

ALINE FERNANDES ANGÉLLA

**ESTUDO POPULACIONAL DE *Anopheles darlingi* UTILIZANDO
ANÁLISE DE RAPD E SEQUENCIAMENTO DE GENES
MITOCONDRIAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

BOTUCATU - SP

- 2006 -

“Dá instrução ao sábio, e ele se fará mais sábio,
ensina o justo e ele crescerá em entendimento”.

Provérbios 9.9

DEDICATÓRIA

À Deus, essência da minha vida,
porque até aqui tem me ajudado

Aos meus pais de todo meu coração,
por todo amor, carinho,
amizade e estímulo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu paizinho querido, por andar comigo a cada momento, cuidar de mim, me sustentar e ser meu auxílio bem presente na dificuldade, por me capacitar para o desenvolvimento deste trabalho e pelas pessoas maravilhosas que tem colocado na minha vida durante esta caminhada. Enfim...por ser o meu TUDO!

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Ribolla, por acreditar na minha capacidade, pelos ensinamentos tão valiosos, por esta oportunidade de aprendizado, pela amizade e respeito demonstrados ao longo dos anos.

Ao Prof. Dr. Newton Madeira, pela amizade sincera, pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração e pelo privilégio de tê-lo como examinador na minha banca.

Ao amigo e também Prof. Dr. Wesley Godoy, pela amizade e apoio irrestritos, por todo exemplo de profissionalismo e competência. Não tenho palavras para expressar minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Alexandre Peixoto, meu tutor durante o IX Seminário Laveran & Deane em 2004, pelas instruções e contribuições que enriqueceram meu trabalho. Pelas orientações e o prazer de tê-lo como examinador na minha banca.

Ao Prof. Dr. Luis Hildebrando pela infra-estrutura fornecida durante minha estadia no CEPEM-Porto Velho e colaboração durante meu trabalho.

À amiga Helene Ueno, inicialmente minha monitora durante o IX Seminário Laveran & Deane em 2004, hoje uma amiga muito querida, agradeço pelo carinho, amizade, apoio, ensinamentos, estímulo, sugestões e auxílio durante a preparação da dissertação.

À minha amiga Karis, pelo carinho e amizade demonstrados ao longo desses anos, especialmente durante esses últimos meses. Pela **imensa** ajuda no meu trabalho e auxílio direto na elaboração da dissertação.

Aos meus queridos amigos Letis, Diego e Jaymex, pela amizade, carinho e por todo apoio que me deram em **todos** os momentos dentro e fora do laboratório. Amo vocês!

Aos amigos do lab, Alberto, Bianca, Élen, Fábio, Le Trick's, Soneca pela amizade, pelos momentos de aprendizado e de descontração e por proporcionarem um ambiente super agradável para trabalhar.

Aos amigos do departamento, pela amizade e momentos de descontração.

À secretária Nilza pela amizade, carinho e por sempre me estimular nos momentos difíceis.

Aos docentes do departamento por todo apoio durante o trabalho.

Aos funcionários do departamento por toda ajuda e colaboração.

Aos pesquisadores do CEPEM e IPEPATRO pela colaboração durante as coletas e todo apoio durante o trabalho, especialmente ao Luiz Herman, Tony e Rafa.

À FAPESP pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

À minha amiga Feiti, por sua amizade sincera e sempre ter uma palavra de estímulo, descontração e carinho. Pela sua disposição para me ouvir e para me ajudar no que for preciso, sem restrições.

Aos amigos distantes, pelo carinho e amizade.

À minha família, por todo apoio e incentivo durante esses anos.

Aos amigos Marli e Kike, por fazerem parte da minha vida, por todo apoio, amizade e carinho demonstrados.

Aos amigos Verônica e Pastor Reginei, pelo incentivo, ensinamentos, apoio e carinho desta família sempre presente na minha vida em todos os momentos.

À querida tia Nilza Coine, pelo carinho, conselhos, pelo exemplo de vida e estímulo em momentos decisivos na minha vida.

Ao meu querido irmão e futuramente colega de profissão, pelo amor, carinho, **paciência**, amizade e auxílio na informática.

Aos meus queridos pais, pelo exemplo de vida, conselhos, amizade, ensinamentos, amor e carinho irrestritos. Por sempre estarem ao meu lado, em toda e qualquer situação com palavras de incentivo e coragem.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iiiv
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO & ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Coleta dos mosquitos.....	36
3.2 Extração de DNA.....	38
3.3 Quantificação.....	40
3.4 Reações de RAPD.....	41
3.4.1 Eletroforese em gel de agarose.....	43
3.5 PCR dos genes mitocondriais.....	44
3.5.1. Purificação dos produtos de PCR.....	44
3.5.2 Reação de seqüenciamento.....	45
3.5.3 Seqüenciamento.....	46
3.5.4. Análises filogenéticas.....	47
4. RESULTADOS.....	48
4.1 Análise de RAPD.....	49
4.2 Sequenciamento dos genes mitocondriais.....	64
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa ilustrando as áreas de risco para malária.....	18
Figura 2. Distribuição mundial dos principais anofelinos vetores de malária.....	22
Figura 3. Mapa mostrando as localidades onde mosquitos foram coletados.....	37
Figura 4. Gel de agarose para visualização do DNA extraído.....	54
Figura 5. Gel de agarose com os produtos das reações de RAPD-PCR utilizando diversos oligonucleotídeos, B06, B18, W03, W10, W11 e X17.....	55
Figura 6. Gel de agarose com os produtos das reações de RAPD-PCR utilizando diversos oligonucleotídeos, B07, K11, K12, K09, W06, W12 e W14.....	56
Figura 7. Amplificações da RAPD-PCR para as espécies de <i>Anopheles darlingi</i> coletadas nos setores A e B do povoado de Portuchuelo (RO).....	57
Figura 8. Árvore fenética dos indivíduos dos setores A e B construída a partir da matriz de similaridade gerada pelos oligonucleotídeos utilizados.....	60
Figura 9. Árvore fenética das sub-populações de <i>Anopheles darlingi</i> coletadas em Portuchuelo.....	62
Figura 10. Diagrama de haplótipos das seqüências do gene COI de <i>Anopheles darlingi</i>	68
Figura 11. Diagrama de haplótipos das seqüências do gene ND4 de <i>Anopheles darlingi</i>	69
Figura 12. Arvore filogenética obtida a partir dos dados de seqüência do gene COI de <i>Anopheles darlingi</i>	70
Figura 13. Arvore filogenética obtida a partir dos dados de seqüência do gene ND4 de <i>Anopheles darlingi</i>	71
Figura 14. Árvore de Neighbor-Joining baseada na análise da distância genética	

das espécies.....	72
Figura 15. Foto aérea da região periférica de Porto Velho.....	75
Figura 16. Frequência dos diferentes haplótipos encontrados em ambas as capturas de <i>Anopheles darlingi</i>	76
Figura 17. Árvore mostrando a relação entre os haplótipos encontrados em <i>Anopheles darlingi</i>	77

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RAPD.	42
Tabela 2. Quantidade de mosquitos coletados em cada uma das coletas.....	52
Tabela 3. Quantidade de mosquitos coletados em Portuchuelo nos setores A e B intra e peri domiciliares.....	53
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados e número de produtos polimórficos gerados nas reações de RAPD-PCR.....	58
Tabela 5. Diversidade genética das populações dos setores A e B.....	59
Tabela 6. Distância genética entre as sub-populações.....	61
Tabela 7. Valores obtidos da diferenciação das sub-populações de <i>Anopheles darlingi</i> em Portuchuelo.....	63
Tabela 8. Diversidade genética das populações de <i>Anopheles darlingi</i>	73
Tabela 9. Diversidade genética das populações de <i>Anopheles darlingi</i>	74
Tabela 10. Haplótipos encontrados em ambas as coletas de <i>Anopheles darlingi</i> na região de Porto Velho.....	78

RESUMO & ABSTRACT

RESUMO

Dentre as doenças transmitidas pelos insetos a malária é a causa de 1,5 a 2,7 milhões de mortes por ano correspondendo a 4% da mortalidade mundial, sendo considerada uma das principais parasitoses do mundo. Esta parasitose é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que podem ser transmitidos aos hospedeiros vertebrados através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados. A distribuição geográfica dos anofelinos é ampla podendo ser encontrados em ambientes diversos, desde desertos às florestas tropicais. No Brasil, o principal vetor de malária é o *Anopheles darlingi*. Estratégias efetivas para controle deste vetor poderiam ser melhor elaboradas com o conhecimento da estrutura genética e do fluxo de genes entre as populações, permitindo um discernimento dentro da diversidade genética do vetor e de sua competência em transmitir o parasita. O uso de marcadores moleculares tem obtido importantes resultados no estudo dessas populações, demonstrando eficiência na discriminação e caracterização genética dos mosquitos. O presente estudo teve como objetivo utilizar técnicas de análise genômica para estudar a diversidade genética e caracterizar diferentes populações de *An. darlingi* coletados em quatro localidades de Porto Velho. Mosquitos coletados dentro e fora das casas em Portuchuelo, uma vila próxima a Porto Velho, foram analisados pela técnica de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction). Também foram coletados mosquitos de 4 localidades diferentes, Portuchuelo e mais 3 lugares próximos a Porto Velho, em períodos diferentes do ano (abril e outubro). Estes mosquitos foram analisados através do seqüenciamento de parte do gene ND4 (NADH dehydrogenase subunit 4). Os resultados da análise do RAPD-PCR mostraram isolamento parcial por distância de duas localidades diferentes de Portuchuelo. As diferenças observadas dos mosquitos coletados dentro e fora das casas não foram significantes. O sequenciamento do gene ND4 mostrou que não há uma clara correlação entre distância genética e geográfica, no entanto há diferenças em relação à sazonalidade, que é importante para epidemiologia e deve ser ressaltado.

Palavras-chave: *Anopheles darlingi*, malária, RAPD-PCR, mtDNA

ABSTRACT

Among the diseases transmitted by the insects malaria is the cause of 1,5 to 2,7 million of deaths per year corresponding to 4% of world mortality. This parasitic disease is caused by protozoa of the gender *Plasmodium*, that can be transmitted to the vertebrate hosts through the bite of mosquitoes of the gender *Anopheles*. The geographical distribution of the anophelines is spread worldwide and can be found in several niches, from deserts to rain forests. In Brazil, the main malaria vector is the *Anopheles darlingi*. Effective strategies for vector control could be better elaborated with the knowledge about genetic structure and gene flow among populations, allowing a discernment of the vector genetic diversity and of its competence in transmitting the parasite. The use of molecular markers has shown important results in the study of those populations, which demonstrates the efficiency in the discrimination and genetic characterization of these mosquitoes. The present study had as objective the use of genomic analysis techniques in the intention to study the genetic diversity and to characterize different populations of *An. darlingi* collected at four places of Porto Velho. Mosquitoes collected inside and outside houses from Potruchuelo, a riverine village near Porto Velho, were analyzed by RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction). We also collected mosquitoes at 4 different sites, Potruchuelo and 3 places near Porto Velho, at different times (April and October). These mosquitoes were analyzed by partial ND4 (NADH dehydrogenase subunit 4) sequencing. Results from RAP-PCR analysis showed partial isolation by distance at 2 different sites at Potruchuelo. The differences observed from mosquitoes collected inside and outside the houses are not significant. ND4 sequencing showed that there is no clear correlation among genetic and geographical distance, however there are differences in relation to seasonality, what is important for the epidemiology and should be underlined.

Key-words: *Anopheles darlingi*, malaria, RAPD-PCR, mtDNA

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Cerca de 70% das espécies de animais vivas conhecidas na biosfera são insetos, que assumem importância ecológica no processo de polinização, já que dois terços das plantas que dão flores dependem deles (Barnes, 1984). Muitos insetos e outros artrópodes possuem importância médica e veterinária por causarem condições patológicas ou transmitirem organismos patogênicos ao homem ou animais (Harwood & James, 1979). Alguns grupos de insetos, denominados hematófagos, são adaptados para se alimentarem de sangue. O principal problema advindo destes insetos é a sua capacidade de transmitir para o homem e outros vertebrados vários patógenos, dentre eles, vermes, protozoários e vírus.

A maioria dos mosquitos é hematófaga, entretanto, somente as fêmeas se alimentam de sangue e este é metabolizado provendo substratos para a síntese de proteínas destinada à formação de ovos. Parte do sangue ingerido pelas fêmeas pode ser também utilizada como fonte de energia. Machos e fêmeas, porém, se alimentam de néctar de flores, sucos de frutas e outras fontes alimentares ricas em carboidratos encontradas na natureza (O'Meara, 1987; James, 1994).

Dentre as doenças transmitidas por insetos inclui-se a malária que causa de 1,5 a 2,7 milhões de mortes por ano correspondendo a 4% da mortalidade mundial, sendo considerada uma das principais parasitoses do mundo (Guerrante & Blackwood, 1999). Aproximadamente um milhão de mortes é representado por crianças abaixo de cinco anos de idade. Atualmente, a malária no mundo existe em uma centena de países (Figura 1) e territórios sendo que, em 92 deles, a transmissão inclui a forma maligna representada pelo *Plasmodium falciparum* (Forattini, 2002). Existem pelo menos três tipos de malária no Brasil,

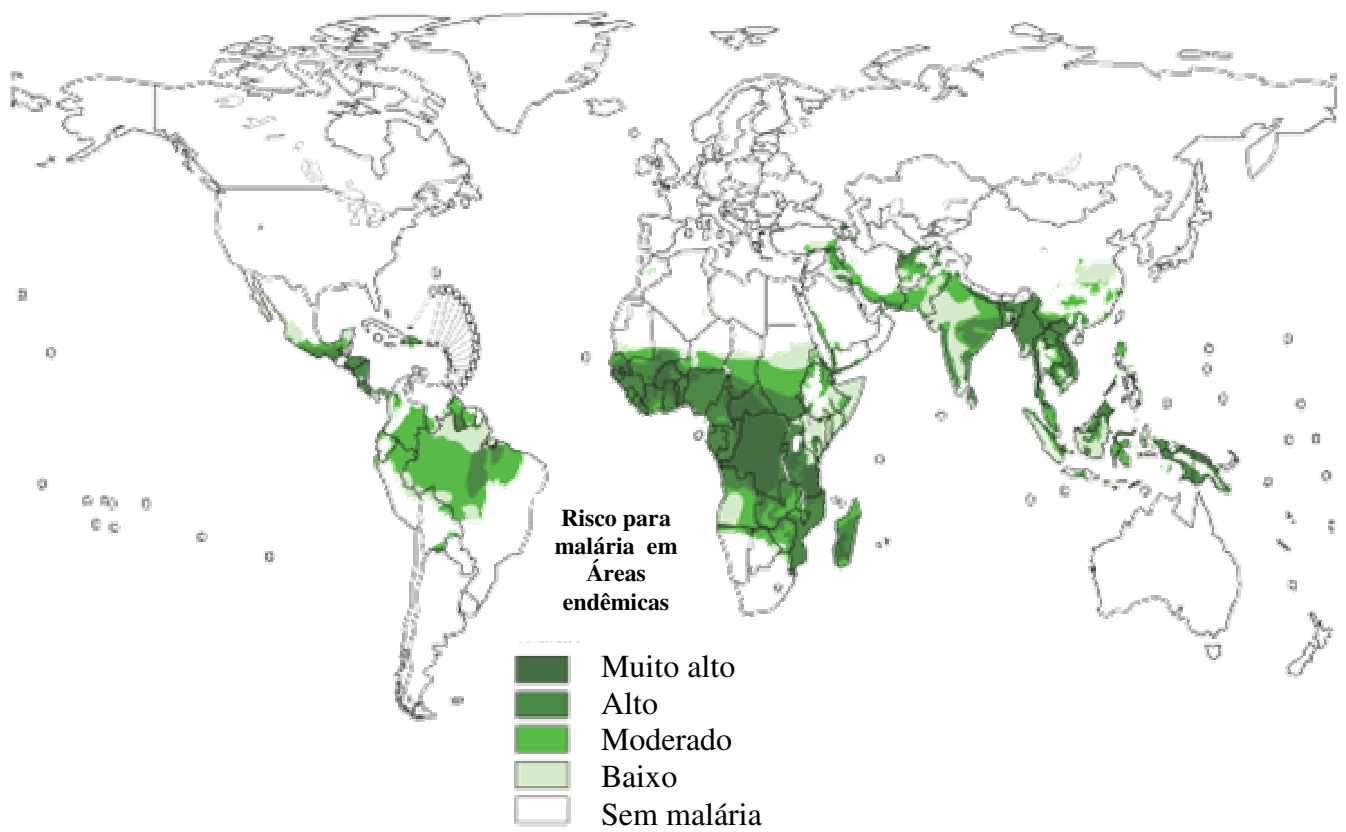
causados pelos diferentes tipos de plasmódios: a febre terçã (*Plasmodium vivax*), a febre quartã (*Plasmodium malariae*) e a febre terçã maligna (*Plasmodium falciparum*). Popularmente também é conhecida como febre intermitente, febre palustre, maleita, paludismo ou impaludismo, pernicioso, sezão, sezonismo, acréscimo, bateadeira, tremedeira e carneirada (Rey, 2001).

A África detém mais de 90% da incidência total e a maior parte dos óbitos. Além da África, o Brasil e a Índia são países onde há alta incidência de malária (WHO, 1997).

Nas Américas, a zona malarígena se divide em três regiões: uma ao norte do Planalto Mexicano, tendo como principais vetores os mosquitos *Anopheles quadrimaculatus* e *Anopheles pseudopunctipennis*; outra abrangendo toda a América Central e Antilhas até a costa norte da Colômbia e Venezuela, tendo como principal vetor *Anopheles albimanus* e por último grande parte do Continente Sul-Americano, tendo como principal transmissor o *Anopheles darlingi* (Rey, 2001).

Na África, a transmissão da malária ocorre principalmente pelo *Anopheles gambiae*, e também pode ser transmitida pelo *Anopheles funestus* sendo ambos eficientes vetores determinando assim a existência de extensas zonas hiperendêmicas. Existem vários países onde quase toda a população contrai malária, embora a doença se manifeste principalmente nos grupos etários mais jovens (Rey, 2001).

As áreas altamente endêmicas para malária na Índia incluem a região nordeste, florestas tribais, regiões montanhosas de vários estados incluindo Maharashtra e distritos não tribais. Aproximadamente um quarto dos casos relatados é do estado de Orissa, e 80% tem origem de 20% da população. Durante o período de 1995 a 1996 surtos e casos de morte por malária foram relatados de partes tribais do estado de Maharashtra.



Fonte: WHO 2005

Figura 1. Mapa ilustrando as áreas de risco para malária.

Por volta de 47% dos casos são causados pelo *Plasmodium falciparum* e aproximadamente 1000 mortes são relatadas anualmente. *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina e vetores de malária resistentes a inseticidas são predominantes em algumas áreas. Os principais vetores são: *An. dirus*, *An. minimus*, *An. philippinensis*, *An. culicifacies*, *An. stephensi*, e *An. annularis* (<http://rbm.who.int/wmr2005/profiles/india.pdf>).

Esta parasitose é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que podem ser transmitidos aos hospedeiros vertebrados através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados. Existem quatro tipos de plasmódio que podem causar malária no ser humano: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* sendo as duas primeiras as principais causadoras da doença no Brasil.

Nas Américas a malária é causada predominantemente por infecções com *Plasmodium vivax*, atingindo igualmente adultos e crianças. As formas graves e complicadas, causadas por infecções com *Plasmodium falciparum* são em geral pouco freqüentes. Na Nigéria, 96% dos casos são devido a *Plasmodium falciparum* e o restante, a *Plasmodium malariae*. Casos semelhantes ocorrem no resto do continente africano, embora infecções por *Plasmodium vivax* também sejam observadas na África Oriental (Rey 2001).

Das 500 espécies de anofelinos conhecidas, 70 são vetores de plasmódios e destes, cerca de 20 são importantes transmissores da malária ao homem (Service, 1996). Existem algumas condições muito importantes para que uma espécie de anofelino seja considerada um importante vetor de malária humana como: o grau de antropofilia, ou seja, a proporção de mosquitos que se alimentem preferencialmente de sangue humano; seu ciclo de vida deve ser compatível com o desenvolvimento do parasita em relação à sobrevivência e longevidade dos mosquitos; a freqüência de fêmeas que se alimentam, o

que pode permitir o contato com vários vertebrados ao longo de sua vida e o grau de domesticidade da espécie, também chamado de endofilia, que é o hábito de penetrar em habitações humanas. A capacidade vetorial de um mosquito está ligada a fatores ecológicos e comportamentais e a competência, a compatibilidade fisiológica vetor-parasito (Dye, 1986).

A distribuição geográfica dos anofelinos é ampla (Figura 2) podendo ser encontrados em ambientes diversos, desde desertos às florestas tropicais (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). A expansão da malária pode ser favorecida devido ao aumento populacional que vem ocorrendo nas regiões endêmicas, ao contínuo desmatamento e outras atividades exploratórias na região aumentando com isso a incidência de infecções parasitárias (Walsh et al., 1993; Taípe-Lagos da Costa, 1994).

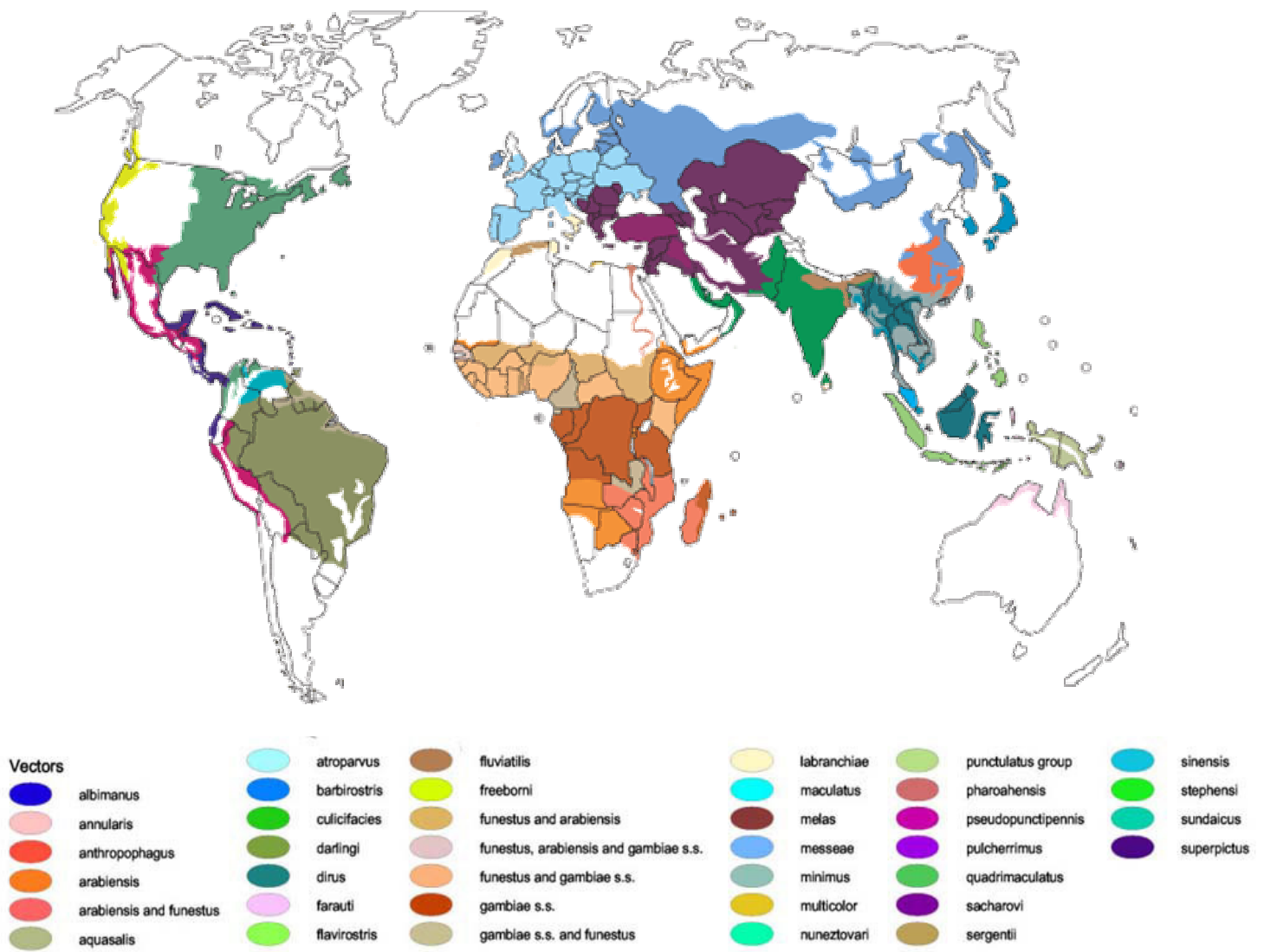
No Brasil, além do *Anopheles darlingi*, outras espécies estão relacionadas como transmissoras secundárias de plasmódios causadores da malária humana, entre elas, *Anopheles aquasalis* e *Anopheles albitarsis* (Forattini, 2002).

Anopheles aquasalis é o principal vetor de malária na região costeira do Brasil, devido a sua adaptação a ambientes de águas salobras e o fato de suas larvas suportarem alto teor de salinidade. Sua distribuição incluía a costa Atlântica, desde Peruíbe (Estado de São Paulo) até a Costa Rica. Embora sejam mais abundantes durante a estação chuvosa, estes anofelinos costumam estar presentes em grande quantidade o ano todo dentro e fora das habitações. Na região nordeste do Brasil são muito endofílicos, mas em outras regiões da costa brasileira predominam no exterior das casas, onde são mais zoofílicos, ou seja, picam mais frequentemente os animais (bovinos e eqüinos) que o homem. Um fator interessante

é que esta espécie tem um raio de vôo de 8 km considerado muito grande em relação ao de outros mosquitos estudados (Rey, 2001).

Anopheles albitarsis é encontrado principalmente onde há grandes coleções de água/criadouros permanentes, como na região amazônica, sendo mais abundante durante a estação chuvosa. É considerado exofílico e de hábito alimentar preferencialmente zoofílico, podendo eventualmente picar o homem (Rey, 2001; Klein et al., 1991). Devido a estes fatores, esta espécie é considerada um vetor secundário de malária no Brasil, uma vez que o número de *Plasmodium vivax* na forma de esporozoítos presente nas glândulas salivares destes é similar ao número encontrado em *An. darlingi*, alimentados sob as mesmas condições (Klein et al., 1991b). Isso indica que este mosquito pode ser um transmissor de malária quando se alimenta em humanos acometidos pela doença. O raio de vôo desta espécie é de 3 km.

Anopheles darlingi é o principal vetor de malária no Brasil. Além de seu papel na transmissão de *Plasmodium falciparum*, este mosquito também é vetor de outras espécies de *Plasmodium* (Klein et al., 1991a). Sua distribuição geográfica e densidade estão intimamente relacionadas com a malária e estes mosquitos são frequentemente encontrados infectados com o parasita causador da doença, não raras vezes por mais de uma espécie de *Plasmodium*. (Tadei et al., 1998). Sua distribuição é extensa, sendo encontrado desde as regiões orientais do México até o norte da Argentina. No Brasil, antes das campanhas de erradicação, só estavam livres de sua presença quatro estados: Rio Grande do Norte, Paraíba, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Atualmente, este mosquito encontra-se em grande número principalmente na região Amazônica.



Fonte: WHO 2005

Figura 2. Distribuição mundial dos principais anofelinos vetores de malária.

Os criadouros deste anofelino são caracteristicamente representados por coleções de águas límpidas, com certa profundidade, sombreadas, dotadas de vegetação flutuante ou emergente e pobres em sais e matéria orgânica (Rey, 2001; Forattini, 2002). Os mosquitos são capturados em maior abundância no interior das casas do que fora delas, mas recentemente, *An. darlingi* tem sido mais encontrado em alto número no peridomicílio. Além de sua grande endofilia, é notavelmente antropofílico, picando humanos de preferência a outros animais, pois na medida em que o ambiente natural se transforma em antrópico, ou desmatado, a população local de *An. darlingi* tenderá a coabitar com o homem, invadindo-lhe os domicílios traduzindo a capacidade de adaptação do mosquito ali presente e potencializando seu papel de vetor (Rozendaal, 1990). Esta espécie é muito suscetível à infecção pelos plasmódios, tendo sido observadas, em condições naturais, taxas de parasitismo superiores a 20% no intestino (índice de oocistos), e superiores a 5% nas glândulas salivares (índice de esporozoítos). O raio de vôo é menor em relação aos outros mosquitos estudados, cerca de 1,5 km (Rey, 2001).

Atualmente, dezenas de complexos de espécies crípticas de *Anopheles* são conhecidas e acumulam evidências que sugerem que os principais vetores de malária parecem ser membros de tais complexos (Collins & Paskewitz 1996). Complexos de espécies crípticas são grupos de espécies intimamente relacionadas que apresentam características morfológicas idênticas ou semelhantes, dificultando e em alguns casos impossibilitando sua correta identificação. Esses complexos são conhecidos em uma ampla variedade de insetos e outros artrópodos e é comum entre os insetos mais estudados e os de importância médica. Por exemplo, muitos anofelinos vetores de malária pertencem a complexos de espécies crípticas. Esses complexos incluem espécies vetoras e não vetoras e

duas ou mais espécies deste complexo são frequentemente encontradas vivendo em simpatria (Collins & Paskewitz 1996).

Existem ainda muitas dúvidas quanto à espécie *Anopheles darlingi* pertencer a um complexo de espécies crípticas, no entanto, vários estudos sugerem a existência de tal complexo baseando-se na ampla distribuição geográfica desta espécie e também em estudos que mostram diferenças morfológicas sutis, nas diferenças nos padrões de isoenzimas na análise de DNA mitocondrial (mtDNA) e no bandeamento de cromossomos politênicos, além de diferenças na bionomia entre as várias populações encontradas no Brasil, Suriname, Guiana Francesa, Colômbia e Venezuela (Kreutzer et al., 1972; Charlwood & Hayes 1978; Rosa-Freitas et al., 1992; Freitas-Sibajev et al., 1995; Charlwood, 1996). Contudo, alguns estudos mostram que estes resultados poderiam indicar apenas variações intraespecíficas (Rosa-Freitas et al., 1992), e que *An. darlingi* é uma espécie monotípica (Rosa-Freitas et al., 1998; Manguin et al., 1999).

A controvérsia dos dados indica que investigações mais detalhadas devem ser realizadas com o intuito de esclarecer se esta espécie pertence ou não a um complexo de espécies crípticas. A correta identificação de membros destes complexos pode ser dificultada por variações intraespecíficas, devido a polimorfismos ou estrutura da população, ou ainda devido à existência de espécies não conhecidas (Walton et al., 1999). Um outro fator que pode dificultar a diferenciação das espécies é a introgressão genética. White (1971) demonstrou através de hibridização cromossômica que híbridos interespecíficos de campo têm sido coletados com frequências como 0,1% a 0,2% entre *An. arabiensis* e *An. gambiae* s.s., membros do complexo *An. gambiae*. Este fator tem sido bem estudado ultimamente em *An. gambiae* (Donnelly et al., 2004; Zhong et al., 2006). Um outro

fato que tem sido utilizado para explicar um caso de introgressão genética entre espécies é o de que *An.gambiae s.s.* e *An. arabiensis* compartilham seqüências de mtDNA (Besansky et al., 1997).

Dentre os diferentes métodos amplamente utilizados na identificação de espécies crípticas podemos citar cinco: análise de morfologia externa, cruzamentos, análise de cromossomos politênicos, tipagem de isoenzimas e métodos baseados em DNA.

Um dos métodos mais fáceis e mais utilizados na identificação das espécies é a análise da morfologia externa de anofelinos no intuito de identificar caracteres espécie-específicos. No entanto, existem algumas desvantagens como o estágio de desenvolvimento e estado de conservação dos espécimes. Os cruzamentos também são métodos determinantes na identificação dos mosquitos vetores da malária onde a incompatibilidade de acasalamento é analisada. Apesar deste método ser de grande utilidade, é muito trabalhoso e demanda muito tempo para que seja utilizado na rotina de identificação de espécies. Além disso, nem todos os anofelinos estão adaptados à colonização em laboratório, como por exemplo, o *Anopheles darlingi* (Luiz Herman, comunicação pessoal). Frizzi (1947; 1953) foi o primeiro a aplicar a técnica de análise de cromossomos politênicos para identificar espécies crípticas de anofelinos. Apesar desta técnica ser amplamente utilizada ela apresenta algumas desvantagens, como: diferenças nos resultados, de acordo com o estágio de desenvolvimento, dificuldade de preservação dos espécimens, os padrões de bandas das espécies de anofelinos de difícil interpretação e também o tamanho amostral exigindo grandes amostras. A técnica bioquímica comumente utilizada é a tipagem de isoenzimas (Foley & Bryan, 1993) apresentando a vantagem de poder ser utilizada em todos os estádios de desenvolvimento e em ambos os sexos (Hill &

Cramptom, 1994). No entanto, esta técnica também apresenta algumas desvantagens, como: longo tempo de desenvolvimento da técnica, dificuldade de preservação dos espécimes, levando em consideração a conservação das propriedades das enzimas e o número de espécimes que deve ser analisado.

Devido à ineficácia das técnicas na correta identificação das espécies mostradas anteriormente, surgiu a necessidade de se pesquisar métodos alternativos. Estudos baseados no DNA frequentemente oferecem vantagens sobre outros métodos, possibilitando a identificação em todos os estádios de desenvolvimento do inseto e de ambos os sexos, uma vez que o DNA permanece constante, independente do estágio de desenvolvimento. Dentre as vantagens apresentadas por este método está a estabilidade da molécula, permitindo vários métodos de preservação dos mosquitos como: em isopropanol, sílica, frescos ou congelados. Além disso, métodos baseados em DNA geralmente apresentam resultados mais confiáveis e reprodutíveis.

Os espécimes de *An. darlingi* coletados no Brasil e outros países da América do Sul apresentam heterogeneidade, tanto genética através de análise por RFLP de mtDNA, indicando isolamento por distância e análise de seqüências da região ITS2 dos clusters de regiões ribossomais mostrando de 4 a 5% de divergência quando diferentes populações foram comparadas (Conn et al., 1999). Quanto ao hábito, *An. darlingi* tem apresentado diferenças no horário para a hematofagia (revisado em Rosa-Freitas et al., 1992; Luiz Herman, comunicação pessoal). Voorham (2002) mostrou que populações de mosquitos coletadas no Amapá apresentaram diferenças quanto ao horário para a hematofagia. Além disso, relatos obtidos em Rondônia, indicam essa plasticidade no hábito hematofágico e período em populações muito próximas. Esta heterogeneidade é de grande importância

epidemiológica, visto que a diferença existente pode refletir diferentes capacidades vetoriais nas populações de *An. darlingi*.

Um dos primeiros ensaios de variação genética envolvendo o uso de um marcador molecular mostrou que cerca de 30% dos locos de cinco populações de *Drosophila pseudoobscuras* eram polimórficos (Lewontin & Hubby, 1966). Os autores utilizaram a técnica de eletroforese de isoenzimas, demonstrada primeiramente por Harris (1966) e Hubby & Lewontin (1966), iniciando a era dos marcadores moleculares.

Os estudos populacionais realizados até o momento conseguem mostrar diferenças, mas os marcadores utilizados não são sensíveis o bastante para a discriminação de sub-populações. Marrelli et al. (2005) num estudo utilizando DNA ribossômico para diferenciar 16 espécies de anofelinos demonstraram claramente a separação destas espécies em dois subgêneros, no entanto, o índice de variabilidade intraespecífico para algumas espécies foi insuficiente para uma identificação molecular confiável.

Uma das ferramentas que está sendo pesquisada para suprir esta dificuldade em estudos populacionais é o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) podendo ser aplicada sem nenhuma informação molecular do genoma da espécie analisada. De acordo com esta técnica, regiões aleatórias do genoma são amplificadas com a utilização de oligonucleotídeos de 10 a 12 pares de base escolhidos arbitrariamente para serem usados em PCR, resultando na amplificação de vários fragmentos do DNA de tamanhos variados que podem ser fracionados e analisados após eletroforese em gel de agarose. O padrão eletroforético destes produtos amplificados é então utilizado como caráter diferencial das populações e sub-populações. Através desta técnica, pequenos *primers* anelam a temperaturas baixas em regiões arbitrárias do genoma durante a RAPD-PCR. A presença

de um produto significa que este indivíduo é homozigoto dominante ou heterozigoto para esta seqüência, enquanto que a ausência significa homozigose recessiva. Esta técnica tem sido empregada em estudos populacionais com anofelinos (Richard et al., 1995) e com o mosquito transmissor da dengue, *Aedes aegypti* (Williams et al., 1990; Paduan et al., 2006).

Estudos com seqüências de DNA podem ser feitos para análise de espécies dentro de um complexo. As seqüências utilizadas nesses estudos geralmente são repetitivas, pois além de evoluírem mais rápido (Hill & Crampton, 1994), são mais facilmente identificadas numa pequena quantidade de DNA.

Além desta ferramenta descrita acima, o seqüenciamento de genes para a busca de diferentes alelos pode ser utilizado na caracterização populacional de mosquitos. A heterogeneidade encontrada em *An. darlingi* pode ser explicada, em parte, através da estrutura da população e padrões de fluxo gênico (Conn et al., 1999).

A importância dos estudos realizados com genes do mtDNA vem aumentando de forma crescente, devido às suas propriedades exclusivas. O genoma mitocondrial na grande maioria dos casos é constituído por uma molécula circular, pequena, com conteúdo genético conservado (apenas 37 genes) e estrutura gênica simples (herança materna; ausência de recombinação; regiões intergênicas pequenas ou ausentes; ausência de íntros, de DNA repetitivo, de pseudogenes, de elementos transponíveis) (Moritz et al., 1987). Essa molécula apresenta uma alta taxa de evolução por mutação (Brown, 1985), cerca de 5 a 10 vezes mais rápida do que a taxa de mutação de um gene nuclear de cópia única (Moritz et al., 1987; Harrison, 1989).

Os erros de replicação e as altas concentrações de compostos de oxigênio, capazes de danificar o DNA, aliados a um sistema de reparo pouco eficiente quando comparado

com a maquinaria nuclear, parecem ser os responsáveis pelo acúmulo de mutações no DNAm (Wilson et al., 1985). Estas e outras características como a alta taxa de evolução, o fato de que o baixo número de cadeias polipeptídicas codificadas pelo genoma, nenhuma delas envolvida com sua replicação e transcrição (Moritz et al., 1987), fazem com que o mtDNA seja amplamente utilizado em estudos de caráter evolutivo e filogenético (Harrison, 1989).

O genoma mitocondrial nos animais possui geralmente 16 kb. Poucas inserções são encontradas entre os genes do genoma mitocondrial animal, no entanto, quando presentes, constituem regiões intergênicas não codificadoras (Brown, 1985).

A taxa de evolução do genoma do mtDNA em insetos é diferente do genoma nuclear (revisado de Simon et al., 1994). Essa diferença combinada com a herança materna do mtDNA e níveis extremamente baixos de recombinação, tem sido utilizada em análises de populações e de espécies em muitos organismos incluindo mosquitos anofelinos neotropicais (Conn et al., 1998) e africanos (Besansky et al., 1997).

O mtDNA pode ser extraído de forma relativamente fácil. Sendo assim, os genes do mtDNA possuem algumas características que o tornam marcadores moleculares importantes para estudos evolucionários, filogenéticos e de genética de populações, subespécies e espécies (Harrison, 1989; Simon et al., 1994). É importante considerar que o fato do mtDNA apresentar herança materna e não sofrer recombinação gênica permite utilizá-lo para a realização de análises filogenéticas de linhagens maternas (Avice, 1994).

Outra vantagem deste marcador é que devido ao mtDNA ser de herança materna, estudar a diferenciação dessa molécula equivale a estudar a população de fêmeas, juntamente com o fato do mtDNA ser haplóide, faz com que o tamanho efetivo da

população estudada seja quatro vezes menor do que quando se utiliza um marcador nuclear diplóide (Haavie et al., 2000).

Nos estudos sobre genomas mitocondriais, os genes codificadores de proteínas são analisados quanto ao tamanho e seqüência de nucleotídeos, seqüência de aminoácidos (inferida a partir de um código genético mitocondrial apropriado para o grupo) e uso de códons (de iniciação, de terminação e os codificadores para aminoácidos). As mudanças evolucionárias do mtDNA ocorrem principalmente através da substituição de nucleotídeos, embora deleções e inserções sejam conhecidas por ocorrer mais freqüentemente em regiões não-codificantes (Brown & Simpson, 1981).

Podem ser utilizados padrões de variação na freqüência de determinados haplótipos mitocondriais para se estimar a estrutura genética em populações de mosquitos (Walton et al., 2000). O seqüenciamento de haplótipos polimórficos desse tipo de DNA em *Aedes aegypti* mostrou-se uma ferramenta eficaz para a análise da variabilidade genética intra e interpopulacionais (Birungi & Munstermann, 2002; Paduan & Ribolla, 2006).

Padrões de variação na freqüência de haplótipos podem ser utilizados para estimar taxas de fluxo gênico entre populações. Por esta razão, o mtDNA tem sido amplamente utilizado em estudos sobre fluxo gênico e relações filogenéticas intra e interespecíficas das quatro espécies do complexo *An. quadrimaculatus* (Mitchell et al., 1992), entre populações de *An. aquasalis*, *An. rangeli*, *An. trinkae* e *An. nuneztovari* (Conn et al., 1993; Conn et al., 1998), e variações intra e interespecíficas de *An. gambiae* e *An. arabiensis*, vetores de malária africanos (Besansky et al., 1994; Caccone et al., 1996).

O mtDNA é herdado maternalmente e varia rapidamente entre as gerações, está presente num alto número de cópias e é altamente conservado entre os filos. Estas e outras

características o tornam um bom marcador molecular para ser utilizados em estudos populacionais. Com a técnica de sequenciamento, a partir dos dados das seqüências de mtDNA podemos obter taxas de relacionamento filogenético entre as populações (Yamauchi, 2004).

Dentre os genes mais utilizados, podemos citar os genes mitocondriais ND4 (subunidade 4 da NADH desidrogenase) e COI (subunidade I da citocromo c oxidase) (Conn et al., 1999; Beebe et al., 2000; Sallum et al., 2002).

O gene mitocondrial COI está envolvido no transporte de elétrons e na translocação de prótons através da membrana (Saraste, 1990). Este gene é um marcador mitocondrial freqüentemente utilizado em estudos evolutivos por ser a maior e a mais conservada das três subunidades codificantes (Clary & Wolstenholme, 1985; Beard et al., 1993). Sua seqüência protéica contém domínios funcionais altamente conservados e regiões variáveis (Saraste, 1990). Análises genéticas do mosquito *Aedes aegypti* têm sido conduzidas em particular com os locos ND4 (NADH desidrogenase subunidade 4) e ND5 (NADH desidrogenase subunidade 5), mostrando ser altamente polimórficos (Gorrochotegui-Escalante et al., 2000; 2002; Paduan & Ribolla, 2006).

Gorrochotegui-Escalante et al. (2000) determinaram taxas de fluxo gênico entre 10 populações de *Aedes aegypti* de sete localidades ao longo da costa nordeste do México através do uso de marcadores RAPD e da análise de um fragmento do gene mitocondrial ND4. Sete haplótipos foram detectados e as análises filogenéticas indicaram a presença de dois clados independentes bem suportados. Os marcadores RAPD indicaram que as populações estavam isoladas por distância, mas este isolamento por distância não foi detectado pelos genes do mtDNA .

Dada a importância da utilização de marcadores moleculares no estudo populacional de insetos, este trabalho emprega técnicas moleculares na caracterização populacional de *Anopheles darlingi* coletados em quatro localidades de uma região endêmica na região amazônica do Brasil com o intuito de investigar a dinâmica populacional destes mosquitos e auxiliar estudos epidemiológicos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Utilizar as técnicas moleculares RAPD-PCR e sequenciamento de genes mitocondriais para avaliar a estrutura populacional de *Anopheles darlingi* em Porto Velho.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar mosquitos coletados no intra-domicílio e no peri-domicílio.
- Comparar mosquitos coletados em diferentes horários.
- Avaliar as modificações sazonais nas populações de *Anopheles darlingi*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos mosquitos

Durante o desenvolvimento do projeto foram utilizados mosquitos provenientes de quatro coletas, sendo que uma delas foi realizada no ano de 2001. Esta coleta foi realizada na localidade de Portuchuelo em Porto Velho-RO durante um período de 12 horas (das 18:00 às 06:00) e os mosquitos foram separados de acordo com a hora em que foram coletados (cada amostra equivalia a mosquitos coletados em 1 hora, sendo P1: 18 - 19h, P2: 19 - 20h,..., P12: 5 - 6h). Foram 4 os diferentes pontos de coleta, de duas regiões distintas da localidade (denominadas setor A e setor B) que estão isoladas uma da outra por um afluente do rio Madeira. Nestas duas localidades, foram coletados mosquitos dentro das casas (intradomiciliar) e fora delas (peridomiciliar). Os mosquitos fêmeas identificados como *Anopheles darlingi* foram armazenados à -20°C até o momento do uso.

As outras três coletas foram realizadas em período crepuscular (das 18:00 às 22:00) em abril de 2004, abril e outubro de 2005 e os mosquitos foram separados de acordo com o local em que foram coletados. Os mosquitos fêmeas foram coletados nas seguintes localidades de Porto Velho - RO: Portuchuelo (S 08° 37' 45,6'' W 63° 49' 29,2''), Bate-Estaca (S 08° 48' 16,3'' W 63° 56' 26,4''), Santo Antônio (S 08° 48' 34,3'' W 63° 56' 34,3'') e Vila Candelária (S 08° 47' 17,8'' W 63° 55' 00,5'') foram identificados como *An. darlingi* através da análise em chave de identificação para espécies do subgênero *Nyssorhynchus* das Américas (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994) e imediatamente imersos em isopropanol para preservação e posterior extração do DNA. A coleta foi realizada em colaboração com pesquisadores do IPEPATRO (Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia) e CEPEM (Centro de Pesquisas em Medicina Tropical).

Os quatro pontos de coleta mencionados anteriormente estão relativamente isolados um do outro sendo que Portuchuelo e Santo Antônio são os locais mais distantes do centro de Porto Velho cerca de 30 Km e Bate-Estaca e Vila Candelária são as localidades que estão mais próximas uma da outra (Figura 3).

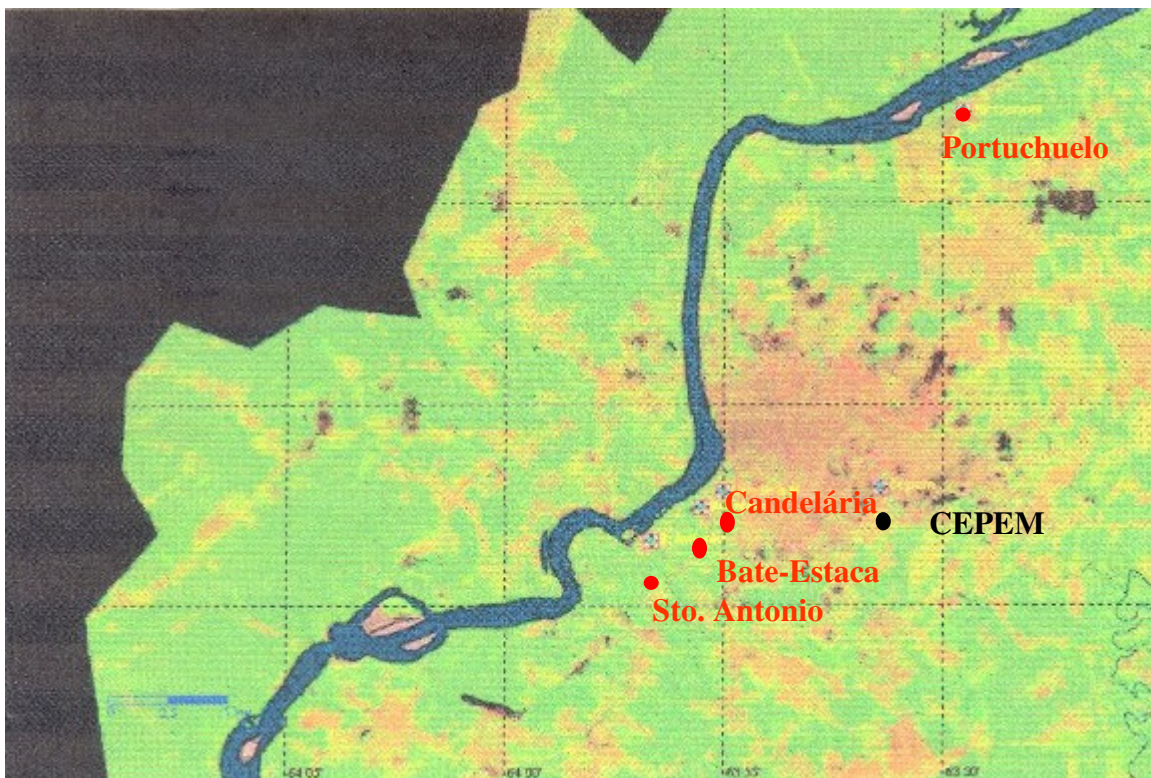


Figura 3. Mapa mostrando as localidades onde mosquitos foram coletados. Mapa físico de parte do estado de Rondônia onde estão destacadas as localidades onde foram realizadas as coletas. Os setores A e B da localidade de Portuchuelo não são visíveis neste mapa.

3.2 Extração do DNA

Os mosquitos tiveram seu DNA extraído por três métodos: 1) o método de Bender et al., (1983), com modificações; 2) o de Extração de DNA de tecido animal (Protocolo GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA isolation Kit), Amersham Biosciences segundo recomendações do fabricante com algumas modificações; 3) e o método utilizando a resina Chelex® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories).

Para o protocolo de Bender et al. (1983), utilizou-se como tampão de extração Tris-HCl 1mM pH 9.2 adicionado de NaCl 1mM, sacarose 2mM, EDTA 0,5mM e SDS (sódio dodecil sulfato) 0,5% m/v. Seguindo o procedimento de extração, cada mosquito foi lavado com éter e depois de seco, colocado em um microtubo de 1,5 ml. A seguir cada um deles foi homogeneizado com 200µl do tampão de extração adicionado de 2% v/v de DEPC (dietil pirocarbonato) e incubado a 65°C por 30 minutos. Após essa incubação foram adicionados 25µl de acetato de potássio 8M e a segunda incubação em gelo por 30 minutos foi realizada, com posterior centrifugação a 12000g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi então separado em um novo microtubo e o DNA precipitado por adição de 400µl de etanol absoluto gelado. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por cinco minutos, e depois de uma nova centrifugação a 12000g a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado adicionado de 400µl de etanol 70% gelado. Após a terceira centrifugação a 7500g a 4°C por 5 minutos o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol absoluto gelado. Cada amostra foi seca à temperatura ambiente e o DNA foi ressuspensão em TE (Tris-HCl 10mM pH 7.4, EDTA 1mM) estéril. O produto de cada extração foi estocado a -20°C até o momento do uso.

No método de Extração de DNA de tecido animal (Protocolo GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA isolation Kit) os mosquitos foram colocados individualmente em tubos de 1,5ml contendo solução de lise previamente colocada em gelo até que a solução tenha ficado turva. Em seguida os mosquitos foram homogeneizados com um pistilo e colocados novamente no gelo até o próximo passo. Para garantir a lise do tecido os tubos foram incubados a 65°C por 30 min. Em seguida foi feito o tratamento com 3 ul de Proteínas K (20mg/ml) ao lisado e os tubos foram então incubados a 55°C por 16 horas. Depois deste tratamento com Proteinase K, foi realizado o tratamento com RNase A ao lisado, invertendo os tubos 25 vezes e incubando-os a 37°C por 30 min. Antes da precipitação, os tubos foram esfriados a temperatura ambiente. A precipitação foi feita adicionando-se 200ul de solução de precipitação de proteínas ao lisado tratado com RNase A, em seguida homogeneizados em vortex em alta velocidade por 20s para homogeneizar a solução de precipitação ao lisado celular. Depois disso foi feita uma centrifugação a 13000-16000g por 3 min até o precipitado de proteínas formar um pellet compacto. O sobrenadante contendo o DNA foi colocado cuidadosamente em um novo tubo contendo 600ul de isopropanol 100% e o tubo contendo o pellet foi descartado. Novamente os tubos foram centrifugados a 13000-16000g por 1 min até o DNA ser visível como um pequeno pellet branco. O sobrenadante foi descartado e os tubos invertidos em papel absorvente. Para a lavagem do DNA foram adicionados 600ul de etanol 70% e em seguida centrifugados a 13000-16000g por 1 min. O etanol foi descartado cuidadosamente sem deslocar o pellet de DNA e os tubos invertidos em papel absorvente e secos em speed-vac por 10-15 min. A hidratação foi feita com a adição de 50ul de solução de hidratação de DNA ao pellet de DNA e em seguida os tubos foram aquecidos a 65°C por 1h e finalmente estocados a -20°C.

O último método utilizado foi a extração de DNA com a utilização da enzima Chelex[®] Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories). Os mosquitos foram colocados individualmente em tubos de 1,5 ml contendo 300ul de Chelex[®] a 5% (diluída com água ultra pura) e em seguida homogeneizados com pistilo e posteriormente em vortex por 15 min. Depois de homogeneizados os tubos foram centrifugados a 13.000g por 20 segundos colocados por 30 min em banho seco a 80°C. Após centrifugação por 20 min, o sobrenadante foi retirado, colocado em novo tubo e armazenado a -20°C até o uso. Neste método não foi possível fazer quantificação do DNA, pois por este método ele fica muito diluído e não visível em gel de agarose.

3.3 Quantificação

A quantificação foi realizada por eletroforese do DNA extraído em gel de agarose usando uma mini cuba horizontal Hoeker HE 33 Amersham Pharmacia Biotech segundo Sambrook et al., (1989). Para cada amostra a ser quantificada foram adicionados 8µl do DNA genômico do mosquito a 2µl de tampão de amostra (4g de sacarose; 0,01g de azul de bromofenol e 10ml de TE para um volume final de 10ml). As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% (GIBCO BRL[®]) e submetidas à eletroforese a 100V por 1h. A seguir, os géis foram corados com solução de TAE 1x (Tris-HCl 4mM pH 8.0 contendo, ácido acético 2mM e EDTA 5mM), contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. As bandas foram visualizadas em um transluminador UV e fotografadas com uma câmera digital *Nikon Coolpix 750* (Figura 4).

As soluções de trabalho foram preparadas com concentrações de 10ng/µl do DNA genômico em TE estéril, sendo estocadas a -20°C até o momento do uso.

3.4. Reações de RAPD

Inicialmente, as reações de RAPD foram realizadas com o Kit Ready-To Go™ RAPD Analysis Beads (Amersham Pharmacia Biotech), utilizando 25pmol dos oligonucleotídeos da Operon Technologies A02 e B13, descritos por Black (1992) e 7,5 pmol dos oligonucleotídeos K09, K11, W10, W14, (Tabela 1) previamente selecionados juntamente com 70 a 220 ng/μl de DNA genômico de cada mosquito. Para estas reações foi utilizado o termociclador TGradient (Whatman Biometra®) nas seguintes condições: 4 min para desnaturação a 94°C seguido de 45 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 36°C, 2min e a 72°C; e uma extensão final de 5min a 72°C.

Os fragmentos de RAPD foram analisados como presença (1) ou ausência (0) de bandas homólogas, e uma matriz binária foi construída. Os marcadores RAPD foram analisados como marcadores genéticos de acordo com as seguintes premissas: 1) os marcadores RAPD segregam num modelo Mendeliano; 2) a frequência genotípica do RAPD está em equilíbrio de Hard-Weinberg (Gorrochotegui-Escalante et al., 2000).

Os programas RAPDDIST e RAPDPLOT (Black, 1996) foram utilizados para computar as distâncias par a par entre amostras e populações. Os dados foram analisados utilizando todas as medidas de distância genética disponíveis no RAPDDIST com o método de fator de correção para amostras pequenas de acordo com Lynch and Milligan (1994). Os valores de F_{st} foram compilados na matriz de distância. A similaridade genética foi calculada pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic averages) com valores de bootstrap baseados em 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RAPD.

<i>Oligonucleotídeos</i>	Seqüência dos Oligonucleotídeos (5' - 3')
A02	TGCCGAGCT G
B3	TTCCCCCGCT
B6	TGCTCTGCCC
B7	GGTGACGCAG
B10	CTGCTGGGAC
B13	TTCCCCCGCT
B18	CCACAGCAGT
K09	CCCTACCGAC
K11	AATGCCCCAG
P14	CCAGCCGAAC
P15	GGAAGCCAAC
W10	TCGCATCCCT
W14	CTGCTGAGCA

Outra análise foi realizada utilizando-se o mesmo kit e as mesmas condições do termociclador, no entanto, o DNA dos mosquitos coletados dentro e fora das casas em ambos os setores (A e B) foi juntado em *pools* Peri A (PA), Intra A (IA), Peri B (PB) e Intra B (IB) utilizando-se os oligonucleotídeos K09, K11, W10, W14, A02 E B13, previamente selecionados apresentados na tabela 1.

3.4.1. Eletroforese em gel de agarose

Utilizando um método padrão (Sambrook et al. 1989), os produtos amplificados pela reação de RAPD foram analisados por eletroforese em gel de agarose, usando uma mini cuba horizontal Hoeker HE 33 (Amersham Pharmacia Biotech) com 30ml de gel de agarose 1%, a 60V por 1h em TAE 1X (Tris-HCl 0,4M, pH 8,0, contendo ácido acético 0,20M e de EDTA 0,5M) e também uma cuba horizontal Hoeker HE 99X (Amersham Pharmacia Biotech), com 150 ml de gel de agarose 1,5%, a 90V por 2h em tampão TAE 1X, utilizando 12 μ l do produto amplificado de cada amostra e 2 μ l de tampão de amostra (4g de sacarose; 0,01g de azul de bromofenol e 10ml de TE para um volume final de 10ml). Foram utilizados 5 μ l do DNA *Ladder* de 123pb (Invitrogen-Life Technologies) como padrão para a comparação do peso molecular dos fragmentos amplificados. Os géis foram corados em solução de TAE 1X contendo 0,5 μ g/ml brometo de etídio por 30 min e visualizados em um transluminador UV. Os produtos foram fotografados com uma câmera digital *Nikon coolpix 750*.

3.5. PCR dos genes mitocondriais

A reação de amplificação foi montada a partir do DNA extraído de cada mosquito, segundo protocolo de Gorrochotegui-Escalante (2000), com modificações. As reações de amplificação foram montadas com volume final de 25µl utilizando-se 1µl de DNA da amostra, Tris-HCl 10mM pH 8.0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 100µM (PCR nucleotide mix Invitrogen Life Technologies), 20µM dos oligonucleotídeos específicos de regiões do gene COI / ND4 denominadas, COIF (5'-GGATTATTAGGATTTATTGT-3') e COIR (5'-GCAAATAATGAAATTGTTCT-3'), ND4F (5'-TGATTGCCTAAGGCTCATGT-3') e ND4R (5'-TTCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT-3') (Invitrogen Life Technologies) e 1,0U de Taq DNA polimerase (Biotools DNA polimerase). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Whatman Biometra[®] (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 3 ciclos de 94°C por 2 min, 37°C por 2 min, 72°C por 1 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 1 min, com um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min. Após a amplificação os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al., (1989) como descrito anteriormente. A visualização das bandas foi feita em transluminador de luz UV e as mesmas foram fotografadas com câmera digital *Nikon Coolpix 750*.

3.5.1. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al., (1989) como descrito anteriormente. O volume do produto amplificado pela reação de PCR (+/- 40µl) foi adicionado a 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO BRL[®]) em solução de TAE 1x contendo brometo de etídio a

0,5µg/ml. Após a corrida a 100V por 1h as bandas foram visualizadas em um transluminador UV, cortadas com auxílio de espátula, transferidas para tubos de 1,5ml e pesadas. As bandas específicas geradas pela reação de PCR foram purificadas com o Kit Concert™ Gel Extraction Systems (GIBCO BRL®). A seguir, foram adicionados 30µl do Tampão de Solubilização (L1) para cada 10mg de gel. Prosseguiu-se com incubação a 50°C por 15 min e homogeneização por 3 min em vortex. Após este período, as soluções foram transferidas para colunas fixadas em tubos de 2ml e estes centrifugados a 12.000g por 1min. Após a centrifugação o volume contido no tubo foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo. Seguindo o protocolo, uma nova lavagem foi feita com 500µl do Tampão de Solubilização (L1), incubando a T.A. por 1min. A seguir, o material foi centrifugado a 12.000g por 1min e a solução descartada novamente. A coluna foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 700µl do Tampão de Lavagem (L2), incubando-se por 5 min. Após este período, foi feita uma nova centrifugação a 12.000g por 1min. O tubo contendo a solução foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo. Para a eluição foram adicionados 50µl de Tampão TE (aquecido a 65°C) à coluna, do DNA. Cada coluna foi incubada por 1 min a T.A. e submetida a uma última centrifugação de 12.000g por 2 min. O DNA eluído foi armazenado a -20°C até o momento da utilização.

3.5.2. Reação de seqüenciamento

As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) utilizando-se 4µl de Save Money 2,5x (400mM Tris-HCl pH9,0, 10mM MgCl₂), 4µl BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 pmol dos oligonucleotídeos CO1 e CO1 e ND4

forward e ND4 *reverse*, e 1µl do DNA genômico. As reações de seqüenciamento foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 3 ciclos de 2 min a 94°C, 2 min a 37°C, 1 min a 72°C seguidos de 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 50°C, 1 min a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C., como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o *primer forward* e outra para o *reverse*.

A cada reação de seqüenciamento foram adicionados 80µl de isopropanol 65%, incubando-se a temperatura ambiente (T.A.) por 20 min no escuro. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 30 min na velocidade de 2000g a T.A.. O isopropanol foi removido invertendo-se os tubos e, a seguir, adicionou-se 200µl de etanol 60% e centrifugou-se a velocidade máxima por 5 min a 2000g a T.A.. Todo o etanol foi removido com o auxílio de uma micropipeta, para que nenhum resíduo resultasse em manchas fluorescentes. As amostras foram secas a T.A. e o DNA foi eluído em 2µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25mM EDTA pH 8,0 contendo 50mg/ml Blue Dextran) (5:1). Antes da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems, USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 min e rapidamente transferidas para o gelo.

3.5.3. Seqüenciamento

Após a amplificação dos fragmentos pela técnica de PCR, foi realizado o seqüenciamento em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems).

3.5.4. Análises filogenéticas

As seqüências do gene ND4 foram obtidas a partir dos produtos de PCR e analisadas utilizando-se o software MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) para a construção das seqüências consenso em cada amostra de DNA utilizado. Estas seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W (Thompson et al., 1994) e as seqüências mal alinhadas foram ajustadas manualmente. Análises filogenéticas e moleculares foram conduzidas utilizando-se o programa MEGA “Molecular Evolutionary Genetics” v 2.1 (Kumar et al., 2001). Métodos de distância (Neighbor Joining - NJ) e parcimônia foram utilizados na construção das árvores filogenéticas (Saitou e Nei, 1987). Para a análise filogenética de NJ foi utilizada a distância gamma (Kimura 2 - parâmetros) com o parâmetro gamma ($\alpha=1$). Na análise de parcimônia foi realizada uma busca heurística para encontrar todas as árvores mais parcimoniosas. O teste de bootstrap com 1000 réplicas foi aplicado para estimar o índice de consistência da árvore de NJ (Felsenstein, 1985). As seqüências de nucleotídeos e as freqüências de cada haplótipo, foram também estimadas utilizando-se o programa DnaSP versão 3.5 (Rozas e Rozas, 1999). Foram estimados os sítios sinônimos e não sinônimos, o número de sítios polimorficos, o número médio de diferenças nucleotídicas (κ) e a diversidade de haplótipos (Hd).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise de RAPD

Os mosquitos utilizados no estudo da técnica de RAPD foram coletados no ano de 2001 na população ribeirinha de Potuchuelo (Figura 3). A coleta consistiu de captura com isca humana em duas localidades da comunidade de Portuchuelo (Setor A e Setor B) durante a noite inteira (das 18:00 às 06:00) com capturadores posicionados dentro e fora das casas. Os mosquitos coletados foram classificados segundo Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994) e os mosquitos identificados como *Anopheles darlingi* utilizados neste estudo. A quantidade de *Anopheles darlingi* coletados nas duas localidades esta mostrada na tabela 2 e a quantidade de mosquitos coletados no peri e intra domicílio estão mostrados na tabela 3.

A qualidade do DNA para ser utilizado no método de RAPD é de extrema importância uma vez que a amplificação não é específica a um locus gênico. Por esse motivo, testamos alguns métodos diferentes visando a melhor adequação ao RAPD. O primeiro método testado foi o método de extração segundo Bender et al. (1983) com algumas modificações, no entanto, os resultados não foram satisfatórios, pois a quantidade e qualidade de DNA extraído não foi suficiente para análises posteriores (Figura 4A). Em seguida, foi utilizado o kit de extração de DNA de tecido animal (Protocolo GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA isolation Kit), Amersham Biosciences para cada indivíduo de acordo com as instruções do fabricante. Ao contrário do primeiro, este método mostrou resultado muito satisfatório quanto à qualidade e quantidade de DNA (Figura 4B).

DNA de mosquitos coletados no setor A e no setor B de Portuchuelo foram submetidos à reação de RAPD como descrito em Material e Métodos. Após a reação os produtos foram analisados em gel de agarose e foi possível observar a ocorrência de produtos polimórficos entre 250 a 1500pb. Para a obtenção de um número maior de produtos polimórficos, 13 oligonucleotídeos foram testados em reações de RAPD com amostras de *Anopheles darlingi* coletadas nos setores A e B. Os resultados (Figuras 5 e 6) mostram que dentre os 13 oligonucleotídeos testados, 4 deles (K09, K11, W10 e W14)

apresentaram produtos polimórficos consistentes e foram utilizados nas análises posteriores, junto com os oligonucleotídeos A02 e B13 descritos anteriormente por Black et al. (1992).

Apenas um dos géis contendo os resultados das reações de RAPD feitas com o Kit Ready -To- Go™ RAPD Analysis Beads (Amersham Pharmacia Biotech) está apresentado na Figura 7 revelando a presença de produtos bem definidos. O número desses produtos polimórficos gerados por cada oligonucleotídeo está representado na Tabela 4.

A diversidade gênica de cada população foi analisada pela comparação do padrão de bandas produzido pelos seis oligonucleotídeos citados em 35 indivíduos. Produtos de PCR de mesmo tamanho referentes ao mesmo oligonucleotídeo são considerados pertencentes ao mesmo locus gênico. Ausência de produto é considerada como caractere recessivo. A presença de produto é considerado heterozigoto ou homozigoto dominante. A tabela 5 mostra os índices de heterogeneidade das populações divididas geograficamente (setor A e B) e divididas por local de captura (peri e intradomicílio).

A distância gênica entre as populações foi calculada comparando-se o perfil do RAPD produzido pelos indivíduos. Através desta comparação foi possível a obtenção de uma matriz de similaridade e os dados desta matriz foram utilizados para a construção de uma árvore de similaridade das populações (Figura 8).

As populações estudadas de Portuchuelo (setor A e B) foram sub-divididas em mosquitos coletados dentro das casas (Intra) e fora delas (Peri). A análise da diversidade gênica está mostrada na tabela 5. Podemos observar uma diversidade semelhante entre as sub-populações, mas é possível detectar uma certa diferença entre os mosquitos coletados no setor A ($H=0,3995$) com os mosquitos coletados no setor B ($H=0,4274$).

A distância genética foi calculada segundo Nei (distância genética corrigida, Nei, 1987) tomando-se como pares as populações do setor A e setor B (0,0641). A distância entre os pares de sub-populações está mostrada na tabela 6.

Com base nos dados de distância genética entre as sub-populações (Tabela 6) foi possível construir uma árvore fenética (figura 9). A análise da árvore resultante mostra que as sub-populações estão agrupadas segundo seu local de captura (setor A e B) e não quanto ao hábito (intra ou peri domiciliar).

À medida que uma população se isola geneticamente, sua taxa de heterozigosidade decai. Com isso a comparação das taxas de heterozigosidade entre as sub-populações e a taxa total é uma forma de medir a diferenciação da sub-população (Wright, 1978). Este valor é expresso numericamente com valores de 0 a 1, sendo que valores entre 0 e 0,05 indicam pequena diferenciação, entre 0,05 e 0,15 diferenciação moderada e maiores de 0,15 indicam alta diferenciação. A tabela 7 mostra os valores obtidos nas sub-populações de *Anopheles darlingi* em Portuchuelo.

Tabela 2. Quantidade de mosquitos coletados em cada uma das coletas.

Localidade	1ª coleta (abril 2004)	2ª coleta (abril 2005)	3ª coleta (outubro 2005)
Portuchuelo	26	30	26
Candelária	10	31	32
Bate-Estaca	26	31	32
Santo Antônio	7	34	30
Total	69	126	120

Os Mosquitos foram coletados no período crepuscular, das 18 às 22 horas em cada uma das localidades citadas na tabela. O método de coleta utilizado foi o de isca humana e após a coleta os mosquitos foram colocados em isopropanol para preservação do DNA.

Tabela 3. Quantidade de mosquitos coletados em Portuchuelo nos setores A e B intra e peri domiciliares.

Ambiente	Setor A	Setor B	Total
Peri	23	54	77
Intra	21	49	70
Total	44	103	147

Na localidade de Portuchuelo, os mosquitos foram coletados dentro e fora das casas em ambos os setores A e B, como mostrado acima, apresentando uma maior densidade de mosquitos no peridomicílio em ambos os setores.

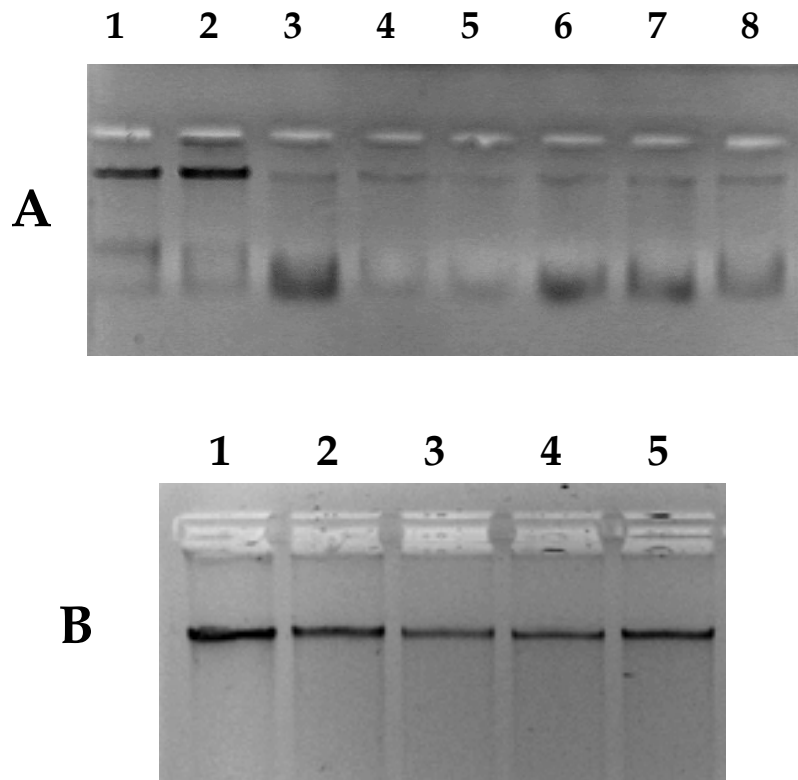


Figura 4. Gel de agarose para visualização do DNA extraído.

A. Método de Bender et al., 1983. As duas primeiras amostras são DNA de *Aedes aegypti*, extraído por esse método, utilizado aqui como controle e as seguintes canaletas são DNA de *Anopheles darlingi*, mostrando a baixa eficiência do método para este mosquito.

B. Método de extração com DNA isolation kit. A primeira amostra é DNA de *Aedes aegypti* usado como controle e as seguintes canaletas, DNA de *Anopheles darlingi* mostrando a eficácia deste método.

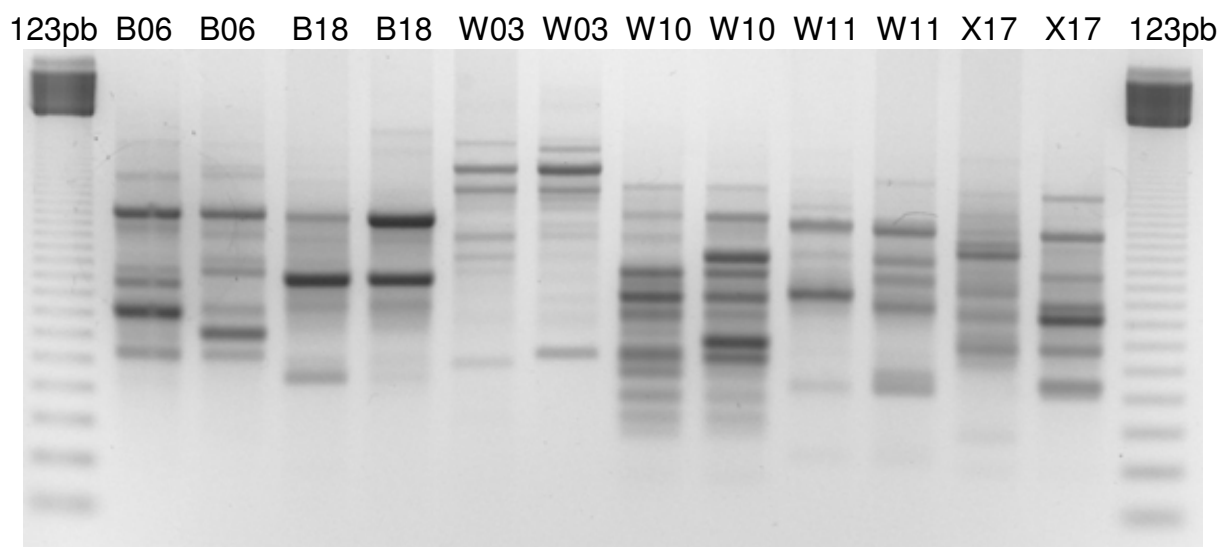


Figura 5. Gel de agarose com os produtos das reações de RAPD-PCR utilizando diversos oligonucleotídeos, B06, B18, W03, W10, W11 e X17. As colunas 1 e 14 correspondem ao marcador de peso molecular DNA ladder 123 pb e as demais colunas correspondem aos produtos gerados com cada oligonucleotídeo escrito em cima a partir do DNA de mosquitos do setor A e B respectivamente escolhidos aleatoriamente.

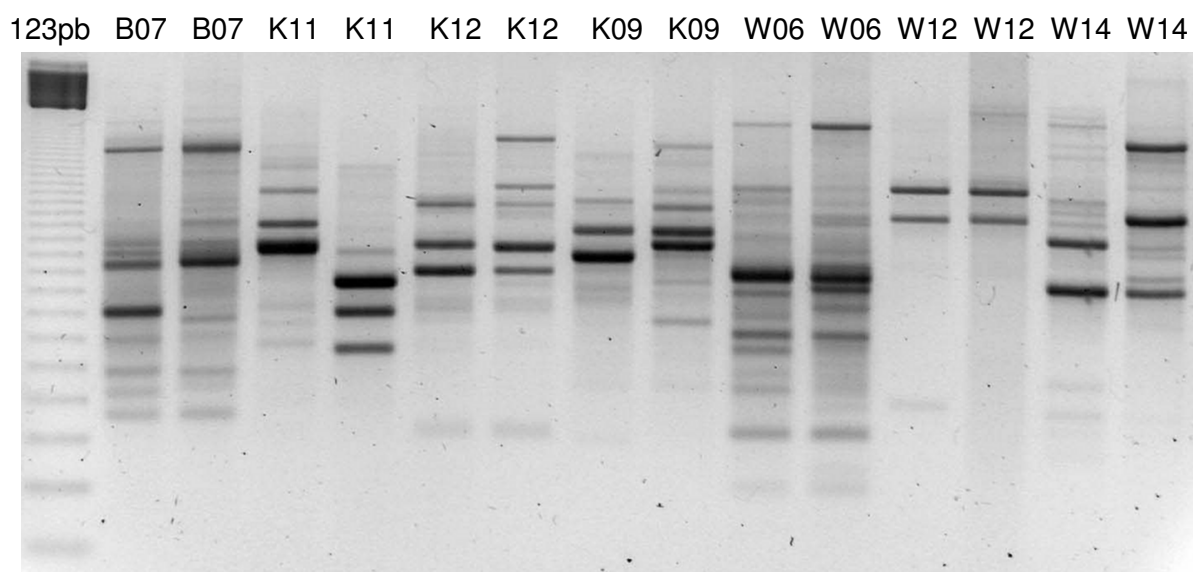


Figura 6. Gel de agarose com os produtos das reações de RAPD-PCR utilizando diversos oligonucleotídeos, B07, K11, K12, K09, W06, W12 e W14. As colunas 1 e 14 correspondem ao marcador de peso molecular DNA ladder 123 pb e as demais colunas correspondem aos produtos gerados com cada oligonucleotídeo escrito em cima a partir do DNA de mosquitos do setor A e B respectivamente escolhidos aleatoriamente.

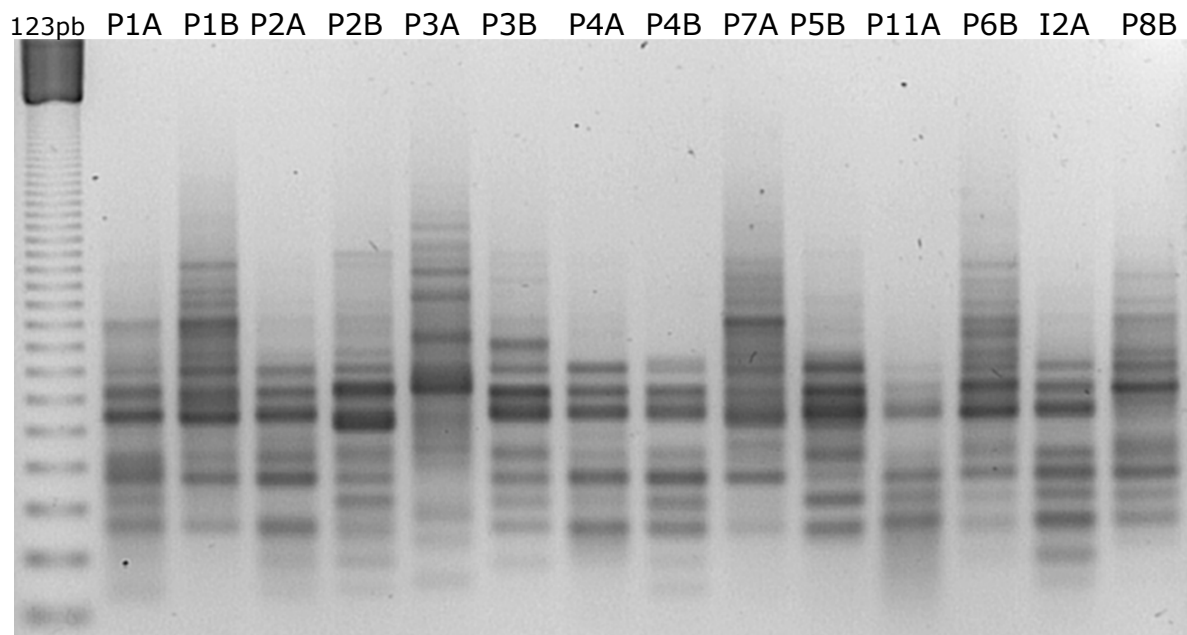


Figura 7. Amplificações da RAPD-PCR para as espécies de *Anopheles darlingi* coletadas nos setores A e B do povoado de Portuchuelo (RO). Coluna 1 corresponde ao peso molecular DNA *Ladder* de 123pb (Invitrogen-Life Technologies) e colunas 2 a 15 com amostras de DNA de mosquitos do setor A e B alternadas, amplificadas com o oligonucleotídeo A02.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados e número de produtos polimórficos gerados nas reações de RAPD-PCR.

Oligonucleotídeos	N° de Produtos Polimórficos
A02	6
B13	4
K09	1
K11	1
W10	5
W14	7

DNA provindo de *Anopheles darlingi* foi submetido à análise de RAPD com os primers descritos acima, apresentando os produtos polimórficos correspondentes para cada primer.

Tabela 5. Diversidade genética das populações dos setores A e B.

	HETEROZIGOSIDADE MÉDIA (Nei, 1972)	HETEROZIGOSIDADE CORRIGIDA (Nei, 1978)
SETOR A - PERI	0,3193	0,3506
SETOR A - INTRA	0,3935	0,4242
SETOR B - PERI	0,3830	0,4178
SETOR B - INTRA	0,3646	0,4167
TOTAL	0,4085	0,4178

A diversidade genética das populações foi calculada a partir dos dados obtidos da análise de RAPD sendo a heterozigozidade corrigida de Nei usada para pequeno número de amostras.

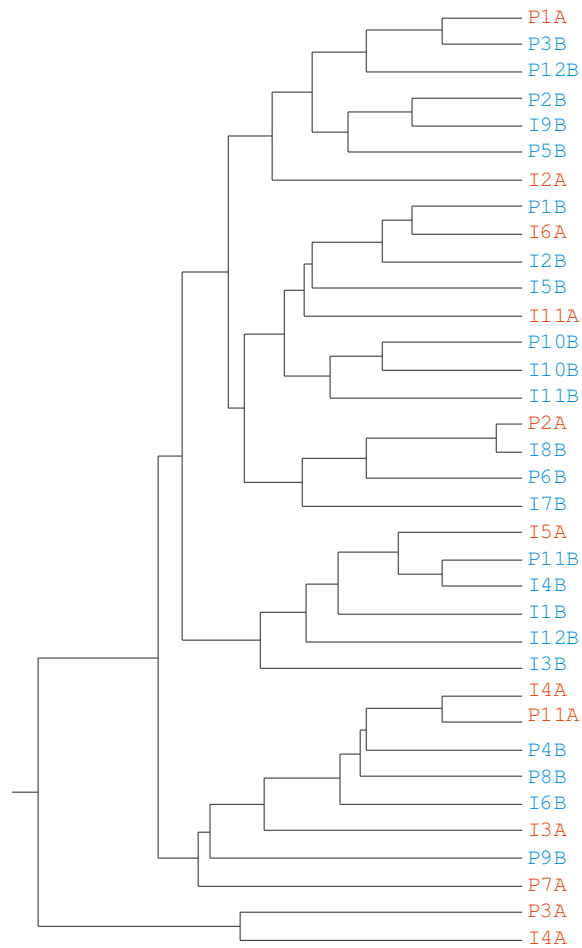


Figura 8. Árvore fenética dos indivíduos dos setores A e B construída a partir da matriz de similaridade gerada pelos oligonucleotídeos utilizados. P= peri, I= intra, A= setor A, B= setor B e os números correspondem aos períodos em que os mosquitos foram coletados, ex: 1= das 18 às 19hs,..., 12= das 5 às 6hs.

Tabela 6. Distância genética entre as sub-populações.

	PERI A	INTRA A	PERI B	INTRA B
PERI A	-----			
INTRA A	0,0312	-----		
PERI B	0,0838	0,0409	-----	
INTRA B	0,0990	0,0601	0,0211	-----

A distância genética entre as populações foi calculada baseada no Fst das populações par a par.

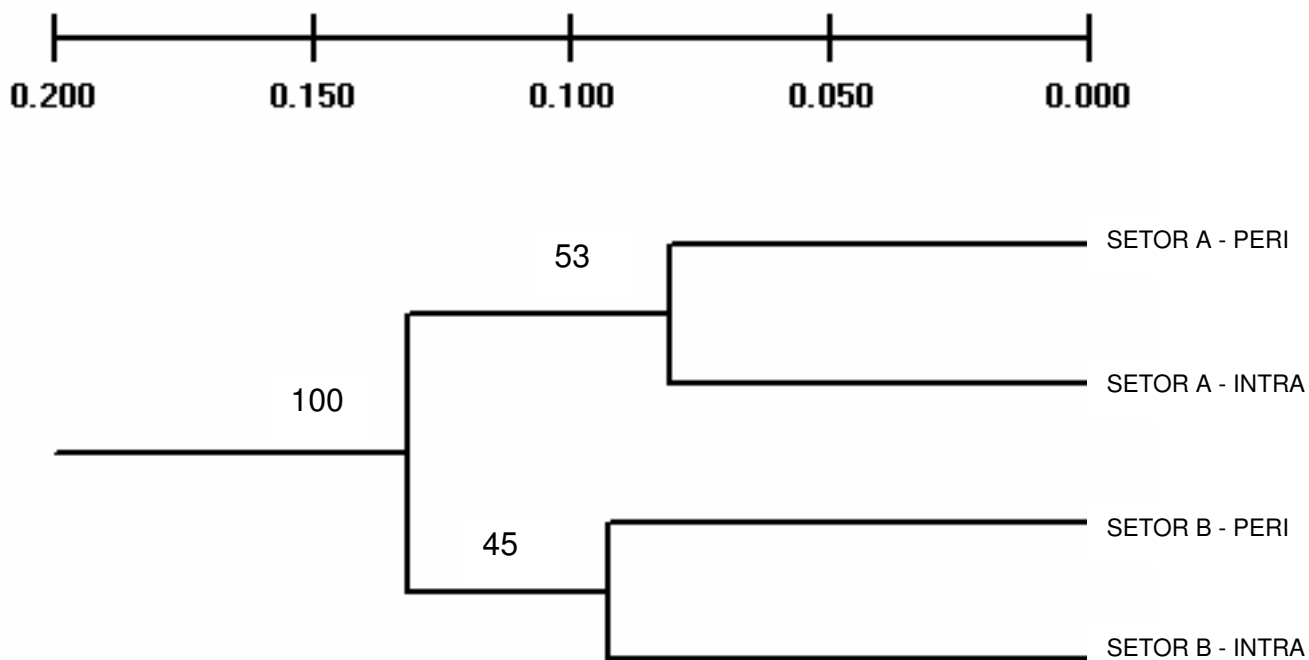


Figura 9. Árvore fenética das sub-populações de *Anopheles darlingi* coletadas em Portuchuelo. Com os dados obtidos da matriz de similaridade genética (Tabela 6) uma árvore fenética foi construída pelo método de UPMGA. Os números acima da árvore indicam os índices de similaridade. Os números na árvore indicam o índice de representatividade de cada nó em porcentagem após 1000 repetições.

Tabela 7. Valores obtidos da diferenciação das sub-populações de *Anopheles darlingi* em Portuchuelo.

	F_{ST}
SETOR A - PERI	0,21
SETOR A - INTRA	0,04
SETOR B - PERI	0,06
SETOR B - INTRA	0,11

Cálculo de diferenciação genética das sub-populações em comparação com o total de mosquitos analisados.

4.2 Sequenciamento dos genes mitocondriais

O resultado das coletas realizadas nas quatro localidades de Porto Velho - RO (Candelária, Bate-Estaca, Santo Antônio e Portuchuelo) em abril de 2004, abril e outubro de 2005 está mostrado na tabela 2.

Para a extração de DNA dos mosquitos utilizados para a amplificação do gene ND4 foi utilizado o método de extração de DNA com a utilização do composto Chelex[®] Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories), por ser um método mais barato, rápido e de resultados satisfatórios quanto a qualidade e quantidade de DNA. A extração de DNA realizada com o composto Chelex[®] não permite visualização em gel de agarose, uma vez que o volume final do extraído é de 200 - 250µl.

Uma primeira análise do sequenciamento dos genes mitocondriais realizada com os mosquitos coletados em abril de 2004 mostrou que o gene COI de 12 indivíduos resultou em 9 haplótipos que diferiram por 4 mutações não sinônimas e 9 mutações sinônimas, representados por 5 transversões e 8 transições. O gene ND4 de 14 indivíduos foi seqüenciado resultando em 10 haplótipos que diferiram por 1 mutação não sinônima e 9 mutações sinônimas, representadas por 2 transversões e 8 transições. A relação entre os haplótipos de COI e ND4 está mostrada nas figuras 10 e 11. A análise das seqüências também foi realizada pelo método de distância por Neighbor-Joining resultando em duas árvores mostradas nas figuras 12 e 13. Estes dados de sequenciamento de DNA mostram que tanto o gene COI como o gene ND4 são polimórficos mesmo quando mosquitos coletados na mesma região são comparados. Este fato demonstra a potencialidade destes marcadores no estudo populacional de mosquitos como *Anopheles darlingi* no Brasil. Ambas as seqüências dos genes ND4 e COI mostraram 2 grupos distintos com diferentes indivíduos. No entanto, não há nenhuma correlação clara entre distância geográfica e genética até o momento.

Devido ao alto grau de polimorfismo encontrado no seqüenciamento do gene ND4 e à maior reprodutibilidade nas reações de PCR, apenas o gene ND4 dos mosquitos coletados durante as duas últimas coletas (abril e outubro de 2005) foram seqüenciados e analisados.

O fragmento do gene ND4 de 116 indivíduos coletados em abril de 2005 foi seqüenciado e a análise dos resultados revelou a existência de 14 diferentes haplótipos. Do número total de sítios polimórficos 5 foram singletons (ex, apresentam uma única substituição num único indivíduo) e 14 sítios foram parcimoniosamente informativos. As populações analisadas apresentaram um número médio de diferenças nucleotídicas ($\kappa = 2,812$), com índice de diversidade nucleotídica $\pi = 0,01134$ e diversidade haplotípica $Hd = 0,731$.

Análises filogenéticas realizadas através da topologia das árvores não mostraram uma clara existência de linhagens mitocondriais entre os 14 haplótipos encontrados nas populações brasileiras de *An. darlingi*. Apesar disso é possível observar haplótipos mais freqüentes.

A seqüência do haplótipo mais abundante foi utilizada na construção de uma árvore filogenética com outras seqüências de anofelinos. Como pode ser observado na Figura 14, a árvore mostra um ramo com as 3 espécies pertencentes ao Complexo Albitarsis (*Anopheles albitarsis*, *Anopheles deaneorum* e *Anopheles marajoara*) com alta consistência (100%). Além disto, as espécies pertencentes ao Subgênero *Nyssorhynchus* também estão agrupadas (Complexo Albitarsis, *Anopheles darlingi* e *Anopheles argyritarsis*). *Anopheles quadrimaculatus* e *Anopheles gambiae* pertencem ao Subgênero *Anopheles* e a espécie *Haematobia irritans* foi utilizada como grupo externo.

Portuchuelo é a localidade com menor número de diferenças nucleotídicas, enquanto que Candelária apresenta o maior número, diferente do que foi encontrado na segunda coleta como pode ser observado nas tabelas 8 e 9.

Como pode ser observado, a localidade com maior influência humana, Candelária, apresenta maior diversidade. Este dado pode estar refletindo as modificações causadas pelo homem no meio ambiente. Além disto, não podemos descartar a introdução de novas linhagens de *An. darlingi* através do tráfego de embarcações. Com relação a diversidade genética das populações brasileiras podemos dizer que esta se apresenta mais diversa do que populações africanas de anofelinos, as quais apresentam índices de diversidade de nucleotídeos (π) entre 0,0023 a 0,0051 (Merida et al., 1999).

No entanto, a análise das 4 populações de *An. darlingi* não mostrou correlação clara entre distância genética e distância geográfica, assim como relatado para *Anopheles nuneztovari* em análise de mtDNA (Conn et al., 1998).

A análise dos indivíduos separadamente (Figura 15) mostra não haver nenhuma correlação entre a localidade das coletas e o haplótipo do gene ND4.

O fragmento do gene ND4 de 102 indivíduos coletados em outubro de 2005 foi seqüenciado e a análise dos resultados revelou a existência de 16 diferentes haplótipos. Do número total de sítios polimórficos 9 foram singletons (ex, apresentam uma única substituição num único indivíduo) e 10 sítios foram parcimoniosamente informativos. As populações analisadas apresentaram um número médio de diferenças nucleotídicas ($\kappa = 3,065$), com índice de diversidade nucleotídica $\pi = 0,01236$ e diversidade haplotípica $Hd = 0,781$.

Ao contrário das análises da primeira coleta, Bate-Estaca foi a localidade que apresentou a maior diversidade de nucleotídeos (Tabela 9) e Candelária a que apresentou a menor na coleta de outubro. Assim como Candelária, Bate-Estaca é uma localidade que sofre muita influência humana como pode ser observado na foto aérea da região periférica de Porto Velho (Figura 16) a região de Bate-Estaca apresenta maior número de locais de alagamento o que poderia representar um maior número de sítios de criação, o que aumentaria a diversidade da população local de mosquitos. Por outro lado, Santo Antonio e Portuchuelo apresentam regiões de pouca densidade humana.

O dado a respeito da diversidade genética das diferentes populações pode ter implicações na transmissão da malária em Porto Velho. Uma vez que as populações urbanas se apresentaram mais diversificadas, isto pode apresentar também uma maior diversificação de plasmódios carregados por estes mosquitos, o que sugere maior facilidade de aparecimento de resistência a drogas ou de variantes mais virulentas. De qualquer modo, este resultado demonstra a influência da atividade humana na estrutura populacional de *Anopheles darlingi*, influência esta que pode potencializar o papel do mosquito como vetor.

Quando comparamos os mosquitos coletados nos dois períodos de 2005 (Figura 17) observamos a ocorrência de haplótipos mais freqüentes em ambas as coletas. Do total de 20 haplótipos (tabela 10), 10 são comuns a ambas as capturas. Apesar disso, em maio são

observados 3 haplótipos únicos e em outubro outros 7 haplótipos são exclusivos. Todos os haplótipos únicos apresentam frequência muito baixa, sendo a maioria observada em um único indivíduo. A análise de diferenciação por F_{st} de todos os pares de população só mostrou significância entre as populações de Portuchuelo ($F_{st}=0,08 \pm 0,02$). Todos os outros pares apresentaram valores de $F_{st} < 0,05$. Com relação à estruturação genética, os testes de AMOVA não mostraram estruturação entre as populações ou entre as coletas (abril e outubro), sendo que a maior parte da diferenciação genética dos indivíduos (99,86%) é explicada quando comparamos mosquitos par a par.

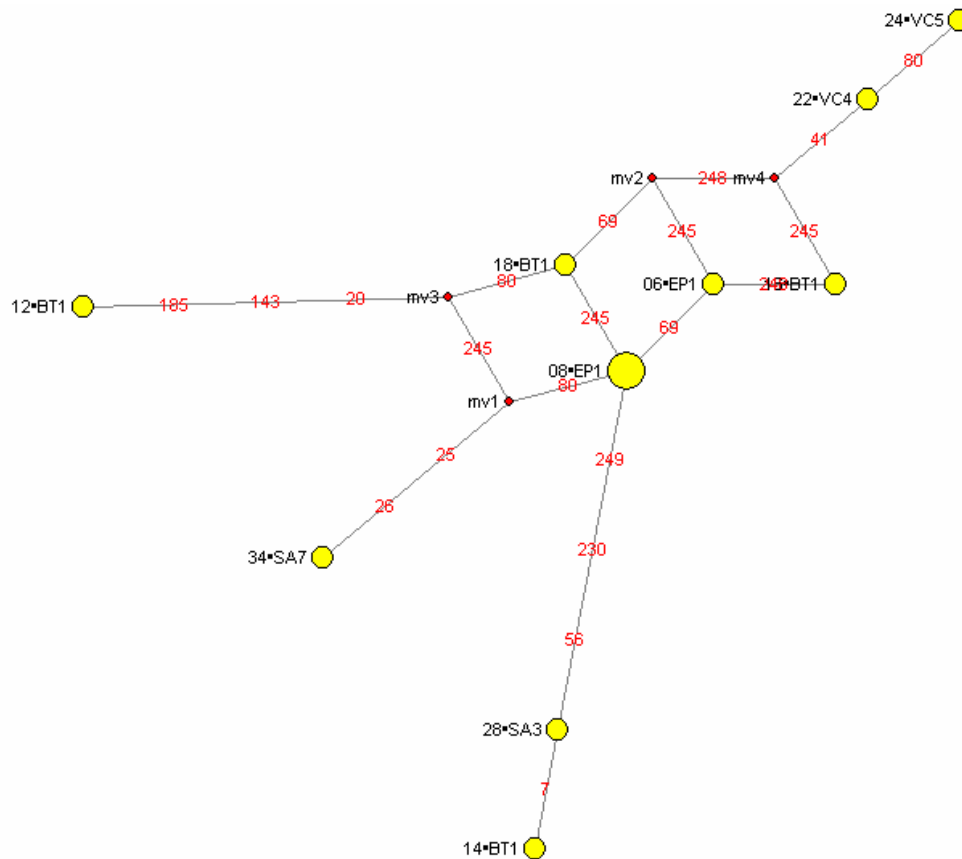


Figura 10. Diagrama de haplótipos das seqüências do gene COI de *Anopheles darlingi*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os números entre as esferas representam os sítios polimórficos.

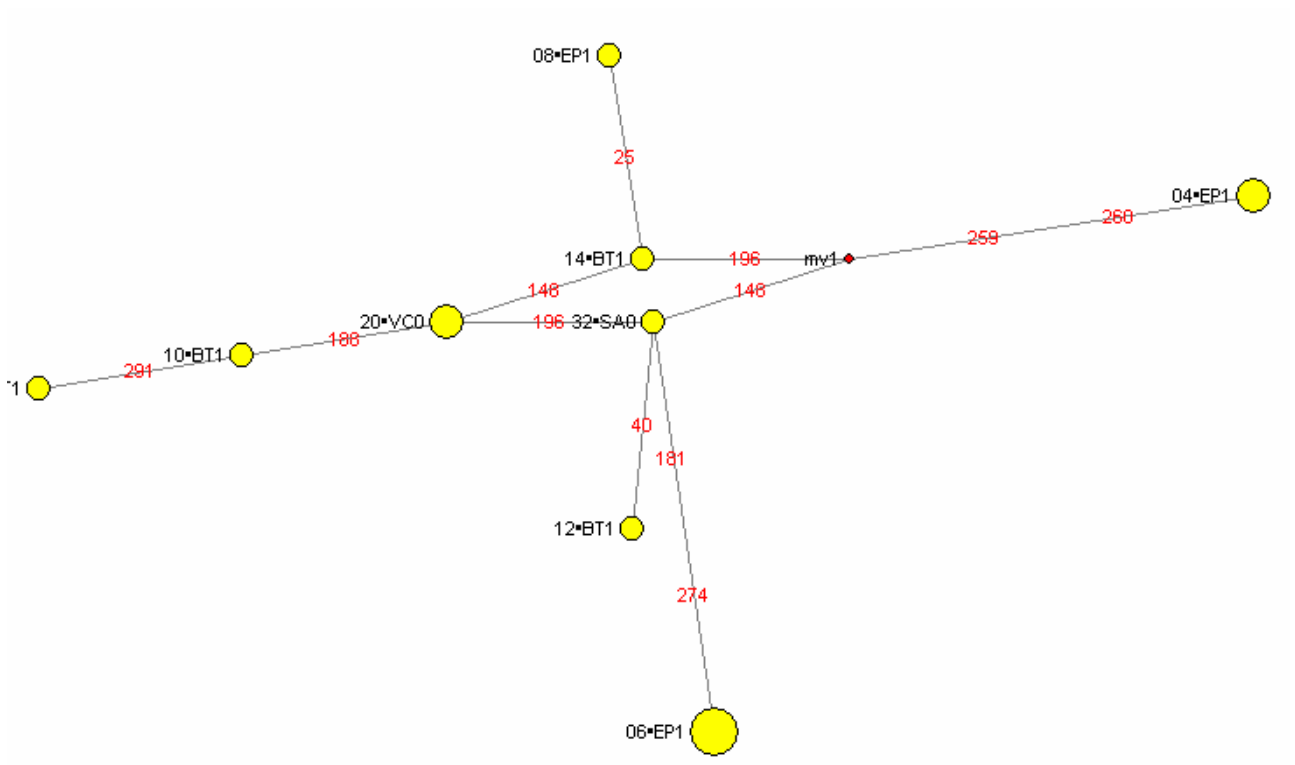


Figura 11. Diagrama de haplótipos das seqüências do gene ND4 de *Anopheles darlingi*. O tamanho das esferas representa o número de indivíduos e os números entre as esferas representam os sítios polimórficos.

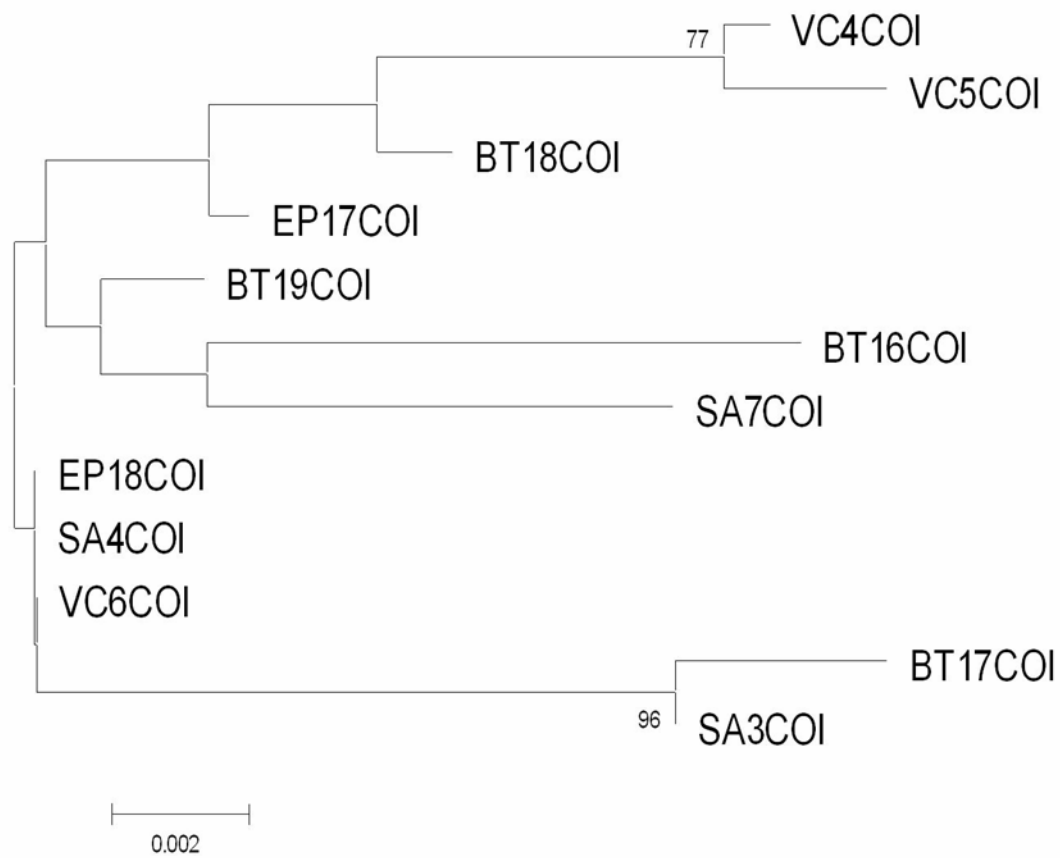


Figura 12. Arvore filogenética obtida a partir dos dados de seqüência do gene COI de *Anopheles darlingi*.

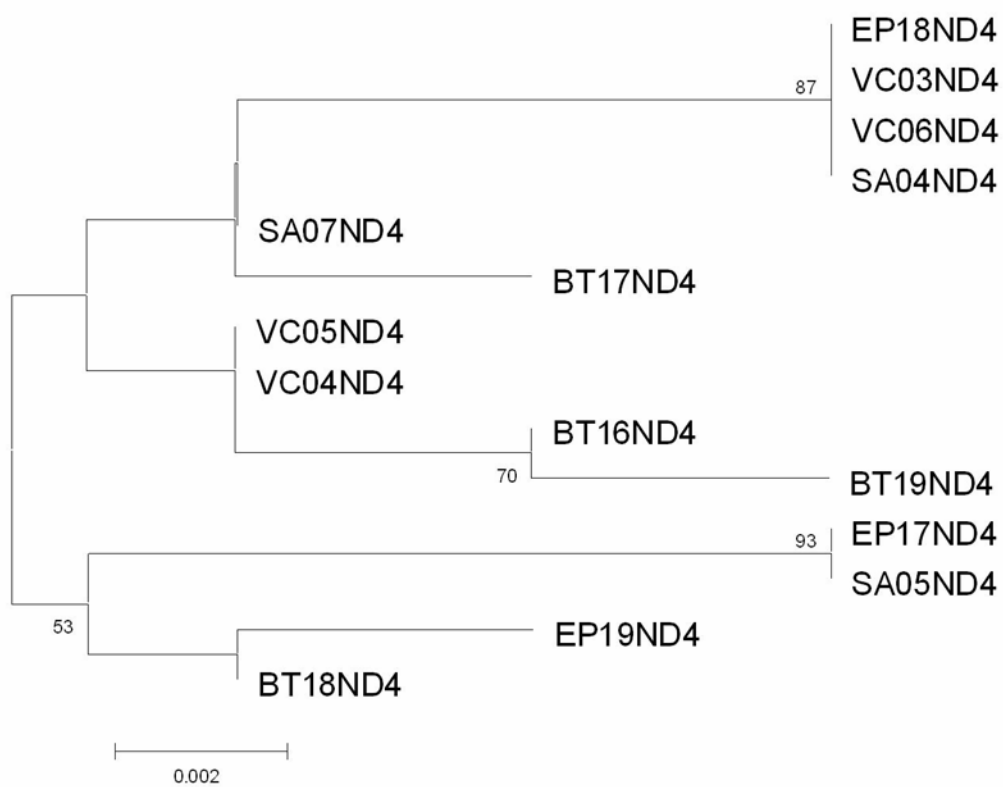


Figura 13. Arvore filogenética obtida a partir dos dados de seqüência do gene ND4 de *Anopheles darlingi*

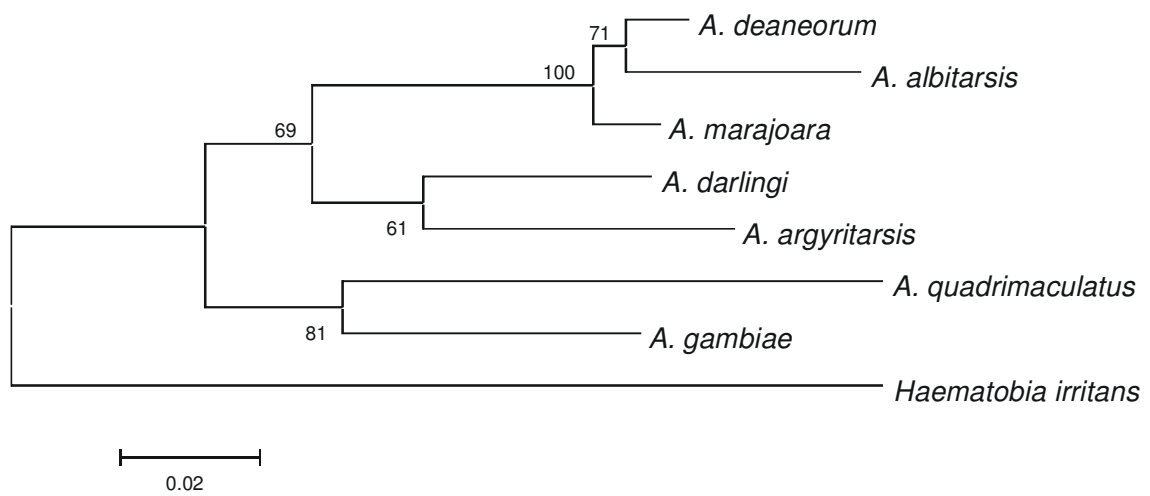


Figura 14. Árvore de Neighbor-Joining baseada na análise da distância genética das espécies. Os números nos ramos são os valores de bootstrap (apenas valores acima de 50 são mostrados).

Tabela 8. Diversidade genética das populações de *Anopheles darlingi*.

Populações	Nº de seqüências	Nº de haplótipos (h)	Diversidade de haplótipos (Hd)	Diversidade de nucleotídeos (π)
Portuchuelo	32	09	0,6774	0,0097
Candelária	30	11	0,7701	0,0137
Bate-Estaca	29	07	0,7069	0,0107
Santo Antonio	25	08	0,7833	0,0110

Os dados de diversidade genética das populações de *An. darlingi* desta tabela correspondem a coleta realizada no primeiro semestre.

Tabela 9. Diversidade genética das populações de *Anopheles darlingi*.

Populações	Nº de seqüências	Nº de haplótipos (h)	Diversidade de haplótipos (Hd)	Diversidade de nucleotídeos (π)
Portuchuelo	23	06	0,7865	0,0131
Candelária	25	07	0,7100	0,0111
Batestaca	25	09	0,8300	0,0132
Santo Antonio	29	11	0,8054	0,0119

Os dados de diversidade genética das populações de *An. darlingi* desta tabela correspondem a coleta realizada no segundo semestre.

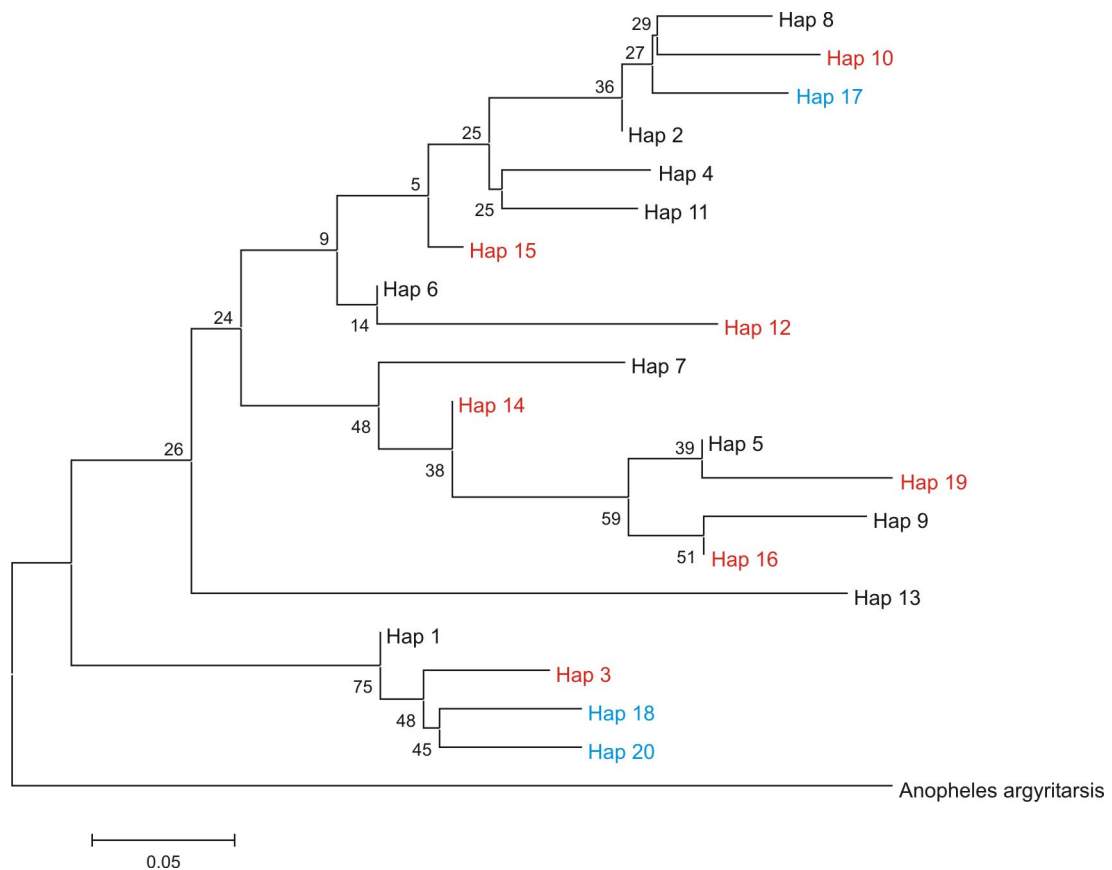


Figura 15. Árvore mostrando a relação entre os haplótipos encontrados em *Anopheles darlingi*.

A seqüência dos haplótipos foi utilizada para a construção de uma árvore através do método de Neighbor-Joining utilizando o algoritmo Kimura-2-parametros. Os haplótipos em preto representam haplótipos encontrados nos dois períodos, haplótipos em azul são exclusivos de abril e haplótipos em vermelho exclusivos de outubro.

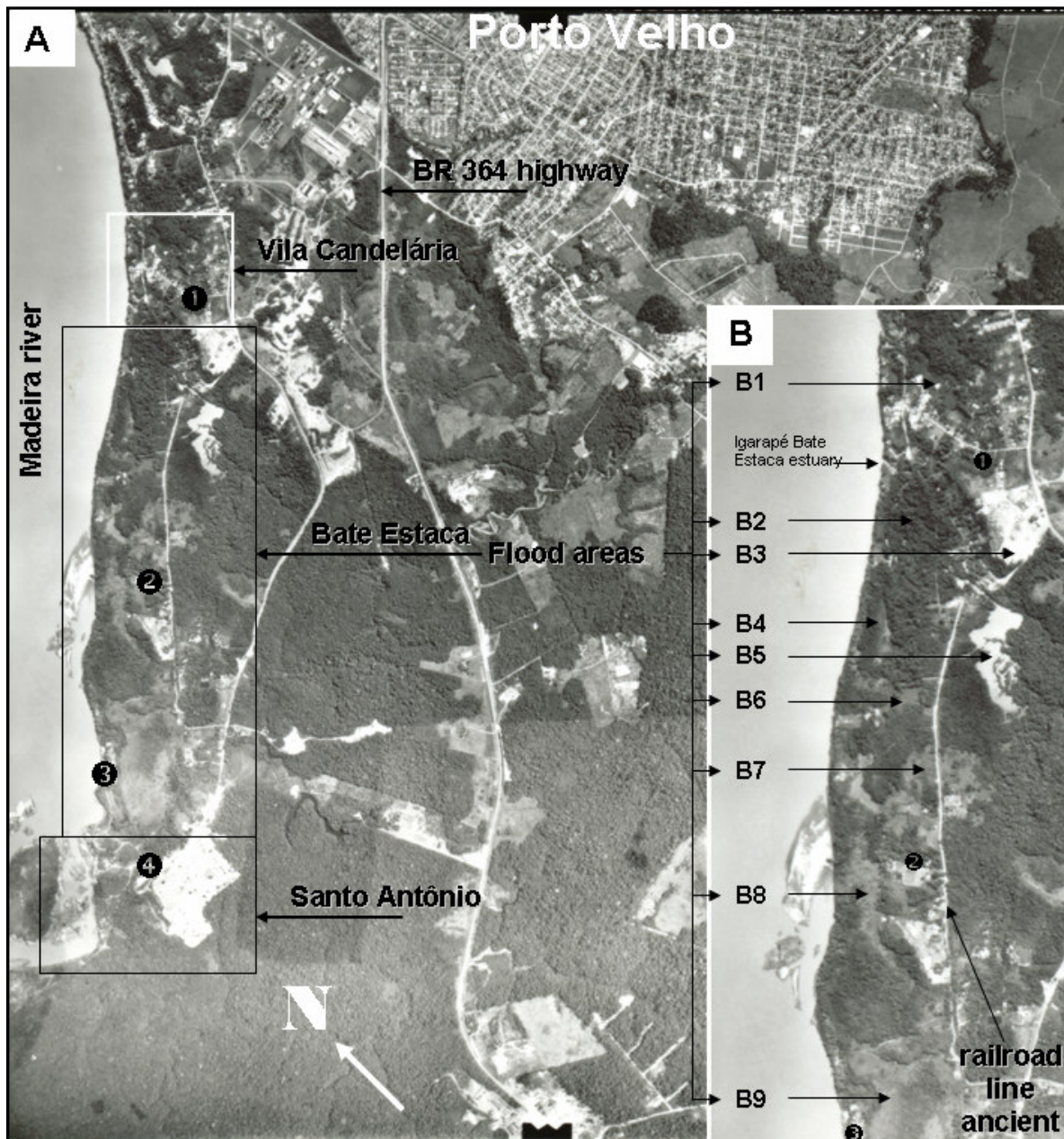


Figura 16. Foto aérea da região periférica de Porto Velho. A foto mostra a região sul da cidade de Porto Velho (A) onde foram realizadas parte das coletas. A figura B mostra um detalhe da região de Bate-Estaca destacando-se as regiões de alagamento (B1 a B9).

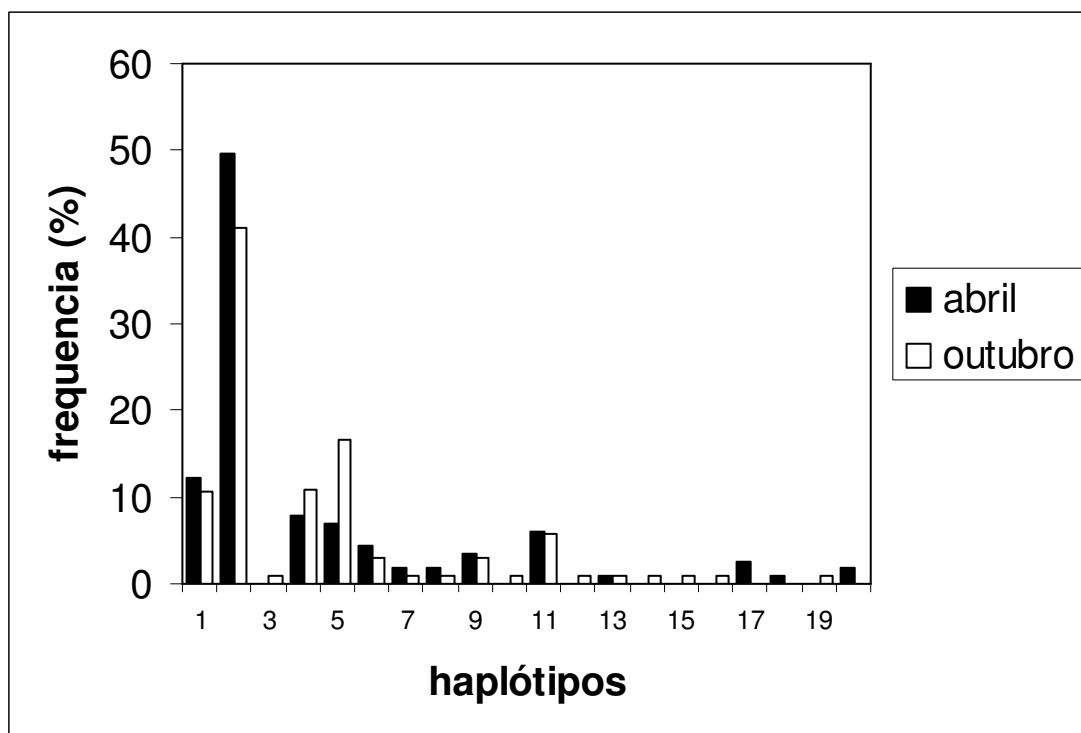


Figura 17. Frequência dos diferentes haplótipos encontrados em ambas as capturas de *Anopheles darlingi*.

Os mosquitos capturados tiveram seu DNA extraído e parte do gene ND4 seqüenciado como descrito em Materiais e Métodos.

	11111111122222
	345677813455678901122
	9957929712101519210125 N
Hap 1	ACTAAGTATAGTTCATATGTTA (25)
Hap 2	.T...A.G.....T.C..... (99)
Hap 3C. (01)
Hap 4ACG.....T.C..... (20)
Hap 5A.....T...CA... (25)
Hap 6A.....T.C..... (08)
Hap 7A.....T.C..AC.. (03)
Hap 8	.T..TA.G.....T.C..... (03)
Hap 9	C....A.G.....T...CA... (07)
Hap 10	.TC..A.G.....T.C..... (01)
Hap 11A.G.....T.C.....G (13)
Hap 12A...GA..T.C..... (01)
Hap 13	.T...A.....GCT..G..... (02)
Hap 14A.....T....A... (01)
Hap 15	.T...A.....T.C..... (01)
Hap 16A.G.....T...CA... (01)
Hap 17	.T...A.G.....T.C....C. (03)
Hap 18C..... (01)
Hap 19	...G.A.....T...CA... (01)
Hap 20G..... (02)

Tabela 10. Haplótipos encontrados em ambas as coletas de *Anopheles darlingi* na região de Porto Velho.

Os diferentes haplótipos foram numerados de 1 a 20 (os haplotipos são 1 a 20, 1 a 22 são os sítios polimórficos) e as diferenças entre as seqüências estão assinaladas. Os números acima da seqüência indicam a posição do sítio dentro do produto de PCR seqüenciado. N representa o número de indivíduos em cada haplótipo.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Anopheles darlingi é o vetor mais eficiente de malária no Novo Mundo (Deane, 1988). É um importante vetor de malária devido à ampla extensão geográfica que ocupa, também à sua associação com humanos e sua alta taxa de infecção com parasitas da malária (Tadei et al., 1998).

O objetivo do nosso trabalho foi testar as técnicas moleculares RAPD e seqüenciamento de genes mitocondriais, para o estudo populacional de *An. darlingi*, comparar as populações de *An. darlingi* coletadas quanto à distribuição na região amazônica e analisar a diferenciação e variabilidade de *An. darlingi* através do estudo da estrutura de sub-populações em indivíduos simpátricos.

A coleta e identificação dos mosquitos coletados em Portuchuelo mostrou uma predominância (95%) de *Anopheles darlingi*. Outras espécies coletadas foram *An. oswaldoi* e *An. nuneztovari*. Esta característica é típica de regiões com agrupamentos de população humana (GIL, comunicação pessoal) e difere das densidades observadas em locais selvagens onde *An. darlingi* é menos denso. A distribuição temporal dos mosquitos coletados mostra a ocorrência de *An. darlingi* durante toda a noite, predominando a ocorrência do mosquito no peridomicílio, mas com alguns pontos onde há maior ocorrência no intradomicílio. Pesquisadores do CEPEM (comunicação pessoal) encontraram três picos de atividade para *An. darlingi*, às 18:00h, às 24:00h e às 6:00h. Nossos dados não mostram claramente estes picos, mas sim uma distribuição contínua durante a noite. Estudos realizados no estado do Amapá (Voorham, 2002) demonstraram um aumento significativo na densidade de *An. darlingi* no final da estação chuvosa e também um pico de atividade noturna pronunciado, enquanto que em estudos feitos em Rondônia (Klein & Lima, 1990), ocasionalmente esta espécie tem mostrado atividade crepuscular muito baixa em contraste com várias localidades do Pará, onde esta espécie apresentou atividade hematofágica crepuscular pronunciada (Tadei et al., 1983; Tadei et al., 1998). Estudo semelhante na região amazônica boliviana mostrou um pico de atividade entre 19:00 e 21:00 horas, sendo que neste período 48% do total de mosquitos foram coletados (Harris et al., 2006). Esta plasticidade na atividade hematofágica pode

resultar num aumento da potencialidade do vetor e as estratégias de controle devem ser adaptadas para atender as diferenças no contato com humanos. O conhecimento da plasticidade da atividade hematofágica do vetor também é essencial para estudos entomológicos.

A atividade hematofágica está intimamente relacionada com as condições de umidade e temperatura do ambiente. Segundo Galvão et al., 1937, mesmo quando do uso de iscas animais no ambiente peridomiciliar, o mosquito é encontrado dentro das habitações. Os mosquitos adultos são capturados em maior abundância no interior das casas do que fora delas, mas ultimamente o *An. darlingi* tem sido encontrado mais no peridomicílio como mostram nossos resultados e assim como demonstrado por Gil et al., 2006 (trabalho submetido).

Dos 13 oligonucleotídeos testados para RAPD (figuras 5 e 6) os K09, K11, W10 e W14 foram os únicos que apresentaram produtos polimórficos entre indivíduos dos setores A e B. Dentre estes, o oligonucleotídeo W14 é o que apresenta mais produtos polimórficos (7). Com a utilização destes 4 oligonucleotídeos em conjunto com os oligonucleotídeos A02 e B13 descritos por Black (1992), foi possível a obtenção de 24 produtos polimórficos que foram utilizados neste trabalho (tabela 4). Como produtos polimórficos tomamos as bandas facilmente visualizadas após a coloração com brometo de etídio nas quais o alelo de menor frequência está presente em pelo menos 5% dos indivíduos.

A diversidade dos indivíduos do peridomicílio setor A é igual a 0,32 e no peridomicílio setor B é igual a 0,35, no intradomicílio setor A é igual a 0,34 e no intradomicílio setor B é igual a 0,36. Nenhum produto polimórfico foi 100% discriminante entre indivíduos dos setores A e B nem entre indivíduos coletados no peri e intradomicílio.

O índice de diferenciação entre essas populações está em torno de 0,05 indicando que esses mosquitos coletados em locais diferentes apresentam moderada diferenciação genética, segundo Wright (1978) indicando, portanto a existência de isolamento parcial. Este fato pode indicar a existência de apenas 1 população com hábitos diferentes. Apesar disso, quando analisamos os resultados de RAPD observamos um certo agrupamento

entre mosquitos coletados no peridomicílio em detrimento aos mosquitos coletados no intradomicílio. A diferenciação entre os mosquitos coletados no setor A e no setor B de Portuchuelo pode ser explicada pelo isolamento geográfico parcial. O mesmo nível de diferenciação foi encontrado quando as populações de *Plasmodium falciparum* foram analisadas por genotipagem de microssatélites (Alves, 2002). Apesar das metodologias serem diferentes, o fato destes dois valores estarem próximos pode demonstrar interdependência entre as populações de mosquitos e parasitas, como sugerido por Boëte & Paul (2006). A dispersão dos parasitas da malária está intimamente relacionada com o trânsito humano e de mosquitos desde que os moradores de Portuchuelo, na sua maioria, não apresentem deslocamentos significativos, cabe aos mosquitos dispersarem o parasita. Por outro lado, a diferenciação entre os mosquitos coletados dentro e fora das casas pode indicar modificações na estrutura populacional desta espécie em decorrência da ocupação humana. O uso de inseticidas, a construção de moradias com aumento populacional, o aparecimento de criadouros artificiais permanentes podem ser ações que alterem a estrutura populacional de *Anopheles darlingi*. Apesar disto, estas diferenças podem ser muito sutis dependendo do estágio de isolamento reprodutivo. Diferenças comportamentais foram descritas para *Anopheles darlingi* em detrimento da ocupação de regiões ribeirinhas de Porto Velho (Gil et al., 2006). Por outro lado, Wondji e colaboradores (2005) ao avaliar a estrutura populacional de *Anopheles arabiensis* em uma região dos Camarões durante a implementação do uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, não observou diferenças significativas e a pequena diminuição no tamanho estimado da população que ocorreu logo após a implementação dos mosquiteiros logo retornou aos valores anteriores. Outro estudo conduzido na região amazônica do Peru mostrou que o deflorestamento aumenta mais de 200 vezes a incidência de picadas de *Anopheles darlingi* no homem (Vittor et al., 2005). Apesar de não encontrarmos diferenças significativas entre os mosquitos coletados dentro e fora das casas, podemos observar uma mudança no hábito de *Anopheles darlingi* de entrar menos nas casas, fato que pode estar ligado com o uso de inseticidas no interior das mesmas.

A maioria dos anofelinos pode ser agrupada em complexos de espécies crípticas (Collins & Paskewitz, 1996; Rosa-Freitas et al., 1998) e entre eles podem ser encontrados tanto vetores como não vetores de malária (White, 1982). Com o intuito de se esclarecer o

problema da identificação de espécies crípticas, vários métodos tem sido empregados como bandeamento de cromossomos politênicos (Mahon et al., 1976; Colluzzi et al., 1979) e outros métodos, mas devido às limitações dessas técnicas, métodos baseados em DNA têm sido desenvolvidos nos últimos anos, assim como apresentado na introdução.

Devido a esses fatores, foi utilizado nesse estudo a técnica de sequenciamento de DNA mitocondrial (mtDNA) com o intuito de se estudar diferentes populações de *An. darlingi* coletadas em diferentes localidades de Porto Velho, citadas em Material e Métodos.

Vários estudos com anofelinos vem sendo realizados com a técnica de sequenciamento de mtDNA. Padrões de variação na frequência de haplótipos de mtDNA podem ser utilizados para estimar taxas de fluxo gênico entre populações. Por esta razão, mtDNA tem sido usado em estudos de fluxo gênico e relacionamentos filogenéticos inter e intraespecíficos em quatro espécies do complexo *Anopheles quadrimaculatus*, entre populações de *An. aquasalis*, *An. rangeli*, *An. trinkae* e *An. nuneztovari* (Conn et al., 1993; 1998) e também com o vetor africano de malária *An. gambiae* (Besansky et al., 1994; Caccone et al., 1996). Merida et al., 1999, demonstraram através do estudo da distribuição de haplótipos de mtDNA de *Anopheles albimanus* coletados em alguns países da América Central e Sul isolamento por distância. A presença de barreiras para o fluxo gênico entre populações de *An. albimanus* da costa Atlântica e Pacífica foi relatada através do estudo de uma região da NADH desidrogenase subunidade 5.

Estudos realizados através da análise do mtDNA em *An. darlingi* coletados na América do Sul mostraram uma estrutura populacional considerável e isolamento por distância (Conn et al., 1999) resultados similares foram encontrados em vetores neotropicais (Fairley et al., 2002).

Os resultados aqui apresentados mostraram alto polimorfismo na região do gene ND4 sequenciada. Dos 218 mosquitos analisados obtivemos 20 diferentes haplótipos com um índice de diversidade de 0,756, equivalente ao encontrado em outros estudos com anofelinos neotropias (Conn et al., 1999). As populações analisadas parecem estar em panmixia, ou seja, não foi encontrada nenhuma estruturação populacional significativa e o fluxo gênico entre elas é alto. Uma explicação para este fato é de que os pontos de coleta estão localizados muito próximos e esta metodologia não é suficientemente discriminante

para avaliar as diferenças entre estas populações. Sazonalmente também não encontramos diferenças significativas, com exceção das populações de Portuchuelo que se diferenciaram significativamente. Apesar disto, a metade dos haplótipos encontrados são exclusivos de uma das coletas, mostrando que as populações apresentam modificações durante o ano. Este fato tem um importante significado epidemiológico, uma vez que novas cepas do mosquito podem representar vetores mais eficientes ou mesmo, podem albergar diferentes cepas de plasmódios.

Os dados aqui apresentados demonstram a importância do estudo molecular para a caracterização populacional de *Anopheles darlingi*. Estes estudos poderão servir de apoio para os métodos tradicionais de controle visando a adequação das metodologias atualmente utilizadas. Também fica claro a necessidade de ferramentas moleculares discriminatórias para a resolução de questões locais de distribuição dos vetores, ferramentas estas que devem ser multi-locus devido à alta complexidade do sistema.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Análises por RAPD mostraram diferenciação entre os mosquitos coletados no setor A e B da localidade de Portuchuelo - RO e também uma possível diferenciação entre os mosquitos coletados dentro e fora das casas indicando a existência de mosquitos *Anopheles darlingi* com hábitos diferentes em Portuchuelo.
- As análises do sequenciamento de genes mitocondriais dos mosquitos coletados em dois períodos diferentes do ano mostraram que existem pequenas diferenças com relação à sazonalidade dos mosquitos. As populações analisadas não apresentaram estruturação, evidenciando o alto fluxo gênico entre elas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, F. P.** (2002) Epidemiologia da malária em populações nativas da Amazônia Brasileira: a ocorrência de infecções assintomáticas. 105p. Tese (Doutorado). Dept. Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- AVISE, J.C.** (1994) Molecular markers, natural history and evolution. New York: London, Chapman & Halls (Eds)., 511p.
- BARNES, R. D.** (1984) Os insetos. In: Barnes, R. D. (ed) Zoologia dos invertebrados. Saunders College/ Holt, Rinehart and Winston, Gettysburg College, Pennsylvania, USA.
- BEARD, C.B., HAMM, D.M., COLLINS, F.H.** (1993) The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. Insect Mol. Biol., v.2, p.103-124.
- BEEBE N.W., COOPER R.D., MORRISON D.A., ELLIS J.T.** (2000) A phylogenetic study of the *Anopheles punctulatus* group of malaria vectors comparing rDNA sequence alignments derived from the mitochondrial and nuclear small ribosomal subunits. Mol Phylogenet Evol.17(3):430-6.
- BENDER, W., P. SPIERER, D.S. HOGNESS** (1983) Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the Ace and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. J. Mol. Biol. 168: 17-33.
- BESANSKY, N.J., J.R. POWELL, A. CACCONE, D.M. HAMM, J.A. SCOTT, F.H. COLLINS** (1994) Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests

genic introgression between principal malaria vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 6885-6888.

BESANSKY, N.J., LEHMANN, J.A., FAHEY, G.T. (1997) Patterns of mitochondrial DNA variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive gene flow. Genetics, v.147, p.1817-1828.

BIRUNGI, J., MUNSTERMANN, L.E. (2002) Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. Ann. Entomol. Soc. Am., v.95, n.1, p.125-132.

BLACK IV W.C., BALLINGER - CRABTREE M.E., MILLER B.R. (1992) Use of Genetic Polymorphisms Detected by the Random - Amplified Polymorphic DNA Chain Reaction (RAPD-PCR) FOR Differentiation and Identification of *Aedes aegypti* Subspecies and Population. Am. J. Trop. Med. Hyg. 47(6): 893-901.

BLACK W.C. (1996) RAPDPLOT 2.4 Department of Microbiology Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA.

BOËTE C., PAUL R.E.L. (2006) Can mosquitoes help to unravel the community structure of Plasmodium species? Trends in Parasitology vol. 22, n°1, p. 21-25.

BROWN, G.G., SIMPSON, M.W. (1981) Intra and inter-specific variation of the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: restriction enzyme of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships. Genetics, v.97, p.125-143.

BROWN, W.M. (1985) The mitochondrial genome of animals. In: Molecular Evolutionary Genetics. MACINTYRE, R.J. (Ed), New York: Plenus Press, p. 95-130.

- CACCONE A., GARCIA B.A., POWELL J.R.,** (1996). Evolution of the mitochondrial DNA control region in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Mol Biol* 5: 51-59.
- CHARLWOOD, J. D., HAYES, J.** (1978) Variações geográficas no ciclo de picada do *Anopheles darlingi* Root no Brasil. *Acta Amazônica*, 8: 601-603.
- CHARLWOOD, J. D.** (1996) Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91: 391-398.
- CLARY, D.O., WOLSTENHOLME, D.R.** (1985) The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.*, v.22, p.252-271.
- COLLINS, F. H., PASKEWITZ, S. M.** (1996) A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular*
- COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V., DI DECO M.A.** (1979) Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 483-497.
- CONN J.E., COCKBURN A.F., MITCHELL S.E.** (1993) Population differentiation of the malaria vector *Anopheles aquasalis*. *J Hered* 84: 248-253.
- CONN J.E., MITCHELL S.E., COCKBURN A.F.** (1998) Mitochondrial DNA analysis of the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari*. *Genome* 41: 313-327.
- CONN J.E., ROSA-FREITAS M.G., LUZ S.L., MOMEN H.** (1999) Molecular population genetics of the primary neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. *J Am Mosq Control Assoc.*; 15(4):468-74.
- CONSOLI, R. A. G. B., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.** (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p225.

- DEANE, L.M.** (1988) Malaria studies and control in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 223-230.
- DONNELLY M.J., GIROD R., BESANKY N.J., LEHMANN** (2004) Revisiting the role of introgression *vs* shared ancestral polymorphisms as a key process shaping genetic diversity in the recently separated sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Heredity* 92, 61-68.
- DYE C.**, (1986) Vectorial capacity: Must be measure all its components? *Parasitology*
- FAIRLEY T.L., POVOA M.M., CONN J.E.** (2002). Evaluation of the Amazon River delta as a barrier to gene flow for the regional malaria vector, *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) in northeastern Brazil. *J Med Entomol* 39: 861-869.
- FELSENSTEIN, J.** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783
- FOLEY, D. H., BRYAN, J. H.** (1993) Electrophoretic keys to identify members of the *Anopheles punctulatus* complex of vector mosquitoes in Papua New Guinea. *Medical and Veterinary Entomology*, 7: 49-53.
- FORATTINI O.P.** (2002) *Culicidologia Médica* vol. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- FREITAS-SIBAJEV, M.G.R., CONN, J., MITCHELL, S., COCKBURN, A. F., SEAWRIGHT, J. A., MOMEN, H.** (1995) Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil. *Mosquito Systematics*, 27: 79-85.
- FRIZZI, G.** (1947) Salivary gland chromosomes of *Anopheles*. *Nature*, 160: 226-227.

- FRIZZI, G.** (1953) Etude cytogenetique d'*Anopheles maculipennis* en Italie. Bulletin of the World Health Organization, 9: 335-344.
- GALVÃO A.L.A., LANE J., CORRÊA R.R.** (1937) Notas sobre os *Nyssorhynchus* de São Paulo. V. Sobre os *Nyssorhynchus* de Novo Oriente. Rev. Biol. Hyg., 8: 37-45.
- GIL L.H.S., TADA M.S., KATSURAGAWA T.H., RIBOLLA P.E.M., PEREIRA DA SILVA L.H.** (2006) Urban malaria in Rondônia (western amazon region, Brasil) II. Environmental changes of uncontrolled human activities favor anopheline proliferation. (submetido)
- GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N., M.L. MUNOZ, I. FERNANDEZ-SALAS, B.J. BEATY, W.C. BLACK** (2000) Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62: 200-209.
- GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N., C. GOMES-MACHORRO, S. LOZANO-FUENTES, I. FERNANDEZ-SALAS, M.L. MUNOZ, J.A. FARFAN-ALE, J. GARCIA-REJON, B.J. BEATY, W.C. BLACK** (2002) Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66: 213-222.
- GUERRANT, R.L., BLACKWOOD, B.L.** (1999) Threats to global health and survival: the growing crises of tropical infectious disease – our “unfinished agenda”. Clinical and Infective Diseases, 28 (5): 966-986.
- HAAVIE, J., SAETRE, G.P., MOUNT, T.** (2000) Discrepancies in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage color in the pied flycatcher – inferring evolutionary processes. Mol. Ecol., v.9, p.1137-1148.

- HARRIS, H.** (1966) Enzyme polymorphisms in man. Proc. R. Soc. London, v.164, p.298-310.
- HARRIS A.F., MATIAS-ARNEZ A., HILL N.** (2006) Biting time of *Anopheles darlingi* in the Bolivian Amazon and implications for control of malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg. Jan;100(1):45-7. Epub Sep 9.
- HARRISON, R.G.** (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. Trends Ecol. Evol., v.4, p.6-11,.
- HARWOOD R.F., JAMES M.T.** (1979) Entomology in Human and Animal Health. Seventh Edition, Macmillan Publishing Co., Inc. 1979.
- HILL S.M., CRAMPTON J.M.** (1994) DNA - Based methods for the identification of insect vectors. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 88: 227 - 250.
- HUBBY, J.L., LEWONTIN, R.C.** (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. Genetics, v.54, p.577-594.
- JAMES, A. A.** (1994) Salivary glands of vector mosquitoes. Bull. Inst. Pasteur, 92: 133-150.
- KLEIN T.A., LIMA J.B.** (1990) Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. J Am Mosq Control Assoc. Dec;6(4):700-7.
- KLEIN T.A., TADA M.S., LIMA J.B., KATSURAGAWA T.H.** (1991) Infection of *Anopheles darlingi* fed on patients infected with *Plasmodium vivax* before and during treatment with chloroquine in Costa Marques, Rondonia, Brazil. Am J Trop Med Hyg; 45(4): 471-8.

- KLEIN T.A., LIMA J.B.P., TADA M.S.** (1991a) Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondônia, Brasil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44, 598-603.
- KLEIN T.A., LIMA J.B.P., TADA M.S., MILLER R.** (1991b) Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondônia, Brasil to infection by *Plasmodium vivax*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45, 463-470.
- KREUTZER, R. D. KITZMILLER, J. B., FERREIRA, E.** (1972) Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. *Mosquito News*, 32: 555-565.
- KUMAR, S., TAMURA, I. B. JAKOBSEN, M. NEI** (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics*, 17:1244-1245.
- LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L.** (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v.54, p.595-609.
- LINCH M., MILLIGAN B.G.** (1994) Analysis of populations genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol* 3: 91-99.
- MAHON, R.C., GREEN, C.A., HUNT, R.H.** (1976) Diagnostic allozymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex . *Bulletin of Entomological Research*, 66, 25-31.
- MANGUIN, S., WILKERSON, R. C., CONN, J. E., RUBIO-PALIS, Y., DANOFF-BURG, J. A. & ROBERTS, D. R.** (1999) Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified

polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 60: 364-376.

**MARRELLI M.T., FLOETER-WINTER L.M., MALAFRONTA R.S., TADEI W.L.,
LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R., FLOREZ-MENDONZA C., MARINOTTI O.,**
(2005) Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2
rDNA sequences. Medical and Veterinary Entomology 19, 208-218.

**MERIDA A.M. DE, PALMIERI M., YURRITA M., MOLINA A., MOLINA E., BLACK
W.C.** (1999) Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Vol 61, Issue 2, 230-239.

**MITCHELL S.E., NARANG S.K., COCKBURN A.F., SEAWRIGHT J.A.,
GOLDENTHAL M.** (1992) Mitochondrial and ribosomal DNA variation among
members of the *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) species complex.
Genome 35: 939-950.

MORITZ, C., DOWLING, T.E., BROWN, W.M. (1987) Evolution of animal
mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Ann.
Review Ecol. Systematics, v.18, p.269-292, principal malaria vectors. Proc Natl
Acad Sci USA 91: 6885-6888

NEI, M. (1972) Genetic distance between populations. Amer. Natur. 106: 283-92

NEI, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small
number of individuals. Genetics 89: 583-90

NEI M. (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

O'MEARA, G. D. (1987) Nutritional ecology of blood-feeding Diptera. In: Slansky Jr, F. &
Rodrigues, J. G. (eds). Nutritional ecology of insects, mites, and spiders.

- PADUAN K.S., ARAÚJO-JÚNIOR J.P., RIBOLLA P.E.M.** (2006) GENETIC VARIABILITY IN GEOGRAPHICAL POPULATIONS OF *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) IN BRAZIL ELUCIDATED BY MOLECULAR MARKERS. *Genetics and Molecular Biology, in press.*
- PADUAN K.S., RIBOLLA P.E.M.** (2006) MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISM AND HETEROPLASMY IN POPULATIONS OF THE *Aedes Aegypti* IN BRAZIL (em preparação)
- REY L.** (2001) *Parasitologia*. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, R. J., Brasil.
- RICHARD C.W., THOMAS J.P., TERRY A.K., THOMAS V.G., EDUARDO B., JOSE C.** (1995) Diagnosis by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of Four Cryptic Species Related to *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 32: 697-704.
- ROSA-FREITAS M.G., BROOMFIELD G., PRIESTMAN A., MILLIGAN P.J., MOMEN H., MOLYNEUX D.H.** (1992) Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J Am Mosq Control Assoc*; 8(4):357-66.
- ROSA-FREITAS, M. G., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., CARVALHO-PINTO, C. J. DE, FLORES-MENDOZA, C., SILVA-DO-NASCIMENTO, T.F.** (1998) Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 651-655.
- ROZAS, J., R. ROZAS.** (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174-175.

- ROZENDAAL J.A.**, (1990) Observations on the distribution of anophelines in Suriname with particular reference to the malaria vector *Anopheles darlingi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85: 221-34.
- SAITOU, N., NEI, M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425
- SALLUM M.A., BERGO E.S., FLORES D.C., FORATTINI O.P.** (2002) Systematic studies on *Anopheles galvaoi* Causey, Deane & Deane from the subgenus Nyssorhynchus blanchard (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 97(8):1177-89.
- SAMBROOK, J., FRITSH E.F., MANIATS T.** (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- SARASTE, M.** (1990) Structural features of cytochrome oxidase. Quart. Rev. Biophysics, v.23, p.331-366.
- SERVICE, M.W.** (1996). Medical Entomology. First Edition. London: Chapman & Hall.
- SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., et al.** (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. Ann. Entomol. Soc. Am., v.87, p.651-701.
- TADEI W.P., MASCARENHAS B.M., PODESTÁ M.G.** (1983) Biologia de anofelinos amazônicos. VIII. Conhecimento sobre a distribuição de espécies de *Anopheles* na região de Tucuruí-Marabá (Pará). Acta Amaz; 13: 103-40.
- TADEI, W.P., THATCHER, B.D., SANTOS, J.M., SCARPASSA, V.M., RODRIGUES, I.B., RAFAEL, M.S.**, (1998) Ecologic observations on anopheline vectors of malaria

in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 325–335.

TAIPE-LAGOS DA COSTA C.B. (1994) Caracterização epidemiológica da malária no Projeto de colonização agrícola Pedro Peixoto Gomide, Estado do Acre, Brasil. São Paulo. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública – USP.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Acids. Res.* 22: 4673-4680.

VITTOR A.Y., GILMAN R.H., TIELSCH J., GLASS G., SHIELDS T., LOZANO W.S., PINEDO-CANCINO V., PATZ J.A. (2006) The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* Jan;74(1):3-11

VOORHAM J. (2002) Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera, Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brasil. *Rev Saúde Pública* 36 (1): 75 – 80.

WALSH J.F., MOLYNEUX D.H., BIRLEY M.H. (1993) Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology*, 196: 55:75.

WALTON, C., SHARPE, R.G., PRITCHARD, S.J., THELWELL, N.J., BUTLIN, R.K. (1999) Molecular identification of mosquito species. *Biol. J. Linn. Soc.*, v.68, p.241–256.

- WALTON, C., HANDLEY, J.M., TUN-LIN, W., et al.** (2000) Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia. *Mol. Biol. Evol.*, v.17, p.962-974.
- WHITE, G. B.** (1971) Chromosomal evidence for natural interspecific hybridisation by mosquitoes of the *An. gambiae* complex. *Nature* 231: 184-185.
- WHITE, G.B.** (1982) Malaria vector ecology and genetics. *British Medical Bulletin*, **38**, 207-212.
- WHO (World Health Organization),** (1997) World malaria situation in 1994. Part I. Population at risk. *Wkly Epidemiol Rec.* 72(36): 269-274.
- WILLIAMS J.G., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*;18(22):6531-5.
- WILSON A.C., CANN R.L., CARR S.M. et al.** (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.*, v.26, p.375- 400.
- WONDJI C., SIMARD F., LEHMANN T., FONDJO E., SAME-EKOBO A., FONTENILLE D.** (2005) Impact of insecticide-treated bed nets implementation on the genetic structure of *Anopheles arabiensis* in an area of irrigated rice fields in the Sahelian region of Cameroon. *Mol Ecol.* Oct;14(12):3683-93
- WRIGHT, S.** (1978) *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability within and among Natural Populations.* University of Chicago Press, Chicago.
- YAMAUCHI M.M., MIYA M.U., NISHIDA N.** (2004) Use of a PCR- based approach for sequencing whole mitochondrial genomes of insects: two examples (cockroach and

dragonfly) based on the method developed for decapod crustaceans. *Insect Molecular Biology* 13(4), 435-442.

ZHONG D., TEMU E.A., GUDA T., GOUAGNA L., MENGE D., PAI A., GITHURE J, BEIER J.C., YAN G. (2006) Dynamics of Gene Introgression in the African Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Genetics*. Apr;172(4):2359-2365.