

GEN-07

IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS DE LARVAS E ADULTOS DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE), DA AMAZÔNIA

¹Ketlen Christine Nunes de Souza; Míriam Silva Rafael ²Carlos Gustavo Nunes da Silva ³;
¹Bolsista INPA/CNPq/PIBIC; ² Pesquisador/INPA/CPCS; ³ bolsista doutorado/UFAM/CAM

Anopheles darlingi é o principal vetor da malária no Brasil, com a maioria dos registros dessa doença na Amazônia (Tadei & Dutary-Thatcher, 2000), cuja enfermidade afeta mais de 90 países no mundo (Ministério da Saúde/Fiocruz, 2005). A análise de DNA genômico de diversos organismos tem permitido a obtenção de bibliotecas de cDNA, por meio de métodos do DNA recombinante (Adams *et al.* 1991; Boguski, 1995). A biblioteca de cDNA de larvas de *Anopheles darlingi*, já produzida foi utilizada para identificar seqüências de genes expressos (*Expressed Sequence Tags - ESTs*) e fazer comparação com o genoma de *A. gambiae*. Fêz-se a preparação de plasmídeos (*miniprep*), segundo Birnbaim & Doly (1979). Na seleção e quantidade das colônias recombinantes, obteve-se $1,9 \times 10^5$ clones. Os produtos das *miniprep* foram analisados em gel de agarose a 0,8% e fotodocumentados, para estimar a quantidade de cDNA. No seqüenciamento, utilizou-se o *primer* M13R: 5'- TAGGGAAACAGCTATGAC - 3' Reverso. Os produtos da reação de seqüenciamento foram purificados e submetidos à eletroforese por capilaridade, no *MegaBACE¹⁰⁰⁰ DNA Sequencing System* (Amersham biosciences – GE heath careTM). A leitura e análise dos dados gerados foram realizadas pelos programas de *Base Calling* (*Base Caller Cimaron 1.53 Slim Phredfy*) e *ScoreCard* (MegaBACETM). A avaliação da qualidade das seqüências e a conversão dos arquivos binários para extensão *fasta*, *phd* e *qual* foram obtidas com o programa *Phred*. O programa *CAP3* (Huang & Madan, 1999) foi utilizado no agrupamento das seqüências para a montagem de *clusters*. As seqüências foram submetidas ao banco de dados do *GenBank* (NCBI), por meio do programa *BLAST* (Altschul *et al.*, 1997) e alinhadas com a modalidade *BLASTX*. Os resultados da busca no *GenBank*, por *BLASTx* foram selecionados pelo índice estatístico de *e-value*. Aceitou-se os valores menores ou iguais a e^{-10} . O rendimento de 75% foi obtido com o auxílio do programa *Scorecard* (GE Healthcare). Os clones seqüenciados apresentaram entre 701 e 800 pb.

A **Tabela 1** mostra os números de placas (mini-preps), clones seqüenciados, porcentagem da eficiência, o seqüenciamento e as seqüências de boa qualidade.

Tabela 1. Resultados obtidos das mini-preps de *A. darlingi* a partir de larvas e adultos.

Nome da placa	Clones sequenciados	Valor do ScoreCard (%)	Sequências de boa qualidade
Ad 02	96	34	33
Ad 03	96	75	72
Ad 04	96	57	55
Ad 05	96	66	63
Ad 06	96	58	56
05	480	58	279

Das 472 sequências analisadas, 227 foram validadas pelo *Blastx*. Entre essas, 128 (56%) foram consideradas significativas e 99 (37%) não significativas, enquanto que aquelas onde não apresentaram correspondência alguma no *GenBank* foram denominadas de *no match* (**Gráfico 1**).

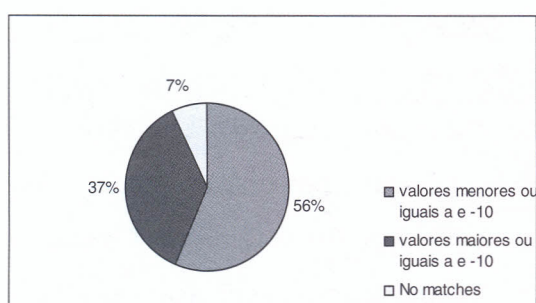


Gráfico 1: Resultados da busca no GenBank por BLASTx. Sequências selecionadas pelo índice estatístico de *e-value*.

A biblioteca de cDNA de larvas e adultos de *A. darlingi* foi validada, considerando que os *reads* (ESTs) gerados foram comparados e apresentaram similaridade principalmente com genes do complexo *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* e de outros insetos depositados no *GeneBank*. Esses resultados serviram para subsidiar ações de controle futura de populações de *A. darlingi* e outros vetores da malária e disponibilizar essas *ESTs* na WEB database.

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R., Venter, J.C. 1991. Complementary DNA sequencing: "expressed sequence tags" and the human genome project. *Science*, 252: 1651-1656.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402.

Birnbaum, H.C., Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513 -1523.

Boguski, M.S. 1995. The turning point in genome research. *Trends in Biochem Sci.*, 20: 295-296.

Huang, X., Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9 (9): 868-877.

Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (2005) www.fiocruz.br/ccs/estetica/malaria.htm. Centro de Informação Científica e Tecnológica. Agência Fiocruz de notícias. 2005.

Tadei, W.P., Dutary-Thatcher, B. 2000. Malaria vectors in the brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 42 (2): 87-94.