

Roberta de Oliveira Ferreira

**ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE  
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Anopheles (Kerteszia) bellator*  
UTILIZANDO O GENE *Rp49***

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao curso de Ciências  
Biológica da Universidade Federal  
de Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de licenciado em Ciências  
Biológicas

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luísa  
Damazio Rona Pitaluga

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos José  
de Carvalho Pinto

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Roberta de Oliveira

Análise da diferenciação genética entre populações  
brasileiras de *Anopheles (Kerteszia) bellator* utilizando o  
gene Rp49 / Roberta de Oliveira Ferreira ; orientadora,  
Luísa Damázio Rona Pitaluga ; coorientadora, Carlos José de  
Carvalho Pinto. - Florianópolis, SC, 2016.  
55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. *Anopheles bellator*. 3.  
Complexo de espécies. 4. Malária. 5. Diferenciação  
genética. I. Pitaluga, Luísa Damázio Rona. II. Pinto,  
Carlos José de Carvalho . III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Roberta de Oliveira Ferreira

Análise da diferenciação genética entre populações brasileiras de  
*Anopheles (Kerteszia) bellator* utilizando o gene *Rp49*

Este Trabalho de Conclusão de curso foi julgado e adequado para obtenção do Título de licenciado em Ciências Biológicas, e aprovado em sua forma final pela Banca Examinadora.

Florianópolis, 07 de julho de 2016.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Risoleta F. Marques  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luísa Damazio Rona Pitaluga  
Orientadora  
UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz  
UFSC

---

Prof. Dr. Carlos Frederico Deluque Gurgel  
UFSC

---

Dr. Rafael Dutra de Armas  
UFSC



Dedico este trabalho aos meus amados  
filhos Douglas e Rafaela, ao meu  
marido Davi e a minha mãe Ester.



## AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a todos que contribuíram de alguma maneira para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, aos funcionários que cooperaram no processo da minha formação e ao CNPq que ajudou na realização deste trabalho.

Aos meus queridos professores que contribuíram para a minha formação, orientando e compartilhando o conhecimento.

Durante a graduação conquistei vários amigos, agradeço a todos pelo apoio e carinho, especialmente a Kamila e ao Rafael, que sempre tiveram ao meu lado nos momentos tristes e alegres.

A companheira de laboratório e amiga Marcela, por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas.

A todos do laboratório de protozoologia que permitiram a realização de parte dos experimentos, principalmente a Carime, a Ana Paula (loira), a Laís e a Milene, que compartilharam os seus conhecimentos e experiências.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luísa Damazio Rona Pitaluga pela grande oportunidade de aprendizado, dedicação, apoio e incentivo durante este processo. Por me inspirar, como pessoa e como profissional apaixonada pelo que faz. Estou muito feliz e grata por tudo que passamos juntas.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos Pinto, pela ajuda com a identificação dos mosquitos e orientações de coleta. Sempre que solicitado se mostrou dedicado, simpático e amável, foi um imenso prazer estarmos juntos.

Agradeço aos membros avaliadores deste processo a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea Rita Marrero, a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yara Costa Netto Munizz, ao Prof. Dr. Carlos Frederico Deluque Gurgel e ao Dr. Rafael Dutra de Armas pela disponibilidade e contribuição neste trabalho.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

E acima de tudo agradeço à minha família, meus filhos pela compreensão dos poucos momentos que passamos juntos durante esses cinco anos, ao meu marido pelo apoio, a minha mãe pelas suas palavras de incentivo, que me encorajaram a prosseguir mesmo após o seu falecimento. Ao meu pai Roberto e aos meus sogros Anízio e Irene pelo apoio financeiro, sem eles eu não poderia me afastar do emprego para me dedicar a este trabalho. Meu muito obrigado a todos!





*Por natureza, entendo somente a ação combinada e os resultados complexos de um grande número de leis naturais; e, por leis, a série de fatos que temos reconhecido.*

Charles Darwin



## RESUMO

*Anopheles bellator* (Diptera: Culicidae), mosquito pertencente ao subgênero *Kerteszia*, foi um dos principais responsáveis pela malária endêmica no sul do Brasil, entre os anos de 1930 e 1960. Atualmente, esta espécie é ainda considerada como vetor de malária no sul e sudeste do país. Apesar da importância epidemiológica deste mosquito, os dados disponíveis a respeito da variabilidade genética de populações brasileiras de *An. bellator* é ainda pouco conhecida.

Por isso, neste estudo, foi analisado a diferenciação genética entre diferentes populações de *An. bellator* provenientes de diferentes localidades brasileiras: Angra dos Reis (Rio de Janeiro) em Ilha Grande, sobre duas regiões: Sítio Forte e Abraão, Cananéia (São Paulo) e Ilha do Mel (Paraná). Para isso, foi utilizado como marcador molecular o gene *Rp49*, constitutivo e codificante de proteína ribossomal. Utilizando a técnica de PCR, fragmentos desse gene foram amplificados, clonados e sequenciados.

Desta forma, foi comparado o grau de diferenciação genética entre as populações de *An. bellator*. Com base nas populações analisadas, o presente estudo sugere que *An. bellator* não é um complexo de espécies crípticas.

**Palavras chave:** Malária, *Anopheles bellator*, especiação, gene *Rp49*, Mata Atlântica, complexo de espécies crípticas.



## ABSTRACT

*Anopheles bellator* (Diptera: Culidae), mosquitoes belonging to the subgenus *Kerteszia*, was a major contributor to the malaria endemic in southern Brazil, between 1930 and 1960. Currently, this species is still considered as malaria vector in south and southeast from the country. Despite the epidemiological importance of this mosquito, the available data regarding the genetic variability of Brazilian populations of *An. bellator* is little known.

Therefore, in this study, we analyzed genetic differentiation among different populations of *An. bellator* from different locations in Brazil: Angra dos Reis (Rio de Janeiro) in Ilha Grande, on two regions: Sítio Forte and Abraão, Cananéia (São Paulo) and Ilha do Mel (Paraná). The *Rp49* gene, a constitutive gene that code a ribosomal protein, was used as molecular marker. Using the PCR technique, gene fragments were amplified, cloned and sequenced.

Thus, it was compared the degree of genetic differentiation among populations of *An. bellator*. Based on different populations, this study suggests that *An. bellator* is not a complex of cryptic species.

**Keywords:** Malaria, *Anopheles bellator*, speciation, *Rp49* gene, Atlantic Forest, complex of species.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Locais de coleta, Angra dos Reis (Rio de Janeiro) em Ilha Grande, sobre duas regiões: Sítio Forte e Abraão, Cananéia (São Paulo) e Ilha do Mel (Paraná).....35
- Figura 02:** Eletroforese (agarose 1%) dos produtos de PCR purificados do gene *Rp49*.....38
- Figura 03:** Alinhamento de todas as sequências do fragmento do gene *Rp49* utilizadas na análise das populações de *An. bellator*.....39
- Figura 04:** Redes de haplótipos das sequências do fragmento do gene *Rp49*.....40
- Figura 05:** Árvore filogenética das sequências de *An. bellator* utilizando o fragmento do gene *Rp49*.....41





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Reagentes utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR).....	30
<b>Tabela 02:</b> Distância geográfica (em Km) entre as populações analisadas.....	25
<b>Tabela 03:</b> Polimorfismos observados nas quatro populações de <i>An. bellator</i> utilizadas neste estudo utilizando o gene <i>Rp49</i> .....	42
<b>Tabela 04:</b> Diferenciação genética entre as populações de <i>An. bellator</i> utilizando o gene <i>Rp49</i> .....	43



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB: Indivíduos do Abraão

An.: Anopheles

CA: Indivíduos de Cananéia

Da: Número de substituições de nucleotídeos líquido por sítio entre as populações

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês, desoxyribonucleic acid)

DT: Teste de Tajima

Dxy: Média do número de substituições de nucleotídeos por sítio

EDTA – Etileno-diamina-tetra-acetato

FST: Coeficiente de diferenciação genética

IM: indivíduos da Ilha do Mel

LB – meio de cultura Luria-Bertani

Mg: Miligramas

mL: Mililitros

mM: Milimolar

n: Número de sequências de DNA

oligo: do inglês “primer” – oligonucleotídeo ou iniciador

PCR: Reação em cadeia da polimerase (do inglês: Polymerase chain reaction)

pb: pares de base

RPM: Rotações por minuto

S: Número de sítios polimórficos

SF: indivíduos do Sítio Forte

Ss: Número de polimorfismos compartilhados

Sf: Número de diferenças fixas

TAE – tampão Tris base, ácido acético glacial/EDTA

UV: radiação Ultravioleta

X: vezes

µl: microlitro



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 MALÁRIA .....	23
1.2 GÊNERO <i>ANOPHELES</i> .....	23
1.3 COMPLEXOS DE ESPÉCIES .....	24
1.4 GENE <i>RP49</i> .....	26
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
3.1 COLETA DE MOSQUITOS .....	29
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	29
3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	30
3.4 AS CONDIÇÕES PARA REALIZAÇÃO DA PCR.....	30
3.5 ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR .....	31
3.6 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR:.....	31
3.7 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS PURIFICADOS AO VETOR DE CLONAGEM:.....	31
3.8 TRANSFORMAÇÃO .....	31
3.9 INOCULAÇÃO DAS COLÔNIAS.....	32
3.10 MINI PREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL:.....	32
3.11 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS.....	33
3.12 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS: .....	33
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MALÁRIA

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, são cinco as espécies desse gênero que causam a malária em seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. No Brasil são três as espécies associadas à malária: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo que o *P. vivax* é predominante como agente infectante. O *P. ovale* está limitado a algumas regiões do continente africano. O *P. knowlesi* é parasita de macacos, com casos registrados no homem, mas ocorre somente no Sudeste Asiático. A transmissão do parasita é oriunda da picada de fêmeas de diferentes espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* (MS, 2013), pertencentes à família Culicidae e subfamília Anophelinae (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

A malária nos dias atuais é uma doença endêmica em 97 países. Segundo a Organização Mundial de Saúde em 2013, 198 milhões de pessoas foram infectadas e cerca de 584.000 pessoas morreram em consequência dessa doença, 90% dessas mortes ocorreram no continente Africano, sendo que as crianças foram as mais atingidas (WHO, 2014).

Atualmente no Brasil 99% dos casos da doença ocorrem na região Amazônica, considerada uma área endêmica do país. Outros registros são de casos importados de outros países e/ou em áreas de Mata Atlântica como nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (MS, 2013). Embora, no passado outras regiões brasileiras eram consideradas endêmicas na transmissão da malária como em São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, onde as espécies responsáveis pela transmissão da doença eram *Anopheles cruzii*, *Anopheles bellator* e *Anopheles homunculus* (Rachou, 1958).

## 1.2 GÊNERO ANOPHELES

O gênero *Anopheles* possui aproximadamente 500 espécies descritas que encontram-se distribuídas em seis subgêneros. O subgênero *Anopheles* é localizado em várias regiões do mundo; *Cellia* tem distribuição pelo Velho Mundo e os outros subgêneros são Neotropicais: *Lophopodomyia*, *Kerteszia*, *Nyssorhynchus* e *Stethomyia* (Krzywinski e Besansky, 2003; Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

No Brasil, mosquitos dos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* são os responsáveis pela transmissão da malária (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). As espécies do subgênero *Nyssorhynchus* têm como criadouros, locais terrestres com disponibilidade de água como lagoas, rios, valas, escavações, entre outros (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994), e são responsáveis por grande parte dos casos de malária registrados na região Amazônica (Rosa-Freitas *et al.*, 1998), no qual *An. (Nyssorhynchus) darlingi* é o principal transmissor da doença (Rachou, 1958; Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

As espécies do subgênero *Kerteszia* são responsáveis pela transmissão da malária no litoral sul / sudeste do país e nas encostas de serra litorânea nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, onde predominam duas espécies de *Kerteszia*: *An. (Kerteszia) bellator* e *An. (Kerteszia) cruzii* (Coutinho e Rachou, 1966; Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Os mosquitos desse subgênero têm como criadouro águas acumuladas nas bromélias, porém, *An. bellator* é encontrado em bromélias maiores, arborícolas, rupestres ou terrestres e expostas a luz solar, e *An. cruzii* em ambientes sombreados e em bromeliáceas de diversos tamanhos (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

### 1.3 COMPLEXOS DE ESPÉCIES

Para Bickford *et al.* (2007) complexo de espécies crípticas, são duas ou mais espécies distintas que foram classificadas morfológicamente como uma única espécie. Diferentes pesquisas têm colaborado para a identificação de novas espécies dentro dos complexos, podendo ser molecular (sequenciamento do DNA) ou observando ciclo de vida e comportamento (bioacústica, acasalamento, corte).

É comum a ocorrência de complexos de espécies entre os artrópodes, inclusive dentro do gênero *Anopheles* que tem sérias implicações para a saúde humana na transmissão da malária. Assim, reconhecer uma nova espécie é de grande importância epidemiológica, já que pode apresentar diferenças de comportamento, sensibilidade à infecção do protozoário e respostas às medidas de controle (Bickford *et al.*, 2007). Na África, os principais vetores de malária fazem parte do complexo *An. gambiae sensu lato*, formado por um conjunto de ao menos nove espécies crípticas cujos adultos são morfológicamente indistinguíveis entre si (Coetzee *et al.*, 2013; Hunt *et al.*, 1998; White, 1974). Dentre as espécies do complexo, *An. gambiae sensu stricto*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles quadriannulatus* são de água doce; *Anopheles melas* e *Anopheles merus*,



de água salgada; *Anopheles bwambae*, de água salobra, provindo de fontes geotermais (Coetzee *et al.*, 2013). Ainda, *An. gambiae* s.s. apresenta 5 formas cromossômicas, nomeadas Mopti, Savanna, Bamako, Forest e Bissau, cada uma possuindo um conjunto diferente de inversões cromossômicas. Os diferentes arranjos cromossômicos, acredita-se, que facilita a exploração a diferentes nichos ecológicos, e híbridos são raros (Ayala e Coluzzi, 2005; Coluzzi *et al.*, 2002).

Através de estudos moleculares, *An. gambiae* s.s. também já foi subdividido em duas formas moleculares: M e S. Essa separação foi baseada em três regiões diferentes: uma no cromossomo X, e as outras no cromossomo 2, onde foram encontradas diferenças fixas (Turner *et al.*, 2005). Em 2013 os mosquitos com a forma molecular M foram classificados como *An. coluzzii* e a forma molecular S continuou como *An. gambiae* (Coetzee *et al.*, 2013).

Neste complexo de espécies, um dos mais bem estudados atualmente (Huestis e Lehmann, 2014), as diferentes espécies possuem uma série de diferenças, quanto à resistência aos inseticidas por exemplo, e nem todas as espécies são consideradas vetores de malária (Casimiro *et al.*, 2006).

Estudos com espécies pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus*, na região centro-oeste do Brasil, comprovaram a partir de análises dos genes *timeless* e *cpr*, que a espécie *An. triannulatus* é na verdade um complexo de espécies crípticas (Silva-do-Nascimento *et al.*, 2011).

Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2004) sugerem que *An. cruzii*, espécie pertencente ao subgênero *Kerteszia*, também seria um complexo de espécies crípticas, a partir de análises isoenzimáticas em populações dos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Bahia. Os autores concluíram que as três primeiras populações são mais geneticamente ligadas em comparação com a da Bahia.

Ramirez e Dessen (2000) analisando populações de *An. cruzii* dos estados de São Paulo e Santa Catarina, pesquisaram o padrão de bandas dos cromossomos politênicos ovarianos e as frequências de inversões paracêntricas. O resultado caracterizou três formas distintas do cromossomo X, sugerindo um complexo de espécies crípticas.

Ainda, estudos realizados com *An. cruzii* utilizando uma análise multilocus com os genes *cpr*, *timeless*, *clock*, *cycle*, *Rp49*, *RpS2* e *RpS29*, comprovaram os resultados de Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2004), mostrando que a população da Bahia é geneticamente diferente das populações do sul e sudeste do Brasil. Além disso, os resultados também sugerem que a população de Itatiaia (RJ) possui duas espécies incipientes que ocorrem em simpatria, nomeadas provisoriamente de Itatiaia A e Itatiaia B. A conclusão mais plausível é que provavelmente o

complexo *An. cruzii* passou por três principais eventos de cladogênese: i) origem da espécie da Bahia (~2.4 Mya, final do Plioceno); ii) ocorreu ~600 mil anos e separou a população de Itatiaia das outras populações do sul/sudeste; iii) o mais recente (~200 mil anos) originou as duas espécies simpátricas de Itatiaia (Rona *et al.*, 2009b, 2010a, 2010b, 2013).

Apesar da importância epidemiológica de *An. bellator*, considerado junto com *An. cruzii* como um dos principais vetores de malária da Mata Atlântica (Marrelli *et al.*, 2007), os dados disponíveis a respeito deste mosquito são insuficientes. Assim, a variabilidade genética de populações de *An. bellator* é ainda pouco conhecida.

Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2003) utilizando uma análise isoenzimática em populações brasileiras de *An. bellator* provenientes de Santa Catarina, São Paulo e Bahia e uma população da Ilha de Trinidad (República de Trinidad e Tobago) concluíram que essas populações apresentam baixo nível de fluxo gênico, principalmente nas comparações utilizando a população da Ilha de Trinidad, indicando a possibilidade de um processo de especiação recente.

Como exposto acima, pouco se sabe sobre a variabilidade genética das populações brasileiras de *An. bellator*. Com isso, a necessidade de monitoramento dessa espécie se faz necessária, tanto pela persistência da transmissão da malária autóctone, quanto pelo aumento do ecoturismo na região de Mata Atlântica. Por isso, neste projeto, analisamos a diferenciação genética entre diferentes populações de *An. bellator* provenientes de diferentes localidades brasileiras utilizando o gene *Rp49*, já isolado em *An. bellator* (Rona, 2009a), com o objetivo de verificar o quão estruturadas estão estas populações e investigar se *An. bellator* também é um complexo de espécies crípticas como é o caso de *An. cruzii*.

#### 1.4 GENE *RP49*

O gene *Rp49* é um gene nuclear constitutivo que codifica para uma proteína ribossomal, usado repetidamente como um controlador endógeno em experimentos de expressão gênica (Gentile *et al.*, 2005). Em *An. gambiae*, este gene está localizado no braço direito do cromossomo 2 (Mongin *et al.*, 2004). Neste estudo, este gene constitutivo será utilizado para efeito de comparação com outros genes que também estão sendo utilizados em outras análises e que fazem parte do controle do relógio circadiano (*timeless* e *Clock*), o que teoricamente os torna possivelmente envolvidos no isolamento reprodutivo entre espécies próximas.

## 2 OBJETIVOS

- Analisar a diversidade genética de populações provenientes do sul / sudeste do Brasil de *Anopheles bellator*, usando o gene *Rp49* como marcador molecular;
- Averiguar a presença de fluxo gênico e o grau de diferenciação genética entre as populações;
- Examinar a participação de *An. bellator* na formação de um complexo de espécies;
- Comparar a variabilidade genética encontrada em *An. bellator* como a que foi investigada em *An. cruzii*.



### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 COLETA DE MOSQUITOS

Os locais escolhidos para coleta do *An. bellator* foram: Angra dos Reis (Rio de Janeiro) em Ilha Grande (Latitude: 23° 8' 26" S, Longitude: 44° 14' 50" W), sobre duas regiões: Sítio Forte e Abraão, Cananéia - São Paulo (Latitude: 25° 00' 53" S, Longitude: 47° 55' 36" W) e Ilha do Mel – Paraná (Latitude: 25° 32' 7" S, Longitude: 48° 19' 52" W) (Figura 02, Tabela 01).

Os mosquitos foram coletados de duas maneiras diferentes: na primeira delas, as fêmeas foram capturadas dentro da mata, com auxílio de isca luminosa e aspirador manual, a coleta teve seu início antes do por do sol e se estendeu por duas a três horas. No segundo tipo de coleta, larvas foram coletadas em água de bromélia com auxílio de sugador. Essa água foi armazenada em garrafas e posteriormente despejada em uma bandeja para triagem das larvas, as quais foram capturadas com pipeta de *Pasteur*, transferidas para recipientes de plástico e transportadas ao insetário, onde foram criadas até atingir a fase adulta. Posteriormente, os adultos provenientes dos dois tipos de coleta foram identificados com auxílio de lupa e chave dicotômica de identificação (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994) e transferidos para frascos contendo etanol 70%.

#### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA genômico foi realizada individualmente através do *kit DNeasy Blood and Tissue*, da Qiagen. Para acessar o DNA, os mosquitos foram macerados em 180 µL de solução tampão de lise celular (ATL buffer) e 20 µL de proteinase K. Depois, as amostras foram incubadas em Banho Maria à 56 °C por dez minutos e homogeneizado em vortex. Em seguida foram adicionado 200 µL de buffer AL e novamente homogeneizado em vortex, incubado em Banho Maria por mais dez minutos e adicionado 200 µL de etanol e homogeneizado em vortex. Posteriormente, para remoção de restos celulares foram utilizados tubos coletores com membranas de sílica e centrifugado a 8.000 RPM por 1 minuto, foi acrescentado à mistura 500 µL de buffer AW1, centrifugado novamente e adicionado 500 µL de Buffer AW2. Para diluir o DNA foram utilizados 200 µL de buffer AE. Após a extração, os tubos contendo o DNA extraído foram armazenados no freezer -20°C.

### 3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Na realização da PCR foi usado a enzima *Pfu* DNA polimerase (Thermo scientific) que possui atividade *proofreading*. Para isolar o gene *Rp49* foram utilizados oligos específicos de *Anopheles aquasalis* e *Aedes aegypti* (Gentile *et al.*, 2005):

5'aquaRP1 - GTGAAGAAGCGGACGAAGAAGTT

3'aeaquaRP1b - TCATCAGCACCTCCAGCTC

A tabela 02 mostra os reagentes utilizados, a quantidade e as concentrações para a obtenção da reação em cadeia da polimerase.

**Tabela 01:** Reagentes utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

REAGENTES	1 tubo
H <sub>2</sub> O milli-Q	28 µL
Tampão de PCR com Mg (10x)	4,0 µL
dNTP (25mM de cada nucleotídeo)	1,0 µL
Oligo 3' (10 µM)	2,0 µL
Oligo 5' (10 µM)	2,0 µL
<i>Pfu</i> DNA polimerase (1 unidade / µl)	1 µL
*DNA genômico (~ 50ng / µl)	2,0 µL
Total	40 µL

\*Para todas as reações em cadeia da polimerase foram realizados controle negativo livre de DNA genômico.

### 3.4 AS CONDIÇÕES PARA REALIZAÇÃO DA PCR

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo inicial de 94 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos. Após as reações de PCR, a

visualização dos produtos amplificados na reação foi feita por eletroforese em gel de agarose.

### 3.5 ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR

Para observar a presença de fragmentos de DNA, o gel de agarose foi preparado a uma concentração de 1%, e para visualização em UV foi incluído 1  $\mu\text{L}$  de Gel Red 1000x in DMSO. Como tampão de corrida foi utilizado TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA). Para a aplicação das amostras no gel, foram acrescentados 2,0  $\mu\text{L}$  de corante Loading Dye 6 x em 10  $\mu\text{L}$  do produto de PCR. O aparelho de eletroforese foi ajustado em 110 V por 60 minutos.

### 3.6 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR:

Após a visualização em gel de agarose dos fragmentos de DNA amplificados, os mesmos foram purificados utilizando o “*QIAquick PCR Purification Kit*” da QIAGEN seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizado novamente o gel de agarose 1% com 1  $\mu\text{L}$  de Gel Red 1000x in DMSO para a visualização do DNA purificado.

### 3.7 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS PURIFICADOS AO VETOR DE CLONAGEM

A clonagem foi obtida a partir da utilização do kit “*Clone JET PCR Cloning #K1231*” (Thermo). Esse kit apresenta seleção positiva de clonagem no vetor pJET1.2/blunt, que inclui um gene letal que é interrompido pela ligação de um DNA inserido no sítio de clonagem, fazendo com que apenas as células com os plasmídeos recombinantes sejam capazes de se propagar. Para a reação de ligação foram utilizados os seguintes reagentes: 5  $\mu\text{L}$  de Buffer, 2  $\mu\text{L}$  de água, 2  $\mu\text{L}$  do produto de PCR purificado, 0,5  $\mu\text{L}$  do vetor pJET1.2/blunte 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima T4 ligase. As amostras foram incubadas a 22 °C por 30 minutos. Esse procedimento foi realizado com seis indivíduos de cada população e de cada indivíduo, oito clones foram sequenciados para a obtenção dos dois alelos e para minimizar os erros induzidos pelo PCR.

### 3.8 TRANSFORMAÇÃO

Na transformação foram homogeneizados delicadamente 3  $\mu\text{L}$  de ligação em 100  $\mu\text{L}$  de células DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. A mistura ficou no gelo por 30 minutos, e após esse período a mistura foi para o banho maria a 42 °C por 1 minuto. Posteriormente, as células foram levadas ao gelo por 2 minutos. Então, foi adicionado 1 mL de meio SOC. Os tubos foram deixados na estufa a 37 °C durante uma hora. Depois, foram centrifugados a 13.000 RPM por 30 segundos, a maioria do sobrenadante foi descartado e o restante foi homogeneizado com cuidado juntamente com o “*pellet*”. As células foram inoculadas em placa de Petri com meio LB (Lúria-Bertani) sólido e ampicilina (400  $\mu\text{L}$  / mL). Então, as placas permaneceram na estufa a 37°C por 12 horas para o crescimento das colônias.

### 3.9 INOCULAÇÃO DAS COLÔNIAS

Em placa “*deepwell*” as colônias foram selecionadas e inoculadas individualmente utilizando 1 ml da seguinte solução: 200 mL de meio LB (Lúria-Bertani) líquido com 800  $\mu\text{L}$  / mL de ampicilina. As placas foram lacradas com fita adesiva e perfuradas a cada poço, para proporcionar a entrada de oxigênio. As placas ficaram incubadas a 37 °C por 22 horas em um agitador a 200 RPM. Na sequência foram centrifugadas a 4.000 RPM por 6 minutos à 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o “*pellet*” armazenado no freezer até a mini preparação do DNA plasmidial.

### 3.10 MINI PREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

A mini preparação do DNA plasmidial foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, em cada poço das placas “*deepwell*” as células foram ressuspendidas com 240  $\mu\text{L}$  de GET (glicose, EDTA, Tris). Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 20°C por 9 minutos a 4.000 RPM, o sobrenadante foi descartado e as placas permaneceram invertidas sobre papel absorvente por cerca de 5 minutos. Foi adicionado em cada poço, uma solução contendo 80 $\mu\text{l}$  de GET e 3  $\mu\text{L}$  de RNase a 10 mg / mL para a suspensão das células, que foram transferidas para uma microplaca. Então, foi adicionado em cada poço 80  $\mu\text{L}$  de NaOH (0,2N/SDS 1%). As placas foram seladas com adesivo e homogeneizadas por inversão (aproximadamente 30 vezes), foram centrifugadas rapidamente até 2.000 RPM e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi acrescentado a cada poço 80  $\mu\text{L}$  de KOAc 3M gelado, as placas foram seladas e misturadas novamente por inversão e incubadas



por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação foi centrifugado a 4.000 RPM por 30 segundos. As placas foram armazenadas a -80 °C. Na segunda etapa, as placas foram descongeladas naturalmente e centrifugadas 4.000 RPM por 30 segundos, o adesivo foi removido e as placas foram incubadas em estufa a aproximadamente 90 °C por 45 minutos. Então, foram resfriadas e centrifugadas a 4.000 RPM, por 9 minutos a 20 °C. Todo o volume do sobrenadante foi transferido para uma placa Millipore fixada na parte superior de uma placa de fundo “v” de 250 µL de polipropileno, onde foram centrifugadas a 4.000 RPM por 6 minutos a 20 °C. Em seguida, foi removida a placa Millipore e adicionado 100 µL de isopropanol (Merck) gelado ao filtrado restante na placa de fundo “v”. Esta, foi selada e homogeneizada por inversão (aproximadamente 30 vezes) e em seguida incubada a temperatura ambiente por 15 minutos e então, centrifugada a 4.000 RPM por 45 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200 µL de etanol 70% (Merck) gelado. A placa foi novamente selada e centrifugada a 4.000 RPM por 5 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado imediatamente e a placa foi colocada invertida sobre papel absorvente e centrifugada até 900 RPM. Para secar, a placa foi deixada para cima a temperatura ambiente por 60 minutos. O DNA foi suspenso em 40 µL de água MiliQ. A placa foi coberta com adesivo e colocada a temperatura ambiente até o dia seguinte. Posteriormente foi acondicionada a -20°C até o sequenciamento.

### 3.11 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS

As placas foram enviadas para empresa Myleus biotecnologia que sequenciou os fragmentos de DNA por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando polímero POP7 e BigDye v3.1.

### 3.12 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

A análise das sequências obtidas foi realizada através dos seguintes programas: DNA Star para edição e análise dos oitos clones de cada indivíduo, no qual, verificou-se a diferença alélica, e em seguida foi realizado um consenso dessas sequências, onde os indivíduos homozigotos permaneceram com uma sequência e os heterozigotos com duas sequências. Para prosseguir com as outras análises o número de sequências de cada indivíduo deve ser a mesma, então para os homozigotos as sequências foram duplicadas, além disso, as sequências

de cada alelo foram nomeadas de a e b, o BLAST para comparar as seqüências com os bancos de dados que está disponível no site: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST); ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) para o alinhamento das seqüências; DNASP.5 (Librado e Rosa, 2009) e PROSEQ (Filatov e Charlesworth, 1999) para análise dos polimorfismos foram estimados os seguintes parâmetros populacionais: número de sítios polimórficos (S), diversidade nucleotídica baseado no número de diferenças par-a-par ( $\pi$ ) e baseado no número total de mutações ( $\theta$ ). Foi realizado também um teste de neutralidade (Teste *D* de Tajima) para testar a hipótese de evolução neutra das seqüências. E para a diferenciação genética entre as populações foram estimados os seguintes parâmetros populacionais, o *Fst*, medida da diferenciação genética entre as populações; P-value, significância dos valores de *Fst*. As significâncias nos valores de *Fst* foram avaliados com 1000 permutações. *Dxy*, divergência bruta entre as populações; *Da*, divergência líquida entre as populações. *Ss*, número de polimorfismos compartilhados entre as populações. *Sf*, número de diferenças fixas entre as populações.

Para construção da árvore filogenética foi utilizado o programa MEGA.6 (Tamura *et al.*, 2007) e para a construção da rede de haplótipos foi utilizado o programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000).

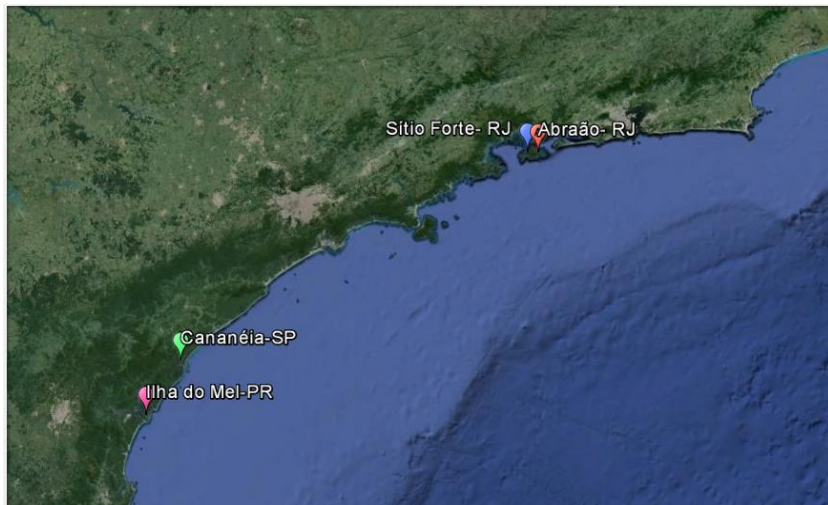
**Tabela 02:** Distância geográfica (em Km) entre as populações analisadas.

	<b>Abraão</b>	<b>Sítio Forte</b>	<b>Cananéia</b>	<b>Ilha do Mel</b>
<b>Abraão</b>	-	11	433	497
<b>Sítio Forte</b>		-	428	490
<b>Cananéia</b>			-	65
<b>Ilha do Mel</b>				-

Fonte: Entre cidades

Disponível: <http://www.entrecidadesdistancia.com.br>

**Figura 01:** Locais de coleta, Angra dos Reis (Rio de Janeiro) em Ilha Grande, sobre duas regiões: Sítio Forte e Abraão, Cananéia (São Paulo) e Ilha do Mel (Paraná).



Fonte: Google Maps



## 4 RESULTADOS

Foram analisadas um total de 38 seqüências, nas quais 10 são provenientes da população de Abraão e 10 de Sítio Forte (diferentes regiões de Ilha Grande / Angra dos Reis - RJ), 8 de Cananéia - SP e 10 da Ilha do Mel – PR (Figura 01).

Os fragmentos gerados pelo gene *Rp49* possuem aproximadamente 300 pares de bases (Figura 02).

O alinhamento dessas seqüências pode ser analisado na Figura 03, que mostra as regiões codificantes de proteína (éxon) e as não codificantes (íntron).

Este fragmento do gene *Rp49* se mostrou pouco polimórfico. Dos 269 sítios analisados, apenas 06 possuem polimorfismos. As substituições de base presentes nos éxons ocorreram no sítio 23 (indivíduo 04 da Ilha do Mel), no sítio 16 (indivíduo 53 do Sítio Forte), no sítio 134 (indivíduos 06 e 14 do Abraão e 22 e 32 do Sítio Forte), e no sítio 155 (indivíduos 01, 02 e 04 da Ilha do Mel e 49 do Sítio Forte). No íntron também ocorreu substituição de base no sítio 99 (indivíduos 28 e 29 do Abraão) e no sítio 96 (indivíduos 01 e 03 de Cananéia e 04 da Ilha do Mel) (Figura 03).

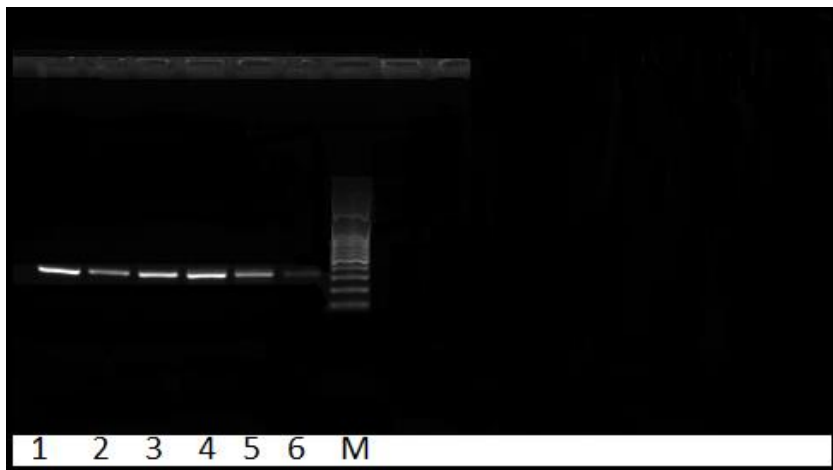
A Tabela 03 mostra os polimorfismos encontrados nas populações analisadas, as populações da Ilha do Mel e Sítio Forte são as mais polimórficas, apresentando os maiores valores de  $S$ ,  $\pi$  e  $\theta$ . Além disso, nenhuma das populações obteve valores significativos no teste  $D$  de Tajima ( $P > 0.10$ ), que foi calculado usando o número total de mutações. Dessa forma, não há evidência de que haja seleção natural agindo sobre as seqüências estudadas em nenhuma das populações.

A Tabela 04 mostra os valores de diferenciação genética entre as populações, foram encontrados valores significativos de  $F_{st}$  ( $P < 0,05$ ) nas comparações entre as populações do Abraão e Cananéia, Abraão e Ilha do Mel, Cananéia e Sítio Forte, e Ilha do Mel e Sítio Forte, na qual a comparação de Cananéia e Sítio Forte foi a que apresentou o valor de  $F_{st}$  mais alto. Os valores de  $D_{xy}$  e  $D_a$  foram bem baixos, quanto aos valores de polimorfismo compartilhado somente as comparações de Abraão e Sítio Forte, Cananéia e ilha do Mel, e Ilha do Mel e Sítio Forte apresentaram 01 polimorfismo compartilhado ( $S_s$ ). Além disso, as populações analisadas não apresentaram nenhuma diferença fixa ( $S_f$ ).

A rede de haplótipos (Figura 04) e a árvore filogenética (Figura 05) refletem os resultados obtidos na Tabela 04, onde o agrupamento dos indivíduos se deu de forma homogênia, mostrando que não há diferenciação genética entre as populações analisadas e que elas são geneticamente muito próximas. Ainda, a rede de haplótipos resultou em

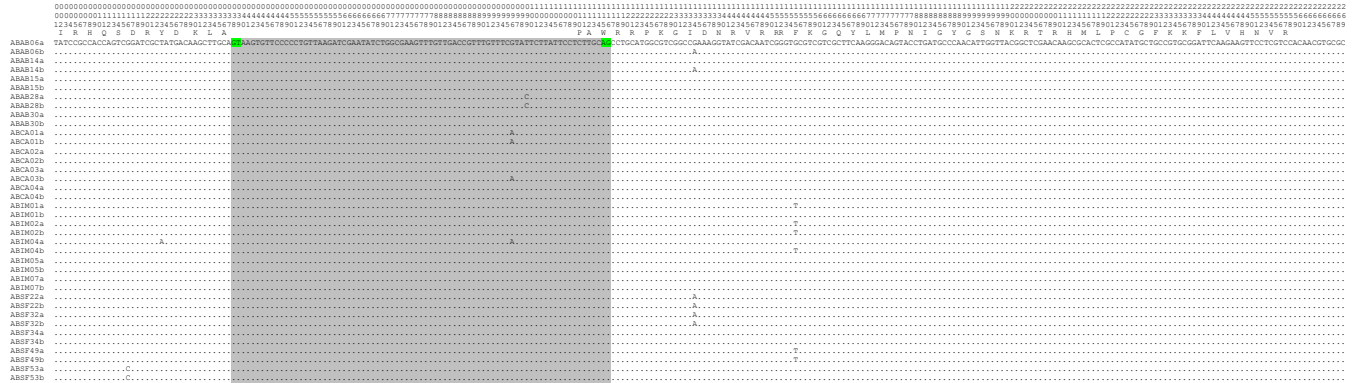
apenas sete haplótipos diferentes, refletindo a baixa variabilidade encontrada neste fragmento do gene *Rp49*.

**Figura 02:** Eletroforese (agarose 1%) dos produtos de PCR purificados do gene *Rp49* do DNA genômico de *Anopheles bellator* da Ilha do Mel utilizando os oligos 5'aquaRP1 x 3'aeaquaRP1b (Gentile *et al.*, 2005). 1-6: indivíduos da Ilha do Mel. M – Marcador de peso molecular (100 pares de base). As amostras possuem aproximadamente 300 pares de base.



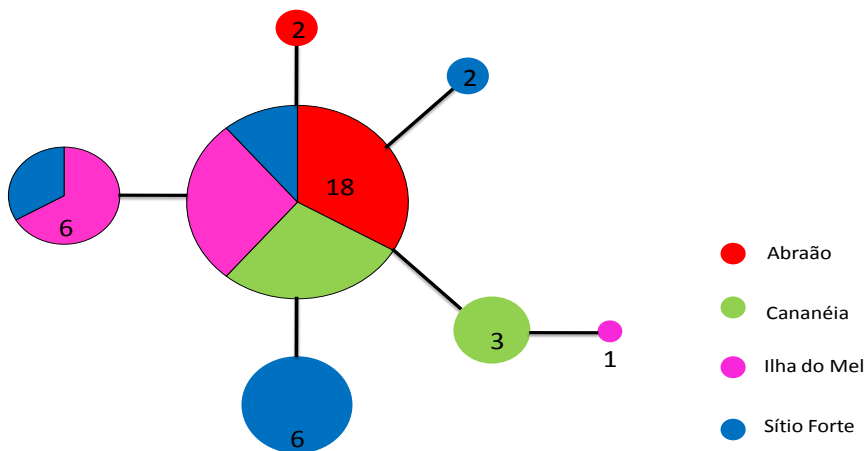
Fonte: Roberta de Oliveira Ferreira.

**Figura 03:** Alinhamento de todas as seqüências do fragmento do gene *Rp49* utilizadas na análise das populações de *An. bellator*. A parte em cinza representa o íntron e as partes em branco o éxon. As caixas verdes com as letras GT representam o início do íntron e a caixa AG o final. **ABAB:** indivíduos de Abraão; **ABCA:** indivíduos de Cananéia; **ABIM:** indivíduos da Ilha do Mel; **ABSF:** indivíduos de Sítio Forte.



Fonte: Programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1997). Roberta de Oliveira Ferreira.

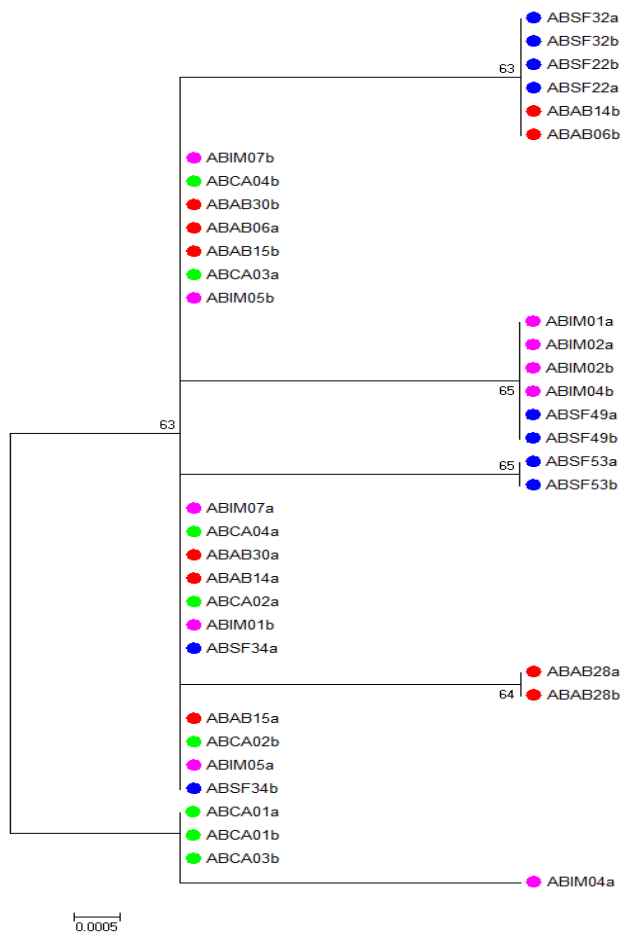
**Figura 04:** Redes de haplótipos das sequências do fragmento do gene *Rp49*. Cada população de *An. bellator* está representado por uma cor. Os números indicam a quantidade de sequências em cada haplótipo. Cada traço representa um passo mutacional.



Fonte: Programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Roberta de Oliveira Ferreira.



**Figura 05:** Árvore filogenética das seqüências de *An. bellator* utilizando o fragmento do gene *Rp49*, obtida com o método Neighbour-Joining e distância Kimura 2-parâmetros, estimadas par-a-par. Os números acima dos ramos são os valores de “*bootstrap*”, baseados em 1000 replicações. **Azul:** indivíduos de Sítio Forte; **Vermelho:** indivíduos de Abrão; **Rosa:** indivíduos da Ilha do Mel; **Verde:** indivíduos de Cananéia.



Fonte: Programa MEGA.6 (Tamura *et al.*, 2007).

**Tabela 03: Polimorfismos observados nas quatro populações de *An. bellator* utilizadas neste estudo utilizando o gene *Rp49*.**

*N*, número de sequências de DNA de cada população; *S*, número de sítios polimórficos;  $\theta$ , diversidade de nucleotídeos com base no número total de mutações (ETA);  $\pi$ , diversidade de nucleotídeos com base no número médio de diferenças par-a-par;  $D_T$ , Teste *D* de Tajima (1989).

<b>População</b>	<i>N</i>	<i>S</i>	$\theta$	$\pi$	$D_T$
<b>Abraão</b>	10	02	0,00263	0,00264	0,01889
<b>Cananéia</b>	08	01	0,00143	0,00199	1,16650
<b>Ilha do Mel</b>	10	03	0,00394	0,00347	-0,43130
<b>Sítio Forte</b>	10	03	0,00394	0,00463	0,62422

Fonte: Programas DNASP.5 (Librado e Rosa, 2009) e PROSEQ (Filatov e Charlesworth, 1999).  
Roberta de Oliveira Ferreira.

**Tabela 04: Diferenciação genética entre as populações de *An. bellator* utilizando o gene *Rp49*.** *Fst*, medida da diferenciação genética entre as populações. *P-value*, significância dos valores de *Fst*. As significâncias nos valores de *Fst* foram avaliados com 1000 permutações. *Dxy*, divergência bruta entre as populações; *Da*, divergência líquida entre as populações. *Ss*, número de polimorfismos compartilhados entre as populações. *Sf*, número de diferenças fixas entre as populações.

<b>Populações</b>	<i>Fst</i>	<i>P-value</i>	<i>Dxy</i>	<i>Da</i>	<i>Ss</i>	<i>Sf</i>
<b>Abrão X Cananéia</b>	0,1956	0,0370	0,0029	0,0006	00	00
<b>Abraão X Ilha do Mel</b>	0,1778	0,0000	0,0037	0,0007	00	00
<b>Abraão X Sítio Forte</b>	0,0598	0,1730	0,0039	0,0002	01	00
<b>Cananéia X Ilha do Mel</b>	0,1839	0,0990	0,0033	0,0006	01	00
<b>Cananéia X Sítio Forte</b>	0,2425	0,0000	0,0044	0,0011	00	00
<b>Ilha do Mel X Sítio Forte</b>	0,1219	0,0440	0,0046	0,0006	01	00

Fonte: Programas DNASP.5 (Librado e Rosa, 2009) e PROSEQ (Filatov e Charlesworth, 1999). Roberta de Oliveira Ferreira.



## 5 DISCUSSÃO

Os anofelinos do subgênero *Kerteszia* desenvolvem grande parte do seu ciclo de vida em criadouros do tipo "recipiente natural", principalmente em água acumulada em bromélias. As principais espécies deste subgênero responsáveis pela transmissão da malária são *Anopheles (Kerteszia) bellator* e *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Coutinho e Rachou, 1966; Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Quanto à distribuição geográfica, eles são encontrados em todo litoral brasileiro, sendo que *An. cruzii* é predominante nas florestas e *An. bellator* nas encostas. Por isso, as larvas de *An. cruzii* são preferencialmente encontradas em bromélias epífitas e terrestres em locais sombreados, enquanto que *An. bellator* prefere as bromélias rupestres, epífitas ou terrestres, com mais exposição aos raios solares (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Dessa maneira, *An. bellator* possui um nicho mais restrito comparado ao de *An. cruzii* (Veloso *et al.*, 1956). Isto explicaria o baixo polimorfismo encontrado em *An. bellator* neste estudo, assim como foi proposto por Ramirez e Dessen (1996), analisando cromossomos politênicos de *An. cruzii* e de *An. bellator* provenientes das mesmas localidades, observaram que as populações de *An. cruzii* mostraram um alto grau de polimorfismo cromossômico quando comparado com *An. bellator*. E por Rona (2005) utilizando o gene *timeless* para comparar a diversidade genética entre uma população de *An. bellator* com diferentes populações de *An. cruzii*, verificou que *An. bellator* apresentou os menores valores de diversidade nucleotídica, sendo portanto, menos polimórfica que todas as populações de *An. cruzii* estudadas. Foi proposto por essas autoras que o baixo polimorfismo nas inversões cromossômicas e a pouca diversidade nucleotídica encontrada em *An. bellator* pode ser uma consequência da reduzida diversidade de microhabitats que esta espécie ocupa quando comparado com *An. cruzii* (Ramirez e Dessen, 1996; Rona, 2005).

Comparando os resultados obtidos neste estudo com aqueles encontrado por Rona *et al.* (2010a) em uma análise *multilocus* com duas populações de *An. cruzii*, uma de Florianópolis (Santa Catarina) e outra de Itaparica (Bahia), utilizando o mesmo fragmento de gene *Rp49* deste estudo, observou-se valores de  $\pi$  e  $\theta$  maiores nas populações de *An. cruzii* do que os encontrados neste estudo para *An. bellator*. A média da diversidade nucleotídica, por exemplo, utilizando as duas populações de *An. cruzii* foram maiores ( $\pi= 0.00763$  e  $\theta= 0.01024$ ) quando comparada com a média dos valores obtidos neste estudo para *An. bellator* ( $\pi= 0.00318$  e  $\theta = 0.00298$ ).

Rona (2009a) a partir de uma análise *multilocus*, comparando a diferenciação genética entre populações de *An. cruzii* uma de Florianópolis – SC e outra de Itaparica - Ba, também utilizou o mesmo marcador molecular deste estudo, o gene *Rp49*, onde o valor de diferenciação genética (*Fst*) foi muito alto 0,8854, além disso apresentaram 12 diferenças fixas (*Sf*) e nenhum polimorfismo compartilhado (*Ss*), sugerindo que as populações são geneticamente diferentes.

Hey e Pinho (2012), concluíram que um *Fst* maior que 0,35 seria um diagnóstico de espécie críptica, apesar da maioria das comparações deste estudo apresentarem valores de *Fst* significativos nenhuma das comparações obtiveram valores acima de 0,35, a comparação que mostrou o valor de *Fst* mais alto foi de Cananéia e Sítio Forte com um *Fst* de 0,2425, e ainda as comparações não apresentaram diferença fixa e pouco polimorfismo compartilhado, diferente de Rona (2009a) que obteve muitas diferenças fixas e nenhum polimorfismo compartilhado.

Comparando os resultados obtidos neste estudo utilizando o gene *Rp49* com os resultados obtidos em outros experimentos utilizando genes envolvidos nos ritmos circadianos (*timeless* e *Clock*) e com as mesmas populações de *An. bellator* (dados não publicados), os genes *timeless* e *Clock* não apresentaram valores de *Fst* significativos.

Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2003) utilizando uma análise isoenzimática em populações brasileiras de *An. bellator* provenientes de Santa Catarina, São Paulo e Bahia, e uma população da Ilha de Trinidad (República de Trinidad e Tobago) calcularam a distância genética entre estas populações, e no geral encontraram um baixo nível de fluxo gênico nas comparações com a população Bahia e ainda menor nas comparações com a população da Ilha de Trinidad. Neste estudo, apesar da distância geográfica entre os locais de coleta ser considerável, os resultados mostraram pouca diferenciação genética entre as populações analisadas, sugerindo que as populações de *An. bellator* utilizadas neste estudo constituem em uma única espécie. No entanto, as populações provenientes da Bahia e da Ilha de Trinidad analisadas por Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2003) não foram utilizadas neste estudo.

A diversificação dentro do subgênero *Kerteszia* é relativamente recente (2-14,2 MYA) comparada a outros grupos de *Anophelinae* (Lorenz *et. al*, 2015) e pode estar intimamente ligada a dispersão das bromélias na América do sul, que ocorreu há aproximadamente 9,1 MYA (Giynish *et. al*, 2011). Durante os últimos três milhões de anos ocorreram modificações climáticas que proporcionaram eventos de especiação incluindo os insetos (Hewitt, 2000), o que explicaria a recente radiação do

grupo *Kerteszia* (Lorenz *et. al*, 2015). Ainda, em estudos anteriores, Rona *et al.* (2010a) sugere que a divergência entre as espécies dentro do complexo *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, ocorreu entre 1,1-3,6 MYA. Por essa razão, em estudos futuros seria interessante investigar se *An. bellator* é uma espécie mais recente dentro deste subgênero, o que explicaria a razão de *An. bellator* ser uma espécie pouco polimórfica quando comparada com outras espécies do mesmo subgênero, e também continuar com o estudo em outras populações de *An. bellator*, como a população proveniente da Bahia por exemplo, para verificar se esta espécie faz realmente parte de um complexo de espécies crípticas, como sugerido por Carvalho-Pinto & Lourenço-de-Oliveira (2004).





## 6 CONCLUSÃO

As populações analisadas se apresentaram pouco polimórficas quando comparadas com populações de *An. cruzii*, assim como nos estudos de Ramirez e Dessen (1996) e Rona (2005).

Apesar dos resultados de diferenciação genética entre as populações apresentarem valores significativos de *Fst*, parâmetros comparativos como o de diferença fixa (*Sf*) entre as populações e o número de polimorfismo compartilhado (*Ss*) não corroboram para um diagnóstico de espécie críptica, portanto, as populações de *An. bellator* estudadas não fazem parte de um complexo de espécies crípticas.



## 7 REFERÊNCIAS

- Ayala FJ, Coluzzi M: **Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes.** *Proc Natl AcadSci U S A* 2005, 1:6535-6542.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I: **Cryptic species as a window on diversity and conservation.** *Trends in Ecology and Evolution* 2007, 22 (3): 148-155.
- Carvalho-Pinto CJ, Lourenço-de-Oliveira R: **Isoenzymatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) bellator* Dyar & Knab (Diptera: Culicidae) populations.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, 98:1045-1048.
- Carvalho-Pinto CJ, Lourenço-de-Oliveira R: **Isoenzymatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, 99:471-475.
- Casimiro S, Coleman M, Hemingway J, Sharp B: **Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* from Mozambique.** *Journal of Medical Entomology* 2006, 43 (2):276-282.
- Clement M, Posada D, Crandall KA: **TCS: a computer program to estimate gene genealogies.** *Molecular Ecology* 2000, 9: 1657-1659.
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly MB, Besansky NJ: ***Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex.** *Zootaxa* 2013, 3619:246-274.
- Coluzzi M, Sabatini A, Della Torre A, Di Deco MA, Petrarca V: **A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex.** *Science* 2002, 298:1415-1418.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. 1994.
- Coutinho JO, Rachou R: **Dados sobre a biologia e a capacidade vetora de malária dos anofelinos do sub-gênero *Kerteszia* em condições naturais.** *Rev Bras Malariol Doen Trop* 1966, 18:557-579.

Filatov DA, Charlesworth D: **DNA polymorphism, haplotype structure and balancing selection in the *Leavenworthia* PgiC locus.** *Genetics* 1999, **153**:1423-1434.

Gentile C, Lima JBP, Peixoto AA: **Isolation of a fragment homologous to the *rp49* constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae).** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 2005, **100**(6): 545-547.

Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ: **Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny.** *Am. J. Bot.* 2011, **5**: 872–895.

Hewitt G: **The genetic legacy of the Quaternary ice ages.** *Nature.* 2000, **405**: 907–913.

Hey J, Pinho C: **Population genetics and objectivity in species diagnosis.** *Evolution* 2012, **66**:1413–1429.

Huestis LD, Lehmann T: **Ecophysiology of *Anopheles gambiaes.l.*: Persistence in the Sahel.** *Infection, Genetics and Evolution* 2014, **28**:648-661.

Hunt RH, Coetzee M, Fittene M: **The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia.** *Tran R Soc Trop Med Hyg* 1998, **92**:231-235.14.

Krzywinski J, Besansky NJ: **Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations.** *Annu Rev Entomol* 2003, **48**:111-139.

Librado P, Rozas J: **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics* 2009, **25**:1451-1452.

Lorenz C, Patane JSL, Suesdek L: **Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*.** *Infection, Genetics and Evolution* 2015, **35**:144–152.

Marrelli TM, Malafrente SR, Sallum MAM, Natal D: ***Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges.** *Malaria Journal* 2007, **6**:127.

Mongin E, Louis C, Holt RA, Birney E, Collins FH. **The *Anopheles gambiae* genome: an update.** *Trends Parasitol.* 2004, **20**:49-52.

MS 2013. Secretaria de vigilância em saúde. Ministério da saúde (Portal do MS). Boletim Epidemiológico de Situação da malária no Brasil, 2000 a 2011. Acesso em 02 de outubro de 2015 [<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/30/boletim-epidemiol--gico-1-de-2013-malaria.pdf>]

Rachou RG: **Anofelinos do Brasil: Comportamento das espécies vetoras de malária.** *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1958, **10**:145-181.

Ramirez CCL, Dessen EMB: **The polytene chromosomes of the mosquito *Anopheles bellator* compared with those of *Anopheles cruzii*.** *Braz. J. Genet* 1996, **19**:555-558.

Ramirez CCL, Dessen EMB: **Chromosome differentiated populations of *Anopheles cruzii*: evidence for a third sibling species.** *Genetica* 2000, **108**:73- 80.

Rona LDP: **Análise da diferenciação genética entre populações de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* do sul e sudeste do Brasil e sua divergência de *An. (Kerteszia) bellator* utilizando o gene *timeless* como marcador molecular (Diptera: Culicidae).** Dissertação de mestrado. IOC-FIOCRUZ, 2005, Rio de Janeiro. 61p.

Rona LDP: **Análise da diferenciação molecular entre populações brasileiras de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* utilizando uma abordagem multilocus (Diptera: Culicidae).** Tese do Doutorado. IOC-FIOCRUZ, 2009a Rio de Janeiro. 160p.

Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Gentile C, Grisard EC, Peixoto AA: **Assessing the molecular divergence between *Anopheles (Kerteszia) cruzii* populations from Brazil using the *timeless* gene: further evidence of a species complex.** *Malaria Journal* 2009b, **8**:60.

Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Mazzoni CJ, Peixoto AA: **Estimation of divergence time between two sibling species of the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex using a multilocus approach.** *BMC EvolBiol* 2010a, 10:91.

Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Peixoto AA: **Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex in south-east Brazil.** *MalariaJournal* 2010b, 9:33.

Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Peixoto AA: **Evidence for the occurrence of two sympatric sibling species within the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex in southeast Brazil and the detection of asymmetric introgression between them using a multilocus analysis.** *BMC EvolBiol* 2013, 13:207.

Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento T: ***Anopheline* Species Complexes in Brazil. Current Knowledge of Those Related to Malaria Transmission.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998, 93:651-655.

Silva-do-Nascimento TF, Pitaluga LD, Peixoto AA, Lourenço-de-Oliveira R: **Molecular divergence in the *timeless* and *cpr* genes among three sympatric cryptic species of the *Anopheles triannulatus* complex.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011, 106: 218-222.

Tajima F: **Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism.** *Genetics* 1989, 123:585-595.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *MolBiolEvol*2007, 24:1596-1599.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG: **The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Res* 1997, 25:4876-4882.

Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV: **Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae*.** *PLoS Biol* 2005, 3: 285.

Veloso HP, Moura JV, Klein RM: **Delimitação ecológica dos anofelíneos do subgênero *Kerteszia* na região costeira do sul do Brasil.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz 1956, 54: 517-549.

White, GB: **Anopheles gambiae complex and disease transmission in Africa.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1974, 68: 278-298.

WHO 2014. World Health Organization (WHO Home page). World Malaria Report 2014. Acesso em 05 de outubro de 2015 [[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf?ua=1)].