMANS, 2007; PHUNNGAM *et al.*, 2017).

União das Comores é um arquipélago formado por três ilhas. Essa região é endêmica para malária e no ano de 2010 o país atingiu o recorde no número de casos da doença, onde foram notificados 100.000 casos. As espécies de *Anopheles* encontradas nas Comores são: *An. gambiae s.l.*, *An. merus*, *An. funestus*, sendo consideradas vetores primários de malária, e as espécies *Anopheles mascarensis*, *Anopheles pretoriensis*, *Anopheles coustani* e *Anopheles maculipalpis*, vetores secundários ou não-vetores. Durante o período de coletas a espécie com maior abundância foi *An. pretoriensis* (vetor secundário), entretanto a espécie não possui papel na transmissão de malária nas ilhas bem relatado, porém, em outros pontos da África, a presença de esporozoítos de *P. falciparum* já foi encontrada na espécie. Análises da sequência do gene COI mostrou a presença de 7 haplótipos separados por 9 sítios polimórficos e 1 *singleton*. Apenas um haplótipo, o H1, era compartilhado por todas as populações de *An. pretoriensis* da ilha. A árvore filogenética mostrou que os 7 haplótipos encontrados são únicos de *An. pretoriensis* de Grande Comore, não sendo compartilhados com *An. pretoriensis* da Etiópia, Quênia, Malawi, Moçambique, África do Sul e Zâmbia. A utilização do gene COI ajudou no

conhecimento e compreensão da genética populacional de *An. pretoriensis*, possível vetor de malária na Ilha Grande Comore (CAMPOS *et al.*, 2023).

A utilização de uma região do gene COI auxiliou na identificação e caracterização populacional de *Anopheles stephensis* em Somalilândia. O mosquito *An. stephensis* é vetor de malária e sua distribuição ocorre no Sul da Ásia e no Oriente Médio, incluindo parte da Península Arábica. Contudo, a espécie foi detectada pela primeira vez em Djibouti, África Central, em 2012. Desde então, a presença desses mosquitos já foi registrada na Etiópia, Sudão, Somália e Iêmen. Com base nas sequências do gene COI geradas, foi identificado 3 haplótipos diferentes nas populações de Somalilândia e a partir da árvore filogenética, montada com base no método de Máxima Verossimilhança, foi possível observar um compartilhamento desses haplótipos com mosquitos de Djibouti, Etiópia e Sudão. Os haplótipos compartilhados com mosquitos de Djibouti, Sudão Etiópia, países vizinhos, podem indicar uma origem compartilhada da espécie ou um padrão de movimento dos mosquitos entre essas regiões. Já o compartilhamento de haplótipos com Sri Lanka e Índia, países mais afastados, sugere que *An. stephensis* pode ter se espalhado além das fronteiras do país (ALI *et al.*, 2022).

A espécie *Anopheles algeriensis* possui distribuição na Europa, Ásia e África. Esses mosquitos são capazes de transmitir *Plasmodium spp.*, mas são considerados vetores secundários de malária por possuírem baixa incidência nas regiões. Entretanto, a alta incidência da espécie na Itália, alertou os pesquisadores de um possível surto de malária. Desta forma, a fim de melhor compreender a estrutura populacional desta espécie na Europa, os pesquisadores utilizaram o gene COI em abordagens baseadas em árvores filogenéticas e distâncias para investigar a diversidade genética em seis países da Europa, Itália, Alemanha, Portugal, Romênia, Espanha e Suécia. Os três métodos utilizados para delimitação de espécie (distância genética, árvore filogenética e rede de haplótipos) mostram o mesmo resultado, a presença de 3 possíveis espécies, denominadas A, B e C. A espécie A está presente na Suécia, Romênia, Itália e Alemanha. Já a espécie B, está presente na Romênia e Suécia, vivendo em simpatria com a espécie A. Por último, a espécie C encontra-se em Portugal e Espanha. Com base nesses resultados, o estudo concluiu que *An. algeriensis* é na verdade um complexo de espécies crípticas presente na Europa (MENEGON *et al.*, 2022).

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho é analisar a estrutura genética populacional da espécie *Anopheles bellator* na Mata Atlântica.

1.8.2 Objetivos Específicos

- Realizar coletas de *Anopheles bellator* ao longo de sua distribuição geográfica na Mata Atlântica, incluindo Itaparica e Camacan (Bahia), e em localidades do Sul e Sudeste do Brasil, como em Florianópolis (Santa Catarina), e Ilha Grande (Rio de Janeiro).
- Realizar a identificação morfológica dos mosquitos e registro fotográfico individual dos caracteres morfológicos que os identificam enquanto gênero, subgênero e espécie.
- Amplificar um fragmento do gene *Citocromo C Oxidase I* (COI) em indivíduos de cada população.
- Realizar estudos populacionais e filogenéticos com o fragmento gene *Citocromo C Oxidase I*, com o intuito de analisar a diferenciação genética entre as populações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA, PROCESSAMENTO E REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS AMOSTRAS

Os mosquitos foram coletados no Município de Florianópolis – SC (Latitude: 27° 17' 57" S, Longitude: 48° 21' 23" O), na Ilha Grande – RJ (Latitude: 23° 8' 26" S, Longitude: 44° 14' 50" W), no Município Camacan – BA (Latitude: 15° 25' 09" S, Longitude: 39° 29' 45" W), e na Ilha de Itaparica – BA (Latitude: 13° 7' 04.5" S, Longitude: 44° 16' 29.9" W) (Figura 2).

Foram coletados larvas e adultos da espécie *An. bellator*. Os mosquitos adultos foram capturados no final de tarde e início da noite, utilizando armadilhas do tipo CDC com gelo seco. As larvas foram coletadas com o auxílio de sugadores manuais no acúmulo de água encontrado nas axilas foliares de plantas da família Bromeliaceae.

Após a coleta, as larvas e os mosquitos adultos foram levados ao laboratório. As larvas de *Anopheles* spp. foram mantidas em laboratório em copos de plásticos pequenos contendo água filtrada e alimento de tartaruga triturado. A água era trocada de dois em dois dias. As larvas foram mantidas até atingirem o estágio de adultos, e então foram identificados morfológicamente. Posteriormente à identificação morfológica, os mosquitos foram acondicionados individualmente em microtubos com etanol absoluto e armazenados a -20°C.

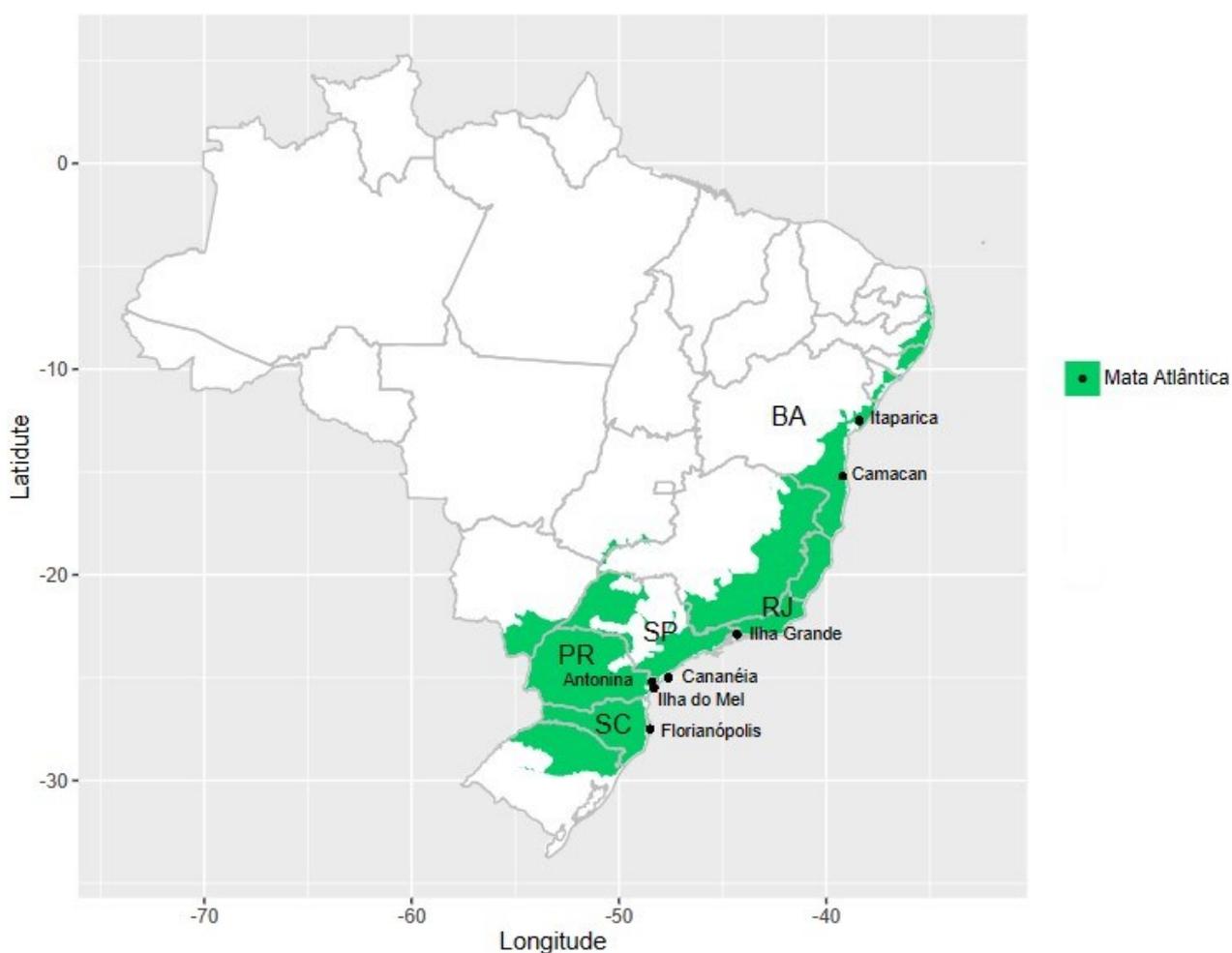
A identificação morfológica dos mosquitos adultos foi realizada com base na chave de Consoli e Lourenço-de-Oliveira, (1994). Após a identificação, todos os mosquitos adultos da espécie *An. bellator* foram fotografados, especialmente os caracteres morfológicos que permitem a identificação do gênero, subgênero, espécie e sexo dos indivíduos, formando um acervo fotográfico de todos os espécimens analisados no estudo. As fotos foram tiradas no Estereomicroscópio SZX16® Olympus® no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB).

2.2 AMOSTRAS INCLUÍDAS NESTE TRABALHO

Além das localidades citadas acima, foram utilizadas amostras de DNA de *An. bellator* de trabalhos anteriores do Laboratório Rona-Pitaluga das seguintes

localidades: Município de Antonina – PR, (Latitude: 25° 25' 43" S Longitude: 48° 42' 43" W), Ilha do Mel – PR (Latitude: 25° 32' 7" S, Longitude: 48° 19' 52" W), Ilha Grande – RJ (Latitude: 23° 8' 26" S, Longitude: 44° 14' 50" W), e Camacan – BA (Latitude: 15° 25' 09" S, Longitude: 39° 29' 45" W). Por último, realizou-se o acréscimo de uma sequência do gene mitocondrial COI de *An. bellator* de Cananéia – SP (Latitude: 25° 00' 53" S, Longitude: 47° 55' 36" W). A sequência está disponível no GenBank, sob o número de acesso KU551287 (OLIVEIRA *et al.*, 2016) (Figura 2).

Figura 2 – Mapa representando as localizações das amostras de *An. bellator* utilizadas neste estudo em quatro Estados do Brasil (SC: Santa Catarina, PR: Paraná, SP: São Paulo, RJ: Rio de Janeiro, BA: Bahia).



Fonte: Elaborado pelo autor em *R software* versão 1.4.1106.

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA genômico, adaptamos um protocolo de extração com base no *kit Puregene Core Kit A* (Qiagen) e no método enzimático não destrutivo de Santos *et al.* (2018), que permite a extração de DNA preservando a morfologia das partes duras dos insetos (por exemplo: exoesqueleto e genitália masculina). O DNA genômico dos mosquitos identificados como *An. bellator* coletados em Florianópolis – SC, Ilha Grande – RJ, Camacan – BA, e Itaparica – BA foi extraído individualmente. Primeiramente, os mosquitos foram acondicionados individualmente em um microtubo esterilizado e devidamente identificado. Em seguida, foi adicionado 100 µl de solução de lise com 1 µl de proteinase K (20 mg/ml) em cada amostra. Posteriormente, as amostras foram incubadas por três dias em banho seco a 45°C. Após o período de três dias, o exoesqueleto dos mosquitos (partes duras) foi retirado, deixando apenas o DNA dentro do microtubo. Posteriormente, as amostras foram incubadas no gelo por 1 minuto. Após a incubação em gelo, foi adicionado 33 µl de solução de precipitação, homogeneizado por inversão e incubado novamente em gelo por 5 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 15.000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos e o pellet foi descartado. No novo microtubo, foram adicionados 0,5 µl de RNase (100 mg/ml) e as amostras foram levadas ao banho seco a 65°C por 15 minutos e, em seguida, a 37°C por mais 15 minutos. As amostras foram retiradas do banho seco e incubadas em gelo por 1 minuto. Em seguida, 33 µl de solução de precipitação foi adicionado em cada amostra e levados ao vórtex por 20 segundos. Posteriormente, as amostras foram incubadas em gelo por mais 5 minutos. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm por 3 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 µl de glycoblu (15 mg/ml) em um novo microtubo e o sobrenadante foi transferido para este tubo. No tubo novo, 100 µl de isopropanol absoluto foi adicionado, seguido de homogeneização por inversão e centrifugação a 16.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet deixado para secar por, aproximadamente, 15 minutos. Em seguida, 100 µl de etanol 70% foi adicionado, seguido da inversão do tubo manualmente para lavar o DNA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm por 1 minuto e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando o pellet secar em temperatura ambiente por, aproximadamente, 10 a 15 minutos. Para finalização, foi adicionado 50 µl de solução de hidratação de DNA e incubado a 65°C por 1 hora. Após a incubação, as amostras

ficaram em temperatura ambiente *overnight*. Após a extração, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

2.4 PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS

Foram testados quatro pares de primers para amplificação da região do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase I* (COI) em *An. bellator*. Os primers KUM, proposto por Kumar *et al.* (2007), foi desenhado para mosquitos em geral (mais de 60 espécies de 15 gêneros, incluindo espécies do gênero *Anopheles*), e visa à amplificação da região de *barcode* do gene COI com aproximadamente 685 pb. Com base nesses primers, desenhamos um novo par de primers degenerado, o KERT 1, apenas para espécies do subgênero *Kerteszia*.

O terceiro primer, UEA, foi proposto por Zhang; Hewitt (1997) para amplificação de um fragmento do gene COI em insetos em geral. A região amplificada possui aproximadamente 640 pb e está adjacente e a jusante da região de *barcode* proposta por Kumar *et al.* (2007). A partir dos primers UEA, desenhamos o quarto par de primers chamado KERT 2, também degenerado para espécies do subgênero *Kerteszia*. As sequências nucleotídicas dos quatro pares de primers estão no Quadro 1.

Quadro 1 – *Primers* utilizados para padronização da amplificação de um fragmento do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase I* (COI) em *Anopheles bellator*.

PRIMERS		
KUM	Kum07-F	5' GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CCT T 3'
	Kum07-R	5' AAA AAT TTT AAT TCC AGT TGG AAC AGC 3'
KERT 1	COI_KERT1-F	5' GAG GAT TYG GAA ATT GAT TAG TTC C 3'
	COI_KERT1-R	5' AAA AAT YTT AAT TCC TGT TGG YAC AGC 3'
UEA	UEA-7	5' TAC AGT TGG AAT AGA CGT TGA TAC 3'
	UEA-10	5' TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A 3'
KERT 2	COI_KERT2-F	5' TAC AGT TGG RAT AGA YGT RGA TAC 3'
	COI_KERT2-R	5' TTC ATT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A 3'

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.5 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

A amplificação de fragmentos do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase I* (COI), foi realizada com os primers degenerados COI_KERT1-F: 5' GAG GAT TYG GAA ATT GAT TAG TTC C 3' (*Forward*) e COI_KERT1-R: 5' AAA AAT YTT AAT TCC TGT TGG YAC AGC 3' (*Reverse*), através da técnica de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*). Os reagentes utilizados nas reações de *PCR* e suas respectivas quantidades/concentrações estão descritos na Tabela 1. Controles negativos (sem adição de DNA) e controles positivos (DNA de uma amostra de *Kerteszia* na qual o fragmento de interesse já foi amplificado e sequenciado) foram usados em todas as reações de amplificação.

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) e suas respectivas quantidades/concentrações para 1 (uma) amostra.

Reagentes	Quantidades (μ l)
H ₂ O Mili-Q	21,0
Buffer (5X)	8,0
MgCl ₂ (25 mM)	4,0
dNTP (10 mM)	0,8
Primer Foward (10 μ M)	2,0
Primer Reverse (10 μ M)	2,0
GoTaq G2 Hot Start Polymerase (5U/ μ l)	0,2
DNA (20 a 100 ng/ μ l)	2,0
TOTAL	40,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

O programa de temperatura consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 9 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 47°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, terminando com uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Entretanto, diferentes temperaturas de anelamento foram utilizadas para diferentes populações, a fim melhorar a amplificação do DNA, variando de 45°C a 47°C.

2.6 ELETROFORESE DO PRODUTO DE *PCR*

O resultado da *PCR* foi observado em gel de agarose 1%, utilizando 5 µl do produto de *PCR*. Como tampão de corrida foi utilizado TAE (Tris-Acetato-EDTA). Para a visualização em luz ultravioleta (UV), foi acrescentado *UniSafe Dye* à solução de gel. Com o objetivo de verificar o tamanho do fragmento gerado, foi adicionado um padrão de peso molecular da *Sinapse Inc* de 100 pb a todas as corridas. Não foi necessário incluir corante *loading* nas reações, pois já vinha incorporado no *Buffer* do kit *GoTaq G2 Hot Start Polymerase* da *PCR*. As amostras que tiveram seu DNA amplificado e visualizado em gel de agarose 1%, passaram pelo processo de purificação utilizando o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* da PROMEGA, seguindo as instruções do fabricante. Após o processo de purificação, o DNA purificado foi submetido a uma segunda corrida em gel de agarose 1% para verificar a presença de DNA após o processo de purificação.

2.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

As amostras foram sequenciadas pelo método *Sanger* no Instituto Oswaldo Cruz – RJ no aparelho *Applied Biosystem 3130xl DNA sequencer*. Para as reações de sequenciamento foram utilizados de 5 a 20 ng do DNA purificado, 2,5 µl de *primer* (10 µM) e H₂O mili-Q para diluição, fechando o total de 7,5 µl por tubo. As amostras foram enviadas em duplicatas, sendo um tubo com o *primer forward* (COI_KERT1-F) e o outro com o *primer reverse* (COI_KERT1-R).

2.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Os cromatogramas foram visualizados no programa *CHROMAS version 2.4*, com o objetivo de verificar a qualidade do sequenciamento. A sequência consenso foi montada e editada no programa *SeqMan version 7.0* a partir das sequências *forward* e *reverse*. Após a obtenção das sequências consensos, o alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa CLUSTAL X (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A árvore filogenética de Máxima verossimilhança (*Maximum likelihood*) foi gerada no *software IQ-Tree version 2.1.2* (NGUYEN *et al.*, 2015) utilizando como *input* o arquivo FASTA com todas as

sequências alinhadas. Primeiramente, o comando “*iqtree -nt AUTO -s nome do arquivo -m MFP*” foi usado para encontrar o melhor modelo evolutivo para reconstrução filogenética. Posteriormente, o comando “*iqtree -nt AUTO -s nome do arquivo -m modelo evolutivo -b 1000 -redo &*” foi utilizado para construção da árvore filogenética usando *bootstrap* de 1000 replicações. O arquivo IQTREE gerado pelo programa, foi utilizado como input no site *iTOL: Interactive Tree of Life* (www.itol.embl.de/upload.cgi) para visualização da árvore.

2.9 ANÁLISES POPULACIONAIS

Com a finalidade de melhor compreender a estrutura populacional de *An. bellator* na Mata Atlântica e fazer inferências sobre sua história evolutiva, o programa *DNA Sequence Polymorphism version 6.12.06* (ROZAS *et al.*, 2017) foi utilizado para calcular medidas intra-populacionais para cada população como: número de sítios polimórficos (S), diversidade nucleotídica baseada nas diferenças par-a-par (π), diversidade nucleotídica baseada no número de mutações (θ) e teste de neutralidade de Tajima (D_T). Ainda, medidas inter-populacionais foram calculadas para cada comparação par-a-par utilizando o mesmo programa citado acima, como: coeficiente de diferenciação populacional (F_{ST}), divergência bruta (D_{XY}) e líquida (D_a) entre as populações, número de sítios polimórficos exclusivos de cada uma das populações analisadas (S_1/S_2), polimorfismos compartilhados (S_S), e número de diferenças fixas (S_F).

O marcador molecular utilizado neste trabalho (COI) foi submetido ao teste de neutralidade de Tajima (TAJIMA, 1989) em cada população analisada, a fim de verificar se esta seguia o modelo neutro de evolução molecular. A relação estatística entre a distância geográfica (Km) e a distância genética (F_{ST}) foi calculada utilizando o teste de Mantel (MANTEL, 1967) com o pacote *ade4* no *Software R v. 4.2.2* (R CORE TEAM, 2013), de três maneiras diferentes: *i*) com todas as populações analisadas no trabalho, *ii*) sem a população de Camacan – BA, e *iii*) sem a população de Itaparica – BA.

A rede de haplótipos foi gerada com base no método TCS no programa *PopArt 1.7* (CLEMENT *et al.*, 2002) e no programa *DNA Sequence Polymorphism version 6.12.06* (ROZAS *et al.*, 2017).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COLETA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS NESTE ESTUDO

Os mosquitos utilizados neste estudo foram aqueles coletados em Florianópolis – SC (08), Ilha Grande – RJ (08), Camacan – BA (03), e Itaparica – BA (10). Ainda, foram utilizadas amostras de DNA de *An. bellator* de Antonina – PR (01), Ilha do Mel – PR (03), Ilha Grande – RJ (03), e Camacan – BA (02). Por último, realizou-se o acréscimo de uma sequência de *An. bellator* de Cananéia – SP (Número de acesso: KU551287, (OLIVEIRA *et al.*, 2016)) (Figura 2).

Sendo assim, no total foram analisados 10 indivíduos de Itaparica – BA, 05 indivíduos de Camacan – BA, 11 indivíduos de Ilha Grande – RJ, 01 indivíduo de Cananéia – SP, 01 indivíduo de Antonina – PR, 03 indivíduos de Ilha do Mel – PR, e 08 indivíduos de Florianópolis – SC, totalizando 39 amostras.

As amostras provenientes da coleta realizada neste estudo estão descritas no Quadro 2, já as amostras em que o DNA já estava extraído no Laboratório Rona-Pitaluga, estão especificadas no Quadro 3.

Quadro 2 – Amostras coletadas neste estudo e suas respectivas informações sobre identificação, sexo, localidade, coordenadas e o método de captura do mosquito.

Identificação	Sexo	Localidade	Coordenadas	Método de Coleta
CAM01_F	Fêmea	Camacan - BA	15° 25' 09" S 39° 29' 45" W	CDC
CAM02_F	Fêmea	Camacan - BA	15° 25' 09" S 39° 29' 45" W	CDC
CAM03_F	Fêmea	Camacan - BA	15° 25' 09" S 39° 29' 45" W	CDC
ITA01_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ITA02_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ITA03_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ITA04_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ITA05_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ITA06_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ITA07_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ITA08_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ITA09_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ITA10_F	Fêmea	Itaparica - BA	13° 7' 04.5" S 44° 16' 29.9" W	Bromélia
ILH01_F	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
ILH02_F	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia

ILH03_F	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
ILH04_F	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
ILH05_F	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
ILH06_M	Macho	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
ILH07_F	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
ILH08_F	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
FLO01_F	Fêmea	Florianópolis - SC	27° 17' 57" S 48° 21' 23" O	CDC
FLO02_F	Fêmea	Florianópolis - SC	27° 17' 57" S 48° 21' 23" O	CDC
FLO03_F	Fêmea	Florianópolis - SC	27° 17' 57" S 48° 21' 23" O	CDC
FLO04_F	Fêmea	Florianópolis - SC	27° 17' 57" S 48° 21' 23" O	CDC
FLO05_F	Fêmea	Florianópolis - SC	27° 17' 57" S 48° 21' 23" O	CDC
FLO06_F	Fêmea	Florianópolis - SC	27° 17' 57" S 48° 21' 23" O	CDC
FLO07_F	Fêmea	Florianópolis - SC	27° 17' 57" S 48° 21' 23" O	CDC
FLO08_F	Fêmea	Florianópolis - SC	27° 17' 57" S 48° 21' 23" O	CDC

Fonte: Elaborado pelo autor.

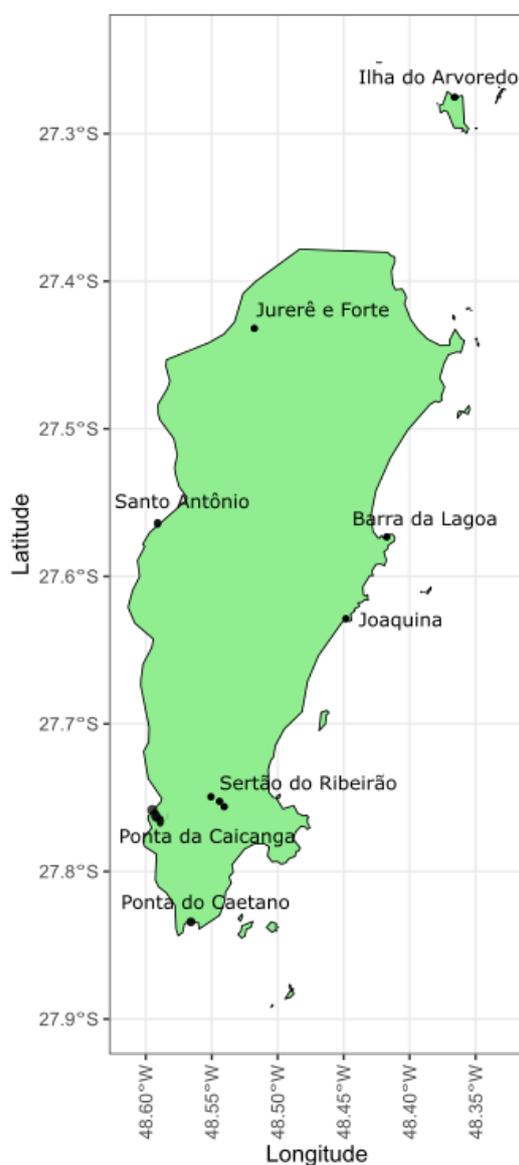
Quadro 3 – Amostras utilizadas neste estudo que já estavam com o DNA extraído no laboratório e suas respectivas informações sobre identificação, sexo, localidade, coordenadas e método de captura do mosquito.

Identificação	Sexo	Localidade	Coordenadas	Método de Coleta
ABBA03	Fêmea	Camacan - BA	15° 25' 09" S 39° 29' 45" W	-
ABBA04	Fêmea	Camacan - BA	15° 25' 09" S 39° 29' 45" W	-
ABSF60	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
ABSF61	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
ABSF22	Fêmea	Ilha Grande - RJ	23° 8' 26" S 44° 14' 50" W	Bromélia
ANT01	Fêmea	Antonina - PR	25° 25' 43" S 48° 42' 43" W	-
ABIM_1	Fêmea	Ilha do Mel - PR	25° 30' 42" S 48° 20' 20" O	Bromélia
ABIM_5	Fêmea	Ilha do Mel - PR	25° 30' 42" S 48° 20' 20" O	Bromélia
ABIM_7	Fêmea	Ilha do Mel - PR	25° 30' 42" S 48° 20' 20" O	Bromélia

Fonte: Elaborado pelo autor.

Além das coletas mencionadas acima, também foram realizadas coletas em diversos pontos de Florianópolis (Figura 3) focando principalmente na região Sul da cidade (ex.: bairro Ribeirão da Ilha), já que outros autores já capturaram a espécie *An. bellator* na região (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2003).

Figura 3 – Mapa com os pontos onde foram realizadas as coletas de *Anopheles bellator* em Florianópolis, Santa Catarina.



Fonte: Elaborado pelo autor em *R software* versão 1.4.1106 .

Os pontos de coleta foram “Ponta do Caetano”, “Ponta do Caicanga”, “Sertão do Ribeirão”, “Joaquina”, “Barra da Lagoa”, “Santo Antônio”, “Jurerê e Forte” e “Ilha do Arvoredo”. Essas localizações foram escolhidas visando áreas onde havia bromélias expostas à luz solar e próximas ao mar, característica estas que são conhecidas por serem *habitat* preferencial da espécie *An. bellator* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Apenas o ponto "Sertão do Ribeirão" estava localizado no meio da mata (Figura 3), onde foram coletados larvas e adultos de *An. cruzii*. De fato, essa espécie tem preferência por áreas sombreadas, que possuem alta umidade e onde as bromélias são protegidas dos raios solares pelas copas das árvores, características diretamente relacionadas à densidade populacional de *An. cruzii* (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O Sertão do Ribeirão é uma região de mata parcialmente fechada, úmida, com um riacho que corre por dentro da mata. As bromélias estavam dispostas tanto em árvores, quanto nas pedras próximas ao riacho e, em sua maioria, em regiões com sombras. Portanto, a região possui *habitat* preferencial para a espécie *An. cruzii*. Já na "Ilha do Arvoredo", foram encontrados mosquitos adultos da espécie *An. bellator* em locais onde havia bromélias expostas a luz solar, característica diretamente relacionada à densidade populacional desta espécie. Nos demais pontos não foi encontrada nenhuma larva ou adulto do gênero *Anopheles*.

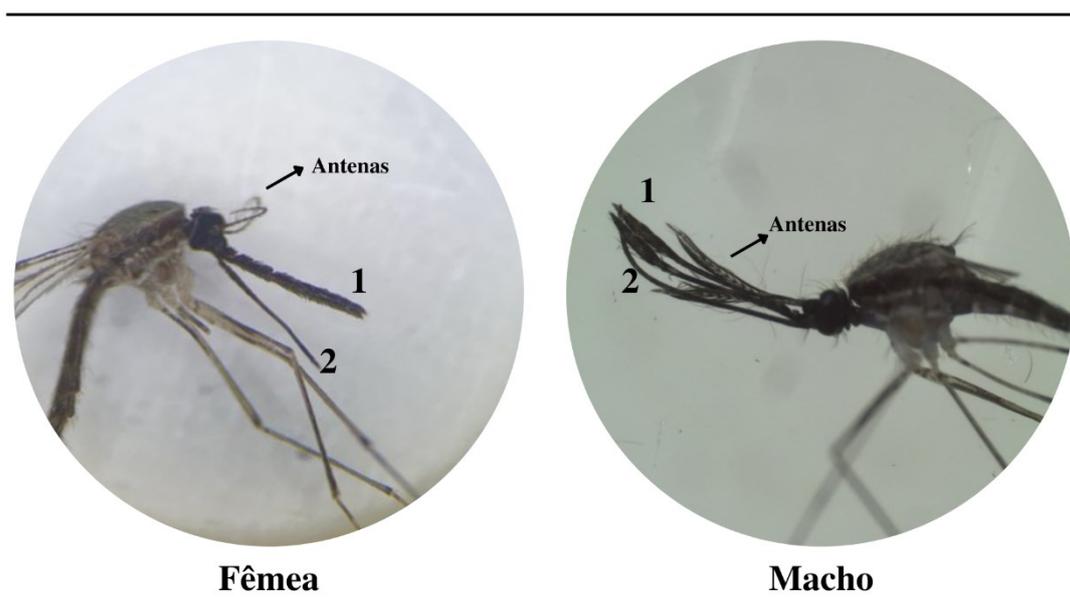
Segundo Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994), é raro encontrar *An. bellator* em matas onde ocorre predominância de *An. cruzii*. Portanto, a ausência de *An. bellator* no ponto "Sertão do Ribeirão" pode ser explicada pela grande quantidade de *An. cruzii* na região. Já nos pontos de coleta mais litorâneos do bairro Ribeirão da Ilha ("Ponta do Caetano" e "Ponta do Caicanga"), locais em que *An. bellator* já foi encontrado no passado (~20 anos) (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2003), a ausência da espécie pode ser explicada pela mudança na paisagem local. De fato, alguns autores sugerem que a perda da vegetação natural e mudanças na paisagem podem ocasionar a redução na abundância de espécies do subgênero *Kerteszia* (ex.: *An. cruzii*) (MEDEIROS-SOUSA *et al.*, 2019).

3.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Os mosquitos foram fotografados individualmente, visando registrar os caracteres morfológicos que permitem a identificação de gênero, subgênero, espécie e sexo. Para a identificação do gênero, realizamos o registro da região dos palpos e probóscide, pois todas as espécies do gênero *Anopheles* possuem os palpos e a probóscide do mesmo tamanho (Figura 4). A identificação do sexo ocorre através das antenas, onde os machos possuem pelos mais longos e numerosos, desta

forma, apresentando antenas plumosas em relação as fêmeas (Figura 4) (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 4 – Figura mostrando a região da cabeça e tórax de uma fêmea e um macho da espécie *Anopheles bellator* (1: palpos / 2: probóscides).

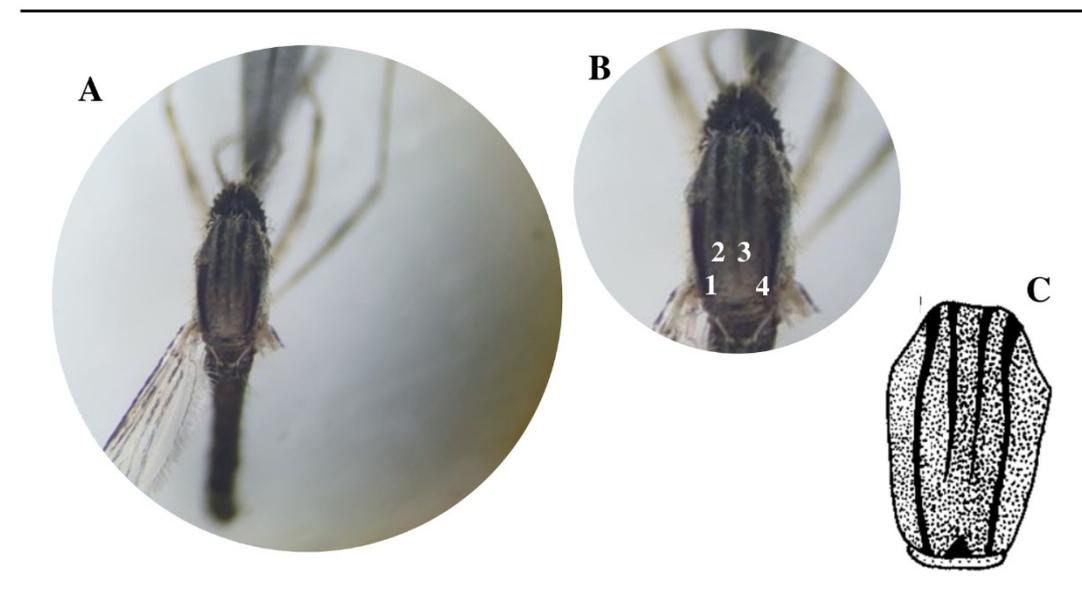


Fonte: Elaborado pelo autor.

O registro do escudo contendo quatro linhas pretas possibilita o reconhecimento do subgênero *Kerteszia* (Figura 5). Por fim, para identificação da espécie, o último par de patas do mosquito foi registrado (Figura 6). *Anopheles bellator* possui o tarso posterior V inteiramente preto (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Com base nos registros fotográficos, foram elaborados esquemas fotográficos dos mosquitos por localidades (Figura 7 e 8).

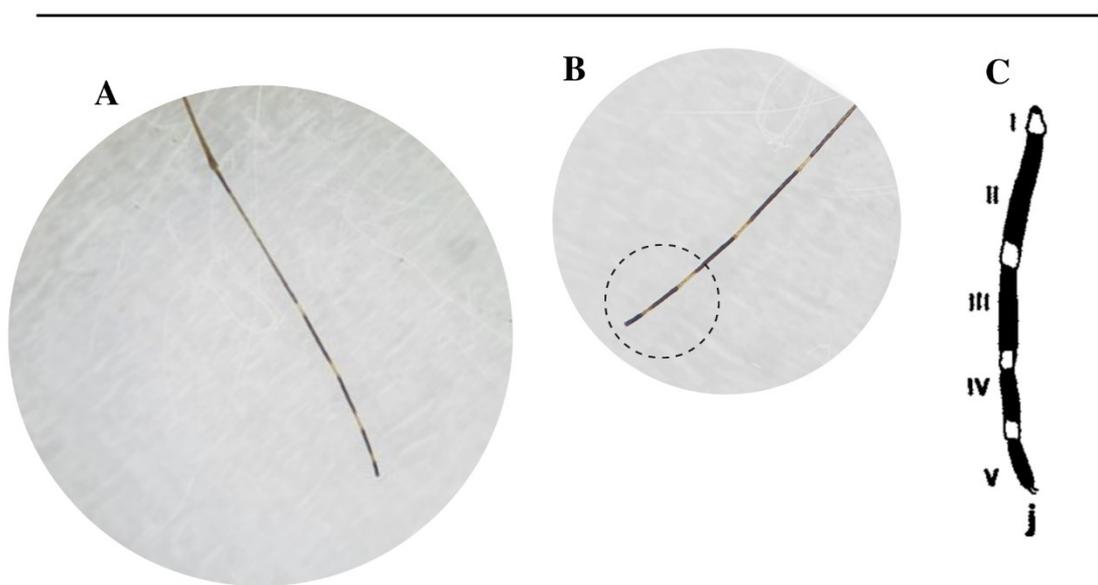
A montagem do acervo fotográfico foi possível apenas para as amostras provenientes de coletas recentes. Não havia registros fotográficos das amostras de Antonina – PR, Ilha do Mel – PR e ABBA03 e ABBA04 de Camacan – BA, as quais o DNA extraído já estava armazenado em freezer -20°C no laboratório Rona-Pitaluga, nem da amostra Cananéia – SP que foi retirado do *GenBank*.

Figura 5 – Escudo de *Anopheles bellator*. A: Imagem do escudo completo. B: Escudo ampliado e listras numeradas de 1 a 4. C: Desenho ilustrativo do escudo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).



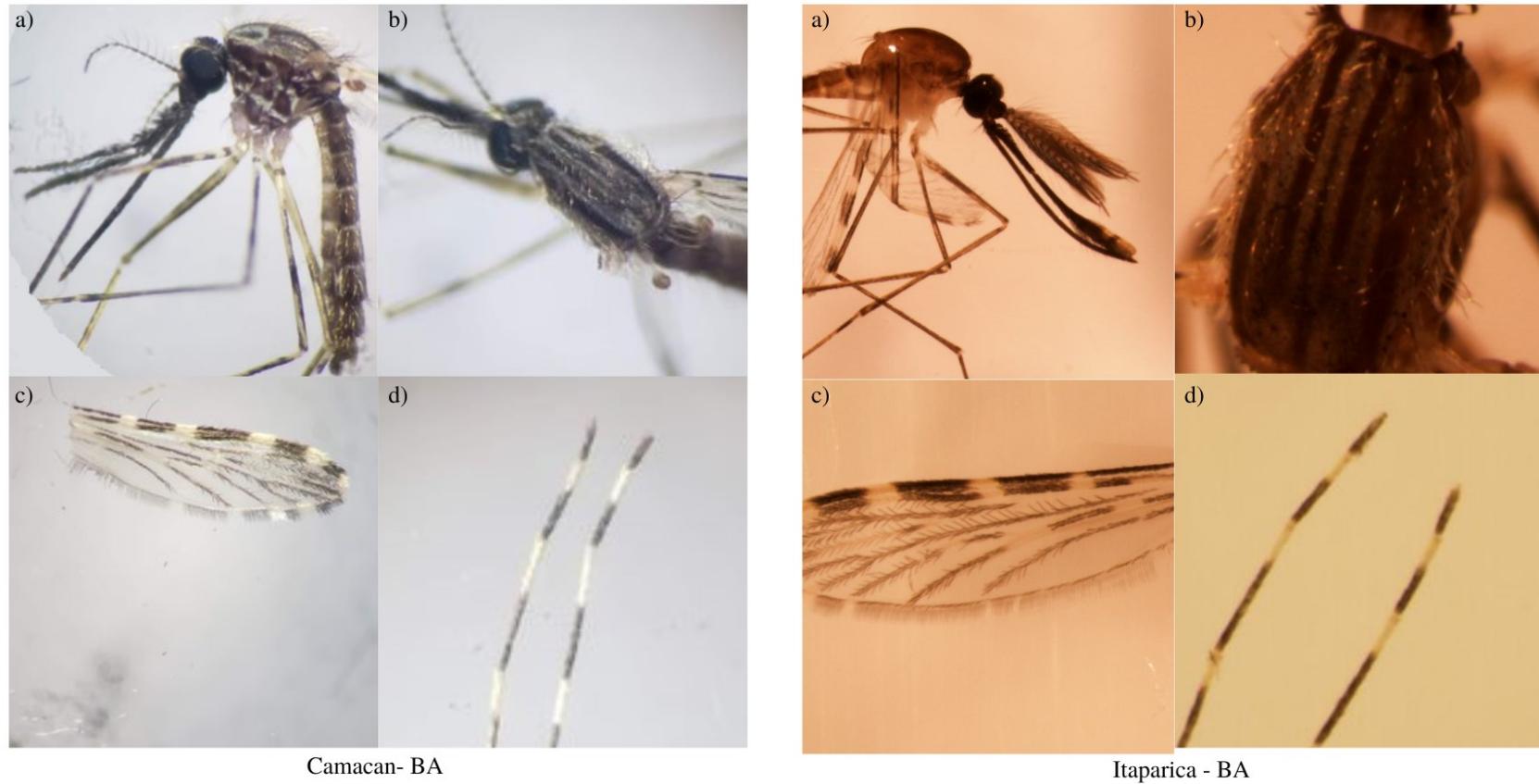
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Pata pertencente ao terceiro par (posterior) de *Anopheles bellator* com o último tarso (V) completamente preto. A: imagem da terceira pata completa. B: imagem da pata ampliada, com foco no último tarso. C: Desenho ilustrativo da pata (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).



Fonte: Elaborado pelo autor.

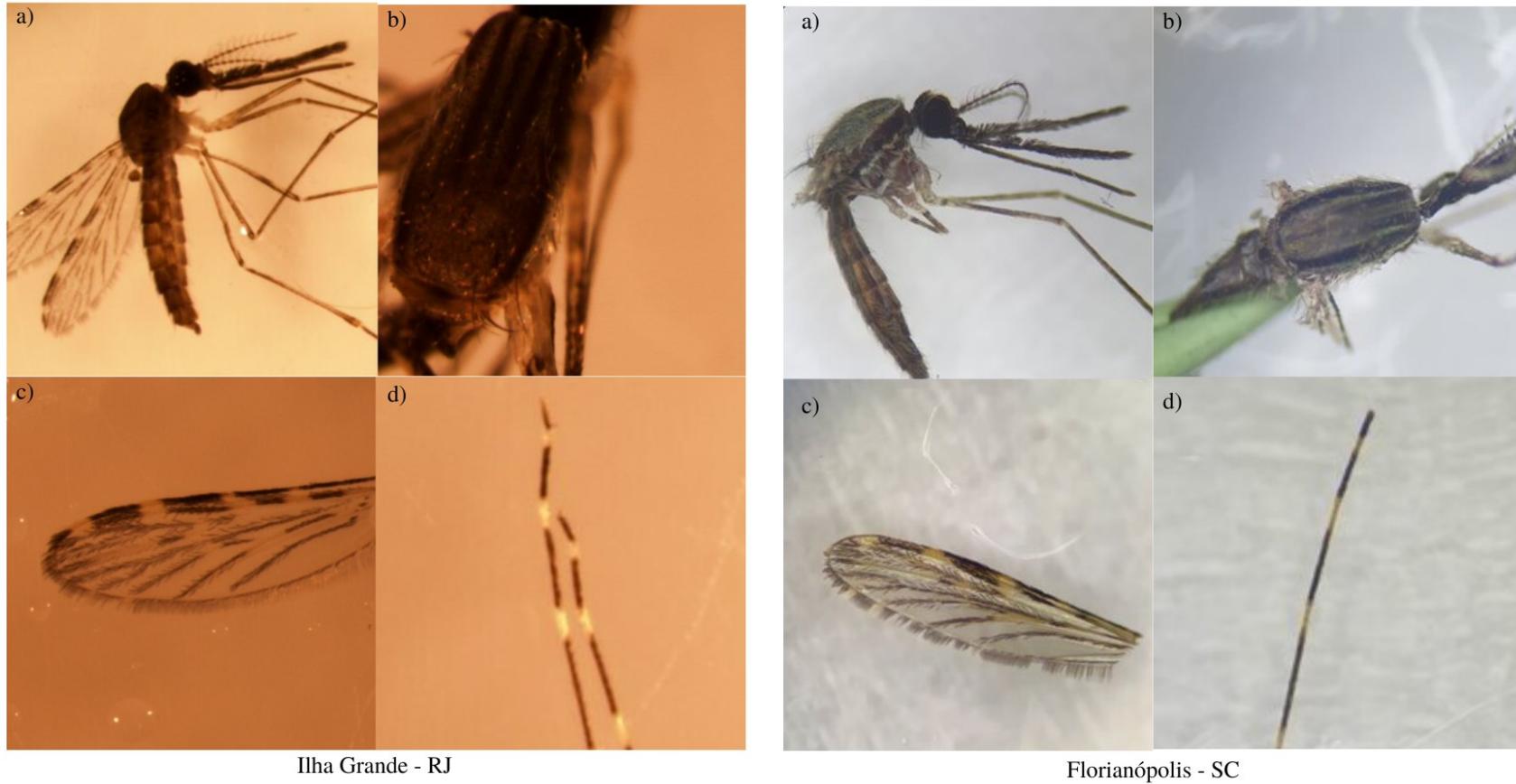
Figura 7 – Fotografias dos caracteres morfológicos para identificação do gênero, subgênero, espécie e sexo de mosquitos Anophelinos de Itaparica (Macho) e Camacan (Fêmea) – BA, utilizados nesse estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A: palpos e probóscide. B: Escudo. C: asa. D: último par de patas do mosquito, focando no tarso V.

Figura 8 – Fotografias dos caracteres morfológicos para identificação do gênero, subgênero, espécie e sexo de mosquitos Anophelinos de Ilha Grande – RJ (Fêmea) e Florianópolis – SC (Fêmea) utilizados nesse estudo.



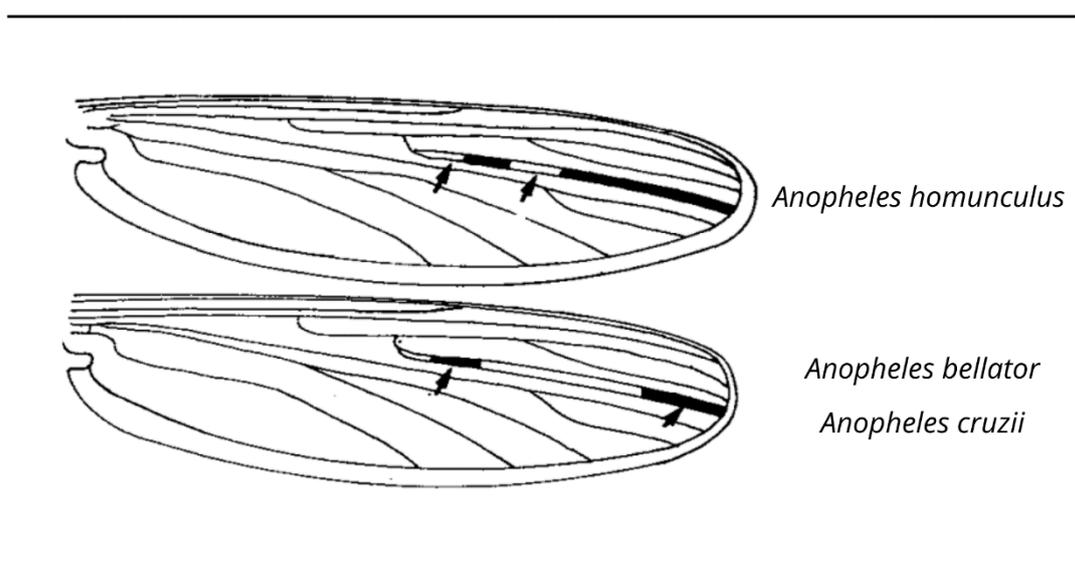
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A: palpos e probóscide. B: Escudo. C: asa. D: último par de patas do mosquito, focando no tarso V.

Após fotografar cada mosquito individualmente e realizar a identificação, conseguimos elaborar imagens comparativas das estruturas corporais entre as populações.

O caractere morfológico veia R4+5 predominantemente branca é compartilhado pelas espécies *An. bellator* e *An. cruzii*. A espécie *An. homunculus*, que também pertence ao subgênero *Kerteszia*, possui a veia R4+5 predominante escura, com duas manchas brancas basais (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), ou seja, a mancha branca é maior nas espécies *An. bellator* e *An. cruzii* e menor em *An. homunculus* (Figura 9).

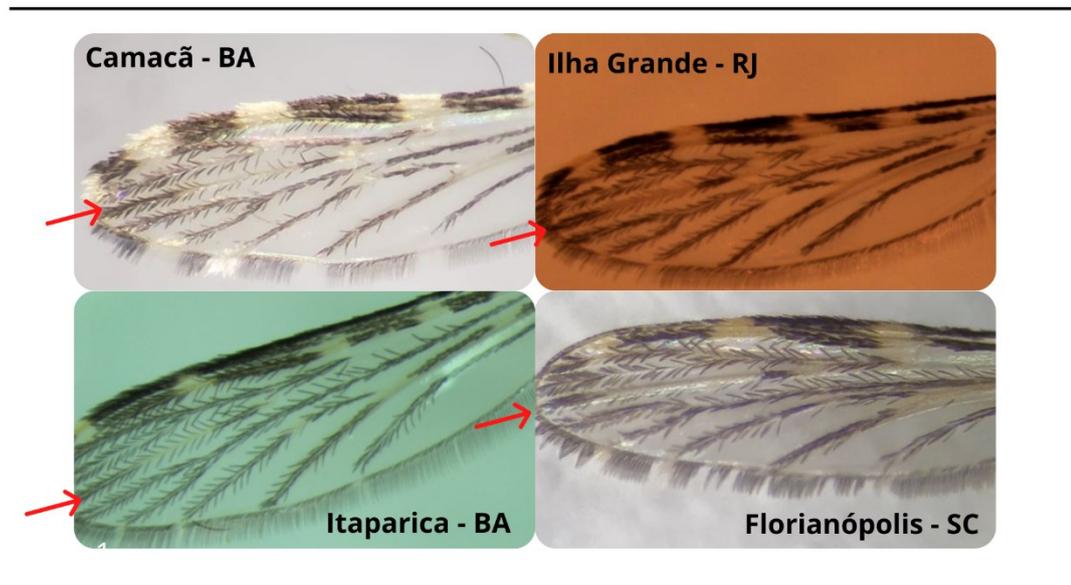
Figura 9 – Imagem ilustrativa da comparação de coloração da veia R4+5 nas espécies *Anopheles bellator*, *Anopheles cruzii* e *Anopheles homúnculos*.



Fonte: Adaptado de (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Observando atentamente a asa dos mosquitos de Camacan e Itaparica (Figura 10), conseguimos perceber que os mosquitos dessas localidades apresentam uma veia R4+5 com uma proporção maior de preto, quando comparados com o exemplo da chave de identificação de Consoli; Lourenço-de-Oliveira (1994) (Figura 9) e com os mosquitos de Florianópolis (Figura 10). Entretanto, a proporção de preto não chega a se encaixar na identificação de *An. homunculus*.

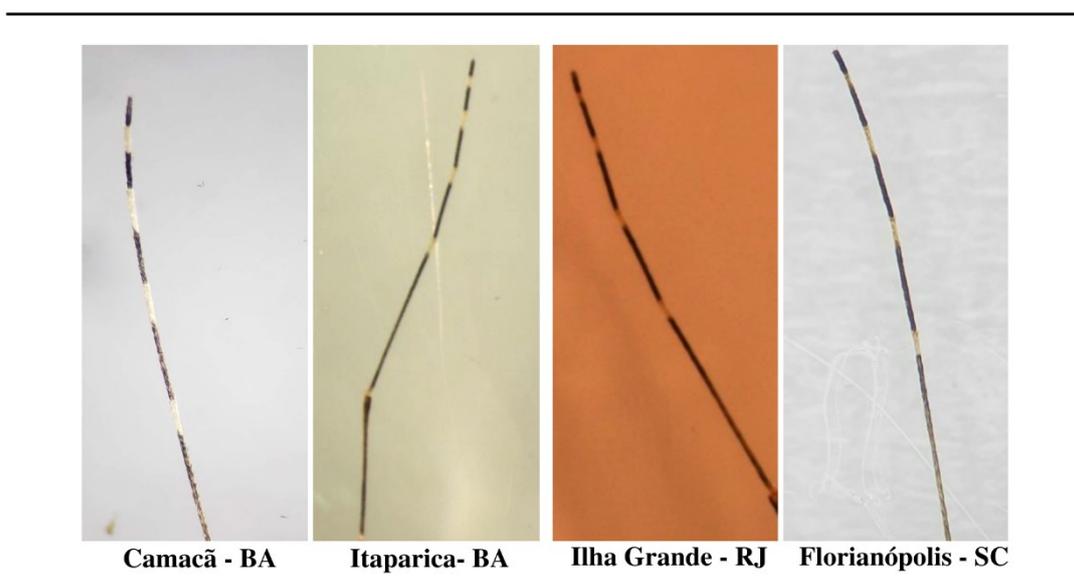
Figura 10 – Análise da proporção de branco e preto na veia R4+5 nas asas dos mosquitos *Anopheles bellator* presentes na Mata Atlântica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A comparação do padrão de coloração do último par de patas (Figura 11) também apresentou variação entre as populações estudadas. Assim como as asas, as patas possuem uma proporção nas cores branca e preta nos tarsos. Observamos uma diferença nessa proporção, onde os mosquitos de Camacan – BA mostraram uma maior proporção de branco nos tarsos II, III e IV do último par de patas quando comparado com as demais localidades. Apesar do padrão de coloração ser diferente, o tarso V completamente preto é uma característica presente apenas na espécie *An. bellator*.

Figura 11 – Comparação morfológica da última pata de mosquitos da espécie *An. bellator* das populações analisadas no estudo.



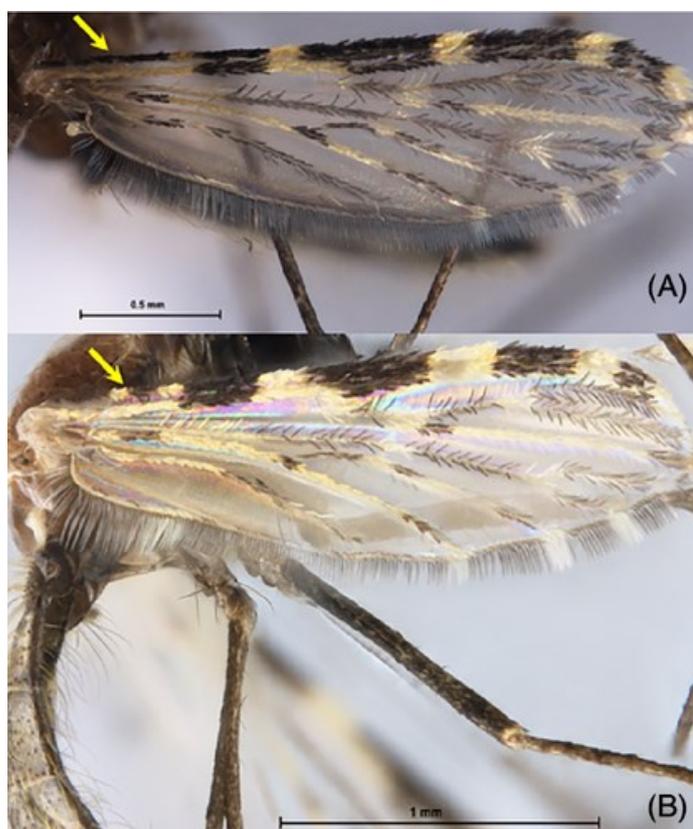
Fonte: Elaborado pelo autor.

Diferenças fenotípicas entre indivíduos de uma mesma espécie podem ocorrer devido à plasticidade fenotípica, que é a capacidade de um mesmo genótipo apresentar fenótipos distintos dependendo do ambiente no qual ele está inserido (LIMA *et al.*, 2017). Os mosquitos da espécie *Aedes albopictus*, por exemplo, presentes no Monte Tirana-Dajti, Albânia, apresentam plasticidade fenotípica em diferentes altitudes do Monte. O estudo analisou a variação morfológica nas asas destes mosquitos provenientes de cinco pontos de coleta com altitudes diferentes (A1 – A5): A1 representando uma área urbana artificial; A2 uma terra rural / agrícola; A3 uma floresta mista e seminatural; A4 e A5 florestas mistas e áreas seminaturais localizadas no topo do Monte Dajti. Tanto machos quanto fêmeas, apresentaram variações fenotípicas entres os pontos, tanto em relação a estrutura da asa, quanto ao seu tamanho, o que pode estar relacionado a fatores biológicos e/ou ambientais (ex.: diferentes fontes de sangue, diferentes micro-habitats, vegetação e ecossistemas, e diferenças climáticas) (PRUDHOMME *et al.*, 2019).

No caso das populações de *An. bellator* analisadas neste estudo, a plasticidade fenotípica poderia explicar as pequenas diferenças morfológicas encontradas entre elas. Entretanto, além da diferença morfológica, encontramos diferenças genéticas consideráveis entre as populações analisadas.

Pequenas diferenças morfológicas presentes em espécies crípticas vêm sendo estudadas em mosquitos do gênero *Anopheles*. As espécies *Anopheles minimus* e *Anopheles harrisoni* pertencem a um complexo de espécies na Tailândia, onde *An. minimus* é um dos principais vetores de malária na região, alimentando-se tanto de humanos quanto de outros animais, enquanto sua espécie irmã, *An. harrisoni*, ainda não possui seu papel esclarecido na transmissão da doença. Apesar de serem muito semelhantes morfológicamente, as espécies apresentam distribuição, hábitos alimentares e capacidade de transmissão de malária diferentes. Portanto, um método simples e de baixo custo se torna importante para a identificação das espécies pelos órgãos competentes. A presença ou ausência de uma pequena mancha clara localizada na parte proximal da asa tem auxiliado na identificação e separação das espécies (Figura 12) (CHATPIYAPHAT *et al.*, 2021)

Figura 12 – A presença de uma mancha clara basal é o caráter morfológico usado para diferenciar *An. mínimus* (A) e *An. harrisoni* (B) na Tailândia. A mancha está presente apenas em *An. harrisoni* (seta).

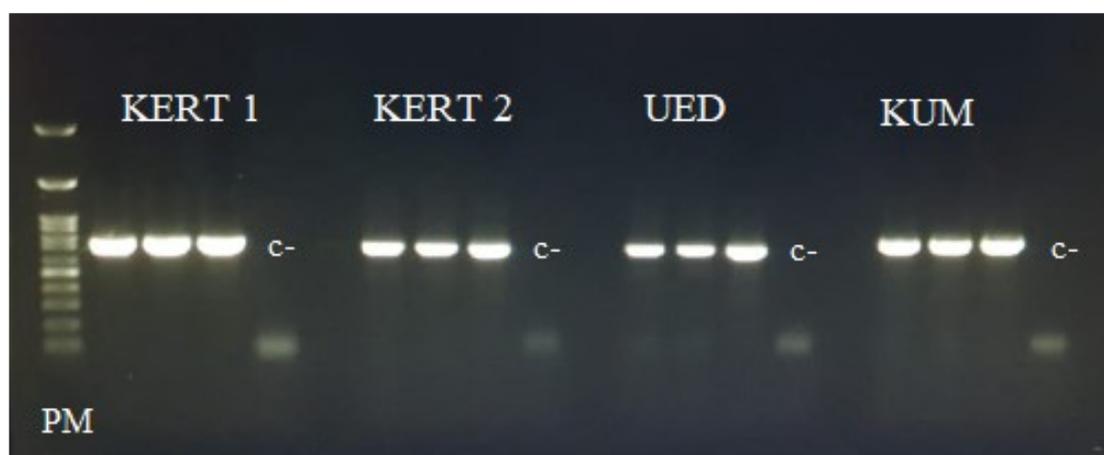


Fonte: (CHATPIYAPHAT *et al.*, 2021).

3.3 ENSAIOS MOLECULARES

Todos os quatro pares de primers testados no estudo se mostraram eficientes na amplificação de um fragmento do gene mitocondrial *Citocromo Oxidase I* (COI) em *An. bellator*, onde os fragmentos amplificados ficaram com um tamanho entre 600 - 700 pb (Figura 13).

Figura 13 – Teste de padronização dos primers mitocondriais KERT 1, KERT 2, UEA e KUM em gel de agarose 1% com amostras de *Anopheles bellator*.

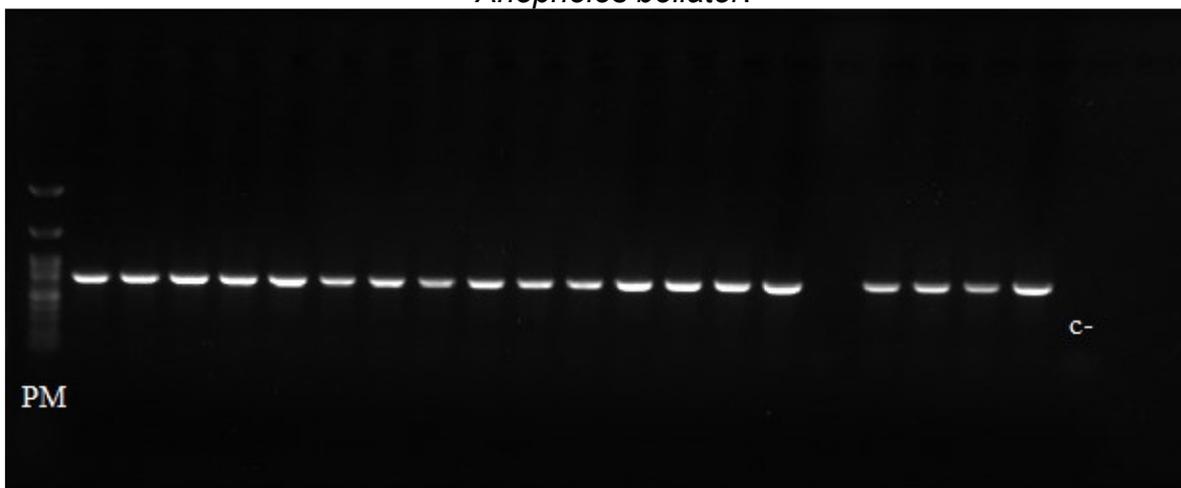


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: c-: controle negativo; PM: marcador de peso molecular de 100 pb.

Para o presente estudo, optamos por realizar a amplificação da região de interesse com o primer KERT 1, o qual amplifica a região de ~ 660 pb descrita por Hebert *et al.*, 2003 (Figura 14).

Figura 14 – PCR realizada com o par de *primers* KERT 1 nas amostras de *Anopheles bellator*.

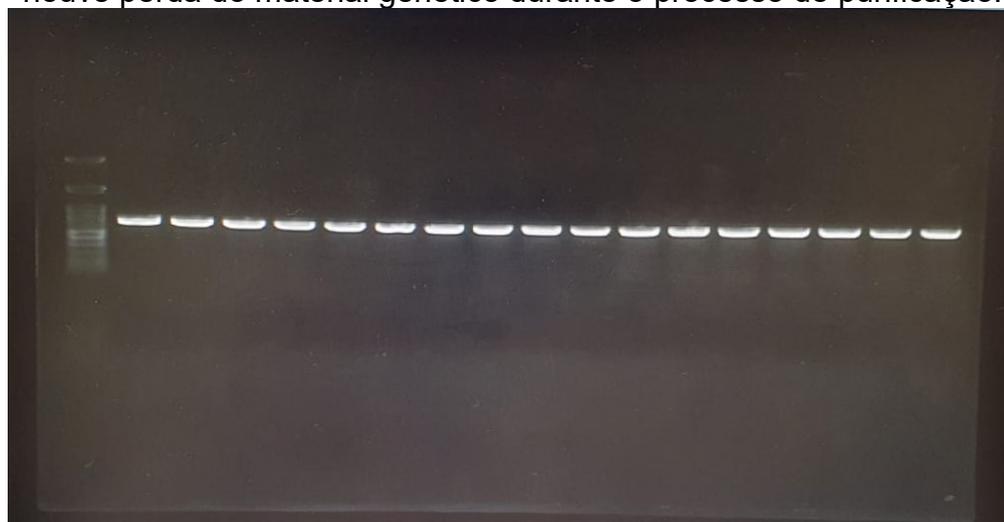


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: C-: controle negativo, PM: peso molecular 100 pb.

Todas as amostras que tiveram o fragmento amplificado, passaram pela purificação do produto de PCR utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* da Promega. Após a purificação, o DNA purificado foi mensurado por espectrofotometria no aparelho *NanoDROP Lite Spectrophotometer – Thermo Scientific* e a concentração obtida variou de 10 – 100 ng/ μ l. Posteriormente, este material foi submetido a uma nova corrida em gel de agarose 1%, a fim de verificar se não houve perda de DNA durante o processo de purificação (Figura 15).

Figura 15 – Produto de PCR após a purificação do DNA demonstrando que não houve perda do material genético durante o processo de purificação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 ANÁLISES MOLECULARES

A partir das sequências obtidas, foram realizadas buscas na plataforma *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* e no *BOLD Systems (Barcode of Life Data System)*, a fim de realizar a confirmação da espécie geneticamente. A porcentagem de similaridade entre as sequências obtidas no estudo e as sequências de *An. bellator* disponíveis nesses bancos de dados (que é proveniente de Cananéia – SP) foi variável (Tabela 2). As amostras de Florianópolis – SC, Ilha do Mel – PR, e Antonina – PR apresentaram valores em torno de 99-100% de similaridade com a sequência disponível no banco de dados. Já as amostras da Ilha de Itaparica – BA apresentaram uma porcentagem menor de similaridade nos bancos de dados, mas todos acima de 97%. As amostras de Camacan – BA apresentaram o menor valor de similaridade, chegando a 93%, e as sequências não obtiveram similaridade apenas com *An. bellator*, mas sim com várias espécies do subgênero *Kerteszia*.

Segundo Hebert *et al.* (2003), a divergência genética entre espécies diferentes é maior que 3%, portanto, valores de similaridade entre 97 e 100% podem ainda caracterizar organismos da mesma espécie. É importante ressaltar que as sequências disponíveis nos bancos dados são de indivíduos de localidades diferentes das amostras analisadas neste estudo e a possibilidade de *An. bellator* ser um complexo de espécies crípticas pode explicar a variação nos valores de similaridade com sequências disponíveis nos bancos de dados.

Sendo assim, os valores de similaridade apresentados pelos indivíduos de Camacan (93 - 95%) correspondem a informações genéticas que os tornam pertencentes ao subgênero *Kerteszia* e não à espécie *An. bellator*. Apesar de possuir a mesma morfologia, possivelmente os mosquitos coletados em Camacan – BA pertençam a uma nova espécie ainda não descrita do subgênero *Kerteszia*.

Tabela 2 – Porcentagem de similaridade com as sequências de *Anopheles bellator* obtidas nos bancos de dados *BOLD Systems (Barcode of Life)* e *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*.

Identificação	BOLD	NCBI
ABBA03_F	<i>An. bellator</i> (93,79%)	<i>An. bellator</i> (93,54%)

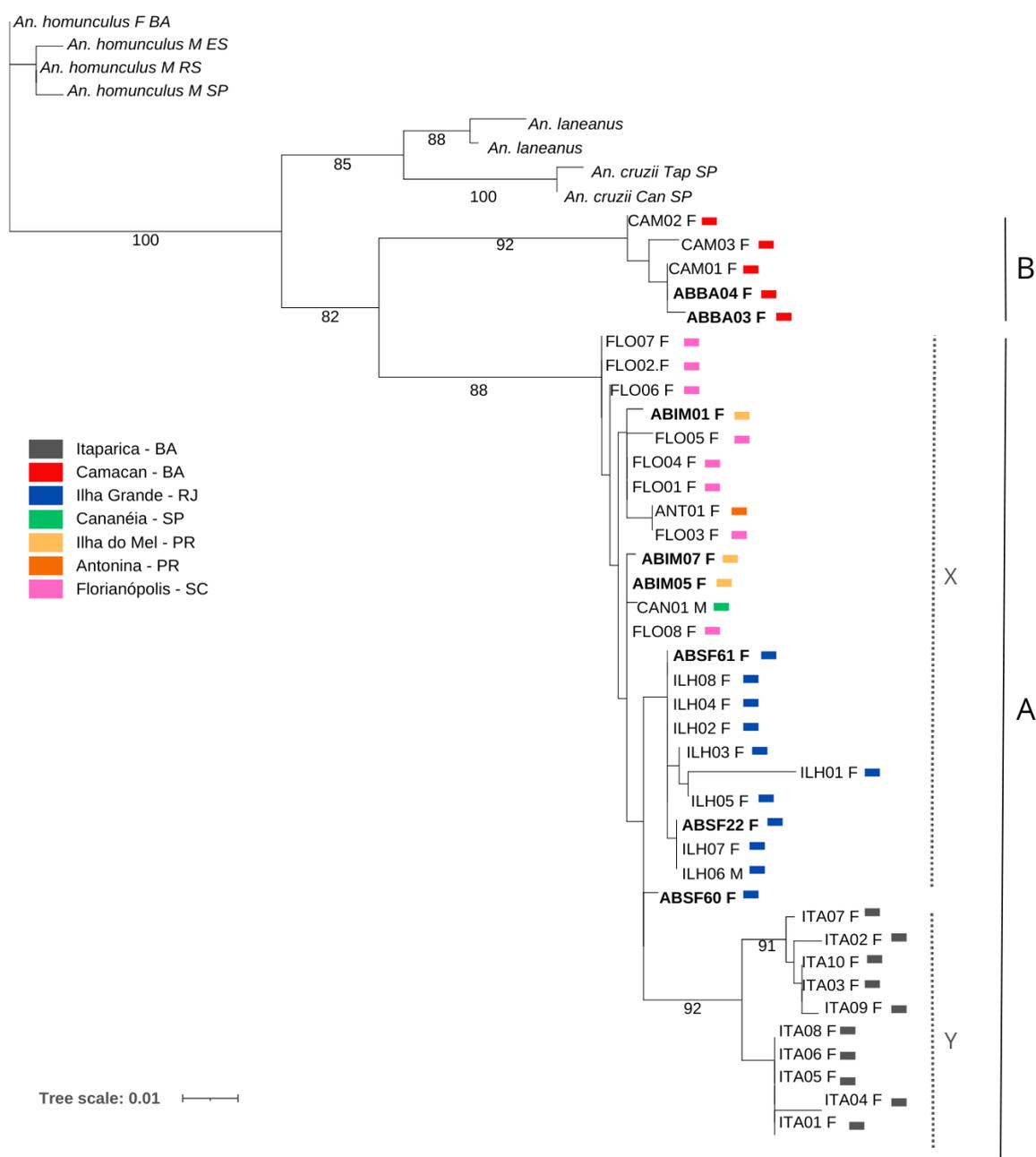
ABBA04_F	<i>An. homunculus/ An. cruzii</i> (93,09%)	<i>An. homunculus/ An. cruzii</i> (93,14%)
CAM01_F	<i>An. bellator/ An. homunculus</i> (94,64%)	<i>An. bellator</i> (94,78%)
CAM02_F	<i>An. homunculus/ An. laneanus</i> (95,03%)	<i>An. laneanus</i> (95,09%)
CAM03_F	<i>An. homunculus</i> (94,37%)	<i>An. homunculus</i> (94,42%)
ITA01_F	<i>An. bellator</i> (98,38%)	<i>An. bellator</i> (97,51%)
ITA02_F	<i>An. bellator</i> (98,06%)	<i>An. bellator</i> (97,02%)
ITA03_F	<i>An. bellator</i> (98,05%)	<i>An. bellator</i> (97,23%)
ITA04_F	<i>An. bellator</i> (98,1%)	<i>An. bellator</i> (97,37%)
ITA05_F	<i>An. bellator</i> (98,07%)	<i>An. bellator</i> (97,25%)
ITA06_F	<i>An. bellator</i> (98,09%)	<i>An. bellator</i> (97,48%)
ITA07_F	<i>An. bellator</i> (98,05%)	<i>An. bellator</i> (97,38%)
ITA08_F	<i>An. bellator</i> (98,51%)	<i>An. bellator</i> (97,65%)
ITA09_F	<i>An. bellator</i> (98,08%)	<i>An. bellator</i> (96,61%)
ITA10_F	<i>An. bellator</i> (98,09%)	<i>An. bellator</i> (97,29%)
ILH01_F	<i>An. bellator</i> (99,31%)	<i>An. bellator</i> (98,94%)
ILH02_F	<i>An. bellator</i> (99,11%)	<i>An. bellator</i> (99,27%)
ILH03_F	<i>An. bellator</i> (99,13%)	<i>An. bellator</i> (98,9%)
ILH04_F	<i>An. bellator</i> (99,34%)	<i>An. bellator</i> (98,95%)
ILH05_F	<i>An. bellator</i> (98,86%)	<i>An. bellator</i> (98,79%)
ILH06_M	<i>An. bellator</i> (99,24%)	<i>An. bellator</i> (99,05%)
ILH07_F	<i>An. bellator</i> (99,07%)	<i>An. bellator</i> (98,42%)
ILH08_F	<i>An. bellator</i> (99,07%)	<i>An. bellator</i> (98,93%)
ABSF60_F	<i>An. bellator</i> (99,38%)	<i>An. bellator</i> (99,14%)
ABSF61_F	<i>An. bellator</i> (99,07%)	<i>An. bellator</i> (98,93%)
ABSF22_F	<i>An. bellator</i> (98,97%)	<i>An. bellator</i> (98,64%)
FLO01_F	<i>An. bellator</i> (99,77%)	<i>An. bellator</i> (99,56%)
FLO02_F	<i>An. bellator</i> (99,53%)	<i>An. bellator</i> (99,41%)
FLO03_F	<i>An. bellator</i> (99,30%)	<i>An. bellator</i> (99,04%)
FLO04_F	<i>An. bellator</i> (99,07%)	<i>An. bellator</i> (99,0%)
FLO05_F	<i>An. bellator</i> (98,80%)	<i>An. bellator</i> (98,82%)
FLO06_F	<i>An. bellator</i> (99,53%)	<i>An. bellator</i> (99,12%)
FLO07_F	<i>An. bellator</i> (99,53%)	<i>An. bellator</i> (98,99%)
FLO08_F	<i>An. bellator</i> (98,35%)	<i>An. bellator</i> (97,96%)
ANT01_F	<i>An. bellator</i> (99,67%)	<i>An. bellator</i> (99,34%)
ABIM01	<i>An. bellator</i> (100%)	<i>An. bellator</i> (99,453%)
ABIM05	<i>An. bellator</i> (100%)	<i>An. bellator</i> (99,69%)
ABIM07	<i>An. bellator</i> (100%)	<i>An. bellator</i> (99,41%)

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 FILOGENIAS

Utilizando o *software IQ-Tree*, árvores filogenéticas foram construídas através do método de máxima verossimilhança (do inglês *Maximum Likelihood*) com o intuito de reconstruir a história evolutiva das sequências provenientes de várias populações brasileiras de *An. bellator*. Nas análises, *An. homunculus*, *An. cruzii* e *An. laneanus* foram usados como grupo externo para enraizar a árvore. Utilizando o comando “*iqtree -nt AUTO -s nome do arquivo -m MFP*”, o modelo evolutivo *TPM2+F+I* foi selecionado para reconstrução filogenética. Após a escolha do modelo evolutivo, rodamos a árvore sob o comando “*iqtree -nt AUTO -s nome do arquivo -m TPM2+F+I -b 1000 -redo &*”, com 1000 réplicas (*bootstrap* = 1000). A primeira árvore filogenética está representada na Figura 16 e o alinhamento das sequências está disponível no Apêndice 1.

Figura 16 – Árvore de máxima verossimilhança das sequências de *Anopheles bellator*, utilizando um fragmento do gene COI, obtida com o modelo evolutivo *TPM2+F+I*.



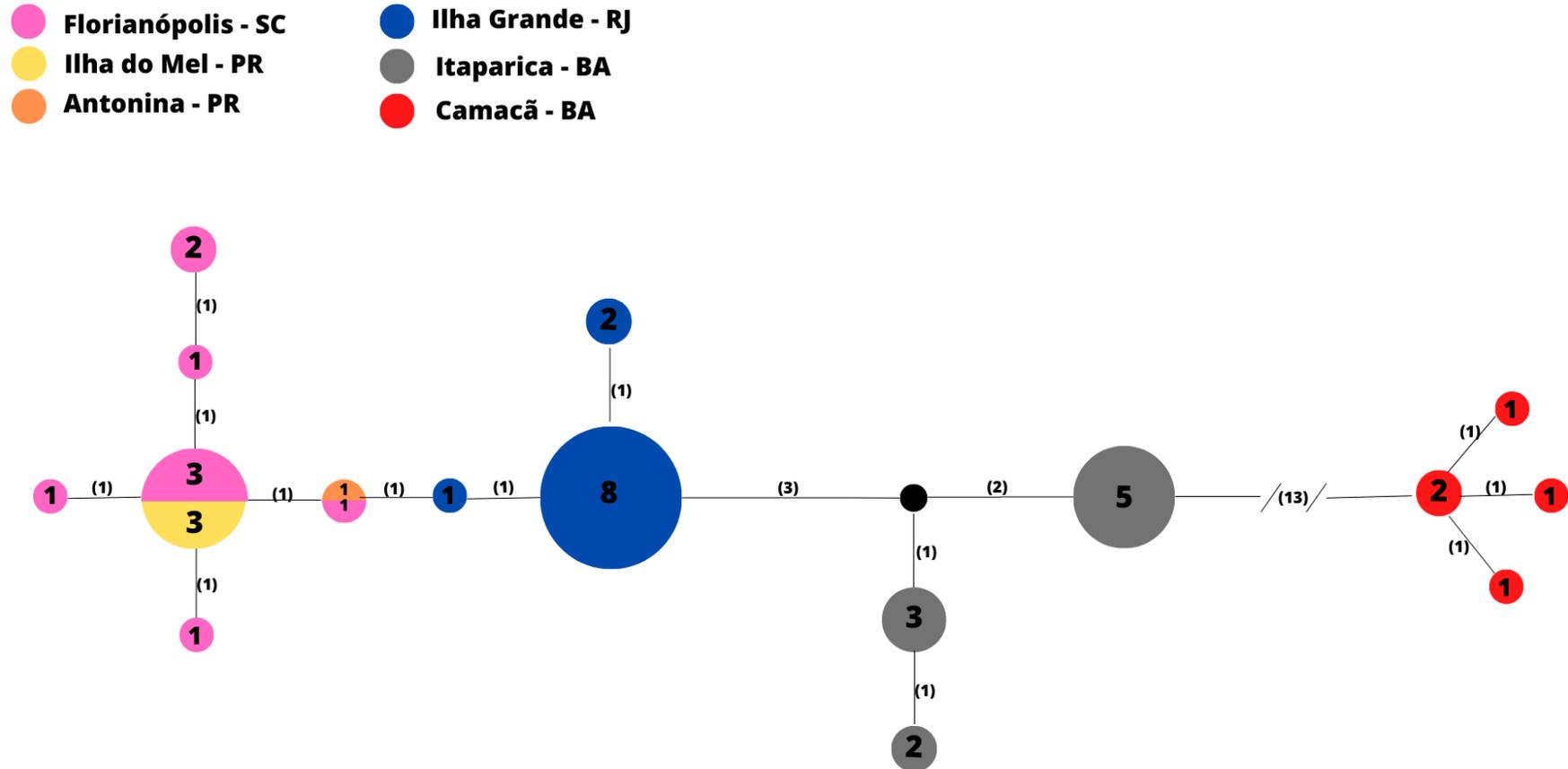
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: As sequências de *An. cruzii*, *An. homunculus*, e *An. laneanus* foram utilizadas como grupo externo para enraizar a árvore. Os números abaixo dos ramos são os valores de “bootstrap”, baseados em 1000 replicações. F: fêmeas, M: macho. FLO: indivíduos de Florianópolis – SC, ILM: Ilha do Mel – PR, ANT: Antonina – PR, CAN: Cananéia – SP, ILH: Ilha Grande – RJ, CAM: Camacan – BA, ITA: Itaparica – BA, TAP: Tapiraí – SP. F: fêmea; M: macho. Em negrito amostras utilizadas no trabalho de Voges *et al.*, (2019). Número de acesso grupo externo: *An. cruzii* (CAN): GBDP12017-12, *An. cruzii* (TAP): GBDP17080-15, *An. laneanus*: GBMNC7813-20, *An. laneanus*: GBMNC7814-20, *An. homunculus* (BA): GBANO754-12, *An. homunculus* (ES): GBANO755-12, *An. homunculus* (RS): GBANO759-12, *An. homunculus* (SP): GBANO761-12.

A primeira filogenia (Figura 16) mostra *An. bellator* como um grupo monofilético que sofreu um processo de especiação dando origem a dois novos grupos, aqui denominados grupo A e grupo B. O grupo A é formado por dois grupos irmãos (denominados X e Y). O grupo X é composto por indivíduos do Sul e Sudeste (Florianópolis – SC, Ilha do Mel – PR, Antonina – PR, Cananéia – SP, Ilha Grande – RJ), enquanto o grupo Y é formado apenas por indivíduos de Itaparica – BA. O grupo B é composto apenas por indivíduos de Camacan – BA e se mostra um clado bem consistente com valor de suporte de 92%.

A rede de haplótipos (Figura 17) corrobora com os resultados apresentados na filogenia do gene COI (Figura 16, mostrando a população de Camacan completamente isolada das demais populações através de muitos passos mutacionais (13 passos). A população de Itaparica também formou um grupo isolado, assim como a população da Ilha Grande. As demais populações de Florianópolis, Ilha do Mel e Antonina, permaneceram juntas na rede, mostrando que há compartilhamento de haplótipos entre elas.

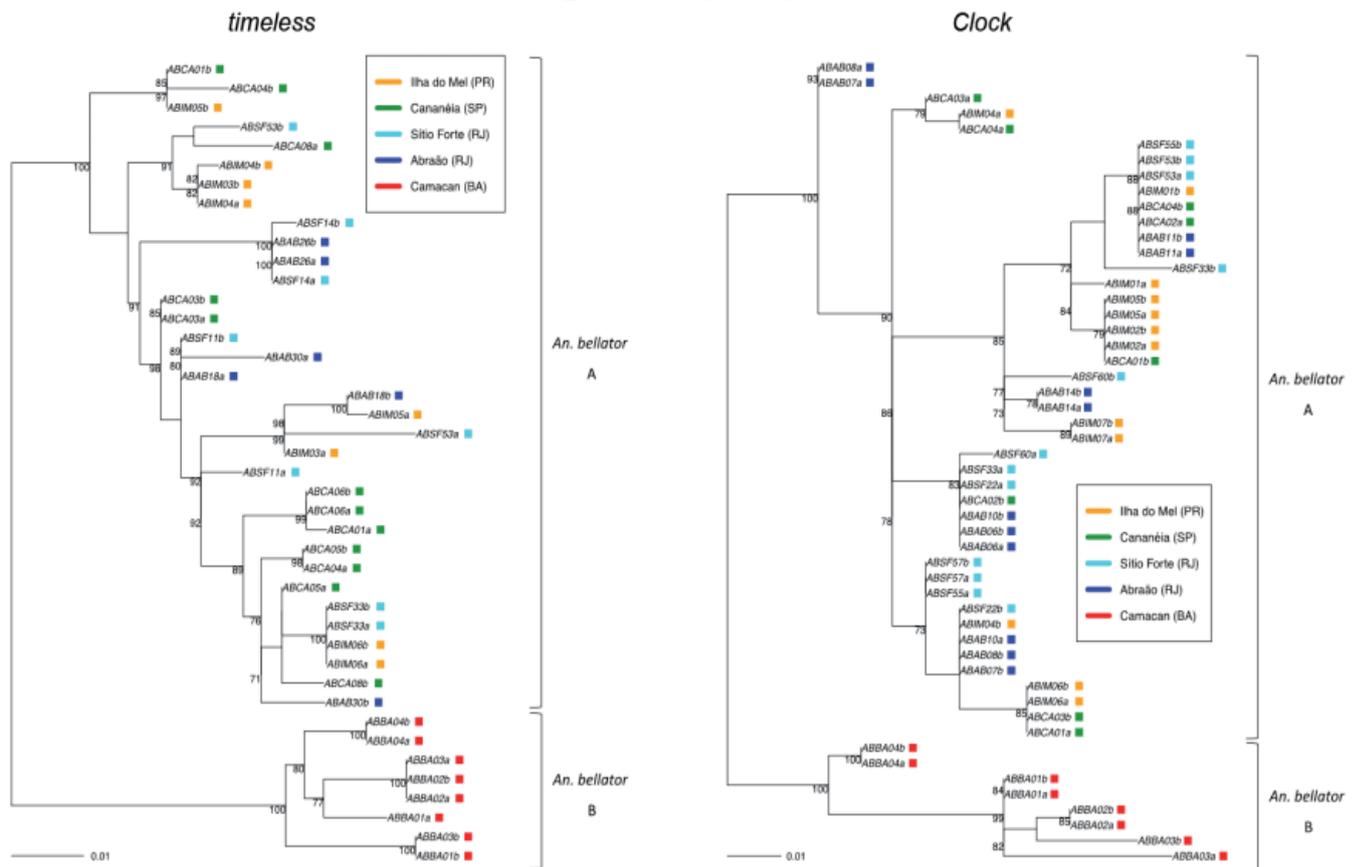
Figura 17 – Rede de haplótipos de seqüências do gene mitocondrial COI para as populações de Florianópolis (SC), Ilha do Mel e Antonina (PR), Ilha Grande (RJ), Camacan e Itaparica (BA). O tamanho de cada círculo é proporcional à frequência do haplótipo. A numeração entre parênteses corresponde à quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Voges *et al.* (2019) obtiveram um resultado semelhante ao encontrado nesse estudo utilizando os genes nucleares *timeless* e *Clock*. O trabalho analisou amostras de *An. bellator* das seguintes localidades: Ilha do Mel – PR, Cananéia – SP, Sítio Forte e Abraão em Ilha Grande – RJ, e Camacan – BA. Assim como os resultados encontrados no presente estudo, as árvores filogenéticas com os genes *timeless* e *Clock* (Figura 18) mostraram Camacan – BA como um grupo isolado das demais localidades do Sul e Sudeste do Brasil. Já as populações do Sul e Sudeste (Ilha do Mel – PR, Cananéia – SP, Sítio Forte e Abraão em Ilha Grande – RJ) compartilham haplótipos entre si, apresentando pouca divergência genética para esses dois marcadores.

Figura 18 – Árvores filogenéticas com os genes *timeless* e *Clock* do trabalho de Voges *et al.* (2019).



Fonte: (VOGES *et al.*, 2019).

Entretanto, a árvore filogenética para o gene COI (Figura 16) mostrou a população de Ilha Grande – RJ distante geneticamente das demais populações do Sul e Sudeste, resultado diferente do encontrado por Voges *et al.* (2019), onde Ilha Grande – RJ compartilha haplótipos com as demais populações do Sul e Sudeste para os genes *timeless* e *clock*.

Por este motivo, a montagem de mais duas árvores filogenéticas, agora utilizando os genes *timeless* e *Clock* como marcadores, foi realizada a fim de compreender melhor a relação da população de Ilha Grande – RJ com as outras localidades, e verificar se os mosquitos de Ilha Grande – RJ utilizados no presente estudo correspondem à mesma população de Ilha Grande – RJ analisada anteriormente por Voges *et al.* (2019). Por último, foi verificado o comportamento das amostras de Itaparica – BA na árvore de marcadores nucleares, visto que essa localidade não estava presente no trabalho de Voges *et al.* (2019).

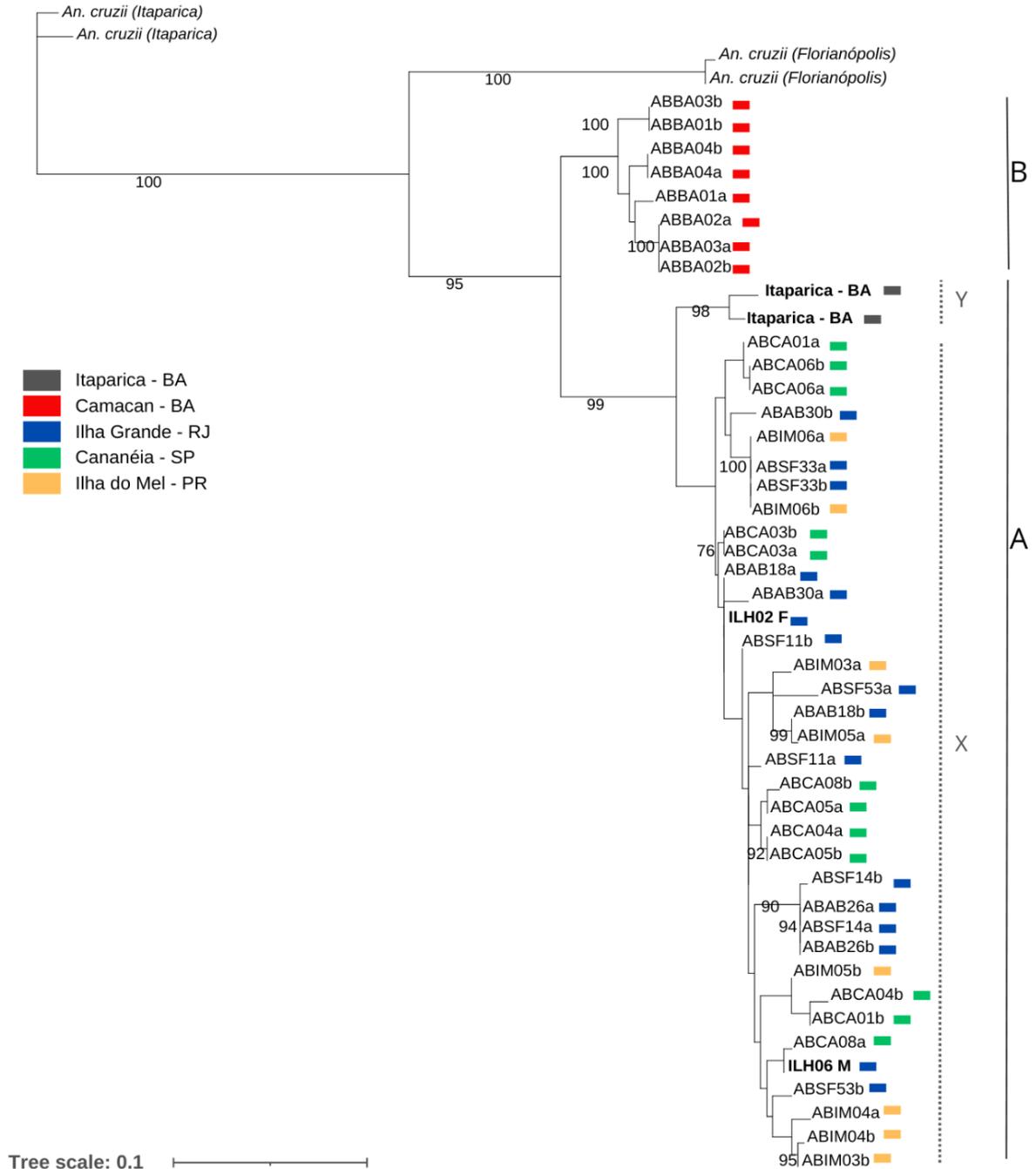
A anotação dos genes *timeless* e *Clock* de *An. bellator* foi realizada nas amostras ILH02_F e ILH06_M de Ilha Grande – RJ, e ITA11_F e ITA12_M de Itaparica – BA (amostras utilizadas em um trabalho paralelo a este pelo grupo), que tiveram seu genoma completo sequenciado por *Illumina*. Além dessas sequências, incluímos as sequências do trabalho de Voges *et al.* (2019) que estão disponíveis no *GenBank* (MG755641 - MG755734).

As árvores dos dois genes nucleares foram montadas com sequências das seguintes populações: Itaparica – BA, Camacan – BA, Sítio Forte e Abraão (Ilha Grande – RJ), Cananéia – SP e Ilha do Mel – PR. Como grupo externo, utilizamos sequências de *An. cruzii*. Os alinhamentos das sequências estão disponíveis no Apêndice 2 (*timeless*) e Apêndice 3 (*Clock*). Os métodos de montagem das árvores foram os mesmos utilizados anteriormente e os modelos evolutivos selecionados foram: TNe+G4 para *timeless* e TNe+G4 para *Clock*.

A filogenia do gene *timeless* para *An. bellator* (Figura 19) apresentou dois grupos principais, grupo A e grupo B. O grupo A é formado por amostras de Itaparica – BA, Sítio Forte e Abraão (Ilha Grande – RJ), Cananéia – SP e Ilha do Mel – PR. Essas localidades estão divididas em dois grupos irmãos, um com as amostras de Itaparica – BA (grupo Y) e outro com as localidades do Sul e Sudeste (grupo X). O grupo B por sua vez é composto apenas por amostras de Camacan – BA. A maioria dos resultados encontrados na árvore de *timeless* corroboram com a filogenia de

COI, como o clado formado por Camacan – BA e o agrupamento das amostras do Sul e Sudeste (resultados já apresentados no trabalho de Voges *et al.* (2019)). Entretanto, podemos observar o isolamento das amostras da Itaparica – BA em um ramo fortemente suportado com 98% de confiabilidade, amostras que ainda não tinham sido analisadas com o gene *timeless*, e a confirmação que os indivíduos de Ilha Grande – RJ compartilham haplótipos com as demais populações do Sul e Sudeste para este marcador.

Figura 19 – Árvore de máxima verossimilhança das sequências de *Anopheles bellator*, utilizando um fragmento do gene *timeless*, obtida com o modelo evolutivo TNe+G4.



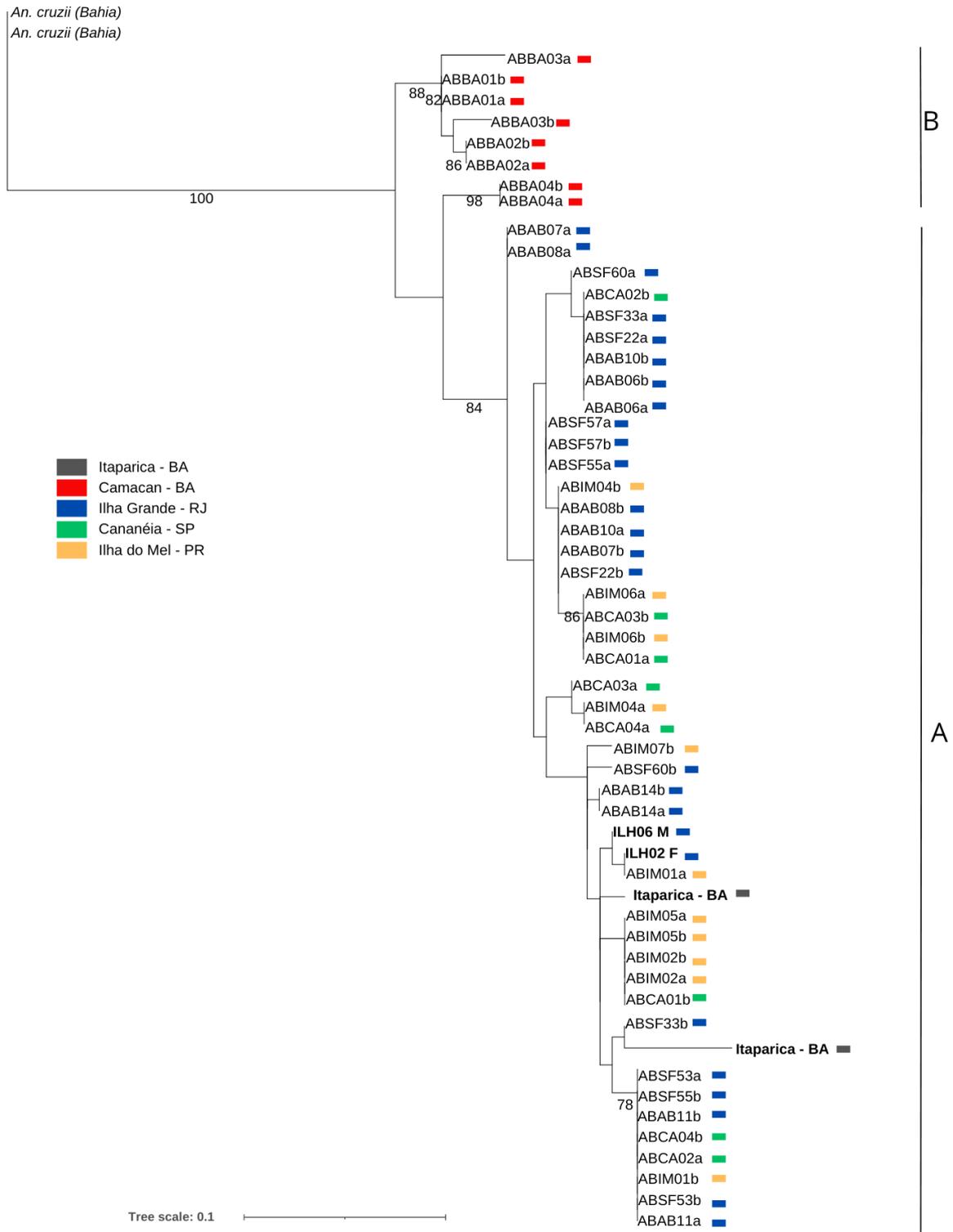
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: *Anopheles cruzii* foi utilizado como grupo externo para enraizar a árvore. Os números abaixo dos ramos são valores de “bootstrap”, baseados em 1000 replicações. F: fêmeas, M: macho. FLO: indivíduos de Florianópolis – SC, ILM: Ilha do Mel – PR, CAN: Cananéia – SP, ILH: Ilha Grande – RJ, CAM: Camacan – BA, ITA: Itaparica – BA. Em negrito amostras coletadas recentemente em Ilha Grande – RJ e Itaparica – BA (sequenciamento *Illumina*).

Na filogenia do gene *Clock* (Figura 20) é possível observar essa homogeneidade mais forte entre as localidades. A árvore é formada basicamente por dois grupos, aqui também denominados A e B, onde o grupo A abriga as amostras de Itaparica – BA, Ilha Grande – RJ, Cananéia – SP e Ilha do Mel – PR, enquanto o B, como em todas as outras árvores, é composto apenas por Camacan – BA. A principal diferença da árvore de *Clock* para as outras árvores filogenéticas apresentadas neste trabalho é o agrupamento de Itaparica – BA com as populações de Sul e Sudeste.

Essa diferença pode ser explicada pois o gene *Clock* (fragmento utilizado no estudo: 159 pb) possui apenas uma região de íntron (110 pb), enquanto o gene *timeless* (fragmento utilizado: 414 pb) possui dois (íntron 1: 78 pb / íntron 2: 105 pb) (RONA *et al.*, 2010; RONA; CARVALHO-PINTO; APEIXOTO, 2013). Os íntrons são sequências não-codificantes, que são removidas e descartadas durante o processamento do RNA. As partes que formarão a proteína são os exons (região codificadora), que serão unidas após a retirada dos íntrons durante o *splicing* (STRACHAN; READ, 2021). As regiões codificadoras tendem a sofrer mais influência da seleção natural, visto que mutações, dependendo do tipo, podem gerar proteínas disfuncionais para a célula. Desta forma, as regiões não-codificantes (íntrons) podem abrigar mais mutações quando comparadas com as regiões codificadoras. Levando em consideração que as mutações são a fonte primordial das inovações genéticas e a sua taxa é utilizada para construção das árvores filogenéticas, conseguimos entender a ausência de agrupamento na árvore de *Clock*, visto que esse gene possui uma grande região codificadora quando comparado ao gene *timeless* (HARTL; CLARCK, 2010).

Figura 20 – Árvore de máxima verossimilhança das sequências de *Anopheles bellator*, utilizando um fragmento do gene *Clock*, obtida com o modelo evolutivo TNe+G4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: *Anopheles cruzii* foi utilizado como grupo externo para enraizar a árvore. Os números abaixo dos ramos são os valores de "bootstrap", baseados em 1000 replicações. F: fêmeas, M: macho. FLO: indivíduos de Florianópolis – SC, ILM: Ilha do Mel – PR, CAN: Cananéia – SP, ILH: Ilha Grande – RJ, CAM: Camacan – BA, ITA: Itaparica – BA. Em negrito amostras coletadas recentemente em Ilha Grande – RJ e Itaparica – BA (sequenciamento *Illumina*).

Analisando as três topologias, podemos perceber que Camacan – BA forma um grupo isolado em todas, com valores acima de 85% de confiabilidade, mostrando um alto nível de diferenciação genética em relação às demais populações de *An. bellator* presentes na Mata Atlântica. Já a população de Itaparica – BA parece estar em um processo de especiação mais recente, pois apesar de formar um grupo isolado das populações do Sul e Sudeste para os marcadores COI e *timeless*, com o gene *Clock* ela mostrou haplótipos compartilhados com essas amostras.

Ainda, na árvore filogenética do gene mitocondrial, a população de Ilha Grande – RJ se mostrou geneticamente isolada das populações do Sul e Sudeste, levando à hipótese de que uma nova linhagem de *An. bellator* estaria presente na Mata Atlântica. Essa diferença nas filogenias com o COI e os genes nucleares (*timeless* e *Clock*), pode estar relacionada ao marcador molecular utilizado, já que em animais, o DNA mitocondrial possui uma taxa de mutação maior quando comparado ao DNA nuclear (RONG *et al.*, 2021). Desta forma, quando há isolamento reprodutivo e, conseqüentemente, o interrompimento do compartilhamento de haplótipos, é comum que mutações apareçam primeiro em regiões do DNA com uma taxa mutacional maior, como é caso do gene COI, tornando-o assim um bom marcador para diferenciar espécies muito próximas. De fato, estudos já mostraram diferenças nas relações inter-específicas de mosquitos utilizando filogenias de genes nucleares e mitocondriais, onde os últimos resultaram num aumento no número de grupos filogenéticos (ZADRA; RIZZOLI; ROTA-STABELLI, 2021).

Árvores de gene podem fornecer uma estimativa razoável da árvore de espécie, entretanto, encontrar incongruência entre as árvores de genes pode ser comum, e é resultado principalmente de dois eventos biológicos: *i*) *ILS* (do inglês *incomplete lineage sorting*), no qual polimorfismos ancestrais persistem através do processo de especiação, e *ii*) introgressão, quando ocorre fluxo gênico entre espécies próximas (TAJIMA, 1983; PAMILO; NEI, 1988; LEACHÉ *et al.*, 2014). *ILS* é a explicação mais simples para a heterogeneidade das árvores, pois é uma consequência de forças evolutivas que operam em todas as populações (ex.: mutação e deriva genética). Essas incongruências ocorrem, pois, diferentes genes evoluem como resultado de mutações pontuais, podendo se duplicar, serem perdidos ou transferidos ao longo do tempo. Ainda, alelos podem coexistir em populações por longos períodos, mesmo após vários eventos de especiação,

dificultando a visualização da árvore de espécie através da árvore de gene. Sendo assim, o *ILS* tem implicações importantes para estudos filogenéticos, e pode também ser uma explicação para as diferentes topologias observadas neste estudo, pois depende da persistência de polimorfismos em diferentes eventos de especiação (WIENS, 1998; ROGERS; GIBBS, 2014; SZLLOSI *et al.*, 2015).

3.6 ANÁLISE INTRA-POPULACIONAL

As medidas intra-populacionais para o gene COI, assim como os valores dos testes de neutralidade de Tajima estão disponíveis na Tabela 3.

Tabela 3 – Medidas intrapopulacionais do gene COI das populações de *Anopheles bellator* analisadas.

Populações	N	S	θ	Π	D_T
Camacan – BA	5	4	0,00625	0,005586	-0,41017
Itaparica - BA	10	11	0,00710	0,00941	1,45932
Ilha Grande – RJ	11	2	0,00234	0,00174	-0,77815
Ilha do Mel e Antonina – PR	3	1	0,00156	0,00156	-0,61237
Florianópolis – SC	8	6	0,00530	0,00449	0,70456

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: N: número de sequências utilizadas para cada população; S: número de sítios polimórficos; θ : diversidade de nucleotídeo calculada com base no número total de mutações (Eta); Π : diversidade de nucleotídeo calculada com base nas diferenças par-a-par; D_T : teste de neutralidade de Tajima. Devido à baixa quantidade de sequências da Ilha do Mel (PR) e Antonina (PR), unimos essas duas localidades para representar o Estado do Paraná, visto que o teste de neutralidade de Tajima funciona apenas com mais de duas sequências.

Mesmo com o maior número de sequências analisadas, a população do Estado do Rio de Janeiro se mostrou pouco polimórfica, apresentando um dos menores valores de sítios polimórficos, assim como baixos valores de π e θ . Já a população da Ilha de Itaparica – BA se mostrou a mais polimórfica apresentando os maiores valor de π e θ , assim como o maior número de sítios polimórficos.

Os testes de neutralidade não foram significativos em nenhum caso ($p > 0,10$), indicando que não há desvios ao modelo neutro de evolução molecular no fragmento analisado. No entanto, apesar de nenhum teste ser significativo, a maior parte das populações apresentaram valores negativos para o teste de Tajima, que é calculado comparando os valores de π e de θ . A maioria das populações

apresentam maiores valores de θ em relação aos valores de π , o que é indicativo de uma maior quantidade de singletons, e, possivelmente, de crescimento populacional. Entretanto, a população de Itaparica apresentou um valor de π maior do que o valor de θ , sugerindo manutenção de polimorfismos dentro da população.

3.7 ANÁLISE INTER-POPULACIONAL

Altos valores de F_{ST} foram encontrados em quase todas as comparações par-a-par ($F_{ST} > 0,7$) (Tabela 4), e os maiores valores foram obtidos a partir das comparações de Camacan com as demais localidades ($F_{ST} > 0,9$), corroborando com os resultados obtidos por Voges *et al.* (2019) utilizando os genes nucleares *timeless* e *Clock* ($F_{ST} > 0,6$). Segundo Hey; Pinho (2012), valores de $F_{ST} > 0,35$ caracterizam indivíduos de espécies diferentes. Já valores abaixo deste limiar ($F_{ST} < 0,35$) sugerem que os indivíduos das duas populações fazem parte de uma mesma espécie, como na comparação entre Florianópolis e Paraná que mostrou um valor baixo de diferenciação genética ($F_{ST} = 0,07563$), o que pode ser explicado pela curta distância de 290 km entre as localidades. No entanto, apesar da pouca distância geográfica (390 Km) entre Camacan e Itaparica (localizadas no mesmo Estado), foi encontrado entre elas um valor expressivo de F_{ST} ($> 0,9$), sugerindo que essas duas populações não pertencem à mesma espécie, o que indica que a distância geográfica *per se* não é uma explicação razoável para a estruturação populacional encontrada entre as populações de *An. bellator*. De fato, os altos valores de F_{ST} encontrados nesse estudo não podem explicados por isolamento geográfico, pois a correlação entre a distância genética (F_{ST}) e a distância geográfica (Km) entre as populações não foi significativa em nenhum dos três testes de Mantel realizados (todas as populações: $r = 0.396658$, $P = 0.1143$; sem Camacan – BA: $r = 0.5792406$, $P = 0.1249$; sem Itaparica – BA: $r = 0.7532274$, $P = 0.0851$).

Tabela 4 – Medidas inter-populacionais entre as populações de *Anopheles bellator* analisadas utilizando o gene COI.

Populações	Km	F _{ST}	D _{XY}	D _a	S ₁	S ₂	S _s	S _F	T
Camacan (BA) x Ilha Grande RJ	1438	0,94695	0,06268	0,05936	3	2	0	17	0,085
Camacan (BA) X Paraná (PR)	1449	0,95129	0,06790	0,06459	4	1	0	18	0,090
Camacan (BA) X Florianópolis (SC)	2286	0,92129	0,06586	0,06067	3	3	1	18	0,087
Camacan (BA) X Itaparica (BA)	390	0,89470	0,05953	0,05326	4	5	0	16	0,076
Itaparica (BA) X Paraná (PR)	1840	0,82112	0,02743	0,02252	7	1	0	8	0,032
Itaparica (BA) X Florianópolis (SC)	2581	0,76522	0,02889	0,02211	8	4	0	4	0,031
Itaparica (BA) X Ilha Grande (RJ)	1913	0,74361	0,01921	0,01428	4	1	1	3	0,020
Ilha Grande (RJ) X Paraná (PR)	734	0,82240	0,01105	0,00909	2	1	0	2	0,013
Ilha Grande (RJ) X Florianópolis (SC)	997	0,72435	0,01393	0,01009	3	2	1	1	0,014
Florianópolis (SC) X Paraná (PR)	293	0,07563	0,00413	0,00031	4	1	0	0	0,0004

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Km: distância entre as populações em quilômetros; F_{ST}: coeficiente de diferenciação genética; D_{XY}: divergência bruta; D_a: divergência líquida; S₁: número de sítios polimórficos exclusivos da primeira população; S₂: número de sítios polimórficos exclusivos da segunda população; S_s: número de polimorfismos compartilhados entre as populações; S_F: número de diferenças fixas entre as populações; T: tempo de divergência entre as populações em milhões de anos. A localidade Paraná inclui sequências de Ilha do Mel (3) e Antonina (a).

Ferreira (2017), utilizando o gene mitocondrial COI, analisou populações de *An. cruzii* de Camacan e Itaparica (Bahia), Itatiaia (Rio de Janeiro), Bocaina, Cananéia e Tapiraí (São Paulo), Antonina, Morretes e Ilha do Mel (Paraná) e Florianópolis, Santo Amaro da Imperatriz e São Francisco do Sul (Santa Catarina). Os resultados do cálculo de F_{ST} apresentaram valores altos para as comparações de Camacan – BA com as demais localidades ($F_{ST} > 0,87$), assim como as comparações da Ilha de Itaparica – BA ($F_{ST} > 0,91$), resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho com *An. bellator*.

A população da Ilha de Itaparica – BA também apresentou valores de F_{ST} expressivos nas comparações com as populações do Sul e Sudeste, entretanto, o teste de Mantel não indicou que este isolamento seja devido à distância geográfica. Portanto, o isolamento ecológico também pode ser uma explicação para a diferenciação genética encontrada. Apesar das populações do Sul e Sudeste também estarem localizadas no litoral do Brasil, a vegetação encontrada nas áreas são diferentes da presente em Itaparica, que possui áreas de restinga e manguezal, já as localidades do Sul e Sudeste são compostas, em sua maioria, por Floresta Ombrófila Densa (PEREIRA, 2009). Durante o período de coleta em Itaparica foi observado uma fragmentação da Mata e muitas áreas de reflorestamento, enquanto nas localidades do Sul e Sudeste as áreas de coleta eram regiões de Preservação e Mata primária.

A especiação é um processo evolutivo que ocorre de maneira aleatória segregando populações em linhagens evolutivas distintas. Um dos fatores que pode levar a especiação é a baixa ou a ausência de fluxo gênico entre as populações e, além do isolamento geográfico, o fluxo gênico pode ser interrompido por isolamento comportamental e/ou isolamento ecológico, resultando no acúmulo de diferenças genéticas ao longo do tempo, que pode levar à divergência e ao isolamento reprodutivo (SHULTS *et al.*, 2022).

A presença de duas linhagens isoladas dentro do Estado da Bahia pode ser explicada por diferentes pressões seletivas, já que o tipo de ecossistema encontrado em cada localidade é muito diferente, o que pode ter ocasionado a evolução dessas duas linhagens. Itaparica é basicamente composta por restinga e manguezal, com árvores de pequeno a médio porte e bromélias expostas ao sol e sob influência direta do mar. Já Camacan é caracterizada por árvores de médio a grande porte, com bromélias sob a sombra de grandes árvores e não há influência direta do mar

(THOMAS *et al.*, 1998). Além das diferenças na vegetação, também existe diferença de altitude entre as localidades, o que pode ter gerado diferentes pressões seletivas. Itaparica está localizada ao nível do mar (SILVA, 2009), enquanto Camacan está entre 180 e 960 metros acima do nível do mar (Figura 21) (MARTINS; GALILEO, 2010).

Figura 21 – Mapa topográfico do Estado da Bahia mostrando a diferença de altitude entre Itaparica e Camacan.



Fonte: Fonte: Elaborado pelo autor em *R software* versão 1.4.1106.

Diversos estudos têm demonstrado o mesmo padrão de separação entre os segmentos Norte e Sul da Mata Atlântica em diversos grupos de fauna e flora (incluindo *An. cruzii* s.l. e *An. bellator*), convergindo particularmente na região norte do Espírito Santo e Sul da Bahia. Esses achados sugerem a ocorrência de um evento vicariante comum (RONA *et al.*, 2009; RONA *et al.*, 2010; PATTERSON; COSTA, 2013; VOGES *et al.*, 2019). De fato, essa região é caracteriza pela

presença de várias espécies endêmicas, como é o caso de espécies de legumes dos gêneros *Brodriguesia*, *Arapatiella* e *Harleyodendron*, de gramíneas dos gêneros *Atractantha*, *Anomochloa*, *Alvimia* e *Sucrea*, de anfíbios como *Rhamphophryne proboscídea*, *Leptodactylus viridis* e *Hylomantis aspera*, e de espécies de psitacídeos como *Propyrrhura maracana*, *Aratinga auricapilla* e *Aratinga aurea* (THOMAS *et al.*, 1998; SILVANO; PIMENTA, 2003; HENRIQUE; CORDEIRO, 2003)

Como citado anteriormente, as espécies do complexo *An. gambiae s. l.* estão distribuídas por quase todo território Africano e, em muitas áreas, vivem em simpatria. Entretanto, apesar de viverem em simpatria, diferentes espécies preferem nichos ecológicos distintos. Por exemplo, as espécies *An. arabiensis* e *An. gambiae s.s.* preferem áreas mais secas e ensolaradas, com reservatórios de água temporários, como poças e pegadas. Já a espécie *An. coluzzii* prefere os campos de arroz, onde há reservatório de água artificial e mais permanentes. As espécies *An. melas* e *An. merus* estão associadas a águas salinas, enquanto *An. bwambae* prefere se reproduzir em águas geotérmicas salobras (ONEN *et al.*, 2021). Além de terem preferência por nichos ecológicos diferentes dentro de uma mesma região, as espécies do complexo *An. gambiae s.l.* apresentam valores de F_{ST} semelhantes aos encontrados neste trabalho: *Anopheles arabiensis* e *Anopheles gambiae s.s.*, que vivem em simpatria na África Subsaariana, apresentaram valores de $F_{ST} = 0,9$ quando comparadas entre si, utilizando sequências do gene mitocondrial COI (MATTHEWS *et al.*, 2007).

Os altos valores de F_{ST} encontrados nas comparações de Ilha Grande com as outras populações do Sul (Ilha do Mel e Florianópolis, $F_{ST} = 0,72$ e $0,82$, respectivamente) não eram esperados nesse trabalho, já que Voges *et al.* (2019) encontraram valores baixos de diferenciação genética nas comparações entre a Ilha Grande – RJ e as demais populações do Sul e Sudeste (Ilha do Mel – PR e Cananéia – SP, $F_{ST} \leq 0,1$) para os genes nucleares *timeless* e *Clock*. Essa diferença nos valores de F_{ST} corrobora com os resultados observados nas filogenias com o COI e os genes nucleares (*timeless* e *Clock*) e pode estar relacionada ao marcador molecular utilizado, já que o DNA mitocondrial possui uma taxa de mutação maior quando comparado ao DNA nuclear (RONG *et al.*, 2021), sendo um bom marcador para diferenciar espécies muito próximas. Até nas comparações de Camacan com as demais localidades, onde os maiores valores de F_{ST} foram obtidos tanto neste trabalho com o COI quanto no trabalho de Voges *et al.* (2019) utilizando

os genes nucleares, foi visto maiores valores de F_{ST} utilizando o gene mitocondrial ($F_{ST} COI \sim 0,9$ / $F_{ST} timeless$ e $Clock \sim 0,6$).

A estimativa do tempo de divergência entre as populações de *An. bellator* foi calculada com base nas diferenças líquidas (D_a) entre as linhagens (Tabela 4). Para esta estimativa, assumimos que a taxa de substituição em *An. bellator* seja semelhante às taxas estimadas para o mesmo fragmento do gene COI entre *Drosophila persimilis* e *Drosophila pseudoobscura* (número de acesso LOC6589076 e LOC6589076, respectivamente) que divergiram há 0,85 milhões de anos (TAMURA; SUBRAMANIAN; KUMAR, 2004). O valor de D_a calculado entre as duas espécies de *Drosophila* para o mesmo fragmento do COI foi $D_a = 0,58836$.

Os maiores tempos de divergência encontrados foram entre a população de Camacan – BA com as demais, onde a separação ocorreu por volta de 80 - 90 mil anos atrás. Esse período corresponde ao Pleistoceno, que vai de 1,8 milhões a 10.000 anos atrás (SUGUIO, 2010), quando ocorreram muitas mudanças climáticas como as glaciações, resultando em esfriamento generalizado, baixa umidade do ar e, conseqüentemente, diminuindo o nível de chuvas. O baixo nível de chuvas levou a condições climáticas mais áridas, ocasionando a fragmentação da Mata Atlântica em refúgios, como o refúgio da Bahia, refúgio Pernambuco e refúgio São Paulo, por exemplo. A formação desses fragmentos ajudou a moldar a biodiversidade atual e a formação de padrões de endemismo (CARNAVAL *et al.*, 2009). Essa dinâmica de mudanças climáticas pode ajudar a explicar a estruturação populacional e possível processo de especiação alopátrica entre as populações analisadas de *An. bellator*, assim como já foi visto para grupos tão diversos quanto cobras, sapos, primatas, roedores, aves e diversos outros vetores de malária (CONNOR, 1986; GRAZZIOTIN *et al.*, 2006; CABANNE; SANTOS; MIYAKI, 2007; PEDRO; SALLUM; BUTLIN, 2008; RONA *et al.*, 2009; CARNAVAL *et al.*, 2009; RONA *et al.*, 2010; LOAIZA *et al.*, 2012; VALDEZ; D'ELÍA, 2013; BUCKNER *et al.*, 2015).

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho com o gene COI fica claro a existência de pelo menos quatro grupos distintos de *An. bellator* na Mata Atlântica: dois grupos no Estado da Bahia, um localizado na região de Camacan e outro na Ilha de Itaparica, o terceiro grupo formado por indivíduos de Cananéia, Ilha do Mel, Antonina e Florianópolis, e o quarto e último grupo localizado em Ilha Grande. Esses resultados corroboram com trabalhos anteriores que utilizaram isoenzimas e genes nucleares (CARVALHO-PINTO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2003; VOGES *et al.*, 2019) e mostraram o isolamento genético das duas populações da Bahia em relação as demais do Sul e Sudeste do Brasil.

Nosso trabalho foi o primeiro analisar e comparar as populações de *An. bellator* de Camacan e Ilha de Itaparica no Estado da Bahia. Ilha de Itaparica formou um grupo isolado em duas (COI e *timeless*) das três topologias apresentadas, assim como na rede de haplótipos, e valores de F_{ST} altos em todas as comparações, e acima do sugerido por Hey; Pinho (2012) ($F_{ST} > 0,35$) para indivíduos de espécies diferentes.

Apesar da população de Ilha Grande (RJ) não ter mostrado nenhum sinal de estruturação no trabalho de Voges *et al.* (2019) com os genes nucleares *timeless* e *Clock*, neste trabalho, esta população apresentou uma grande diferenciação genética em todas as comparações feitas com o gene mitocondrial COI. Essa alta taxa de diferenciação pode ter ocorrido devido ao marcador molecular utilizado, entretanto, mais estudos são necessários pois essa população pode estar passando por um processo incipiente de especiação.

Mais estudos são necessários para melhor compreensão da estrutura genética populacional de *An. bellator* na Mata Atlântica. A utilização de mais marcadores moleculares, e a análise de populações intermediárias entre as localidades aqui estudadas, podem auxiliar.

REFERÊNCIAS

ADITYA, N. P. *et al.* Advances in Nanomedicines for Malaria Treatment. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 201–202, p. 1–17, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.014>.

ALI, Said *et al.* Morphological identification and genetic characterization of *Anopheles stephensi* in Somaliland. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05339-y>.

ALLGAYER, Heloisa; HILLER, Rafael Francisco; VALIATI, Victor Hugo. Uma Análise Epistêmica Para a Elucidação Do Complexo De Espécies Críticas. **Conjectura filosofia e educação**, [s. l.], v. 26, n. 0, p. 85–100, 2021.

ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure**, [s. l.], p. 305–309, 2003.

ASHLEY, Elizabeth A.; PYAE PHYO, Aung; WOODROW, Charles J. Malaria. **The Lancet**, [s. l.], v. 391, n. 10130, p. 1608–1621, 2018.

BARRÓN, Maite G. *et al.* A new species in the major malaria vector complex sheds light on reticulated species evolution. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

BEEBE, Nigel W. DNA barcoding mosquitoes: Advice for potential prospectors. **Parasitology**, [s. l.], v. 145, n. 5, p. 622–633, 2018.

BERTI, Jesús *et al.* New Records of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Bolívar State in South Eastern Venezuela, with 27 New Species for the State and 5 of Them New in the Country. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 2, n. March, p. 1–10, 2015.

BOURKE, Brian P. *et al.* High Levels of Diversity in *Anopheles* Subgenus *Kerteszia* Revealed by Species Delimitation Analyses. **Genes**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 1–14, 2023.

BUCKNER, Janet C. *et al.* Biogeography of the marmosets and tamarins (Callitrichidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 82, n. PB, p. 413–425, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.031>.

CABANNE, Gustavo Sebastián; SANTOS, Fabrício R.; MIYAKI, Cristina Yumi. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): Vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. **Biological**

Journal of the Linnean Society, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 73–84, 2007.

CAMPOS, Melina *et al.* Population Genetics of *Anopheles pretoriensis* in Grande Comore Island. **Insects**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–8, 2023.

CARNAVAL, Ana Carolina *et al.* Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, [s. l.], v. 323, n. 5915, p. 785–789, 2009.

CARVALHO-PINTO, Carlos José de; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo. Isoenzimatic analysis of four *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 471–475, 2004.

CARVALHO-PINTO, Carlos José de; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo. Isoenzymatic Analysis of Four *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator* Dyar & Knab (Diptera: Culicidae) Populations. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 98, n. 8, p. 1045–1048, 2003.

CASTELLI, Francesco; TOMASONI, Lina R. New insights on malaria. *In: NEW MICROBIOLOGICA*. [S. l.: s. n.], 2022. v. 45, p. 83–98.

CHATPIYAPHAT, K. *et al.* Geometric morphometrics to distinguish the cryptic species *Anopheles minimus* and *An. harrisoni* in malaria hot spot villages, western Thailand. **Medical and Veterinary Entomology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 293–301, 2021.

CLEMENT, Mark *et al.* TCS: Estimating Gene Genealogies. **Proceeding 16th International Parallel Distributed Processing Symposium**, [s. l.], p. 184–190, 2002.

COETZEE, Maureen *et al.* *Anopheles coluzzii* and *anopheles amharicus*, new members of the *anopheles gambiae* complex. **Zootaxa**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 74–77, 2000.

COETZEE, M.; FONTENILLE, D. Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 599–605, 2004.

CONNOR, Edward F. The role of Pleistocene forest refugia in the evolution and biogeography of tropical biotas. **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 165–168, 1986.

CONSOLI, Roτραut A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo. **Principais mosquitos de importância médica no Brasil**. [S. l.: s. n.], 1994. v. Único

DIAS, Guilherme de Rezende *et al.* Cryptic diversity in an Atlantic Forest malaria vector from the mountains of South-East Brazil. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2018.

FERREIRA, Betina Westphal. Linhagens Genéticas em *Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908 (Diptera: Culicidae): Aspectos Moleculares, Ecológicos e Morfométricos. [s. l.], 2017.

FOLMER, O. *et al.* DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994.

GRAZZIOTIN, Felipe G. *et al.* Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): Past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 15, n. 13, p. 3969–3982, 2006.

HAFALLA, Julius Clemence; SILVIE, Olivier; MATUSCHEWSKI, Kai. Cell biology and immunology of malaria. *In*: IMMUNOLOGICAL REVIEWS. [S. l.: s. n.], 2011. v. 240, p. 297–316.

HARBACH, Ralph E.; RATTANARITHIKUL, Rampa; HARRISON, Bruce A. Baimaia, a New Subgenus for *Anopheles kyondawensis* Abraham, a Unique Crabhole-breeding Anopheline in Southeastern Asia. [s. l.], v. 107, n. 4, p. 750–761, 2005.

HARTL, Daniel L.; CLARCK, Andrew G. **Princípios de Genética de Populações 4ª Edição**. [S. l.: s. n.], 2010.

HARTMEYER, Gitte N. *et al.* *Plasmodium cynomolgi* as Cause of Malaria in Tourist to Southeast Asia, 2018. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 1936–1939, 2019.

HEBERT, Paul D.N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HENRIQUE, Paulo; CORDEIRO, Chaves. a Fragmentação Da Mata Atlântica No Sul Da Bahia E Suas Implicações Na Conservação Dos Psitacídeos. **Corredor de Biodiversidade da Mata Atlântica do Sul da Bahia Publicação em**

CDROM Ilhéus IESB CI CABS UFMG UNICAMP, [s. l.], p. 1–13, 2003.

HEY, Jody; PINHO, Catarina. Population genetics and objectivity in species diagnosis. **Evolution**, [s. l.], v. 66, n. 5, p. 1413–1429, 2012.

HUESTIS, Diana L.; LEHMANN, Tovi. Ecophysiology of *Anopheles gambiae* s.l.: Persistence in the Sahel. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 28, n. June, p. 648–661, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.027>.

KARIMIAN, Fateh *et al.* Phylogenetic analysis of the oriental-palearctic-afrotropical members of *Anopheles* (Culicidae: Diptera) based on nuclear rDNA and mitochondrial DNA characteristics. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 67, n. 5, p. 361–367, 2014.

KIRCHGATTER, Karin *et al.* Phylogeny of *Anopheles* (Kerteszia) (Diptera: Culicidae) using mitochondrial genes. **Insects**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2020.

KRESS, W. John *et al.* DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 25–35, 2015.

KROGSTAD, Donald J. Malaria as a Reemerging Disease. **Epidemiologic Reviews**, [s. l.], v. 18, 1996.

KRZYWINSKI, Jaroslaw; BESANSKY, Nora J. Molecular Systematics of *Anopheles*: From Subgenera to Subpopulations. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 48, p. 111–139, 2003.

KUMAR, N. Pradeep *et al.* DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 1–7, 2007.

LEACHÉ, Adam D. *et al.* The influence of gene flow on species tree estimation: A simulation study. **Systematic Biology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 17–30, 2014.

LI, Jing *et al.* Applying DNA barcoding to conservation practice: a case study of endangered birds and large mammals in China. **Biodiversity and Conservation**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 653–668, 2017.

LIMA, Neuza Rejane Wille *et al.* Plasticidade Fenotípica. **Revista de Ciência Elementar**, [s. l.], v. 5, n. 2, 2017.

LOAIZA, J. R. *et al.* Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–12, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.004>.

LOUGHLIN, Samantha O'. The expanding *Anopheles gambiae* species complex. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1722434>.

MANTEL, Nathan. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. **Cancer Research**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 209–220, 1967.

MARTINS, Ubirajara R.; GALILEO, Maria Helena M. Cerambycidae (Coleoptera) da Serra Bonita, Camacan, Bahia, Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, [s. l.], v. 50, n. 28, p. 435–443, 2010.

MATTHEWS, S. D. *et al.* Evidence for late Pleistocene population expansion of the malarial mosquitoes, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* in Nigeria. **Medical and Veterinary Entomology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 358–369, 2007.

MEDEIROS-SOUSA, Antônio Ralph *et al.* Effects of anthropogenic landscape changes on the abundance and acrodendrophily of *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzei*, the main vector of malaria parasites in the Atlantic Forest in Brazil. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2744-8>.

MENEGON, Michela *et al.* Molecular Characterization of *Anopheles algeriensis* Theobald, 1903 (Diptera: Culicidae) Populations from Europe. **Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 9, 2022.

MILLER, Louis H. *et al.* Malaria biology and disease pathogenesis: Insights for new treatments. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 156–167, 2013.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual review of ecology and systematics**. Vol. 18, [s. l.], v. 92, p. 269–292, 1987.

MULTINI, Laura Cristina; WILKE, André Barretto Bruno; MARRELLI, Mauro Toledo. Neotropical *Anopheles* (*Kerteszia*) mosquitoes associated with bromeliad-malaria transmission in a changing world. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 205, 2020.

MULTINI, Laura Cristina; WILKE, André Barretto Bruno; MARRELLI, Mauro Toledo. Urbanization as a driver for temporal wing-shape variation in *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, [s. l.], v. 190, p. 30–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.10.009>.

NGUYEN, Lam Tung *et al.* IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015.

OBSOMER, Valérie; DEFOURNY, Pierre; COOSEMANS, Marc. The Anopheles dirus complex: Spatial distribution and environmental drivers. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 6, p. 1–16, 2007.

OLIVEIRA, T. M.P. *et al.* Mitochondrial Genomes of Anopheles (Kerteszia) (Diptera: Culicidae) from the Atlantic Forest, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 790–797, 2016.

ONEN, Hudson *et al.* Predatory and competitive interaction in Anopheles gambiae sensu lato larval breeding habitats in selected villages of central Uganda. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04926-9>.

OSWALDO PAULO FORATTINI. **Culicidologia Médica Vol.2**. [S. l.: s. n.], 2002.

PAMILO, P.; NEI, M. Relationship between gene trees and species trees. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 568–583, 1988.

PATTERSON, Bruce D.; COSTA, Leonora P. Bones, Clones, and Biomes. **Bones, Clones, and Biomes**, [s. l.], n. June, p. 3–7, 2013.

PEDRO, P. M.; SALLUM, M. A.; BUTLIN, R. K. Forest-obligate Sabethes mosquitoes suggest palaeoecological perturbations. **Heredity**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 186–195, 2008.

PEREIRA, Anisio Baptista. Mata Atlântica: Uma Abordagem Geográfica. **Nucleus**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 27–52, 2009.

PHUNNGAM, Prin *et al.* Molecular Identification of Four Members of the Anopheles dirus Complex Using the Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit i Gene. **Journal of the American Mosquito Control Association**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 263–269, 2017.

PRUDHOMME, Jorian *et al.* Altitudinal variations in wing morphology of Aedes albopictus (Diptera, Culicidae) in Albania, the region where it was first recorded in Europe. **Parasite**, [s. l.], v. 26, 2019.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foudation for Statistical Computing**, [s. l.], 2013. Disponível em: <http://www.r-project.org/>.

RAGHAVENDRA, Kamaraju *et al.* Malaria vector control: From past to future. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 108, n. 4, p. 757–779, 2011.

RAMÍREZ, C. C.L.; DESSEN, E. M.B. Chromosome differentiated

populations of *Anopheles cruzii*: Evidence for a third sibling species. **Genetica**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 73–80, 2000.

ROGERS, Jeffrey; GIBBS, Richard A. Comparative primate genomics: Emerging patterns of genome content and dynamics. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 347–359, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3707>.

RONA, Luísa Dp *et al.* Assessing the molecular divergence between *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* populations from Brazil using the timeless gene: Further evidence of a species complex. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2009.

RONA, Luísa D.P. *et al.* Estimation of divergence time between two sibling species of the *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* complex using a multilocus approach. **BMC Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2010.

RONA, Luísa Dp; CARVALHO-PINTO, Carlos J.; APEIXOTO, Alexandre A. Evidence for the occurrence of two sympatric sibling species within the *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* complex in southeast Brazil and the detection of asymmetric introgression between them using a multilocus analysis. **BMC Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2013.

RONA, Luísa Dp; CARVALHO-PINTO, Carlos J.; PEIXOTO, Alexandre A. Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* complex in south-east Brazil. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–9, 2010.

RONG, Ziyue *et al.* The Mitochondrial Response to DNA Damage. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, n. May, p. 1–10, 2021.

ROZAS, Julio *et al.* DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 2017.

SANTOS, André Luís F. *et al.* Comparison of DNA extraction using proteinase K and extraction kit: Analysis of the quality of the genetic material. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 70–75, 2018.

SANTOS, Vanessa Sardinha dos. **Malária**. [S. l.], [s. d.].

SCHUSTER, Frederick L. Cultivation of *Plasmodium* spp. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 355–364, 2002.

SHAW, W. Robert; MARCENAC, Perrine; CATTERUCCIA, Flaminia. *Plasmodium* development in *Anopheles*: a tale of shared resources. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 124–135, 2022.

SHULTS, Phillip *et al.* Species delimitation and mitonuclear discordance within a species complex of biting midges. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05856-x>.

SILVA, J. S. Caracterização Hidrogeoquímica Da Ilha De Itaparica, Bahia. [s. l.], n. li, p. 1–20, 2009.

SILVANO, Debora Leite; PIMENTA, Bruno V. S. Diversidade e distribuição de anfíbios na Mata Atlântica do sul da Bahia. **Anfíbios Anuros**, [s. l.], n. May 2014, p. 1–22, 2003.

STRACHAN, Tom.; READ, Andrew. Genetica molecolare umana. [s. l.], 2021.

SUGUIO, Kenitiro. **Geologia do Quartenário e Mudanças Ambientais**. [S. l.: s. n.], 2010.

SZLLOSI, Gergely J. *et al.* The inference of gene trees with species trees. **Systematic Biology**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. e42–e62, 2015.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 437–460, 1983.

TAJIMA, Fumio. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. [s. l.], 1989.

TALAPKO, Jasminka *et al.* Malaria: The Past and The Present. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2019.

TAMURA, Koichiro; SUBRAMANIAN, Sankar; KUMAR, Sudhir. Temporal Patterns of Fruit Fly (*Drosophila*) Evolution Revealed by Mutation Clocks. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 36–44, 2004.

THOMAS, Wm Wayt *et al.* Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 311–322, 1998.

VALDEZ, Lourdes; D'ELÍA, Guillermo. Differentiation in the Atlantic Forest: Phylogeography of *Akodon montensis* (Rodentia, Sigmodontinae) and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia. **Journal of Mammalogy**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 911–922, 2013.

VOGES, Kamila *et al.* Novel molecular evidence of population structure in anopheles (*Kerteszia*) bellator from brazilian atlantic forest. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 114, n. 4, p. 1–5, 2019.

WIENS, John J. Combining data sets with different phylogenetic histories. **Systematic Biology**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 568–581, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2022**. [S. l.: s. n.], 2022.

ZADRA, Nicola; RIZZOLI, Annapaola; ROTA-STABELLI, Omar. Chronological incongruences between mitochondrial and nuclear phylogenies of aedes mosquitoes. **Life**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–17, 2021.

ZAVORTINK, Thomas J. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXIX. A Review of the Subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. [s. l.], 1973.

ZHANG, De Xing; HEWITT, Godfrey M. Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 99–120, 1997.

