

MAPEAMENTO FÍSICO CROMOSSÔMICO DO GENE ARRESTINA EM CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE)

Wancléia Graça GRANGEIRO¹; Letícia Cegatti BRIDI²; Míriam Silva RAFAEL³

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

1. Introdução

A malária é a doença que causa mais mortes no mundo (Coura *et al.* 2006). De acordo com o Ministério da saúde (2011) os casos de malária, concentram-se em quatro principais estados da região amazônica: 17.176 casos no Acre, 50.253 no Amazonas, 25.093 em Rondônia, 95.681 no Pará. 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). Uma das metodologias muito utilizadas para o estudo de mapeamento cromossômico é a Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) que 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 (Guerra 2004).

No presente estudo, o mapeamento físico do gene arrestina foi realizado, tendo em vista que, entre alguns insetos, estudos sugerem que a expressão desse gene está relacionada aos sistemas sensoriais e olfativos. Segundo a literatura, a participação do gene arrestina em processos sensoriais e olfativos envolve, dentre outras características, aspectos comportamentais de insetos (Merril *et al.* 2003). Ricci *et al.* (2002) registraram a expressão do gene arrestina na cabeça, antenas e palpos em *A. gambiae*, utilizando a técnica de PCR em tempo real, sugerindo a grande importância deste gene no desempenho das funções visuais e olfativas deste inseto.

Este trabalho teve como objetivo mapear fisicamente o gene arrestina em cromossomos de *A. darlingi*, por meio de FISH, para estudo da variabilidade cromossômica e aspectos evolutivos desse mosquito.

2. Material e Métodos

As coletas de imaturos de *A. darlingi* foram realizadas no sítio Madeireira Portela (S 03° 05' 19" 5" e W 05° 98' 92" 62"), bairro do Puraquequara, Manaus, Estado do Amazonas. As preparações das lâminas dos cromossomos politênicos de *A. darlingi* foram realizadas de acordo com os métodos descritos por French *et al.* (1962); Kumar e 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 *Expressed Sequence Tag* (ESTs) arrestina, contendo 1.197 pares de bases foi obtida do banco da biblioteca de cDNA de *A. darlingi* adulto, a partir do Projeto Genoma Funcional de *A. darlingi* (Rafael *et al.* 2005; Bridi *et al.* 2006). Em seguida foi desenhado um par de *primers*, da sequência de nucleotídeos: 5'-TTCATCGACCACCGGACTA -3' e 3'- ACACGGAGCGAGTACGAGAT -5'; com auxílio do programa *Gene Runner* 3.01 (www.generunner.net).

A partir do gradiente de temperatura por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), com o par de *primers* arrestina de *A. darlingi*, obteve-se a temperatura de anelamento (59,7 °C). O produto da PCR foi purificado com *Polythylene glycol* (PEG).

O produto da PCR purificado foi utilizado como sonda, ao qual foi acrescentado fluoresceína-12-dUTP (*Bio Probe*® ENZO-42716, USA), por *Random Primer* 2.5x (*Invitrogen* cat. nº 18187-013, USA). Em seguida, a sonda foi adicionada sobre as preparações cromossômicas e, após a hibridação *in situ*, os cromossomos politênicos foram corados com YOYO 10X (*Invitrogen* – 895247, USA) em PBS 1X. As microfotografias foram obtidas em microscópio de luz *Axioplan Zeiss*, com luz de epifluorescência e objetiva 100x, com campo claro.

3. Resultados e Discussão

No presente trabalho foi mapeada a sonda arrestina *A. darlingi*, a qual hibridou no braço 3R, região 33C dos núcleos politênicos salivares, cuja localização foi realizada segundo o fotomapa dos núcleos politênicos salivares de *A. darlingi* (Rafael *et al.* 2010), para localizar a região da marcação (Figura 1).

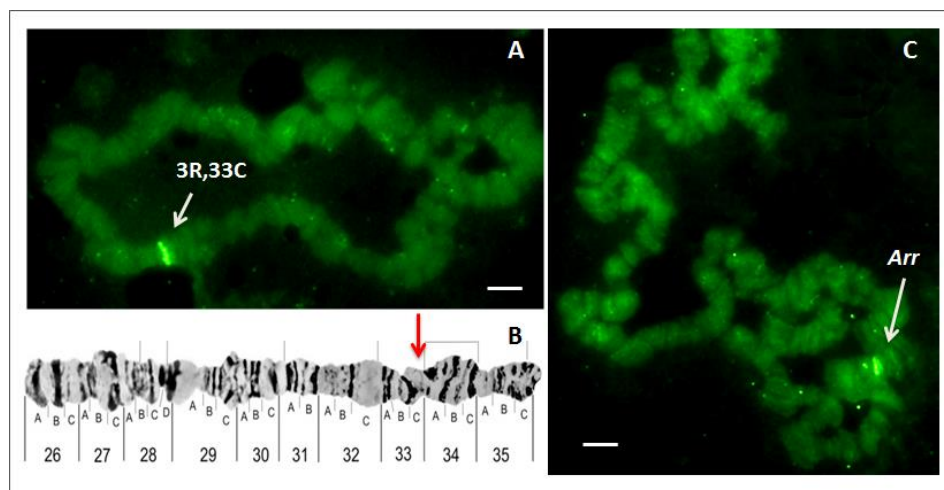


Figura 1A: Mapeamento do gene Arrestina (*Arr*) no cromossomo politênico 3R, região 33C de *A. darlingi* (seta). Barra: 10µm. B: Cromossomo 3, segundo o fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al.* 2010), mostrando a localização do gene arrestina no cromossomo 3R, 33C, (seta). C: foto do núcleo completo do cromossomo politênico de *A. darlingi* do fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al.* 2010), (seta). Barra: 10µm.

Na literatura, há escassas informações sobre mapeamento físico do gene arrestina para anofelinos.

Sharakhov *et al.* (2002) realizaram um trabalho que comparou fisicamente a sequência gênica da arrestina B de *A. gambiae* e *Anopheles funestus* em seus cromossomos politênicos, obtendo como resultado a marcação no braço 2L na divisão 24B e 3R na divisão 35F, respectivamente. Ricci *et al.* (2002) registraram outra localização para o gene arrestina no braço 3R, divisão 36D, utilizando também a metodologia de FISH.

Ricci *et al.* (2002) registraram a expressão do gene arrestina na cabeça, antenas e palpos em *A. gambiae*, utilizando a técnica de PCR em tempo real, sugerindo a grande importância deste gene no desempenho das funções visuais e olfativas deste inseto.

Estudos envolvendo a composição molecular do sistema sensorial e detalhes da função da arrestina ainda são escassos. Até o momento, as descobertas das funções na qual o gene arrestina desempenha podem ser úteis no desenho de estratégias de controle de vetores de doenças (Sun *et al.* 2012). O resultado deste projeto com *A. darlingi*, da América do Sul, principal vetor da malária, especialmente na região amazônica pode ser utilizado como base para análises da variabilidade e evolução de sequências gênicas de interesse no controle deste e outros mosquitos de importância epidemiológica.

4. Conclusão

O presente mapeamento físico cromossômico, com a sonda arrestina no cromossomo politênico 3R, região 33C de *A. darlingi*, auxiliará estudos posteriores sobre a localização cromossômica dessa EST em outros mosquitos, além de estudos que enfoquem processos funcionais evolutivos da arrestina, no principal vetor da malária na Amazônia.

5. Referências Bibliográficas

- 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 Cruz*, 101(3): 229-237.
- French, W.L.; Baker, R.H.; Kitzmiller, J.B. 1962. Preparation of mosquito chromosomes. *Mosq. News*, 22: 377-383.
- Guerra, M. 2004. *FISH. Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 184p.
- 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.
- Ministério da saúde, 2011. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/avaliacao_malaria_jan_maio_19_07_2010.pdf
- Merrill, C.E.; Pitts, R.J.; Zwiebel, L.J. 2003. Molecular characterization of arrestin family members in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 12(6): 641–650.
- 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*, 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. v.CD. Zeppelini Editorial & Comunicação, Águas de Lindóia/ São Paulo. p. 145-145.
- Rafael, M.S.; Rohde, C.; Bridi, L.C.; Gaiety V.L.S.V.; Tadei, W.P. 2010. Salivary Polytene Chromosome Map of *Anopheles darlingi*, the Main Vector of Neotropical Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(2).
- Ricci, I.; Santolamazza, F.; Favia, C.C. 2002. Molecular characterisation and chromosomal mapping of transcripts having tissue-specific expression. In the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: possible involvement in visual or olfactory processes. *Parasitology Research*, 88: 1-8
- Sharakhov, I.V.; Serazin, A.C.; Grushko, O.G.; Dana, A.; Lobo, N.; Hillenmeyer, M.E.; Westerman, R.; Romero-Severson, J.; Costantini, C.; Sagnon, N.; Collins, F.H.; Besansky, N.J. 2002. Inversions and Gene Order Shuffling in *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. *Science*, 298:182
- 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.