

Kamila Voges

**ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE  
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *ANOPHELES (KERTESZIA)*  
*BELLATOR* UTILIZANDO O GENE *CLOCK***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito para  
cumprimento da disciplina TCC II  
(BIO7016) do currículo do Curso de  
Graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina

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

Coorientador: 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.

Voges, Kamila

Análise da diferenciação genética entre populações  
brasileiras de *Anopheles (Kerteszia) bellator* utilizando o  
gene clock / Kamila Voges ; orientadora, Luisa Damazio  
Rona Pitaluga ; coorientadora, Carlos José de Carvalho  
Pinto. - Florianópolis, SC, 2016.  
63 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. Malária. 3. *Anopheles  
bellator*. 4. Complexo de espécies. I. Damazio Rona  
Pitaluga, Luisa . II. de Carvalho Pinto, Carlos José. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Ciências Biológicas. IV. Título.

Kamila Voges

**ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE  
POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *ANOPHELES (KERTESZIA)*  
*BELLATOR* UTILIZANDO O GENE *CLOCK***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para o cumprimento da disciplina TCCII (BIO7016) e aprovado em sua forma final pela banca Examinadora.

Florianópolis, 7 de Julho de 2016.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Risoleta F. Marques  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ilíada Rainha de  
Souza  
UFSC

---

Prof. Dr Geison Souza Izídio  
UFSC

---

Msc.Mayara Thais Fernandes  
UFSC



Este trabalho é dedicado aos amigos e  
aos meus pais.



## AGRADECIMENTOS

É com um misto de alegria e tristeza que encerro mais esta etapa de minha graduação. Mas, sem sombra de dúvidas o sentimento que predomina neste momento é o de gratidão! Agradeço imensamente a todos os que contribuíram de algum modo para realização deste trabalho.

Agradeço primeiramente a minha família e amigos que sempre torceram por mim e me deram apoio. Em especial a minha mãe, que me educou e me ensinou a ser forte e lutar pelos meus objetivos, estando sempre ao lado, não só neste momento, mas, durante toda minha vida.

Agradeço ao Cnpq, a Universidade Federal de Santa Catarina, e a todos os professores que participaram desta trajetória. Principalmente a minha orientadora Luísa Damazio Rona Pitaluga pela paciência, dedicação, por tudo que me ensinou, e que é sem dúvida um exemplo para mim e alguém que eu admiro muito. E ao meu coorientador Carlos José de Carvalho Pinto pelas identificações, dicas, apoio e risadas.

Agradeço também ao meu professor de biologia do ensino médio Fernando Maciel Brüggemann.

Ao longo destes cinco anos foram muitas as pessoas que marcaram de alguma forma, porém cito apenas alguns nomes, mas agradeço a todas, pelo carinho, ensinamentos, amizade e companheirismo, vocês foram fundamentais. A todos os amigos: as meninas de Rancho e as que moraram comigo pelas conversas, incentivo e companheirismo. Aos amigos que fiz durante a graduação, em especial ao Rafa, Beta e Marcela pelo amizade, apoio, carinho, e pelas boas e novas experiências, que possamos levar essa amizade para vida.

Ao pessoal do LAGEV e LAPOGE. Obrigada também a Carime, Laís e toda a galera da PROTO por estarem sempre dispostos a ajudar. Agradeço à banca: Dr<sup>a</sup> Ilíada Rainha de Souza, Dr. Geison de Souza Izídio e Msc. Mayara Thais Fernandes.

Perdão se esqueci de alguém, é que os nomes são muitos mas, todos tem lugar especial em meu coração. O meu sincero agradecimento a todos que fizeram parte direta ou indiretamente de minha formação, sou muitíssimo grata a todos vocês!





*O conhecimento é uma ilha, cercada pelo oceano do desconhecido. A ciência permite acessar partes desse desconhecido e, com isso, a ilha cresce. Mas cresce também a fronteira com o desconhecido: surgem novas questões, que nem poderíamos ter antecipado.*

(Marcelo Gleiser)



## RESUMO

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium* que são transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles* e que ainda atinge globalmente milhões de pessoas. Embora no Brasil a maior parte dos casos da doença esteja concentrada na região amazônica, ainda existe a transmissão em outras regiões do país. Na faixa litorânea no Brasil Meridional, as espécies do subgênero *Kerteszia* são as principais responsáveis pela transmissão da malária, incluindo *Anopheles bellator*, que tem como criadouro as plantas da família Bromeliaceae. Deste modo, neste trabalho foi feita a análise da diversidade genética de populações brasileiras de *An. bellator* e da presença de fluxo gênico entre essas populações utilizando como marcador molecular o gene *clock*. Os resultados deste estudo confirmam a presença de fluxo gênico e a não diferenciação genética entre as populações analisadas, indicando desta forma, que as populações de *An. bellator* utilizadas neste estudo não fazem parte de um complexo de espécies crípticas.

**Palavras-chave:** Malária, *Anopheles bellator*, complexo de espécies.

## ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* that are transmitted to humans by *Anopheles* mosquitoes bites. In Brazil the cases are concentrated in the Amazon region, however there is also transmission in other regions of the country. In the coastal range in southern and southeastern Brazil, the species of *Kerteszia* subgenus are primarily responsible for the malaria transmission, including *Anopheles bellator*, which breed in plants of the bromeliad family. Thus, this study was done to analyze the genetic diversity of Brazilian populations of *An. bellator* and the presence of gene flow between populations using as molecular marker the *clock* gene. The results confirmed the presence of gene flow and non-genetic differentiation between the populations analyzed, indicating that these *An. bellator* populations do not form a complex of species.

**Keywords:** Malária, *Anopheles bellator*, complex of species.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01: Pontos de coleta de *Anopheles bellator* e distâncias entre estes pontos.....32**

**Figura 02: DNA purificado de reação em cadeia da polimerase dos fragmentos do gene *clock* dos indivíduos de Sítio Forte- RJ: Eletroforese (gel de agarose em uma concentração de 2%) dos produtos de PCR do gene *clock*. 1-15 Indivíduos de Sítio Forte. M – Marcador de peso molecular (100 pares de base).....40**

**Figura 03: Alinhamento de todas as seqüências do fragmento do gene *clock* empregada nas análises das populações de *Anopheles bellator*. As partes em branco representam o éxon e a destacada em cinza o íntron. A caixa verde com as letras GT representam o início do íntron e a caixa com AG o fim. As letras a e b no final de cada nome indicam os diferentes alelos de cada indivíduo. **ABAB:** Indivíduos de Abraão; **ABCA:** Cananéia; **ABIM:** Ilha do Mel; **ABSF:** Sítio Forte.....42**

**Figura 04: Árvore Neighbor-Joining do gene *clock* das seqüências de nucleotídeos de Abraão, Cananéia, Ilha do Mel e Sítio Forte. Árvore de Neighbor-Joining utilizando o gene *clock* de todas as seqüências de nucleotídeos utilizadas, obtidas com distância Kimura-2 parâmetros. Números sobre os nós representam os valores de bootstrap com base em 1.000 replicações. As letras a e b no final de cada nome indicam os diferentes alelos de cada indivíduo. **ABAB:** Indivíduos de Abraão (círculos Vermelhos); **ABCA:** Cananéia (círculos Verdes); **ABIM:** Ilha do Mel (círculos rosas); **ABSF:** Sítio Forte (círculos Azuis).....44**

**Figura 05. Rede de haplótipos das seqüências do gene *clock*. As diferentes cores representam as populações de *Anopheles bellator*. Cada círculo representa um haplótipo diferente com tamanho proporcional à sua freqüência relativa de seqüências. Números entre parênteses indicam a quantidade de seqüências de cada haplótipo. Os pequenos círculos brancos representam os haplótipos intermediários ausentes e as linhas que ligam os haplótipos representam um passo mutacional entre dois haplótipos observados. **ABAB:** Indivíduos de Abraão (círculos Vermelhos); **ABCA:** Cananéia (círculos Verdes); **ABIM:** Ilha do Mel (círculos rosas); **ABSF:** Sítio Forte (círculos Azuis). As letras a e b no**

final de cada nome indicam os diferentes alelos de cada indivíduo.....46

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01: Quantidade e concentrações dos reagentes utilizados nas reações em cadeia da polimerase.....34**

**Tabela 02: Polimorfismos de todas as populações de *Anopheles bellator*.** 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; DT, Teste de Tajima...47

**Tabela 03: Diferenciação genética entre as populações de *Anopheles bellator*.**  $F_{ST}$ , as estimativas do coeficiente de diferenciação entre as populações. Valor de P, significância dos valores de  $F_{ST}$ .  $D_{xy}$ , média do número de substituições de nucleotídeos por sítio entre as populações;  $D_a$ , número de substituições de nucleotídeos líquido por sítio entre as populações.  $S_s$ , número de polimorfismos compartilhados entre as duas populações.  $S_f$ , número de diferenças fixas entre as duas populações.....47





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(2L): Cromossomo 2, no braço esquerdo

(2R): Cromossomo 2, no braço direito

μl: Microlitros

AB: Indivíduos de Abraão

An: Anopheles

CA: Cananéia

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

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *desoxyribonucleic acid*)

DT: Teste de Tajima

Dxy: Média do número bruto de substituições de nucleotídeos por sítio entre as populações

F<sub>ST</sub>: Coeficiente de diferenciação genética

IM: Ilha do Mel

Mg: Miligramas

mL: Mililitros

mM: Milimolar

n: Número de sequências de DNA de cada população

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

RJ: Rio de Janeiro

RPM: Rotações por minuto

S: Número de sítios polimórficos

SF: Sítio Forte

Ss: Número de polimorfismos compartilhados entre as duas populações.

Sf: Número de diferenças fixas entre as duas populações.

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

UV: Ultravioleta



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1 Malária .....	25
1.2 Gênero <i>Anopheles</i> .....	25
1.3 Complexo de espécies .....	26
1.4 <i>Anopheles bellator</i> , um complexo de espécies? .....	28
1.5 Gene <i>Clock</i> .....	28
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo Geral .....	29
2.2 Objetivos Específicos .....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Coleta dos Anophelinos .....	31
3.2 Extração de DNA .....	33
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase .....	33
3.4 Condições para realização do PCR .....	34
3.5 Eletroforese do produto de PCR .....	34
3.6 Purificação do produto de PCR .....	35
3.7 Ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem.....	35
3.8 Transformação .....	35
3.9 Inoculação das colônias .....	36
3.10 Mini preparação do DNA plasmidial.....	36
3.11 Sequenciamento das amostras .....	37
3.12 Análise das sequências obtidas .....	37
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Malária

A malária é uma doença parasitária e em humanos é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. No Brasil, são encontradas três espécies deste gênero: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*, das quais, as infecções por *P. vivax* são as predominantes. A transmissão do parasita é proveniente da picada de fêmeas de diferentes espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* (MS, 2015), pertencentes à família Culicidae e subfamília Anophelinae (Krzywinski e Besansky, 2003).

A malária é atualmente endêmica em 95 países. Ainda ocorrem globalmente milhões de casos, e de acordo com estimativas da Organização mundial de saúde (WHO), só em 2015 ocorreram 214 milhões de casos, com 438.000 óbitos registrados em decorrência da doença. A região africana é o local de maior incidência, com estimativa de quase 90% de todas as mortes, sendo que a faixa etária mais atingida é a de crianças (WHO, 2015).

No passado, a malária era considerada endêmica em muitos locais brasileiros, como em São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo os maiores responsáveis pela transmissão da malária nestas regiões, os mosquitos *Anopheles cruzii* e *Anopheles bellator* (Rachou, 1958).

Nos dias atuais, a doença ainda é considerada endêmica na Região Amazônica, local em que ocorre a maior parte dos casos brasileiros, com 235.078 notificações positivas de um total de 242.756 casos novos de malária registrados no país em 2012. Neste mesmo período, ocorreram 100 notificações, na Região Extra-amazônica (MS, 2015).

### 1.2. Gênero *Anopheles*

O gênero *Anopheles* possui cerca de 500 espécies distribuídas em seis subgêneros. Destes, o subgênero *Anopheles* é encontrado em várias partes do mundo; *Cellia* tem distribuição pelo Velho Mundo e quatro desses subgêneros são Neotropicais: *Lophopodomyia*, *Kerteszia*, *Nyssorhynchus* e *Stethomyia* (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994; Krzywinski e Besansky, 2003; Karimian et al., 2014). Dentre estes subgêneros, *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* são responsáveis pela manutenção da malária no país (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

Mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus* são encontrados em coleções hídricas terrestres (Rachou, 1958), e este subgênero é responsável por grande parte dos casos registrados na Amazônia (Rosa-Freitas et al., 1998), no qual *An. (Nyssorhynchus) darlingi* é o principal vetor. As formas imaturas são encontradas nos mais variados locais, desde represas, lagoas e com menor frequência em depressões de terrenos e em valas (Rachou, 1958).

As espécies de *Kerteszia* são as principais responsáveis pela transmissão da malária na faixa litorânea no Brasil Meridional (Coutinho e Rachou, 1966). Durante a fase larval, *Kerteszia* ocupa água acumulada no interior de bromélias (Rachou, 1958). Todavia, *An. (Kerteszia) bellator* é encontrado em bromélias maiores, arborícolas, rupestres ou terrestres e expostas a luz solar, e *An. (Kerteszia) cruzii* é encontrado com maior frequência em ambientes sombreados, e em bromeliáceas de diversos tamanhos (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

Em consequência aos *hábitats* das fases imaturas da maioria das espécies de *Kerteszia*, o ecossistema Mata Atlântica, com bromélias abundantes, é excelente ambiente para essas espécies (Marrelli et al., 2007). Dessa forma, os indivíduos do subgênero *Kerteszia* tem ampla distribuição nas Américas, desde o México até o Sul do Brasil (Zavortink, 1973).

### 1.3. Complexos de Espécies

São comuns os complexos de espécies crípticas no gênero *Anopheles* (Harbach, 2004), sendo os membros destes complexos indistinguíveis apenas por caracteres morfológicos. Porém, eles apresentam diferenças genéticas e de comportamento, o que pode interferir na capacidade de transmissão da doença (Della Torre et al., 2002). O complexo de espécies *An. gambiae*, um dos mais bem estudados atualmente, é dividido em *An. gambiae sensu stricto* e *An. gambiae sensu lato*, e engloba os principais vetores de malária na África (Huestis e Lehmann, 2014).

O complexo *An. gambiae s.l.* é composto por seis espécies crípticas, três de água doce — *An. gambiae sensu stricto*, *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus* —, duas de água salgada — *An. melas* e *An. merus* —, e uma de água mineral salobra, proveniente de fontes geotermiais — *An. bwambae* (Coetzee et al., 2013). Ainda, o complexo *An. gambiae s.s.* apresenta 5 formas cromossômicas, as quais foram denominadas Mopti, Savanna, Bamako, Forest e Bissau.

Acredita-se que os diferentes arranjos cromossômicos, facilitam a exploração de diferenciados nichos ecológicos, pois híbridos com arranjos cromossômicos heterozigotos tendem a produzir gametas disfuncionais e tem, conseqüentemente, sucesso reprodutivo reduzido. Com a redução do fluxo gênico, genes com características favoráveis a diferentes condições tendem a se fixar, levando à adaptação local (Ayala e Coluzzi, 2005; Coluzzi et al., 2002).

Além disso, *An. gambiae* s.s também já foi subdividido nas formas moleculares M e S. Turner et al. (2005) encontraram três regiões distintas entre estas formas moleculares: uma região no cromossomo X, e outras duas no cromossomo 2, uma no braço esquerdo (2L) e outra no direito (2R). Em todas as regiões foram encontradas diferenças fixas. Recentemente a forma M passou a ser chamada de *An. coluzzii* e a forma S manteve o nome *An. gambiae* (Coetzee et al., 2013).

*An. triannulatus* s.l., pertencente ao subgênero *Nyssorhynchus*, também é um complexo de espécies crípticas. Trabalhos como o de Silva do Nascimento et al. (2011) corroboram com este fato, e após realização de estudos no centro oeste brasileiro foi comprovado através de análises de sequencias gênicas, utilizando os genes *timeless* e *cpr*, que *An. triannulatus* s.s, *An. halophylus* e *An. triannulatus* C são na verdade táxons diferentes.

Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2004) utilizando análises isoenzimáticas em populações de *An. cruzii* provenientes de São Paulo, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Bahia concluíram que as três primeiras são mais relacionadas geneticamente em comparação com a encontrada na Bahia. E com isso sugerem que *An. cruzii* seja na verdade um complexo de espécies crípticas. Rona et al. (2009, 2010a, 2010b, 2013) utilizando uma análise multilocus com os genes *cpr*, *timeless*, *clock*, *cycle*, *Rp49*, *RpS2* e *RpS29*, confirmaram os resultados de Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2004) mostrando que os mosquitos do Estado da Bahia constituem um grupo geneticamente diferente das populações do sul/sudeste do Brasil. Além disso, os resultados desses autores também sugerem que Itatiaia (RJ) possui duas espécies incipientes que ocorrem em simpatria e que foram nomeadas provisoriamente de Itatiaia A e Itatiaia B. Esses autores concluíram 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 as populações de Itatiaia das outras populações do sul/sudeste; iii) o mais recente (~200 mil anos) originou as duas espécies simpátricas de Itatiaia.

Além disso, inúmeras outras espécies de anofelinos são descritas como complexos, como por exemplo, *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* composto de pelo menos quatro espécies (Rosa-Freitas et al., 1998) e *An. (Nyssorhynchus) oswaldoi* também com quatro espécies distintas (Ruiz et al., 2013). Contudo, muitas espécies ainda estão sob investigação para comprovação de possível formação de complexos.

#### **1.4. *Anopheles bellator*, um complexo de espécies?**

Dentre o subgênero *Kerteszia*, além de *An. (Kerteszia) cruzii*, estudos também sugerem que *An. (Kerteszia) bellator* possa fazer parte de um complexo de espécies crípticas. Carvalho-Pinto e Lourenço de Oliveira (2003) realizaram estudos com populações dos estados de Santa Catarina, São Paulo, Bahia e da ilha de Trinidad, concluindo com a utilização de métodos isoenzimáticos que o fluxo gênico entre as populações do Brasil é relativamente baixo, e ao comparar o fluxo gênico dessas populações com as da ilha de Trinidad observaram que este é ainda menor, o que pode indicar um recente processo de especiação.

Todavia, ainda são poucos os estudos genéticos com populações de *An. bellator* para verificação da formação de um complexo de espécies. Deste modo, estudos para averiguar a estruturação genética destas populações são necessários.

#### **1.5. Gene *Clock***

Muitos organismos possuem alterações comportamentais e fisiológicas que ocorrem de modo rítmico ao longo de 24 horas. Essas alterações são coordenadas por um sistema chamado de relógio circadiano ou biológico (Abruzzi et al., 2011). E um dos componentes desse sistema é o gene do relógio biológico *clock*. Em *An. gambiae*, *clock* é um gene autossômico, localizado no braço esquerdo do cromossomo dois (Mongin et al., 2004). Assim, caso ocorra sentenia, espera-se que ele se encontre nesta mesma posição nas outras espécies do gênero *Anopheles*.

Este gene e alguns outros do relógio biológico (como: *timeless*, *cycle* e *period*) são encontrados em *Drosophila spp.*, e exercem influência em alguns comportamentos como: alterações no sono, locomoção, resposta a luz, alimentação e inúmeras outras funções fisiológicas (Allada e Chung, 2010). *An. gambiae* também tem sua fisiologia controlada por meio de genes do relógio biológico, que



coordenam funções como: atividade de vôo noturno, alimentação, comportamentos relacionados a reprodução e oviposição (Rund et al., 2013). Pelo fato dos genes do relógio biológico também estarem envolvidos nos ritmos de atividade sexual, eles podem ser potencialmente importantes no isolamento reprodutivo entre espécies próximas (Sakai e Ishida, 2001; Tauber et al., 2003).

A regulação dos genes do relógio biológico ocorre através de um mecanismo de autorregulação negativa, no qual os genes *clock* e *cycle* são fatores de transcrição para as proteínas *period* e *timeless*. Estas últimas formam um heterodímero para entrar no núcleo. Então, no núcleo *period* se liga a *clock* e *cycle* e os inibe, fazendo com que ocorra um “*feedback*” negativo, parando sua própria produção. A proteína *timeless* é degradada no início do dia por uma proteína chamada *cry* que é ativada pela luz (Scully e Kay, 2000). Esse mecanismo é responsável por uma série de atividades que ocorrem de modo rítmico ao longo de vinte quatro horas em diversos animais.

Neste cenário, temos como um dos principais objetivos analisar a diferenciação genética das populações de *An. bellator* bem como, averiguar se este faz parte de um complexo de espécies crípticas, utilizando como marcador molecular o gene *clock*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Estudar a diversidade genética de populações brasileiras de *An. bellator* e verificar a presença de fluxo gênico entre essas populações.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Averiguar a presença de fluxo gênico e grau de diferenciação genética entre as populações provenientes da Ilha Grande, em duas regiões: Sítio Forte e Abraão (Rio de Janeiro), Cananéia (São Paulo) e Ilha do Mel (Paraná) (Figura 01);
- Verificar se *An. bellator* faz parte de um complexo de espécies crípticas.

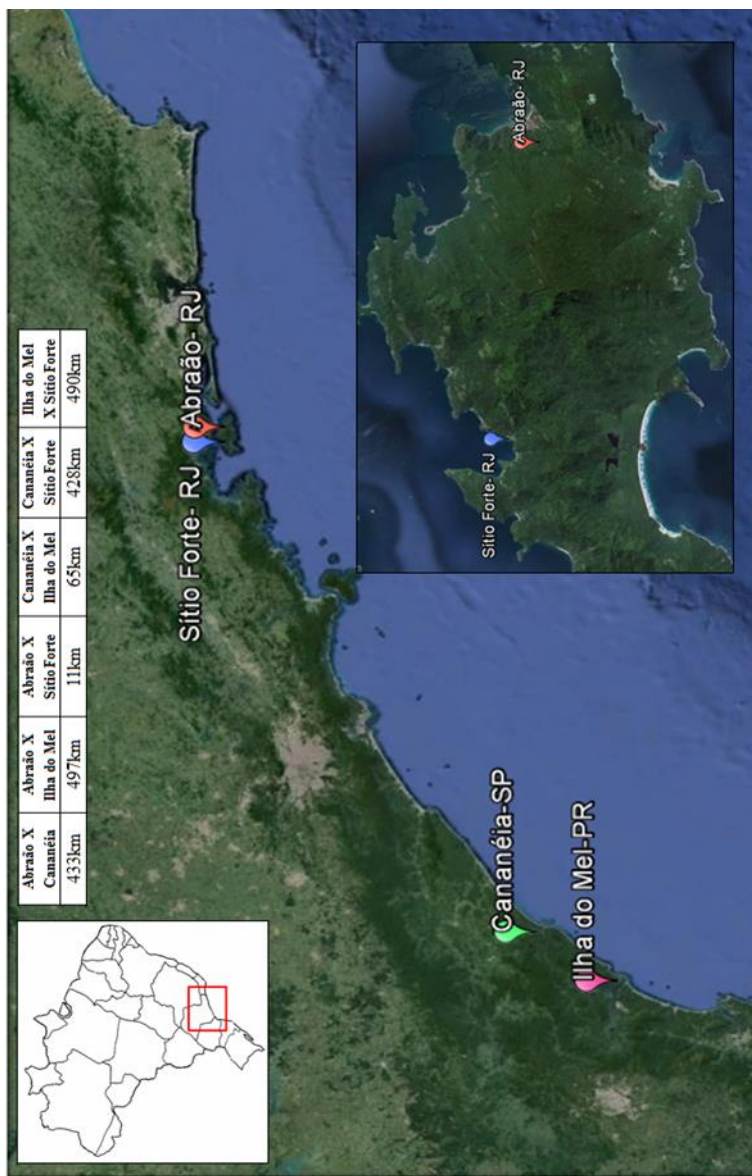


### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta dos Anophelinos

Os locais escolhidos para coleta dos indivíduos foram: Ilha Grande – Rio de Janeiro (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 01). As capturas dos mosquitos foram realizadas de duas maneiras: a primeira delas foi dentro da mata, nos finais de tarde e início da noite, com auxílio de aspirador manual. Após a captura, estes foram classificados e transferidos para frascos contendo etanol 70%. Na segunda forma de coleta, as formas imaturas foram coletadas, nos espaços interfoliares de plantas pertencentes a família Bromeliaceae. As formas imaturas foram alimentadas e criadas em laboratório, até a eclosão e estágio adulto. Posteriormente, foi feito o reconhecimento do sexo de cada indivíduo coletado além disso, todos os mosquitos foram identificados a nível de espécie através de microscópio estereoscópico, com auxílio de chave dicotômica de identificação (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Independente da forma de coleta foi dada prioridade neste estudo para utilização de indivíduos fêmeas. A posteriori todas as amostras foram acondicionadas a -20°C para posterior utilização nas extrações de DNA.

**Figura 01: Pontos de coleta de *Anopheles bellator* e distâncias entre estes pontos.**



### 3.2. Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada individualmente através do *kit DNeasy Blood and Tissue*, da Qiagen. Para isolar o DNA, primeiramente os mosquitos foram macerados em 180µl de solução tampão de lise celular (ATL buffer) e 20µl de proteinase K (10mg/ml). Após a maceração, as amostras foram incubadas em Banho Maria à 56°C e submetidas ao vortex, então foi adicionado 200µl de buffer AL e submetidas ao vortex novamente, incubado em Banho Maria por mais dez minutos e adicionado 200µl de etanol e expostas ao 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 a mistura 500µl de buffer AW1, centrifugado novamente e adicionado 500µl de Buffer AW2. Para eluir o DNA foram utilizados 200µl de buffer AE. Após a extração, o DNA extraído foi armazenados no freezer -20°C.

### 3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para as reações em cadeia da polimerase a enzima utilizada foi a *Pfu* DNA polimerase (Thermo), que possui atividade *proofreading*. Os iniciadores empregados nas reações de PCR estão abaixo (Rona et al., 2010a):

5'cruziiclock: 5'-TTGACGATCTGGAAAAGGTG-3'

3'cruziiclock: 5'-CTTGGTCAGGAAGCGATAGT-3'

A quantidade e concentrações dos reagentes utilizados pode ser visualizada na tabela a seguir.

**Tabela 01: Quantidade e concentrações dos reagentes utilizados nas reações em cadeia da polimerase.**

REAGENTES	1 tubo
H <sub>2</sub> O milli-Q	24.5µl
Tampão de PCR com Mg (10x)	4.0µl
dNTP (0,2mM de cada nucleotídeo)	4.0µl
3' Primer (10µM)	2.0µl
5' Primer (10µM)	2.0µl
<i>Pfu</i> DNA polimerase (2.5 unidade / µl)	0.5µl
*DNA genômico (~50 ng / µl)	3.0µl
Total	40µl

\*A amostra controle negativo é livre de DNA. Em todas as reações de PCR foram realizados controles negativos.

### 3.4. Condições para realização do PCR:

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 60 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e por último um ciclo de 72°C por 7 minutos. Após as reações de PCR, a observação dos produtos amplificados na reação foi feita por eletroforese em gel de agarose.

### 3.5. Eletroforese do produto de PCR

O gel de agarose foi preparado a uma concentração de 2%, e para a visualização em UV foi empregado 1µl de Gel Red (10.000x). Como tampão de corrida foi utilizado TAE 1x (40mM Tris, 20mM ácido

acético, 1mM EDTA). Para totalidade das amostras que foram aplicadas no gel, foi incluído: 10µl do produto de PCR e 2µl de corante de corrida Loading Dye 6x. Em todas as eletroforeses, padrões de tamanho molecular (100bp ladder) foram incluídos.

### **3.6. Purificação do produto de PCR:**

O DNA amplificado e visualizado em gel de agarose foi purificado através do “*QIAquick PCR Purification Kit*” da QIAGEN segundo as instruções do fabricante. A visualização para averiguar a presença do DNA foi realizada novamente em gel de agarose 2% com 1µl de Gel Red (10.000x).

### **3.7. Ligação dos fragmentos purificados ao vetor de clonagem**

Para clonagem dos fragmentos gênicos utilizou-se o kit “*CloneJET PCR Cloning #K1231*” (Thermo). O kit possui um mecanismo de controle positivo, um vetor de clonagem o pJET1.2/blunt, que contém um gene letal que é interrompido pela ligação de um DNA no sítio de clonagem fazendo com que apenas as bactérias com os plasmídeos recombinantes sejam capazes de se propagar. Para a reação de ligação foram utilizados os seguintes reagentes: 5µl de Buffer, 2µl de água, 2µl do produto de PCR purificado, 0.5µl do vetor pJET1.2/blunt e 0.5 µl da enzima T4 ligase. As amostras foram incubadas por aproximadamente 30 minutos a 22°C.

### **3.8. Transformação**

Para a reação de transformação foi pipetado 3µl de ligação em 100µl de células DH5α de *Escherichia coli*, e homogeneizado cuidadosamente. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, posteriormente colocada em banho-maria por 1 minuto a aproximadamente 42°C. Imediatamente, as células foram levadas ao gelo para choque térmico por 2 minutos. Então, foi adicionado 1mL de meio SOC líquido. Os tubos foram deixados durante uma hora em estufa a 37°C. Em seguida, foram centrifugados a 13.000 RPM por 30 segundos, o meio foi retirado e homogeneizado o “pellet”. As células foram plaqueadas em meio LB (Lúria- Bertani) sólido com ágar e ampicilina (100µg/mL), para que haja crescimento apenas das colônias desejadas. Por fim, as placas foram levadas a estufa 37°C e deixadas “overnight” para o crescimento das colônias.

### 3.9. Inoculação das colônias

As colônias foram inoculadas em placas “deepwell” de 96 poços para isso, utilizamos a cada 100mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido, 100µg/mL de ampicilina. As colônias foram selecionadas e inoculadas individualmente em 1mL da mistura contendo meio LB com ampicilina em cada poço. As placas foram seladas com adesivo, foram feitas pequenas aberturas no adesivo em cada poço, para entrada de oxigênio. As placas ficaram incubadas por 22 horas em um agitador (a aproximadamente 200 RPM) a 37°C. Na manhã seguinte, estas foram centrifugadas (4.000 RPM) por 6 minutos a 20°C. O sobrenadante foi removido e apenas o “pellet” foi armazenado no freezer -80 °C até a mini preparação do DNA.

### 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 240µl de GET (glicose, EDTA, Tris). Posteriormente, as placas foram centrifugadas por 9 minutos (4.000 RPM), a 20°C, o sobrenadante foi descartado e as placas permaneceram invertidas sobre papel absorvente por cerca de 5 minutos. Foi adicionado uma solução contendo 80µl de GET e 3µl de RNase a 10mg/ml em cada poço, para ressuspensão das células. Essa suspensão de células foi transferida para uma microplaca. Então, foi adicionado em cada poço 80µl de NaOH 0,2N/SDS 1%. As placas foram vedadas e a homogeneização da solução ocorreu por inversão, foram centrifugadas rapidamente até 2.000 RPM e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi acrescentado a cada poço 80µl 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 rapidamente (até 4.000 RPM). As placas foram armazenadas a -80°C. Na segunda etapa, após o descongelamento das placas, estas foram centrifugadas rapidamente (Até 4.000 RPM), o adesivo retirado e as placas incubadas em estufa a aproximadamente 90°C por 45 minutos. As placas foram colocadas a -20°C até esfriar e então, 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 “U” de 250µl de polipropileno. Estas foram centrifugadas por 6 minutos (4.000 RPM), a 20°C. Em



seguida, a placa Millipore foi retirada e foi adicionado 100µl de isopropanol (Merck) gelado ao filtrado restante na placa de fundo “U”. Esta foi selada e homogeneizada por inversão e em seguida incubada a temperatura ambiente por 15 minutos e então, centrifugada por 45 minutos (4.000 RPM), a 20°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200µl de etanol 70% (Merck) gelado. A placa foi novamente selada e centrifugada por 5 minutos (4.000 RPM) a 20°C. O sobrenadante foi descartado imediatamente e a placa foi colocada invertida sobre papel absorvente e centrifugada rapidamente (até 900 RPM). Para secar, a placa foi deixada para cima a temperatura ambiente por 60 minutos. O DNA foi ressuspensionado em 40µl de água MiliQ. A placa foi selada e colocada a temperatura ambiente até o dia seguinte. Posteriormente foi acondicionada a -20°C até o sequenciamento.

### **3.11. Sequenciamento das amostras**

Para cada indivíduo, oito clones foram sequenciados para identificar os dois alelos e também para verificar possíveis erros induzidos por PCR. As placas foram enviadas para empresa Myleus biotecnologia que realizou o sequenciamento do DNA presente nas amostras. As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

### **3.12. Análise das seqüências obtidas:**

A análise das seqüências obtidas foi realizada através dos seguintes programas: ClustalW (Thompson et al.,1997) para o alinhamento das seqüências; DNASP.5.10.01 (Librado e Rozas, 2009) e ProSeq v2.91 (Filatov e Charlesworth, 1999) para avaliar a diferenciação entre as populações e análise dos polimorfismos. Para construção da árvore filogenética foi utilizado o programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) e para a rede de haplótipos o TCS 1.21 (Clement et al., 2000).



#### 4. RESULTADOS

Foram analisadas 12 sequências provenientes de Sítio Forte (Rio de Janeiro), 12 de Abraão (Rio de Janeiro), 12 de Ilha do Mel (Paraná) e 08 de Cananéia (São Paulo). Totalizando 44 sequências analisadas.

Como observado em gel de agarose, os fragmentos resultantes de PCR do gene *clock* possuem em torno de 160 pares de base (Figura 02).

Na Figura 03 temos o alinhamento de todas as sequências utilizadas neste estudo, podendo observar que o gene *clock* praticamente não possui *gaps* e que sua região de éxon é bastante conservada, ocorrendo poucas substituições de bases, sendo que estas acarretam apenas substituições sinônimas. Além disso, no segmento que não codifica proteínas destacado em cinza, o íntron, encontramos substituições de bases em maior número e apenas um *indel*. (Figura 03).

A Tabela 02 mostra os resultados do teste de neutralidade de Tajima, em que encontramos uma tendência a valores positivos, todavia, estes não foram significativos, indicando que as sequências seguem o modelo neutro de evolução. Dessa forma, não há evidência de que haja seleção natural agindo sobre as sequências estudadas em nenhuma das populações. Também foi analisado o número de sítios polimórficos ( $S$ ) para cada população e duas medidas de diversidade nucleotídica:  $\pi$ , com base no número médio das diferenças par a par e  $\theta$ , com base no número total de mutações por sítio, sendo que em todas as análises o  $\pi$  encontrado foi maior que o  $\theta$ . A população de Cananéia se mostrou a mais polimórfica, contendo o maior número de sítios polimórficos ( $S = 12$ ) e a maior diversidade nucleotídica ( $\pi = 0.03461$  e  $\theta = 0.02857$ ). A população de Abraão foi a menos polimórfica, apresentando os menores valores de diversidade nucleotídica ( $\pi = 0.02281$  e  $\theta = 0.02248$ ).

Na Tabela 3 temos os valores de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ). Os valores de  $F_{ST}$  encontrados entre todas as populações foram extremamente baixos. A maior parte dos valores de  $F_{ST}$  não foram significativos ( $P > 0,05$ ), com exceção da comparação entre de Ilha do Mel e Abraão ( $F_{ST} = 0.1148$  e  $P < 0,05$ ).

A Tabela 3 também mostra os valores de polimorfismos compartilhados ( $S_s$ ), diferenças fixas ( $S_f$ ), divergência bruta ( $D_{xy}$ ) e divergência líquida ( $D_a$ ) entre as populações analisadas.  $D_{xy}$  é a medida de divergência entre as sequências das duas populações, baseado no número de diferenças par-a-par, que não exclui a variabilidade intra-populacional, ou seja, é a divergência bruta.  $D_a$  é um índice que mede

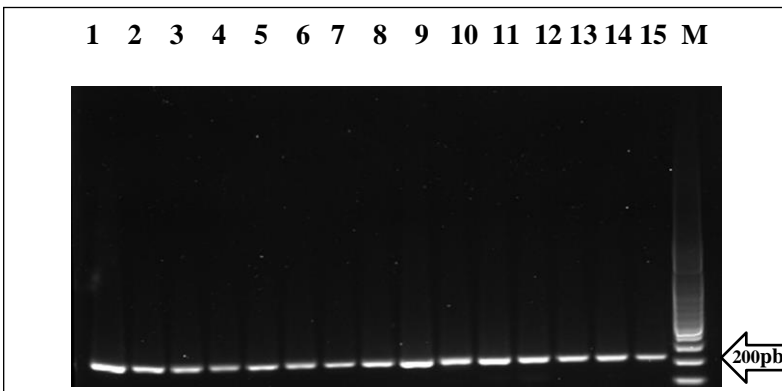
apenas a diferença entre as populações, ou seja, a diferença líquida. Todas as populações possuem muitos polimorfismos compartilhados, e não foram encontradas diferenças fixas em nenhuma das populações.

Os maiores valores de  $D_a$  e  $D_{xy}$  foram encontrados na comparação entre Ilha do Mel e Abraão ( $D_{xy} = 0,0419$  e  $D_a = 0,0048$ ), assim como o menor número de polimorfismos compartilhados ( $S_s = 08$ ).

A árvore filogenética foi estimada utilizando o método de Neighbor-Joining, o modelo escolhido foi Kimura 2-parâmetros com 1000 replicações de bootstrap. Na árvore as sequências estão dispostas de maneira randômica, não existindo uma separação clara entre as sequências das quatro populações. Sendo assim, pode-se observar claramente na Figura 04 que a árvore utilizando o gene *clock* não agrupa as sequências em grupos distintos.

Uma rede de haplótipos utilizando as sequências do gene *clock* também foi estimada com as diferentes populações de *An. bellator* (Figura 05). Foram encontrados quinze diferentes haplótipos, que são compartilhados entre as quatro populações, confirmando que as populações não estão separadas em grupos isolados, e que provavelmente fazem parte de uma mesma espécie.

**Figura 02: DNA purificado da reação em cadeia da polimerase dos fragmentos do gene *clock* dos indivíduos de Sítio Forte- RJ:** Eletroforese (gel de agarose em uma concentração de 2%) dos produtos de PCR do gene *clock*. 1-15 Indivíduos de Sítio Forte. M – Marcador de peso molecular (100 pares de base).

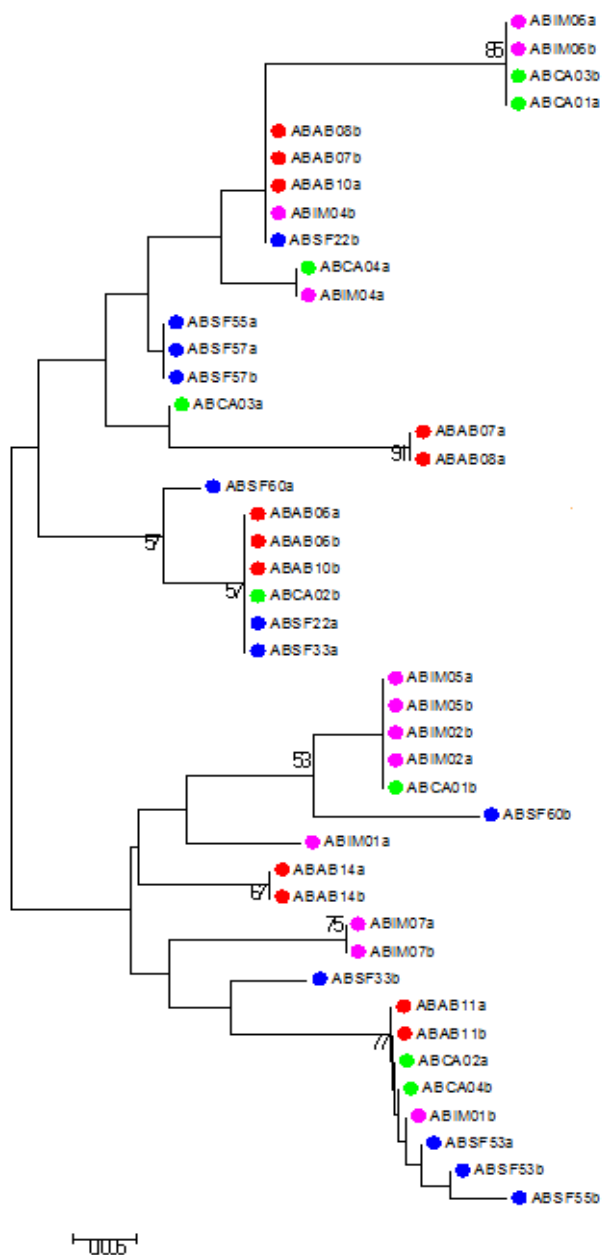


**Figura 03: Alinhamento de todas as sequências do fragmento do gene *clock* empregada nas análises das populações de *Anopheles bellator*.** As partes em branco representam o éxon e a destacada em cinza o íntron. A caixa verde com as letras GT representam o início do íntron e a caixa com AG o fim. As letras a e b no final de cada nome indicam os diferentes alelos de cada indivíduo. **ABAB:** Indivíduos de Abraão; **ABCA:** Cananéia; **ABIM:** Ilha do Mel; **ABSF:** Sítio Forte.



**Figura 04: Árvore Neighbor-Joining do gene *clock* das sequências de nucleotídeos de Abraão, Cananéia, Ilha do Mel e Sítio Forte.** Árvore de Neighbor-Joining utilizando o gene *clock* de todas as sequências de nucleotídeos utilizadas, obtidas com distância Kimura 2-parâmetros. Números sobre os nós representam os valores de bootstrap com base em 1.000 replicações. As letras a e b no final de cada nome indicam os diferentes alelos de cada indivíduo. **ABAB:** Indivíduos de Abraão (círculos Vermelhos); **ABCA:** Cananéia (círculos Verdes); **ABIM:** Ilha do Mel (círculos rosas); **ABSF:** Sítio Forte (círculos Azuis).

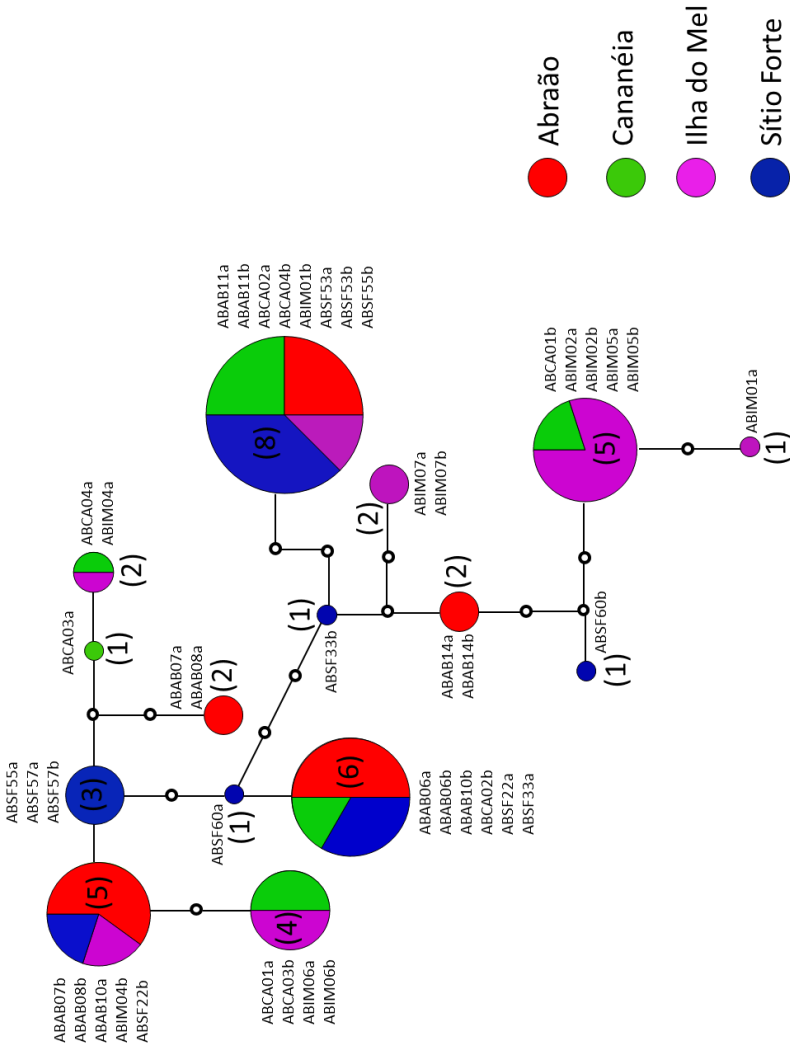
Figura 04





**Figura 05. Rede de haplótipos das sequências do gene *clock*.** As diferentes cores representam as populações de *Anopheles bellator*. Cada círculo representa um haplótipo diferente com tamanho proporcional à sua frequência relativa de sequências. Números entre parênteses indicam a quantidade de sequências de cada haplótipo. Os pequenos círculos brancos representam os haplótipos intermediários ausentes e as linhas que ligam os haplótipos representam um passo mutacional entre dois haplótipos observados. **ABAB:** Indivíduos de Abraão (círculos Vermelhos); **ABCA:** Cananéia (círculos Verdes); **ABIM:** Ilha do Mel (círculos rosas); **ABSF:** Sítio Forte (círculos Azuis). As letras a e b no final de cada nome indicam os diferentes alelos de cada indivíduo.

Figura 05



**Tabela 02: Polimorfismos de todas as populações de *Anopheles bellator*.** 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 de Tajima.

População	N	S	$\theta$	$\pi$	$D_T$
<b>Abraão</b>	12	11	0,02248	0,02281	1.16984
<b>Cananéia</b>	08	12	0,02857	0,03461	1.06437
<b>Ilha do Mel</b>	12	11	0,02248	0,03114	1.60251
<b>Sítio Forte</b>	12	11	0,02781	0,03308	0.78908

**Tabela 03: Diferenciação genética entre as populações de *Anopheles bellator*.**  $F_{ST}$ , as estimativas do coeficiente de diferenciação entre as populações. Valor de P ( $F_{ST}$ ), significância dos valores de  $F_{ST}$ . Dxy, média do número de substituições de nucleotídeos por sítio entre as populações; Da, número de substituições de nucleotídeos líquido por sítio entre as populações. Ss, número de polimorfismos compartilhados entre as duas populações. Sf, número de diferenças fixas entre as duas populações.

Populações	$F_{ST}$	P( $F_{ST}$ )	Dxy	Da	Ss	Sf
<b>Ilha do Mel X Abraão</b>	0,1148	0,0110	0,0419	0,0048	08	00
<b>Ilha do Mel X Sítio Forte</b>	0,0850	0,0900	0,0391	0,0033	09	00
<b>Abraão X Cananéia</b>	0,0023	0,3760	0,0391	0,0001	09	00
<b>Sítio Forte X Abraão</b>	0,0221	0,5490	0,0336	0,0007	09	00
<b>Sítio Forte X Cananéia</b>	0,0109	0,4180	0,0375	0,0004	10	00
<b>Ilha do Mel X Cananéia</b>	0,0393	0,6320	0,0391	0,0015	11	00



## 5. DISCUSSÃO

Na década de 60, o Brasil aderiu à campanha de erradicação da malária, baseada fundamentalmente no controle dos insetos vetores (Coura et al., 2006). Como relata Brady et al (2015), as intervenções que baseiam-se nos vetores ainda são artefatos importantes dos programas que tem por objetivo minimizar os casos de doenças transmitidas por mosquitos. Deste modo, ao longo dos anos foram propostas uma série de medidas para erradicação da malária, em que a grande maioria tem como princípio interromper a transmissão da doença eliminando os mosquitos vetores (Taulil et al., 1985).

Portanto, estudos sobre os elementos genéticos que podem interferir na evolução, e adaptação do mosquito ao ambiente, são de suma importância pois, podem contribuir significativamente para a elaboração correta dos planos de manejo (Coluzzi et al., 1979), uma vez que é sabido que nem todas as espécies que fazem parte de um complexo de espécies crípticas (duas ou mais espécies que foram previamente classificadas como uma única espécie nominal devido à uniformidade morfológica) são vetores eficazes. Ainda, as espécies de anofelinos existentes em regiões geográficas distintas podem ter capacidades vetorais diferentes pelos diferentes tipos de *Plasmodium* encontrados (Pereira-Da-Silva e Gama-de-Oliveira, 2002). O complexo de espécies *An. gambiae* por exemplo, inclui espécies que apresentam diferenças em sua biologia e capacidade vetorial (Derua et al., 2012).

Ademais, muitas espécies do gênero *Anopheles* são morfológicamente muito semelhantes como é o caso, por exemplo, de *An. cruzii* e *An. bellator* (Lorenz et al., 2012). Por este motivo, a identificação dessas espécies ocorre muitas vezes de forma errônea. Todavia, a identificação correta desses animais é de suma importância tanto para diagnose dos vetores responsáveis pela transmissão de doenças bem como, para o controle dos patógenos (Sallum et al., 2008). Desta forma, a biologia molecular se faz essencial, oferecendo ferramentas para distinguir espécies morfológicamente parecidas ou pertencentes a complexos de espécies crípticas (Cook et al, 2005).

Estudos anteriores descrevem *An. cruzii*, (pertencente ao mesmo subgênero que *An. bellator*) como sendo um complexo de espécies crípticas. Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2004) utilizando análises isoenzimáticas em diferentes populações de *An. cruzii*, obtiveram valores relativamente altos de  $F_{ST}$  sugerindo assim, a existência de duas espécies distintas: uma na Bahia e a outra composta por indivíduos dos estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio de

Janeiro. Rona et al (2010a, 2010b, 2013) também realizou comparações entre populações de *An. cruzii*, provenientes de diferentes Estados Brasileiros utilizando análises multilocus com genes que codificam proteínas ribossomais e genes do relógio biológico, incluindo o mesmo marcador molecular utilizado neste estudo, o gene *clock*. Estes autores observaram altos valores de  $F_{ST}$  nas comparações com a população de Itaparica (BA) ( $F_{ST} > 0,7088$ ), corroborando com os resultados de Carvalho-Pinto e Lourenço-de-Oliveira (2004) e sugerindo que estas são diferentes espécies do complexo *An. cruzii*. Ainda, foi visto que a população de Itatiaia (RJ) é distante geneticamente das demais populações analisadas, e que nesta região de Itatiaia (RJ) ocorrem duas espécies simpátricas.

Utilizando análises isoenzimáticas Carvalho-Pinto e Lourenço de Oliveira (2003), avaliaram populações de *An. bellator* de Santa Catarina, São Paulo, Bahia e da Ilha de Trinidad. As comparações com a Bahia apresentaram altos valores de diferenciação genética e o fluxo gênico observado foi ainda menor quando incluída a população de Trinidad. Isso pode ser devido à distribuição geográfica e distância entre essas populações, já que a capacidade de vôo é fator condicionante para dispersão do mosquito (Bona, 2008).

Do mesmo modo, devido às distâncias, e pela presença de uma cadeia de montanhas entre duas das populações analisadas neste estudo, a de Abrão e a de Sítio Forte (RJ) (Figura 01), esperava-se que estas atuassem como barreiras geográficas entre as populações. Que, por conseguinte encontraríamos baixo fluxo gênico entre as amostras analisadas, como foi verificado por Carvalho-Pinto e Lourenço de Oliveira (2003). Todavia, em contraposição ao esperado, valores de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) extremamente baixos e não significativos foram obtidos entre essas duas amostras, e também entre todas as outras populações. O único valor de  $F_{ST}$  significativo foi observado entre Ilha do Mel e Abraão ( $F_{ST} = 0,1148$ ). Contudo, segundo Hey e Pinho (2012) para uma população vir a ser diagnosticada como espécie é necessário um valor de  $F_{ST}$  de no mínimo 0,35, indicando assim, que as populações de *An. bellator* estudadas não podem ser classificadas como um complexo de espécies crípticas.

Além disso, na árvore filogenética estimada através do método de Neighbor-Joining com o modelo Kimura 2-parâmetros observamos que as sequências estão dispostas randomicamente. A rede de haplótipos também não separou as populações em grupos isolados, ao invés disso, obtivemos haplótipos compartilhados entre todas as populações. Corroborando assim, com os resultados de  $F_{ST}$  obtidos neste estudo,

indicando que não está ocorrendo um processo de especiação entre as populações analisadas. Apesar dos resultados obtidos neste estudo não corroborarem com os encontrados por Carvalho-Pinto e Lourenço de Oliveira (2003), as populações da Bahia e da Ilha de Trindade utilizadas por estes autores e que se mostraram mais diferenciadas em relação às do sul e sudeste não foram analisadas aqui.

Outros estudos também foram realizados no Laboratório de Polimorfismos Genéticos com outros dois diferentes marcadores moleculares: *timeless*, um outro gene do relógio biológico, e *Rp49* que codifica proteínas ribossomais (dados ainda não publicados). As mesmas populações de *An. bellator* foram analisadas nesses estudos, e os resultados obtidos corroboram com os dados encontrados neste trabalho com o gene *clock*, sugerindo que, diferente do que foi encontrado para *An. cruzii*, as populações de *An. bellator* analisadas fazem parte de uma única espécie.

Ramirez e Dessem (2000) através de uma análise sobre padrões de bandejamento do cromossomo X, comparando populações de *An. cruzii* do sul e sudeste do Brasil, chegaram a conclusão da ocorrência de pelo menos duas formas divergentes na espécie, cada uma carregando um conjunto diferente de inversões. Devido à ausência de heterozigotos nas regiões onde as formas ocorriam em simpatria, a hipótese levantada foi de que as mesmas constituíam duas unidades evolutivas independentes. Além disso, cada uma das formas estava associada a um conjunto de inversões cromossômicas e a diferentes habitats: uma das formas era predominante em regiões com altitude mais elevada, enquanto a outra era predominante em florestas costeiras ao nível do mar. Ainda, Ramirez e Dessem (1996), através de uma comparação dos cromossomos politênicos entre populações de *An. bellator* e de *An. cruzii*, verificaram que as populações de *An. cruzii* apresentaram maior quantidade de polimorfismos cromossômicos. Segundo Ramirez e Dessem (1996), isso pode ser devido a divergência de habitats das formas imaturas entre as duas espécies, pois, *An. cruzii* é uma espécie que ocupa uma maior variabilidade de nichos, sendo que não apresenta tantas especificações quanto ao meio (Veloso et al, 1956). Sendo assim, este é encontrado frequentemente em bromélias de diversos tamanhos, nas copas das árvores, terrestres e até mesmo rupestres. Em contrapartida, *An. bellator* é encontrado nas bromélias geralmente maiores em locais ensolarados, e raramente é encontrado dentro das matas (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994).

Acredita-se que os diferentes rearranjos cromossômicos favoreceriam a ocupação de habitats distintos no caso de *An. cruzii*. O

que talvez possa ser explicado através de dois modelos de especiação cromossômica: o de supressão da recombinação e o de inviabilidade do híbrido. O primeiro modelo sugere que há diminuição na recombinação das diferentes formas cromossômicas devido a presença de inversões. Já o segundo, postula que os indivíduos heterozigotos para rearranjos cromossômicos são estéreis ou tem seu *fitness* reduzido. Deste modo em ambos os casos, isso poderia servir de barreira para o fluxo gênico, reduzindo-o entre as populações, fazendo com que haja tendência a fixação de alelos com características favoráveis a diferentes condições, ocasionando maior adaptação local (Coluzzi et al., 2002; Ayala e Coluzzi, 2005). Talvez, a presença de polimorfismos de inversões cromossômicas em *An. cruzii* e sua ausência em *An. bellator* pode explicar o fato da primeira constituir um complexo de espécies crípticas e de diferentes populações de *An. bellator* formarem uma única unidade evolutiva no sul e sudeste do Brasil.



## 6. CONCLUSÃO

Os resultados confirmam a presença de fluxo gênico e a não diferenciação genética entre as populações analisadas, indicando desta forma, que *An. bellator* não faz parte de um complexo de espécies.



## 7. PERSPECTIVAS

Como já comentado anteriormente, Carvalho-Pinto e Lourenço de Oliveira (2003) encontraram grande diferenciação genética entre populações de *An. bellator* provenientes da Bahia e de outras regiões brasileiras, por este motivo, pretendemos dar continuidade ao trabalho incluindo outras populações, como as provenientes da Bahia e de Florianópolis.

Concomitantemente a este trabalho no Laboratório de Polimorfismos genéticos, também foram desenvolvidos outros dois estudos com as mesmas populações, mas, com outros marcadores: os genes *timeless* e *Rp49*. Além destes genes, também pretendemos adicionar ao trabalho um gene mitocondrial como marcador molecular.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abruzzi KC, Rodriguez J, Menet JS, Desrochers J, Zadina A, Luo W, Tkachev S, Rosbash M. ***Drosophila clock target gene characterization: implications for circadian tissue-specific gene expression.*** *Genes Dev* 2011, 25:2374-2386.
2. Allada R, Chung BY. **Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*.** *Annu Rev Physiol* 2010, 72:605-624.
3. Ayala FJ, Coluzzi M. **Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 1:6535-6542.
4. Bona ACD. **Culicidae (Diptera) em Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas e Análise da idade fisiológica, sobrevivência diária e duração do ciclo gonotrófico da população de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Diar e Knab, 1908.** [dissertação (Mestrado em ciências biológicas)]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2008. 78f.
5. Brady OJ, Godfray HC, Tatem AJ, Gething PW, Cohen JM, McKenzie FE, Alex Perkins T, Reiner RC Jr, Tusting LS, Scott TW, Lindsay SW, Hay SI, Smith DL. **Adult vector control, mosquito ecology and malaria transmission.** *Int Health* 2015, 7:121-9.
6. 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.
7. 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.

8. Clement M, Posada D, Crandall KA. **TCS: a computer program to estimate gene genealogies.** *Mol Ecol* 2000, 9:1657-1659.
9. 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.
10. Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. **Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979, 73:483-97.
11. 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.
12. Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro. 1994.
13. Cook S, Diallo M, Sall AA, Cooper A, Holmes EC. **Mitochondrial markers for molecular identification of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae) involved in transmission of arboviral disease in West Africa.** *J Med Entomol* 2005, 42:19-28.
14. Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. **A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2006, 101: 229-237.
15. 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.

16. Della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR, Coluzzi M. **Speciation within *Anopheles gambiae* - the glass is half full.** *Science* 2002, 298:115-117.
17. Derua YA, Alifrangis M, Hosea KM, Meyrowitsch DW, Magesa SM, Pedersen EM, Simonsen PE. **Change in composition of the *Anopheles gambiae* complex and its possible implications for the transmission of malaria and lymphatic filariasis in north-eastern Tanzania.** *Malar J* 2012, 11:188.
18. Filatov DA, Charlesworth D. **DNA polymorphism, haplotype structure and balancing selection in the *Leavenworthia PgiC* locus.** *Genetics*. 1999,153:1423–1434.
19. Harbach RE. **The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships.** *Bull Entomol Res* 2004, 94:537-553.
20. Hey J, Pinho C: **Population genetics and objectivity in species diagnosis.** *Evolution* 2012, 66:1413–1429.
21. Huestis LD, Lehmann T. **Ecophysiology of *Anopheles gambiae* s.l.: Persistence in the Sahel.** *Infection, Genetics and Evolution* 2014, 28:648-661.
22. Karimian F, Oshaghi MA, Sedaghat MM, Waterhouse RM, Vatandoost H, Hanafi-Bojd AA, Ravasan NM, Chavshin AR. **Phylogenetic analysis of the oriental-Palearctic-Afrotropical members of *Anopheles* (Culicidae: Diptera) based on nuclear rDNA and mitochondrial DNA characteristics.** *Jpn J Infect Dis* 2014, 67:361-367.
23. Krzywinski J, Besansky NJ. **Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations.** *Annu RevEntomol* 2003, 48:111-139.

24. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: **A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics* 2009, 25: 1451-1452.
25. Lorenz C, Marques TC, Sallum MAM, Suesdek L. **Morphometrical diagnosis of the malaria vectors *Anopheles cruzii*, *An. homunculus* and *An. bellator*.** *Parasites & Vectors* 2012, 5:257.
26. Marrelli MT, Malafrente RS, Sallum MA, Natal D. ***Kerteszia* subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges.** *Malar J* 2007, 6:127.
27. Mongin E, Louis C, Holt RA, Birney E, Collins FH. **The *Anopheles gambiae* genome: an update.** *Trends Parasitol.* 2004, 20:49-52.
28. MS 2015. Secretaria de vigilância em saúde. Ministério da saúde (Portal do MS). Boletim Epidemiológico de Situação da malária no Brasil, 2012 e 2013. Acesso em 06 de maio de 2016 [<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/16/2015-003---Mal--ria.pdf>]
29. Pereira-Da-Silva LH, Gama-de-Oliveira VE. **O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica.** *Ciênc. saúde coletiva* 2002, 7: 49-63.
30. Rachou RG. **Anofelinos do Brasil: Comportamento das espécies vetoradas de malária.** *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1958, 10:145-181.
31. Ramirez CCL, Dessem EBM. **The polytene cromossomes of the mosquito *Anopheles bellator* compared with those of *Anopheles cruzii*.** *Revista brasileira de genética* 1996, 19: 555-558.



32. Ramirez CC, Dessen EM. **Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles cruzii*.** *Genome* 2000, 43:143-51.
33. 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.** *Malar J* 2009, 8:60.
34. 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 Evol Biol* 2010a, 10:91.
35. 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.** *Malar J* 2010b, 9:33.
36. 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 Evol Biol* 2013, 13:207.
37. 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.
38. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Ponsonby DJ, Herrera M, Sallum MA, Velez ID, Quiñones ML, Flores-Mendoza C, Chadee DD, Alarcon J, Alarcon-Ormasa J, Linton YM. **Systematics of the *Oswaldoi* complex (*Anopheles*, *Nyssorhynchus*) in South America.** *Parasit Vectors* 2013, 6:324.
39. Rund SS, Gentile JE, Duffield GE. **Extensive circadian and light regulation of the transcriptome in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.** *BMC Genomics* 2013, 14:218.

40. Sakai T, Ishida N. **Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila***. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98: 9221-5.
41. Sallum MAM, Urbinnati PR, Malafronte RS, Resende HR, Cerutti-Junior C, Natal D. **Primeiro registro de *Anopheles (Kerteszia) homunculus Komp* (Diptera, Culicidae) no Estado do Espírito Santo, Santo, Brasil**. *Revista Brasileira de Entomologia* 2008, 52:671-73.
42. Scully AL, Kay SA. **Time flies for *Drosophila***. *Cell*. 2000, 100:297-300.
43. 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.
44. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. **MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0**. *Mol Biol Evol*. 2007, 24:1596–1599.
45. Tauber E, Roe H, Costa R, Hennessy JM, Kyriacou CP. **Temporal mating isolation driven by a behavioral gene in *Drosophila***. *Curr Biol* 2003, 13:140-5
46. Tauil P, Deane L, Sabroza P, Ribeiro C. **A malária no Brasil**. *Cad. Saúde Pública* 1985, 1: 71-111.
47. 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.
48. Turner TL, Hahn MW, Nuzhdin SV. **Genomic islands of speciation in *Anopheles gambiae***. *PLoS Biol* 2005, 3:e285.

49. Veloso MP, Klein M, Moura, JV. **Delimitação ecológica dos anofelinos do subgênero *Kerteszia* na região costeira do Brasil.** *Inst. Oswaldo Cruz Mem* 1956, 54: 517-548.
50. WHO 2015. World Health Organization (WHO Home page). World Malaria Report 2015. Acesso em 06 de maio de 2016 [[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf?ua=1)]
51. Zavortink TJ. **Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*.** *Contributions of the American Entomological Institute* 1973, 9:1-54.