

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Marcela Possato Correa da Rosa

**ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DA MATA ATLÂNTICA DE  
*ANOPHELES (KERTESZIA) BELLATOR* DYAR & KNAB UTILIZANDO O GENE *TIMELLES* COMO  
MARCADOR MOLECULAR**

Florianópolis  
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Marcela Possato Correa da Rosa

**ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DA MATA ATLÂNTICA DE  
*ANOPHELES (KERTESZIA) BELLATOR* DYAR & KNAB UTILIZANDO O GENE *TIMELLES* COMO  
MARCADOR MOLECULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito  
para cumprimento da disciplina TCCII (BIO 7016)  
do currículo do Curso de Graduação em Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Santa Catarina  
Modalidade Licenciatura  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luísa Damazio Rona Pitaluga

Florianópolis  
2016



Marcela Possato Correa da Rosa

**ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES DA MATA ATLÂNTICA DE  
*ANOPHELES (KERTESZIA) BELLATOR* DYAR E KNAB UTILIZANDO O GENE *TIMELLES* COMO  
MARCADOR MOLECULAR**

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.

Local, 5 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  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>o</sup>, Dr<sup>o</sup> Luiz Carlos Pinho  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Carlos José de Carvalho Pinto  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

M<sup>a</sup> Carime Lessa  
Universidade Federal de Santa Catarina



*“O primeiro passo em direção ao sucesso é dado quando  
você se recusa a ser um prisioneiro do ambiente em que estava inicialmente.”*

– Mark Caine





## **Agradecimentos**

Agradeço a todos os meus professores e a UFSC por ter me recebido nesses anos de faculdade. É uma realização muito grande ter chegado até aqui. É impossível citar todos que ajudaram nesse tempo. Meus agradecimentos às pessoas que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Gostaria de agradecer imensamente a professora Luísa por toda atenção e principalmente pela paciência comigo. Serei sempre grata por tudo que me ensinou e ajudou nesses dois anos e meio. Hoje, levo mais do que uma orientadora, levo um exemplo.

Ao professor Carlos Pinto, pela ajuda na identificação das espécies e ainda pelo bom humor com que sempre nos recebeu.

As colegas, Kamila e Roberta, obrigada por todas as nossas tardes de experimentos e pela ajuda nas análises dos dados. Ao Rafa por ser nosso companheiro. A Mayara pela paciência de estar conosco no laboratório. Vou sentir muita falta de vocês!

Aos colegas do LAPOGE e do Laboratório de Protozoologia, Lais e Carime pela ajuda com os experimentos e também aos técnicos do Laboratório Multiuso.

A professora Norma, pela ajuda na bancada e estar sempre disposta e presente nesse tempo de iniciação científica.

Gostaria de agradecer a minha família. Minha mãe por toda força e por ter me ensinado a ser uma pessoa mais determinada. Meu irmão por me fazer rir das situações mesmo quando elas não saem como deveriam. Ao Matheus por toda escuta e ajuda. Meu pai que mesmo na ausência sempre foi tão solícito. Ao meu padrinho Santo, pessoa em quem me inspirei para chegar aqui.

Minha amiga e irmã Kamila Cardoso, por estar ao meu lado nas horas mais difíceis da minha vida.

A professora Lúcia Locatelli Flôres, pela motivação e força e por todo ensinamento passado.

Gostaria de agradecer a toda família Ávila por ter me acolhido em Florianópolis, em especial ao Drº Antônio Carlos, D. Valkíria, Drª Eledite e Senhor Walmir, Sueli, Netinho e Gabriel. Eu não teria chegado tão longe sem vocês. Minha eterna gratidão.



Este trabalho é dedicado  
à minha avó, Irma Possato  
e a Senhora Dalva Matos Ávila.  
(*in memoriam*)



## RESUMO

A malária é uma doença transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles* e causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e foi responsável por cerca de 438 000 mortes apenas no ano de 2015. O gênero *Anopheles* é dividido em seis subgêneros, sendo que os transmissores da malária humana no Brasil estão incluídos nos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. O subgênero *Nyssorhynchus* apresenta 33 espécies e o subgênero *Kerteszia* agrupa 7 espécies. Mosquitos do subgênero *Kerteszia* são os responsáveis pela transmissão da malária nas regiões sul e sudeste do Brasil e duas das principais espécies deste subgênero encontradas em Santa Catarina, são *Anopheles (Kerteszia) bellator* Dyar e Knab e *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab. Estudos realizados com *An. cruzii* e utilizando um grande número de marcadores moleculares sugerem que ele constitui um complexo de espécies crípticas. Ainda, um estudo utilizando isoenzimas realizado com diferentes populações de *An. bellator*, verificou um nível muito baixo de fluxo gênico entre a população proveniente da Ilha de Trindad, Trinidad e Tobago, e as outras populações brasileiras provenientes de Santa Catarina, São Paulo e Bahia. Compreender a existência dos complexos de espécies pode ser útil para o controle específico de culicídeos responsáveis por epidemias de grande importância, pois nem todos os membros dos complexos são verdadeiros vetores da doença. Sendo assim, o presente estudo buscou analisar a diferenciação genética de quatro populações de *An. bellator*. Os resultados sugerem que as populações analisadas apresentam pouca diferenciação genética entre si. Entre as hipóteses levantadas para tal resultado está a baixa diversidade de habitats em que *An. bellator* ocupa.

**Palavras-chave:** malária, genética de populações, complexos de espécies crípticas.



## ABSTRACT

Malaria is a disease transmitted by *Anopheles* mosquitoes and caused by protozoa of the genus *Plasmodium*. It was responsible for about 627,000 deaths only in 2012. The genus *Anopheles* is divided into six sub-genus, and the responsible for the malaria transmission in Brazil are included in the subgenus *Nyssorhynchus* and *Kerteszia*. The subgenus *Nyssorhynchus* presents 31 species and the *Kerteszia* groups 12 species. Mosquitoes from *Kerteszia* subgenus are responsible for malaria transmission in southern and southeastern regions of Brazil and the two most important species from this subgenus are found in Santa Catarina: *Anopheles (Kerteszia) bellator* Dyar and Knab and *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab. Studies involving *An. cruzii* and using a large number of molecular markers suggest that it is a complex of cryptic species. Moreover, a study using isozymes conducted with different *An. bellator* populations found a low level of gene flow between populations from the Trinidad Island, Trinidad and Tobago, and other Brazilian populations from Santa Catarina, São Paulo and Bahia. Understand the existence of the species complexes may be useful for the specific control of mosquitoes responsible for endemic diseases, because not all members of these complexes are true vectors of the disease. So, this study sought to analyze the genetic differentiation of four *An. bellator* populations and the results suggest that the populations studied have little genetic differentiation between them. Among the hypotheses for this result is the low diversity of habitats in which *An. bellator* occupies.

**Keywords:** *Anopheles bellator*, malaria, population genetics, complex species.





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localidades onde as amostras das quatro populações de *An. bellator* foram coletadas . Valores na tabela são distâncias aproximadas entre localidades de km .....29
- Figura 2.** Gel de agarose (2%) contendo o fragmento do gene *timeless* amplificado por PCR. Estas bandas possuem fragmentos de aproximadamente 366 pares de base. Para a reação de PCR, foi utilizado o DNA genômico de indivíduos da população de Ilha do Mel. Os números de 1 a 5 indicam as bandas de 366 pares de base de cada indivíduo; M indica o marcador de peso molecular CN indica o controle negativo.....33
- Figura 2.** Árvore filogenética das sequências de *An. bellator* construída utilizando o método Neighbour-Joining com distância Kimura 2-parâmetros. Os números acima dos ramos são os valores de “bootstrap”, baseados em 1000 replicações. **ABAB:** indivíduos de Abraão; **ABCA:** Cananéia; **ABIM:** Ilha do Mel; **ABSF:** Sítio Forte.....36
- Figura 3.** Rede de haplótipos construída utilizando o fragmento do gene *timeless* Cada círculo representa um haplótipo diferente com tamanho proporcional à sua frequência relativa de sequências. Os números entre parênteses indicam a quantidade de sequências em haplótipo. As diferentes cores representam as populações de *An. bellator*. 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; **ABCA:** Cananéia; **ABIM:** Ilha do Mel; **ABSF:** Sítio Forte.....37



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tabela de Reagentes e concentrações utilizadas nas reações em cadeia da polimerase..... 30
- Tabela 2.** Polimorfismos encontrados em cada população de *An. bellator* utilizada neste estudo utilizando o gene *timeless*. 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;  $\pi$ , diversidade de nucleotídeos com base no número médio de diferenças par-a-par; DT , Teste de Tajima.....34
- Tabela 3.** Diferenciação genética entre as populações de *An. bellator* utilizadas neste estudo utilizando o gene *timeless*. FST, medida de diferenciação entre as populações. As significâncias nos valores de FST foram avaliadas com 1000 permutações. P, significância dos valores de FST. Dxy e Da, média do número de substituições de nucleotídeos por sítio entre as populações, onde Dxy é a divergência bruta e Da é a divergência líquida; Ss, número de polimorfismos compartilhados entre as duas populações; Sf, número de diferenças fixas entre as duas populações.....35



## Lista de Siglas e Abreviaturas

ABAB – Indivíduos da população de Abraão

ABCA – Indivíduos da população de Cananéia

ABIM – Indivíduos da população de Ilha do Mel

ABSF – Indivíduos da população de Sítio Forte

An. – *Anopheles*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Etileno-diamina-tetra-acetato

LB – meio de cultura Luria-Bertani

mL – mililitros

mM – milimolar

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

oligo – do inglês “primer” – oligonucleotídeo ou iniciador

Pb – Pares de base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, polymerase chain reaction)

Pfu – Polimerase de *Pyrococcus furiosus*

pH Potencial Hidrogeniônico

RPM – rotações por minuto

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate

TAE – tampão Tris base, ácido acético glacial/EDTA

Taq – Polimerase de *Thermus aquaticus*

TBE – tampão Tris-Borato/EDTA

tim – gene *timeless*

UV – Ultravioleta

V – Volts

μL – Microlitro



## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	Objetivos específicos .....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Coleta de Material.....	29
3.2	Extração do DNA Genômico .....	30
3.3	Amplificação dos Segmentos de DNA.....	30
3.4	Eletroforese do produto de PCR .....	30
3.5	Purificação dos fragmentos gênicos obtidos por PCR .....	30
3.6	Ligação dos fragmentos purificados ao vetor de clonagem .....	31
3.7	Transformação de bactérias resistentes .....	31
3.8	Inoculação e centrifugação das culturas.....	31
3.9	Mini-preparação do DNA .....	31
3.10	Sequenciamento .....	32
3.11	Análise das sequências .....	32
4	RESULTADOS .....	33
5	DISCUSSÃO.....	39
6	CONCLUSÃO.....	41
7	REFERÊNCIAS .....	43
8	APÊNDICE .....	46





# 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles* contaminados por parasitas do gênero *Plasmodium*. Dados da Organização Mundial da Saúde de 2016 apontam para 214 milhões de novos casos de malária no mundo em 2015 e ainda 438 000 mortes no mesmo ano (WHO, 2016).

Embora existam registros mais antigos, as primeiras publicações sobre o estudo da malária teve seu início com o médico parasitologista francês Charles Louis Alphonse Laveran. Em sua viagem à Argélia, em 1878, Laveran pôde observar que, ao contrário do que se pensava, os surtos febris ocorridos em algumas populações africanas não eram causados por bactérias, mas sim por micro-organismos que estavam presentes nos glóbulos vermelhos. Mais tarde, outro pesquisador, Ronald Ross, analisando tecidos do estômago de mosquitos do gênero *Anopheles*, alimentados com sangue de pacientes infectados, encontrou esses parasitas presentes nos tecidos analisados. Finalmente, o ciclo completo da malária foi desvendado por três pesquisadores italianos, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi, em estudos realizados entre 1898 e 1899 (CDC, 2014).

Os mosquitos do gênero *Anopheles* pertencem a família Culicidae. Esse gênero compreende seis subgêneros: *Nyssorhynchus*, *Kerteszia*, *Stethomya*, *Lophopodomya*, *Anopheles* e *Cellia* (CONSOLI & LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

No Brasil, os vetores de malária pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia*. O subgênero *Nyssorhynchus* apresenta 33 espécies e o subgênero *Kerteszia* agrupa 7 espécies. (HUTCHINGS ET AL. 2016). Esses subgêneros apresentam distribuição neotropical (CONSOLI & LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; MARCONDES, 2011). As espécies do subgênero *Nyssorhynchus* têm como criadouros as coleções hídricas terrestres como lagoas, represas, rios, valas, escavações (RACHOU, 1958). Mais de 90% dos casos de malária relatados no Brasil ocorrem na região Amazônica, onde a transmissão é devida a espécies do subgênero *Nyssorhynchus* (ROSA-FREITAS *et al.*, 1998), que engloba a espécie mais importante na transmissão do *Plasmodium* no Brasil: *Anopheles*. (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root (RACHOU, 1958). Já as espécies do subgênero *Kerteszia* têm como criadouros as águas acumuladas nas folhas de bromélias (RACHOU, 1958). No sul / sudeste do Brasil as principais espécies responsáveis pela transmissão da malária são *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator* Dyar e Knab e *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzi* Dyar & Knab (MARCONDES, 2011). Devido ao fato de os mosquitos causadores da malária do subgênero *Kerteszia* viverem nas folhas de bromélias, a doença foi denominada bromélia-malária no sul / sudeste do Brasil (RACHOU, 1958).

A zona de malária endêmica por *Kerteszia*, isto é, a zona de bromélia-malária, como é chamada, compreende os municípios mais setentrionais do Rio Grande Sul, todo o litoral de Santa Catarina e do Paraná, e municípios do litoral e da serra dos Estados de São Paulo e do Rio de Janeiro (RACHOU, 1958).

O comportamento das duas espécies causadoras do problema bromélia-malária em Santa Catarina pode ser diferenciado principalmente pela preferência dos locais onde elas vivem. *An.* (*Kerteszia*) *bellator* prefere locais mais abertos e expostos ao sol, sujeitos a maior taxa de evaporação. Por consequência são encontrados em bromélias de grande porte com maiores taxas de acumulação de água. As fêmeas picam humanos, geralmente ao anoitecer, prolongando sua atividade hematofágica às primeiras horas da noite (CONSOLI & LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

*An.* (*Kerteszia*) *cruzi*, outra espécie do mesmo subgênero, é considerado vetor primário e importante no Brasil, desde as investigações de Lutz, na Serra do Mar, em 1898. Não divide a tarefa da transmissão da malária humana com outros anofelinos, senão com outros *Kerteszia*, em seus domínios territoriais na Região Sul do Brasil. Prefere as bromélias epífitas e terrestres, mas situadas em locais protegidos dos raios solares, ou seja, na sombra produzida pelas copas das árvores (CONSOLI & LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994).

*Anopheles gambiae* é o principal vetor do *Plasmodium falciparum* na África e é um dos vetores da malária mais eficientes do mundo (HOLT, 2002). Este também pertence ao subgênero *Anopheles*. Entretanto, vários estudos (BRADLEY, 2002; COETZEE, 2013; COLUZZI, 1964; HUESTIS & LEHMANN, 2014) comprovaram que *Anopheles gambiae* constitui, na verdade, um complexo de espécies crípticas.

Espécies crípticas são duas ou mais espécies distintas classificadas como uma única espécie, devido à sua morfologia muito semelhante (PFENNINGER & SCHWENK, 2007). Os são membros do complexo *An. gambiae* sensu lato inclui oito espécies crípticas: *An. bwambae* White, *An. melas* Theobald, *An. merus* Dönitz, *An. arabiensis* Patton, *An. quadriannulatus* (A e B) (Theobald), *An. gambiae stricto sensu* e *An. coluzzii* Coetzee (2013) *An. amharicus* Coetzee (HUESTIS & LEHMANN, 2014). *An. coluzzii* recentemente se separou de *An. gambiae* s.s., anteriormente conhecida como as formas moleculares M e S, respectivamente (COETZEE *et al.*, 2013). A malária é transmitida por todas as espécies crípticas do complexo *An. gambiae* s.l., exceto duas espécies, que normalmente alimentam-se de animais: *An. quadriannulatus* e *An. amharicus* (anteriormente conhecido como espécies B de *An. quadriannulatus*) (COETZEE *et al.*, 2013)

Uma forma tradicional de diferenciação das espécies é o estudo morfológico e a utilização das chaves dicotômicas. No entanto, no caso de espécies crípticas há um impedimento para o uso desse método, pois há pouca ou nenhuma diferença morfológica entre as diferentes espécies de um complexo. Análises dos padrões de banda nos cromossomos politênicos desses mosquitos e das inversões cromossômicas são métodos utilizados para

avaliar a divergência entre as diferentes espécies crípticas desses complexos. Entre os membros do complexo *An. gambiae s.l.*, por exemplo, inversões cromossômicas são comuns, onde cada espécie do complexo tem um padrão específico de inversões (COLUZZI *et al.*, 2002).

Dentro do complexo há espécies vivendo em habitats ecologicamente diversificados e podendo supostamente alimentar-se dentro de casas e ao ar livre e com suas larvas encontradas em uma grande variedade de habitats, incluindo piscinas de chuva, arrozais, nascentes de água mineral e água salina (MASTBAUM, 1957). *An. quadriannulatus* (Theobald), um membro deste complexo, por exemplo, embora intimamente relacionado à *An. gambiae*, alimenta-se preferencialmente de bovinos em vez de humanos, não sendo considerado um verdadeiro vetor de malária humana. Outro exemplo é *An. s. merus* (Dönitz) e *An. melas* (Theobald) que realizam a oviposição em água salgada ou salobra, em vez dos locais de água doce como outras espécies (NEAFSEY ET ALL. 2015). Dessa forma, seria útil pensar no controle epidemiológico das espécies que realmente têm importância na transmissão da doença, quando múltiplas espécies estão presentes dentro dos complexos (DEREDEC, 2016).

Estudos moleculares envolvendo os vetores de doenças têm se tornando cada vez mais importantes na determinação de espécies com capacidade vetorial dentro dos complexos, pois nem todos os membros dos complexos de espécies crípticas são verdadeiro vetores de malária. Um dos motivos para a determinação dos complexos de espécies é o controle específico de vetores, pois muitas vezes uma intervenção pode ser bem sucedida contra algumas espécies de mosquitos dentro dos complexos, e não ser bem sucedida contra outras. Por exemplo, mosquiteiros e pulverização intradomiciliar são mais eficazes contra espécies que vivem dentro das residências do que aquelas que vivem em áreas abertas (DEREDEC, 2016). Portanto, ações pensadas para espécies específicas são cruciais para o controle de epidemias e o conhecimento das espécies dentro dos complexos é essencialmente importante. *An. cruzii*, também é uma espécie polimórfica para inversões cromossômicas. Ramirez & Dessen (2000a, 2000b) estudando o padrão de bandamento em cromossomos politênicos de diferentes populações dos Estados de São Paulo e Santa Catarina, observaram a existência de três formas do cromossomo X e sugeriram a existência de pelo menos três espécies crípticas, nomeadas provisoriamente por *An. cruzii* A, B e C. Associado com cada forma cromossômica existe um conjunto diferente de inversões. Além disso, Carvalho-Pinto & Lourenço-de-Oliveira (2004) utilizando a análise de isoenzimas, sugeriram a ocorrência de apenas dois grupos geneticamente isolados ao longo da mata atlântica, um formado pela população da Bahia e o outro pelas populações do sul e sudeste do Brasil (RJ, SP e SC). Rona *et al.* (2009, 2010a, 2010b, 2013), utilizando uma análise *multilocus*, mostraram que os mosquitos do Estado da Bahia (Ilha de Itaparica) constituem um grupo geneticamente diferente das populações do sul/sudeste do Brasil. Além disso, os resultados também sugerem que Itatiaia (RJ) é constituída por duas espécies incipientes que ocorrem em simpatria nomeadas de Itatiaia A e Itatiaia B. Esses estudos sugerem três principais eventos de cladogênese: i) origem da espécie da Bahia (~2,4 milhões de anos, final do Plioceno); ii) ocorreu ~600 mil anos e separou Itatiaia das outras populações do sul/sudeste; iii) o mais recente (~200 mil anos) originou as duas espécies simpátricas de Itatiaia.

Sobre *An. bellator*, Carvalho-Pinto & Lourenço-de-Oliveira (2003) utilizando uma análise isoenzimática em populações 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. Ramirez & Dessen (1996), analisando cromossomos politênicos de populações simpátricas de *An. cruzii* e de *An. bellator*, observaram que populações de *An. cruzii* mostraram um alto grau de polimorfismo cromossômico quando comparado com *An. bellator*. Corroborando com os estudos de Ramirez & Dessen (1996), Rona (2005) comparando uma população de *An. bellator* com diferentes populações de *An. cruzii*, observou que a primeira apresentou os menores valores de diversidade nucleotídica, sendo por isso, menos polimórfica que todas as populações de *An. cruzii* estudadas.

No complexo *gambiae* a fisiologia e o comportamento do mosquito estão sob um controle genético, organizados de uma maneira rítmica ao longo do dia. Os genes que regulam esses comportamentos são conhecidos pela sigla em inglês CCGs (“*clock-controlled genes*”).

Entre os comportamentos controlados por esses genes estão o comportamento em enxames ao anoitecer para acasalamento noturno, atividade de voo, alimentação de açúcar, o repasto sanguíneo das fêmeas e oviposição. Entre os genes que controlam esses ritmos circadianos está o gene *timeless*, já estudado em *Drosophila* spp. e *Ae. aegypti* (RUND *et al.*, 2011).

Neste sentido, pretendemos analisar a diferenciação genética entre diferentes populações brasileiras de *An. bellator* utilizando um fragmento do gene *timeless* como marcador molecular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as populações de *An. bellator* de diferentes localidades do Brasil medindo o grau de diferenciação genética, utilizando o gene *timeless* como marcador molecular, e testar se essa espécie forma um complexo de espécies crípticas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Observar se há fluxo gênico entre as populações de *An. bellator* a partir da análise de diferenciação genética entre as populações;
- Comparar a variabilidade genética que será encontrada em *An. bellator* com a que já foi investigada em *An. cruzii* (Rona *et al.*, 2009; 2010a; 2010b; 2013);
- Investigar se *An. bellator* forma um complexo de espécies.



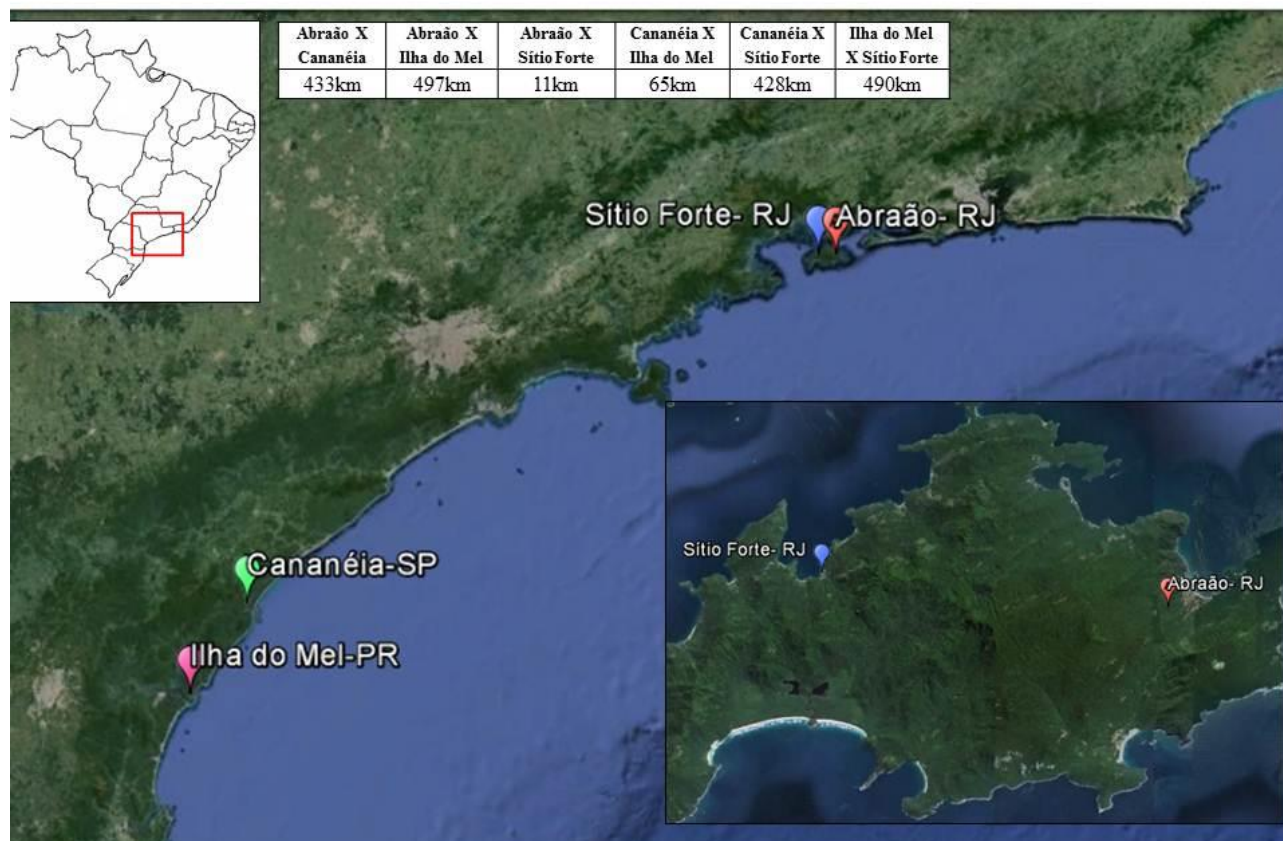
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de Material

Foram coletadas amostras de adultas e de larvas.

As amostras utilizadas neste estudo são proveniente de quatro localidades diferentes: Ilha do Mel/PR, Cananéia/SP, Abraão e Sítio Forte em Ilha Grande/ RJ ( figura 1)

**Figura1.** Localidades onde as amostras das quatro populações de *An.bellator* foram coletadas . Valores na tabela são distâncias aproximadas entre localidades de km (Fonte: IBGE e Google Mapas).



Também foram coletas amostras em Florianópolis/SC e Santo Amaro da Imperatriz/SC, mas não foram obtidas amostras do subgênero *Kerteszia* destas localidades

As larvas eram coletas nas bromélias utilizando um sifão. Após a coleta era feita a triagem em laboratório.

O processamento do material era feito colocando o conteúdo de água em uma bandeja branca e com o auxílio de uma fonte luminosa e uma pipeta era feita a procura por larvas de mosquitos. Como forma de identificação foi observado o posicionamento na água. Em seguida, o material triado era criado até a fase adulta. Quando então, os mosquitos eram identificados utilizando a chave dicotômica (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

A coleta de mosquitos adultos era feita na mata utilizando aspirador manual e com isca luminosa. A captura ocorria ao entardecer. Em seguida, os mosquitos eram colocados em copos com tecido de seda vedado com elástico, para serem levados para a identificação no laboratório de entomologia da Universidade Federal de Santa Catarina A identificação era feita no insetário utilizando chave dicotômica (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

### 3.2 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico de mosquitos foi extraído utilizando o *kit DNeasy Blood and Tissue da QIAGEN®*, de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração os tubos foram armazenados em um freezer-20°C.

### 3.3 Amplificação dos Segmentos de DNA

Para a reação de amplificação foram adicionadas as concentrações mencionadas abaixo em tubos de 0,2mL (tipo *Eppendorf®*) e adicionados 3 µL de DNA genômico da amostra desejada totalizando o volume final de 40µL. As amostras foram colocadas em um termociclador e as reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e finalizadas com um ciclo de 72°C por 7 minutos.

**Tabela 1.** Tabela de Reagentes e as concentrações utilizadas nas reações em cadeia da polimerase.

Reagente	Quantidade
Água <i>Mili-Q®</i>	24,5 µl
Tampão de PCR + Mg (10x)	4,0 µl
dNTPs (0,2 mM de cada nucleotídeo)	4,0 µl
Oligo 3' (10 µM)	2,0 µl
Oligo 5' (10 µM)	2,0 µl
Pfu DNA polimerase (2,5 unidade/ul)	0,5 µl
DNA genômico (~50 ng / µl)	3 µl
Total	40 µl

Os oligos específicos (5' - 3') utilizados nas reações de PCR seguem abaixo:

3'cruziitim03 GACGTATCGATCTGCACTT (reverse)

5'cruziitim02 CGCTTCAATGCCGCAAATA (forward)

O controle negativo foi realizado em todas as reações com ausência de DNA genômico.

### 3.4 Eletroforese do produto de PCR

Após cada reação de amplificação era realizada a corrida em gel de agarose em concentração de 1% para observar se houve a correta amplificação do DNA ou não.

Para o gel de eletroforese foram diluídos 0,8 gramas de agarose em 80 ml de TAE ( 20 ml de TAE 50 X para 1000 ml de água destilada), que também foi utilizado como solução tampão da corrida. Para visualização foi utilizado GelRed 10.000 x. Em cada poço, foram adicionados 10 ul de produto de PCR e 2 µl de Gel Loading Dye (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%, sacarose 40%). O marcador molecular utilizado foi o 100bp.

### 3.5 Purificação dos fragmentos gênicos obtidos por PCR

Os fragmentos do DNA amplificados foram cortados do gel e purificados utilizando o kit "*QIAquick PCR Purification Kit*" da *QIAGEN®* conforme instruções do fabricante. Em seguida as amostras eram novamente corridas em gel de agarose 1% conforme o item 3.4.

### 3.6 Ligação dos fragmentos purificados ao vetor de clonagem

Os fragmentos de PCR obtidos foram clonados utilizando o *Kit CloneJet PCR Cloning®* da *QIAGEN®*. Esse kit apresenta a seleção positiva original do clonagem vector pJet1.2/blunt que contém um gene letal que é interrompido pela ligação de um DNA inserido no sítio de clonagem. No resultado, apenas células com plasmídeos recombinantes são propagadas. A reação de ligação continha 5 µl de 2x Reaction Buffer, 0,5 µl de pJet 1.2/blunt Cloning Vector, 0,5 µl de T4 DNA ligase.

### 3.7 Transformação de bactérias resistentes

Células cálcio competentes foram transformadas utilizando os vetores com as ligações. Foram adicionados 3 µl de ligação para 100 µl de células *Escherichia coli*. A mistura era deixada no gelo por 30 minutos. Em seguida foi feito o choque térmico de 1 minuto a 42°C e rapidamente transferido os *Eppendorf®* para o gelo por dois minutos. Adicionou-se 1000 µl de meio SOC suavemente e as células foram incubadas para crescimento durante 1 hora na estufa.

Então a mistura foi levada a centrífuga a 13 000 rpm por 30 segundos sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os *pellets* ressuspensos utilizando uma ponteira de 1000 µl sem rinçar muito.

O plaqueamento foi feito em meio LB ágar com ampicilina (100 µg/ml). As placas foram deixadas na estufa durante à noite, para crescimento.

### 3.8 Inoculação e centrifugação das culturas

As colônias foram selecionadas e inoculadas em microplaca “deepwell” (96 poços) como segue o protocolo abaixo. Em cada poço foi adicionado 1 ml de meio Circle Grow (40g de meio Circle Grow, 100 ml de água *miliQ*) com ampicilina 100 µg/ml. Para cada poço era feita a inoculação de uma colônia. A placa foi selada com adesivo e identificada. Foram feitos furos de respiro em casa poço utilizando uma agulha esterilizada.

As placas foram deixadas a 37°C no *shaker* durante 22 horas. Após a retirada do *shaker* as microplacas foram centrifugadas por 6 minutos, a 20°C para sedimentação. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* restantes foram guardados em um freezer -20°C.

### 3.9 Mini-preparação do DNA

A preparação do DNA plasmidial foi realizada em placa de 96 poços. A cada poço foi adicionado 240 µl de solução GET (glicose, EDTA, Tris). A placa foi selada e levada ao vortex para que as células fossem ressuspensas. Foram centrifugadas a 4000 rpm, a 20°C e o sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre o papel por alguns minutos. Foi adicionado 80 µl de GET + 3 µl RNase aos poços. A suspensão de células foi transferida para outra placa de 250 µl de polipropileno de fundo V.

Novamente em cada um dos poços foi adicionado 80 µl de NaOH (500 µl de NaOH + 1ml de SDS 10% + 8,5 de água *Mili-Q®* para completar a solução) sendo o volume total para cada placa de 10 µl. A placa foi selada e misturada por inversão por 30 vezes. As placas foram centrifugadas a 2000 rpm a 20°C por 40 segundos e em seguidas foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação, adicionou-se 80 µl de KOAc 3 M gelado. As placas foram seladas e misturadas por inversão 30 vezes e incubadas novamente por 10 minutos a temperatura ambiente, em seguidas, foram centrifugadas (“spin” a 4 000 rpm). Foi incubada por 45 minutos a 90°C e depois resfriada em gelo por 10 minutos. Em seguida centrifugou-se mais uma vez por 9 minutos, 4 000 rpm a 20°C.

Uma placa do tipo *Milipore®* foi fixada no topo da placa em fundo V e o conteúdo sobrenadante foi transferido para a placa *Milipore®* e foi centrifugada por 6 minutos, 4 000 rpm, 20°C até todo volume descer para a placa em fundo V e então a placa *Milipore®* foi removida. Adicionou-se 100 µl de isopropanol (Merck) gelado ao filtrado. A placa foi selada e misturada por inversão 30 vezes. Em seguida, foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada por 45 minutos, 4 000 rpm a 20°C.

O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200 µl de etanol 70% (Merck) gelado. A placa foi selada e centrifugada por 5 minutos, 4000 rpm a 20°C. O sobrenadante foi removido e placa invertida em papel absorvente. Ainda com o papel absorvente e invertida foi colocada para centrifugar (“spin” até 9 000 rpm) a 20°C.

Para secagem a placa foi deixada, virada para cima, a temperatura ambiente por 60 minutos coberta com papel toalha. O DNA foi ressuspendido com 40 µl de água *Mili-Q®*. A placa foi coberta com adesivo e guardada em freezer - 20°C para sequenciamento.

### 3.10 Sequenciamento

Para cada indivíduo, oito clones foram sequenciados para identificar os dois alelos e também verificar possíveis erros induzidos por PCR. Os clones foram enviados ao laboratório MYLEUS biotecnologia para sequenciamento. O métodos utilizando foi sequenciamento de Sanger.

### 3.11 Análise das sequências

Para verificar a coerência das sequencia obtidas, foi utilizado o método de comparação. Cada sequencia foi colocada no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, para conferir sua identidade.

Foi utilizado o programa DNASTar para edição das sequências.

Para o alinhamento das sequencias foi utilizado o programa ClustalW (THOMPSON ET AL., 1997). Os programas DNASP.10.01. (LIBRADO & ROZAS, 2009) e ProSeqV 2.91 (FILATOV & CHARLESWORTH, 1999) foram utilizados para análise dos polimorfismos e a diferenciação entre as populações; o programa TCS1.21 (CLEMENT ET AL., 2000) foi usado para para a construção da rede de haplótipos e o programa MEGA4 foi usado para construção da árvore filogenética (TAMURA & NEI).



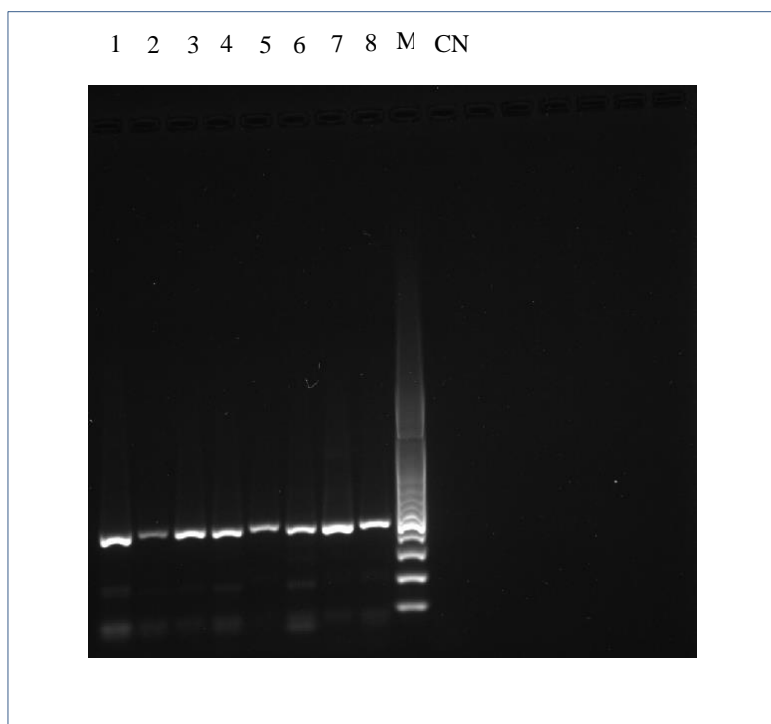
## 4 RESULTADOS

Foram analisadas 30 sequências das quatro populações, sendo duas do Abraão, doze de Cananéia, oito da Ilha do Mel e oito do Sítio Forte.

É possível observar através do alinhamento (apêndice A) e do gel de agarose (figura 1) que as sequências utilizadas nas análises das quatro populações de *An. bellator* possuem um fragmento de aproximadamente 400 pares de base do gene *timeless*.

No alinhamento (apêndice A) obtido podemos observar que o gene em estudo possui dois *íntrons* e dois *exons*. As regiões de *íntrons* (não codificadora de proteínas), destacadas em cinza, apresentam-se com maior número de substituições de base e *indels*. A primeira contém cerca 67 pares de base e a segunda 77. A região do *exon* (codificadora de proteínas) apresenta-se menos polimórfica, com um menor número de substituições. O primeiro *éxon* contém 79 pares de base e o segundo 142 pares de base.

**Figura 21.** Gel de agarose (2%) contendo o fragmento do gene *timeless* amplificado por PCR. Estas bandas possuem fragmentos de aproximadamente 400 pares de base. Para a reação de PCR, foi utilizado o DNA genômico de indivíduos da população de Ilha do Mel. Os números de 1 a 8 indicam as bandas de aproximadamente 400 pares de base de cada indivíduo; M indica o marcador de peso molecular CN indica o controle negativo.



Na tabela 2, podemos observar o número de sequências analisadas, o número de polimorfismos em cada população, além das medidas de diversidade nucleotídica ( $\theta$  e  $\pi$ ), e o teste D de neutralidade de Tajima.

Como a população de Abraão teve apenas duas sequências analisadas, não foi possível calcular a diversidade nucleotídica nem o  $D_T$  para esta população. A população de Cananéia teve 12 sequências analisadas, Ilha do Mel teve oito e Sítio Forte também teve oito sequências analisadas. A população da Ilha do Mel mostrou-se a mais polimórfica, com maior número de sítios polimórficos e a de Abraão a menos polimórfica. O baixo número de polimorfismos encontrado na população de Abraão pode ser efeito do menor número de sequências analisadas.

É possível observar ainda a diversidade nucleotídica com base no número total de mutações ( $\theta$ ) e baseada na média de diferenças par-a-par entre as sequências ( $\pi$ ), sendo o maior valor atribuído à população da Ilha do Mel (0,02414 e 0,02516, respectivamente) e o menor valor para Cananéia (0,01651 e 0,01864, respectivamente). Os valores do Teste de Tajima ( $D_T$ ) não foram significativos ( $P > 0,05$  em todos os casos), indicando evolução neutra das sequências. Dessa forma, não há evidência de que haja seleção natural agindo sobre as sequências estudadas em nenhuma das populações.

**Tabela 2.** Polimorfismos encontrados em cada população de *An. bellator* utilizada neste estudo utilizando o gene *timeless*. 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;  $\pi$ , diversidade de nucleotídeos com base no número médio de diferenças par-a-par;  $D_T$ , Teste de Tajima.

População	N	S	$\theta$	$\pi$	$D_T$
Abraão	2	11	-	-	*Não pode ser calculado
Cananéia	12	17	0,01651	0,01864	0,056071
Ilha do Mel	8	21	0,02414	0,02516	0,21228
Sítio Forte	8	18	0,02284	0,02150	-0,30303

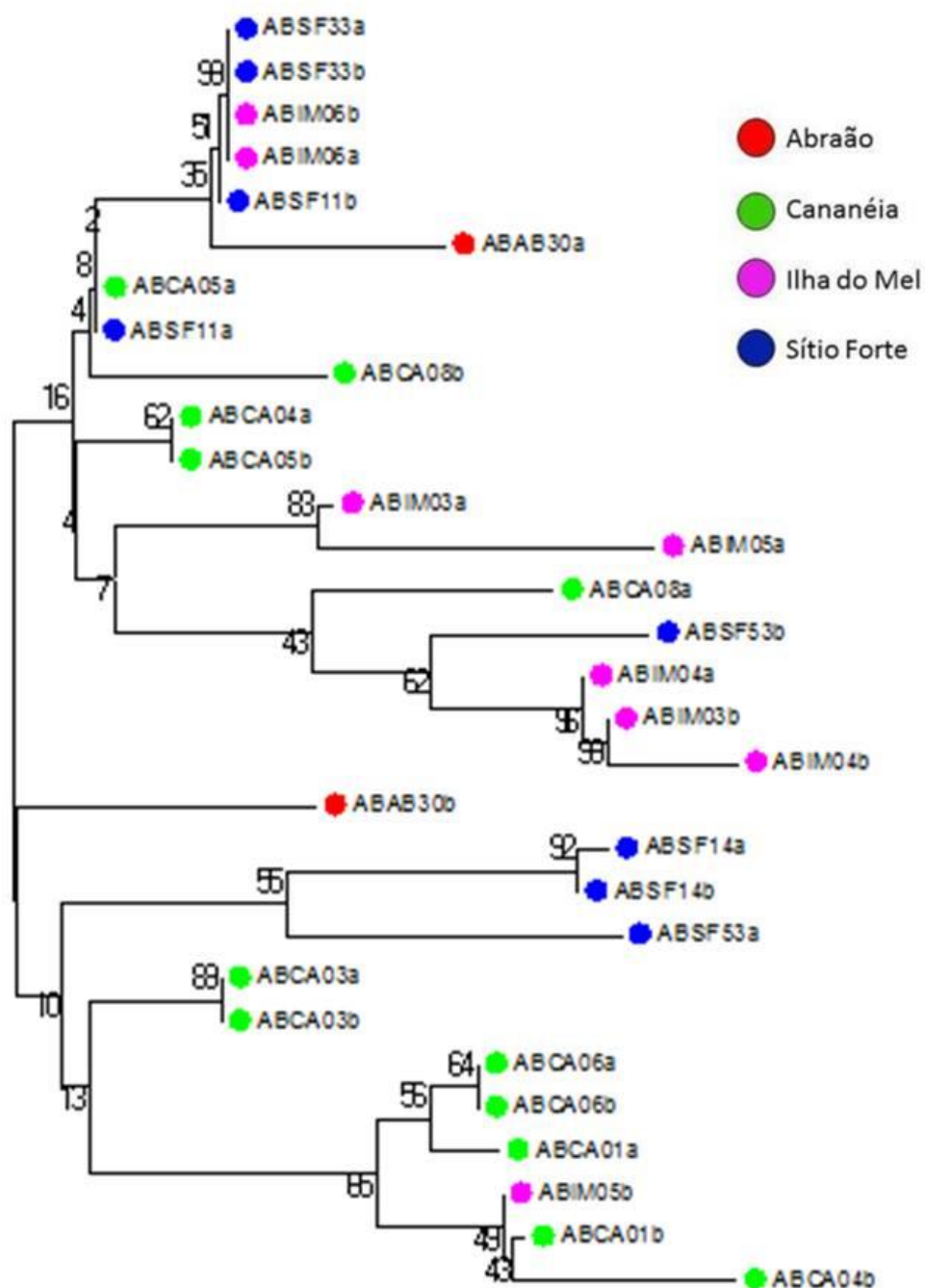
**Tabela 3.** Diferenciação genética entre as populações de *An. bellator* utilizadas neste estudo utilizando o gene *timeless*.  $F_{ST}$ , medida de diferenciação entre as populações. As significâncias nos valores de  $F_{ST}$  foram avaliados com 1000 permutações.  $P$ , significância dos valores de  $F_{ST}$ .  $D_{xy}$  e  $Da$ , média do número de substituições de nucleotídeos por sítio entre as populações, onde  $D_{xy}$  é a divergência bruta e  $Da$  é a divergência líquida;  $Ss$ , número de polimorfismos compartilhados entre as duas populações;  $Sf$ , número de diferenças fixas entre as duas populações.

Populações:	$F_{ST}$	$P$ -value	$D_{xy}$	$Da$	$Ss$	$Sf$
<b>Ilha do Mel x Sítio Forte</b>	0.0674	0.1600	0.0237	0.0016	12	<b>0</b>
<b>Sítio Forte x Cananéia</b>	0.1061	0.0430	0.0232	0.0025	09	<b>0</b>
<b>Ilha do Mel x Cananéia</b>	0.1296	0.0490	0.0246	0.0032	11	<b>0</b>

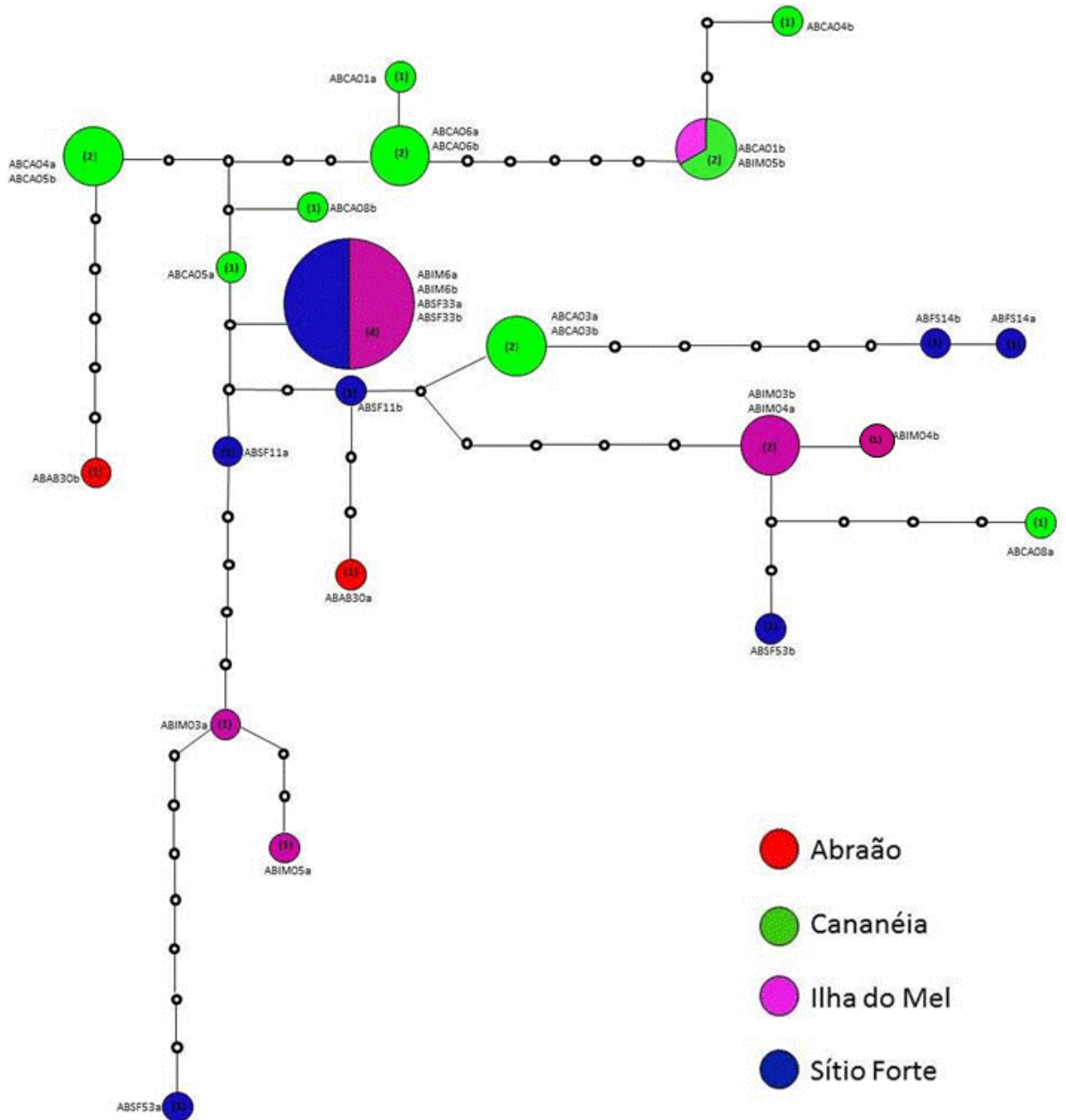
A tabela 3 mostra os valores de  $F_{ST}$ , calculados par-a-par entre as populações utilizando o software PROSEV.2.9.1. Este índice estima o grau de diferenciação genética entre as populações estudadas. Devido ao baixo número de sequências provenientes da população de Abraão (apenas duas), essa amostra não foi utilizada na análises da tabela 3. Das comparações par-a-par, duas foram significativas ( $P < 0,05$ ), e dentre essas, o maior valor de  $F_{ST}$  foi encontrado na comparação entre Cananéia e Ilha do Mel ( $F_{ST} = 0.1296$ ), seguido de Cananéia e Sítio Forte ( $F_{ST} = 0.1061$ ).

Na mesma tabela também podemos observar os valores das divergências bruta ( $D_{xy}$ ) e divergências líquida ( $Da$ ). Cananéia x Ilha do Mel apresentaram os maiores valores de  $D_{xy}$  e de  $Da$ , corroborando com o valor mais alto de  $F_{ST}$ . Em relação aos valores de polimorfismos compartilhados ( $Ss$ ) e de diferenças fixas ( $Sf$ ), foram encontrados muitos polimorfismos compartilhados e nenhuma diferença fixa entre as populações analisadas.

**Figura 2.** Árvore filogenética das seqüências de *An. bellator* construída utilizando o método Neighbour-Joining com distância Kimura 2-parâmetros. Os números acima dos ramos são os valores de “bootstrap”, baseados em 1000 replicações. **ABAB:** indivíduos de Abraão; **ABCA:** Cananéia; **ABIM:** Ilha do Mel; **ABSF:** Sítio Forte,



**Figura 3.** Rede de haplótipos construída utilizando o fragmento do gene *timeless*. Cada círculo representa um haplótipo diferente com tamanho proporcional à sua frequência relativa de seqüências. Os números entre parênteses indicam a quantidade de seqüências em haplótipo. As diferentes cores representam as populações de *An. bellator*. 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; **ABCA:** Cananéia; **ABIM:** Ilha do Mel; **ABSF:** Sítio Forte.



As figuras 2 e 3 representam a história evolutiva dos haplótipos deste estudo. É possível observar que os haplótipos não mostram uma separação clara entre si e que eles são compartilhados entre as diferentes populações analisadas.



## 5 DISCUSSÃO

Estudos com *An. cruzii* também têm demonstrado evidências da existência de uma completo de espécies para esse táxon. Ramirez & Dessen (2000a, 2000b), em seus estudos com cromossomos politênicos observaram diferentes padrões de bandeamento para o cromossomo X. Foram encontrados três padrões diferentes, sugerindo a existências de pelo menos três espécies crípticas.

Utilizando análises isoenzimáticas Carvalho-Pinto & Lourenço-de-Oliveira (2004) comprovaram a existência de dois grupos geneticamente distintos. O primeiro formado pela população da Bahia e o segundo pelas populações do sul e sudeste do Brasil, provenientes dos estados do RJ, SP e SC.

A partir de estudos utilizando uma análise multilocus, Rona *et al.* (2009, 2010a, 2010b, 2013), corroborou com os estudos isoenzimáticos de Carvalho-Pinto & Lourenço-de-Oliveira (2004), confirmando a existência de um grupo distinto no estado da Bahia (Itaparica), que estava geneticamente separado dos demais populações analisadas do sul/sudeste do Brasil. Os mesmos estudos ainda observaram outras duas espécies em processo de especiação nomeadas de Itatiaia A e Itatiaia B, em Itatiaia (RJ). Os resultados descritos apontam alguns possíveis eventos de separação. Sendo o primeiro responsável pela separação da espécie originada em Itaparica – BA, que ocorreu há aproximadamente 2,4 milhões de anos, no final do Plioceno. O segundo ocorreu há aproximadamente 600 mil anos, e separou Itatiaia das outras populações do sul/sudeste, e o último originando as duas espécies de Itatiaia.

Comparando os resultados adquiridos no presente estudo com aqueles encontrados por Rona *et al.* (2009) em seu estudo utilizando também o gene *timeles*, em populações Brasileiras de *An. cruzii*, podemos observar valores totais de  $\pi$  e  $\theta$  maiores nas populações de *An. cruzii* do que os encontrados neste estudo utilizando o mesmo marcador para *An. bellator*. A população de Cananéia, por exemplo, apresentou valores de  $\pi$  (0,02677) e de  $\theta$  (0,03334) muito maiores para *An. cruzii* quando comparado com os valores obtidos para *An. bellator*:  $\pi$  (0,01864) e de  $\theta$  (0,01651).

Ramirez & Dessen (1996), também encontraram resultados semelhantes em suas análises com cromossomos politênicos e inversões cromossômicas, de populações das mesmas localidades utilizadas neste estudo. Foi observado que as populações de *An. cruzii* mostraram um alto grau de polimorfismo cromossômico quando comparado com *An. bellator*. Foi proposto 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 & DESSEN, 1996; RONA, 2005). Estudos utilizando o complexo de espécies *An. gambiae s.l.*, e suas diferentes formas do braço direito do cromossomo 2 (Mopti, Savanna, Bamako, Forest e Bissau), puderam observar algo semelhante. As variações cromossômicas encontradas estão diretamente relacionadas ao clima e ao ambiente ocupado por cada uma das formas (Coluzzi *et al.*, 1979; Coluzzi *et al.*, 1985). Acredita-se que os diferentes rearranjos cromossômicos favoreceriam a ocupação de habitats distintos. O que poderia 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. 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 genes com características favoráveis a diferentes condições, ocasionando maior adaptação local. (Ayala e Coluzzi, 2005; Coluzzi, 1982, Coluzzi *et al.*, 2002).

Quanto ao teste de neutralidade (Teste D de Tajima), nenhum dos valores obtidos foi estatisticamente significativo, indicando que todas as populações estão dentro do modelo de evolução neutra. Dessa forma, não há evidência de que haja seleção natural agindo sobre as sequências estudadas em nenhuma das populações. Mesmo para a população de Sítio Forte, onde o teste de Tajima gerou um resultado negativo, o que poderia indicar aumento do tamanho populacional ou seleção purificadora, o teste não teve significância. O valor negativo do teste de Tajima, para a população de Sítio Forte pode ser explicado pelo valor de  $\theta$  ser superior ao de  $\pi$ .

Comparando os altos índices de  $F_{ST}$  encontrados entre as populações Brasileiras de *An. cruzii* utilizando o gene *timeless* (RONA ET AL., 2009) com os valores de diferenciação aqui encontrados entre as amostras de *An. bellator*, podemos concluir que possivelmente as populações de *An. bellator* constituem uma espécie única, e que não formam um complexo de espécies crípticas como é o caso de *An. cruzii*. Todos os valores de  $F_{ST}$  encontrados no presente estudo apresentaram-se abaixo de 0.35, valor como tido diagnóstico de espécies (HEY & PINHO, 2012). O maior valor de  $F_{ST}$  encontrado entre as populações de *An. bellator* foi entre Sítio Forte x Cananéia ( $F_{ST} = 0.1061$ ) enquanto que para *An. cruzii* (RONA ET AL., 2009) muitos valores foram acima de 0.35. Além disso, tanto os valores de  $D_a$ , quanto os de  $D_{xy}$  foram considerados baixos em comparação com os resultados encontrados por Rona *et al.*, (2009). Ainda, a presença de polimorfismos compartilhados e nenhuma diferença fixa sugere que as populações de *An. bellator* aqui estudadas contem espécies iguais ou estritamente relacionadas.

Corroborando com os dados acima, a árvore filogenética construída não demonstrou uma separação clara entre as populações o que pode ser evidenciado também pela rede haplótipos.

Este estudo faz parte de um projeto maior onde os genes *clock*, também envolvido nos ritmos circadianos foram analisados e ainda o gene *rp49*, um gene ribossomal constitutivo foram analisados. Em ambos os estudos foram encontrados muitos polimorfismos genéticos, poucas diferenças fixas e ainda valores muito baixo de  $F_{st}$ , corroborando os resultados encontrados no presente estudo.



## 6 CONCLUSÃO

O estudo da variação molecular do gene *timeless* em quatro populações de *Anopheles bellator* provenientes de Abraão e Sítio Forte (RJ), Cananéia (SP) e Ilha do Mel (PR) não demonstrou evidências de que esta espécie pode ser considerada um complexo de espécies crípticas. Valores muito baixos de  $F_{ST}$ , assim como de  $D_{xy}$  e  $D_a$ , foram encontrados, indicando que possivelmente ainda há fluxo gênico entre as populações analisadas.

Este estudo também demonstrou que o grau de polimorfismo genético encontrado nas populações de *An. bellator* são mais baixos quando comparado com as populações de *An. cruzii* (Ramirez & Dessen, 1996; Rona, 2009). Uma das possíveis explicações para que tal espécie permaneça com baixo grau de polimorfismo e baixa diversidade nucleotídica, é que *An. bellator* possui uma diversidade de habitats pouco variada.



## 7 REFERÊNCIAS

- Carvalho-Pinto CJ, Lourenço-de-Oliveira R. (2003), **Isoenzymatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) bellator* Dyar & Knab (Diptera: Culicidae) populations.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98:1045-1048.
- Carvalho-Pinto CJ, Lourenço-de-Oliveira R. (2004) **Isoenzymatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 99:471-475.
- CDC ( 2014) Centers for Disease Control and Prevention. **The History of Malaria, an Ancient Disease.** Acesso em 15 de outubro de 2016. Site: < <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/index.html>>.
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre A, Coulibaly MB, Besansky NJ (2013) ***Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex.** *Zootaxa.*, 3619:246–274.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. (1994) **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, Di Deco MA, Petrarca V. (2002) **A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex.** *Science.* 298:1415-1418.
- Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA.(1979) **Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex.** *Trans R Soc Trop Med Hy.*, 73:483-97.
- Coluzzi M. **Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in Anopheline mosquitoes.**(1982) *Prog Clin Biol Res*, 96:143-53.
- Coluzzi, M., Petrarca V, Di Deco M. A. (1985)**Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*.** *Boll. Zool.* 52: 45–63.
- Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, Di Deco MA, Petrarca V. (2002) **A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex.** *Science.* 298:1415-1418.
- Deredec A. et all. (2016).**Partitioning the contributions of alternative malaria vector species.** *Malaria Journal.* 15:60
- Filatov DA & Charlesworth D. (1999) **DNA Polimorphism, Haplotype Structure and Balancing Selection in the *Leavenworthia* PgiC locus.** *Genetics.* 153:1423-1434.
- Hey J, Pinho C.( 2012 ) **Population genetics and objectivity in species diagnosis.** *Evolution.* 66(5):1413-29.
- Holt, A. R.,(2002) **The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* .** *Science* 298:129-149.
- Huestis, D.L., Lehmann, T. (2014), **Ecophysiology of *Anopheles gambiae* s.l.: Persistence in the Sahel.** *Infect. Genet. Evol.* Acesso em 09 de julho de 2016 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.05.027>>
- Librado P, Rozas J. **DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics,* 25:1451-1452.
- Marcondes CB. (2011). **Entomologia médica e veterinária.** 2ª ed. São Paulo. Atheneu, 526 p. 107-128.
- Mastbaum, O. (1957). **Past and present position of malaria in Swaziland.** *Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 60, 3–11.
- Neafsey et all. (2015) **Highly evolvable malaria vectors: The genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes.** *Science.* 347: 43-54.
- Pfenninger M & Schwenk K. (2007) **Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions.** *BMC Evol Biol.* 7:121.
- Ramirez CCL, Dessem EMB. (1996) **The polytene chromosomes of the mosquito *Anopheles bellator* compared with those of *Anopheles cruzii*.** *Brazilian J Genet.* 19:555-558.
- Ramirez CCL, Dessem EMB. (2000a).**Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles cruzii*.** *Genome,* 43:143-151.
- Ramirez CCL, Dessem EMB. (2000b)**Chromosome differentiated populations of *Anopheles cruzii*: evidence for a third sibling species.** *Genética,* , 35:1-8.

- Rachou RG. (1958), **Anofelinos do Brasil: Comportamento das espécies vetoras de malária.** *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.* 10:145-181.
- Rona, Luísa DP. (2005) **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).** Rio de Janeiro,. 61 f. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
- Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Gentile C, Grisard EC, Peixoto AA. (2009), **Assessing the molecular divergence between *Anopheles (Kerteszia) cruzii* populations from Brazil using the *timeless* gene: further evidence of a species complex.** *Malar J.* 8:60.
- Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Mazzoni CJ, Peixoto AA. (2010) **Estimation of divergence time between two sibling species of the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex using a multilocus approach.** *BMC Evol Biol.* 10:91.
- Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Peixoto AA. (2010). **Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex in south-east Brazil.** *Malar J.*, 9:33.
- Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Peixoto AA. (2013) **.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.*, 13:207.
- Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Carvalho-Pinto, CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento T. (1998). ***Anopheline Species Complexes in Brazil. Current Knowledge of Those Related to Malaria Transmission.*** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 93:651-655.
- Rund SSC, Hou TY, Ward SM, Collins FH, Duffield GE. (2011). **Genome-wide profiling of diel and circadian gene expression in the malaria vector *Anopheles gambiae*.** *PNAS.* 108:E421-E430.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. (2013) **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** *Mol Biol Evol.*, 30:2725-2729.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. (2002) **Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX.** *Curr Protoc Bioinformatics.*. Chapter 2: Unit 2.3.
- WHO 2016. World Health Organization (WHO Home page). Fact sheet on the World Malaria Report 2016. Acesso em 09 de julho de 2016. Site: [http://www.who.int/malaria/media/world\\_malaria\\_report\\_2016/en/](http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2016/en/).







