

MAPEAMENTO DA SEQUÊNCIA GÊNICA MIOSINA EM CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE) MANAUS, ESTADO DO AMAZONAS.

Wancléia Graça GRANGEIRO¹; Leticia Cegatti BRIDI²; Miriam Silva RAFAEL³.

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Bolsista Doutorado-GCBEV/FAPEAM; ³Orientador INPA/CSAS.

1.Introdução

A malária é a doença que causa mais mortes no mundo (Coura *et al.*, 2006). Em 2011 foram notificados 217.298 casos da doença na região amazônica (Ministério da Saúde, 2012). Os parasitas, responsáveis pela doença, são protozoários do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos de uma pessoa a outra pela picada do mosquito do gênero *Anopheles*.

O *Anopheles darlingi* é o principal vetor da malária humana na Amazônia, onde ocorre o maior número de casos e cuja preferência é alimentar-se de sangue humano (Tadei *et al.*, 1998). Esse anofelino apresenta cariótipo metafásico comum ao gênero com 2n=6 cromossomos, consistindo de dois pares de cromossomos autossômicos (II e III) e um par de cromossomos sexuais, sendo XX nas fêmeas e XY nos machos (Rafael e Tadei, 1998).

O presente estudo visou analisar a proteína miosina. É uma ATPase que se movimenta ao longo da actina e em presença de ATP, sendo responsável pela contração muscular (Montenegro & Franco, 2004). Além de funções associadas às células musculares, a miosina desempenha um papel significativo na manutenção das glândulas salivares, conforme a análise transcriptômica e funcional das glândulas salivares de *Anopheles gambiae* em relação à alimentação sanguínea de fêmeas adultas (Das *et al.*, 2010). Apesar da importância da miosina como proteína motora, a literatura não registra a sua localização física em cromossomos de mosquitos.

O método de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) consiste no emparelhamento de determinado segmento de DNA/DNA, RNA/RNA ou DNA/RNA (sonda) com uma sequência complementar de nucleotídeos na amostra alvo, para identificar genes específicos ou sequências de regiões cromossômicas. Essa metodologia tem auxiliado estudo de caracterização e variabilidade cromossômica de diversos insetos (Guerra, 2004).

Este trabalho teve como objetivo mapear fisicamente o gene da miosina (*AdaMyo82-83*), da biblioteca de Etiqueta de Sequência expressa - ESTs de *A. darlingi* (Rafael *et al* 2005), em cromossomos politênicos de *A. darlingi*, por meio de FISH, para estudo da variabilidade cromossômica e evolução desse mosquito.

2.Material e Métodos

As coletas de imaturos de *A. darlingi* foram realizadas no Sítio do Carlão e madeireira Portela, bairro do Puraquequara, Manaus-AM. As preparações das lâminas dos cromossomos politênicos de *A. darlingi* foram realizadas de acordo com os métodos descritos por French *et al.* (1962) e Kumar & Collins (1994), com modificações para *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2004).

O DNA genômico de *A. darlingi* foi extraído, conforme o método de Williams *et al* (1990). A sequência da EST miosina (*AdaMyo82-83*) contendo 568 pares de base (*AdaMyo82-83*) foi obtida a partir do genoma funcional de *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2005; Bridi *et al.*, 2006). Em seguida foi desenhado um par de *primers* denominado 82-83, cuja sequência de nucleotídeos é: 5' GAACCCAACCTCTGGACCTCA 3' e 5' AATCGCTGTTTTGCTTGCTT 3'; com auxílio do programa *Gene Runner* 3.01: www.generunner.net.

Foi realizado um gradiente de temperatura e em seguida uma PCR do par de *primers* miosina com a temperaturas de anelamento 56,5 °C. O produto de PCR foi purificado pela metodologia de *Polythylene glycol* (PEG)

A marcação da sonda *AdaMyo82-83* foi feita por *Random Primer* 2.5x (*Invitrogen* cat. nº 18187-013, USA). A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada nos cromossomos politênicos de *A. darlingi*, com o fluorocromo fluoresceína-12-dUTP (*Bio Probe*® ENZO-42716, USA). A detecção do sinal da sonda nos cromossomos foi a partir do corante YOYO 10X (*Invitrogen* – 895247, USA), diluídos em de PBS 1X. As microfotografias foram capturadas em microscópio de luz Axioplan Zeiss epifluorescente, com campo claro e contraste de fase.

3.Resultados e Discussão

No presente trabalho o gene *AdaMyo* 82-83 hibridou no braço 3R (inversão 3Rc, Seção banda 34c), conforme visualizado na Figura 1A e B.

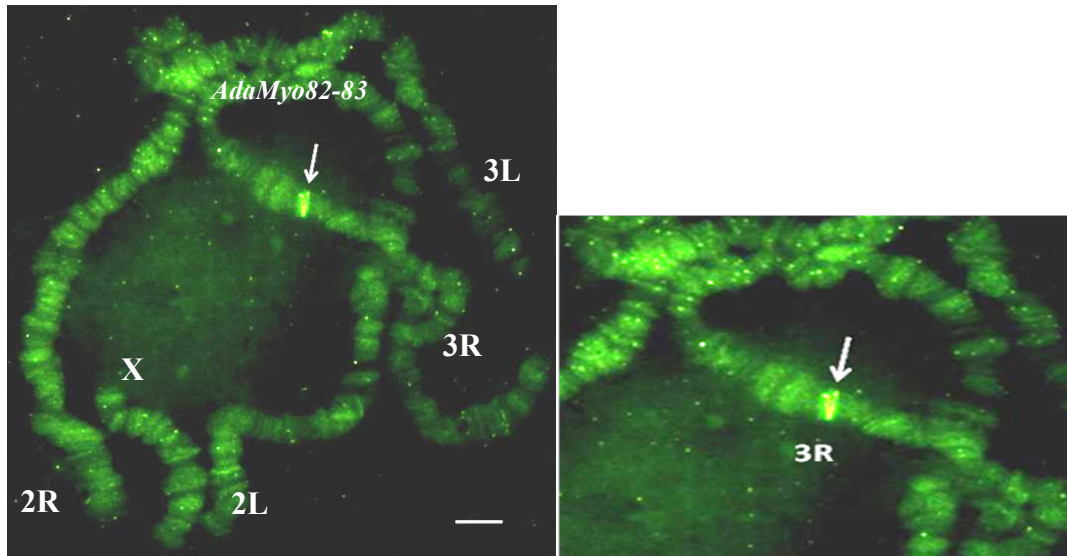


Figura 1A, B: Mapeamento do gene *AdaMyo82-83* no cromossomo 3 (braço 3R, inversão 3Rc, Seção 34c), do cromossomo politênico de *A. darlingi* (seta). B: Foto ampliada da região de hibridação (seta). Barra: 10µm.

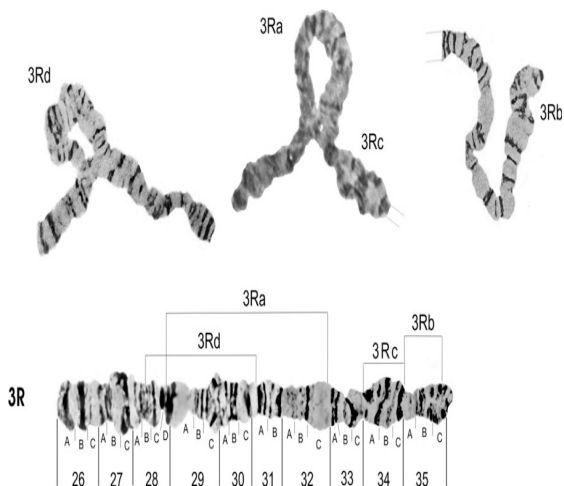


Figura 6: Cromossomo 3, do fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2010), mostrando a marcação *in situ* do gene *AdaMyo82-83* no cromossomo 3 (braço 3R, inversão 3Rc, Seção 34c), (seta). Barra: 10µm.

Mao e colaboradores (2006) detectaram o *dachs*, gene da sub-família da miosina 5, 7 e 10I, que auxilia na regulação do crescimento e desenvolvimento embrionário de discos imaginários de *Drosophila*, visualizado com marcações de fluorocromo, pelo método de FISH. A ação da miosina em músculos embrionários de larva, pupa e adulto de *Drosophila melanogaster* também foi estudada por Hess e colaboradores (2007).

Porém, há escassez de artigos na literatura acerca de mapeamento físico da miosina em mosquitos. Isso dificultou a análise comparativa do presente resultado de mapeamento físico do gene *AdaMyo82-83* no cromossomo 3 (braço 3R, inversão 3Rc, Seção 34c) de larva de *A. darlingi* por FISH, com outros mosquitos. Este resultado representa uma oportunidade única para compreender a estrutura e organização do seu genoma desse importante vetor da malária Neotropical.

4. Conclusão

Considerando a grande capacidade de *A. darlingi* como transmissor primário da malária humana, especialmente na Amazônia, o mapeamento da miosina pelo método FISH, em seus cromossomos politênicos auxiliará estudos futuros, para melhor compreensão da variabilidade cromossômica e evolução desse mosquito.

5. Referências Bibliográfica

- Bridi, L.C.; Tadei, W.P.; Nunes-Silva, C.G; Astolfi-Filho, S.; Santos, J.M.M dos; Rafael, M.S. 2006. Biblioteca de cDNA de Larva de *Anopheles darlingi* (Diptera; Culicidae). Anais do II Encontro de Genética do Norte: II Engenor, Belém, PA.1: 26-26.
- Coura, J.R.; Mutis, M.S.; Andrade, S.L. 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo*. 101(3): 229-237.

- Das, S.; Radtke, A.; Choi, Y-J, Mendes, A.M.; Valenzuela, J.G.; Dimopoulos, G. 2010. Transcriptomic and functional analysis of the *Anopheles gambiae* salivary gland in relation to blood feeding. *BMC Genomics*, 11:566.
- French, W.L.; Baker, R.H.; Kitzmiller, J.B. 1962. Preparation of mosquito chromosomes. *osq. News*, 22: 377-383.
- Guerra, M. 2004. FISH. Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 184p.
- Hess, K.N.; Singer, A.P.; Trinh, K.; Nikkhoy, M.; Bernstein, I.S. 2006. Transcriptional regulation of the *Drosophila melanogaster* muscle myosin heavy-chain gene. *Gene Expression Patterns* 7. 413–422
- Kumar, V. & Collins, F.H. 1994. A technique for nucleic acid *in situ* hybridization to polytene chromosome of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Mol. Biol.* 3 (1): 41- 47.
- Mao, Y.;Rauskolb, C.;Cho, E.;Hus, W.;Hayter, H.;Minihan, G.; Katz, N.F.; Irvine, D,K.2006.Dachs: an unconventional myosin that functions downstream of Fat to regulate growth, affinity and gene expression in *Drosophila*. *Development*. 133(13) 2539-2551
- Montenegro, M.R. & Franco, M. *Patologia, processos gerais*; Editora Atheneu; 4º edição. 2004.
- Rafael, M.S. & Tadei, W.P. 1998. Metaphase karyotypes of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root and *A. (N) nuneztovari* Galbadón (Diptera: Culicidae). *Genetics and Biology*. 21 (4): 351- 354.
- Rafael, M. S.; Tadei, W. P.; Hunter, F. F. 2004. The physical gene Hsp70 map on polytene chromosomes of *Anopheles darlingi* from the Brazilian Amazon. *Genetica*, Netherlands, 121: 89-94.
- Rafael, M.S.; Nunes–Silva, C.G.; Astolfi–Filho, S., Tadei, W.P. 2005. Biblioteca de cDNA de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). In: 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia/ São Paulo: Zeppelini Editorial & Comunicação. v.CD. pp. 145-145.
- Tadei, W.P.; Dutary-Thatcher, B.; Santos, J.M.M.; Scarpassa, V.M.; Rodrigues, I.B.; Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 59: 325-335.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafaski, J.; Tingly, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18 (22): 6531-6535.