



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**  
**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**MARIA JÚLIA DE FRANÇA SOUZA SILVA**

**ESTUDO EVOLUTIVO DE ESPÉCIES DE CULICÍDEOS COM POSICIONAMENTO  
FILOGENÉTICO INCERTO**

Recife, 2024

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**  
**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

MARIA JÚLIA DE FRANÇA SOUZA SILVA

**ESTUDO EVOLUTIVO DE ESPÉCIES DE CULICÍDEOS COM POSICIONAMENTO  
FILOGENÉTICO INCERTO**

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Gabriel da Luz Wallau - Departamento de Entomologia (FIOCRUZ-PE)

Coorientador(a): Me. Alexandre Freitas da Silva - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências (FIOCRU)

Recife, 2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Souza Silva, Maria Júlia de França.

ESTUDO EVOLUTIVO DE ESPÉCIES DE CULICÍDEOS COM  
POSICIONAMENTO FILOGENÉTICO INCERTO / Maria Júlia de França  
Souza Silva. - Recife, 2024.

52p : il., tab.

Orientador(a): Gabriel da Luz Wallau

Coorientador(a): Alexandre Freitas da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2024.

Inclui referências, anexos.

1. Filogenia. 2. Culicidae. 3. Genoma mitocondrial. 4. Bioinformática. I.  
Wallau, Gabriel da Luz. (Orientação). II. da Silva, Alexandre Freitas.  
(Coorientação). IV. Título.

500 CDD (22.ed.)

MARIA JÚLIA DE FRANÇA SOUZA SILVA

**ESTUDO EVOLUTIVO DE ESPÉCIES DE CULICÍDEOS COM POSICIONAMENTO  
FILOGENÉTICO INCERTO**

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 26/02/2024

Nota: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Me. Alexandre Freitas da Silva (Coorientador)  
Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências

---

Prof. Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos (1º Titular)  
Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências

---

Me. Luisa Maria Inácio (2º Titular)  
Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências

---

Me. Derciliano Lopes da Cruz (Suplemente)  
Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ  
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências

*“Nada na biologia faz sentido exceto à luz da evolução.”*

*Theodosius Dobzhansky*

## AGRADECIMENTOS

A experiência da graduação foi algo sem igual e que vou carregar comigo para todo o sempre, os momentos bons e ruins, os erros e acertos, mas principalmente as memórias e laços que pude criar e fortalecer durante esse caminho tão difícil.

Gostaria de começar agradecendo duas pessoas que muitas vezes me carregaram durante esses anos de graduação e que sem o apoio delas eu com certeza não estaria aqui. Agradecer a minha mãe, por sempre acreditar em mim primeiro do que todos, obrigada por cuidar de mim todos os dias e sempre saber quando eu precisava de uma força a mais ou um cuidado a mais, sem ela eu não teria conseguido. Ao meu pai, por todas as vezes que ele me levou e me buscou na faculdade, por todas as palavras de incentivo e por fazer de tudo por mim e para que eu tivesse acesso a educação e conquistasse meus sonhos. Gostaria também de agradecer ao meu irmão Ricardinho, que do seu próprio modo me ajudou e me apoiou em muitos momentos, muito bom dividir a vida com você e saber que tenho seu apoio sempre.

Tenho muita sorte de ter nascido em uma família tão incrível, obrigada a todos que me deram amor, carinho e incentivo durante o caminho, obrigada Vovó Lenice, Tia Leny, Dayse Tia Dja, Tia Ló, Camilla e Priscilla. Minha madrinha que me ajudou todas as vezes que precisei e me deu muito suporte, obrigada Tia Paula, e obrigada Tia Sinha e Tia Silva por todas as palavras de carinho e motivação de sempre. Obrigada Bárbara e Beatriz por terem acreditado em mim desde o começo e me auxiliarem durante esse caminho deixando a caminhada mais leve. E por último agradecer meu avô Luís que infelizmente não pôde estar comigo nesse período, mas que eu levo sempre comigo e me ajudou em muitos momentos, juntamente com minha segunda mãe, Ana.

Gostaria de agradecer ao pessoal do WallauLab e por terem aberto as portas para mim em 2020 e terem me ensinado tanto, juntamente com o outros grupos do departamento de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães, que me auxiliaram inúmeras vezes quando eu precisei tirar uma dúvida ou precisava de algum suporte em um experimento. Em especial agradecer meu orientador Gabriel Wallau por ter sempre confiado em mim e me auxiliado e apoiado em todas as decisões acadêmicas que tomei durante esses 4 anos e ter me proporcionado uma ótima experiência dentro da ciência. Agradeço de coração também ao meu coorientador Alexandre Freitas, por todas as centenas de reuniões e conhecimento que ele me passou durante esses anos, por sempre ter tido paciência e empolgação para me ensinar e me estimular a ser uma boa pesquisadora e uma boa pessoa. Agradeço também a Laís Ceschini que me ensinou tudo que sei de bancada e me mostrou que sou mais capaz do que eu

posso imaginar, obrigada por todos os ensinamentos e momentos nesses últimos anos, por ter tido tanta paciência e carinho durante meu processo de aprendizagem e crescimento. A Yago e Gutembergmann, meus companheiros de iniciação que me ajudaram inúmeras vezes, não teria sido a mesma coisa sem vocês

Gostaria de agradecer aos meus amigos de escola e de infância, que acompanharam o meu crescimento e mesmo a distância continuaram me apoiando e sendo presentes de alguma forma. Obrigada Hadrya, Gabriel, Vitória Travassos, Thiago e Ana Beatriz. Alguns boatos dizem que no ensino médio não se leva amigos, mas isso não é verdade, tenho muito a agradecer aos meus amigos dos últimos anos de escola por todo amor e apoio que me deram e me dão até hoje. Obrigada Mariana, Matheus, Laura, Mateus, Enildo. Obrigada minhas meninas, Hiasmyn e Marcela por permanecerem ao meu lado diariamente e serem porto seguro. Por último, preciso agradecer especialmente a Kleber Fernando, meu companheiro que primeiro do que todos acredita em mim e me apoia infinitamente, obrigada por ser meu parceiro de vida e melhor amigo.

Entrar na universidade era algo que me assustava imensamente, mas se eu apenas soubesse os companheiros que iria encontrar no caminho eu não teria ficado nem um pouco assustada, e sim ansiosa para nosso encontro. Não sei o que seria de mim sem Beatriz Luna que foi a primeira a me abraçar e cuidar de mim dentro do CB e que até hoje permanece sendo a irmã que Deus me deu. O mesmo digo sobre Rafael Padilha que se tornou um irmão de alma e coração, sempre serei grata por todos os momentos e por tudo que você me ensinou. Outro irmão que eu fiz e que foi essencial para minha jornada foi João Neto que esteve lá por mim sempre que eu precisei. Quando eu menos esperava Laura veio para ser luz na minha vida e deixar meus dias mais divertidos e esperançosos, um privilégio dividir minha vida com você. E não podia falar de luz e não agradecer imensamente a Beatriz Mendonça, que segurou na minha mão de maneira tão forte e companheira, sorriu e chorou comigo e se tornou uma das pessoas mais importantes na minha vida, não sei que seria da minha graduação sem ela. Gostaria também de agradecer a Renan Gabriel, Leo, Renan Nascimento, Julieta, Márcio, Bruna, Gabriel, Vittória, Rafael Melo, Arthur, Hebert e Lana por terem sido pessoas tão preciosas na minha vida e terem feito meus dias melhores e mais leves. E por último meus veteranos que admiro até os dias atuais independente do caminho que eles tomaram, obrigada por me receberem tão bem e terem me ensinado tanto, obrigada Savanna, Sayonara, Lucas, Manuela, Milena, Thalicia e Hugo Chaves. E obrigada a todas as outras pessoas que fizeram parte da minha caminhada acadêmica de alguma forma esbarrando comigo pelos corredores do CB e se encontrando esporadicamente em cadeiras.

Agradeço a Deus por ter dado tantos planos incríveis nas minhas mãos e ter me presenteado com tantas bênçãos e a Nossa Senhora por sempre cuidar de mim. A Eles agradeço pelos meus afilhados que sempre me apoiarem e acreditarem no meu potencial, e agradeço a eles também por serem os melhores. E agradeço as minhas amigas de longa distância, mas os muitos quilômetros nunca impediram a presença forte delas em minha vida. Obrigada Laís por ter sido meu alicerce durante a escrita deste TCC. Obrigada Bruna por ser uma das melhores companheiras de vida e ser meu ponto de segurança e paz. E agradecer especialmente a Larissa Sousa que transformou minha vida para melhor e sem ela não teria conseguido chegar até aqui. Também agradecer as outras inúmeras pessoas que fizeram parte disso comigo, como Yasmin, Clara, Thelmo e Arthur, mas que infelizmente não consigo citar todas, mas que me fizeram a pessoa que sou hoje e me carregaram.

Gostaria de agradecer ao CNPQ por ter financiado minhas pesquisas nesses quatro anos e também ao Instituto Aggeu Magalhães pelo suporte nesse processo. Agradeço também aos meus professores da UFPE por terem me passado tanto conhecimento e ensinamentos de humanidade e me feito uma pessoa melhor.

## RESUMO

Reconstruir a história evolutiva de um grupo biológico é uma forma de melhor compreender como se deu sua evolução e radiação temporal e também levantar novas hipóteses sobre as adaptações e condições associadas às mudanças evolutivas sobre os fenômenos biológicos que atuam sobre as espécies. O objetivo do presente estudo foi obter informações sobre a família Culicidae através da reconstrução filogenética utilizando diferentes abordagens com base nos genomas mitocondriais de 122 espécies. O conjunto de dados foi formado por mitogenomas de mosquitos coletados e/ou sequenciados por nós e por mitogenomas disponibilizados no banco de dados do NCBI. Os genomas foram montados utilizando o programa MITObim 1.6 e anotados no MITOS2 *webservice*. Realizamos quatro tipos de análise diferentes: genes particionados, genes concatenados, proteínas concatenadas e genoma completo. Para gerar as árvores utilizamos o programa BEAST 1.8.4 com os padrões de duas corridas independentes de 500 milhões de gerações cada. A partir desse estudo obtivemos dois genomas mitocondriais completos para as espécies de *Mansonia wilsoni* e *Coquillettidia hermanoi* e outros cinco genomas rascunho para outras espécies. Além disso, o posicionamento de táxons com posicionamento incerto foram revistos e trouxemos novos conhecimentos acerca daqueles pouco explorados na literatura até então.

Palavras-chave: Filogenia, Culicidae, Genoma mitocondrial, Bioinformática

## ABSTRACT

Reconstructing the evolutionary history of a biological group is a way to more completely understand its evolution and temporal radiation as well as raise new hypotheses about natural constraints that act on species and adaptations to the natural environment. The aim of this study was to obtain information on the Culicidae family through phylogenetic reconstruction using different approaches based on the mitochondrial genomes of 122 species. The dataset consisted of mosquito mitogenomes collected and/or sequenced by us and mitogenomes available in the NCBI database. The genomes were assembled using the MITObim 1.6 program and annotated on the MITOS2 webserver. We carried out four different types of analysis: partitioned genes, concatenated genes, concatenated proteins and complete genome. To generate the trees we used the BEAST 1.8.4 program with two independent runs of 500 million generations each. From this study we obtained two complete mitochondrial genomes for the species *Mansonia wilsoni* and *Coquillettidia hermanoi* and another five draft genomes for other species. In addition, the positioning of uncertain taxa has been revised and we have brought new knowledge about those little explored in the literature until now.

Keywords: Phylogeny, Culicidae, Mitochondrial genome, Bioinformatics

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa comparativo de mitogenomas	25
Figura 2 - Filogenia dos genes particionados	29
Quadro 1 - Mitogenomas recolhidos no NCBI	22
Quadro 2 - Mitogenomas montados	28

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1 COLETA DE MOSQUITOS E ANÁLISES MOLECULARES:	20
3.2 MONTAGEM E ANOTAÇÃO:	21
3.3 DATASET:	21
3.4 ANÁLISES EVOLUTIVAS:	22
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>24</b>
4.1 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO:	24
4.2 ANÁLISES EVOLUTIVAS:	26
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>34</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR</b>	<b>44</b>

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA REVISTA **GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO SE ENCONTRAM NO ANEXO A.

**Filogenômica mitocondrial revela novas relações entre as espécies e clados incertos dentro da família Culicidae**

**RESUMO:** O uso de marcadores moleculares para a reconstrução filogenética vem sendo aplicado para o estudo de diversos organismos devido a sua facilidade em recuperar informações, diferenciar espécies e estabelecer o posicionamento filogenético de espécies pouco estudadas ou com limitado conhecimento evolutivo. Porém, realizar reconstruções evolutivas com base em um ou poucos marcadores mitocondriais pode gerar resultados limitados e em uma filogenia com poder de resolução devido a saturação temporal ao longo de milhões de anos de evolução (acúmulo excessivo de mutações e perda do sinal filogenético). Propomos este estudo para posicionar espécies ainda não estudados do ponto de vista filogenético e posicionar táxons de difícil resolução através de análises filogenômicas da família Culicidae utilizando mitogenomas completos que foram sequenciados nesse estudo ou recuperados de banco de dados. Quatro análises foram realizadas, (1) genoma completo, (2) nucleotídeos particionados por gene, (3) nucleotídeos concatenadas, e (4) proteínas concatenadas. Com esse estudos conseguimos obter 7 novos mitogenomas, *Mansonia wilsoni*, *Coquillettidia hermanoi*, *Culex taeniopius*, *Aedes angustivittatus*, *Culex erythrothorax*, *Limatus durhamii*, e *Wyomyia smithii*. Aqui pudemos testar e mostrar que o uso de genomas completos contendo centenas de marcadores filogenéticos informativos pode ter um impacto considerável nos resultados filogenéticos e dar diferentes perspectivas no assunto.

## 1. INTRODUÇÃO

O genoma mitocondrial é uma molécula de DNA circular presente nos organismos eucarióticos sendo composto por 37 genes. Treze genes codificadores de proteínas, 22 RNAs

transportadores e 3 RNAs ribossomais. Mitogenomas são usados amplamente no campo da taxonômica e filogenética devido suas características, como a hereditariedade exclusivamente materna e por consequência ausência de recombinação, um número grande de cópias, e por conta da ausência de um mecanismo de reparo de DNA carreando mais mutações em comparação com o genoma nuclear (Cameron, 2014). Um marcador molecular que se mostra bastante eficiente e amplamente usado em uma gama de estudos, seja para animais vertebrados como para invertebrados, é o gene *Citocromo C Oxidase subunidade 1* (COX 1) (Tavares e Baker 2008; Trivedi *et al.*, 2016). Seguindo o grande desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento durante os últimos anos, a quantidade de mitogenomas aumentou, permitindo a resolução de relações complexas e conflitantes graças aos caracteres moleculares do genoma mitocondrial. Contudo, algumas relações filogenéticas ainda não foram estabelecidas para muitas espécies e/ou são difíceis de entender e apresentam resultados conflitantes na literatura. Então, para conseguir alcançar resultados corretos e confiáveis, obter uma quantidade maior de caracteres moleculares que cobrem diferentes taxas evolutivas se torna importante para reavaliar e posicionar novas espécies no contexto evolutivo filogenético.

O grupo taxonômico chamado de Culicidae é uma família da ordem Diptera que possui alta importância médica e veterinária em inúmeros países devido a atuação como vetores de patógenos como o vírus causador da febre amarela ou malária (Consoli e Lourenço, 1994; Fecchio *et al.*, 2017). As espécies de mosquitos pertencentes a essa família são muito abundantes, principalmente nos países de clima tropical e subtropical, onde conseguem se reproduzir com mais facilidade. Atualmente essa família engloba duas subfamílias, a Culicinae, que possui a maior quantidade de táxons tendo 38 gêneros no total, e a subfamília Anophelinae que é considerada mais primitiva e com três gêneros no total. Em uma família tão diversa, é natural que existam grupos mais estudados do que outros dentro de uma subfamília ou tribo, porém isso cria um viés de conhecimento com ênfase em espécies com maior impacto na população humana. Para as espécies com menor impacto existe uma ausência generalizada de conhecimento molecular e filogenético baseado nesse dado. Com a ampla discussão sobre o nível de classificação dos táxons deste grupo a partir do uso extensivo das técnicas moleculares aplicadas em estudos filogenéticos, a nomenclatura das espécies está em constante análise (Judd 1996; Foster e Walker, 2019; Lorenz *et al.*, 2021). Porém, conhecimento taxonômico e filogenético sólido é de suma importância em todos os grupos de organismo, não somente para uma boa e clara comunicação dentro da comunidade científica em todas suas áreas, mas também para trazer uma base correta para os estudos do

seu papel vetorial e adaptações que permitem a transmissão de patógenos para vertebrados (Thomson *et al.*, 2018).

Diante disso, esse estudo foi realizado com a finalidade de verificar os posicionamentos de espécies pouco ou ainda não estudadas do ponto de vista filogenético molecular e resolver posicionamentos incertos dentro da árvore dos Culicidae baseado nos genomas mitocondriais completos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

A família Culicidae possui mais de 3 mil espécies e pertence à ordem Diptera do grande filo Arthropoda. Estas espécies possuem um par de asas e um par halteres. Os culicídeos são mais conhecidos como mosquitos, pernilongos ou muriçocas a depender da região do Brasil. Os mosquitos apresentam dimorfismo sexual, onde as fêmeas são bem caracterizadas pelas suas antenas pilosas e os machos com antenas com uma pelugem mais rasa. Os mosquitos compõem um grupo de animais holometábolo, isso porque apresenta quatro estágios de vida durante seu ciclo: ovo, depois o estágio de larva, pupa, e por último estágio adulto. Durante as fases de ovo, larva e pupa é necessário a presença de corpos de água para a sobrevivência e desenvolvimento até a fase alada adulta. De um modo geral, as fêmeas se alimentam de sangue, que é fundamental para a maturação dos ovos, enquanto a maior parte dos machos se alimentam apenas de substâncias açucaradas como néctar e seiva. A distribuição geográfica desses animais no globo terrestre é quase que completa, onde conseguem ocupar os mais diversos ecossistemas, sendo menos prevalentes em regiões muito frias como nos Pólos e Antártica (Consoli e Lourenço, 1994). Devido a sua ampla distribuição e certa facilidade de se reproduzir e ocupar inúmeros espaços eles são encontrados em certa abundância e facilidade por quase toda ocupação humana, o que infelizmente é problemático e perigoso. Devido ao fato que muitas das espécies dessa família possuem a capacidade de transmitir patógenos para os seres humanos e também para animais não humanos. A gama de patógenos que os mosquitos conseguem vetorizar é diversa, como o Vírus da Dengue (DENV), Vírus da Febre do Nilo Ocidental (WNV), Vírus da Febre Amarela(YFV), Vírus da Zika (ZIKV), mas também podendo vetorizar protozoários como *Plasmodium*, ou nematoide com o gênero *Wuchereria*. É estimado que mais de 1 milhão de pessoas morram por ano por conta de doenças causadas pelos patógenos transmitidos por esses vetores, sendo de grande relevância médica (OMS, 2020).

A mitocôndria é uma organela essencial para a sobrevivência e manutenção dos organismos devido sua função respiratória e energética nas células. No início dos anos 60, o artigo que descrevia pela primeira vez a presença de material de DNA na mitocôndria foi publicado sendo o início do que seria uma extensiva dedicação de estudos a esse compartimento celular tão importante (Nass e Nass, 1963). O genoma mitocondrial é um genoma circular bem conservado entre os grupos biológicos, e que possui características diferentes do genoma nuclear, ao começar pela sua hereditariedade que é exclusivamente materna (Gissi *et al.*, 2008). Além disso, devido ao grande número de mitocôndrias que uma

única célula pode ter, o número de cópias desse DNA é bem maior comparado às cópias do material genético nuclear. A quantidade exata de cópias pode variar de acordo com cada tipo celular, onde a maioria das células possuem no mínimo 1.000 cópias, mas também existe o caso do ovócito maduro que possui mais de 100.000 cópias desse genoma.

O DNA mitocondrial (mtDNA) é composto por 37 genes, 13 polipeptídeos (atp6, atp8, cob, cox 1–3, nad1–6, nad4L), dois RNA ribossômicos (rrnS, rrnL) e 22 RNAs transportadores. Além disso, o mtDNA não possui íntrons e possui uma taxa de mutação em torno de 10 vezes maior em comparação ao DNA nuclear, podendo trazer informações relevantes sobre um organismo ou o histórico de uma população em uma janela temporal mais curta que o nuclear (Nussbaum *et al.*, 2016; Galtier *et al.*, 2009). Todos esses fatos combinados torna os mitogenomas excelentes marcadores moleculares, e explica o extenso uso deles em inúmeros estudos nos últimos 40 anos.

Devido ao seu grande número de cópias, o amplificação e sequenciamento do mtDNA é de fácil obtenção comparado com outros marcadores moleculares. Depois da sua descoberta nos anos de 1960, no ano de 1988 a primeira mutação patogênica do mtDNA foi detectada (Holt *et al.*, 1988; Wallace *et al.*, 1988). A partir disso, o potencial do genoma mitocondrial começou a ser explorado onde até os dias atuais é utilizado como um marcador molecular utilizado por uma abrangente variedade de estudos. A classe Insecta é um grupo que se beneficiou e continua se beneficiando fortemente do ponto de vista sobre sua classificação, onde temos estudos, por exemplo, que focam em estudar a ecologia e a biodiversidade dos insetos a partir do genoma mitocondrial, além de estudos centrados em genética e dinâmica das populações em um passado distante e mais recente (Shao e Barker, 2006; Dong *et al.*, 2021). O número de estudos filogenéticos do grupo dos insetos utilizando mitogenomas continua crescendo, e ao longo dos anos foram registradas resoluções de classificações problemáticas e novos entendimentos através do uso desse tipo de dado (Ramírez-Ríos *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2019). O estudo de Cameron *et al.* (2006) utilizou mitogenomas para explorar e resolver relações dentro da ordem Diptera, uma ordem diversa e com uma grande quantidade de dados disponíveis, e obteve resultados robustos com boa resolução e suporte utilizando estratégias de partições diferentes.

O estudo de Rodrigues *et al.* (2017) concluiu que utilizar o gene mitocondrial COX 1 é uma ferramenta confiável para realizar a distinção entre *Trypanosoma cruzi* e espécies do mesmo gênero próximas a ela, além de identificar bem os principais genótipos do *T. cruzi*. De uma forma geral, o uso de mtDNA é fortemente ligado à área da taxonomia e filogenética, sendo usado para desvendar e/ou melhorar o estudo de grupos de animais diversos, tanto

vertebrados, como invertebrados. Na classe dos Insetos existem exemplos onde estudos evolutivos ao usarem genoma mitocondrial conseguiram corroborar o posicionamento de táxons antigos já explorados através de outras fontes de dados, demonstrando a sua robustez no posicionamento de espécies (Simon e Hadrys, 2013; Carapelli *et al.*, 2006). Um exemplo é o estudo de Plazzi *et al.* (2011), onde ele e seus colaboradores sequenciaram quase que por completo o genoma de duas espécies do gênero *Bacillus* da ordem Phasmatodea e realizaram uma análise filogenética que obteve resultados que estão em harmonia com a literatura prévia (Plazzi *et al.*, 2011). Apesar do genoma mitocondrial ser na sua forma geral bem conservado em termos de ordem gênica, já foi identificado em alguns grupos biológicos de vertebrados casos de rearranjos gênicos (Montaña-Lozano *et al.*, 2022). Essas modificações também podem ser utilizadas para estudar as relações filogenéticas dos organismos apesar de serem comparativamente mais raras que mutações de nucleotídeo único (Boore e Brown, 1998; Boore, 1999).

Através da obtenção do genoma mitocondrial completo é possível realizar e testar diferentes abordagens para uma inferência filogenética. É possível, por exemplo, retirar a região não codificante (Fenn *et al.*, 2008). Assim como também avaliar o potencial da região controladora para seu uso em estudos evolutivos (Zhang e Hewitt, 1997). O genoma não evolui de maneira igualitária, é um processo heterogêneo onde vamos ter diferentes taxas evolutivas, frequência de bases e padrões de substituição para cada gene (Bradley *et al.*, 2005; Lanfear *et al.*, 2014 ). Diante dessa problemática, uma abordagem muito comum é realizar partições, ou dos genes, ou das proteínas traduzidas, e assim analisar de forma separada tendo um modelo de substituição mais adequado aplicado para cada partição (Lanfear *et al.*, 2014; Kainer e Lanfear, 2015). A escolha do modelo molecular deve ser feita com cuidado e atenção pois pode afetar a acurácia da filogenia e afetar as estimativas da datação (Lanfear *et al.*, 2012 Bradley *et al.*, 2005). Os estudos de Bradley *et al.* (2005), Leavitt *et al.* (2013) e Rota e Wahlberg (2012) mostraram que realizar a partição dos dados é um ponto positivo e que melhora a qualidade dos resultados na filogenia. Como dito, as partições também podem ser feitas com as proteínas, já que existe a possibilidade trabalhar não com os nucleotídeos, mas sim com base nos aminoácidos daquele genoma. Isso se dá devido a característica principal do código genético e sua degeneração. As mutações silenciosas que ocorrem alterando normalmente o terceiro códon dificilmente vão resultar em uma drástica mudança naquela proteína, fazendo com que as proteínas sejam mais conservadas que as sequências no DNA (Foster e Hickey, 1999; Wernersson e Pedersen, 2003). Devido a isso, usar proteínas para a reconstrução filogenética é dita como mais confiável e uma boa escolha quando se quer

estudar relações de nós mais internos e antigos da árvore sendo estudada (Simion *et al.*, 2017; Philippe *et al.*, 2019; Williams *et al.*, 2020).

O começo das tentativas de se reconstruir a história evolutiva e entender as relações de parentesco entre as espécies da família Culicidae se deu início com o estudo de Ross em 1951, que utilizou como base dados morfológicos e comparações baseadas nos comportamentos dos animais com o meio (Ross 1951, p.128, apud Harbach, 2007, p.591). A partir dessa filogenia se originou a primeira divisão do que se era aceito como três subfamílias; Culicinae, Anophelinae e Toxorhynchitinae. Onde até hoje se é aceito que a linhagem basal é a subfamília Anophelinae (Foster e Walker, 2019). Contudo, a classificação da subfamília Toxorhynchitinae foi desafiada e contrariada por diversos estudos até ser completamente desfeita, transformando esse táxon em uma tribo, Toxorhynchitini, que compõem o gênero *Toxorhynchites* (Belkin, 1962; Harbach e Kitching, 1998; Mitchell *et al.*, 2002). Quase 50 anos depois, o estudo de Harbach (1998) onde quase nenhuma hipótese de Ross foi suportada, combinou caracteres morfológicos tradicionais já estabelecidos na literatura conhecida e investigou novos caracteres para serem adicionadas na montagem das matrizes. Contudo, é importante lembrar que as metodologias utilizadas por ambos estudos tiveram muitos anos de diferença e isso teve um forte impacto em seus resultados (Harbach e Kitching, 1998). Besansky em 1997 realizou uma reconstrução filogenética utilizando outra fonte de dado, tendo como base um fragmento do gene White de 13 espécies de culicídeos (Besansky e Fahey, 1997). Ademais, utilizando a informação genética da subunidade ribossomal pequena (18S rDNA) Shepard *et al* (2006) utilizou 39 espécies e obteve sucesso em reconstruir bem as relações de espécie e gênero, contudo, não obteve êxito em nós mais profundos da filogenia (Shepard *et al.*, 2006). Por ser uma família numerosa, com uma grande diversidade morfológica, possuir alguns complexos de espécies e ser amplamente distribuído no Velho Mundo e no Novo Mundo, muitas vezes a classificação e entendimento de parentesco de algumas tribos e gêneros pode ser complexa de se resolver na família Culicidae e diversas metodologias podem ser aplicadas na tentativa de solucionar (Reidenbach *et al.*, 2009). Uma vez que diferentes espécies ou até gêneros podem compartilhar traços morfológicos semelhantes, é importante utilizar abordagens moleculares para obter dados menos enviesados e poder assim chegar a definições filogenéticas mais claras (Judd, 1996). Contudo, não se deve ignorar a utilidade e importância dos estudos morfológicos e seu papel na taxonomia, filogenética e estudos sobre adaptações (Zou e Zhang, 2016).

Apesar dos culicídeos comporem um grupo biológico de grande relevância e estudado há muitos anos, ainda é possível pontuar descobertas filogenéticas recentes e a necessidade de

investigar mais profundamente certos táxons e suas relações filogenéticas. Pesquisas recentes já mostraram, por exemplo, que a espécie *Anopheles christyi* está proximamente relacionada com o complexo *An. gambiae (s.l)* que compõe três espécies que são reconhecidas como vetores da Malária (*An. gambiae s.s.*, *An. coluzzii* e *An. arabiensis*) e que isso é fator importante a se levar em consideração em estudos de surgimento de novos vetores (Peng *et al.*, 2016; Loughlin, 2020; Ghassemi-Khademi *et al.*, 2021). Ademais, existem espécies que mostraram capacidade vetorial para certos patógenos em condições de laboratório, mas apesar disso não se têm muitos dados moleculares e filogenéticos dessas espécies, como: *Culex erythrothorax*, *Aedes angustivittatus* e *Cx. taeniopus* (Galindo, 1969; Pecor *et al.*, 2000; Esterly *et al.*, 2020). Donald *et al.* (2020) comenta em seu estudo como o gênero *Toxorhynchites* pode ser útil no campo do controle biológico, visto que é uma das poucas exceções da família Culicidae onde a fêmea não se alimenta de sangue e quando no seu estado larval preda outras larvas da família, como larvas de *Aedes*, gênero conhecido pelas suas espécies vetoras. Contudo, devido a complicações nas identificações morfológicas por conta da grande similaridade entre as espécies juntamente com lacunas sobre sua taxonomia o mesmo táxon é descrito mais de uma vez com nomes diferentes, dessa forma, dificultando a identificação de forma precisa, conseqüentemente, a utilização desse grupo para controle biológico (Donald *et al.*, 2020). A importância das reconstruções filogenéticas está baseada na possibilidade de organizar o conhecimento sobre a biodiversidade do planeta de forma estruturada baseada na classificação taxonômica que existe atualmente, e através disso promover melhor entendimento do caráter evolutivo dos grupos biológicos e suas adaptações às condições atuais e futuras.

A sistemática é o campo da biologia que se dedica a estudar a biodiversidade do planeta e suas relações. Dentro da sistemática existem alguns conceitos importantes para compreender a organização dos grupos biológicos, o primeiro deles é o conceito de monofilia, que se diz respeito a um grupo dito natural, onde todos os descendentes provém de um único ancestral. Se um grupo não possui todas as espécies descendentes de um único ancestral, esse grupo é chamado de parafilético. E por último, um grupo polifilético corresponde a um grupo formado por espécies que descendem de mais de um ancestral (Brusca *et al.*, 2016). Para realizar a reconstrução das relações de um grupo de espécies é possível utilizar diferentes tipos de dados. No início da cladística e sistemática as filogenias eram feitas baseadas apenas no que podia ser visto e distinto de um organismo e outro, basicamente, se utilizava características morfológicas para dividir e caracterizar grupos. Nos dias atuais uma gama de dados podem ser utilizados com a finalidade de gerar uma árvore, esses dados podem ser combinados ou

usados individualmente, os tipos mais comuns são: DNA nuclear, proteínas, moléculas de RNA, enzimas, dados fósseis, mitogenomas, além dos próprios caracteres morfológicos (Pélandakis e Solignac, 1993; Tsang *et al.*, 2008; Reidenbach *et al.*, 2009; Quental e Marshall, 2010; Motta *et al.*, 2012). Além das muitas fontes de informação, existem alguns métodos de reconstrução filogenética que podem ser escolhidos para verificar como seus dados vão se comportar e quais resultados vão apresentar. Os principais métodos de reconstrução são: Neighbor Joining, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Método Bayesiano. Dessa forma, as filogenias podem não somente ajudar na classificação dos organismos, mas também para outras finalidades, como identificar origem de patógenos já conhecidos ou de novos patógenos, e possíveis novas ondas e cepas associadas à transmissão. No campo da biologia da conservação, as filogenias podem ser muito ricas para oferecer informações que devem ser levadas em consideração na tomada de decisão dentro de um plano de conservação, e evitar novas extinções ou decaimento de populações (Wiley, 2010; Baum, 2008).

Assim, este estudo busca reconstruir da árvore filogenética da família Culicidae baseado em genomas mitocondriais de 122 espécies aplicando diferentes abordagens de análise dos dados com a finalidade de tentar promover maior entendimento sobre a história evolutiva dos mosquitos através da datação dos eventos de especiação e relações de proximidade filogenética entre os taxa estudados que compõem essa família.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE MOSQUITOS E ANÁLISES MOLECULARES:

Os mosquitos foram coletados em dois locais com áreas remanescente de Mata Atlântica, o parque Estadual Dois Irmãos localizado em Recife (8°00'43.3"S 34°56'40.7"W), e no Jardim Botânico do Recife (8°04'33.0"S, 34°57'35.9"W) usando redes entomológicas. Os mosquitos coletados foram transportados ainda vivos para o Departamento de Entomologia - FIOCRUZ-PE e armazenados a -80°C até a realização da identificação morfológica através de chaves dicotômicas de identificação disponíveis na literatura sobre Culicidae (Forattini, 2002). Após a identificação morfológica os espécimes foram separados em *pools* e processados para extração de DNA usando o Kit *MasterPure™ Complete DNA and RNA*

*Purification* (LGC Biosearch technologies) para *Ma. wilsoni* (pool com 14 indivíduos) e *Cq. hermanoi* (pool com 22 indivíduos). Para *Li. durhamii* (pool com 15 indivíduos) o RNA total foi extraído seguindo o protocolo de Trizol (Invitrogen, USA) e tratado com o protocolo TURBO™ DNase (2u/μl - Ambion) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA e sua verificação de qualidade foi realizada pelo Qubit RNA HS kit e Bioanalyzer, respectivamente. O DNA foi sequenciado utilizando o kit Illumina DNA Prep (Illumina CA) utilizando o Novaseq SP reagent kit 300 ciclos, com capacidade para 1.3 bilhões de reads. A biblioteca do RNA foi preparada usando TruSeq Stranded Total RNA library kit (Illumina, USA) e foi sequenciado na plataforma NextSeq 500 da Illumina usando a abordagem de paired-end de 75 pb. O RNA neste caso foi utilizado tendo em vista que é possível recuperar mtDNA a partir dele e este já havia sido extraído para ser objeto de estudo em outro trabalho do grupo de pesquisa.

### 3.2 MONTAGEM E ANOTAÇÃO:

As leituras brutas foram analisadas na ferramenta Trimmomatic v0.36 para remover leituras de baixa qualidade usando os seguintes parâmetros: LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36. Após a trimagem, os reads foram usados para realizar a montagem do mitogenoma no MITObim 1.6 (Hahn *et al.*, 2013) utilizando genomas referência de espécies do mesmo gênero ou tribo. Para a anotação gênica o webserver MITOS2 (<http://mitos2.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>) foi usado. Para obter as sequências concatenadas foi utilizado o programa MEGA-X (Kumar *et al.*, 2008).

### 3.3 DATASET:

Com o intuito de incluir espécies sem mitogenoma disponível, nós realizamos uma mineração de dados no banco de dados SRA do *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e recuperamos dados brutos de estudos que não possuíam o interesse de investigar esses genomas. Os dados brutos foram então processados, montados e anotados como descrito acima. Além disso, também fizemos uma busca no NCBI por novos mitogenomas disponibilizados por publicações recentes e o *Genbank Feature Extractor*

([https://www.bioinformatics.org/sms2/genbank\\_feat.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/genbank_feat.html)) foi usado para extrair as sequências dos genes e proteínas a partir dos arquivos Genbank de cada um (Quadro 1). Os demais genomas foram coletados a partir da publicação de Silva *et al* (2020) e foram incluídos nas nossas análises.

### 3.4 ANÁLISES EVOLUTIVAS:

O alinhamento do dataset disponibilizado por Silva *et al* (2020) foi recuperado e então incluímos os mitogenomas montados e resgatados neste estudo. Todos os alinhamentos foram realizados no servidor da web MAFT usando “*mafft-add output keeplength*” (Kato *et al.*, 2019). Para visualização, separação dos genes e tradução para amino ácidos foi usado o programa Aliview (Larsson, 2014). Nós realizamos então análises bayesianas em quatro alinhamentos: (1) mitogenomas completos, (2) PCGs (*Protein Coding Gene*) particionada, (3) PCGs concatenadas e (4) proteínas concatenadas. Os arquivos BEAST XML foram construídos no BEAUTi 1.8.4 e analisados usando BEAST 1.8.4 baseado no método Monte Carlo Cadeia Bayesiana de Markov (MCMC) (Drummond *et al.*, 2012) assim como foi feito por Silva *et al* (2020). A análise do BEAST foi feita em duas corridas independentes de 500 milhões de gerações com amostragem a cada 10,000 árvores. Para analisar a amostragem balanceada das árvores e parâmetros, o de *Effective Sample Size* (ESS) foi avaliado no Tracer 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018). As árvores foram combinadas com LogCombiner e um *burn-in* de 25% foi aplicado e posteriormente as árvores foram anotadas no TreeAnnotator. Os melhores modelos evolutivos foram selecionados pelo Modelfinder do IQ-TREE 2.0 (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) (Suplementar 2).

Quadro 1: Genomas coletados no NCBI

Espécie	Gênero	Subgênero	Tribo	Código	Pares de base
<i>Ae. alternans</i>	<i>Aedes</i>	<i>Mucidus</i>	Aedini	MN389472.1	16,128
<i>Ae. flavopictus</i>	<i>Aedes</i>	<i>Stegomyia</i>	Aedini	NC_050044.1	16,060

<i>Ae. rubrithorax</i>	<i>Aedes</i>	<i>Finlaya</i>	Aedini	MN389466.1	15,808
<i>Ae. vittiger</i>	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	Aedini	MN389473.1	16,027
<i>Ae. fulvus</i>	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	Aedini	MK575476.1	15,428
<i>Ae. nigrithorax</i>	<i>Aedes</i>	<i>Ochlerotatus</i>	Aedini	MN389467.1	15,943
<i>Cx. sities</i>	<i>Culex</i>	<i>Culex</i>	Culicini	MN389463.1	15,585
<i>Cx. chidesteri</i>	<i>Culex</i>	<i>Culex</i>	Culicini	NC_037826.1	16,052
<i>Cx. cylindricus</i>	<i>Culex</i>	<i>Lophoceraomyia</i>	Culicini	MN389457.1	15,565
<i>Cx. fergusonii</i>	<i>Culex</i>	<i>Neoculex</i>	Culicini	MN389458.1	15,653
<i>Tp. tasmaniensis</i>	<i>Tripteroides</i>	<i>Polylepidomyia</i>	Aedini	MN389468.1	16,403
<i>Ru. reversa</i>	<i>Runchomyia</i>		Sabethini	MK575487.1	15,302
<i>Ae. koreicus</i>	<i>Aedes</i>	<i>Hulecoeteomyia</i>	Aedini	NC_046946.1	15,840
<i>Ae. busckii</i>	<i>Aedes</i>	<i>Howardina</i>	Aedini	MN626443.1	16,542
<i>Cx. orbostiensis</i>	<i>Culex</i>	<i>Lophoceraomyia</i>	Culicini	NC_054317.1	15,588
<i>Cx. annulirostris</i>	<i>Culex</i>	<i>Culex</i>	Culicini	NC_054323.1	15,572
<i>Cs. inconspicua</i>	<i>Culiseta</i>		Culisetini	NC_054327.1	15,888
<i>Tx. speciosus</i>	<i>Toxorhynchites</i>		Toxorhynchitini	NC_054324.1	16,109
<i>Ar. subalbatus</i>	<i>Armigeres</i>	<i>Armigeres</i>	Aedini	KY978578.1	14,663
<i>Ps. saeva</i>	<i>Psorophora</i>		Aedini	MK575486.1	15,049
<i>Ps. ferox</i>	<i>Psorophora</i>	<i>Janthinsoma</i>	Aedini	MK575485.1	15,345
<i>Lt. halifaxii</i>	<i>Lutzia</i>		Culicini	MH316119.1	15,744
<i>Lt. fuscus</i>	<i>Lutzia</i>		Culicini	MH316118.1	15,803
<i>Sa. undosus</i>	<i>Sabethes</i>	<i>Peytonulus</i>	Sabethini	MK575488.1	15,334

<i>Ma. uniformis</i>	<i>Mansonia</i>	<i>Mansonioides</i>	Mansoniini	NC_047479.1	15,603
<i>Ma. amazonensis</i>	<i>Mansonia</i>	<i>Mansonia</i>	Mansoniini	NC_044657.1	15,357
<i>Wy. confusa</i>	<i>Wyeomyia</i>	<i>Prosopoleps</i>	Sabethini	MK575492.1	15,426
<i>Tr. pallidiventer</i>	<i>Trichoprosopon</i>		Sabethini	MK575490.1	16,037
<i>Li. flavisetosus</i>	<i>Limatus</i>		Sabethini	MK575482.1	15,663
<i>Ur. geometrica</i>	<i>Uranotaenia</i>	<i>Uranotaenia</i>	Uranotaeniini	NC_044662.1	15,593
<i>Toxorhynchites. spp</i>	<i>Toxorhynchites</i>		Toxorhynchitini	MK575489.1	15,320
<i>Hg. albomaculatus</i>	<i>Haemagogus</i>	<i>Haemagogus</i>	Aedini	MN531846.1	15,097
<i>Hg. leucocelaenus</i>	<i>Haemagogus</i>	<i>Conopostegus</i>	Aedini	MN531847.1	15,056
<i>Hg. spegazzinii</i>	<i>Haemagogus</i>	<i>Haemagogus</i>	Aedini	MN531848.1	15,081
<i>Hg. tropicalis</i>	<i>Haemagogus</i>	<i>Haemagogus</i>	Aedini	MN531849.1	14,917

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO:

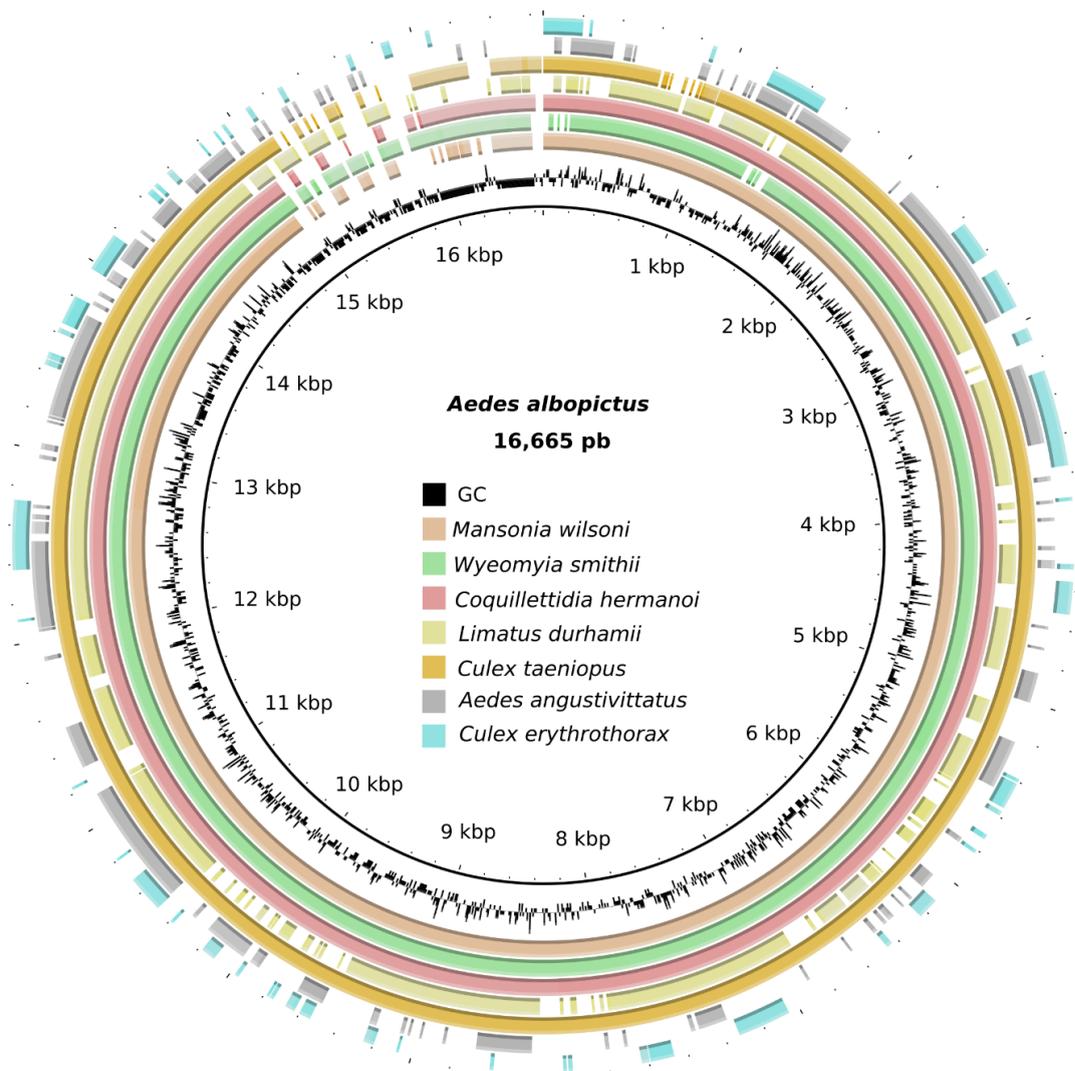
Neste estudo nós caracterizamos sete novos mitogenomas, três completos (*Ma. wilsoni*, *Cq. hermanoi*, and *Cx. taeniopi*), e quatro rascunhos (*Ae. angustivittatus*, *Cx. erythrothorax*, *Li. durhamii*, *Wy. smithii*) com tamanhos variando de 14,736 pb (*Ae. angustivittatus*) até 16,340 pb (*Wy. smithii*) (Quadro 2). *Ma. wilsoni*, *Cq. hermanoi* e *Li. durhamii* foram genomas coletados e sequenciados pelo nosso grupo, onde os 37 genes esperados foram recuperados nas duas primeiras e 20 para a espécie *Li. durhamii*.

Sobre o tamanho do genoma, nós tivemos 16,097 pb para *Ma. wilsoni* e 17,598 pb para *Cq. hermanoi*. A montagem de *Cx. taeniopi* proveniente dos dados disponíveis no NCBI alcançou 97,77% de cobertura e todos os 37 genes foram anotados. Nós também

montamos e anotamos os genomas rascunhos de *Ae. angustivittatus*, *Cx. erythrothorax*, *Li. durhamii*, e *Wy. smithii*.

Foi possível obter a partir da montagem do mitogenoma de *Cx. erythrothorax* e *Li. durhamii* 20 PCGs no total além de dois RNAs ribossomais. Com uma cobertura de 41,95% *Ae. angustivittatus* foi possível anotar apenas 14 genes no total, nove PCGs, três RNAs e dois RNAs. Além disso, *Wy. smithii* foi o rascunho com o maior número de genes 13 PCGs, dois RNAs, e dois RNAs. Além de ter realizado montagens próprias utilizando dados das coletas de dados brutos do RA, coletamos 35 novos mitogenomas montados (tabela) de 17 gêneros diferentes incluindo *Runchomyia*, *Culiseta*, e *Haemagogus*.

Figura 1: Mapa genômico comparativo dos genomas sequenciados e montados



## 4.2 ANÁLISES EVOLUTIVAS:

Avaliamos a história evolutiva da família Culicidae aplicando diferentes abordagens: o genoma completo, nucleotídeo particionado, nucleotídeo concatenado e proteína concatenada. Um total de 122 espécies diferentes de 15 gêneros de culicídeos foram incluídas nas nossas análises.

Em geral, a reconstrução filogenética recuperou as duas grandes subfamílias Culicinae e Anophelinae com bom suporte (Suplementar 3). Iremos focar nos posicionamentos resultantes para a subfamília Culicinae, em especial as espécies que foram montadas pelo nosso grupo, utilizando a topologia resultante dos nucleotídeos particionadas como referência principal. Para essa subfamília tivemos espécies que compreendem 8 tribos das 11 que existem atualmente na classificação. Na tribo Culicini o posicionamento do táxon *Cx. erythrothorax* (Fig 1A) teve um bom suporte apesar da sua montagem não ter sido completa. O mesmo ocorreu para *Cx. taeniopijs* (Fig 1D), mas que diferentemente do anterior apresentou o mesmo posicionamento em todas as topologias sendo alocado com a espécie basal da tribo, exceto na análise de proteínas concatenadas (Suplementar 6). Em nossas análises, o posicionamento do gênero *Lutzia* no clado das espécies de *Culex* apresentou um alto suporte. As análises sugerem que esse gênero se separou das demais espécies de *Culex* no período em 57.82 MIA (Fig 1C e 1B). As duas espécies de *Lutzia* foram alocadas juntas formando um subclado e mais interno entre o gênero *Culex*, e isso foi observado independente do tipo de análise feita. A radiação do ancestral comum das tribos Culicini e Culisetini ocorreu com uma estimativa temporal de 122.3 MIA (Fig 1E). Sobre a tribo Aedini, a espécie *Ar. subalbatus* foi a única desse gênero e apresentou um bom suporte de nós e demonstrou um posicionamento de grupo irmão em relação ao gênero *Aedes* (Fig 1F) (Suplementar 6). Contudo, na análise de genoma completo e de nucleotídeo concatenado esse táxon foi alocado fora da sua tribo sendo colocado como a espécie mais basal da subfamília Culicinae (Suplementar 4 e 5). O posicionamento de *Li. durhamii* agrupou esta espécie juntamente com *Li. flavisetosus*, onde um alto valor de suporte foi observado em todas as topologias, mudando apenas o grupo irmão nas diferentes abordagens (Fig 1G). O gênero *Wyeomyia* demonstrou certas incongruências no seu posicionamento nas árvores obtidas das diferentes abordagens, tendo o mesmo posicionamento na análise de genoma completo e nucleotídeo concatenado, mas que em comparação às outras análises divergiram bastante. Na topologia de nucleotídeo particionada é possível perceber que as duas espécies do gênero *Wyeomyia* foram alocadas

separadamente como dois clados independentes e grupo irmãos, mas esse gênero se mostrou ancestral às demais espécies da tribo. Sendo *Wy. smithii* o mais ancestral com a separação mais antiga da tribo com 107.13 MIA (Fig 1H e 1I). A espécie *Runchomyia reversa* foi posicionada em um clado juntamente com *Tr. pallidiventer* e tendo *Tr. digitatum* como espécie mais basal tendo sua especiação em 103.5 MIA. Essas três espécies formaram um clado separado dentro da tribo Sabethini, mas a separação de *Runchomyia* foi a mais recente com datação em 87.44 MIA (Fig 1K e 1J). O gênero *Sabethes* mostrou um perfil monofilético nas análises de nucleotídeo particionada e proteína concatenada, contudo, na análise de genoma e nucleotídeo concatenado podemos perceber um clado formado por *Sa. undosus* e *Wy. confusa* que pertencem ao mesmo grupo dentro da tribo Sabethini, o grupo do Novo Mundo (Figura 1) (Suplementar 4-6). Segundo nossa topologia a separação das tribos Sabethini e Toxorhynchitiini ocorreu em torno do Meio Jurássico (153.21 MIA) com um bom suporte (Fig 1L). Ainda observando nós mais antigos foi possível verificar a separação do ancestral comum mais antigo entre as tribos com uma datação de 172.07 MIA e com um ótimo suporte (Fig 1M). Na tribo Toxorhynchitiini, tivemos três amostras que formaram dois clados irmãos, um clado formado por *Tx. amboinensis* e *Tx. speciosus*, e outro apenas com uma espécie não identificada do gênero, sendo essa última a mais ancestral, além de ter formado um clado basal em relação às espécies de Sabethini (Fig 1O e 1N). As espécies *Cq. hermanoi* e *Cq. venezuelensis* foram posicionadas juntas em quase todas as análises com valor de suporte alto (0,97 e 1) (Fig 1P) (Suplementar 4-6). Diferentemente, na análise de proteína concatenada, *Cq. hermanoi* foi alocada com *Cq. juxtamansonia* com alto suporte (Suplementar 6). No que se trata do táxon *Mansonia*, a *Ma. wilsoni* foi alocada junto com *Ma. humeralis* com alto suporte em todas topologias, enquanto as outras espécies deste táxon foram posicionadas como grupo irmão deste primeiro clado (Fig 1Q). As tribos Uranotaeniini e Aedeomyiini foram as tribos agrupadas em um posicionamento basal em relação às outras, suportado por altos valores de probabilidade posterior (Fig 1S). A tribo Aedeomyiini foi alocada como a mais basal da subfamília Culicinae tendo seu ancestral comum mais recente com a tribo Uranotaeniini em torno de 157 MIA no período Jurássico (Fig 1R).

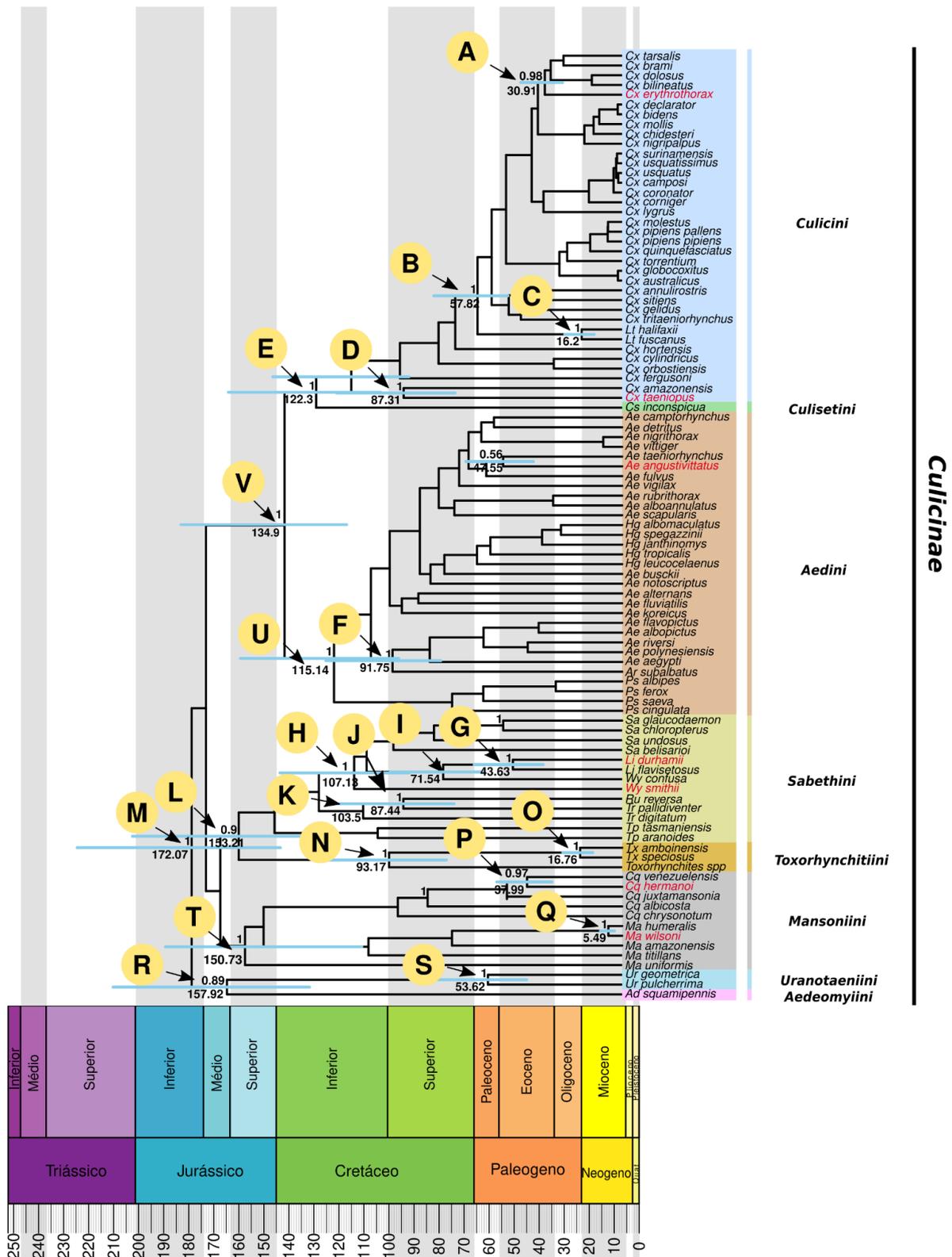
Observando a escala do tempo na filogenia dos culicídeos vemos que a separação do ancestral comum da *Drosophila* e da família Culicidae ocorreu em torno de 274 MIA no período Permiano, especificamente no Cisuraliano (Suplementar 3). Quando entramos para o nó mais antigo dentro da família, onde ocorreu a divisão das duas subfamílias atuais, temos uma radiação de 190 MIA de forma aproximada no início do Jurássico (Suplementar 3). No final do Jurássico indo para a nova era, Cretáceo, podemos ver que ocorreu o surgimento do

ancestral comum entre *Culex* e *Aedes* em torno de 134 MIA (Fig 1V). Na tribo Aedini o gênero *Psorophora* apresentou um posicionamento basal em relação às espécies de *Aedes* tendo se especiado dentro da tribo em torno de 115 MIA ( Fig 1U). O ancestral do gênero *Mansonia* ficou datado em 150 MIA tendo *Ma. uniformis* como espécie mais basal da tribo, e dentro desse táxon a espécie *Ma. wilsoni* alocada com *Ma. humeralis* datou uma radiação de 5 MIA sendo um especiação relativamente recente, ocorrendo no Neógeno (Fig 1T e 1Q). Durante o período do Cretáceo inferior em torno de 122 MIA ocorreu a separação da tribo Culisetini e Culicini (Fig 1E).

Quadro 2: Genomas montados

Espécies	Total de reads (Mi)	Montagem MITObim (pb)	Montagem final (pb)	Cobertura em relação a montagem (%)	Reads mapeadas	Total de genes	PCG	rRNA	tRNA
<i>Ae. angustivittatus</i>	2,1	14,736	6,182	41,95%	24,328	14	9	2	3
<i>Cx. erythrothorax</i>	2,5	15,358	3,513	22,87%	38	20	8	2	10
<i>Cx. taeniopius</i>	69,6	15,185	14,855	97,83%	185,426	37	13	2	22
<i>Cq. hermanoi</i>	400	17,598	17,598	100,00%	4,614,718	37	13	2	22
<i>Li. durhamii</i>	102,8	14,752	10,827	73,39%	208,391	20	9	2	9
<i>Ma. wilsoni</i>	400	16,097	16,097	100,00%	120,806	37	13	2	22
<i>Wy. smithii</i>	47,8	16,340	16,073	98,37%	5,036,188	32	13	2	17

Figura 2: Árvore evolutiva da subfamília Culicinae baseada em nucleotídeos particionados com datação. Números acima das barras representam a probabilidade posterior para o nó. Números abaixo das barras representam a datação estimada para o nó. As barras azuis representam o HPD95%



## 5. DISCUSSÃO

Dessa forma, através desse trabalho foi possível montar o genoma de sete espécies de mosquitos pertencentes à família Culicidae, onde três foram completos e quatro rascunhos. Todas essas espécies obtiveram um bom valor de suporte no seu posicionamento nas filogenias geradas. Dentro de um total de 122 espécies conseguimos reunir oito tribos da família Culicinae e trazer novas informações sobre seus posicionamentos e relações através de quatro diferentes análises evolutivas com base em diferentes tipos de dados e partições.

As informações retiradas a partir de genomas mitocondriais podem ser limitadas, contudo, quando utilizada a metodologia correta conseguimos atingir resultados satisfatórios, como é o caso do posicionamento de espécies utilizando estes marcadores. Desde que se foi descoberto a possibilidade de se utilizar esse genoma secundário como fonte de informação para reconstruções filogenéticas, diversos grupos biológicos vêm sendo estudado utilizando marcadores mitocondriais (Carapelli *et al* 2006; Zhang *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2012; Simon e Hadrys, 2013 ). Mitogenomas podem ser usados em diferentes formas, trazendo diferentes resultados a depender da abordagem usada, já que aminoácidos e nucleotídeos possuem um relógio evolutivo diferenciado (Yang *et al.*, 2018). Devido a isso, decidimos produzir quatro análises e comparar as topologias para verificar como cada árvore iria contar a história evolutiva da família Culicidae usando os mesmos genomas mitocondriais, porém de formas diferentes.

A família Culicidae consiste em um grupo monofilético que possui um extenso histórico de classificação baseada em caracteres morfológicos, principalmente por possuir 4 estágios no seu ciclo de vida, ovo, larva, pupa e adulto, apresentando um grande número de traços usados no momento de classificar esses táxons (Consoli e Lourenço, 1994). Contudo, muitos pontos dessa classificação apresentavam problemas e ainda se mostravam ambíguos a depender de cada estudo, um dos motivos para isso sendo a quantidade de homoplasia nos caracteres morfológicos usados para a reconstrução filogenética das espécies (Lorenz *et al.*, 2021). O advento de dados moleculares como uma solução para essas relações problemáticas e não resolvidas trouxe um melhor esclarecimento para alguns pontos dentro dessa família, como a extinção da subfamília Toxorhynchitinae sendo transformada em tribo. Porém, para outros gêneros diversos ainda existe posicionamentos conflitantes como nos generos *Aedes*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Tripteroides*, *Toxorhynchites*, *Uranotaenia* e *Wyeomyia* (Harbach, 2007).

Aqui nesse estudo um total de 122 genomas foram usados para reconstruir a árvore filogenética da família Culicidae, onde os genomas puderam ser incluídos, representando genomas completos ou rascunhos, com a finalidade de abranger uma quantidade mais abrangente de representatividade táxons deste grupo. Com isso, a monofilia das duas subfamílias foi recuperada, tal como dos gêneros *Anopheles*, *Sabethes*, *Mansonia*, *Coquillettidia* e *Psorophora*. Porém, observando as outras topologias é possível notar incongruências nas monofilias, como ocorreu para *Sabethes*, que na análise de genoma completo e nucleotídeo concatenada teve seus táxons separados pelas outras espécies da tribo Sabethini, onde *Sa. undosus* foi alocado com *Wy. confusa* (Suplementar 4 e 5). A tribo Sabethini pode ser dividida no grupo do Novo Mundo (*Isostomyia*, *Limatus*, *Onirion*, *Sabethes*, *Runchomyia*, *Trichoprosopon* e *Wyeomyia*) e no grupo do Velho Mundo (*Malaya*, *Topomyia*, *Maorigoeldia* e *Tripteroides*), de acordo com Harbach (2007), Judd (1996) e Reidenbach *et al* (2009) os gêneros que compõem o Novo Mundo formam um clado monofilético, principalmente mostrando uma forte relação entre *Limatus*, *Sabethes* e *Wyeomyia*, o que foi confirmado neste presente estudo. Ainda sobre esse grupo, o gênero *Wyeomyia* é tido como não monofilético (Judd 1996; Motta *et al.*, 2007), o que pode também ser observado nas nossas topologias, onde na árvore de nucleotídeo particionada as duas espécies ficaram separadas em clados diferentes, e nas outras topologias *Wy. confusa* chegou até ser alocado com uma espécie de *Sabethes*. O táxon *Limatus* nesse estudo foi representado por duas espécies (*Li. durhamii* e *Li. flavisetosus*) e na árvore de nucleotídeo particionada foram alocadas juntas tendo o grupo *Sabethes* e *Wyeomyia* como grupos irmãos de forma similar ao estudo de Motta *et al* (2007). Contudo, no estudo de Judd (1996) temos um posicionamento onde o gênero *Limatus* está integrado dentro do gênero *Wyeomyia*, o que foi visto no presente estudo nas demais topologias que geramos, onde as duas espécies desse gênero foram separadas pelas espécies de *Limatus*.

A tribo Culicini é estabelecida como monofilética na literatura e isso pode ser visto em alguns estudos como Harbach (1998, 2012), e esse perfil também foi visualizado nas nossas árvores. Contudo, em relação às espécies basais desse grupo tivemos *Cx. amazonensis* e *Cx. taeniopi* como clado ancestral independente do tipo de análise. Enquanto Silva *et al* (2020) e Harbach (2012), estudo baseado em mitogenomas e outro baseado em caracteres morfológicos respectivamente, mostraram *Cx. amazonensis* e *Cx. hortensis* ocupando esse posicionamento. No entanto, estes estudos não incluíram na amostragem a espécie *Cx. taeniopi* em suas análises. Uma problemática muito grande da taxonomia da família Culicidae se encontra dentro dessa tribo, o complexo *pipiens* é complexo e vem sendo

estudado a muitos anos na busca de entender melhor sua real classificação e relação filogenética (Aardema *et al.*, 2021). Em nossa topologia esse complexo foi alocado em duas partes, onde as espécies endêmicas da Austrália *Cx. australicus* e *Cx. globocoxitus* formaram um clado mais recente com especiação de aproximadamente 1.66 MIA, enquanto a subespécies *Cx pipiens pallens*, as espécies que apresentam diferenças no seu comportamento ecológico, *Cx. pipiens f. pipiens* e *Cx. pipiens f. molestus*, formaram um clado único, tendo como grupo irmão *Cx. quiquesfasciatus*, que também faz parte do complexo *pipiens*. Estranhamente entre esses dois clados a espécie *Cx. torrentium* foi alocada pois ela não pertence a esse complexo, contudo, suas características morfológicas são bastante semelhantes aos dos táxons desse complexo citado acima. Além da semelhança na morfologia, essa espécie já mostrou um perfil de potencial vetor de WNV na Europa junto com *Cx. pipiens f. pipiens* e *Cx. pipiens f. molestus* (Jansen *et al.*, 2019).

A classificação do táxon *Lutzia* tem um histórico complexo, em 1932 era considerado um subgênero, porém foi elevado para a classificação de gênero por Tanaka (2003). Os estudos de Sun *et al* (2019) e de Harbach (2012) focaram na tribo Culicini e mostraram topologias onde *Lutzia* foi visto como grupo independente e irmão do gênero *Culex*. Todavia, neste estudo usamos um grande número de amostras da espécie *Culex* e em todas as quatro formas de análise *Lutzia* foi alocado dentre o gênero *Culex* assim como mostrado nas topologias de Vesgueiro *et al* (2011) e Demari-Silva *et al* (2011) e Demari-Silva (2011). Em ambos estudos os pesquisadores apontam que baseado nos seus resultados a classificação de gênero de *Lutzia* não foi suportada e sugerem uma possível revisão para subgênero, assim como o presente estudo.

O gênero *Armigeres* foi alocado como espécie ancestral ao gênero *Aedes* na topologia de nucleotídeo particionada, assim como observado por Ross (1951, p.128, apud Harbach, 2007, p.591). Contudo o posicionamento de *Armigeres* nas diversas árvores sofreu incongruências, sendo inclusive posicionado fora de sua tribo na análise de genoma completo e nucleotídeo concatenado. Apesar disso, o posicionamento da árvore de proteínas mostra *Armigeres* entre o gênero *Aedes* similar a outros estudos como Reinert *et al* (2004) e Isoe (2000). O subgênero *Stegomyia* (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. falopictus*, *Ae. riversi*, e *Ae. polynesiensis*) mostrou um caráter monofilético nos nossos resultados independente do tipo de análise em congruência como ocorreu em Silva *et al* (2020) e Reinert (2009). Enquanto isso, o subgênero *Ochlerotatus* (*Ae. fluviatilis*, *Ae. angustivittatus*, *Ae. taeniorhynchus*, *Ae. vittiger*, *Ae. fulvus*, *Ae. nigrithorax*, *Ae. scapularis*, *Ae. vigilax*, *Ae. detritus* e *Ae. camptorhynchus*) onde o genoma montado por nós *Ae. angustivattus* se encontra, mostrou seu perfil parafilético

assim como Silva *et al* (2020). O gênero *Haemagogus* formou um grupo monofilético dentro do gênero *Aedes* fazendo este ter um perfil parafilético que já foi apontado anteriormente por outros estudos (Ross 1951; Reinert., 2004; Lorenz *et al.*, 2021). Assim como Silva *et al* (2020), Reidenbach *et al* (2009) e Lorenz *et al* (2021), o táxon *Psorophora* foi alocado como basal da tribo como resultado em todas nossas quatro árvores.

Em relação ao gênero *Mansonia*, tivemos o táxon como grupo irmão do táxon *Coquillettidia*. independente da árvore gerada, mostrando o perfil monofilético da tribo *Mansonia* já visto em outros estudos (Lorenz *et al* 2021; Nascimento *et al.*, 2021). No estudo de Silva *et al* (2020) a tribo *Mansoniini* foi alocada com tribo irmã de *Aedini* e *Sabethini*, o que divergiu do presente estudo onde *Mansoniini* foi tribo irmã da tribo *Toxorhynchitiini* e *Uranotaeniini*, assim como inferências realizadas nos estudos de Nascimento *et al* (2021)

As estimativas temporais de datações podem sofrer mudanças a depender da quantidade de dados e da taxa evolutiva dos marcadores utilizados para a construção daquela árvore e que tipo de reconstrução foi escolhida. Na nossa árvore a separação do nosso grupo externo escolhido, *Drosophila*, e a família Culicidae foi de 274 MIA, e seguindo dentro do nosso intervalo de confiança a topologia gerada por Hao *et al* (2017) obteve a estimativa de 259.5 MIA e no estudo de Silva *et al* (2020) foi de 273 MIA. A separação das duas subfamílias de acordo com nosso estudo ocorreu no Jurássico em torno de 190 MIA, de forma igual, Moreno *et al* (2010) também obteve a mesma estimativa para a separação das subfamílias no seu estudo com base em genomas mitocondriais. Um estudo que associa o aumento de CO<sub>2</sub> à especiação dos mosquitos de Tang *et al* (2018) estimou 195 MIA para ancestral das duas subfamílias, também sendo uma estimativa dentro do nosso intervalo. Porém, no estudo de Zhou *et al* (2014) a estimativa foi de 122 MIA, valor que além de divergente das nossas estimativas, também não está presente no nosso intervalo de confiança. O tipo de dado utilizado neste estudo foi diferente do presente, sendo usado genomas nucleares para a reconstrução juntamente com um número baixo de espécies da família Culicidae, fatores que influenciam fortemente nos valores estimados. Além disso, o estudo de Krzywinski *et al* (2006) realizou análises com diferentes partições, onde a estimativa com base nos genes de proteínas apresentou uma faixa de estimativa de 145-200 MIA fazendo sobreposição com nossos resultados. Todavia, a análise de Krzywinski *et al* (2006) apenas baseada em tRNA estimou valores, 77.2–125.3 MIA, que estão fora da nossa variação de confiança. A radiação das tribos Culicini e Aedini no nosso estudo ocorreu no final do Jurássico em torno de 134 MIA, o estudo de Lorenz *et al* (2021) obteve a estimativa de 123 MIA com um baixo valor de suporte que engloba a parte inicial do período Cretáceo, mas

apesar disso essa média está incluindo na nossa faixa. Diferentemente, a variação de estimativa de 51.7–22.4 MIA no estudo de Desmond *et al* (1998) baseado no gene COX II que não apresenta sobreposição com as datações das nossas topologias.

## 6. CONCLUSÕES

Em suma, a partir do presente trabalho realizado foi possível sequenciar e caracterizar o genoma mitocondrial de sete espécies da família Culicidae e reconstruir uma hipótese sobre a história evolutiva frente às 122 genomas mitocondriais disponíveis de membros da família Culicidae. Através das nossas análises, conseguimos estimar as datas de especiação para diversos grupos dentro da família. Além disso, trouxemos novos dados acerca de posicionamentos de tribos da subfamília Culicinae com posicionamento incerto que podem ser utilizados para levantar hipóteses em outros estudos taxonômicos ou mesmo de competência vetorial. Ademais, importante ressaltar que a família Culicidae é extremamente numerosa e com uma alta relevância médica e ainda necessita de estudos incluindo uma maior diversidade de espécies para obtermos uma compreensão mais ampla acerca de sua classificação e história evolutiva.

## 7. REFERÊNCIAS

AARDEMA, M. L.; OLATUNJI, S. K.; FONSECA, D. M. The Enigmatic *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Species Complex: Phylogenetic Challenges and Opportunities From a Notoriously Tricky Mosquito Group. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 115, n. 1, p. 95–104, 24 set. 2021.

BAUM, D. **Phylogenetic Trees and Monophyletic Groups | Learn Science at Scitable.**

Disponível em:

<<https://www.nature.com/scitable/topicpage/reading-a-phylogenetic-tree-the-meaning-of-41956/>>. Acesso em: 12 jan. 2024.

BELKIN, J. N. The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae), Vol. 2. **University of California Press**, v. I & II, 1 jan. 1962.

BERNT, M. et al. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 2, p. 313–319, nov. 2013.

BERTONE, M. A.; COURTNEY, G. W.; WIEGMANN, B. M. Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta: Diptera) based on multiple nuclear genes. **Systematic Entomology**, v. 33, n. 4, p. 668–687, out. 2008.

BESANSKY, N. J.; FAHEY, G. T. Utility of the white gene in estimating phylogenetic relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 4, p. 442–454, 1 abr. 1997.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 8, p. 1767–1780, 1 abr. 1999.

BOORE, J. L.; BROWN, W. M. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 8, n. 6, p. 668–674, 1 dez. 1998.

BRANDLEY, M. C.; SCHMITZ, A.; REEDER, T. W. Partitioned Bayesian Analyses, Partition Choice, and the Phylogenetic Relationships of Scincid Lizards. **Systematic Biology**, v. 54, n. 3, p. 373–390, 1 jun. 2005.

BRUSCA, R. C. et al. **Invertebrates**. 3. ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 2016.

CAMERON, S. L. et al. A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. **Systematic Entomology**, v. 32, n. 1, p. 40–59, 15 set. 2006.

CAMERON, S. L. Insect Mitochondrial Genomics: Implications for Evolution and Phylogeny. **Annual Review of Entomology**, v. 59, n. 1, p. 95–117, 7 jan. 2014.

CARAPELLI, A. et al. The mitochondrial genome of the entomophagous endoparasite *Xenos vesparum* (Insecta: Strepsiptera). **Gene**, v. 376, n. 2, p. 248–259, jul. 2006.

CONSOLI, B.; LOURENÇO, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. [s.l.] Editora Fiocruz, 1994.

- DEMARI-SILVA, B. et al. Taxonomic and Phylogenetic Relationships Between Species of the Genus *Culex* (Diptera: Culicidae) From Brazil Inferred From the Cytochrome *c* Oxidase I Mitochondrial Gene. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 272–279, 1 mar. 2011.
- DONALD, C. L.; SIRIYASATIEN, P.; KOHL, A. Toxorhynchites Species: A Review of Current Knowledge. **Insects**, v. 11, n. 11, 30 out. 2020.
- DONG, Z. et al. Mitochondrial DNA as a Molecular Marker in Insect Ecology: Current Status and Future Prospects. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 114, n. 4, p. 470–476, 15 maio 2021.
- DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 25 fev. 2012.
- ESTERLY, A. T. et al. *Culex erythrothorax* (Diptera: Culicidae): Activity periods, insecticide susceptibility and control in California (USA). **PLOS ONE**, v. 15, n. 7, p. e0228835–e0228835, 10 jul. 2020.
- FECCHIO, A. et al. Avian malaria, ecological host traits and mosquito abundance in southeastern Amazonia. **Parasitology**, v. 144, n. 8, p. 1117–1132, 27 mar. 2017.
- FENN, J. D. et al. A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera (Insecta) and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 1, p. 59–68, out. 2008.
- FOLEY, D. H. et al. Evolution and Systematics of Anopheles: Insights from a Molecular Phylogeny of Australasian Mosquitoes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 262–275, 1 abr. 1998.
- FOSTER, P. G.; HICKEY, D. A. Compositional Bias May Affect Both DNA-Based and Protein-Based Phylogenetic Reconstructions. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 3, p. 284–290, mar. 1999.
- FOSTER, W. A.; WALKER, E. D. **Chapter 15 - Mosquitoes (Culicidae)**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128140437000157?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 jan. 2024.

GALINDO, P. Notes on the systematics of *Culex* (Melanoconion) *taeniopus* Dyar and Knab and related species, gathered during arbovirus investigations in Panama. **Mosquito Systematics**, v. 1, n. 4, p. 82–89, nov. 1969.

GALTIER, N. et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 22, p. 4541–4550, nov. 2009.

GHASSEMI-KHADEMI, T. et al. Utility of Complete Mitochondrial Genomes in Phylogenetic Classification of the Species of *Anopheles* (Culicidae: Anophelinae). **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–20, 21 jun. 2021.

GISSI, C.; IANNELLI, F.; PESOLE, G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. **Heredity**, v. 101, n. 4, p. 301–320, 9 jul. 2008.

HAHN, C.; BACHMANN, L.; CHEVREUX, B. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads—a baiting and iterative mapping approach. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 13, p. e129–e129, 9 maio 2013.

HAO, Y.-J. et al. Complete mitochondrial genomes of *Anopheles stephensi* and *An. dirus* and comparative evolutionary mitochondriomics of 50 mosquitoes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7666, 9 ago. 2017.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny\*. **Zootaxa**, v. 1668, n. 1, p. 591–638, 21 dez. 2007.

HARBACH, R. E. *Culex pipiens*: Species Versus Species Complex – Taxonomic History and Perspective. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 4s, p. 10–23, dez. 2012.

HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic Entomology**, v. 23, n. 4, p. 327–370, out. 1998.

HOLT, I. J.; HARDING, A. E.; MORGAN-HUGHES, J. A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. **Nature**, v. 331, n. 6158, p. 717–719, 25 fev. 1988.

ISOE, J. **Comparative analysis of the vitellogenin genes of the Culicidae**. Thesis PhD—Faculty of the Interdisciplinary Program in Insect Science, University of Arizona: [s.n.].

JANSEN, S. et al. *Culex torrentium*: A Potent Vector for the Transmission of West Nile Virus in Central Europe. **Viruses**, v. 11, n. 6, p. 492, 29 maio 2019.

JUDD, D. Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). **Systematic Entomology**, v. 21, n. 2, p. 129–150, abr. 1996.

KAINER, D.; LANFEAR, R. The Effects of Partitioning on Phylogenetic Inference. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 6, p. 1611–1627, 6 fev. 2015.

KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, 8 maio 2017.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, 6 set. 2017.

KRZYWINSKI, J.; GRUSHKO, O. G.; BESANSKY, N. J. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: An improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, n. 2, p. 417–423, maio 2006.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2 maio 2018.

LANFEAR, R. et al. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 6, p. 1695–1701, 20 jan. 2012.

LANFEAR, R. et al. Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 82, 2014.

LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. **Bioinformatics**, v. 30, n. 22, p. 3276–3278, 5 ago. 2014.

LORENZ, C. et al. Phylogeny and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) with an emphasis on the Neotropical fauna. **Systematic Entomology**, v. 46, n. 4, p. 798–811, 10 maio 2021.

LOUGHLIN, S. O. The expanding *Anopheles gambiae* species complex. **Pathogens and Global Health**, v. 114, n. 1, p. 1–1, 30 jan. 2020.

MITCHELL, A.; SPERLING, F. A. H.; HICKEY, D. A. Higher-level phylogeny of mosquitoes (Diptera: Culicidae): mtDNA data support a derived placement for Toxorhynchites. **Insect Systematics & Evolution**, v. 33, n. 2, p. 163–174, 2002.

MONTAÑA-LOZANO, P. et al. Comparative genomic analysis of vertebrate mitochondrial reveals a differential of rearrangements rate between taxonomic class. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 31 mar. 2022.

MORENO, M. et al. Complete mtDNA genomes of *Anopheles darlingi* and an approach to anopheline divergence time. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, 14 maio 2010.

MOTTA, M. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SALLUM, M. A. M. Phylogeny of genus *Wyeomyia* (Diptera: Culicidae) inferred from morphological and allozyme data. **Canadian Entomologist**, v. 139, n. 5, p. 591–627, 1 out. 2007.

NASCIMENTO, B. L. S. DO et al. First Description of the Mitogenome and Phylogeny of Culicinae Species from the Amazon Region. **Genes**, v. 12, n. 12, p. 1983, 1 dez. 2021.

NASS, M. M. K.; NASS, S. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. **Journal of Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 593–611, 1 dez. 1963.

NUSSBAUM, R.; WILLARD, H. F.; MCINNES, R. R. **Thompson & Thompson Genética Médica**. [s.l.] Elsevier Editora Ltda, 2016.

OSWALDO PAULO FORATTINI. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp, 2002.

PECOR, J. E. et al. Annotated checklist of the mosquito species encountered during arboviral studies in Iquitos, Peru (Diptera: Culicidae). **PubMed**, v. 16, n. 3, p. 210–8, 1 set. 2000.

PÉLANDAKIS, M.; SOLIGNAC, M. Molecular phylogeny of *Drosophila* based on ribosomal RNA sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 37, n. 5, p. 525–543, 1 nov. 1993.

- PENG, X.-Y. et al. The mitochondrial genomes of twelve Anopheles mosquitoes (Diptera: Culicidae) and their phylogenetic implications. **Conservation Genetics Resources**, v. 8, n. 4, p. 387–390, 28 jun. 2016.
- PHILIPPE, H. et al. Mitigating Anticipated Effects of Systematic Errors Supports Sister-Group Relationship between Xenacoelomorpha and Ambulacraria. **Current Biology**, v. 29, n. 11, p. 1818-1826.e6, jun. 2019.
- PLAZZI, F.; RICCI, A.; PASSAMONTI, M. The mitochondrial genome of Bacillus stick insects (Phasmatodea) and the phylogeny of orthopteroid insects. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 58, n. 2, p. 304–316, fev. 2011.
- QUENTAL, T. B.; MARSHALL, C. R. Diversity dynamics: molecular phylogenies need the fossil record. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 8, p. 434–441, ago. 2010.
- RAMBAUT, A. et al. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901–904, 27 abr. 2018.
- RAMÍREZ-RÍOS, V. et al. Mitochondrial genome characterization of *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) and its phylogenetic relationship with other lepidopteran insects. **Gene**, v. 581, n. 2, p. 107–116, maio 2016.
- REIDENBACH, K. R. et al. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, dez. 2009.
- REINERT, J. F.; HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 142, n. 3, p. 289–368, nov. 2004.
- RODRIGUES, M. S.; MORELLI, K. A.; JANSEN, A. M. Cytochrome c oxidase subunit 1 gene as a DNA barcode for discriminating *Trypanosoma cruzi* DTUs and closely related species. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 16 out. 2017.
- ROTA, J.; WAHLBERG, N. Exploration of data partitioning in an eight-gene data set: phylogeny of metalmark moths (Lepidoptera, Choreutidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, n. 5, p. 536–546, 19 jun. 2012.

SHAO, R.; BARKER, S. C. Mitochondrial genomes of parasitic arthropods: implications for studies of population genetics and evolution. **Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 153–167, 1 fev. 2007.

SHEPARD, J. J.; ANDREADIS, T. G.; VOSSBRINCK, C. R. Molecular Phylogeny and Evolutionary Relationships Among Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Northeastern United States Based on Small Subunit Ribosomal DNA (18S rDNA) Sequences. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 3, p. 443–454, 1 maio 2006.

SIMION, P. et al. A Large and Consistent Phylogenomic Dataset Supports Sponges as the Sister Group to All Other Animals. **Current Biology**, v. 27, n. 7, p. 958–967, abr. 2017.

SIMON, S.; HADRYIS, H. A comparative analysis of complete mitochondrial genomes among Hexapoda. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 69, n. 2, p. 393–403, nov. 2013.

SONG, N. et al. The mitochondrial genomes of palaeopteran insects and insights into the early insect relationships. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17765, 28 nov. 2019.

SUN, L. et al. The complete mt genomes of *Lutzia halifaxia*, *Lt. fuscus* and *Culex pallidothorax* (Diptera: Culicidae) and comparative analysis of 16 *Culex* and *Lutzia* mt genome sequences. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, 26 jul. 2019.

TANAKA, K. Studies on the pupal mosquitoes of Japan (9). Genus *Lutzia*, with establishment of two new subgenera, *Metalutzia* and *Insulalutzia* (Diptera, Culicidae). **Japanese Journal of Systematic Entomology**, v. 9, n. 2, p. 159–169, 30 nov. 2003.

TANG, C. et al. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> promoted speciation in mosquitoes (Diptera, Culicidae). **Communications Biology**, v. 1, n. 1, 5 nov. 2018.

TAVARES, E. S.; BAKER, A. J. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 81, 2008.

THOMSON, S. A. et al. Taxonomy based on science is necessary for global conservation. **PLOS Biology**, v. 16, n. 3, p. e2005075, 14 mar. 2018.

TRIVEDI, S. et al. Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation: An update. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 161–171, mar. 2016.

TSANG, L. M. et al. Phylogeny of Decapoda using two nuclear protein-coding genes: Origin and evolution of the Reptantia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, n. 1, p. 359–368, jul. 2008.

VESGUEIRO, F. T. et al. Intragenomic variation in the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA of species of the genera *Culex* and *Lutzia* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 01–08, 1 fev. 2011.

WALLACE, D. et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **Science**, v. 242, n. 4884, p. 1427–1430, 9 dez. 1988.

WAN, X. et al. Complete Mitochondrial Genome of the Free-Living Earwig, *Challia fletcheri* (Dermaptera: Pygidicranidae) and Phylogeny of Polyneoptera. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, p. e42056–e42056, 6 ago. 2012.

WERNERSSON, R.; PEDERSEN, A. G. RevTrans: multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3537–3539, 1 jul. 2003.

WILEY, E. O. Why Trees Are Important. **Evolution: Education and Outreach**, v. 3, n. 4, p. 499–505, 25 set. 2010.

WILLIAMS, T. A. et al. Phylogenomics provides robust support for a two-domains tree of life. **Nature Ecology & Evolution**, v. 4, n. 1, p. 138–147, 9 dez. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector-borne Diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em: 19 jan. 2024.

YANG, H. et al. Compositional and mutational rate heterogeneity in mitochondrial genomes and its effect on the phylogenetic inferences of Cimicomorpha (Hemiptera: Heteroptera). **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 18 abr. 2018.

ZHANG, D.-X.; HEWITT, G. M. Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 2, p. 99–120, mar. 1997.

ZHANG, Y. et al. The complete mitochondrial genome of the cockroach *Eupolyphaga sinensis* (Blattaria: Polyphagidae) and the phylogenetic relationships within the Dictyoptera. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 7, p. 3509–3516, 10 dez. 2009.

ZHOU, D. et al. Genome sequence of *Anopheles sinensis* provides insight into genetics basis of mosquito competence for malaria parasites. **BMC Genomics**, v. 15, n. 42, p. 42, 18 jan. 2014.

ZOU, Z.; ZHANG, J. Morphological and molecular convergences in mammalian phylogenetics. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 2 set. 2016.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Material suplementar 1 - Tabela HPD95%:

<https://docs.google.com/document/d/1kWy6Nocyo6S9M19HqcmgfZiQ4JCOOnKruvUfzTq07Cwg/edit?usp=sharing>

Material suplementar 2 - Tabela modelos evolutivos escolhidos:

[https://docs.google.com/document/d/1vniPLGU0yjwgxIebt1\\_\\_wIRMbyxX9ALYegKnjgqOWUQ/edit?usp=sharing](https://docs.google.com/document/d/1vniPLGU0yjwgxIebt1__wIRMbyxX9ALYegKnjgqOWUQ/edit?usp=sharing)

Material suplementar 3 - Filogenia completa de PCG particionados:

<https://drive.google.com/file/d/1VPbrcokSDLMIvjtMv6pYvBqLK02k23Oa/view?usp=sharing>

Material suplementar 4 - Filogenia baseada no genoma completo:

[https://drive.google.com/file/d/1k77vNlr-P19P9CZh1tcyKgCoxmU-v\\_Ko/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1k77vNlr-P19P9CZh1tcyKgCoxmU-v_Ko/view?usp=sharing)

Material suplementar 5 - Filogenia baseada em PCG concatenada:

[https://drive.google.com/file/d/1vhpxh8gWpdHvkwG-fvb3Ph-CXDx\\_FAVt/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1vhpxh8gWpdHvkwG-fvb3Ph-CXDx_FAVt/view?usp=sharing)

Material suplementar 6 - Filogenia baseada em proteínas concatenadas:

<https://drive.google.com/file/d/19h806DPwEfy3PNr9UtNEbFOeIFuJCWaY/view?usp=sharing>

## ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA

### About the journal

---

#### Basic information

**Genetics and Molecular Biology** ISSN 1415-4757 - (formerly named Revista Brasileira de Genética/[Brazilian Journal of Genetics](#) - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the [Sociedade Brasileira de Genética](#) (Brazilian Society of Genetics)

**Genetics and Molecular Biology** begins with vol. 21, issue 1, of March 1998, following the sequence of numbering of its predecessor, which was published from 1978 to 1997, V. 1 to V. 20.

**Genetics and Molecular Biology** considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines. Manuscripts presenting methods and applications only, without an analysis of genetic data, will not be considered.

The journal's short title is **Genet. Mol. Biol.**, which should be used in bibliographies, footnotes and bibliographical references and strips.

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

#### Indexed in

**Genetics and Molecular Biology** is abstracted or indexed in:

- PubMed
- Science Citation Index Expanded
- Current Contents/Life Sciences
- ISI Web of Science
- Biotechnology Citation Index
- Biological Abstracts
- Excerpta Medica
- Genetics Abstracts
- Animal Breeding Abstracts
- Plant Breeding Abstracts
- Chemical Abstracts
- Referativnyi Zhurnal (Abstracts Journal, Russia)
- Periódica (UNAM-Mexico)
- Lilacs

Volumes published since 2009 are indexed in full-text version in PubMed Central.

#### Intellectual property

All content of the journal, except where identified, is licensed under a [Creative Commons](#) attribution-type BY.

#### Sponsors

The journal receives support from the:

Apoio:



Ministério  
da Educação

Ministério da  
Ciência e Tecnologia

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## Editorial Board

---

### Editor

- Augusto Schrank - UFRGS, Rio Grande do Sul, RS, Brazil
- Carlos F. M. Menck - USP, São Paulo, SP, Brazil
- Marcia Pinheiro Margis - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

### Assistant Editor

- Klaus Hartfelder - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

### Senior editors

- André Luiz Paranhos Perondini - USP, São Paulo, SP, Brazil
- Angela M. Vianna-Morgante - USP, São Paulo, SP, Brazil
- Catarina Satie Takahashi - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil
- Fábio de Melo Sene - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil
- Fausto Foresti - UNESP, Botucatu, SP, Brazil
- Paulo A. Otto - USP, São Paulo, SP, Brazil
- Sérgio Olavo Pinto da Costa - USP, São Paulo, SP, Brazil

### Associate editors

- Alberto Kornblihtt - Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales - Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
- Alexandre Rodrigues Caetano - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brazil
- Alysson Muotri - University of California San Diego, La Jolla, CA, USA
- Anamaria Aranha Camargo - Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, SP, Brazil
- Ana Tereza R. Vasconcelos - LNCC, Petrópolis, RJ, Brazil
- Antonio Matteo Solé-Cava - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
- Bertram Brenig - University of Göttingen, Göttingen, Germany
- Carlos R. Machado - UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil
- Célia Maria de Almeida Soares - UFG, Goiania, GO, Brazil
- Daisy Maria Fávero Salvadori - UNESP, Botucatu, SP, Brazil
- Dario Grattapaglia - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brazil, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Emmanuel Dias Neto - USP, São Paulo, SP, Brazil
- Fabrício Rodrigues dos Santos - UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil
- Filippo Pinto e Vairo - Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
- Gloria Regina Franco - UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil
- Guilherme Corrêa de Oliveira - FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil
- Guillermo Ortí - The George Washington University, Washington, D.C., USA
- Igor Schneider - UFPA, Belem, PA, Brazil
- Jorge Lopez-Camelo - Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC) (CONICET), Buenos Aires, Argentina
- Juan Lucas Argueso Almeida - Colorado State University, Fort Collins, CO, USA
- Louis Bernard Klaczko - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil
- Luis FZ Batista - Washington University in St. Louis, St. Louis, MO, USA
- Mara H. Hutz - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil
- Marcela Uliano da Silva - Wellcome Sanger Institute, UK
- Marcelo Guerra - UFPE, Recife, PE, Brazil
- Marcio de Castro Silva Filho (incluir) - USP, Piracicaba, SP, Brazil
- Maria Angélica Cortez - Experimental Radiation Oncology, Houston, TX, USA
- Maria José de Jesus Silva - Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil
- Maria Luiza Petzl-Erler - UFPR, Curitiba, PR

- Regina C. Mingroni-Netto - USP, São Paulo, SP, Brazil
- Ricardo G. Correa - SBP-GSK Center for Translational Neuroscience, La Jolla, CA, USA,
- Roberto Giugliani - HCPA, UFRGS, Rio Grande do Sul, RS, Brazil
- Roberto Hirochi Herai - PUCPR, Curitiba, PR, Brazil
- Rogério Margis - UFRGS, Rio Grande do Sul, RS, Brazil
- Vera Maria Fonseca de Almeida e Val - INPA/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brazil

#### Editorial Production

SciELO Brasil  
E-mail: [gestao.editorial@scielo.org](mailto:gestao.editorial@scielo.org)  
Telefone: (11) 5083-3639 - ramal 112.

---

#### Instructions to authors

---

##### Scope and policy

**Genetics and Molecular Biology** (formerly named *Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics* - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The journal considers contributions that present the results of original research in genetics, molecular biology, evolution and related scientific disciplines. Manuscripts presenting methods and applications only, without an analysis of genetic data, will not be considered.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been published or are not under consideration for publication elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, as evaluated by the Editor, are reviewed by an Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

The official abbreviation for Genetics and Molecular Biology is **Genet. Mol. Biol.**

##### Open-Access policy

Genetics and Molecular Biology articles are made available in full content at SciELO (Scientific Library Online) hosted at [www.scielo.br/gmb](http://www.scielo.br/gmb). Back issues dating until 1998 are available through this site.

GMB articles published since 2009 are also indexed at PubMed Central and available in full text version at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1440/>.

Back issues of earlier titles (*Brazilian Journal of Genetics* and *Revista Brasileira de Genética*) are hosted at GMB's own site: <http://www.gmb.org.br>

Membership to the Brazilian Society of Genetics entitles subscription to Genetics and Molecular Biology.

For nonmembers and institutions, the annual subscriptions rates (four issues/year) are informed at the journal's website <http://www.gmb.org.br>.

## Submission of papers

### 1. Manuscripts have to be submitted through our online submission platform:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

A cover letter addressed to the Editor-in-Chief is required

### 2. For submission the following instructions must be observed:

**a)** The manuscript must be submitted by the Corresponding Author, identified as such in the title page of the manuscript. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process. The submitting author must provide an ORCID ID (Open Researcher and Contributor ID, <http://orcid.org/>) at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system.

**b)** Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file.

**c)** Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed. For statements on ethical issues in research see below (3.1.m).

**d)** The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office. We strongly encourage co-authors to also provide their ORCID IDs at the time of submission.

**e)** In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and opposed reviewer(s).

**f)** Files must be uploaded separately and identified according to file types, respecting the following sequence: main text document (title page as page 1), tables, figures and, if applicable, supplementary material. The main text file must include the title page, Abstract, References and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.i).

**g)** Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

## 3. Categories of Contribution

### 3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the title page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

**a) The Title Page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations must be indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, email address and ORCID ID.

**b) The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names separated by "and"; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Do not start a sentence with an Arabic numeral. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; we also recommend to present names of orders or families in the Title and/or when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

*Introduction* - Description of the background that led to the study.

*Material (or Subjects) and Methods* - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

*Results* - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only *P*-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

*Discussion* - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **Conflict of Interest**: Any possible conflict of interest must be disclosed here. If there is none, please state: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

f) **Authors Contributions**: The contributions of each author must be specified here; identify authors by their initials. The style of this section may be as follows:

<author initials> conceived and the study, <author initials> conducted the experiments (detail if necessary), <author initials> analyzed the data, <author initials> wrote the manuscript, <author initials> (other contributions if applicable), all authors read and approved the final version.

In case of doubts concerning contribution definitions, we suggest to consult the CRediT taxonomy at <https://casrai.org/credit>.

g) **The References Section**: Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>) or Thomson Reuters Web of Science.

*Sample journal article citation:*

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophtalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

*Sample book citation:*

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 p.

*Sample chapter-in-book citation:*

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

*Sample electronic article citation:*

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. *PLoS One* 4:e7713.

h) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

*Sample Internet resource citation:*

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009)

LEM Software, [http://dir.niehs.nih.gov/dir/bb/weinbergfiles/hybrid\\_design.htm](http://dir.niehs.nih.gov/dir/bb/weinbergfiles/hybrid_design.htm) (September 4, 2009)

i) **Tables: Formats for tables are Word or RTF in Windows platform. They** must be prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator) and must be numbered consecutively in Arabic numerals). A concise title should be provided above the table. Each column should have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

j) **Figures: Formats for figures are TIFF or JPEG. They** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require resolution yielding 300 dpi for grayscale and color figures. These resolutions refer to the output size of the file, that being the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted and will be reproduced free of charge in the electronic and printed versions. Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file.

k) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

l) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

m) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

n) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission. In any case, a letter (in English) indicating the approval by the respective Ethics Committee must be included in the submission. The letter should be preferentially Institutional and should confirm the protocol number of the approval.

o) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the main text, can be submitted as Supplementary Material, in a separated file, but together with the main paper. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

*Supplementary material:*

- *Table S1 – < short title >*
- *Figure S1 – < short title >*

### 3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited, include an Abstract no longer than five percent of the paper's length, but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion in a single section and without headers. Up to four items (tables and/or figures) may be submitted. The title page and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.n

### 3.3 Genome Insight

Genome Insight is for focused papers, usually of approximately 1500 words (up to four tables or figures), that publish new genome data as they become submitted to GenBank. This section is the premier forum to deliver that information directly to the genome community in a rapid and efficient publication of the genome. Data must be related to a complete (or nearly complete) and fully annotated genome for prokaryote or viruses, but a draft may be accepted for an eukaryote genome. While the focus of Genome Insight is necessarily involved in novel sequences, the manuscript must contain specifically novel biological, evolutive, biotechnological and/or metabolic insights revealed by data. The work may provide comparative analyses of previously published genomes that contain a substantial and novel insight of broadest biological and genetic significance.

Submitted manuscript must contain an abstract, which should be a brief report on the organism as well as its relevance and the main insight revealed by the genome. The text (approximately 1500 words- excluding abstract, references and acknowledgements) should not contain subdivisions, but must contain the rationale for the selection of such organism as well as organism information (including taxonomy, natural habitat, phylogenetic position, eventual pathogenicity, symbiotic, biotechnological use, etc), methodology (genome sequencing and assembly; reference number at GenBank), genome relevance (which should indicate the main insights revealed by the data analysis and main conclusions. Acknowledgements and References (up to 20 references) headings should be included. Figure Legends should be provided at the end of the manuscript.

Metagenome, transcriptome as well as epigenome data may also be considered for publication, but prior submission of the abstract to the Editor is necessary.

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see item 3.1.n. in our Instructions to Authors.

### 3.4 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

### 3.5 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area.

### 3.6 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

### 3.7 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

## 4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding author, who will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by e-mail to the Editorial Office.

**5. Availability of articles and deposition in databases**

Article copies are provided as PDF-files. Authors may deposit these in their personal or institutional homepage, as well as in public databases.

**6. Publication charge**

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

---