

GEN-08

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO COMPLEXO *Anopheles albitarsis* (DIPTERA: CULICIDAE) DA AMAZÔNIA CENTRAL, POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIAIS

⁽¹⁾Mellina Vilhena Naice; ⁽²⁾Wanderli Pedro Tadei; ⁽³⁾Jacqueline da Silva Batista; ⁽²⁾Míriam Silva Rafael

⁽¹⁾Bolsista CNPq/PIBIC; ⁽²⁾ Pesquisador INPA/CPCS; ⁽³⁾ ; Doutoranda PIPG-BTRN/INPA

O complexo *Anopheles albitarsis* é transmissor da malária em algumas áreas da Amazônia, como no Amapá (Segura, 1998). Segundo Wilkerson *et al.* (1995), o complexo *albitarsis* apresenta quatro espécies crípticas, denominadas A (*A. albitarsis sensu strictu*), B (ainda não descrita), C (*A. marajoara*) e D (*A. deaneorum*). Para uma melhor caracterização genética do complexo *A. albitarsis*, ampliou-se o seu banco de DNA, que foi amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com os genes mitocondriais RNAr 16S (RNAr 16S DNAm) e NDH5⁺. As extrações do DNA genômico foram segundo Williams *et al.* (1991), onde utilizou-se 1 larva de 4º estágio de cada postura, totalizando 15, 15, 4 indivíduos de Cacau Pirera, Manaus (AM 010 Km 33) e Coari (AM), respectivamente. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose a 0.8% e fotodocumentado. As bandas do DNA obtido foram de boa qualidade. O método da PCR foi realizado com o par de *primers* A e B, para o fragmento 16S (Mitchell *et al.*, 1993) e, para o gene NDH5⁺ (Merida *et al.*, 1999) utilizou-se o par de *primers* P1 e M2. O produto de PCR foi purificado com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* e submetido ao sequenciamento no seqüenciador automático *MegaBace*¹⁰⁰⁰. As seqüências foram editadas e alinhadas com os programas Bioedit 7.0.5.2 (Hall, 1999) e Chromas 2.24. Obteve-se fragmento de 450 pb para o gene 16S e 398 pb o gene NDH5⁺. Dos indivíduos amostrados do gene 16S foram obtidos 02 haplotipos diferenciados geneticamente por uma mutação. Um haplotipo foi compartilhado entre as duas localidades e o outro foi encontrado somente na localidade de Cacau Pirera, indicando baixo polimorfismo entre esses indivíduos. As análises populacionais e os índices de polimorfismo de DNA de *A. albitarsis*, a partir do gene NDH5⁺ mostraram que, os índices de diversidade molecular foram de baixa variabilidade genética nos indivíduos de Manaus e Cacau Pirera, mas em Coari essa variabilidade genética foi alta. A **Figura 1** mostra a estimativa dos índices para as três localidades foram: nº de haplotipos (H = 3; 3; 2), nº de haplotipos únicos (NS = 1; 1; 1), nº total de mutações (ETA= 3; 2; 11) e a média de diferenças nucleotídicas par a par (K= 0, 514; 0,381; 5,500).

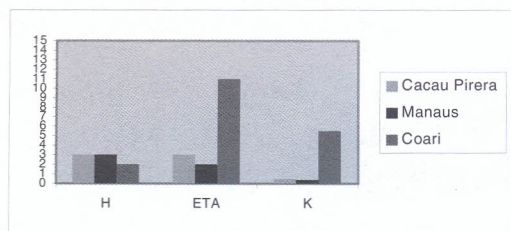


Figura 1: Histograma representativo com os índices de variabilidade genética de *A. albitarsis* amostrados em Cacau Pirera, Manaus e Coari.

Nas três localidades foram encontrados 06 haplotipos (03 haplotipos únicos - 01 em cada localidade, 02 compartilhados entre Manaus e Cacau Pirera e 01 em Coari). Coari não apresentou haplotipos compartilhados com Manaus e Cacau Pirera (**Tabela 1**). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou estruturação genética, com diferenças significativas, entre Coari e as duas outras localidades ($F_{st} = 0,68$ $p < 0,0005$). Porém, não houve diferenciação genética significativa entre os exemplares de Manaus e Cacau Pirera ($p = 0,999$) (**Tabela 2**).

Tabela 1: Distância genética "P" não corrigida em porcentagem estimada entre os 06 haplotipos (de N=34) de *A. albitarsis* encontrados nas 03 localidades: Coari (CO1 e CO3), Cacau Pirera (CP1, CP9 e CP14).

Haplotipos	CO1	CO3	CP1	CP9	CP14	MA1
CO1	-					
CO3	2,8	-				
CP1	1,53	2,29	-			
CP9	1,78	2,55	0,25	-		
CP14	2,3	3,05	0,76	0,51	-	

Tabela 2- Valor de P do índice de F_{st} estimado entre os indivíduos de *A. albitarsis* das 03 Manaus Cacau Pirera e Coari obtido pela AMOVA.

	Coari	Cacau Pirera
Cacau Pirera	0,0004 + 0,0002	*
Manaus	0,0005 + 0,0002	0,9999 + 0,0000

O presente trabalho mostrou que o gene 16S foi bastante conservado entre as amostras de *A. albitarsis* analisadas. Porém, o gene NDH5⁺ revelou que, 69% da variabilidade genética dos indivíduos de *A. albitarsis* ocorreu entre as populações e 31% dentro de cada população estudada. Estes dados mostraram haver um forte indício da ocorrência de mais de um táxon no complexo *A. albitarsis*. Esses resultados são importantes para subsidiar outras áreas da pesquisa que visam auxiliar o controle de *A. albitarsis*, vetor primário de malária na Amazônia.

Chromas 2.24 URL: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Hall, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acid. Symp. 41: 95-98.

Merida, A.M.P ; Palmieri, M ; Yurrita, M.M ; Molina, A ; Molina, E ; Black IV, W.C. 1999. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61 (2): 230-239.

Mitchell, S.E.; Cockburn, A.F.; Seawright, J.A. 1993. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: complete nucleotide sequence and organization. *Genome*, 36: 1058-1073.

Segura, M.N.O. 1998. *Estudo do Anopheles (Nys) darlingi* Root 1926 e *Anopheles (Nys) albitarsis* Arribalzaga 1878 (Diptera: Culicidae) como Vetores de Malária numa Mesma Área de Transmissão, e Caracterização de Espécies do Complexo *albitarsis*, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém, 128 pp.

Wilkerson, R.C., Gaffigan, T.V.; Lima, J.B. 1995. Identification of Species Related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90 (6): 721-732.

Williams, J.G.K.; Hanafei, M.K.; Rafalki, J.A.; Tingey, S.V. 1991. Genetic Analysis using RAPD Markers. *Methods in Enzymology in: Recombinant DNA Volume*.