INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG GCBEv

MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES EXPRESSOS DE RESPOSTA IMUNE E SENSORIAL DE *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi,* VETOR DA MALÁRIA NEOTROPICAL

LETICIA CEGATTI BRIDI

Manaus, Amazonas
Setembro, 2016

LETICIA CEGATTI BRIDI

MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES EXPRESSOS DE RESPOSTA IMUNE E SENSORIAL DE *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi*, VETOR DA MALÁRIA NEOTROPICAL

Orientadora: Míriam Silva Rafael, Dra

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva - PPG GCBEv

Manaus, Amazonas
Setembro, 2016

LETICIA CEGATTI BRIDI

MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES EXPRESSOS DE RESPOSTA IMUNE E SENSORIAL DE *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi*, VETOR DA MALÁRIA NEOTROPICAL

APROVADA EM: ____ / ____ / _____

BANCA EXAMINADORA

_____

Avaliador 1

_____

Avaliador 2

_____

Avaliador 3

_____

Avaliador 4

_____

Avaliador 5

FICHA CATALOGRÁFICA

B851 Bridi, Letícia Cegatti
Caracterização molecular e mapeamento físico de genes expressos de resposta imune de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* / Letícia Cegatti Bridi. --- Manaus: [s.n.], 2016.
71 f. : il.
Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2016.
Orientador: Míriam Silva Rafael.
Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. Malária. 2. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi*. 3. Citogenética. I. Título.

CDD 616.9362

Sinopse:
A Amazônia possui condições ambientais favoráveis ao processo adaptativo e evolutivo de *A. darlingi*, mas este apresenta escassos estudos de mapeamento físico cromossômico, muito útil para compreender a estrutura de genomas. Estudou-se o mapeamento físico de genes expressos de resposta imune: GNBP (*Gran-negative binding protein*), Toll-*interacting protein* (Toll), defensina, *Chymotrypsin-like serine protease* (*AdChyL*), 28S *ribosomal protein S7-mitochondrial precursor* (*RpS7*) e *gambicin anti-microbial peptide* (gambicina), além de uma EST do sistema sensorial olfativo (OBP). As sondas mapearam sítios únicos dos núcleos politênicos, o que significa serem bons marcadores genéticos. Sugere-se que as inversões cromossômicas observadas estão diretamente relacionadas à adaptação ambiental desse mosquito. As relações evolutivas de *A. darlingi* com outros anofelinos também foram analisadas. Este trabalho contribuiu com um mapa físico cromossômico detalhado, para preencher sequências do genoma não anotadas, úteis à análise da estrutura do seu genoma e de outros mosquitos, e auxiliar no entendimento desses genes na variabilidade e evolução cromossômica, e a biologia desse mosquito.

Palavras-chave: hibridização *in situ*, cromossomo politênico, mapeamento cromossômico, inversões.

A realização deste trabalho foi possível devido

Ao Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv) do INPA.

Ao Laboratório de Citogenética, Genomica e Evolução de Mosquitos (LCGEM) do INPA, ligado a Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde (CSAS) onde este trabalho foi desenvolvido com financiamento proporcionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/FAPEAM/MCT/CT-INFRA Processo 2680/2009; ADAPTA I-CNPq) e, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (PAPAC-Processo no. 1570-20131).

À FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos durante a realização deste trabalho.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT)/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela infra-estrutura e apoio cedidos, para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças para atingir todos os meus objetivos e concluir mais essa etapa da minha vida frente todas as dificuldades que enfrentei.

Aos meus pais pelos incansáveis momentos de apoio, pelos conselhos nos momentos de superação das dificuldades, e pelo amor incondicional.

Ao meu marido Mário por me motivar nos momentos insolúveis, por me ajudar nas análises filogenéticas quando pensei não haver mais esperança. Pelo amor, motivação e companheirismo nas madrugadas escrevendo a tese, por estar sempre ao meu lado. Pela família que construímos e pelo nosso bebezinho que está a caminho. Eu te amo.

À Dra. Míriam Silva Rafael pela confiança depositada em mim em mais de 10 anos de convivência. Pela orientação recebida e amizade dispensada, aprendi muito em todos esses anos. Obrigada por tornar possível a realização desta etapa tão importante na minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Conservação e Biologia Evolutiva - PPG-GCBEv por todo apoio durante esses quatro anos.

À Kyara Martins Formiga e Jacqueline da Silva Batista pelos constantes apoios dados no Laboratório Temático de Biologia Molecular-LTMB/INPA.

Aos doutores Mauro Carneiro e Felipe Rodrigues da Silva do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia CENARGEN - EMBRAPA, pela disponibilidade da anotação das ESTs do *Anopheles darlingi* (sites do LNCC, CENARGEN e Vector Base).

Ao Dr. Wanderlei Pedro Tadei, pelo apoio logístico que tornou possível a realização deste trabalho.

A todos os técnicos do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue, em especial ao Carlos e Bosco pelo pronto auxílio esclarecendo dúvidas sobre identificação de mosquitos e ao Juraci pelo pronto socorro nas finalizações da preparação de reagentes e com a utilização dos equipamentos laboratoriais. Ao Elias e Nonato pelo auxílio nas capturas de anofelinos em campo.

Aos colegas de laboratório Sabrina, Kiara, Luíz, Lincoln e Valéria, obrigada por serem pessoas tão especiais. E aos recém-chegados Junielson, Dayane e Luana. Foi um imenso prazer conhece-los. Vocês tornaram as práticas de laboratório muito divertidas. Saudades do nosso café com ciência!!!

A todos os colegas da Coordenação de Sociedade e Ambiente/CSAS pelas conversas divertidas nos corredores.

Aos amigos e irmãos Pedro, Giselle, Ketlen e Paulinha, vocês são minha família em Manaus. Obrigada por me ajudar a superar a saudade e distância da família.

RESUMO

A malária no Brasil ocorre especialmente na Amazônia (99% dos casos), onde as condições ambientais são favoráveis para a proliferação dos agentes etiológicos e de seus mosquitos vetores, cujo principal transmissor é o *Anopheles darlingi.* Fatores ambientais e atividades antrópicas são alguns dos principais aspectos que contribuem para o processo adaptativo e evolutivo desse anofelino, o que pode ser refletido em rearranjos cromossômicos. Neste trabalho, realizamos o mapeamento físico cromossômico por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) dos genes de resposta inume do genoma de *A. darlingi,* GNBP (*Gran-negative binding protein*), Toll-*interacting protein* (Toll), defensina, *Chymotrypsin-like serine protease* (*AdChyL*), 28S *ribosomal protein S7- mitochondrial precursor* (*RpS7*), *gambicin anti-microbial peptide* (gambicina) e ainda, o gene de resposta sensorial: OBP (*odorant binding protein),* para auxiliar na montagem mais precisa do seu genoma estrutural. Esses genes foram mapeados em regiões cromossômicas únicas, com exceção do *RpS7* que mapeou em mais de um local. Outros genes foram mapeados em regiões de inversão: GNBP (inversão 2Rd); *AdChyL*, na região 38D (inversão 3Lb) e *RpS*7, na região 22C (inversão 2Lb). O gene OBP mapeou o cromossomo X de indivíduos de cinco localidades, onde apenas *A. darlingi* de São Gabriel da Cachoeira/AM (SGC/AM) o gene OBP marcou na região 3A em comparação com as quatro localidades Coari/AM, Manaus/AM, Barra do Bugres/MT e Macapá/AP, onde a sonda mapeou a região 4A. Duas novas inversões foram descritas, para *A. darlingi* sendo uma no cromossomo X (Xb) na população de SGC/AM e outra no braço 2L (2Lc), população de Barra do Bugres/MT. Distâncias geográficas e ecoregiões (barreiras geográficas) são fatores ambientais que podem favorecer o aparecimento das duas novas inversões descritas nesse trabalho. Na análise filogenética dos genes GNBP, Toll, defensina, *RpS7* e gambicina, obtivemos três clados para GNBP e a maioria das sequências analisadas foi homóloga com a da subfamília B, incluindo GNBP de *Anopheles gambiae* (87%), sugerindo, que GNBP de *A. darlingi* pertence à subfamília B. As árvores filogenéticas para os genes *RpS7*, gambicina, defensina e Toll mostraram um alto grau de conservação entre esses genes em *A. gambiae* e *Anopheles arabiensis*. Os genes de resposta imune de *A. darlingi* e *Anopheles albimanus* são filogeneticamente próximos, mas nem sempre com um suporte confiável. Isso pode sugerir algum nível de conservação evolutiva entre os genes de resposta imune de ambas as espécies. Os genes mapeados *in situ* foram considerados marcadores citogenéticos úteis aos estudos de variabilidade cromossômica e evolução em *A. darlingi* já que são genes conservados, além de auxiliar no aprimoramento das análises de sequências não finalizadas na montagem e anotação do genoma de *A. darlingi.*

ABSTRACT

Malaria in Brazil occurs especially in the Amazon (99% of cases), where environmental conditions are favorable for the proliferation of the etiologic and their mosquito vectors agents, whose main transmitter is the *Anopheles darlingi*. Environmental factors and human activities are some of the main aspects that contribute to the adaptive and evolutionary process that anopheles, which can be reflected in chromosomal rearrangements. We carried out the physical chromosome mapping by fluorescence in situ hybridization (FISH) of inume response genes in the genome of *A. darlingi*, GNBP (Gran-negative binding protein), Toll-interacting protein (Toll), defensin, Chymotrypsin-like serine protease (AdChyL), 28S ribosomal protein S7- mitochondrial precursor (RpS7), gambicin anti-microbial peptide (gambicin) and also the gene sensory response: OBP (odorant binding protein) to assist in more precise assembly of its structural genomics. These genes have been mapped in single chromosomal regions, with the exception of RpS7, which mapped in more than one location. Other genes have been mapped in inversion regions: GNBP (inversion 2 Rd); AdChyL in the region 38D (inversion 3Lb) and RpS7 in 22C region (inversion 2Lb). The OBP gene mapped the X chromosome from five locations individuals, where only *A. darlingi* of São Gabriel da Cachoeira/AM (SGC/AM) OBP gene marked the region 3A compared to four locations Coari/AM, Manaus/AM, Barra do Bugres/MT and Macapá/AP, where the probe mapped the region 4A. Two new investments were described for *A. darlingi* and one on chromosome X (Xb) in the population of SGC/AM and another in the arm 2L (2LC), population Bugres/MT. Geographical distances and ecoregions (geographical barriers) are environmental factors that can favor the appearance of the two new inversions described in this work. In the phylogenetic analysis of GNBP genes Toll, defensin, RpS7 and gambicin, we obtained three clades for GNBP and most of the analyzed sequence was homologous to the subfamily B, including GNBP *Anopheles gambiae* (87%), suggesting that GNBP *A . darlingi* belongs to the subfamily B. Phylogenetic trees for RpS7 genes, gambicin, defensin and Toll showed a high degree of conservation between these genes in *A. gambiae* and *Anopheles arabiensis*. Immune response genes of *A. darlingi* and *Anopheles albimanus* are phylogenetically close but not always a reliable support. This may suggest some level of evolutionary conservation of the genes of the immune response of both species. The genes mapped in situ were considered cytogenetic useful markers for chromosomal variability studies and developments in *A. darlingi* as they are conserved genes, and assist in the improvement of sequence analyzes not finalized the assembly and annotation of the genome of *A. darlingi.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL..... 1

1.1 *Anopheles darlingi* e a malária..... 1

1.2 Abordagem citogenética..... 2

1.3 Sistema imune dos mosquitos..... 3

1.4 Sistema sensorial dos mosquitos..... 4

1.5 Genômica comparativa e sintenia gênica..... 4

2. OBJETIVOS..... 7

2.1 Objetivo geral..... 7

2.2 Objetivos específicos..... 7

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 7

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 8

4.1 Capítulo 1 - GNBP domain of *Anopheles darlingi*: are polymorphic inversions and gene variation related to adaptive evolution?..... 9

4.1.1 Abstract..... 10

4.1.2 Introduction..... 11

4.1.3 Materials and methods..... 13

4.1.4 Results..... 15

4.1.5 Discussion..... 17

4.1.6 References..... 21

4.2 Capítulo 2 - Mapeamento físico cromossômico de genes de resposta imune no mosquito *Anopheles darlingi*..... 28

4.2.1 Resumo..... 29

4.2.2 Introdução..... 30

4.2.3 Materiais e métodos..... 32

4.2.4 Resultados..... 35

4.2.5 Discussão..... 39

4.2.6 Conclusões..... 44

4.2.7 Referências bibliográficas..... 44

4.3 Capítulo 3 - Mapeamento físico do gene OBP em cromossomo sexual e presença de novas inversões em *Anopheles darlingi*..... 49

4.3.1 Resumo..... 50

4.3.2 Introdução..... 51

4.3.3 Materiais e métodos..... 53

4.3.4 Resultados 55

4.3.5 Discussão 58

4.3.6 Referências bibliográficas..... 62

5. CONCLUSÕES GERAIS..... 66

6. PERSPECTIVAS..... 67

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 68

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Hibridização *in situ* fluorescente de GNBP: **a** Núcleo politênico completo de glândulas salivares de *Anopheles darlingi*: sítio de hibridização de GNBP na inversão 2Rd, seção 13E, braço cromossômico 2R (seta); **b** Sítio de hibridização ampliado; **c** GNBP marcado com *Cy™* 3 dUTP-GE *Healthcare* (seta); **d** Fotomapa do braço 2R de *A. darlingi* com as inversões já descritas 2Ra, 2Rb, 2Rc e 2Rd (Rafael et al. 2010): localização física de GNBP na inversão 2Rd (seta), Barra 10 µm.....15

Figura 2. Filogenia não enraizada de *Gram-negative binding protein* (GNBP) para nove espécies de mosquitos obtida pela análise *PhyML*. Valores de *Bootstrap* nos nós (> 95) são baseados em 1000 repetições. No clado I estão as espécies *Anopheles darlingi*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles sinensis*. No clado II estão as espécies *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*. No clado III estão as espécies *Anopheles coluzzi*, *Anopheles melas*, *Anopheles quadriannulatus* e *Anopheles arabiensis* species.....16

Capítulo 2

Figura 1 Mapeamento físico das sequências dos genes (sondas) Toll, defensina (def), *AdChyL*, *RpS7* e gambicina, marcadas com os fluorocromos *Cy™ 5* (vermelho) e *Cy™ 3* (amarelo) contracoradas com *YOYO*-1 em cromossomos politênicos de *A. darlingi*. **A.** Gene Toll: braço 2L, região 25C (seta). **B.** Sinal de Toll ampliado. **C.** Gene defensina: braço 3R, 27A (seta). **D.** Sinal de defensina ampliado. **E**. Gene *AdChyL*: braço 3L, 38D (seta) **F.** Sinal da *AdChyL* ampliado. **G.** Gene *PrS7*: braço 2L, 16AB e braço 3L, 36CD (setas). **H.** Sinal de *PrS7* ampliado. **I.** Gene gambicina (gam): braço 2R, 10B (seta). **J.** Sinal de gambicina ampliado. Barra: 10 µm.....36

Figura 2. Localizações físicas dos genes Toll (2L, 25C), defensina (3R, 27A), *AdChyL* (3L, 38D), *RpS7* (2L, 16AB e 22C; 3L, 36CD) e gambicina (2R, 10B) (setas), segundo o fotomapa dos núcleos politênicos de *A. darlingi,* que contém regiões de inversões e os centrômeros (asteriscos à direita), conforme Rafael et al. (2010).....37

Figura 3. Filogenia não enraizada dos genes Toll, defensina, *RpS7* e gambicina de *A. darlingi* em comparação a outras seis espécies de *Anopheles*, segundo o método de *Maximum-Likelihood* (ML) e programa PhyML 3.0. Os valores de *bootstrap* nos nós (> 95) são baseados em 1000 repetições. Comprimento dos ramos - número de substituições de amino ácidos por 100 resíduos (barra). **A**: Toll. **B**: Def: defensina. **C**: *RpS7*. **D**: Gam: gambicina.....38

Capítulo 3

Figura 1. Pontos de capturas de fêmeas adultas de *A. darlingi* (círculos vermelhos). 1: SGC/AM; 2: Coari/AM; 3: Manaus/AM; 4: Macapá/AP e 5: B. do Bugres/MT.....54

Figura 2. FISH de OBP no cromossomo X de *A. darlingi* de diferentes localidades. **A1** e **A2**: Manaus/AM na seção 4A; **B1** e **B2**: Macapá/AP na seção 4A; **C1** e **C2**: B Bugres/MT na seção 4A; **D1** e **D2**: SGC/AM na seção 3A; **E1** e **E2**: Coari/AM na seção 4A. Barra: 10 µm.....56

Figura 3. Nova inversão homozigota descrita (Xb) no cromossomo politênico X de *A. darlingi*, de SGC/AM. **A:** Inversão Xb envolvendo as seções 3B a 4B (seta). **B.** Fotomapa do cromossomo X, mostrando os dois sítios de hibridização do gene OBP, seção 3A (seta vermelha) de indivíduos de SGC/AM, e seção 4A de indivíduos de Manaus/AM (seta preta), Macapá/AP, B Bugres/MT e Coari/AM. Centrômero à direita (asterisco). Barra 10 µm.....57

Figura 4. Nova inversão descrita no braço cromossômico 2L de *A. darlingi* de B Bugres/MT. **A e B:** Cromossomos 2L com a nova inversão 2Lc (colchetes). **C.** Fotomapa do cromossomo 2L, mostrando as regiões de inversões já descritas (Rafael et al. 2010). O centrômero encontra-se à direita (asterisco). Barra 10 µm...57

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Anopheles darlingi* e a malária

Dentre os vetores de patógenos e parasitas humanos, os mosquitos são alguns dos mais eficazes do mundo, e o controle de suas populações é a chave para reduzir os casos de malária, os quais atualmente resultam em centenas de casos clínicos e aproximadamente 1,2 milhão de mortes anualmente no mundo e indiretamente produz perdas econômicas significantes (Sachs e Malaney 2002). No Brasil foram confirmados mais de 143 mil casos de malária em 2015. A área endêmica da doença no País compreende a região amazônica, que é responsável por 99% dos casos autóctones. Já no Estado do Amazonas, foram notificados mais de 75 mil casos em 2015 (SIVEP-Malária 2016).

A região amazônica possui diversos ambientes característicos que favorecem a transmissão da malária, o que torna o controle da doença difícil. Água limpa e com pouca movimentação, além de temperaturas superiores a 16ºC, baixa altitude, alta umidade e chuvas são condições favoráveis para a sobrevivência dos mosquitos transmissores dessa parasitose (Tauil 2011).

Os altos índices de malária são influenciados por diversos fatores: biológicos, ecológicos, políticos, econômicos e sociais (Tadei *et al*. 1998). O aumento dos casos de malária a partir de 2003 deveu-se, principalmente, à intensa e desordenada ocupação das periferias das grandes cidades, por exemplo, o desmatamento para extração de madeira, criação de gado, agricultura, assentamentos e atividade de piscicultura desordenada têm contribuído, para o aumento da transmissão da doença na região amazônica (Tauil 2011).

Um dos fatores determinantes para os altos índices de casos de malária é a abundância e a acentuada preferência de espécies transmissoras em alimentar-se com sangue humano, características comuns de *A.* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root, 1926 principal vetor dessa parasitose no Brasil, especialmente na região amazônica (Tadei *et al.* 1998). Essa espécie de mosquito foi encontrada infectada por três espécies de plasmódios que causam a malária humana nas Américas – *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti 1890, *Plasmodium falciparum* Welch 1897 e *Plasmodium malariae* Laveran, 1181 (Rachou 1958; Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

No Brasil, as espécies envolvidas com a transmissão da malária pertencem ao gênero *Anopheles,* subgêneros *Nyssorhynchus: A. darlingi, Anopheles aquasalis* Curry,

1932; *Anopheles nuneztovari* Galbadón, 1940*, Anopheles oswaldoi* Peryassú, 1922*, Anopheles triannulatus* Neiva e Pinto, 1922 e *Anopheles albitarsis s. l. Lynch-Arribálzaga,* 1878, *Anopheles janconnae* Wilkerson & Sallum (Marrelli *et al.* 1999; Tadei e Dutary-Tatcher 2000) e *Kerstezia: Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908 e *Anopheles bellator* Dyar & Knab, 1906 (Ramirez e Dassen 1994, 1996).

O gênero *Anopheles* pertence à família Culicidae e inclui todos os vetores conhecidos de malária humana. São espécies amplamente distribuídas no território sul-americano a leste dos Andes, na Colômbia, Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai, Argentina, Brasil e nas Guianas. Sua distribuição ocorre em áreas de baixas altitudes, quase sempre associado aos grandes cursos de água e florestas do interior, mas ocorre também no litoral (Forattini 1962; Sinka *et al*. 2010). Ao longo dos trópicos, 29 espécies do subgênero *Nyssorhynchus* já foram descritas (Rúbio-Palis e Zimmermann 1997).

1.2. Abordagem Citogenética

O *A. darlingi* possui complemento cromossômico metafásico 2n= 6 (Rafael e Tadei 1998), comum para o gênero. Apresenta dois pares autossômicos: o par maior (III) é submetacêntrico e o par menor (II) metacêntrico. No par sexual, o X é acrocêntrico e o Y, puntiforme. White (1973) sugere que deve haver algum tipo de barreira que mantém o número cromossômico conservado na maioria dos dípteros. Embora o complemento básico cromossômico seja altamente conservado, a evolução do genoma de mosquitos reflete reorganização dos cromossomos devido à inversões e translocações (Matthews e Munsterman 1994), de cujos rearranjos participam genes que podem estar envolvidos em adaptação (Bridi e Rafael 2016) ou controle de infecção por plasmódio (Coluzzi *et al*. 2002). Além disso, o padrão de rápido rearranjo cromossômico parece ser uma característica marcante da evolução cromossômica dos anofelinos (Sharakhov *et al*. 2002).

Além dos cromossomos metafásicos, os anofelinos possuem núcleos politênicos, que consistem em cinco braços: X, 2L, 2R, 3L e 3R. Os primeiros registros relativos ao polimorfismo cromossômico de *A. darlingi* foram realizados por Guedes *et al*. (1957) e Schreiber e Guedes (1960, 1961). Esses autores registraram a ocorrência de duas inversões em anofelinos de Bocaiuva (MG). Posteriormente Kreutzer *et al*. (1972) descreveram nove inversões independentes e um arranjo complexo, as duas

populações analisadas foram do Estado do Amazonas. Tadei *et al*. (1982) ao analisarem uma população de *A. darlingi* da rodovia BR-174 (Manaus/Boa Vista) descreveram mais duas novas inversões independentes. Novas inversões também foram descritas para o braço cromossômico 3, sendo uma delas inversão 3Lc (Rafael et al. 2010) e recentemente mais quatro inversões (Cornel *et al*. 2016).

Descrições de inversões e de mapeamentos físicos de sequências gênicas em núcleos politênicos são possíveis mediante fotomapas. O fotomapa é uma ferramenta útil, para estudos citogenéticos e evolutivos de diversas espécies (Rafael *et al*. 2010). Em *A. darlingi,* citam-se o mapa de referência (Kreutzer *et al*. 1972) e os fotomapas (Rafael *et al*. 2010; Cornel *et al.* 2016).

A citogenética molecular tem contribuído para o mapeamento físico cromossômico, utilizando cromossomos politênicos, por meio do método de hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescent in situ hybridization,* FISH) que utiliza sondas marcadas com fluorocromos ou enzimas. A FISH é uma ferramenta útil para estimar o número de cópias de sequências específicas, fazer comparações taxonômicas ou populacionais evolutivas, mapear genes, identificar espécies relacionadas e contribuir com estudos de aspectos funcional e evolutivo de diversos dípteros (Lara 2002; Guerra 2004). Cita-se o mapeamento físico do gene Hsp70 nas regiões 12A e 14A, do cromossomo politênico 2R de *A. darlingi*, de Manaus (AM), e de Macapá (AP) (Rafael *et al*. 2004), o gene Actina nas regiões 21A e 23B do cromossomo politênico 2L de *A. darlingi* (Bridi *et al*. 2013) e o gene GNBP (*Gran-negative binding protein)* em uma região de inversão (Bridi e Rafael, 2016), do presente estudo.

1.3 Sistema Imune dos Mosquitos

A capacidade de resposta imune inata dos insetos em neutralizar infecções por patógenos, tais como vírus, bactérias e protozoários tem sido uma das grandes razões do seu sucesso evolutivo, como o grupo de animais terrestres mais diversos em espécies (Osta *et al*. 2004). Recentes avanços no entendimento da natureza molecular e comportamento do sistema imune de mosquitos, como o *Anopheles gambiae* Giles, 1902 e *A*edes *aegypti* Linnaeus, 1762, vetores da malária e dengue, respectivamente, têm resultado na identificação de muitos genes de resposta imune.

A imunidade desempenha um papel importante na interação entre o patógeno e o vetor hospedeiro. Muitos genes e seus produtos, os quais estão envolvidos na imunidade inata de mosquitos, têm sido identificados e caracterizados de forma independente baseado em sua relação com genes inumes conhecidos ou com organismos modelo como *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Irving *et al.* 2001).

No presente trabalho, utilizamos seis genes com diferentes funções de resposta imune: GNBP (*Gran-negative binding protein*), Toll-*interacting protein* (Toll), defensina, *Chymotrypsin-like serine protease* (*AdChyL*), 28S *ribosomal protein S7- mitochondrial precursor* (*RpS7*) e *gambicin anti-microbial peptide* (gambicina). As proteínas do sistema imune estão detalhadas nos capítulos 1 e 2, juntamente com seu mapeamento físico e relações evolutivas.

1.4 Sistema Sensorial dos Mosquitos

Os odores são os principais sinais sensoriais que direcionam os mosquitos fêmeas a encontar um hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo (Takken e Knols 1999; Zwiebel e Takken 2004). As antenas de mosquitos adultos apresentam numerosas estruturas sensoriais chamadas sensilas, que são os locais da detecção química. Dentro das sensilas, a transdução de sinal olfativo depende das proteínas receptoras de cheiro localizadas nas membranas dendríticas iniciando o evento que leva a percepção da qualidade e quantidade de odores.

As proteínas de ligação olfativas (*odorant binding proteins* - OBPs) são consideradas importantes componentes hidrossolúveis na linfa das sensilas. O detalhamento dessas proteínas e sua hibridização *in situ* em *A. darlingi*, de 5 diferentes localidades brasileiras serão abordados no capítulo 3.

1.5 Genômica Comparativa e Sintenia Gênica

A habilidade em desenvolver novas metodologias no controle vetorial depende, em parte, do entendimento da biologia do vetor. A significante expansão do conhecimento a respeito dos anofelinos tem sido estimulada pela disponibilidade de novos métodos, como por exemplo, o sequenciamento dos genomas de *A. gambiae* (Holt *et al*. 2002), *Aedes aegypti* (Nene *et al*. 2007) e *Culex quinquefasciatus* (Arensburger *et al.* 2010), da genômica funcional e das tecnologias de mosquitos transgênicos (Beaty *et al*. 2009).

Uma das ferramentas para análise de genomas é a utilização de ESTs (*Expressed Sequences Tags*) juntamente com o método de hibridização *in silico*, nas quais são utilizados programas de bioinformática, para o mapeamento físico virtual de genes expressos ao longo do genoma de determinado organismo (Reed e Palsson 2003). O sequenciamento de genomas completos tem auxiliado o estudo de genes e sua organização em cromossomos, e se essa ordem e agrupamento de genes tem alguma função relevante. Bases de dados de anotação genômica têm mostrado o agrupamento de genes com funções relacionadas como em fungos, plantas e animais (Lee e Sonnhammer 2003). Da mesma forma, a genômica comparativa tem auxiliado na identificação de espécies, a partir dos seus genes previamente sequenciados e analisados.

Uma das tarefas da genômica comparativa é a identificação de sintenias entre diferentes espécies. A palavra sintenia deriva do termo *synteny*, da língua inglesa, um neologismo com o significado de "*on the same ribbon*" ("na mesma fita"), proposto por John H. Renwick, em 1971. Em sua concepção original, sintenia refere-se à localização de genes no mesmo cromossomo ou em um de seus fragmentos (Passarge *et al*. 1999). A identificação de sintenias entre diferentes espécies necessariamente decorre de comparações entre múltiplos genomas, estando fortemente relacionadas às técnicas clássicas de genômica comparativa. Em geral, a identificação de sintenias parte da comparação do genoma em estudo com outros genomas bem conhecidos, nos quais é buscada a ocorrência de genes sintênicos ao do organismo pesquisado.

Tais comparações são feitas utilizando *softwares* de alinhamento de sequências, tais como o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – Altschul *et al.* 1997). O passo seguinte consiste, frequentemente, em utilizar alguma ferramenta de visualização gráfica dos resultados dos alinhamentos obtidos, de modo a facilitar a identificação de sintenias. A genômica comparativa utiliza agrupamento de genes, *contigs* (sequências gênicas consenso) e *scaffolds* ou *supercontigs* (conjuntos de *contigs* que podem ser colocados numa mesma região ou posição cromossômica). Assim, cada gene de um genoma é ligado ao seu ortólogo em outro genoma.

Mapas físicos e sequências de genomas permitem a reconstrução de genomas ancestrais e determinar padrões e mecanismos para evolução cromossômica em diversas espécies (Malone *et al*. 2006). O conhecimento detalhado dos rearranjos nos

cromossomos politêncos pode ser muito útil para a montagem mais precisa do genoma, utilizando os *contigs* sequenciados nas hibridizações *in situ*.

Um dos problemas encontrados em uma anotação genômica são as sequências gênicas não identificadas. A qualidade para a anotação do genoma de qualquer organismo depende altamente da perfeição da montagem do genoma. A criação de um mapa genômico físico é um passo crucial na identificação da reunião de *gaps*, além da reconstrução de rearranjos e reestruturação de filogenia para estudos de evolução de cromossomos (Sharakhov *et al*. 2002). A reunião de genomas não mapeados de anofelinos não é útil para estudos de organização e evolução de cromossomos. Também, a orientação incorreta de *contigs* pode ser o maior problema para reconstrução de uma filogenia de mosquitos baseada na ordem de genes.

Em *A. darlingi,* até o presente momento, poucos trabalhos mostraram o mapeamento *in situ* cromossômico de sequências gênicas (Rafael *et al*. 2003, 2004; Bridi *et al*. 2013, 2016). No presente estudo, utilizamos as ESTs de resposta imune e sensorial olfativa de *A. darlingi* vindas do sequenciamento de seu genoma (Marinotti *et al.* 2013) para realizar a genômica comparativa e determinar as regiões de sintenia gênica com os genomas de outros importantes anofelinos vetores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Mapear fisicamente sequências gênicas expressas (ESTs) de resposta imune de *A. darlingi*: GNBP (*Gran-negative binding protein*), Toll-*interacting protein* (Toll), defensina, *Chymotrypsin-like serine protease* (*AdChyL*), 28S *ribosomal protein S7- mitochondrial precursor* (*RpS7*) e *gambicin anti-microbial peptide* (gambicina), além da EST do sistema sensorial olfativo (OBP) nos cromossomos politênicos de *A. darlingi*, determinando padrões e mecanismos de evolução dessas ESTs de *A. darlingi* comparativamente aos cromossomos de *A. gambiae*, *A. stephensi* e *A. funestus*.

2.2 Objetivo específico

a) Mapear fisicamente ESTs de resposta imune em cromossomos politênicos de *A. darlingi*.

b) Analisar relações filogenéticas dos genes de resposta imune com outros anofelinos.

c) Mapear fisicamente a EST de resposta sensorial olfativa (OBP) em cromossomos politênicos de *A. darlingi,* de cinco localidades do Brasil para analisar aspectos de conservação e sintenia desse gene.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia foi descrita em detalhes nos capítulos 1, 2 e 3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi realizado o mapeamento físico cromossômico de ESTs de resposta imune e sensorial olfativa em cromossomos politênicos de *A. darlingi,* comparando regiões de sintenia com outros anofelinos, além de entender as relações filogenéticas dos genes de resposta imune, que serão publicados na forma de artigos científicos:

Capítulo 1: GNBP domain of *Anopheles darlingi*: are polymorphic inversions and gene variation related to adaptive evolution? Este capítulo refere-se aos objetivos específicos a e b.

Capítulo 2: Mapeamento físico cromossômico de genes de resposta imune no mosquito *Anopheles darlingi*. Este capítulo refere-se aos objetivos específicos a e b.

Capítulo 3: Mapeamento físico do gene OBP em cromossomo sexual e evidências de novas inversões em *Anopheles darlingi*. Este capítulo refere-se aos objetivos específicos c.

Capítulo 1

Bridi LC, Rafael MS (2016). GNBP domain of *Anopheles darlingi*: are polymorphic inversions and gene variation related to adaptive evolution?

Publicado na revista Genetica ('s-Gravenhage) 144 (1): 99-106
DOI 10.1007/s10709-016-9881-6

4.1.1 Abstract

Anopheles darlingi is the main malaria vector in humans in South America. In the Amazon basin, it lives along the banks of rivers and lakes, which responds to the annual hydrological cycle (dry season and rainy season). In these breeding sites, the larvae of this mosquito feed on decomposing organic and microorganisms, which can be pathogenic and trigger the activation of innate immune system pathways, such as proteins Gram-negative binding protein (GNBP). Such environmental changes affect the occurrence of polymorphic inversions especially at the heterozygote frequency, which confer adaptative advantage compared to homozygous inversions. We mapped the GNBP probe to the *A. darlingi* 2Rd inversion by fluorescent in situ hybridization (FISH), which was a good indicator of the GNBP immune response related to the chromosomal polymorphic inversions and adaptative evolution. To better understand the evolutionary relations and time of divergence of the GNBP of *A. darlingi*, we compared it with nine other mosquito GNBPs. The results of the phylogenetic analysis of the GNBP sequence between the species of mosquitoes demonstrated three clades. Clade I and II included the GNBPB5 sequence and clade III the sequence of GNBPB1. Most of these sequences of GNBP analyzed were homologous with that of subfamily B, including that of *A. gambiae* (87 %), therefore suggesting that GNBP of *A. darlingi* belongs to subfamily B. This work helps us understand the role of inversion polymorphism in evolution of *A. darlingi*.

4.1.2 Introduction

The vast majority of malaria infections in Brazil occur in the Amazon region, which accounts for more than 99 % of cases (Tadei et al. 1998; Ministério da Saúde 2015). Of the nine primary vector species of malaria in the Americas, *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Hay et al. 2010) is the most common, especially in the Amazon (Tadei et al. 1998, 2007). Some factors are determinants for the high incidence of malaria in the region, such as the marked preference of *A. darlingi* for feeding on human blood, the annual phenomenon of rains and flooding of rivers, as well as deforestation activities, farming and ranching, settlements and fish farming, which favor the development of different environmental conditions influencing the adaptation process of mosquitoes, the transmission of malaria parasites and vector control (Tadei et al. 1998; Hiwat and Bretas 2011). These environmental changes and anthropic activities are also principal factors that influence the adaptation process and evolution of anophelines, by means of chromosomal rearrangements (Coghlan et al. 2005; Rafael et al. 2010). *Anopheles darlingi* has a chromosome complement of 2n = 6 (Rafael and Tadei 1998), with two autosomal pairs: the larger pair (III) is submetacentric and smaller pair (II) metacentric. In the sex pair, X is acrocentric and Y punctiform. The salivary polytene chromosome consists of five arms: X, 2L, 2R, 3L and 3R. Polymorphic inversions in polytene chromosomes of mosquitoes of the genus *Anopheles* of Europa and Asia (Sharakhova et al. 2011; Liang et al. 2014), southeastern Brazil and the Amazon region (Kreutzer et al. 1972; Tadei and Santos 1982; Rafael et al. 2010) are associated with the capacity of these anophelines to efficiently explore different environmental conditions and to adapt to these environmental changes (Powell et al. 1999).

Studies on the molecular cytogenetics of chromosomal rearrangements of *A. darlingi* in populations from natural environments, involving the physical mapping of genes of interest in its genome, are still scarce. The in situ physical mapping of sequences of rDNA (pDm 238) (Rafael et al. 2003), Hsp 70 (Rafael et al. 2004) and actin (Bridi et al. 2013) has revealed mechanism patterns for chromosomal evolution in populations of this mosquito.

Anopheles darlingi is usually found around lakes and ponds, but also in altered environments with favorable characteristics for the development and survival of its immature forms (Tadei et al. 1998). The larvae feed on decomposing organic matter, fungi, bacteria, viruses, protozoa (Walker and Merritt 1993) and other microorganisms

(Wallace and Merritt 2004). Depending on their quantity and characteristics, these microorganisms can be pathogenic to mosquitoes, triggering the activation of innate immune system pathways for defense against these pathogens, which is one of the reasons for the evolutionary success of these mosquitoes (Osta et al. 2004).

In insects, antimicrobial peptides are synthesized during a systemic infection, which circulate through the hemolymph in the body of these organisms (Meister et al. 1997). In this biological pathway, there are pattern-recognition receptors (PRR) (Kimbrell and Beutler 2001), which recognize and cause the death of pathogens directly by encapsulation and phagocytosis or indirectly by defense reactions and the activation of cascades of intracellular immune signaling pathways (Hoffmann et al. 1996; Hoffmann and Reichhart 2002). In insects, one of these receptors belongs to the family of proteins known as Gram-negative binding proteins (GNBP), present in 19 species including the genus *Anopheles*, *Aedes aegypti*, as well as *Culex quinquefasciatus* and *Drosophila melanogaster* (Neafsey et al. 2015).

GNBPs can be classified into two subfamilies: GNBPA and GNBPB (Waterhouse et al. 2007). GNBP protein is a coelomic cytolytic factor and member of the glycosyl hydrolase family 16 (GH16 CCF), and GH16 CCF is a glucan- and lipopolysaccharide-binding protein that triggers the prophenoloxidase-activating pathway. The GH16 members, which often occur in bacteria, fungi, plants, and animals, act on b-1,3 and b-1,4 glycosidic bonds of many oligo- and polysaccharides throughout their chains (Mertz et al. 2009).

There are no studies on the sequences of immune response genes in anophelines of South America. These proteins are important for information about pathogens and triggering of immune response. To better understand the evolutionary relations and time of divergence of the GNBP gene of *A. darlingi*, it was compared with other mosquitoes in unrooted phylogenetic trees. *Anopheles darlingi*, with high plasticity of adaptation to different environments, especially in the Amazon basin, possesses polytene nuclei with a high degree of polymophic inversion, to which the GNBP probe was mapped to enrich the physical map of the sequences of its genome and to extend our understanding of the variability and evolution of this mosquito.

4.1.3 Materials and methods

Collection of *A. darlingi* and preparation of polytene chromosome slides

Anopheles darlingi larvae (n = 90) were captured in a natural lake, which is influenced by the annual hydrological cycle (dry season and rainy season) and has adequate environmental conditions for the reproduction of these mosquitoes at Bairro do Puraquequara (3º5.19'5''S and 5º98.92'62''W), Manaus, Amazonas State, Brazil. The offspring were reared to 4th instar. Morphological identification of the specimens was according to Forattini (1962) and Consoli and Lourenço-de-Oliveira (1994). Slides of polytene nuclei were prepared according to French et al. (1962) and Kumar and Collins (1994), with modifications (Rafael et al. 2004). Salivary glands of of 4th instar larvae were dissected in Carnoy's solution (100 % ethanol: glacial acetic acid, 3:1) and then fixed with the following solutions: Fixative I (Carnoy's solution and water, 1:5) for 3–5 min at room temperature, Fixative II (Carnoy's solution and water, 1:1) for 3 min at room temperature, and Fixative III (95 % lactic acid and water, 1:1) for 5–8 min at room temperature. The specimens were then placed on a slide and crushed with a coverslip. The coverslip was removed using liquid nitrogen, and the slides were dehydrated in 70, 90 and 100 % alcohol for 3 min each. The slides were air-dried and stored at -20 ºC.

GNBP labeling by PCR and fluorescence in situ hybridization (FISH)

The GNBP fragment was labeled with Cy^{TM} 3 dUTP (GE Healthcare), utilizing the Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen). This probe was precipitated with 1/10 volume of 3 M sodium acetate +2.5 volumes of 100 % ethanol. The chromosomes were hybridized at 40 ºC overnight in hybridization solution (2 x SSC, 100 mM sodium phosphate, 1 x Denhardt's solution, 100 µg/mL of sodium azide) and 10 % dextran sulfate in formamide (20 g of dextran sulfate to 100 mL of formamide, final concentration 500 ng/µL per slide). After hybridization at 37 ºC, chromosomes were washed twice in 0.2 x SSC (x SC = 0.15 M sodium chloride/0.015 M sodium citrate, pH 7) at 42 ºC for 15 min. They were then counterstained with 30 µL of 1µM YOYO-1 (Iodide-Sigma) in 1 x PBS and 10 µl of ProLong® Gold antifade (Invitrogen- P36934) were added. We detected fluorescent signals using Axioplan Imager A2 (Zeiss), using a 100 x objective. The exact location of the signal was carefully determined with help of a standard for *A. darlingi* (Rafael et al. 2010). The chromosome images were captured with an Axiocam MRC charge-coupled device camera (Zeiss) using the Axiovision

program (version 3.1) and edited with Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated).

Primer for GNBP [*A. darlingi*]

The BLASTx algorithms (Altschul et al. 1990) were used to identify protein sequences homologous with the *A. darlingi* GNBP (GenBank ETN64385.1), which is available at NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). The GNBP sequence was used to design the primer pair forward (5' TTGGATACCTGGCAACATGA 3') and reverse (5' GCAGCCAATCATTCTTACCG 3') by the program Gene Runner 3.01 (http://www.generunner.net). The PCR reaction was performed in a 50 µL reaction volume containing 5 µL 10x PCR buffer, 4 µL dNTPs (10 mM), 5 µL primer forward (5 mM), 5 µL primer reverse (5 mM), 2 µL MgCl2 (50 mM), 0.25 µL Taq DNA polymerase (5 U/µL), 2.5 µL DNA (500 ng/µL), 26.25 µL nuclease-free water. The conditions of the reaction were as follows: one cycle of initial denaturation at 94 ºC for 45 s, 35 amplification cycles of denaturation at 92 ºC for 30 s, annealing at 59.7 ºC for 40 s and extension at 72 ºC for 40 s, and one final extension cycle at 72 ºC for 7 min. The specific band size of the PCR product was 928 bp.

Phylogenetic analysis

The GNBP protein sequence of *A. darlingi* (GenBank ETN64385.1), obtained from the BLASTx algorithms (Altschul et al. 1990) was manually aligned with nine species of mosquitoes in the software BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Phylogenetic trees were built from the GNBP protein alignment with the maximum-likelihood (ML) method, using the PhyML 3.0 program (Guindon et al. 2010). ML inference analyses were conducted under the VT substitution model (Muller and Vingron 2000) with empirical equilibrium of frequencies, fixed proportion of invariable sites, six rates of substitution categories and gamma shape parameter fixed in 1.152. The confidence level of each node was estimated by the bootstrap procedure using 1000 resampling repetitions of the data. Reliable orthologous relationships were assigned where the relevant bootstrap support was greater than 90 %. We determined the relationships between the GNPB proteins of the nine species of mosquitoes using an unrooted tree, which illustrates only the relatedness of the nodes and does not require the ancestral root to be known or

inferred. The unrooted phylogenetic trees were visualized using the FigTree v1.4.2 program (Rambaut 2014).

4.1.4 Results

The physical mapping of the GNBP probe in 30 out of 90 of *A. darlingi* showed homology in the paracentric heterozygous 2Rd inversion, section 13E of the salivary polytene chromosomes from Manaus location, which was photographed and analyzed (Fig. 1). No variation in signal localization was ever detected among all the nuclei examined. A negative result was obtained with the salivary gland squash assays, where the nuclear contents and fibrous compounds became dissociated and were lost. During immersion of the slide preparations in liquid nitrogen to remove the coverslip, more material was lost, which meant that there were fewer slide preparations.

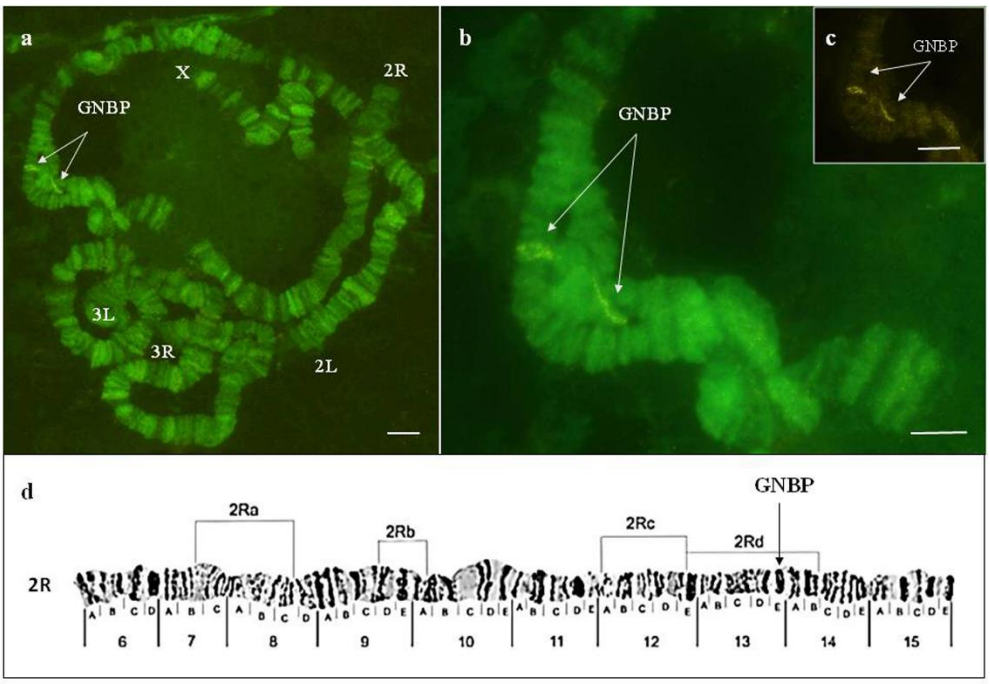

Fig. 1 Fluorescent in situ hybridization of the GNBP. **a** Complete salivary gland polytene chromosome of *Anopheles darlingi*: hybridization site of the GNBP in the 2Rd inversion, section 13E, chromosome arm 2R (arrow); **b** Hybridization site enlarged; **c** The GNBP labeled with Cy^{TM} 3 dUTP-GE Healthcare (arrow); **d** Photomap of arm 2R of *A. darlingi* with the inversions already described 2Ra, 2Rb, 2Rc e 2Rd (Rafael et al. 2010): physical localization of the GNBP in the 2Rd inversion (arrow). Bar 10 µm

BLASTx analysis of the GNBP sequence of *A. darlingi* against the databank of all available genomes identified sequences with similarity between species: *A. gambiae* (GenBank AGAP004456-PA), *A. sinensis* (GenBank AGAP004456-PA), *Cx. quinquefasciatus* (GenBank XP_001845280.1), *Ae. aegypti* (GenBank AAEL003894PA), *A. melas* (GenBank ABU80013), *A. arabiensis* (GenBankACN38176.1), *A. coluzzi* (GenBankAJC98246) and *A. quadriannulatus* (GenBank ACN38192.1). The evolutionary relations and time of divergence of the GNBP gene of *A. darlingi* were compared with that of *A. gambiae*, *A. sinensis*, *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*, *A. melas*, *A. arabiensis*, *A. coluzzii* and *A. quadriannulatus* in unrooted phylogenetic trees. As a result, we showed the GNBPs of the nine mosquito species existed as three clades: clade I (*A. darlingi*, *A. gambiae* and *A. sinensis*); clade II (*Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*), and clade III (*A. melas*, *A. arabiensis*, *A. coluzzi* and *A. quadriannulatus*) mosquitoes (Fig. 2).

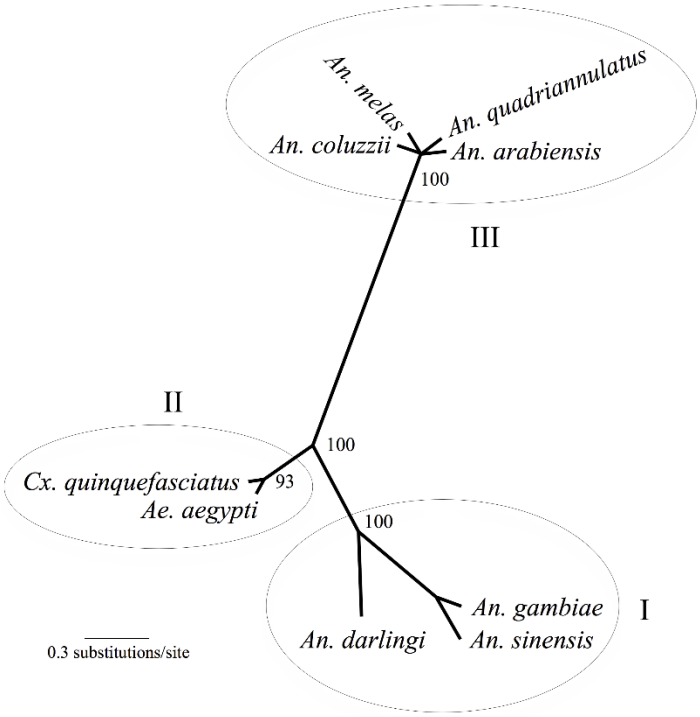

Fig. 2 Unrooted phylogeny of the Gram-negative binding protein (GNBP) for nine species of mosquitoes obtined from PhyML analysis. Bootstrap values at nodes (> 95) are based on 1000 replicates. In the clade I are the *Anopheles darlingi*, *Anopheles gambiae* and *Anopheles sinensis* species. In the clade II are the *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* species. In

the clade III are the *Anopheles coluzzi*, *Anopheles melas*, *Anopheles quadriannulatus* and *Anopheles arabiensis* species

4.1.5 Discussion

The adaptation of organisms in altered environments, especially in relation to the environmental changes, has been an important subject of discussion in evolutionary genetics (Peischl and Kirkpatrick 2012). In the Brazilian Amazon, immature forms of anophelines, such as *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. oswaldoi* and *A. nuneztovari*, have been found in natural and altered aquatic environments, such as puddles of water from settlements with gold mining and other excavations. The remaining factors are environmental alterations caused by anthropic activities, like in Venezuela (Moreno et al. 2007), or exogenous factors (Forattini 1987). The factors cited are temperature in the warm months of southern and southeastern Brazil (Forattini 1987), rainy season (Tadei et al. 1998; Tadei and Dutary-Thatcher 2000) and dry season or transition period (Póvoa et al. 2001; Moreno et al. 2007), which favor the high density of mosquitoes, variation in the cycle of hematophagous activity and productivity of breeding sites of immature forms.

Notably among the determinant factors of local adaptation of mosquito species in heterogeneous conditions due to spatiotemporal environmental changes, are polymorphisms of chromosomal inversions, fusions and translocations, because these cytogenetic aspects favor selection due to their role in the promotion of adaptation and speciation of various organisms (Dobzhansky 1944; Coluzzi et al. 1979; Hoffmann et al. 2004). Some chromosomal inversions in important malaria vectors have been related to environmental conditions, such as in *A. gambiae*, *A. arabiensis* (Coluzzi 1982) and *A. nili* (Sharakhova et al. 2011) in Africa and *A. sinensis* (Liang et al. 2014) and *A. stephensi* (Kamali et al. 2011) in Asia. The first record of chromosomal inversions associated with environmental stress in anophelines was described by Frizzi and Holstein (1956). In *A. gambiae*, the 2Rj inversion is distributed in the region of Mali and is consistent with adaptations of this mosquito to new niches of breeding sites formed on rocks (rockpool) (Manoukis et al. 2008). Among the anophelines, the chromosome arm 2R is the most polymorphic in comparison to the other arms of the chromosome complement (Sharakhov et al. 2002). Of the eight polymorphic inversions described for *A. gambiae*, seven occur in the 2R arm (Coluzzi 1979), and different chromosomal rearrangements in this arm characterize three different populations in Mali, resulting

from reproductive isolation (Coluzzi et al. 1985; Touré et al. 1994). In *A. funestus*, 11 of 17 polymorphic inversions occur in the 2R arm (Sharakhov et al. 2004).

In South America, studies of the polymorphism of inversions in the polytene chromosomes of anophelines, the main vectors of malaria parasites, have been carried out in anophelines from southeastern Brazil, namely *A. cruzii* (Ramírez and Dessen 1994) and *A. bellator* (Ramírez and Dessen 1994), and the Amazon region, namely *A. aquasalis* (Kitzmiller and Chow 1971), *A. darlingi* (Guedes et al. 1957; Kreutzer et al. 1972; Tadei et al. 1982; Rafael et al. 2004, 2010), *A. nuneztovari* (Kitzmiller et al. 1973), *A. argyritarsis* (Kreutzer et al. 1975), *A. albitarsis* (Kreutzer et al. 1975) and *A. triannulatus* (Conn 1991). In *A. darlingi*, six polymorphic inversions occur on the arms of chromosome 2, of which four are on the 2R arm (Tadei et al. 1982; Rafael et al. 2010). In *A. gambiae*, the GNBP gene mapped physicallly to chromosome arm 2R, region 17C, which does not include the inversion region (Lehmann et al. 2009). In *A. darlingi* of Manaus, the GNBP gene was physically mapped to the inversion region 13E of the 2R arm, of chromosome 2. But the comparison of in situ hybridization sites of *A. darlingi* with those of *A. gambiae*, *A. funestus* and *A. stephensi* is sometimes not possible, because *A. darlingi* differs from these mosquitoes with regard to the sections and divisions of polytene arms, due to large differences in the order of bands of polytene chromosomes (Rafael et al. 2010).

In *A. darlingi* populations from Manaus (Kreutzer et al. 1972), we observed that about 90 % of the polytene nuclei analyzed showed one or more heterozygotic inversions. Subsequently, Tadei et al. (1982) described one inversion on chromosome 2 (2Rd), one on chromosome 3 (3Rc) and one on chromosome X (Xb), all belonging to the *A. darlingi* population captured in the rainy season from the vicinities of the BR-174 highway, Manaus-Boa Vista, in the state of Amazonas. These authors studied the frequency variation in most of the chromosome inversions characterized as highly polymorphic, with up to 60 % of individuals having 3–5 inversions, including inversion on chromosome 2 (2Rd). These authors found a high frequency of heterozygotic inversions, including the 2Rd inversion (63 %), but individuals homozygous for this inversion were not observed. According to these authors, the high degree of inversions in the heterozygous state found mainly in the rainy season in the Amazon confers to *A. darlingi* greater adaptability to the environment compared to homozygous inversions. Comparative studies on the analysis of variability in the polymorphism of chromosomal

inversions between populations of *A. darlingi* from northern and southern Brazil, have shown a high frequency of heterozygous inversions and significant genetic differentiation in the northern *A. darlingi* population, resulting from the heterogeneous environments of the central Amazon region, in relation to the low frequency of these inversions in the southeastern population (Kreutzer et al. 1972; Tadei et al. 1982).

The literature reports various chromosomal inversions involved in the local adaptation of species of *Anopheles*, which has led to ecological plasticity of these mosquitoes (Tadei et al. 1982), as observed in three different populations of *A. gambiae* of the African continent, with the 2Rj inversion distributed in the region of Mali, which was consistent with adaptations of this mosquito to new niches of breeding sites (Manoukis et al. 2008). The mapping of the GNBP probe at the heterozygous paracentric inversion 2Rd of *A. darlingi* populations captured during the rainy season in Manaus, can be also attributed to specificity and immune response of this gene locally, and its adaptative meaning can have a correlation, in this mosquito, with ecological plasticity and behavior to environmental stress, variation in the levels of parasitism and pathogenic species. GNBPs are regulated in various tissues of anophelines after infections by bacteria (Tahar et al. 2002). In the complete genome of *A. darlingi*, the majority of DNA sequences are of bacterial origin (Marinotti et al. 2013). It can corroborate studies on pathogenic bacteria present in the natural habitat and intestine of anophelines, which can trigger a humoral immune response.

An annual hydrological cycle (dry season and rainy season) occurs in the Amazon basin (Tadei et al. 2007; Wolfarth et al. 2013; Musset et al. 2014). At the beginning of the rainy season (November), the density of the mosquito population is low and increases due to flooding until the month of June. On the other hand, in the low-water period of the dry season (July–October), the density of mosquitoes decreases due to the destabilization of the breeding sites, reducing mosquito breeding (Tadei et al. 2007). Accordingly, inversions are potential bioindicators are important in detecting genetic responses to environmental changes (Hoffmann and Danborn 2007; Hoffmann and Willi 2008). DS and DP inversions of *Drosophila mediopunctata*, a Neotropical species, have similar properties related to seasonality, temperature, precipitation and altitude (Ananina et al. 2004). However, in anophelines of South America, little is known about the effects of climatic changes and environmental alterations on polymorphic inversions. Therefore, one of the main reasons lies in the difficulty of rearing these

species in captivity. Knowing that inversions can be caused by some type of environmental stress, we can infer that the 2Rd inversion, which involves the region of the GNBP probe, could have originated in response to factors such as intense parasitism or climatic variables, as observed in *A. gambiae* in Mali region, involving the 2Rj inversion (Manoukis et al. 2008). We argue that our results represent an interesting model system for the study of chromosomal speciation mechanisms and an opportunity for comparative genomic studies the widespread *A. darlingi*, a major human malaria vector in South America.

The transmission of malaria is a complex biological and environmental process, which involves parasites, vectors, humans and the environment. The literature also shows little evidence for adaptive evolution in general, especially with regard to antimicrobial peptides (Clark and Wang 1997). The GNBP family, for example, includes members that are known to bind to Gram-negative bacteria, lipopolysaccharide (LPS), and b-1,3-glucan; to be involved in innate immune signaling in response to LPS (Christophides et al. 2002). The GNBPs can be classified into two subfamilies: GNBPA and GNBPB. The two genomes of *A. gambiae* and *Ae. aegypti* have 7 GNBPs.

The GNBPs show considerable conservation both between each other and with bacterial glucanases over the glucanase-like domain (Waterhouse et al. 2007). Subfamily A includes all known fruit fly and moth sequences as well as two mosquito sequences (GNBPA1, 2). Subfamily B is mosquito-specific (GNBP 1–4). According to these authors, *A. gambiae* and *D. melanogaster* share only one ortholog: GNBPA2/DmGNBP-3. All *A. gambiae* GNBP proteins contain a conserved b-1,3-glucan-binding domain, which is also present in the *D. melanogaster* and *Bombyx mori* GNBPs (Warr et al. 2008).

Studies on the identification of subfamilies (A or B) of sequences of GNBPs, deposited mainly in public databanks, are still scarce. Considering the results of the phylogenetic analysis of the GNBP protein of *A. darlingi* in the present study, we constructed clade I (*A. darlingi*, *A. gambiae* and *A. sinensis*), clade II (*Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*), and clade III (*A. melas*, *A. arabiensis*, *A. coluzzii* and *A. quadriannulatus*). Orthologous sequences of GNBPB5, subfamily B were demonstrated between *A. gambiae* and *Ae. aegypti* (Waterhouse et al. 2007), which is also in line with our findings on the behavior of this gene in two clades (I and II). The GNBP sequences of *A. coluzzi* and *A. quadriannulatus* (clade III) are GNBPB1,

subfamily B, which has been described as a pattern recognition receptor, whose expression is strongly upregulated in response to infection with both *Plasmodium berghei* (Dimopoulos et al. 1997) and *Plasmodium falciparum* (Tahar et al. 2002).

According to Slotman et al. (2007), GNBPB1 does not show any signs of positive selection, and in particular, shows little or no differentiation between malaria vectors and the non-vector species, indicating that these genes are largely involved in enhancing selection. GNBPB1 has a higher ratio of non-synonymous/synonymous polymorphisms than fixed differences in most or all populations, including *A. arabiensis*. This indicates the presence of a relatively large number of slightly deleterious alleles in this gene, few or none of which became fixed in ancestral populations.

Considering that the data on the evolution of the GNBP sequence of *A. darlingi* corroborate the high nucleotide similarity with GNBP of *A. gambiae*, subfamily B (87 %) and *A. sinensis*, followed by other mosquitoes, this suggests that GNBP of *A. darlingi* also belongs to subfamily B. However, there is a need for more studies about the genes responsible for the maintenance of chromosomal rearrangements and adaptation of natural populations of *A. darlingi*, including more immune response genes of the GNBP family, to understand the aspects of adaptation to the pressures of heterogeneous environments, which led to the evolutionary success of this mosquito across its geographic distribution.

Acknowledgments

This study was supported by Project PAPAC, Edital 020/2013, process number 1570/2013/FAPEAM awarded to MSR, and project ADAPTA II-CNPq. We thank Dr. Wanderli Pedro Tadei, CSAS, INPA and Dr. Felipe Rodrigues da Silva, Embrapa Bioinformática Agropecuária, UNICAMP, for technical support. Dr. A. Leyva helped with English translation and editing of the manuscript.

4.1.6 References

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403–410

Ananina GA, Peixoto AA, Blanche-Mathé BC, Souza WN, da Silva LB, Valente VLS, Klaczko LB (2004) Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila*

mediopunctata: seasonal, altitudinal and latitudinal variation. Genet Mol Biol 97:61–69

Bridi LC, Sharakhova MV, Sharakhov IV, Cordeiro J, Azevedo Junior GM, Tadei WP, Rafael MS (2013) Chromosomal localization of actin genes in the malaria mosquito *Anopheles darlingi*. Med Vet Entomol 27:118–121

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C et al (2002) Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. Science 298(5591):159–165

Clark AG, Wang L (1997) Molecular population genetics of *Drosophila* immune system genes. Genetics 147:713–724

Coghlan A, Eichler EE, Oliver SG, Paterson AH, Stein L (2005) Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. Trends Genet 21:673–682

Coluzzi M (1982) Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in Anopheline mosquitoes. In: Barigozzi C (ed) Mechanisms of speciation. Liss, New York

Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Dideco MA (1979) Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. Trans R Soc Trop Med Hyg 73:483–497

Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA (1985) Chromosomal inversion intergradations and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. Bollettino di Zoologia 52:45–63

Conn JA (1991) Cytogenetic analysis of the polytene chromosomes of *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) from western Venezuela. Genome 34:267–272

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. FIOCRUZ, Rio de Janeiro

Dimopoulos G, Richman A, Müller H-M, Kafatos FC (1997) Molecular immune response of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. Proc Natl Acad Sci USA 94:11508–11513

Dobzhansky T (1944) Chromosomal races in *Drosophila pseudoobscura* and *Drosophila persimilis*. Carnegie Inst Washington Publ 554:47–144

Forattini OP (1962) Entomologia médica. Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo

Forattini OP (1987) Comportamento exofilo de *Anopheles darlingi* Root, em região meridional do Brasil. Exophilic. Rev Saúde Publ 21:291–304

French WL, Baker RH, Kitzmiller JB (1962) Preparation of mosquito chromosomes. Mosq News 22:377–383

Frizzi G, Holstein M (1956) Etude cytogenetique d'*Anopheles gambiae*. Bull World Health Organ 15:425–435

Guedes AS, Amorim EM, Schreiber G (1957) Análise dos cromossomos salivares em anofelinos brasileiros. Rev Bras Malar D Trop 9:247–250

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst Biol 59(3):307–321

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acid Symp 41:95–98

Hay SI, Sinka ME, Okara RM, Kabaria CW, Mbithi PM, Tago CT, Benz D, Gething PW, Howes RE, Patil AP, Temperley WH, Bangs MJ, Chareonviriyaphap T, Elyazar IRF, Harbach RE, Hemingway J, Manguin S, Mbogo CM, Rubio-Palis Y, Godfray HCJ (2010) Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. PLoS Med 7:e1000209

Hiwat H, Bretas G (2011) Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. Parasite Vector 4:177

Hoffmann AA, Danborn PJ (2007) Towards genetic markers in animal populations as biomonitors for human-induced environmental change. Ecol Lett 10:63–76

Hoffmann JA, Reichhart JM (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. Nat Immunol 3:121–126

Hoffmann AA, Willi Y (2008) Detecting genetic responses to environmental changes. Nat Rev Genet 9:421–432

Hoffmann JA, Reichhart JM, Hetru C (1996) Innate immunity in higher insects. Curr Opin Immunol 8:8–13

Hoffmann AA, Sgro CM, Weeks AR (2004) Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. Trends Ecol Evol 19:482–488

Kamali M, Sharakhova MV, Baricheva E, Karagodin D, Tu Z, Sharakhov IV (2011) An integrated chromosome map of microsatellite markers and inversion breakpoints for an Asian malaria mosquito, *Anopheles stephensi*. J Hered 102(6):719–726

Kimbrell DA, Beutler B (2001) The evolution and genetics of innate immunity. Nature 2:256–267

Kitzmiller JB, Chow GW (1971) The salivary gland chromosomes of *Anopheles aquasalis*. Rev Bras Malariol Doencas Trop 23:65–85

Kitzmiller JB, Kreutzer RD, Tallaferro E (1973) Chromosomal differences in populations of *Anopheles nuneztovari*. Bull World Health Organ 48:435–445

Kreutzer RD, Kitzmiller JB, Ferreira E (1972) Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. Mosq News 32:555–565

Kreutzer RD, Kitzmiller JB, Rabbani MG (1975) The salivary gland chromosomes of *Anopheles argyritarsis* compared with those of certain other species in the subgenus Nyssorhynchus. Mosq News 35:354–365

Kumar V, Collins FH (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

Lehmann T, Hume JCC, Licht M, Burns CS, Wollenberg K, Simard F, Ribeiro JMC (2009) Molecular evolution of immune genes in the malaria mosquito *Anopheles gambiae.* PLoS ONE 4(2):e4549. doi:10.1371/journal.pone.0004549

Liang J, Sharakhova MV, Lan Q, Zhu H, Sharakhov IV, Xia A (2014) A standard cytogenetic map for *Anopheles sinensis* and chromosome arm homology between the subgenera *Anopheles* and *Cellia*. Med Vet Entomol 28(Suppl. 1):26–32

Manoukis NC, Powell JR, Touré MB, Sacko A, Edillo FE, Coulibaly MB, Traoré SF, Taylor CE, Besansky NJ (2008) A test of the chromosomal theory of ecotypic speciation in *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci USA 105:2940–2945

Marinotti O, Cerqueira GC, de Almeida LGP, Ferro MIT, Loreto ELS, Zaha A et al (2013) The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. Nucleic Acids Res 41(15):7387–7400

Meister M, Lemaitre B, Hoffmann JA (1997) Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. BioEssays 19:1019–1026

Mertz B, Gu X, Reilly PJ (2009) Analysis of functional divergence within two structurally related glycoside hydrolases families. Biopolymers 91(6):478–495

Ministério da Saúde — Portal da Saúde (2015) http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=10933&Itemid=646. Accessed 26 May 2015

Moreno JE, Rubio-Palis Y, Paez E, Perez E, Sanchez V (2007) Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. Med Vet Entomol 21:339–349

Muller T, Vingron M (2000) Modeling amino acid replacement. J Comput Biol 7:761–776

Musset L, Pelleau S, Girord R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, Gomes MSM, Djossou F, Legrand E (2014) Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 109(5):525–533

Neafsey DE, Waterhouse RM, Abai MR, Aganezov SS, Alekseyev MA, Allen JE, Amon J, Arcà B et al (2015) Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. Science. doi:10.1126/Science.1258522

Osta MA, Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC (2004) Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. J Exp Biol 207:2551–2563

Peischl S, Kirkpatrick M (2012) Establishment of new mutations in changing environments. Genetics 191:895–906

Póvoa MM, Wirtz RA, Lacerda RNL, Miles MA, Warhurst D (2001) Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, state of Amapá, Amazon Region, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 96:179–184

Powell JR, Petrarca V, della Torre A, Caccone A, Coluzzi M (1999) Population structure, speciation, and introgression in the *Anopheles gambiae* complex. Parassitologia 41:101–113

Rafael MS, Tadei WP (1998) Metaphase karyotypes of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root and *A.* (*N.*) *nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae). Genet Mol Biol 21:351–354

Rafael MS, Tadei WP, Recco-Pimentel SM (2003) Location of ribosomal genes in the chromosomes of *Anopheles darlingi* and *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) from the Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz 98(5):629–635

Rafael MS, Tadei WP, Hunter FF (2004) The physical gene Hsp70 map on polytene chromosomes of *Anopheles darlingi* from the Brazilian Amazon. Genetica 121:89–94

Rafael MS, Rohde C, Bridi LC, Gaiesky VLSV, Tadei WP (2010) Salivary polytene chromosome map of *Anopheles darlingi*, the main vector of neotropical malaria. Am J Trop Med Hyg 83(2):241–249

Rambaut A (2014) FigTree v1.4.2. Computer program available from: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/. Accessed 22 Oct 2015

Ramírez CCL, Dessen EMB (1994) Cytogenetic analysis of a natural population of *Anopheles cruzii*. Rev Bras Genet 17:41–46

Sharakhov IV, Serazin AC, Grushko OG, Dana A, Lobo N, Hillenmeyer ME, Westerman R, Romero-Severson J, Costantini C, Sagnon NF, Collins FH, Besansky NJ (2002) Inversions and gene order shuffling in *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. Science 298:182–185

Sharakhov I, Braginets O, Grushko O, Cohuet A, Guelbeogo WM, Boccolini D, Weill M, Costantini C, Sagnon N, Fontenille D (2004) A microsatellite physical map of the African human malaria vector *Anopheles funestus*. J Hered 95:29–34

Sharakhova MV, Xia A, Leman SC, Sharakhov IV (2011) Arm specific dynamics of chromosome evolution in malaria mosquito. BMC Evol Biol 11:91

Slotman MA, Parmakelis A, Marshall JC, Awono-Ambene PH, Antonio-Nkondjo C, Simard F, Caccone A, Powell JR (2007) Patterns of selection in anti-malarial immune genes in malaria vectors: evidence for adaptive evolution in LRIM1 in *Anopheles arabiensis*. PLoS ONE 8:e793

Tadei WP, Dutary-Thatcher B (2000) Malaria vectors in the Brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. Rev Inst Med Trop São Paulo 42:87–94

Tadei WP, Santos JMM (1982) Biologia de anofelinos amazônicos VII. Estudo da variação de frequências das inversões cromossômicas de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). Acta Amazônica 12(4):759–785

Tadei WP, Santos JM, Rabbani MG (1982) Biologia de anofelinos Amazônicos. V. Polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). Acta Amazônica 12:353–369

Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS (1998) Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg 59:325–335

Tadei WP, Passos RA, Rodrigues IB, Santos JMM, Rafael MS (2007) Indicadores entomológicos e o risco de transmissão de malária na área de abrangência do projeto PIATAM. In: Cavalcante KV, Rivas AAF, Freitas CEC (eds) Indicadores Socioambientais e Atributos de Referência para o trecho Urucu-Coari-Manaus. Rio Solimões, Amazônia, p 160

Tahar R, Boudin C, Thiery I, Bourgouin C (2002) Immune response of *Anopheles gambiae* to the early sporogonic stages of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. EMBO J 21:6673–6680

Touré YT, Petrarca V, Traoré SF, Coulibaly A, Maïga HM, Sankaré O, Sow M, Di Deco MA, Coluzzi M (1994) Ecological genetic studies in the chromosomal form Mopti of *Anopheles gambiae* s. str. in Mali, West Africa. Genetica 94:213–223

Walker ED, Merritt RW (1993) Bacterial enrichment in the surface microlayer of an *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) larval habitat. J Med Entomol 30:1050–1052

Wallace JR, Merritt RW (2004) Diel feeding periodicity of larval Anopheline mosquitoes on microorganisms and microinvertebrates: a spatial and temporal comparison of *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) diets in a michigan pond. J Med Entomol 41(5):853–860

Warr E, Das S, Dong Y, Dimopoulos G (2008) The Gram-negative bacteria binding protein gene family: its role in the innate imune system of *Anopheles gambiae* and in anti-Plasmodium defence. Insect Mol Biol 17:39–51

Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC et al (2007) Evolutionary dynamics of immunerelated genes and pathways in disease-vector mosquitoes. Science. doi:10.1126/science.1139862

Wolfarth BR, Filizola N, Tadei WP, Durieux L (2013) Epidemiological analysis of malaria and its relationships with hydrological variables in four municipalities of the State of Amazonas, Brazil. Hydrol Sci J 58:1495–1504

Capítulo 2

Bridi LC, Rafael MS 2016. Mapeamento físico cromossômico de genes de resposta imune no mosquito *Anopheles darlingi.*

Artigo formatado de acordo com as normas da revista: Chromosoma, ISSN: 0009-5915

4.2.1 Resumo

O *Anopheles darlingi* é o principal vetor na América do Sul, especialmente na bacia amazônica. As fêmeas adultas, durante a hematofagia, podem ingerir sangue contaminado com plasmódio. Em larvas, o modo de infecção natural é durante a ingestão de microrganismos em sítios de reprodução natural (criadouros), que podem ser patógenos, assim desencadear a reação de defesa do seu sistema imune. Neste estudo foram mapeados fisicamente em cromossomos politênicos de *A. darlingi,* cinco genes de resposta imune: Toll-*interacting protein* (Toll), defensina, *Chymotrypsin-like serine protease* (*AdChyL*), 28S *ribosomal protein S7- mitochondrial precursor* (*RpS7*) e *gambicin anti-microbial peptide* (gambicina). As marcações cromossômicas *in situ* foram únicas, não havendo sobreposição das marcações. Apenas dois genes (*AdChyL* e *RpS*7) mapearam *in situ* regiões de inversões: *AdChyL* (região 38D, inversão 3Lb) e *RpS*7 (região 22C, inversão 2Lb). Árvores filogenéticas dos genes Toll, defensina, *RpS7* e gambicina foram construídas e comparadas com sequências gênicas de sete anofelinos, utilizando-se o método de *Maximum-Likelihood* (ML). Alto grau de conservação gênica entre os genes de resposta imune de *A. gambiae* e *A. arabiensis* foi registrado. Os genes de resposta imune de *A. darlingi* e *Anopheles albimanus* estão proximamente relacionados, mas nem sempre com um suporte confiável, podendo indicar algum nível de conservação evolutiva entre eles em ambas as espécies. Este trabalho representa um recurso útil, para um melhor entendimento das relações evolutivas desses genes de resposta imune e estudos futuros sobre a biologia de *A. darlingi*.

Palavras chave: Toll, defensina, *AdChyL, RpS7, gambicina,* sintenia, relações evolutivas.

4.2.2 Introdução

A maior incidência da malária no Brasil ocorre na bacia amazônica, especialmente nos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, onde se concentram mais de 99% dos casos da doença. No Estado do Amazonas foram notificados mais de 75 mil casos positivos da doença em 2015 (SIVEP-Malária 2016). Um dos fatores determinantes para os altos índices de casos de malária é a abundância e a acentuada preferência de espécies transmissoras em alimentar-se com sangue humano, características comuns de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root, 1926 principal vetor dessa parasitose na América do Sul, especialmente na Amazônia (Tadei et al. 1998).

As fêmeas adultas alimentam-se de sangue para ingerir os nutrientes necessários para a produção dos ovos que, consequentemente, acabam ingerindo sangue infectado com plasmódio, podendo afetar a fecundidade do mosquito e seu *fitness* (Hogg & Hurd 1997). Outra forma de infecção natural das larvas de anofelinos é por meio dos sítios de reprodução natural, cujas áreas apresentam enorme heterogeneidade ambiental, incluindo fungos, bactérias gram-negativas e positivas e outros microrganismos (Walker & Merritt 1993), cujos patógenos desencadeiam reação de defesa no sistema imune das larvas (Osta et al. 2004).

Avanços no entendimento do sistema imune em insetos vetores de doenças têm resultado na identificação de diversos genes com papel importante nessas respostas (Dimopoulos et al. 2003). Selecionamos cinco genes oriundos do genoma de *A. darlingi*, com diferentes papéis na resposta imune contra patógenos de mosquitos, detalhados a seguir. O sistema imune em espécies de *Anopheles* tem quatro diferentes maneiras de ativação que envolvem as respostas imunes celulares e moleculares: (1) reconhecimento de patógenos por meio de receptores de reconhecimento padrão (RRPs), (2) cascatas de sinalização de amplificação, (3) vias de sinalização do sistema imunológico como Toll e *Imd* (*Immune Deficiency*), e (4) moléculas efetoras como os peptídeos anti-microbianos (PAMs) (Christophides et al. 2002).

O reconhecimento de patógenos por certos RRPs leva a ativação de uma via de sinalização imune intracelular que ativa a transcrição de PAM e outros genes efetores (Dimopoulos 2003). As vias Toll e *Imd* são as maiores vias de sinalizações identificadas em mosquitos, inclusive a via *Jak/STAT* (*Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*). Toll é reconhecido como um componente da resposta imune

a fungos e infecções bacterianas gram-positiva (Ligoxygakis et al. 2002). Em *A. darlingi* há 7 genes Toll conhecidos (Marinotti et al. 2013). A literatura registra estudos das famílias de PAMs em *Anopheles* e *Aedes aegypti*, tais como a defensina (Lowenberger 2001) e gambicina (Vizioli et al. 2001a) que atuam contra bactérias gram-negativas e positivas, leveduras, fungos e plasmódios.

A defensina é uma molécula efetora produzida nos mosquitos em resposta a infecção por vários patógenos (Richman et al. 1996). É sintetizada principalmente no corpo gorduroso de larvas e adultos e secretada na hemolinfa. A gambicina foi um dos primeiros fatores anti-plasmódio identificados (Vizioli et al. 2001a). O efeito da infecção por plasmódios da malária sobre a expressão da gambicina foi testado nos estágios críticos da transição do ciclo de vida desses protozoários no mosquito vetor *Anopheles gambiae* (Dimopoulos et al. 1998).

A *Chymotrypsin-like serine protease* (*AdChyL*) tem a função molecular de ativar endopeptidase do tipo serina. As serino proteases estão envolvidas no processo de melanização de plasmódios (Clayton et al. 2013), na digestão de proteínas de alimentos (Zhang et al. 2010) e processo de muda em insetos (Wei et al. 2007). Segundo os autores, serino proteases tais como tripsina e quimotripsina, estão entre as enzimas digestivas do intestino médio de larvas de lepidópteras. A *AdChyL* é induzida positivamente após a alimentação sanguínea no intestino médio de fêmeas de mosquitos, indicando seu papel na digestão sanguínea e possivelmente à invasão por *Plasmodium* (Broehan et al. 2008).

A proteína *mitochondrial ribosomal protein S*7 (*RpS*7) tem sido pouco estudada quanto a sua função e importância. Durante a organização do ribossomo, proteínas ribossômicas individuais que inicialmente reconhecem o RNAr devem ligar as partículas reunidas em uma certa ordem e trabalhar tanto em conjunto como isoladamente. Duas destas importantes proteínas ribossômicas são as *RpS7* e a *RpS*8. A proteína *RpS*7 foi relacionada à infecção por *Plasmodium* em *Anopheles dirus* (Xu et al. 2003).

Essas e outras proteínas envolvidas na resposta imune têm sido determinadas graças à era genômica (Nene et al. 2007; Marinotti et al. 2013). Um dos papéis da genômica comparativa é a identificação de sintenias entre diferentes espécies. Mapas físicos e sequências de genomas permitem a reconstrução de genomas ancestrais e

determinar padrões e mecanismos para evolução cromossômica em diversas espécies de mosquitos (Rafael et al. 2010).

Este trabalho objetivou mapear fisicamente os genes Toll, defensina, *AdChyL*, *PrS7* e gambicina de *A. darlingi*, nos cromossomos politênicos desse mosquito, para inferir sobre padrões de variabilidade cromossômica e evolução filogenética dessas sequências gênicas comparativamente a outras seis espécies de anofelinos.

4.2.3 Material e Métodos

Captura de *A. darlingi* e manutenção em Insetário

As capturas de *A. darlingi* foram realizadas de 2011 a 2015, nas localidades do Estado do Amazonas: no bairro do Puraquequara (3º 5.19' 5'' S e 5º 98.92' 62'' W) em Manaus (Tabela 1), e na cidade de Coari (4º 06' 57.1'' S e 63º 08' 56.9'' W). Em cada localidade foram capturados aproximadamente 200 espécimes. A autorização para captura de anofelinos foi segundo o ICMBIO-SISBIO n° 32941-1. A identificação da espécie foi de acordo com as chaves taxonômicas de Forattini (1962) e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). As fêmeas adultas foram mantidas em copos individuais telados, para oviposição e eclosão dos ovos. As larvas foram criadas em insetário até alcançar a fase de 4º estádio, as quais foram utilizadas nas preparações citológicas de cromossomos politênicos.

Preparações das lâminas de cromossomos politênicos

A preparação dos núcleos politênicos foi de acordo com French et al. (1962) e Kumar & Collins (1994), com modificações (Rafael et al. 2004). As larvas de 4º estádio foram dissecadas para retirada das glândulas salivares em Fixador I (solução Carnoy e água 1:5), Fixador II (solução Carnoy e água 1:1) e Fixador III (ácido lático e água 1:1). O material foi esmagado entre lâmina e lamínula, sendo esta última siliconizada. As lâminas foram mergulhadas em nitrogênio líquido. Em seguida, desidratadas em álcool 70 %, 90 % e 100 %, e secas a temperatura ambiente. Logo depois, mantidas a 20 ºC negativos, para utilização no método de FISH.

Após as preparações cromossômicas de politênicos salivares, a maioria é danificada durante o procedimento de retirada de lamínulas em nitrogênio líquido. Sendo assim, uma grande quantidade de preparações cromossômicas é necessária para a realização da metodologia de FISH. Neste estudo foram realizadas preparações

cromossômicas do material capturado no Bairro Puraquequara, cidade de Manaus (100 lâminas e cidade de Coari (100 lâminas) e utilizadas outras amostras, também, do banco de preparações cromossômicas de *A. darlingi* dessas localidades (20 lâminas) do Laboratório de Citogenética, Genômica e Evolução de Mosquitos (LCGEM/INPA).

Primers **de genes de resposta imune de** ***A. darlingi*** **e amplificação por PCR**

As sequências dos genes de resposta imune de *A. darlingi* foram obtidas do site https://www.vectorbase.org, e utilizadas nos desenhos dos *primers forward* e *reverse*, conforme o programa *Gene Runner* 3.01 (http://www.generunner.net) (Tabela 1). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, a qual continha 5 µL de buffer 10x, 4 µL de dNTPs (10 mM), 5 µL de *primer forward* (5 mM), 5 µL *primer reverse* (5 mM), 2 µL $MgCl_2$ (50 mM), 0,25 µL Taq DNA polimerase (5 U/µL), 2,5 µl DNA (500 ng/µL), 26,25 µL de água livre de nuclease. As condições da reação de PCR foram as seguintes: um ciclo de desnaturação inicial de 94 ºC por 45 s, 35 ciclos de amplificação a 92 ºC por 30 s, anelamento a 59,7 ºC por 40 s e extensão a 72 ºC por 40 s, e um ciclo final de extensão a 72 ºC por 7 min.

Os genes ESTs utilizados foram: Toll, defensina, *AdChyL*, *RpS7* e gambicina (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* desenhados, com tamanho dos fragmentos amplificados (pb), para os genes de resposta imune Toll, defensina, *AdChyL, RpS7* e gambicina de *A. darlingi*, dos locais de capturas desse mosquito em Coari/AM e Bairro Puraquequara, Manaus/AM.

Gene	*Forward*	*Reverse*	Região amplificada (pb)	Locais de captura
Toll	GAACGAACATTGGAAGCGG	GCAGCAGAGCGTTGATAA	779	Coari
Defensina	CTTCCACAAGCGATGTGCTA	CTCCACCGTGTGATTCCAG	1035	Manaus
AdChyL	GTGGTAGTGCCGAGTGGAT	CGTAGTCCGAGTTCTGTTC	855	Manaus
RpS7	ATGTCACAGTACGGACCAC	GGCTCGGTTTGCTTCACAC	600	Manaus
Gambicina	GTGTACCATATTCGTCAACAT	CACTCCGTTATACCAGTTTG	419	Coari

Marcação das sondas e o método de FISH

Na marcaçao das sequências gênicas (sondas) foram utilizados Cy™ 3 dUTP e Cy™ 5 dUTP (GE *Healthcare*), kit *Random Primers* DNA *Labeling System* (*Invitrogen*) de acordo com as instruções do fabricante. As sondas foram purificadas com 1/10 do

volume de acetato de sódio 3 M + 2,5 volumes de etanol 100 % e eluídas em solução de hibridação (2 x SSC, 100 mM fosfato de sódio, 1 x solução *Denhardt*, 100 µg/ml de azida sódica) e 10 % sulfato dextran em formamida (20 g de sulfato dextran para 100 mL de formamida), concentração final 500 ng/µL, por lâmina. Os cromossomos foram hibridizados a 40 ºC, por 18 horas. Depois da hibridização, as lâminas foram lavadas em 0,2 x SSC (0,15 M cloreto de sódio /0,015 M citrato de sódio, pH 7) a 42 ºC por 15 min, por 2 vezes. No sistema de detecção foram utilizados 30 µL de *YOYO*-1 (1 µM, *Iodide*-Sigma) em 1 x PBS (Tampão Fosfato Salino), por 10 minutos para corar os cromossomos, em seguida foram adicionados 10 µL de *ProLong® Gold antifade* (Invitrogen- P36934).

Microfotografias

Os sinais fluorescentes foram observados, utilizando-se o microscópio de luz *Axio Imager* A2 (Zeiss), com objetiva de 100X. As localizações dos sinais nos cromossomos politênicos foram determinadas com o auxílio do fotomapa de *A. darlingi* (Rafael et al. 2010). As imagens dos cromossomos foram capturadas com a câmera *Axiocam* e o programa *Axiovision* (versão 3.1), e editadas com o programa *Adobe® Photoshop®* CS4 (*Adobe Systems Incorporated*).

Análise filogenética

As sequências do DNA de Toll, defensina, *RpS7* e gambicina de *A. darlingi* obtidas no banco de dados https://www.vectorbase.org, foram utilizadas para a reconstrução filogenética juntamente com genes ortólogos de outros anofelinos do mesmo banco de dados (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de *Anopheles* utilizadas na reconstrução da filogenia, com os números de acesso: https://www.vectorbase.org.

Anopheles	**Toll**	**Defensina**	***RpS7***	**Gambicina**
A. albimanus	AALB009280-PA	AALB007417-PA	AALB000727-PA	AALB000900-PA
A. arabiensis	AARA010180-PA	AARA006271-PA	AARA011355-PA	AARA010954-PA
A. darlingi	ADAC004703-PA	ADAC001122-PA	ADAC006753-PA	ADAC010639-PA
A. dirus	ADIR006470-PA	ADIR010798-PA	ADIR004845-PA	ADIR006825-PA
A. funestus	AFUN004732-PA	AFUN006915-PA	AFUN003841-PA	AFUN006610-PA
A. gambiae	AGAP003615-PA	AGAP011294-PA	AGAP009613-PA	AGAP008645-PA
A. stephensi	ASTE005309-PA	ASTE011281-PA	ASTE007788-PA	ASTE002252-PA

O gene *AdChyL* (nº de acesso: ADAC000858) não foi comparado na análise filogenética, pois não apresentou genes ortólogos com *A. albimanus*, *A. arabiensis*, *A. dirus*, *A. funestus*, *A. gambiae* e *A. stephensi* utilizados, o que inviabilizou tal comparação. As sequências de nucleotídeos de Toll, defensina, *RpS*7 e gambicina foram alinhadas no programa MEGA 7 (http://www.megasoftware.net/). As árvores filogenéticas foram construídas, utilizando-se o método de *Maximum-Likelihood* (ML) no programa *PhyML* 3.0 (Guindon et al. 2010). As análises de inferência ML foram conduzidas sob o modelo de substituição VT (Muller & Vingron 2000), com equilíbrio empírico de frequências, proporção fixada nos sítios invariáveis, seis taxas de categorias de substituição e o parâmetro gamma fixado em 1.152. Os parâmetros dos modelos evolutivos utilizados para cada gene nas filogenias foram: TN93 + G6 para Toll, e defensina, HKY85 + G6 + I para *RpS*7 e gambicina. O nível de confiança de cada nó foi estimado pelo procedimento de *bootstrap,* utilizando 1000 repetições de reamostragem dos dados. Relações ortólogas confiáveis foram atribuídas, onde o suporte de *bootstrap* relevante foi maior do que 90 %. Nós determinamos as relações dos genes Toll, defensina, *RpS*7 e gambicina entre sete espécies de mosquitos, utilizando uma árvore não enraizada, que ilustra apenas o parentesco entre os nós e não requer uma raiz ancestral a ser conhecida ou inferida. A árvore filogenética não enraizada foi visualizada, utilizando o programa *FigTree* v1.4.2 (Rambaut 2014).

4.2.4 Resultados

Preparações de núcleos politênicos de *A. darlingi* das localidades de Coari (100 lâminas e Manaus (100 lâminas) AM, foram utilizadas no método de FISH. Dentre estas, as marcações de sondas foram analisadas em apenas 30 de cada localidade. Os cinco genes de resposta imune de *A. darlingi*: Toll, defensina, *AdChyL*, *RpS*7 e gambicina apresentaram localizações cromossômicas *in situ* únicas em amostras de ambas as localidades não havendo sobreposição dos sinais observados (Figura 1). Apenas dois genes mapearam *in situ* regiões de inversões: *AdChyL* (região 38D, inversão 3Lb) e *RpS*7 (região 22C, inversão 2Lb), este último está presente em mais de uma cópia no genoma (Figura 2). Uma das localizações do gene *RpS7* em *A. darlingi*, é próximo ao centrômero (braço 2L, 16AB).

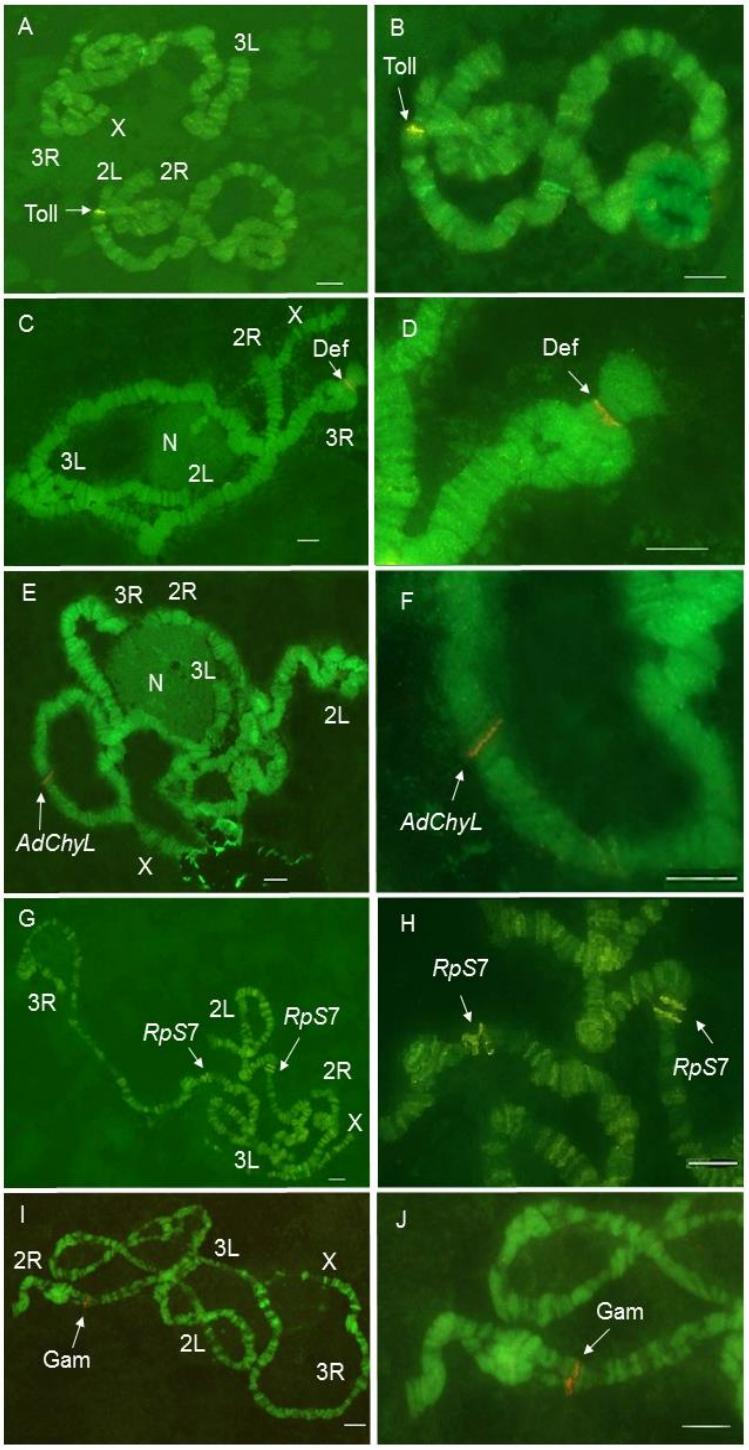

Fig.1 Mapeamento físico das sequências dos genes (sondas) Toll, defensina (def), *AdChyL*, *RpS7* e gambicina, marcadas com os fluorocromos *Cy™ 5* (vermelho) e *Cy™ 3* (amarelo) contracoradas com *YOYO*-1 em cromossomos politênicos de *A. darlingi*. **A.** Gene Toll: braço 2L, região 25C (seta). **B.** Sinal de Toll ampliado. **C.** Gene defensina: braço 3R, 27A (seta). N= nucléolo. **D.** Sinal de defensina ampliado. **E**. Gene *AdChyL*: braço 3L, 38D (seta). N= nucléolo. **F.** Sinal da *AdChyL* ampliado. **G.** Gene *PrS7*: braço 2L, 16AB e braço 3L, 36CD (setas). **H.** Sinal de *PrS7* ampliado. **I.** Gene gambicina (gam): braço 2R, 10B (seta). **J.** Sinal de gambicina ampliado. Barra: 10 µm

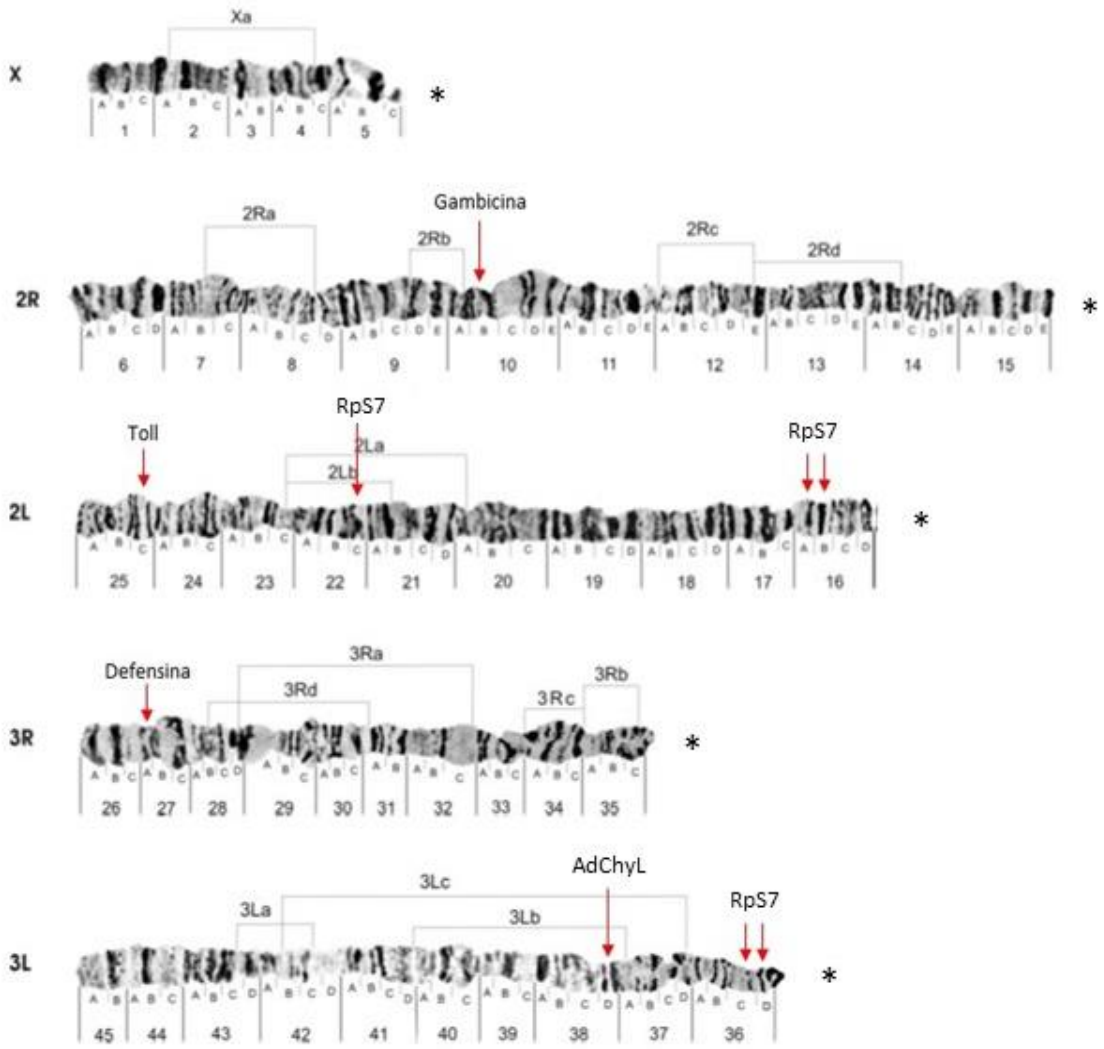

Fig. 2 Localizações físicas dos genes Toll (2L, 25C), defensina (3R, 27A), *AdChyL* (3L, 38D), *RpS7* (2L, 16AB e 22C; 3L, 36CD) e gambicina (2R, 10B) (setas), segundo o fotomapa dos núcleos politênicos de *A. darlingi,* que contém regiões de inversões e os centrômeros (asteriscos à direita), conforme Rafael et al. (2010).

Dentre as proteínas de resposta imune de *A. darlingi*, a *RpS7* foi a única que apresentou sintenia no braço cromossômico politênico com outro díptero, a mosca *Drosophila melanogaster.* Há 22 genes ortólogos de *AdChyL* entre *A. darlingi* e *D. melanogaster* (https://www.vectorbase.org). Os ortólogos estão distribuídos em todos os cromossomos de *D. melanogaster*, menos no cromossomo sexual.

As árvores não enraizadas mostraram as relações evolutivas dos genes Toll, defensina, *RpS7* e gambicina de *A. darlingi* com outros anofelinos: *A. albimanus*, *A. arabiensis*, *A. dirus*, *A. funestus*, *A. gambiae* e *A. stephensi* (Figura 3). Os valores de *bootstrap* (> 95) estão representados acima dos nós nos ramos. Quanto maior o ramo, maior é o número de mutações acumuladas (substituições/sítio).

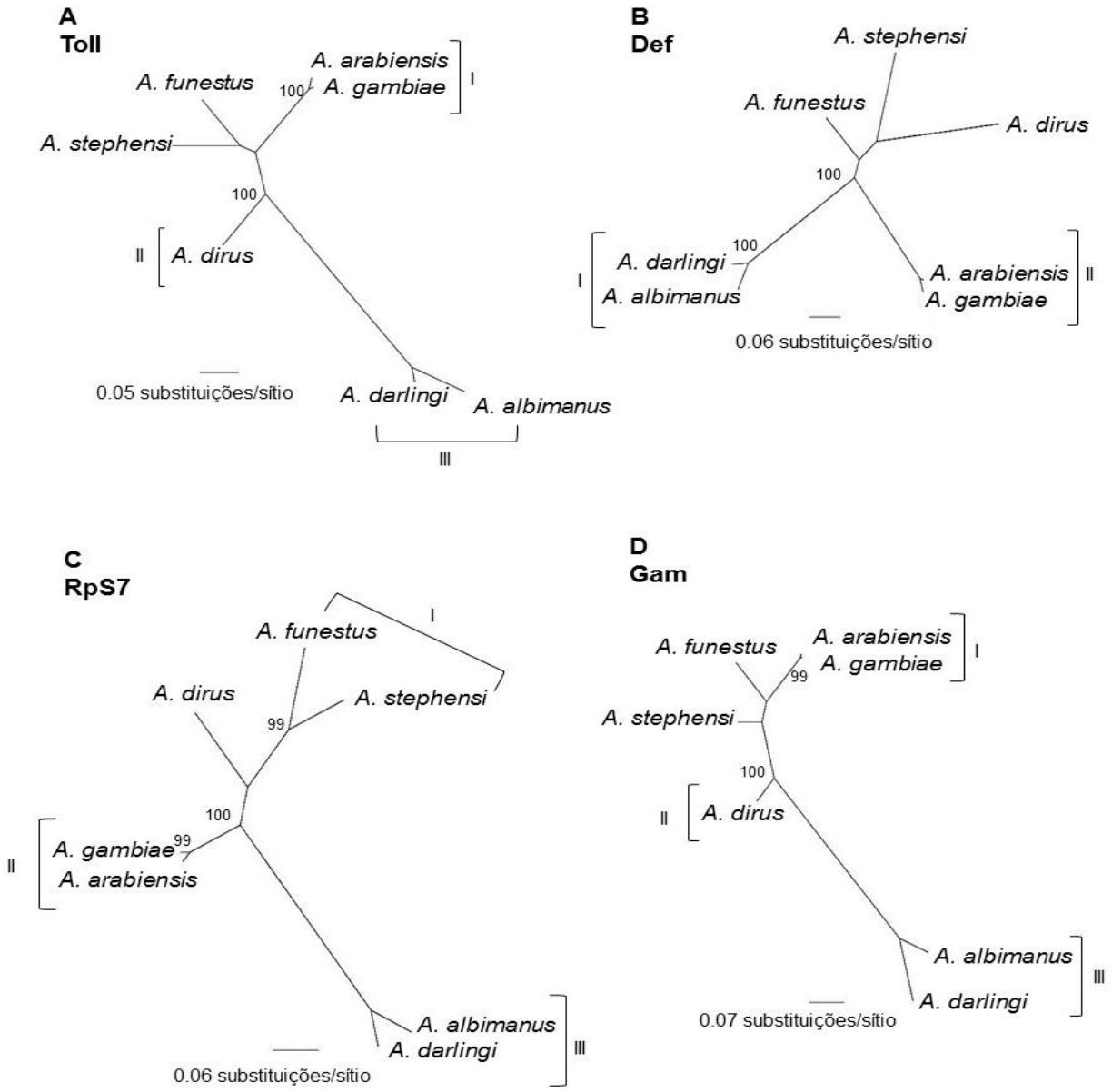

Fig. 3 Filogenia não enraizada dos genes Toll, defensina, *RpS7* e gambicina de *A. darlingi* em comparação a outras seis espécies de *Anopheles*, segundo o método de *Maximum-Likelihood* (ML) e programa PhyML 3.0. Os valores de *bootstrap* nos nós (> 95) são baseados em 1000 repetições. Comprimento dos ramos - número de substituições de amino ácidos por 100 resíduos (barra). **A**: Toll. **B**: Def: defensina. **C**: *RpS7*. **D**: Gam: gambicina.

Na árvore filogenética do gene Toll (Figura 3A) foram obtidos três clados: no clado I, o gene Toll das espécies *A. arabiensis* e *A. gambiae* mostrou-se estreitamente relacionado; nos clados II (*A. dirus*) e III (*A. darlingi* e *A. albimanus*) este gene forma grupo irmão nessas espécies. Como não há um suporte confiável, não foi possível

fazer inferências sobre as relações evolutivas, envolvendo as sequências gênicas Toll do *A. funestus* e *A. stephensi.*

Para o gene defensina (Figura 3B), *A. darlingi* e *A. albimanus* presentes no clado I está estreitamente relacionado, e este clado é um grupo irmão do clado II (*A. arabiensis* e *A. gambiae*). Inferências acerca das relações evolutivas deste gene em *A. funestus*, *A. stephensi* e *A. dirus* não foram realizadas, pois não foi detectado suporte confiável.

A presença de três clados também foi confirmada nas relações evolutivas do gene *RpS7* (Figura 3C). No clado I, esse gene em *A. funestus* e *A. stephensi* foi estreitamente relacionado. O clado II (*A. gambiae* e *A. arabiensis*) é grupo irmão do clado III (*A. albimanus* e *A. darlingi*). Como não há um suporte confiável, não pudemos fazer inferências sobre as relações evolutivas envolvendo o gene *RpS7* de *A. dirus*. E, finalmente, nas relações evolutivas do gene gambicina (Figura 3D) foram gerados três clados. No clado I, esse gene de *A. arabiensis* e *A. gambiae* está estreitamente relacionado. No clado II, de gambicina (*A. dirus*), observaram-se espécies irmãs do clado III (*A. albimanus* e *A. darlingi*).

Análise sobre as relações evolutivas para o gene de gambicina entre *A. stephensis* e *A. funestus* não foram realizadas, pois não foi obtido suporte confiável nos ramos da árvore filogenética construída.

4.2.5 Discussão

Extensivos rearranjos cromossômicos são evidentes entre os mosquitos *Aedes*, *Anopheles* e a mosca *Drosophila* apesar das grandes distâncias evolutivas entre eles (Moreno et al. 2010). *Aedes aegypti* e *A. gambiae* têm mantido associações de genes em braços inteiros, enquanto que as comparações de ambos com *D. melanogaster* indicam consideráveis mudanças entre os braços (Severson et al. 2004). A análise comparativa entre *D. melanogaster* e *A. gambiae* identificou considerável conservação na sintenia de todo o genoma, mas apenas evidências limitadas para a conservação da ordem de genes (Bolshakov et al. 2002; Zdobnov et al. 2002).

Exemplos de segmentos gênicos conservados entre *A. gambiae* e *A. funestus* estão localizados em regiões próximas aos centrômeros e telômeros, onde a taxa de recombinação meiótica pode ser reduzida (Sharakhov et al. 2002). E onde consiste de sequências de DNA altamente repetitivos ou DNA satélite arranjadas *in tandem* (Lohe

et al. 1993). Em *A. darlingi,* uma das localizações do gene ribossômico *RpS7* encontra-se próxima ao centrômero, e não registramos correspondência deste gene com *A. gambiae* ou *A. funestus*. Porém, em *D. melanogaster*, o gene ortólogo de *RpS7*, corresponde ao mesmo braço que *A. darlingi*, mas não está próximo ao centrômero.

Ao longo da história evolutiva de *A. darlingi* e *A. gambiae,* subgêneros *Cellia* e *Nyssorhynchus*, respectivamente, seus cromossomos sofreram vários rearranjos (Sharakhov et al. 2002). Estes autores realizaram comparações entre espécies do mesmo subgênero (*A. gambiae* e *A. funestus*), e não observaram sintenia de braços inteiros, contendo segmentos com a ordem dos genes conservada. Contudo, uma vez que o tempo de divergência entre *A. darlingi* e *A. gambiae* é de ~ 59 MA, e entre *A. gambiae* e *A. funestus* é de ~ 43 MA (Moreno et al. 2010), a ordem dos genes e suas sequências foram evoluindo com taxas tão elevadas como aquelas estimadas para *Drosophila*, que são as mais altas taxas conhecidas (Sharakhov et al. 2002).

Apesar desse achado, há 6.312 genes sintênicos entre *A. darlingi* e *A. gambiae*, o que corresponde a 60 % de todos os genes codificadores de proteínas em *A. darlingi* (Marinotti et al. 2013). Para esses autores, 3680 genes são sintênicos com *A. aegypti*, 3.684 com *Culex quinquefasciatus* e 488 com *D. melanogaster.* Mas, para (Rafael et al. 2010), a comparação de homologias entre os braços cromossômicos politênicos de *A. darlingi* com *A. funestus*, *A. stephensi* e *A. gambiae* foi inviável, pois há muitas diferenças na ordem das bandas dos núcleos politênicos, o que corrobora com a divergência evolutiva destas espécies.

Em relação à evolução cromossômica dos braços autossômicos, há uma grande diferença entre mosquitos anofelinos e moscas do gênero *Drosophila.* As espécies de *Drosophila* possuem autossomos acrocêntricos ou metacêntricos/submetacêntricos, consistindo de fusões nos elementos cromossômicos. Já os autossômicos dos anofelinos são sempre metacêntricos/submetacêntricos, mas eles se remodelaram várias vezes, por meio de translocações, durante ~ 100 MA de evolução (Neafsey et al. 2015).

Das espécies de mosquitos comparadas neste trabalho, o *A. albimanus,* cujo genoma já foi comparado ao de *A. gambiae* (Neafsey et al. 2015) foi a espécie mais próxima evolutivamente ao *A. darlingi.* Os braços cromossômicos de *A. gambiae* são indicados de acordo com os elementos cromossômicos: 1 (X), 2 + 3 (2R + 2L), 4 + 5 (3R + 3L), a correspondência para *A. albimanus* é 1, 2 + 4, 5 + 3, sendo que há 903

blocos sintenicos conservados entre essas espécies e 589 inversões cromossômicas estimadas (Neafsey et al. 2015).

No estudo de Rafael et al. (2010), a análise comparativa das pontas dos braços 2R entre *A. darlingi* (subgênero *Nyssorhynchus*), *A. gambiae, A. stephensi* e *A. funestus* mostrou provável homologia entre essas espécies, que foi conspícua em *A. gambiae* e *A. funestus*. No entanto, a comparação entre as pontas dos braços 2L, 3R e 3L, exceto o cromossomo X de *A. darlingi* em relação ao *A. gambiae*, *A. stephensi* e *A. funestus* mostrou-se bastante divergente. Estes dados fornecem uma base importante para o estabelecimento de homologias cromossômicas entre os principais anofelinos vetores de agentes etiológicos da malária.

Considerando a evolução dos genes clássicos de reconhecimento da resposta imune, proteínas de reconhecimento peptídeoglicanas (proteínas *Gram-Negative Binding Protein*), por exemplo, exibem níveis de divergência das sequências relativamente baixos, e as enzimas efetoras são de fato, altamente conservadas em nível de sequência. Os transdutores de sinal (vias Toll e *Imd*), que raramente se duplicam são encontrados universalmente em todas as espécies e apresentam elevadas taxas de divergência de sequências. Os moduladores de cascatas (serino proteases, por exemplo) também exibem altas taxas de divergência de sequências, mas eles são muito mais específicos de linhagens e, geralmente, têm mais duplicações gênicas (Neafsey et al. 2015).

Em mosquitos, as respostas antimicrobianas, usam três grandes vias de ativação de sinal: Toll, *Imd* e *Jak/STAT*. A maioria dos componentes dessas vias é representada por genes bem conservados, supostamente refletindo a conservação de suas funções. A família de receptores de sinalização (Toll, por exemplo), mostra um baixo nível de diversificação. Este receptor envolve muitas famílias gênicas (Christophides et al. 2002). *Anopheles* tem 11 genes Toll, dos quais o Toll 10 e 11 são ortólogos entre *A. gambiae* e *A. aegypti*; e, o Toll 6 e 7 são ortólogos entre *A. gambiae*, *A. aegypti* e *D. melanogaster*. Ainda é desconhecido qual é o gene Toll encontrado em *A. darlingi*. A via Toll é uma cascata de ativação conservada evolutivamente (Kimbrell & Beutler 2001).

A rápida evolução dos peptídeos anti-microbianos (PAMs) tem sido registrada, e a maioria das famílias importantes são amplamente distribuídas. Estudos sugerem que a defensina de insetos tem evoluído por duplicação gênica, seguido por divergência

sob uma pressão seletiva especialmente em mosquitos para combater uma vasta gama de microorganismos, bem como parasitas que se encontram no seu corpo (Dassanayake et al. 2007). A filogenia, a partir da sequência de defensina de *A. stephensi*, mostrou um grupo parafilético com: *A. stephensi, A. arabiensis*, *A. gambiae, A. aegypti* e *A. albopictus* (Dixit et al. 2008).

Há quatro defensinas descritas para *A. gambiae* (Waterhouse et al. 2007), que são mais numerosas e divergentes que em *Drosophila* (Christophides et al. 2002). A defensina de *A. darlingi* é ortóloga da defensina 1 (DEF1) de *A. gambiae.* Em *Aedes* e *Drosophila,* a DEF1 pode ser agrupada em um mesmo clado (Christophides et al. 2002). Quanto ao seu mapeamento *in situ*, até o momento só foi estudado em três espécies, das quais apresenta uma provável sintenia gênica no braço 3L de *A. gambiae* (braço 3L, seção 42A) e *A. funestus* (3L, 45A; 2R, 18C), segundo Sharakhov et al. (2002). Apesar do braço 3L de *A. gambiae* não apresentar nenhuma inversão, esse braço cromossômico em *A. funestus* possui quatro grandes inversões, o que pode ter comprometido a perfeita sintenia entre essas espécies. E em *D. melanogaster*, a defensina foi mapeada *in silico* no braço 2R, 46D7-9 (Severson et al. 2004). Em *A. darlingi*, analisado no presente estudo, a defensina marcou o braço 3R, 27A.

A *AdChyL* não apresenta sintenia entre as espécies já estudadas, pois mapeou em diferentes braços cromossômicos: *A. gambiae,* no braço 2L, 25D (Vizioli et al. 2001b) e *A. funestus,* no braço 2R, 13C (Sharakhov et al. 2002). Em *D. melanogaster* o gene *AdChyL* foi mapeado *in silico* nos cromossomos 2R, 2L, 3R e 3L (https://www.vectorbase.org). Em *A. darlingi* do presente estudo, a *AdChyL* marcou *in situ* no braço 3L, 38D.

A análise filogenética das *AdChyLs* de *A. gambiae* mostrou que este é um grupo parafilético, proximamente mais relacionadas com *A. aegypti* (Vizioli et al. 2001b). Já foram descritas outras duas sequências de *AdChyLs* de *A. darlingi* que são evolutivamente muito próximas ao *A. aquasalis* sul americano, também vetor de agentes etiológicos da malária; estas *AdChyLs* são ortólogas entre ambas espécies (De Almeida et al. 2003). Esses autores também mencionam a presença de um pequeno rearranjo genômico nesse gene em *A. darlingi,* sugerindo mecanismos de inversão relacionados à elementos transponíveis.

Devido ao papel fundamental dos ribossomos, sua estrutura e função têm sido conservadas significativamente, durante a evolução. A proteína ribossomal *RpS6*

responde à melanização em presença de patógenos e supressor tumoral em *D. melanogaster*, idêntica à *RpS6* em humanos (Watson et al. 1992). Pouco se sabe sobre o gene *RpS7.* O *RpS7* foi mapeado *in silico* em núcleos politênicos, nos braços 3R (34B) de *A. gambiae* e 2L (31D11) de *D. melanogaster*, (https://www.vectorbase.org). Em *A. darlingi,* apresentou marcações em dois braços:-2L (16AB e 22C) e 3L (36CD). Apesar do gene *RpS7* estar no mesmo braço cromossômico 2L de *A. darlingi* e de *D. melanogaster*, não fizemos comparações entre os cromossomos politênicos dessas espécies, pois o padrão de bandas e tamanho dos braços é muito diferente, o que inviabilizou tal comparação.

A gambicina de *A. darlingi* é ortologa à gambicina 1 (GAM1) de *A. gambiae* e *A. aegypti.* Em uma análise *Bayesian* (não enraizada), os *clusters* de gambicina de *A. arabiensis* agruparam com a gambicina de *A. gambiae* (Parmakelis et al. 2008), assim como foi registrado em comparação com a gambicina de *A. darlingi*. A completa ausência de substituições não sinônimas fixadas na comparação do *locus* da gambicina entre espécies do complexo *A. gambiae*, indica que a seleção purificadora é a maior força que molda o padrão evolutivo para gambicina (Parmakelis et al. 2008).

A gambicina só foi mapeada e, *in silico*, até o momento em *A. gambiae*, apresentando-se no braço 3R, 31A (Parmakelis et al. 2008). No presente trabalho, a sonda gambicina mapeou o braço 2R, 10B.

Comparação mais aprofundada acerca dos sítios de hibridização entre *A. darlingi*, *A. gambiae*, *A. funestus* e a mosca *D. melanogaster* não foi possível, devido as diferenças na morfologia, seções e divisões dos cromossomos politênicos desses mosquitos em relação à *D. melanogaster*.

4.2.6 Conclusões

- ✓ O mapeamento físico cromossômico e análise filogenética dos genes Toll, defensina, *AdChyL*, *RpS7* e gambicina do genoma de *A. darlingi* foram úteis para a localização física de sequências consideradas regiões de lacunas não preenchidas na montagem do genoma de *A. darlingi,* e auxiliar na compreensão da variabilidade cromossômica e relações evolutivas.

- ✓ As grandes diferenças nas bandas e seções dos cromossomos politênicos de *A. darlingi* e dos demais anofelinos analisados neste trabalho, inviabilizaram a realização de comparações sintênicas entre esses mosquitos.

- ✓ Aprofundar o estudo da sintenia cromossômica de genes de resposta imune de *A. darlingi* em relação a outros anofelinos, como o *A. albimanus* é necessário, para uma melhor compreensão da evolução desses genes filogeneticamente próximos, já que podem estar sofrendo as mesmas pressões seletivas ambientais, pois ambos os mosquitos compartilham uma pequena sobreposição nas distribuições geográficas.

- ✓ Os anofelinos, que tiveram sequências de genes de resposta imune comparadas filogeneticamente neste trabalho, têm origem de ambientes diversos, com fatores associados, provavelmente, às taxas evolutivas e tempos de divergência, para cada espécie, que foram representadas nos clados filogenéticos I, II e III, refletindo as diferentes histórias evolutivas para cada gene estudado.

4.2.7 Referências bibliográficas

Bolshakov VN, Topalis P, Blass C, Kokoza E, della Torre A, Kafatos FC, Louis C (2002) A comparative genomic analysis of two distant diptera, the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae.* Genome Research 12:57-66

Broehan G, Kemper M, Driemeier D, Vogelpohl I, Merzendorfer H (2008) Cloning and expression analysis of midgut chymotrypsin-like proteinases in the tobacco hornworm. Journal of Insect Physiology 54:1243-1252

Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A et al (2002) Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. Science 298:159-165

Clayton AM, Dong Y, Dimopoulos G (2013) The *Anopheles* innate immune system in the defense against malaria infection. J Innate Immun. DOI: 10.1159/00035360

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. FIOCRUZ, Rio de Janeiro

Dassanayake RS, Silva Gunawardene YI, Tobe SS (2007) Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized alpha/beta motifs. Peptides 28:62-75

De Almeida RW, Tovar FJ, Ferreira II, Leoncini O (2003) Chymotrypsin genes in the malaria mosquitoes *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. Insect Biochem Mol Biol 33:307-315

Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A, Kafatos FC (1998) Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune- responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. EMBO J 17:6115-6123

Dimopoulos G (2003) Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions. Cell Microbiol 5:3-14

Dixit R, Sharma A, Patole MS, Shouche YS (2008) Molecular and phylogenetic analysis of a novel salivary defensina cDNA from malaria vector *Anopheles stephensi.* Acta tropica 106: 75-79. doi:10.1016/j.actatropica.2008.01.001

Forattini OP (1962) Entomologia médica. Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo

French WL, Baker RH, Kitzmiller JB (1962) Preparation of mosquito chromosomes. Mosq News 22:377-383

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst Biol 59(3):307-321

Hogg JC, Hurd H (1997) The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae s.l*. in northeast Tanzania. Parasitology 114:325-331

Kimbrell DA, Beutler B (2001) The evolution and genetics of innate immunity. Nature 2:256-267

Kumar V, Collins FH (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

Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann JA, Reichhart JM (2002) Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. Science 297:114–116

Lohe AR, Hilliker AJ, Roberts PA (1993) Mapping simples repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. Genetics 134:1149-1174

Lowenberger C (2001) Innate immune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31: 219-229

Marinotti O, Cerqueira GC, de Almeida LGP, Ferro MIT, Loreto ELS, Zaha A et al (2013) The genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. Nucleic Acids Res 41(15):7387-7400

Moreno M, Marinotti O, Krzywinski J, Tadei WP, James AA, Achee LN, Conn EJ (2010) Complete mtDNA genomes of *Anopheles darlingi* and an approach to anopheline divergence time. Malaria J 9(127):1-13

Muller T, Vingron M (2000) Modeling amino acid replacement. J Comput Biol 7:761-776

Neafsey DE, Waterhouse RM, Abai MR, Aganezov SS, Alekseyev MA, Allen JE, Amon J, Arcá B et al (2015) Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. Science. doi:10.1126/Science.1258522

Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B et al (2007) Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science. 316 (5832): 1718-1723.

Osta MA, Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC (2004) Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. J Exp Biol 207:2551-2563

Parmakelis A, Slotman MA, Marshall JC, Awono-Ambene PH, Antonio-Nkondjio C, Simard F, Caccone A, Powell JR (2008) The molecular evolution of four anti-malarial immune genes in the *Anopheles gambiae* species complex. BMC Evol Biol 8(79). doi:10.1186/1471-2148-8-79

Rafael MS, Tadei WP, Hunter FF (2004) The physical gene Hsp70 map on polytene chromosomes of *Anopheles darlingi* from the Brazilian Amazon. Genetica 121:89-94

Rafael MS, Rohde C, Bridi LC, Gaiesky VLSV, Tadei WP (2010) Salivary polytene chromosome map of *Anopheles darlingi*, the main vector of neotropical malaria. Am J Trop Med Hyg 83(2):241-249

Rambaut A (2014) FigTree v1.4.2. Computer program available from: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/. Acessado 08 de abril de 2016

Richman AM, Bulet P, Hetru C, Barillas-Mury C, Hoffmann JA, Kafalos FC (1996) Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*:

biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. Insect Mol Biol 5:203-210. PubMed: 8799739

Sharakhov IV, Serazin AC, Grushko OG, Dana A, Lobo N, Hillenmyer ME, Westerman R, Romero-Severson J, Costantini C, Sagnon N et al (2002) Inversions and gene order shuffling in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. Science 298:182-185

Severson DW, Debruyn B, Lovin DD, Brown SE, Knudson DL, Morlais I (2004) Comparative Genome Analysis of the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* with *Drosophila melanogaster* and the Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae*. Journal of Heredity 95(2):103-113. doi: 10.1093/jhered/esh023

SIVEP-MALÁRIA: Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. http://www.portalsaude.saude.gov.br. Data de acesso 13/04/2016

Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS (1998) Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg 59:325-335

Xu WY, Huang FS, Duan JH (2003) The internal control role of ribosomal protein S7 in the defense of *Anopheles dirus* against *Plasmodium* infection. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 21(5):264-7

Vizioli J, Bulet P, Hoffmann JA, Kafatos FC, Müller HM, Dimopoulos G (2001a) Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci USA 98:12630-12635

Vizioli J, Catteruccia F, della Torre A, Reckmann I, Müller HM (2001b) Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. Eur J Biochem 268:4027-4035

Walker ED, Merritt RW (1993) Bacterial enrichment in the surface microlayer of an *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) larval habitat. J Med Entomol 30:1050-1052

Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC et al (2007) Evolutionary dynamics of immunerelated genes and pathways in disease-vector mosquitoes. Science. doi:10.1126/science.1139862

Watson KL, Konrad KD, Woods DF, Bryant PJ (1992) *Drosophila* homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. Proc Natl Acad Sci USA 89:11302-11306

Wei Z, Yin YP, Zhang BSH, Wang ZHK, Peng GX, Cao YQ, Xia YX (2007) Cloning of a novel protease required for the molting of *Locusta migratoria manilensis*. Development Growth and Differentiation 49:611-621

Zhang C, Zhou D, Zheng S, Liu L, Tao S, Yang L, Hu S, Feng Q (2010) A chymotrypsin-like serine protease cDNA involved in food protein digestion in the common

cutworm, *Spodoptera litura*: Cloning, characterization, developmental and induced expression patterns, and localization. Journal of Insect Physiology 56:(7)788-799

Zdobnov EM, von Mering C, Letunic I, Torrents D, Suyama M, Copley RR et al (2002) Comparative Genome and Proteome Analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. Science 298: 140-159

Capítulo 3

Bridi LC, Grangeiro WG, Rafael MS. 2016. Mapeamento físico do gene OBP em cromossomo sexual e presença de novas inversões em *Anopheles darlingi.*

Artigo formatado de acordo com as normas da revista Genome (ISSN 0831-2796)

4.3.1 Resumo

Anopheles darlingi é o vetor primário da malária na bacia amazônica. Este mosquito como outros culicídeos possuem a habilidade de reconhecer e discriminar moléculas de odores por meio de células neurais quimiosensíveis especializadas em expressar proteínas receptoras olfativas, importantes componentes hidrossolúveis, presentes na linfa das sensilas, como as proteínas de ligação olfativas (*odorante binding proteins,* OBP). Neste trabalho, o gene OBP foi mapeado *in situ* em núcleos politênicos de *A. darlingi* de cinco localidades de três Estados brasileiros, sendo três no Amazonas, uma no Amapá e outra no Mato Grosso. O gene OBP apresentou uma única marcação no cromossomo X politênico (seção 4A) de *A. darlingi*, de quatro localidades (Coari/AM, Manaus/AM, Macapá/AP e B Bugres/MT). Porém, este gene OBP hibridizou na seção 3A, apenas nos indivíduos de São Gabriel da Cachoeira/AM. Duas novas inversões foram descritas, uma no braço X (Xb) e a outra no braço 2L (2Lb). As hipóteses sobre barreiras geográficas e adaptação de anofelinos às condições ambientais locais podem estar associadas ao surgimento de novas inversões, o que permite levantar a hipótese de haver uma nova espécie dentro do suposto complexo *A. darlingi,* em São Gabriel da Cachoeira/AM.

Palavras chave: cromossomo X, inversão paracêntrica, gene sensorial, adaptação ambiental, malária, Amazônia.

4.3.2 Introdução

Anopheles darlingi Root, 1926 é o mais importante vetor de parasitos da malária na bacia amazônica (Lounibos & Conn 2000; Sinka et al. 2010). As fêmeas desta espécie foram encontradas infectadas por três plasmódios que causam a malária humana nas Américas – *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (Rachou 1958; Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). Este mosquito tem uma distribuição geográfica nas Américas do Sul e Central, que se estende do sul do México ao norte da Argentina, e do leste da cadeia dos Andes para a costa do Oceano Atlântico (Forattini et al. 1987; Sinka et al. 2010). É encontrado em áreas de baixas altitudes, quase sempre associado aos grandes cursos de água e florestas do interior, mas ocorre também no litoral. Nessas áreas, os seus principais *habitats* são as águas pretas e ácidas, águas brancas, pulso de enchentes e vazantes, que propiciam a existência de uma diversidade e densidade de anofelinos específicos (Tadei et al. 1998).

Há indícios de que *A. darlingi* pertença a um complexo de espécies juntamente com uma segunda: *Anopheles paulistensis* e, a terceira espécie, ainda não descrita (Emerson et al. 2015). Os autores basearam-se nas análises de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) e concluíram que a divergência heterogênea entre populações de *A. darlingi* foi causada por pressões de seleção e processos ecológicos biogeográficos, que pode ter permitido a separação entre as populações estudadas.

O *A. darlingi* possui complemento cromossômico metafásico 2n= 6 (Rafael & Tadei 1998), com dois pares autossômicos: o par maior (III) é submetacêntrico e o par menor (II) metacêntrico. No par sexual, o X é acrocêntrico e o Y, puntiforme. Além dos cromossomos metafásicos, os anofelinos possuem núcleos politênicos, que consistem em cinco braços: X, 2L, 2R, 3L e 3R. Os cromossomos politênicos das glândulas salivares de mosquitos do gênero *Anopheles* têm sido estudados quanto às inversões polimórficas (Schreiber & Guedes 1959, 1960; Kreutzer et al. 1972).

Populações de *A. darlingi* da Amazônia central apresentaram alto grau de inversões polimórficas, como mostram as análises do mapa de referência por Kreutzer et al. (1972), que registram 13 inversões nos cromossomos politênicos dessa espécie. Posteriormente, Rafael et al. (2010) descreveram o fotomapa para *A. darlingi*, de amostras de área periférica da Amazônia (Guajará-Mirim/RO). Os autores identificaram um baixo polimorfismo cromossômico, e registraram mais uma inversão (3Lc), que foi somada às inversões polimórficas previamente encontradas, totalizando 14 inversões

em *A. darlingi*. Dentre essas, uma inversão está localizada no cromossomo X, quatro no braço cromossômico 2R, duas no 2L, quatro no 3R e três no 3L. Os autores dividiram o fotomapa em 45 seções, seguindo o mapa de referência proposto por Kreutzer et al. (1972). Recentemente, novas modificações foram propostas para o fotomapa da espécie (Cornel et al. 2016) os quais descreveram quatro novas inversões paracêntricas, sendo duas para o braço 3R, e duas para o braço 3L em *A. darlingi* de Macapá/Amapá, Manaus/Amazonas e Porto Velho/Rondônia.

O sucesso ecológico de uma espécie depende da sua capacidade para enfrentar os desafios de novos cenários bióticos e abióticos, e o genoma dessas espécies reflete esse processo evolutivo por meio de modificações em suas sequências. Entre os mecanismos de adaptação em maior destaque estão as inversões cromossômicas (Hoffmann et al. 2004). Em *A. darlingi,* rearranjos de inversões peri e paracêntricas têm ocorrido, afetando a sua morfologia cromossomal, mas o seu cariótiplo diplóide se mantém conservado, como em outros anofelinos (Rafael et al. 2005; 2010).

Dentre as características comportamentais de *A. darlingi,* está a preferência em alimentar-se com sangue humano (Tadei et al. 1998). Desta maneira, seu sistema quimiosensorial possui um papel fundamental na sua sobrevivência, pois o utiliza para encontrar hospedeiros, identificar parceiros, evitar predadores, e atuar na seleção de sítios de oviposição (Hallem et al. 2006). Apresenta a habilidade de reconhecer e discriminar milhares de moléculas odoríferas por meio de células neurais quimiosensíveis especializadas em expressar proteínas receptoras olfativas (*olfactory receptor proteins* - ORPs), localizadas em compartimentos chamados sensilas. As proteínas de ligação olfativas (*odorante binding proteins,* OBP) são consideradas importantes componentes hidrossolúveis presentes na linfa das sensilas (Manoharan et al. 2013). As OBPs têm sido caracterizadas em três subfamílias (*Classic*, *PlusC* e *Atypical*) com base nas características de suas sequências (Vieira & Rozas 2011). Essas proteínas não são restritas apenas às antenas dos insetos, foram encontradas ainda em outras partes do corpo de *Aedes aegypti*: probóscide de fêmeas, espermateca e espiráculo (Li et al. 2008). Estudos recentes mostraram que as OBPs adquiriram uma diversidade funcional em *A. gambiae*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (Manoharan et al. 2013).

Considerando a genômica de *A. darlingi,* estudos citogenéticos são necessários, para compreender melhor os dados genômicos, variabilidade cromossômica e evolução

desse mosquito. Estudamos o mapeamento físico do gene OBP e a análise de possíveis inversões em núcleos politênicos de *A. darlingi* de cinco localidades do Brasil, para comparar os sítios de hibridização e determinar se esse gene é conservado entre as populações analisadas.

4.3.3 Material e métodos

Capturas de *A. darlingi* e preparação citológicas de núcleos politênicos

As capturas de fêmeas adultas de *A. darlingi* ocorreram em cinco localidades do Brasil, sendo três no Estado do Amazonas (AM): São Gabriel da Cachoeira (SGC), Coari e Manaus (AM); uma no Amapá (Macapá) e outra em Mato Grosso, Barra do Bugres (B Bugres) (Figura 1). Em cada localidade foram capturadas cerca de 100 fêmeas. A autorização para captura ddas amostras foi segundo o ICMBIO-SISBIO n° 32941-1. As capturas foram realizadas no período de 2011 a 2015 (Tabela 1).

Tabela 1. Localidades e coordenadas geográficas dos pontos de capturas de *A. darlingi*.

Localidade	Coordenadas geográficas	Data da captura
Coari/Ciganópolis/AM	4º 06’ 57.1’’ S, 63º 08’ 56.9’’ W	Maio/2015
Manaus/Puraquequara/AM	3º 5.19’ 5’’ S, 59º 92’ 62’’ W	Abril/2014
SGC/Estrada Camanaus Km 18/AM	00º 08’ 82.1’’ S, 66º 57’ 49.3’’ W	Agosto/2011
B Bugres/MT	15º 4’ 26’’ S, 57º 10’ 27’’ W	Setembro/2011
Macapá/Ramal da Viúva/AP	0º 2’ 4’’ N, 51º 3’ 60’’ W	Julho/2011

A identificação de *A. darlingi* capturado foi de acordo com as chaves taxonômicas de Forattini (1962) e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). As fêmeas adultas foram dispostas, para oviposição em copos telados e individuais em Insetário. As larvas foram criadas até alcançar a fase de 4º estádio. Foram confeccionadas de 50 a 100 lâminas de cromossomos politênicos para cada localidade, (French et al. 1962; Kumar & Collins 1994; Rafael et al. 2004).

As glândulas salivares foram dissecadas, utilizando-se os Fixadores: I (solução Carnoy e água 1:5); II (solução Carnoy e água 1:1), e III (ácido lático e água 1:1). O material foi esmagado entre lâmina e lamínula, esta última siliconizada. As lâminas foram mergulhadas em nitrogênio líquido, e as lamínulas foram retiradas. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool 70 %, 90 % e 100 %, secas a temperatura ambiente (T.A.) e mantidas a 20 ºC negativos. Dentre estas, 10 lâminas de cada localidade foram utilizadas para o método de FISH.

Figura 1. Pontos de capturas de fêmeas adultas de *A. darlingi* (círculos vermelhos). 1: SGC/AM; 2: Coari/AM; 3: Manaus/AM; 4: Macapá/AP e 5: B Bugres/MT.

Obtenção da sonda

A sequência de OBP de *A. darlingi* foi obtida do site https://www.vectorbase.org (nº. de acesso: ADAC000512). Foram utilizadas para desenho dos *primers forward* 5' ACATCGTTCGTAGTCGCTG 3' e *reverse* 5' GCGAACACGACCTTGACC 3', por meio do programa *Gene Runner* 3.01 (http://www.generunner.net). A região de amplificação é de 815 pares de bases (pb). As condições da reação de PCR estão a seguir: um ciclo de desnaturação inicial de 94 ºC por 45 segundos (s), 35 ciclos de amplificação a 92 ºC por 30 s, anelamento a 59,7 ºC por 40 s e extensão a 72 ºC por 40 s, e um ciclo final de extensão a 72 ºC por 7 min.

As sondas foram marcadas com *Cy*^{TM} 3 dUTP (GE *Healthcare*), utilizando o kit *Random Primers* DNA *Labeling System* (Invitrogen), segundo instruções do fabricante. As sondas foram precipitadas com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M + 2,5 volumes de etanol 100 % e diluídas em solução de hibridação (2 x SSC, 100 mM

fosfato de sódio, 1 x solução Denhardt, 100 µg/ml de azida sódica) e 10 % sulfato dextran em formamida (20 g de sulfato dextran para 100 mL de formamida, concentração final 500 ng/µL, por lâmina). Os cromossomos foram hibridizados a 40 ºC, por 18 horas. Depois da hibridização, as lâminas foram lavadas em 0,2 x SSC (0,15 M cloreto de sódio /0,015 M citrato de sódio, pH 7) a 42 ºC por 15 min, 2x. Os cromossomos foram corados com 30 µl de 1µM *YOYO*-1 (*Iodide* - Sigma) em 1 x PBS e foram adicionados 10 µl de *ProLong® Gold antifade* (Invitrogen- P36934). Os sinais fluorescentes foram detectados utilizando o microscópio Axioplan *Imager* A2 (Zeiss), objetiva de 100 x.

As localizações exatas dos sinais foram determinadas, com o auxílio do fotomapa para *A. darlingi* (Rafael et al. 2010). As imagens dos cromossomos foram capturadas com a câmera *Axiocam* e com o programa *Axiovision* (versão 3.1) e editadas com *Adobe® Photoshop®* CS4 (*Adobe Systems Incorporated*).

Análise das novas inversões

As inversões do cromossomo X e do autossomo 2, foram identificadas por letras minúsculas, em ordem alfabética de acordo com outras descrições citológicas para essa espécie, onde a correspondência foi mantida entre nossas descrições e estudos anteriores (Kreutzer et al. 1972; Tadei et al. 1982; Rafael et al. 2010).

4.3.4 Resultados

Em *A. darlingi* das localidades de Coari, Manaus, Macapá/AP e B Bugres/MT o mapeamento físico do gene OBP apresentou uma única marcação, sempre na seção 4A do cromossomo X (Figura 2). Apenas em indivíduos da localidade de SGC/AM, o gene OBP foi hibridizado na seção 3A do cromossomo X.

As análises das inversões cromossômicas nas populações estudadas, mostraram uma inversão no estado homozigoto em indivíduos de SGC/AM, onde os pontos de quebra de pedaços do cromossomo X se pareiam sem formação de alça. Os prováveis pontos de quebra dessa inversão, que denominamos Xb, envolvem as seções 3B a 4B (Figura 3). Esta inversão sobrepõe a inversão Xa (Rafael et al. 2010).

Outra nova inversão, heterozigota, foi encontrada para o braço 2L de *A. darlingi* da localidade de B Bugres/MT (Figura 4). Tal inversão foi denominada 2Lc e os prováveis pontos de quebra dessa inversão envolvem as seções 25A até 21B. Esta

inversão sobrepõe as inversões 2La e 2Lc (Rafael et al. 2010) e um rearranjo alternativo chamado de 2L' (Cornel et al. 2016).

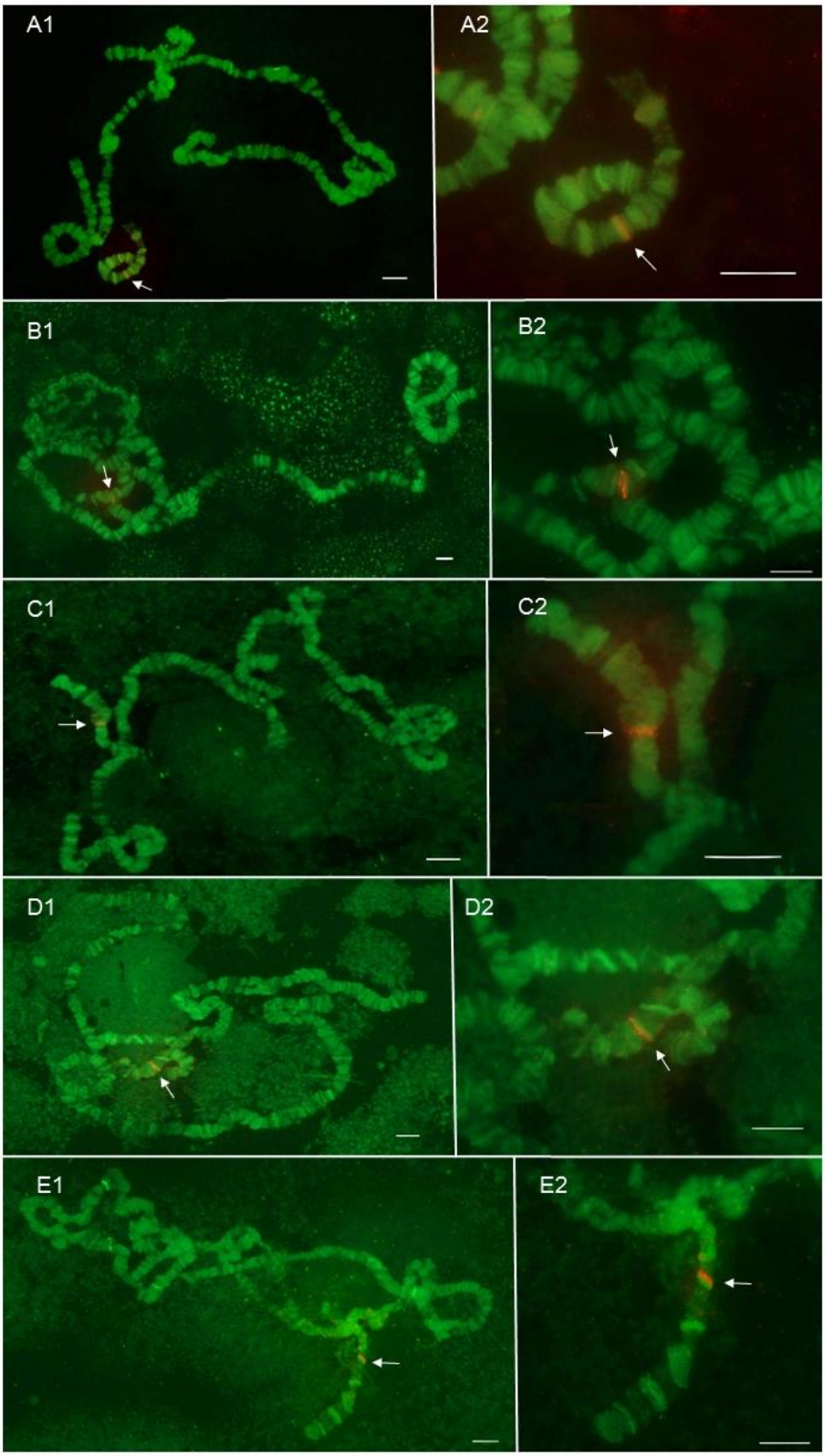

Figura 2. FISH de OBP no cromossomo X de *A. darlingi* de diferentes localidades. **A1** e **A2**: Manaus/AM na seção 4A; **B1** e **B2**: Macapá/AP na seção 4A; **C1** e **C2**: B Bugres/MT na seção 4A; **D1** e **D2**: SGC/AM na seção 3A; **E1** e **E2**: Coari/AM na seção 4A. Barra: 10 µm.

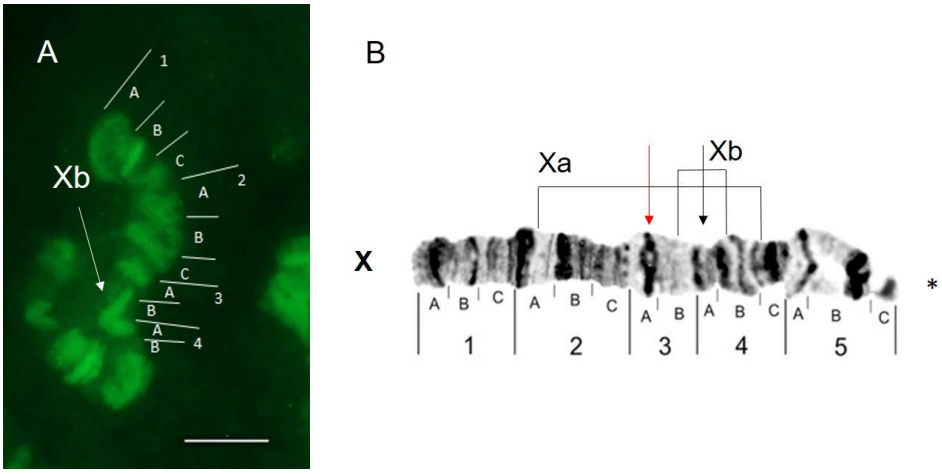

Figura 3. Nova inversão homozigota descrita (Xb) no cromossomo politênico X de *A. darlingi*, de SGC/AM. **A:** Inversão Xb envolvendo as seções 3B a 4B (seta). **B.** Fotomapa do cromossomo X, mostrando os dois sítios de hibridização do gene OBP, seção 3A (seta vermelha) de indivíduos de SGC/AM, e seção 4A de indivíduos de Manaus/AM (seta preta), Macapá/AP, B Bugres/MT e Coari/AM. Centrômero à direita (asterisco). Barra 10 µm.

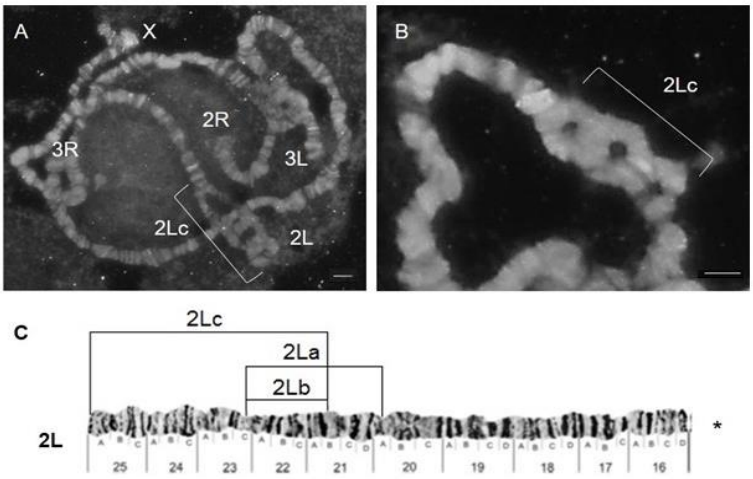

Figura 4. Nova inversão descrita no braço cromossômico 2L de *A. darlingi* de B Bugres/MT. **A e B:** Cromossomos 2L com a nova inversão 2Lc (colchetes). **C.** Fotomapa do cromossomo 2L, mostrando as regiões de inversões já descritas (Rafael et al. 2010). O centrômero encontra-se à direita (asterisco). Barra 10 µm.

4.3.5 Discussão

Estudos de citogenética, envolvendo inversões cromossômicas têm sido úteis ao entendimento de genética de populações e taxonomia de mosquitos vetores de malária (Coluzzi et al. 2002). Inversões têm sido repetidamente associadas à adaptação local em um grande número de animais; a plasticidade dos anofelinos, vetores de plasmódios da malária, pode refletir esse elevado grau de polimorfismo de inversões (Ayala et al. 2014).

O polimorfismo de inversões em uma espécie pode variar nas diferentes localidades ao longo de sua distribuição geográfica, como observado em *Anopheles nili* (Sharakova et al. 2011). *Anopheles gambiae* e *A. funestus* são mais polimórficos na Savana (África Ocidental) do que na floresta (África Central), sugerindo o ambiente como um papel relevante para inversões polimórficas na adaptação local (Sharakhova et al. 2011). A seleção favorece a fixação de inversão, podendo desempenhar um papel importante no isolamento reprodutivo, como registrado em *A. gambiae* e *A. arabiensis* (Slotman et al. 2004; Slotman et al. 2005).

O *A. gambiae* tem sido caracterizado por múltiplas inversões cromossômicas polimórficas, úteis no entendimento do isolamento reprodutivo das formas desse complexo, embora apresente estágios iniciais de especiação, dada a divergência de evolução face ao notável fluxo gênico (Lee et al. 2013). Os autores estudaram comparativamente o arranjo cromossômico normal (forma Savanna) e inversões homozigotas (forma Bamako), para identificar regiões de divergências genômicas relacionadas ao polimorfismo de inversões. Inesperadamente, detectaram metade de todas as regiões significativamente divergentes no cromossomo X, corroborando as inversões cromossômicas, que definiram as formas cromossômicas Bamako e Savanna por um local perto do centrômero do cromossomo X que, para os autores, esses genes que medeiam o isolamento reprodutivo são provavelmente localizados no cromossomo X. Em *A. darlingi,* no presente trabalho, foram encontradas duas novas inversões: uma no cromossomo X, denominada Xb, na população de SGC/AM e a outra inversão no cromossomo 2L (2Lc), na população de B. Bugres/MT. Este achado corrobora os resultados de Lee et al. (2013), de que o cromossomo sexual X pode carregar muitas características, que podem nortear a especiação entre *A. darlingi* de SGC/AM e B. Bugres/MT.

A alta densidade de inversões fixas e raras ocorrências de inversões polimórficas no cromossomo X têm caracterizado a evolução dos cromossomos dos mosquitos da malária (Neafsey et al. 2015). As inversões no cromossomo X de *Anopheles messeae* já foram associadas a diferentes características como diferentes localizações geográficas (Norte e Sul) (Perevozkin et al. 2012a); diferentes sinais acústicos dos machos (Perevozkin et al. 2012b) e associadas aos níveis de atividade enzimática (Perevozkin & Kurovsky, 2009).

O cromossomo X e os autossomos sofrem pressões evolutivas, que podem moldar o seu material genético (Blackmon & Demuth, 2015). O cromossomo X de *A. darlingi* não mostra homologia com outros importantes vetores neotropicais de malária como *Anopheles aquasalis*, *Anopheles albimanus* ou *Anopheles nuneztovari* (Kreutzer et al. 1972; Rafael et al. 2010), o que dificulta comparações de sintenia, homologia ou evolução cromossômica.

Paisagens neotropicais, também chamadas de barreiras são fatores primários na divergência em *A. darlingi* em escalas regionais e continentais, e as condições de distância geográfica e ambientais contribuem para o isolamento desse mosquito em uma escala local (Angêlla et al. 2014). Nihei & Carvalho (2007) defendem a hipótese de que a vasta região amazônica não é uma unidade biogeográfica, mas está dividida em porções sudeste e noroeste. Já Emerson et al. (2015) levantaram a hipótese de haver novas espécies para o complexo *A. darlingi* ao considerarem a associação de diferentes eco-regiões ao longo de sua distribuição.

Essas características podem explicar o surgimento de novas inversões cromossômicas em *A. darlingi*, já que SGC/AM é uma área de fronteira com a Colômbia e Venezuela (figura 1), situada no extremo noroeste do Brasil. Essa região apresenta condições e parâmetros ambientais diferentes das demais localidades de capturas de *A. darlingi* do presente estudo. Citam-se as diferenças na região de floresta e criadouros de anofelinos de SGC/AM, que por não ser objeto de nosso estudo não foram fundamentadas ou analisadas, para comparações.

Utilizando dados microssatélites, quatro grupos populacionais de *A. darlingi* foram detectados na Amazônia, sendo três na Amazônia brasileira (nordeste e sudeste da Amazônia, Amazônia central e ocidental) e uma incluíndo as subpopulações da Amazônia peruana, a formação desses grupos foi atribuída a um efeito de isolamento por distância (Mirabello et al. 2008). Os autores sugerem que as principais forças

responsáveis por dividir *A. darlingi* em grupos nessas regiões é resultado da distância geográfica e/ou diferentes histórias demográficas, ao invés de barreiras físicas (como montanhas ou rios).

Há uma outra hipótese discutida por alguns autores de que inversões fixas entre populações de anofelinos idênticos taxonomicamente, conduzem a identificação de complexos de espécies como foi observado em *Anopheles cruzii* (Ramírez & Dessen, 2000; Coluzzi et al., 2002). Ramírez & Dessen, 2000 descreveram uma nova sequência de bandas no cromossomo X, que definiu a forma C no complexo *A. cruzii*.

Outras diferenças, além de inversões foram encontradas em *A. darlingi* de diferentes localidades, como por exemplo, Rafael & Tadei (2000) encontraram variação intraespecífica em blocos heterocromáticos nos cromossomos sexuais em *A. darlingi* de Manaus e Macapá/AP. Variação intraindividual na distribuição de cópias de DNAr associadas com heterocromatina constitutiva nos cromossomos sexuais de *A. darlingi*, de Manaus, Macapá/AP e Novo Airão/AM (Rafael et al. 2003).

A hibridização *in situ* tem facilitado o mapeamento de genomas de forma comparativa, e tem sido uma ferramenta útil à taxonomia, sistemática, genômica evolutiva, genética de populações e ecologia (Sharakhova et al. 2010). Neste estudo, o mapeamento físico do gene OBP ocorreu no cromossomo X (região 4A) de *A. darlingi* de Coari, Manaus/AM, Macapá/AP e B Bugres/MT. A única exceção foi a marcação da sonda OBP no cromossomo X (região 3A), em uma nova inversão, para *A. darlingi* de SGC/AM.

Em base dos resultados obtidos neste trabalho e com dados da literatura, podemos sugerir a possibilidade de uma nova espécie para o complexo *A. darlingi* para a região de SGC/AM, entretanto, mais estudos, por exemplo, dados moleculares precisam ser levados em consideração para fundamentar tal afirmação.

Considerando os genes OBPs do genoma de *A. darlingi* foram encontrados 33 genes que codificam OBP, cujo número reduzido de genes sugere que eventos de duplicação não são tão frequentes nesta espécie (Marinotti et al. 2013), já que para *A. gambiae* foram identificadas 69 OBPs (Zhou et al. 2004; Vieira & Rozas 2011). Em *A. darlingi,* este baixo número pode estar associado a regiões do genoma desse mosquito ainda não anotadas.

O gene OBP de *A. darlingi* utilizado neste trabalho é homologo à OBP37 (AGAP000644) de *A. gambiae*, e as sequências de aminoácidos dessas duas espécies

são muito semelhantes com apenas três aminoácidos alterados (Marinotti et al. 2013). A OBP37 de *A. gambiae* pertence á subfamília Atípica (*Atypical*), a qual contém genes OBP específicos de mosquitos (Xu et al. 2003). Pouco se sabe a respeito da função da OBP37, apenas que seus transcritos foram encontrados nos ovários de *A. gambiae* (Amenya et al. 2010).

Em *A. darlingi,* os genes OBPs: AD02966 (OBP34), AD00512 (OBP37), AD01405 (OBP44) e AD01406 formam parte de um grupo de parálogos que em *A. gambiae* é composto por 16 genes (Marinotti et al. 2013).

A OBP37 de *A. gambiae* está localizada na região 1A do seu cromossomo X. Nesta região cromossômica há um *cluster* com outras cinco OBPs (Xu et al. 2003). Vários genes de OBP de *A. gambiae* já foram mapeados e estão distribuídos em todos os braços cromossômicos (Manoharan et al. 2013). Já a OBP de *A. darlingi* mapeou na região 4A, do cromossomo X, de *A. darlingi* de Coari/AM, Manaus/AM, Macapá/AP e B Bugres/MT. Sugerem-se que a sequência OBP de *A. darlingi* dessas localidades seja conservada, corroborando a hipótese de que a evolução nos cromossomos sexuais na subfamília *Anophelinae* é conservada (Rafael et al. 2005).

Logo, atribuímos o fato dos espécimes de SGC/AM não terem marcado no mesmo sítio de hibridização das demais localidades analisadas devido à presença de uma nova inversão no cromossomo X daquela localidade.

Considerando a nova inversão no autossomo 2 (braço esquerdo) de *A. darlingi,* denominada de inversão 2Lc, esta envolve desde a região telomérica até a região 21B, do braço 2L, sobrepondo um rearranjo alternativo chamado de 2L' recentemente descrito em um espécime de *A. darlingi,* de Porto Velho e 10 espécimes de Manaus (Cornel et al. 2016). Em *A. gambiae,* análises moleculares registraram DNA satélites e minissatélites nas regiões teloméricas do braço 2L (Biessmann et al. 1998), mas estudo com esse marcador em *A. darlingi* ainda não consta na literatura.

A hipótese sobre barreiras e distâncias geográficas, eco-regiões, podem explicar o aparecimento de novas inversões em populações tão distantes de *A. darlingi* (Estados do Amazonas e Mato Grosso). O Estado do Mato Grosso está nos limites da Amazônia Legal Brasileira, onde foi encontrada a inversão 2Lc. Esta região é conhecida, também, como "arco do desmatamento", onde a fronteira agrícola avança em direção à floresta e, também, onde se encontram os maiores índices de desmatamento da Amazônia. Esta região compreende o leste e sul do Pará, passando

pelos Estados do Mato Grosso, Rondônia e Acre (Lui & Molina 2009). Os indivíduos de *A. darlingi* nessa região podem estar sofrendo intensa pressão do ambiente, e isso pode estar contribuindo para o aparecimento de novas inversões, estando fortemente associadas a adaptações ambientais (Manoukis et al. 2008).

Considerando o genoma completo de *A. darlingi* (Marinotti et al. 2013), algumas lacunas durante a análise do sequenciamento não foram preenchidas devido, especialmente, ao alto grau de inversões característico de núcleos politênicos de *A. darlingi* da Amazônia Central, como previamente relatado por Rafael et al. (2004), cujas lacunas de anotação de sequências gênicas precisam ser preenchidas. Neste sentido, a importante função do gene OBP no sistema sensorial de anofelinos, mapeamos *in situ* a sonda OBP em núcleos politênicos desse mosquito, para auxiliar estudos sobre aspectos genômicos, variabilidade e evolução cromossômica, além da compreensão do recente *status* de complexo de espécies para *A. darlingi* proposto por Emerson et al. (2015).

4.3.6 Referências bibliográficas

Amenya, D.A., Chou, W., Li, J., Yan, G., Gershon, P.D., James, A.A., and Marinotti, O. 2010. Proteomics reveals novel components of the *Anopheles gambiae* eggshell. Journal of Insect Physiology, 56: 1414-1419. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.04.013.

Angêlla, A.F., Salgueiro, P., Gil, L.H.S., Vicente, J.L., Pinto, J., and Ribolla, P.E.M. 2014. Seasonal genetic partitioning in the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi*. Mal J, 13: 203. DOI: 10.1186/1475-2875-13-203.

Ayala, D., Ullastres, A., and Gonzalez, J. 2014. Adaptation through chromosomal inversions in *Anopheles*. Front Genet, 5: 129. doi: 10.3389/fgene.2014.00129.

Biessmann, H., Kobeski, F., Walter, M.F., Kasravi, A., Roth, C.W. 1998. DNA organization and length polymorphism at the 2L telomeric region of *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol, 7: 83-93.

Blackmon, H., and Demuth, J.P. 2015. Genomic origins of insect sex chromosomes. Current Opinion in Insect Science, 7: 45-50. http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2014.12.003.

Coluzzi, M., Sabatini, A., della Torre, A., Di Deco, M.A., and Petrarca, V. 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex, Science, 298(5597):1415-1418.

Consoli, R.A.G.B., and Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Cornel, A.J., Brisco, K.K., Tadei, W.P., Secundino, N.F.C., Rafael, M.S., Galardo, A.K.R., Medeiros, J.F., Pessoa, F.C.A., Ríos-Velásquez, C.M., Lee, Y., Pimenta, P.F.P., and Lanzaro, G.C. 2016. *Anopheles darlingi* polytene chromosomes:

revised maps including newly described inversions and evidence for population structure in Manaus. Mem Inst Oswaldo Cruz, 111(5): 335-346.

Emerson, K.J., Conn, J.E., Bergo, E.S., Randel, M.A., and Sallum, M.A.M. 2015. Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) Clusters by Major Biogeographical Region. PLoS ONE, 10(7): e0130773. doi:10.1371/journal.pone.0130773.

Forattini, O.P. 1962. Entomologia médica. Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo.

Forattini, O.P. 1987. Compartemento exofilo de *Anopheles darlingi* Root, em região meridional do Brasil. Exophilic. Rev Saúde Publ, 21: 291-304.

French, W.L., Baker, R.H., and Kitzmiller, J.B. 1962. Preparation of mosquito chromosomes. Mosq News, 22: 377-383.

Hallem, E.A., Dahanukar, A., Carlson, J.R. 2006. Insect odor and taste receptors. Annu Rev Entomol, 51: 113–135.

Hoffmann, A.A., Sgro, C.M., and Weeks, A.R. 2004. Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. Trends Ecol Evol, 19: 482-488.

Kreutzer, R.D., Kitzmiller, J.B., and Ferreira, E. 1972. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. Mosq News, 32: 555-565.

Kumar, V., and 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.

Lee, Y., Collier, T.C., Sanford, M.R., Marsden, C.D., Fofana, A. et al. 2013 Chromosome inversions, genomic differentiation and speciation in the African malaria Mmsquito *Anopheles gambiae*. PLoS ONE 8(3): e57887. doi:10.1371/journal.pone.0057887

Li, S., Picimbon, JF., Ji, S., Kan, Y., Chuanling, Q., Zhou, JJ., and Pelosi, P. 2008. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 372, 464-468. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.064.

Lounibos, L.P., and Conn, J.E. 2000. Malaria vector heterogeneity in South America. American Entomologist, 46: 238-249.

Lui, G.H., and Molina, S.M.G. 2009. Ocupação humana e transformação das paisagens na Amazônia brasileira. Amazônica - Revista de Antropologia, 1(1).

Manoharan, M., Chong, M.N.F., Vaïtinadapoulé, A., Frumence, E., Sowdhamini, R., and Offmann, B. 2013. Comparative Genomics of Odorant Binding Proteins in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. Genome Biol. Evol, 163-180. doi:10.1093/gbe/evs131.

Manoukis, N.C., Powell, J.R., Touré, M.B., Sacko, A., Edillo, F.E., Coulibaly, M.B., Traoré, S.F., Taylor, C.E., and Besansky, N.J. 2008. A test of the chromosomal theory of ecotypic speciation in *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci USA, 105: 2940-2945.

Marinotti, O., Cerqueira, G.C., de Almeida, L.G.P., Ferro, M.I.T., Loreto, E.L.S., Zaha, A. et al. 2013. The genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. Nucleic Acids Res, 41(15): 7387-7400.

Mirabello, L., Vineis, J.H., Yanoviak, S.P., Scarpassa, V.M., Póvoa, M.M., Padilla, N., Achee, N.L., and Conn, J.E. 2008. Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. BMC Ecology, 8:3. doi:10.1186/1472-6785-8-3.

Neafsey, D.E., Waterhouse, R.M., Abai, M.R., Aganezov, S.S., Alekseyev, M.A., Allen, J.E., Amon, J., Arcà, B. et al. 2015. Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. Science. doi:10.1126/Science.1258522

Nihei, S.S., and De Carvalho, C.J.B. 2007. Systematics and biogeography of Polietina Schnabl & Dziedzicki (Diptera, Muscidae): Neotropical area relationships and Amazonia as a composite area. Syst Entomol, 32(3): 477-501.

Perevozkin, V.P., and Kurovsky, A.V. 2009. Genetic determination of succinate dehydrogenase activity in *Anopheles messeae* (Diptera, Culicidae) larvae. Russ. J. Genet, 45: 1162-1165. doi:10.1134/S1022795409100020.

Perevozkin, V.P., Gordeev, M.I., Moskaev, A.V., Ahmetova, N.M., and Bondarchuk, S.S. 2012a. Inversion polymorphism and ecological specialization of malaria mosquitoes (Diptera, Culicidae) in Karelia. Russ. J. Genet, 48: 679-683. doi:10.1134/S1022795412060105.

Perevozkin, V.P., Printseva, A.A., Maslennikov, P.V., and Bondarchuk, S.S. 2012b. Genetic aspects of sexual behavior in malaria mosquitoes on the basis of specific acoustic signals at mating. Russ. J. Genet. 48: 587-591. doi: 10.1134/S1022795412060099.

Rachou, R.G. 1958. Anofelinos do Brasil. Comportamento das espécies vetoras de malária. Rev Bras Malariol Doenças Trop, 10: 145-181.

Rafael, M.S., and Tadei, W.P. 1998. Metaphase karyotypes of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root and *A. (N.) nuneztovari* Gabaldón (Diptera; Culicidae). Genet. Mol. Biol, 21(3): 351-354.

Rafael, M.S., and Tadei, W.P. 2000. Heterochromatin variation in chromosomes of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root and *A.* (*N.*) *nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae). Genet. Mol. Biol, 23: 67-70.

Rafael, M.S., and W.P. Tadei. 2003. Location of ribosomal genes in the chromosomes of *Anopheles darlingi* and *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) from the Brazilian Amazon. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98(5): 629-635.

Rafael, M.S., Tadei, W.P., and 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., Santos-Junior, I.P., Tadei, W.P., Sallum, M.A.M., and Forattini, O.P. 2005. Karyotype of brazilian *Anopheles albitarsis sensu lato* (Diptera:Culicidae). Genetics and Molecular Research, 4(4): 684-690.

Rafael, M.S.; Rohde, C.; Bridi, L.C.; Gaiesky V.L.S.V.; and Tadei, W.P. 2010. Salivary polytene chromosome map of *Anopheles darlingi*, the main vector of neotropical malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg, 83(2): 241-249.

Ramírez, C.C., and Dessen, E.M. 2000. Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles cruzii.* Genome, 43: 143-151. doi: 10.1139/g99-103.

Schreiber, G., and Guedes, A.S. 1959. Estudo comparativo do cromosoma X em algumas espécies de *Anopheles* do sub-gen. *Nyssorhynchus* (Dipt. Culic.). *Ciên. Cult*, 11: 128-129.

Schreiber, G., and Guedes, A.S. 1960. Perspectivas citológicas na sistemática dos anofelinos (S.G *Nyssorhynchus*). *Rev. Brás. Mal. D. Trop*, 12: 355-358.

Sharakhova, M.V., Xia, A., Tu, Z., Shouche, Y.S., Unger, M.F., and Sharakhov, I.V. 2010. A physical map for an Asian malaria mosquito, *Anopheles stephensi.* Am. J. Trop. Med. Hyg, 83(5): 1023-1027. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0366.

Sharakhova, M.V., Antonio-Nkondjio, C., Xia, A., Ndo, C., Awono-Ambene, P., et al. 2011. Cytogenetic map for *Anopheles nili*: Application for population genetics and comparative physical mapping. Infect Genet Evol, 11: 746-754.

Sinka, M.E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Van Boeckel, T., Kabaria, C.W., Harbach, R.E., and Hay, S.I. 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasites & Vectors, 3: 72.

Slotman, M., Della Torre, A., and Powell, J.R., 2004. The genetics of inviability and male sterility in hybrids between *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, Genetics, 167(1): 275-287.

Slotman, M., Della Torre, A., and Powell, J.R. 2005. Female sterility in hybrids between *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*, and the causes of Haldane's rule. Evolution, 59(5): 1016-1026.

Tadei, W.P., and Santos, J.M. 1982. Biologia de anofelinos amazônicos. VII. Estudo da variação de freqüências das inversões cromossômicas de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). Acta Amazon, 12: 759-785.

Tadei, W.P., Thatcher, B.D., Santos, J.M., Scarpassa, V.M., Rodrigues, I.B., and Rafael, M.S. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg, 59: 325-335.

Vieira, F.G., and Rozas, J. 2011. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the Arthropoda: origin and evolutionary history of the chemosensory system. Genome Biol. Evol, 3: 476-490.

Xu, P.X., Zwiebel, L.J., and Smith, D.P. 2003. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology, 12(6): 549-560.

Zhou, J.J., Huang, W., Zhang, G.A., Pickett, J.A., and Field, L.M. 2004. "Plus-C" odorant-binding protein genes in two *Drosophila* species and the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Gene, 327: 117-129.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os genes de resposta imune de *A. darlingi* mapeados *in situ* em regiões de inversões de seus núcleos politênicos, mostraram-se como bons marcadores citogenéticos, já que sendo oriundo de criadouros naturais devem possuir alguma vantagem adaptativa a esses ambientes.

As relações evolutivas dos genes defensina de resposta imune de *A. darlingi* e *A. albimanus,* da América do Sul, com distribuições geográficas sobrepostas, foram estreitamente próximas.

O gene sensorial olfativo OBP de *A. darlingi*, embora tenha hibridizado em apenas um sítio diferente (população de SGC/AM), mostrou-se conservado nos indivíduos das populações das outras quatro localidades estudadas.

A nova inversão homozigota descrita no cromossomo X, população de *A. darlingi* de uma única localidade (SGC/AM), pode ser devido a fatores ambientais ou mesmo barreiras geográficas, servindo de bloqueios para o fluxo gênico entre esses indivíduos com *A. darlingi* de outras localidades, o que pode influenciar no surgimento de nova espécie.

6. PERSPECTIVAS

Avanços significativos foram alcançados no entendimento do mapeamento gênico nos cromossomos politênicos de *A. darlingi*, entretanto, alguns aspectos importantes ainda precisam ser investigados, como:

- Como as inversões cromossômicas estão associadas a adaptações ambientais em *A. darlingi*?
- Qual é a vantagem evolutiva de genes de resposta imune estar em regiões de inversão?
- Há outra espécie para o complexo *A. darlingi* no extremo noroeste do país?

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Arensburger, P.; Megy, K.; Waterhouse, R.M.; Abrudan, J.; Amedeo, P.; Antelo, B.; Bartholomay, L.; *et al*. 2010. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science*, 330: 86-8.

Beaty, B.J.; Prager, D.J.; James, A.A.; Jacobs-Lorena, M.; Miller, L.H.; Law, J.H.; Collins, F.H.; Kafatos, F.C. 2009. From Tucson to genomics and transgenics: The Vector Biology Network and the emergence of modern vector biology. *PLoS Negl. Trop. Dis*, 3:e343.

Bridi, L.C.; Sharakhova, M.V.; Sharakhov, I.V.; Cordeiro, J.; Azevedo Júnior, G.M.; Tadei, W.P.; Rafael, M.S. 2013. Chromosomal localization of actin genes in the malária mosquito *Anopheles darlingi. Medical and Veterinary Entomology*, 27: 118-121.

Bridi, L.C.; Rafael, M.S. 2016. GNBP domain of *Anopheles darlingi*: are polymorphic inversions and gene variation related to adaptive evolution? *Genetica*, DOI 10.1007/s10709-016-9881-6

Coluzzi, M.; Sabatini, A.; della Torre, A.; Di Deco, M.A.; Petrarca, V. 2002. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science,* 298, 1415. DOI: 10.1126/science.1077769

Consoli, R.A.G.B.; Lourenço de Oliveira, R. 1994. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro – Fiocruz, 228p.

Cornel, A.J.; Brisco, K.K.; Tadei, W.P.; Secundino, N.F.C.; Rafael, M.S.; Galardo, A.K.R.; Medeiros, J.F.; Pessoa, F.C.A.; Ríos-Velásquez, C.M.; Lee, Y.; Pimenta, P.F.P.; Lanzaro, G.C. 2016. *Anopheles darlingi* polytene chromosomes: revised maps including newly described inversions and evidence for population structure in Manaus. Mem Inst Oswaldo Cruz, 111(5): 335-346.

Forattini, O.P. 1962. Entomologia médica. Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo.

Guedes, A.S.; Amorim, E.M.; Schreiber, G. 1957. Análise dos cromossomos salivares em anofelinos brasileiros. *Ver. Bras. Malar. D. Trop.,* 9: 247-250.

Guerra, M. 2004. FISH. *Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 184p.

Holt, R.A.; Subramanian, G.M.; Halpern, A.; Sutton, G.G.; Charlab, R.; Nusskern, D.R.; Wincker, P.; *et al*. 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science, 298: 129-149.

Irving, P.; Troxler, L.; Heuer, T.S.; Belvin, M.; Kopczynski, C.; Reichhart, J.M.; Hoffmann, J.A.; Hetru, C. 2001. A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 98: 15119–15124.

Kreutzer, R.D.; Kitzmiller, J.B.; Ferreira, E. 1972. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles dalingi* Root. *Mosq. News*, 32: 555-556.

Lara, F.J.S. 2002. *Hibridização de Ácidos Nucléicos*. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética. 127p.

Lee, J.M.; Sonnhammer, E.L. 2003. Genomic gene clustering analysis of pathways in eukaryotes. *Genome Res*., 13: 875-882.

Malone, G.; Zimmer, P.D.; Meneghello, G.E.; Binneck, E.; Peske, S.T. 2006. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. *R. Bras. Agrociência*. Pelotas, 12: 07-13.

Marinotti, O.; Cerqueira, G.C.; de Almeida, L.G.P.; Ferro, M.I.T.; Loreto, E.L.S.; Zaha, A.; *et al*. 2013. The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. *Nucleic Acids Res.,* 41: 7387-7400.

Marrelli, M.T.; Malafronte, R.S.; Flores-Mendoza, C.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Kloetzel, J.K.; Marinotti, O. 1999. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). *J. Med.Entomol*., 36: 679-684.

Matthews, T.C.; Munstermann, L.E.; 1994. Chromosomal repatterning and linkage group conservation in mosquito karyotypic evolution. *Evolution,* 48: 146-154. doi: 10.2307/2410010.

Nene, V.; Wortman, J.R.; Lawson, D.; Haas, B.; Kodira, C.; Tu, Z.J.; Loftus, B.; Xi, Z.; *et al*. 2007. Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. *Science*, 316: 1718-1723.

Osta, M.A.; Christophides, G.K.; Vlachou, D.; Kafatos, F.C. 2004. Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J. Exp. Biol.,* 207: 2551-2563

Passarge, E., Horsthemke, B., Farber, R.A.1999. Incorrect use of term synteny. *Nature genetics*, 23: 387.

Rachou, R.G. 1958. Anofelinos do Brasil. Comportamento das espécies vetoras de malária. *Rev Bras Malariol Doenças Trop.* 10: 145-181.

Rafael, M.S.; Tadei, W.P. 1998. Metaphase karyotipes of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root and *A*. (*N*) *nuneztovari* Galbadón (Diptera: Culicidae). *Genetics and Biology*, 21: 351- 354.

Rafael, M.S.; Tadei, W.P.; Recco-Pimentel, S. 2003. Location of ribosomal genes in the chromosome of *Anopheles darlingi* and *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) from the Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 98: 629-635.

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.; Rohde, C.; Bridi, L.C.; Gaiesky 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: 241-249.

Ramírez, C.C.L.; Dessen, E.M.B. 1994. Cytogenetic analysis of a natural population of *Anopheles cruzii*. *Rev. Brasi. Genet.*, 17: 41-46.

Ramírez, C.C.L.; Dessen, E.M.B. 1996. The polytene chromosomes of the mosquito *Anopheles bellator* compared with those of *Anopheles cruzii*. *Rev. Bras. Genet*., 19: 555-558.

Reed, J.L.; Palsson, B.O. 2003. Thirteen years of building constraint-based *in silico* models of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185: 2692-2699.

Rúbio-Palis, Y.; Zimmermann, R.H. 1997. Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *J. Med. Vet. Entomol*., 6: 325-334.

Sachs, J., Malaney, P. 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature*, 415: 680-685.

Schreiber, G.; Guedes, A.S. 1960. Perspectivas citológicas na sistemática dos anofelinos (S.G *Nyssorhynchus*). *Rev. Bras. Mal. D. Trop*., 12: 355-358.

Schreiber, G.; Guedes, A.S. 1961. Cytological aspects of the taxonomy of anophelinos (subgenus *Nyssorhynchus*). Bull. WLD. Hlth. Org., 24: 657-658.

Sharakhov, I.V.; Serazin, A.C.; Grushko, O.G.; Dana, A.; Lobo, N.; Hillenmyer, M.E.; *et al.* 2002. Inversions and gene order shuffling in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. Science, 298:182-185.

Sinka, M.E.; Rubio-Palis, Y.; Manguin, S.; Patil, A.P.; Temperley, W.H.; Gething, P.W.; Van Boeckel, T.; Kabaria, C.W.; Harbach, R.E.; Hay, S.I. 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasites & Vectors. 3: 72.

SIVEP-Malária 2016. Acesso em 06/09/2016.

http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio /662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11346-situacao-epidemiologica - dados.

Tadei W.P.; Santos J.M.M. 1982. Biologia de anofelinos amazônicos VII. Estudo da variação de frequências das inversões cromossômicas de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). Acta Amazônica 12(4):759–785

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.

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

Takken, W.; Knols, B.G. 1999. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.,* 44: 131-157.

Tauil, P. L. 2011. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 106 (Suppl. I): 105-106.

White, GB. 1973. Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Dipt., Culicidae). III. The distribution, ecology, behaviour and vectorial importance of species D in Bwamba County, Uganda, with an analysis of biological, ecological, morphological and cytogenetical relationships of Ugandan species D. *Bull. ent. Res*. 63: 65-97.

Zwiebel, L.J.; Takken, W. 2004. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. *Insect Biochem Mol Biol,* 34: 645-652.