MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
Programas de Pós-Graduação
Programa de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva/INPA

MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES EXPRESSOS DE *Anopheles darlingi* ROOT, 1926 E SUA ANÁLISE *in silico* EM *Anopheles gambiae* GILES, 1902 (DIPTERA: CULICIDAE)

LETÍCIA CEGATTI BRIDI

Manaus - Amazonas
Setembro, 2009

LETÍCIA CEGATTI BRIDI

MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES EXPRESSOS DE *Anopheles darlingi* ROOT 1926 E SUA ANÁLISE *in silico* EM *Anopheles gambiae* GILES 1902 (DIPTERA: CULICIDAE)

MÍRIAM SILVA RAFAEL
Orientadora

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva/INPA como parte dos requisitos para obtenção do titulo de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS na área de concentração Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus - Amazonas
Setembro, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

B852 Bridi, Letícia Cegatti
Mapeamento físico de genes expressos de *Anopheles darlingi* Root, 1926 e sua análise *in silico* em *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (Díptera: Culicidae) / Letícia Cegatti Bridi .--- Manaus : [s.n.], 2009.
xi, 87 f. : il.

Dissertação (mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2009
Orientador : Míriam Silva Rafael
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. *Anopheles darlingi*. 2. Mapeamento físico. 3. Hibridização *in silico*
I. Título.

CDD 19. ed. 595.770415

Sinopse:

Estudaram-se o mapeamento de genes expressos de *Anopheles darlingi in silico*, nos cromossomos de *Anopheles gambiae* e o mapeamento *in situ* dos genes Lisozima, Troponina, Actina e Glutationa Transferase nos cromossomos politênicos de *Anopheles darlingi*.

Palavras-chave:
Anopheles darlingi, Anopheles gambiae, ESTs, hibridização *in situ,* ISH, Mapeamento *in silico.*

Dedico este trabalho,

A Deus

Aos meus pais, Osvaldo e Maristela

Ao Mário

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças para 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 Mário por me motivar nos momentos insolúveis e pelo amor e companheirismo dispensados.

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

À Dra. Míriam Silva Rafael pela orientação recebida e amizade dispensada, pela confiança depositada e por tornar possível a realização deste estudo.

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEV/INPA), pela oportunidade de um aprendizado de excelente qualidade de ensino.

Ao Programa de Cooperação Acadêmica-PROCAD/Amazônia/CAPES, que tornou possível a realização de missão de estudo em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; projeto CT – Amazônia/CNPq, pelo financiamento do trabalho.

À Dra. Vera Valente e doutoranda Juliana Cordeiro da UFRGS/Porto Alegre, pelo apoio cedido nas atividades práticas de hibridização *in situ* e pela disponibilidade do laboratório e equipamentos.

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

Ao Dr. Spartaco Astolfi Filho e Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva que muito contribuíram para a construção das bibliotecas de ESTs de larvas e adultos de *A. darlingi* no Laboratório de DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar-CAM/UFAM.

À Dra Ana Teresa Ribeiro de Vasconcelos do Laboratório Nacional de Computação Científica-LNCC e 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* no site do LNCC e CENARGEN

À CAPES pela bolsa de estudo concedida, tornando possível a realização do curso de Mestrado.

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

Aos colegas de turma Izaura, Marcos, Leandra e Adam que, de alguma forma, participaram de todos os momentos vividos durante o mestrado.

À Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde – (CPCS/INPA) pela atenção deliberada durante a realização das atividades no Laboratório de Malária e Dengue.

À Alessandra por toda ajuda concedida na secretaria do GCBEv.

Ao Mauro de Freitas Ortiz pelo auxilio na hibridização *in silico*, pela ajuda nas discussões do trabalho e pela amizade.

À Cristina Amorin pela valiosa e solidária ajuda na edição das fotos dos cromossomos e pela amizade tão sincera.

À Giselle Moura e Gilson Azevedo pelo auxílio com o crescimento dos clones para obtenção das sondas e por serem pessoas mais que especiais que encontrei em Manaus.

A todos os técnicos do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue: 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 Bastos, Henrique e Elias nas coletas de campo, e em especial ao Gláubio pela sua incansável ajuda e ensinamentos com os cuidados do insetário e alimentação dos mosquitos.

À Adelina e Zilá que representaram minha segunda família em Manaus, sempre me dando “colo” nos momentos de desânimo.

Aos colegas do laboratório Mellina, Ketlen, Gilson, Geysa, Lidiane, Paulinha, Graciela, Fábio e André, e aos alunos recém chegados Sunnaya e Gyselle pelo companheirismo, e compartilhamento de sofrimentos, alegrias e risos.

Às grandes amigas Suzana, Elizabete e Cássia que me ajudaram a superar a saudade da família, e todas as outras dificuldades que passei por estar tão distante da família.

Aos companheiros de república Daniel, Adriana, Ricardo e “Gordo” pelo companheirismo e alegrias vividas em Manaus.

RESUMO

Na região Amazônica brasileira ocorrem cerca de 99,7% dos casos de malária do Brasil, onde o principal vetor é o *Anopheles darlingi*. Em 2007, na região da Amazônia Legal, foram relatados aproximadamente 185 mil casos da doença. Há a necessidade de estudos para o entendimento do genoma funcional do *A. darlingi*, considerando a pouca quantidade de sequências de genes expressos disponíveis em bancos genômicos públicos na Internet. As Etiquetas de Sequências Expressas (*Expressed Sequence Tags-EST*) de *A. darlingi*, obtidas por meio de construções de bibliotecas de cDNA foram mapeadas por hibridização *in silico* em cromossomos de *Anopheles gambiae*, a fim de comparar virtualmente suas localizações cromossômicas. A hibridização *in silico* foi realizada a partir do *downloading* de *clusters* e *singlets* de bibliotecas de cDNA de *A. darlingi*, depositadas no banco de dados do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), para um ambiente virtual com parâmetros pré definidos. As sequências gênicas de *A. darlingi* e *A. gambiae* foram submetidas ao programa *Basic Local Alignment Search Tool* (*BLAST)* a fim de reconhecer regiões com similaridade entre essas espécies. Os dados foram submetidos ao programa "*ARTEMIS*", para visualização das regiões hibridizadas. Os *clusters* e *singlets* foram hibridizados nos 3 cromossomos de *A. gambiae*. No cromossomo X, foram hibridizados 13 *clusters.* No cromossomo 2, braço 2R, 64 *clusters*; no braço 2L, foram hibridizados 40 *clusters*. No cromossomo 3, no braço 3R, foram hibridizados 45 *clusters*, e no braço 3L, 34 *clusters*. As sequências homólogas encontradas foram agrupadas por categoria geral de função do *COG*, dentre as quais, a categoria geral "Armazenagem e Processamento de Informações" foi a mais frequente, com maior número de sequências (36%). Entre os *contigs* e *singlets* hibridizados, detectou-se *reads* tais como genes de Actina, genes ribossomais e sequências gênicas desconhecidas e/ou hipotéticas. Além destes genes expressos, detectou-se similaridade das ESTs de *A. darlingi* com sequências de outros organismos: *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster* e *Culex spp.* Tais resultados auxiliarão estudos futuros no conhecimento da sintenia dos genes em termos evolutivos além de poder auxiliar no controle da malária de forma a localizar genes de resistência a inseticidas nos vetores. Foi aplicada também, a metodologia de hibridização *in situ* nos cromossomos politênicos de *A. darlingi*, cuja marcação dos cDNAs foram feitas por *Nick translation* (Invitrogen®). Os cromossomos, contendo os sinais das sondas foram corados com DAB (*diaminobenzidine tetrahydrochloride* - Sigma, Cat. No. D-5637). As microfotografias foram obtidas em microscópio de luz Axioplan Zeizz epifluorescente, com campo claro e contraste de fase. As sondas que demonstraram sinais de hibridização foram as seguintes: Lisozima, cuja hibridização ocorreu no braço cromossômico 2R, seções 8C e 8D; Troponina, cuja marcação localizou-se no braço 2R, seção 14B; Actina, cuja hibridização localizou-se no braço 2L, seção 23 e a Glutationa Transferase que hibridizou no braço 2L, seção 16C. O presente mapeamento cromossômico físico, utilizando sondas de ESTs, de *A. darlingi* representa uma oportunidade única para compreender a estrutura e organização do seu genoma bem como a diversificação evolutiva e variabilidade cromossômica desse importante vetor da malária no Brasil. Considerando a grande capacidade de transmissão da malária e resistência a inseticidas sintéticos por *A. darlingi*, o mapeamento *in situ* de ESTs em seus cromossomos politênicos poderá auxiliar em ações futuras para uma estratégia racional e seletiva de controle de *A. darlingi* vetor da malária, especialmente na Amazônia.

ABSTRACT

In the Brazilian Amazon region there are approximately 99.7% of malaria cases in Brazil, where the main vector is *Anopheles darlingi*. In 2007, the Legal Amazon region, was reported about 185 thousand cases of the disease. There is a need for studies to the understanding of the functional genome of *A. darlingi*, considering the low amount of expressed gene sequences available in public genomic databases on the Internet. The Expressed Sequence Tags (Expressed Sequence Tags-EST) *A. darlingi*, obtained by construction of cDNA libraries were mapped by *in silico* hybridization in chromosomes of *Anopheles gambiae*, to compare virtually their chromosomal locations. Hybridization was performed *in silico* from the downloading of clusters and singlets from cDNA libraries of *A. darlingi*, deposited in the database of the Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), to a virtual environment with pre-defined parameters. The gene sequences of *A. darlingi* and *A. gambiae* were submitted to the program Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to recognize regions with similarity between these species. The data were submitted to the "ARTEMIS", to visualize the hybridized regions. The clusters and singlets were hybridized to chromosomes 3 of *A. gambiae*. In the X chromosome, were hybridized 13 clusters. Chromosome 2, arm 2R, 64 clusters; arm 2L, were hybridized 40 clusters. Chromosome 3, the arm 3R, were hybridized 45 clusters, and the arm 3L, 34 clusters. The homologous sequences were grouped by general category of function of the COG, among which, the general category of "Storage and Processing of Information" was the most frequent, with the largest number of sequences (36%). Among the contigs and singlets hybridized, detected reads like actin genes, ribosomal genes and gene sequences unknown and / or hypothetical. In addition to these genes expressed, detected similarity of the ESTs of *A. darlingi* with sequences of other organisms: *Aedes aegypti, Drosophila melanogaster* and *Culex* spp. These results will help future studies on the knowledge of synteny of genes in evolutionary terms and they could help control malaria in order to locate genes for resistance to insecticides in vectors. It also applied the methodology of *in situ* hybridization in polytene chromosomes of *A. darlingi*, the marking of cDNAs were made by Nick translation (Invitrogen ®). The chromosomes containing the signals of the probes were stained with DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride - Sigma, Cat No. D-5637). Photomicrographs were obtained under a light microscope Axioplan epifluorescent Zeizz with brightfield and phase contrast. The probes that showed signs of hybridization were as follows: Lysozyme, which hybridization occurred in the chromosome arm 2R, sections 8C and 8D; Troponin whose labeling was located in the arm 2R, section 14B, Actin, the hybridization was located in the 2L arm , section 23 and Glutathione Transferase that hybridized arm 2L, section 16C. This physical mapping of chromosomes, using probes ESTs, *A. darlingi* represents a unique opportunity to understand the structure and organization of its genome and the evolutionary diversification and chromosomal variability of this important vector of malaria in Brazil. Considering the great capacity of malaria transmission and resistance to synthetic insecticides on *A. darlingi*, the *in situ* mapping of ESTs in their polytene chromosomes may help in future actions for a rational and selective control of *A. darlingi* vector of malaria, especially in the Amazon.

SUMÁRIO

Páginas

1. INTRODUÇÃO GERAL…….. 1

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

1.2 Distribuição geográfica e aspectos biológicos *A. darlingi*..... 2

CAPÍTULO I: Hibridização *in silico* de genes expressos de *Anopheles darlingi* em cromossomos de *Anopheles gambiae*.... 4

1. INTRODUÇÃO..... 4

2. OBJETIVOS..... 10

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 11

3.1 Hibridização *in silico*..... 11

4. RESULTADOS..... 12

5. DISCUSSÃO..... 17

6. CONCLUSÃO..... 23

CAPÍTULO II: Mapeamento físico de genes expressos em cromossomos politênicos de *Anopheles darlingi*..... 24

1. INTRODUÇÃO..... 24

2. OBJETIVOS..... 32

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 33

3.1 Área de estudo..... 33

3.2 Desenvolvimento de *A. darlingi*..... 33

3.3 Obtenção dos cromossomos politênicos..... 34

3.4 Hibridização *in situ* (ISH)..... 34

3.4.1 preparo de sonda..... 34

3.4.1.1 Crescimento das Colônias de *Escherichia coli* e extração do cDNA plasmidial..... 35

3.4.1.2 Marcação do DNA por *Nick translation* (Invitrogen cat. nº 18160-010)..... 35

3.4.1.3 Purificação e precipitação da sonda..... 35
3.4.2 Pré-tratamento das lâminas e desnaturação da sonda..... 36
3.4.3 Hibridização *in situ* e detecção dos sinais..... 36
3.5 Microfotografias..... 37
4. RESULTADOS..... 38
5. DISCUSSÃO..... 43
6. CONCLUSÕES..... 50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 51
ANEXO 1..... 74
Tabela 2: Produtos gênicos de *Anopheles darlingi* que apresentaram similaridade ao serem hibridizados *in silico* no genoma de *Anopheles gambiae* (totalizaram 178). E-value = Índice estatístico de valor esperado, *COG = Clusters of Ortologous Groups.*..... 74
Tabela 3: Produtos gênicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no cromossomo 2, braço 2L de *A. gambiae*..... 82
Tabela 4: Produtos gênicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no cromossomo 2, braço 2R de *A. gambiae.*..... 83
Tabela 5: Produtos gênicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no cromossomo 3, braço 3L de *A. gambiae*..... 85
Tabela 6: Produtos genicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no comossomo 3, braço 3R de *A. gambiae*..... 85
Tabela 7: Produtos gênicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no cromossomo X de *A. gambiae*..... 86

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Anopheles darlingi* e a malária

O *Anopheles darlingi* Root, 1926 é o principal vetor da malária no Brasil, especialmente na região amazônica, onde ocorrem a maioria dos casos da doença (Tadei *et al.,* 1998). Esse mosquito foi encontrado infectado por três plasmódios que causam a malária humana nas Américas – *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (Rachou 1958; Consoli & Oliveira, 1994).

Também conhecida como paludismo, febre palustre, impaludismo, maleita ou sezão, a malária foi primeiramente citada na era pré-Cristã, por Hipócrates. Em 1880, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran, observou organismos em movimento quando analisou uma lâmina de sangue fresco de um paciente com malária (revisado por Neves, 2005). A partir desse momento, detalhes sobre a doença e o parasita foram sendo descobertos por outros pesquisadores em experimentos sucessivos.

Estima-se que a malária cause a morte de mais de um milhão de pessoas por ano no mundo, sendo afetadas, principalmente, crianças menores de cinco anos. Cerca de 40% da população mundial vive em zonas de risco de malária, mas a maior incidência dos casos (90%) ocorre na África sub-Sahariana, que abrange os países de população negra situados ao sul do deserto do Saara (Portal da Saúde, 2007). No Brasil, as espécies envolvidas com a transmissão da malária pertencem ao gênero *Anopheles,* subgêneros *Nyssorhynchus* (*A. darlingi, Anopheles aquasalis, Anopheles nuneztovari, Anopheles oswaldoi, Anopheles triannulatus* e complexo *Anopheles albitarsis)* (Marrelli *et al.,* 1999; Tadei & Dutary-Tatcher, 2000) e *Kerstezia (Anopheles cruzii* e *Anopheles bellator)* (Ramirez & Dassen, 1994, 1996). O *A. cruzii* é o principal vetor no sudeste do país (Arruda *et al*., 1986).

A malária no Brasil, antes da década de 40, cobria grande parte do território nacional e apresentava um verdadeiro desafio à colonização da Amazônia. Na primeira metade do século 20, a malária provocou um episódio de grandes dimensões, ocorrendo durante a construção da ferrovia Madeira-Mamoré (localizada no estado de Rondônia). Calcula-se que a doença tenha provocado mais de 10 mil mortes entre os trabalhadores durante a construção e abertura da ferrovia (Silva & Oliveira, 2002). Altos índices da doença também foram registrados em várias áreas

litorâneas do sudeste e de áreas da bacia dos rios Paraná-Prata, São Francisco e Doce, no Planalto Central (revisão, Silva & Oliveira, 2002.). A partir de 1950, o Serviço Nacional de Malária lançou a estratégia de "erradicação", parte da campanha internacional sob o amparo da Organização Mundial de Saúde. Essa campanha baseou-se no uso de inseticidas tais como o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) e drogas antimaláricas sintéticas, como a cloroquina. A campanha alcançou grande sucesso, erradicando quase toda malária de grande parte da área litorânea do país, mas os casos da doença continuam presentes na região amazônica (Deane, 1992; Silva & Oliveira, 2002; Loiola, *et al.*, 2002). Essa região, de 1970 a 1980 recebeu mais de 1 milhão de imigrantes atraídos pelas atividades de garimpagem que levaram ao desflorestamento, alteração natural dos cursos de rios, igarapés e lagos, proporcionando, assim, um ambiente ótimo para a proliferação do mosquito (Silva & Oliveira, *op cit.*). Em 2008 foram notificados 267.053 casos da doença na Amazônia Legal (Portal da Saúde, 2009), região que concentra 99,9% dos casos de malária no país.

1.2 Distribuição geográfica e aspectos biológicos de *A. darlingi*

Um dos fatores biológicos mais importantes que ocorrem para que o *A. darlingi* seja o principal vetor da malária é a sua acentuada preferência em alimentar-se com sangue humano (Tadei *et al*., 1998). Entre os anofelinos brasileiros, 33 espécies são encontradas na Amazônia, sendo que 17 destas são importantes vetores da doença na América do sul (Tadei *et al*., 1998; Lounibos & Conn, 2000).

O gênero *Anopheles* pertence à família Culicidae e inclui todos os vetores conhecidos de malária humana, agrupando cerca de 360 espécies (Service, 1996; Forattini, 2002). As espécies desse gênero são amplamente distribuídas no território sul-americano a leste dos Andes, na Colômbia, Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai, Argentina, Brasil e nas Guianas. No Brasil, só não é encontrado no Nordeste (nas áreas secas), no extremo Sul e nas áreas de elevada altitude (Consoli & Oliveira, 1994; Lounibos & Conn, 2000). 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. 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.

Os estudos populacionais de *A. darlingi*, quanto ao seu papel de principal transmissor da malária humana no Brasil, demonstraram que diferenças geográficas não interferem, aparentemente, na sua capacidade vetorial (Rosa-Freitas *et al.*, 1992; Gil *et al*., 2003; Conn & Mirabello, 2007). Os principais caracteres morfológicos, para a identificação da forma adulta de *A. darlingi* estão presentes na asa que possui manchas claras e escuras; a veia C (costa) apresenta a área escura ph (mancha pré-umeral) de tamanho grande, com envergadura correspondente a três ou mais que da área clara h (mancha umeral); o tarso posterior mostra o segundo tarsômero (Ta-2) com cerca de 0,50 de escuro basal, enquanto os tarsômeros 3 a 5 são totalmente claros (Forattini 2002).

Esse mosquito tem um comportamento preferencialmente antropofílico (Tadei *et al*., 1998). Realiza hematofagia durante todo o ano; porém, entre as épocas de maiores e menores pluviosidades apresenta baixa hematofagia. A transmissão da doença é comum no interior das habitações de áreas rurais e semi-rurais, mas pode ocorrer em áreas urbanas (Consoli & Oliveira, 1994).

Na Amazônia, notadamente no município de Coari, estado do Amazonas, dos anofelinos em contato com o homem, cerca de 95% é o *A. darlingi*. A partir de 2006, com a construção do gasoduto Coari-Manaus, no Município de Coari-AM, pela PETROBRÁS, vêm ocorrendo alterações ambientais naquela região, o que reflete no ambiente natural desse mosquito. Na área urbana e cercanias dessa cidade foi verificada alta densidade de *A. darlingi* em contato com pessoas que habitam a área em relação a outras espécies de anofelinos. Isso reflete o risco de transmissão da malária por *A. darlingi* nessa área (Tadei, comunicação pessoal, 2007).

Tendo em vista a alta incidência do vetor e o grande número de casos de malária, pesquisas têm auxiliado a responder indagações sobre essa problemática, como por exemplo, redes impregnadas com inseticidas têm sido utilizadas para tentar minimizar a presença de anophelinos nas residências (Harris *et al*., 2006). Além disso, técnicas moleculares, com o uso do gene rRNA16S, para caracterizar população de bactérias presentes no intestino de *A. darlingi*, mostraram que estas podem estar associadas a resistência do mosquito a infecções por parasitas, importante para medidas de controle da espécie (Terenius *et al*., 2008).

CAPÍTULO I

HIBRIDIZAÇÃO *in silico* DE GENES EXPRESSOS DE *Anopheles darlingi* EM CROMOSSOMOS DE *Anopheles gambiae*

1. INTRODUÇÃO

O *Anopheles gambiae lato sensu* (*l.s)* é um complexo de espécies que contém os principais mosquitos vetores de malária da África sub-Sahariana. O complexo compreende sete espécies indistinguíveis morfologicamente (Davidson, 1964): *A. gambiae stricto sensu* (*s.s.*), *Anopheles arabiensis*, *Anopheles quadrimannulatus* espécie A, *Anopheles quadrimannulatus* espécie B*, Anopheles melas*, *Anopheles merus* e *Anopheles bwambae*. As principais espécies vetoras da malária no complexo são o *A. gambiae* e o *A. arabiensis,* ambos são antropofílicos, possuem ecologia similar e são simpátricos (Slotman *et al*., 2005). O *A. quadriannulatus* espécie A é difundido no Sul da África e o *A. quadriannulatus* species B é encontrado na Etiópia, ambos são considerados espécies zoofílicas não vetoras de malaria (Coetzee *et al*., 2000; Coetzee, 2004). O *A. melas* e o *A. merus* são espécies que se reproduzem em água salgada e consequentemente são importantes vetores em regiões da Costa (Moreno *et al*., 2004; Try *et al*., 2003). E o *A. bwambae* é restrito a regiões na Uganda (White, 1985).

O complexo *A. gambiae* é caracterizado pela presença de numerosas inversões cromossômicas fixas e polimórficas. Coluzzi *et al.* (1979) e Coluzzi *et al*. (1985) propuseram uma filogenia baseada na presença de inversões compartilhadas, assumindo que cada inversão tivesse uma origem única, ou seja, monofiléticas. O *A. gambiae* e *A. merus* possuem uma grande inversão fixada que se apresenta cobrindo dois terços do cromossomo X (Xag), o que sugere que pertençam a um táxon irmão (Caccone *et al*., 1998). Já o *A. gambiae* e o *A. arabiensis* compartilham várias inversões no segundo cromossomo, o que é difícil de reconciliar com o agrupamento baseado nas inversões do Xag, a menos que estas inversões polimórficas compartilhadas sejam de um ancestral ou uma introgressão tenha ocorrido entre duas espécies (Colluzzi *et al*., 1979).

A identificação de espécies no complexo *A. gambiae* é importante para estudos de interesse em pesquisa ecológica, distribuição geográfica, abundância e

comportamento das diferentes espécies. Além disso, esse complexo compreende espécies com diferentes eficiências como vetoras e inclui espécies não vetoras, a identificação precisa é também essencial para programas de controle (Bass *et al*., 2007). Diferentes marcadores moleculares foram desenvolvidos para detectar eficiência vetorial das espécies dentro do complexo e para fornecer rápida identificação dos indivíduos enfocando programas de controle de malária, o que inclui a análise de cromossomos politênicos (Coluzzi *et al*., 1979), eletroforese de alozimas (Mahon, 1976; Miles, 1979) e cromatografia (Carlson & Service, 1980). Entretanto um dos métodos mais utilizados para identificação de espécies é a amplificação por PCR de sequências de DNA ribossomal (rDNA) (Scott *et al.*, 1993) e a técnica de *Taq man real time* PCR (Bass *et al*., 2007) que, por meio de polimorfismo de nucleotídeos identifica as espécies dentro do complexo.

O *Anopheles gambiae s.s* Giles, 1902*,* utilizado neste estudo, foi detectado como o mosquito mais perigoso e eficiente vetor da malária, além de ser antropofílico e endofílico, o que explica os altos índices de infestações desta espécie em domicílios em Bwamba, município de Uganda (Giglioli *et al*., 1956), cujos autores observaram tais hábitos similares ao *A. darlingi* na região central do Brasil.

Além destas sete espécies que compõem o complexo *Anopheles gambiae s.l,* o *A. gambiae s.s* é subdividido em dois taxa parcialmente isolados, conhecidos como forma M e forma S (Gentile *et al*., 2001). Essas formas foram originalmente caracterizadas baseadas em polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs - *single nucleotide polymorphisms*) no rDNA e no cromossomo X (Favia *et al*., 2001).

Algumas das características do *A. gambiae* são similares às do *Aedes aegypti* como a antropofilia, mas exibem variações na morfologia, fisiologia, comportamento de acasalamento, preferências de oviposição e ciclo de picadas (Beaty & Marquardt, 1996). Estimativas da distância evolutiva de *Ae. aegypti* revelam que há mais similaridade entre os genomas de *Ae. aegypti* e *A. gambiae* do que os genomas de *Ae. aegypti* e *Drosophila melanogaster* (Nene *et al*., 2007).

No sequenciamento do genoma de *Ae. Aegypti*, Nene *et al*. (2007) encontraram 47% de elementos de transposição (ETs), e tais ETs contribuem substancialmente nas diferenças entre os genomas de *Ae. aegypti* e *A. gambiae*. Além de identificar os ETs, os autores determinaram a descrição de 8.332 proteínas para a espécie. No genoma de *Ae aegypti* 67% das suas proteínas têm um ortólogo em *A. gambiae*, e 58% têm um ortólogo em *D. melanogaster* (Nene *et al*., 2007). As

diferenças espécie-específicas no número de membros dentro de uma família multigenes fornecem pistas sobre adaptação biológica a mudanças ambientais (Nene *et al*. *op cit.*). Devido ao recente desenvolvimento da entomologia molecular, da bioinformática e da genômica, esta visão é atualmente considerada uma das mais promissoras abordagens para tornar possível o controle do mosquito e da transmissão da malária (Collins *et al*., 2000).

O sequenciamento de genomas completos, tornou possível estudar a ordem dos genes ao longo dos cromossomos e investigar se essa ordem pode ter alguma função relevante. Em genomas eucarióticos, genes com funções similares são frequentemente encontrados muito próximos uns dos outros (de Wit & van Steensel, 2009). Estudos com sistemática de genomas inteiros utilizando base de dados de anotação genômica têm mostrado que o agrupamento de genes com funções relacionadas é comum em fungos, plantas e animais (Lee & Sonnhammer 2003).

Em espécies como *D. melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*, genes que são expressos exclusivamente em um tecido específico são frequentemente agrupados no genoma (Boutanaev *et al*., 2002). Estudo com perfil de expressão utilizando *microarray* em *Drosophila* com mais de 80 condições experimentais sugeriu que seu genoma contém por volta de 100 clusters, onde a maioria tem um padrão de expressão similar (Spellman & Rubin 2002). Estudos sistemáticos com *Arabidopsis thaliana* encontraram de 5 a 10% de todos os genes com regiões cromossômicas co-expressas (Ren *et al*., 2005; Zhan *et al*., 2006). Dados de estudos comparativos entre genomas sugerem que genes vizinhos que são co-expressos apresentam uma forte conservação na ordem dos genes, diferente daqueles genes que não são co-expressos (Hurst *et al*., 2002).

Os métodos moleculares, com o auxílio da manipulação de organismos vivos, têm gerado sequências nucleotídicas completas, voltadas para o estudo da estrutura e função de genes e proteínas (Bassett *et al*., 1996). Entre os mosquitos, cita-se o genoma completo de *A. gambiae* com aproximadamente 278 milhões de pares de bases (*Mbp*), cujo número de proteínas deduzidas é de 12.981, sem levar em consideração os transposons derivados ou sequências de bactérias e transcritos alternativos (Holt *et al*., 2002). Um estudo comparativo de genoma e proteoma de *A. gambiae* e *D. melanogaster* identificaram 6.089 pares de proteínas como ortólogos o que representa 47% das proteínas em *A. gambiae* e 44% em *D. melanogaster* (Zdobnov *et al*., 2002). Um total de 1.437 genes preditos em *A. gambiae* que não

detectaram homologia com genes de outras espécies; 522 deles têm supostos parálogos apenas dentro de *Anopheles* e 575 são mantidos por etiquetas de sequências expressas (E*xpressed Sequences Tags,* ESTs), incluindo pelo menos 26 genes expressos em glândulas salivares de fêmeas adultas. Os autores constataram também que um total de 579 genes ortólogos são restritos a *A. gambiae* e *D. melonogaster*, e isso pode ajudar a determinar características inseto-específicas.

A geração das primeiras ESTs foi do projeto genoma humano (Adams *et al.,* 1991; Boguski, 1995). A análise dessas ESTs é realizada a partir da construção de biblioteca de cDNA - uma coleção de fragmentos de cDNA (DNA complementar a um mRNA), representando as sequências expressas em um determinado tecido ou estágio de desenvolvimento em um momento específico (Birren *et al*., 1999), que são normalmente armazenados em vetores de clonagem. A utilização das informações dos bancos de cDNA e proteínas é de grande utilidade para a elucidação da função e expressão de novos genes. Cita-se, como exemplo, a predição de sequências gênicas ainda não conhecidas, por meio de alinhamento local (BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool,* Altschul *et al*., 1997). E o sequeciamento de bibliotecas de cDNA de glândulas salivares de mosquitos adultos de *Anopheles funestus* que geraram 916 ESTs (Calvo *et al*., 2007).

Considerando a bioinformática, uma ferramenta computacional combinada com métodos moleculares, têm auxiliado a desvendar a informação contida em bancos públicos de sequências de DNA e proteínas. Análises e interpretação dessas sequências e suas estruturas têm mostrado novos dados sobre níveis de expressão gênica (genômica funcional) e de todas as funções e interações entre proteínas (proteômica) - a chamada era da pós genômica (revisão em Malone *et al*., 2006).

Uma das ferramentas de análise de ESTs é o método de hibridização *in silico*, que utiliza programas de bioinformática, para o mapeamento físico virtual dos genes expressos ao longo do genoma de determinado organismo (Reed & Palsson, 2003)

A bioinformática e a biologia reúnem os códigos biológico e computacional com ajuda do gerenciamento da montagem, finalização de genomas completos e pela integração de bancos de dados aplicáveis ao estudo do genoma. E, na prática, pela construção de sistemas *in silico* para simulação de formas naturais e modificadas de produtos específicos do genoma (de Almeida, 2005). O mapeamento físico e a análise *in silico* têm-se revelado preciosas abordagens para melhorar a montagem do genoma (Sharakhova *et al*., 2007).

A biologia *in silico* refere-se à utilização de computadores para desempenhar estudos biológicos; é a utilização de sistemas de computadores que fazem simulações de ações de produtos gênicos, com auxílio de um *software* que utiliza modelos matemáticos e análise de dados, além de detalhados modelos cinéticos, cibernéticos e estocásticos, análise do controle metabólico e teoria de sistemas bioquímicos (Reed & Palsson, 2003). É necessário definir hipóteses, testar experimentos e formular análises, para obter dados das semelhanças do organismo *in vivo* por meio de comparações genômicas e estudos evolutivos (Palsson, 2000).

A análise *in silico* é um meio para conhecer o desafio de integrar diversos conjuntos de dados entre o genoma, o proteoma, o metaboloma e o transcriptoma (Palsson, 2002). A construção de modelos *in silico* representa uma forma para interpretar esses dados e colocá-los no contexto da fisiologia celular (Reed & Palsson, 2003). Cita-se a análise *in silico* para subtração eletrônica agrupando as sequências obtidas nas bibliotecas de cDNA de uma espécie de arroz (*Oryza sativa*), para determinar genes relacionados com a tolerância a condições de estresse hídrico (Rabello *et al*., 2006). A anotação funcional de genes, no transcriptoma da cana-de-açúcar (Drezza *et al*., 2002), e o desenvolvimento de um *software* (Fowlkes *et al.,* 2008) para estudar a expressão de genes do blastoderma durante a fase embrionária de *Drosophila* fornecendo um mapa de todas as células dos embriões virtuais e oferecendo uma quantificação da expressão dos genes em 3 dimensões (3D).

Considerando os mosquitos, Krzywinski *et al*. (2005) utilizaram análises *in silico* para identificar quatro famílias de DNA satélite ligadas ao cromossomo Y de *A. gambiae* com ajuda de um *software*, o qual percorreu o DNA dos mosquitos machos em busca de possíveis localizações para regiões satélites. Sharakhov *et al*. (2002) hibridizaram *in silico* 157 sondas de *ESTs* de *A. funestus* em *A. gambiae,* como parte de um estudo genômico comparativo da ordem dos genes e conservação das sequências gênicas entre as duas espécies. Jabbari & Bernardi (2004) também realizaram um estudo genômico comparativo entre *A. gambiae* e *D. melanogaster*, e constataram que o genoma de *A. gambiae* é mais rico em nucleotídeos GC (44,7%) e mais heterogêneo comparado com *D. melanogaster* (42,5%), o que contesta os dados apresentados por Holt *et al*. (2002) de 35,2% de GC para *A. gambiae*.

Há necessidade de estudos para conhecer o genoma funcional de *A. darlingi*, considerando a escassez de informações na literatura, com cerca de 334

sequências de nucleotídeos e 270 de proteínas desse mosquito depositadas no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*), até 12 de maio de 2009. No presente estudo, as ESTs da biblioteca de cDNA de *A. darlingi* (Rafael *et al.* 2005, 2008; Bridi *et al*., 2006) foram utilizadas para hibridizar *in silico* os cromossomos de *A. gambiae*. As comparações entre os genomas das duas espécies podem ajudar a localizar genes responsáveis por adaptações ecológicas, especiação, resistência a inseticidas e preferência por hospedeiros em *A. darlingi*, o maior transmissor da malaria na região amazônica.

2. OBJETIVOS

- Mapear *in silico* sequências de genes expressos de *A. darlingi* nos cromossomos de *A. gambiae*.

- Construir o mapa *in silico* de ESTs de *A. darlingi* em cromossomos de *A. gambiae.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Hibridização *in silico*

Foi realizado *download* de ESTs do banco de *A. darlingi* (1628 *singlets* e 643 *clusters*) depositado na página do LNCC (Laboratório Nacional de Computação Científica - www.lncc.darlingi.br). Foi realizado também, *download* das sequências gênicas dos 5 braços cromossômicos (2L, 2R, 3L, 3R e X) de *A. gambiae* depositadas na página do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), cujos números de acesso são: NT 078265, NT 078266, NT 078267, NT 078268 e NC 004818, respectivamente.

As ESTs de *A. darlingi* foram hibridizadas *in silico* contra os cromossomos de *A. gambiae* através do programa BLAST local (Altschul *et al*., 1997) com os seguintes parâmetros: formato de saída MA; Exp (*Expect*) 0.01; WS (*word size*) 28, para reconhecimento de regiões com similaridade. Os dados foram gerados pelo BLAST em forma de tabela e exportados para o programa "ARTEMIS *(Reliase* 10)" (*Sanger Institute*), para visualização das regiões hibridizadas nos braços cromossômicos de *A. gambiae*.

4. RESULTADOS

O total de *clusters* (196) (tal número deve-se a diferentes regiões de um mesmo *cluster*, cujas hibridizações apareceram mais de uma vez em um mesmo braço cromossômico) e *singlets* (136) estão representados na Tabela 1. A similaridade das sequências dos produtos gênicos de *A. darlingi* hibridizados in silico em *A. gambiae* totalizaram 178 (levando em consideração apenas os *clusters* que hibridizaram somente uma vez, sem repetições). Os *clusters* (Figura 1) e *singlets* (Figura 2) de *A. darlingi* foram hibridizados com auxílio do programa "ARTEMIS" no cromossomo 2, (braço 2R e 2L); cromossomo 3 (braço 2R e 2L) e cromossomo X de *A. gambiae.*

Tabela 1: *Clusters* e *Singlets* de *A. darlingi* hibridizados *in silico* nos cromossomos de *A. gambiae*.

Braços Cromossômicos	X	2R	2L	3R	3L	Total
Clusters	13	64	40	45	34	196
Singlets	7	50	38	25	16	136

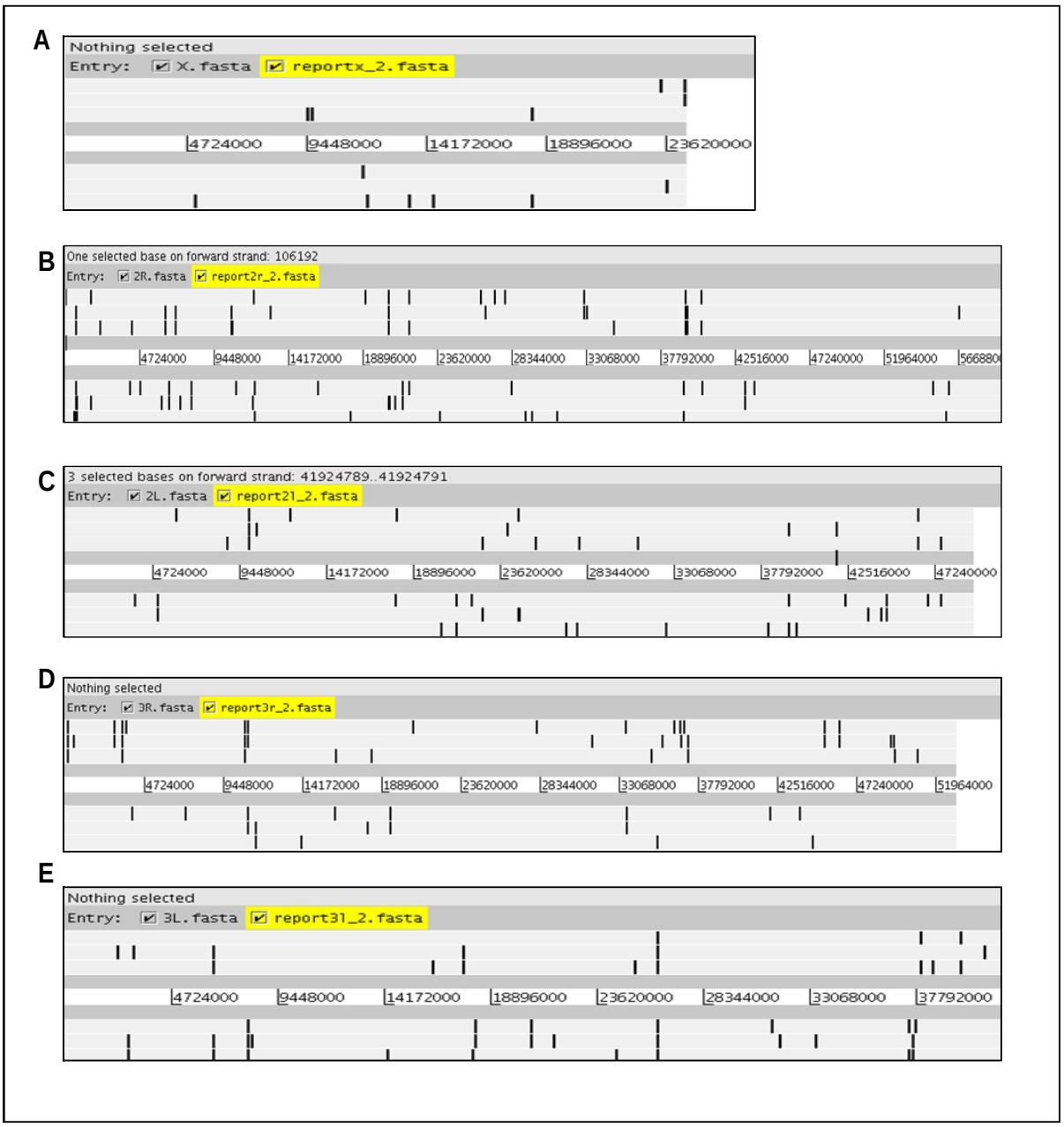

Figura 1: Figura gerada pelo programa "*Artemis*" para visualização das regiões de hibridização dos ***clusters*** de *A. darlingi* nos cromossomos de *A. gambiae*. **A.** Braço cromossômico X; **B.** Braço cromossômico 2R; **C.** Braço cromossômico 2L; **D.** Braço cromossômico 3R; **E.** Braço cromossômico 3L.

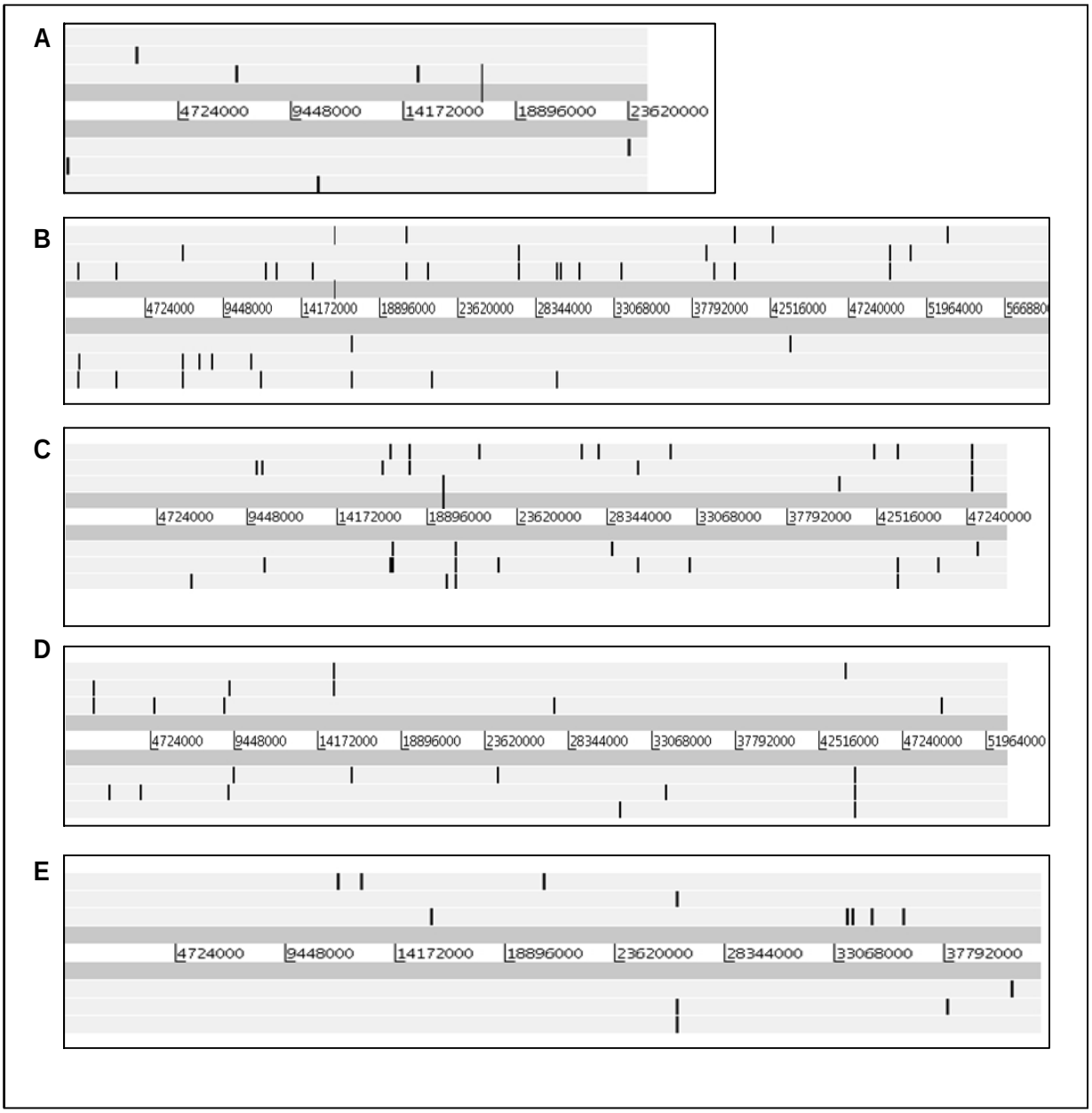

Figura 2: Figura gerada pelo programa "*Artemis*" para visualização das regiões de hibridização dos ***singlets*** de *A. darlingi* nos cromossomos de *A. gambiae*. **A.** Braço cromossômico X; **B.** Braço cromossômico 2R; **C.** Braço cromossômico 2L; **D.** Braço cromossômico 3R; **E.** Braço cromossômico 3L.

Na Tabela 2 (ANEXO 1) estão representados os produtos gênicos de *A. darlingi* que hibridizaram nos cromossomos de *A. gambiae*. Para as sequências gênicas denominadas ENSANGP, buscou-se reconhecimento de similaridade para tais sequências nos bancos de dados públicos NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), EMBL (http://www.ebi.ac.uk/embl/) e Panther (http://www.pantherdb.org/), assim foi possível estabelecer as prováveis categorias funcionais (COG - Clusters of Ortologous Groups (www.ncbi.nih.nhl.gov/COG), segundo Tatusov *et al.* (2003) de tais produtos gênicos hibridizados. Na tabela 2 consta também o índice estatístico de valor esperado (e-value).

Os 178 *clusters* hibridizados nos cromossomos de *A. gambiae* estão representados nas Tabelas 3 a 7 (ANEXO 1), e 465 *clusters* não tiveram similaridade com *A. gambiae* ao serem hibridizados *in silico*.

Entre os *contigs* e *singlets* hibridizados, detectou-se sequências gênicas tais como actina, genes ribossomais e sequências gênicas desconhecidas e/ou hipotéticas. Além destes genes expressos, detectou-se similaridade das ESTs de *A. darlingi* com sequências de outros organismos: *Aedes aegypti*, *D. melanogaster* e *Culex spp.*

Os produtos gênicos de *A. darlingi* encontrados nos 178 *clusters* foram agrupados por categoria geral de função do *COG*, dentre as quais, a categoria geral Armazenagem e Processamento de Informações foi a mais frequente, com maior número de sequências (Gráfico1).

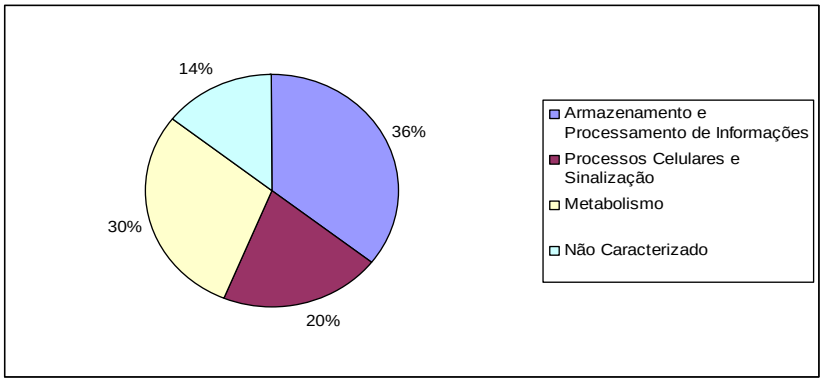

Gráfico 1 - Representação da porcentagem de genes homólogos encontrados por categorias gerais do *COG* no *GenBank*.

O percentual dos produtos gênicos relacionados aos *COGs* é representado por cada grupo das categorias gerais; na categoria geral ”Armazenamento e Processos de Informação, a categoria **J**) que inclui tradução e estrutura ribossômica foi a mais frequente. Na categoria geral “Processos Celulares e Sinalização” as categorias gerais mais abundantes foram **M**) parede celular, membrana, **N**) motilidade celular e **Z**) citoesqueleto. Na categoria geral “Metabolismo” as categorias **C**) produção de energia e conversão e **Q**) biosíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo foram as mais frequentes (Gráfico 2).

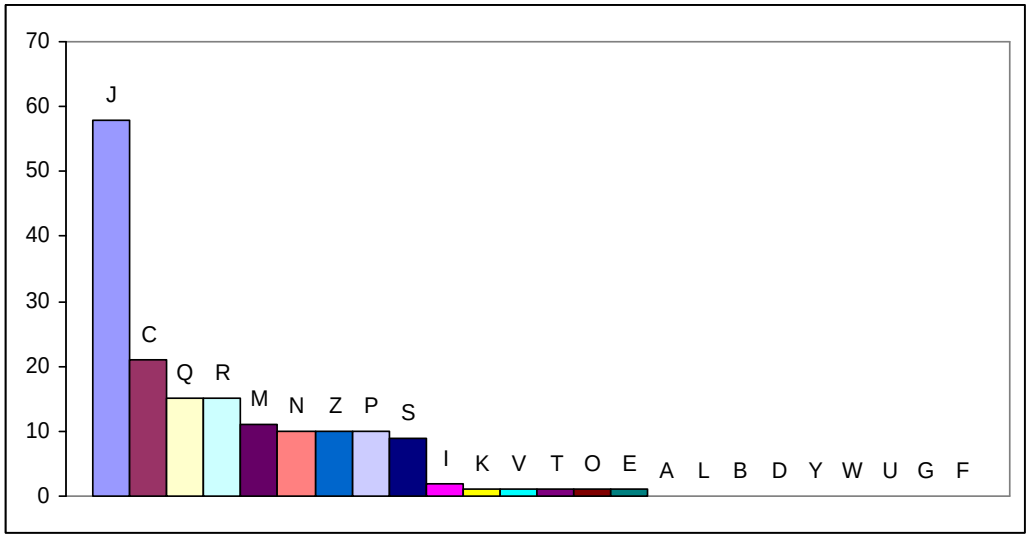

Gráfico 2: Número de clones ortólogos encontrados em *A. darlingi* e suas prováveis funções. Legenda: **J**) tradução, incluindo estrutura ribossômica; **C**) produção e conversão energética; **Q**) Catabolismo, transporte e biossíntese de metabólitos secundários; **R**) predição funcional geral; **M**) estrutura de parede celular e membrana; **N**) motilidade celular; **Z**) citoesqueleto; **P**) transporte e metabolismo de íon inorgânico; **S**) função desconhecida; **I**) metabolismo de lipídeo; **K**) transcrição; **V**) mecanismos de defesa; **T**) mecanismos de transdução de sinal; **O**) chaperone molecular e função correlacionada; **E**) transporte e metabolismo de aminoácido; **A**) processamento e modificação de RNA; **L)** reparo, recombinação e replicação de DNA; **B**) estrutura e dinâmica da cromatina; **D**) divisão celular e cromossômica; **Y**) estrutura nuclear; **W**) estruturas extracelulares; **U**) trafego intracelular, secreção e transporte vesicular**; G**) transporte e metabolismo de carboidrato; **F**) transporte e metabolismo de nucleotídeo.

5. DISCUSSÃO

O constante surgimento de novos métodos experimentais, a possibilidade de combinar a informação contida em sequências gênicas e estruturas, para obter novos dados sobre níveis de expressão gênica de todos os genes (genômica funcional) e de todas as funções e interações entre proteínas (proteômica), abrem a porta para uma nova era, a pós genômica. Trabalhar com auxílio do desenvolvimento de metodologias e algoritmos que permitam elucidar todas essas combinações entre genes e proteínas é, sem dúvida, a nova fronteira da ciência (Malone *et al*., 2006). Apesar da importância do *A. darlingi* como principal vetor da malária na região amazônica, pouco é conhecido a respeito de seu genoma e proteoma, principalmente pelas dificuldades em manter a espécie em laboratório por mais de uma geração (Calvo *et al*., 2004). Os resultados deste trabalho fornecem os primeiros dados de hibridização *in silico* com as sequências obtidas pelo projeto genoma do *Anopheles darlingi.*

Enquanto a sequência do genoma está disponível para uma variedade de organismos, o número preciso dos genes codificados ainda é um assunto a ser debatido. A combinação de diferentes métodos de predição computacional e avaliação experimentais tais como os dados da análise *in silico* fornecerão resultados mais completos das anotações de genomas, a fim de conseguir um conteúdo mais completo dos genes (Hild *et al*., 2003).

Um estudo relacionado ao genoma de *A. darlingi* foi realizado por Calvo *et al*. (2004), onde os autores descreveram o transcriptoma das glândulas salivares da espécie; nele foram sequenciados 593 clones de cDNAs e 289 *clusters*, os dados foram comparados com o transcriptoma de *A. gambiae*; a anotação das sequências foi dividida em três categorias funcionais: S, associados com produtos secretados (52.78% das sequências); H, atividades metabólicas em todos os tipos de células (25,12% das sequências) e U, função desconhecida (22,09% das sequências); uma análise estatística ($P < 0.01$, teste X^2) mostrou que tais *clusters* possuem uma média diferente uns dos outros, e tais resultados corroboram com aqueles encontrados para o transcriptoma das glândulas salivares de *Ae. aegypti*, onde foram encontrados 59 produtos gênicos com função desconhecida, descritos pela primeira vez, além de serem conservados em outros organismos (Ribeiro *et al*., 2007); *A. gambiae, A. stephensi* e *Ixodes scapularis* (Francischetti *et al*., 2002; Valenzuela *et al*., 2002a,b, 2003); Calvo *et al*. (2007) sequenciaram os transcritos de 916 clones de

uma biblioteca da glândula salivar de *A. funestus* e encontraram 222 clusters com funções gênicas desconhecidas. Mas no presente trabalho, cujo objetivo foi hibridizar todo o genoma de *A. darlingi* em *A*. g*ambiae* e não apenas produtos gênicos das glândulas salivares, não foi caracterizado nenhum produto gênico com provável função secretora, as atividades metabólicas representaram 30% dos produtos gênicos encontrados e para a função desconhecida caracterizamos 14% dos produtos gênicos (gráfico 1).

No trabalho realizado com os transcritos da glândula salivar de *Ae. aegypti* (Ribeiro *et al*., 2007), os autores analisaram um conjunto de 4.232 ESTs da biblioteca de cDNA de glândulas salivares de fêmeas adultas, foi utilizado o programa "ARTEMIS" para a identificação de 573 novos transcritos para a espécie. Encontraram 234 sequências de produtos gênicos com função desconhecida, mais de 50% das sequências dessa classe derivam de transcritos associados à síntese de proteínas, metabolismo energético, modificação de proteinas e exportação de proteínas.

As baixas porcentagens das categorias funcionais encontradas no presente trabalho e a baixa quantidade de *clusters* hibridizados 178 e 465 *clusters* não hibridizados, podem estar relacionados com a escolha de altos parâmetros de saída para o programa BLAST local, que fez com que a hibridização das ESTs de *A. darlingi* nos cromossomos de *A. gambiae* se tornasse mais criteriosa, ou então, tais *clusters* podem ser restritos a *A. darlingi*, corroborando a idéia de Zdobnov *et al*. (2002) para características gênicas inseto-especificas, onde encontrou um total de 579 genes ortólogos restritos a *A. gambiae* e *D. melanogaster*; ou segundo a hipótese de Sharakhov *et al*, (2001, 2002), as posições relativas das sequências cujas localizações no mapeamento genético são únicas em ambas as espécies, sustenta a hipótese de que há homologia nos braços cromossômicos.

Inicialmente o genoma de *D. melanogaster* foi proposto com a existência de 14.000 genes (Adams *et al*., 2000). No trabalho realizado por Hild *et al*. (2003), no qual utilizaram o *software Fgenesh in silico*, para mapear regiões do genoma de *D. melanogaster* com maior precisão, encontraram aproximadamente 2.000 novos genes. No genoma de *A. gambiae* foram descritas 12.981 proteínas, além de 15.189 transcritos anotados, sem levar em consideração aquelas derivadas de transposons ou sequências comuns a bactérias e transcritos alternativos (Holt *et al*., 2002).

O genoma de *A. gambiae* também já foi comparado com outros organismos tais como *D. melanogaster* (Zdobnov *et al*., 2002), onde 1.283 proteínas apresentaram pouca ou nenhuma homologia com a espécie comparada, porém, apresentaram maior homologia com outras espécies. Em 1.437 proteínas de *A. gambiae* e 2.570 proteínas de *D. melanogaster* não foram detectados homólogos em nenhuma espécie que tenha seu genoma completamente sequenciado, o que pode ser considerado como novos genes ou genes que possuam uma rápida taxa de evolução.

O processo de construção do *COG* leva em consideração a idéia de que qualquer grupo de pelo menos três proteínas de genomas distintos são mais similares entre elas do que seriam para qualquer outra proteína oriunda de seus próprios genomas, o que as tornam mais prováveis de pertencerem a uma família de ortólogos (Tatusov *et al*., 2003). As 178 sequências gênicas analisadas foram agrupadas por categoria geral de função – COG, dentre as quais, a categoria funcional **J**, possui 58 sequências de ESTS, representa a tradução, biogênese e estrutura ribossomal e está incluída na categoria geral Armazenagem e Processamento de Informações foi a mais frequente. Nessa categoria funcional são requeridos genes para a tradução do mRNA em células eucarióticas, sendo sequências altamente conservadas, que ocorrem na maioria dos organismos, nos quais o número de ribossomos está diretamente relacionado com a atividade de síntese protéica nas células (Lewin,1994). Ribeiro *et al*. (2007) encontraram 75 proteínas ribossomais com mecanismo de tradução em *Ae. aegypti,* das quais 65 foram descritas pela primeria vez para a espécie.

Na categoria funcional relacionada a Processos Celulares, observou-se a alta ocorrência de genes envolvidos com estrutura da parede celular e membrana (**M**), motilidade celular (**N**) e citoesqueleto (**Z**), as altas incidências podem estar relacionadas com o fato da grande quantidade de sequências da biblioteca de cDNA de *A. darlingi* serem de mosquitos adultos no presente estudo. Ribeiro *et al*. (2007) encontrou produtos gênicos que correspondem a 1.7% das sequências totais de transcritos da glândula salivar de *Ae*. *aegypti* relacionados ao citoesqueleto e proteínas da matriz extracelular, onde foi encotrado um receptor para esporozoítos de *Plasmodium gallinaceum* nas glândulas salivares (Korochkina *et al*., 2006). E nas glândulas salivares de *A. funestus* foram identificados 5 *clusters* para a mesma categoria anteriormente citada (Calvo *et al*., 2007).

Considerando os genes relacionados ao metabolismo, duas categorias apresentaram altas frequências, produção e conversão energetica (**C**) e Catabolismo, transporte e biossíntese de metabólitos secundários (**Q**). Em geral, domínios dessas categorias funcionais participam em uma gama de vias metabólicas como produtores de energia na cadeia respiratória. Ribeiro *et al.* (2007) encontrou 54 enzimas relacionadas ao Metabolismo de energia, das quais 51 eram novas, muitas das quais estavam associadas com síntese proteíca e secreção nas glândulas salivares em *A. aegypti*. Nas glândulas salivares de *A. funestus* foram encontrados 21 *clusters* (76 sequências) para categoria de função Metabolismo de energia (Calvo *et al*., 2007).

Na categoria geral de produtos gênicos mal caracterizados, a categoria que apresenta funções gerais apenas preditas (**R**) foi a que apresentou maior quantidade dentre as sequências gênicas hibridizadas. Apesar de pouco caracterizados em *A. darlingi,* esses produtos gênicos foram descritos por estarem presentes nos insetos em geral, pois pouco se conhece a respeito de todas as sequências gênicas, ou pelo menos as de menor importância científica, depositadas nos bancos de dados públicos na *WEB* e estudos futuros mais detalhados serão extremamente necessários acerca da importância de se conhecer todas as funções metabólicas e celulares dos vetores da malária. Neste trabalho, entre as categorias funcionais encontradas para *A. darlingi*, a J (tradução, biogênese e estrutura ribossomal), foi a que apresentou maior homologia com as sequências de *A. gambiae*, depositadas no GenBank. Essas proteínas exercem função regulatória, de tradução e processamento de pré-RNAm.

Considerando alguns produtos gênicos presentes nos dados de hibridização *in silico* e apresentados na literatura destacam-se as proteínas ribossomais “40S *ribosomal protein* S15/S22” e “40S *ribosomal protein* S20” presentes no transcriptoma de *A. darlingi*, quando comparadas por BLASTp com sequências de *A. gambiae* apresentaram alto grau de identidade (Calvo *et al*., 2009). No presente trabalho, essas duas proteínas ribossomais apresentaram similaridade com sequências gênicas de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente.

As proteínas ribossomais “60S ribosomal protein L11”, “60S ribosomal protein L21” e “60S ribosomal protein L2/L8”, também apresentaram alto grau de identidade entre *A. darlingi* e *A. gambiae* (Calvo *et al*., 2009); e no presente estudo, a proteína ribossomal “60S ribosomal protein L11”, apresentou similaridade com *A. funestus*, e

as proteínas ribossomais “60S ribosomal protein L21” e “60S ribosomal protein L2/L8” apresentaram similaridade com *Ae. aegypti*. Na construção do transcriptoma de glândulas salivares do *A. darlingi* (Calvo *et al*., 2009), foram extraídas 183 sequências de proteínas e depositadas no *GenBank*, para isso, 2.371 clones de cDNA foram utilizados e 966 *clusters,* foram utilizadas também 593 clones obtidos por Calvo *et al*. (2004).

A proteína predita AeAct-3 (clone de cDNA do gene de actina) de *Aedes aegypti* apresentou 94% de identidade com o produto gênico ENSANGP00000022175, caracterizado como um gene predito de actina (Vyazunova & Lan, 2004), cuja hibridização *in silico*, no presente estudo, apresentou-se nos braços 2L, 2R, 3L e X. A proteína AeAct-3 representa um gene de actina específico de machos, o qual pode ter especificidade aos músculos de mosquitos machos adultos. E em relação aos machos, nenhuma informação a respeito dos dados de sequências gênicas foi atribuída ao cromossomo Y na primeira publicação do genoma do *A. gambiae* (Holt *et al*., 2002). Estudos seguintes revelaram muitas sequências repetitivas sobre o cromossomo Y, incluindo quatro famílias de DNA satélite e uma grande acumulação de elementos de transposição, consistente com o padrão heterocromático dos cromossomos (Krzywinski *et al*., 2004, 2005). Apenas uma sequência especifica do Y, contendo uma ORF (*open reading frame*) foi expressa exclusivamente em machos. Entretanto, uma pesquisa baseada em dados de bioinformática falhou ao revelar outras sequências contendo genes ligados ao Y (Krzywinski *et al*., 2006). Nas análises *in silico* e BLASTn realizadas por Sharakhova *et al*. (2007), foram identificadas 54 sequências curtas ligadas ao cromossomo Y, todas as sequências são repetitivas e pertencentes a uma família satélite.

Os resultados apresentados no presente estudo são preliminares como a predição de genes e as designações funcionais geradas por análise computacional. O primeiro trabalho realizado com as sequências de DNA de *A. darlingi* e utilizando tal metodologia, foi realizado por Calvo *et al*. (2004), no qual descreveu o transcriptoma das glândulas salivares.

O presente estudo representa um trabalho inicial da localização *in silico* de sequências do genoma funcional de *A. darlingi*, nos cromossomos de *A. gambiae*. Tais resultados auxiliarão estudos futuros no conhecimento da sintenia dos genes em termos evolutivos além de poder auxiliar no controle da malária de forma a localizar genes de resistência a inseticidas nos vetores e genes relacionados a

capacidade de desenvolvimento de espécies do gênero *Plasmodium* nos mosquitos vetores da malária.

6. CONCLUSÕES

- A descrição do transcriptoma de *A. darlingi* e o mapeamento *in silico* comparativo dessas *ESTs* com as informações disponíveis para *A. gambiae* representa um avanço no entendimento das funções protéicas e constituição de seu genoma.

- Estes resultados podem auxiliar a responder questões sobre a preferência por hospedeiros e capacidade vetorial, além de contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle de *A. darlingi* e redução dos casos de malária.

CAPÍTULO II

MAPEAMENTO FÍSICO DE GENES EXPRESOS EM CROMOSSOMOS POLITÊNICOS *DE Anopheles darlingi*

1. INTRODUÇÃO

Nos insetos em geral, os machos apresentam um par de cromossomos heteromórficos (XY) e as fêmeas um par de cromossomos sexuais homomórficos (XX). Geralmente o cromossomo Y é menor que o X. Nesse caso, o cromossomo Y possui poucos genes homólogos ao cromossomo X e são parcial ou totalmente heterocromáticos (Jablonka & Lamb, 1990). Na família Culicidae, a maioria das espécies apresenta três pares de cromossomos: o par I (cromossomos menores), o par II (cromossomos maiores) e o par III (cromossomos intermediários). Esses três pares de cromossomos podem ser metacêntricos e um ou dois pares podem ser levemente submetacêntricos (Rai, 1963; Rao & Rai, 1987). O cariótipo da subfamília Anophelinae, diferencia-se do cariótipo dos demais culicideos por apresentar um par de cromossomos sexuais que pode ser heteromórfico nos machos (X/Y) e homomórfico nas fêmeas (XX) (Kitzmiller, 1977). O *A. darlingi* apresenta cariótipo metafásico comum ao gênero com 2n=6 cromossomos, consistindo de dois pares de cromossomos autossômicos (II e III) e um par de cromossomos sexuais, sendo XX nas fêmeas e XY nos machos (Rafael & Tadei, 1998).

Considerando os estudos dos cromossomos politênicos salivares, *A. darlingi* apresenta um cromossomo X com um braço e dois autossomos (Kreutzer *et al*., 1972). O cromossomo X, mitótico, é submetacêntrico em *A. aquasalis* (Kitzmiller & Chow, 1971), em *A. nuneztovari* (Rafael *et al.,* 1998; 2003), enquanto que é acrocêntrico em *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 1998)*, A. noroestensis*, *A. argyritarsis* (Schreiber & Guedes, 1959), *A. cruzii* (Ramírez, 1989) e *A. albitarsis lato sensu* (Rafael *et al*., 2005).

Os cromossomos politênicos de algumas espécies de *Anopheles* corados com orceína lacto-acética, mostraram a localização da heterocromatina na região proximal do cromossomo X, onde se forma o nucléolo, como em *A. darlingi* (Schreiber & Guedes, 1959, 1961; Tadei, 1985; Rafael, 2001), *A. argyritarsis. A. strodei, A. noroestensis* e *A. aquasalis* (Schreiber & Guedes, 1959, 1961),

Anopheles subpictus (Chaudhry, 1986), *A. cruzii* e *A. bellator* (Ramirez & Dassen, 1994, 1996).

Os cromossomos politênicos das glândulas salivares de mosquitos do gênero *Anopheles* têm sido extensivamente estudados quanto às inversões polimórficas. Análises do polimorfismo dos cromossomos politênicos de *A. darlingi* mostraram altas frequências de inversões heterozigotas (Guedes *et al*., 1957; Schreiber & Guedes 1959, 1960). Kreutzer *et al*. (1972) estudando a variabilidade cromossômica em *A. darlingi* concluíram que populações da Amazônia são altamente polimórficas quando comparadas às populações do sul do país, nas quais foram descritas nove inversões independentes e um arranjo complexo. Outras três inversões foram descritas por Tadei *et al*. (1982, 1985), sendo uma no cromossomo X (Xb), uma no cromossomo 2 (2Rd) e uma no cromossomo 3 (3Rc). Duas regiões de despareamento também foram registradas: uma próxima ao centrômero do cromossomo X e duas no cromossomo 2, além de altas frequências de inversões no estado heterozigoto nessa população.

Outro aspecto do polimorfismo cromossômico de *A. darlingi*, refere-se à identificação de populações com base no seu grau de heterozigosidade. As populações do eixo central da Amazônia mostram um número médio de inversões por indivíduo, no estado heterozigoto que corresponde quase o dobro em relação às populações marginais, o que representa a redução em até 50% nos valores das médias de inversões por individuo, no estado heterozigoto (Tadei *et al*., 1984).

Nos últimos anos, estudos envolvendo marcadores moleculares também têm sido bastante utilizados em análises populacionais de *A. darlingi*. Amostras desse mosquito foram estudadas quanto a sua distribuição geográfica por meio de aloenzimas (Rosa-Freitas *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1999), comportamento e DNA mitocondrial (Rosa-Freitas *et al.*, 1992; Conn *et al.*, 1999). Marrelli *et al*. (2005), encontraram diferenças nas sequências de ITS2 (*second internal transcribed spacer*) de *A. darlingi* comparado com outras espécies do gênero *Anopheles* que diferiram de 35 a 75%. Scarpassa & Conn (2007) analisaram populações de *A. darlingi* da Amazônia central e ocidental brasileira e, por meio de sete *loci* polimórficos de DNA microssatélites, encontraram baixa estruturação genética e alto fluxo gênico entre os indivíduos. Esses resultados corroboram outros estudos de que populações de *A. darlingi* são uma única espécie.

A citogenética molecular tem sido uma ferramenta muito utilizada para mapeamento físico cromossômico, por meio do método de hibridização *in situ* (ISH – *in situ hybridization*). O método de ISH consiste no emparelhamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos complementar, localizada dentro da célula. Para visualizar tal segmento, é necessário que ele esteja marcado com molécula de fácil identificação (sonda), para detectar a sequência complementar de nucleotídeos na amostra alvo; a sonda pode ser de DNA/DNA, RNA/RNA ou DNA/RNA, que identifica genes específicos ou sequências de regiões cromossômicas. A ISH é uma ferramenta útil para estimar o número de cópias de sequências específicas, faz comparações taxonômicas ou populacionais evolutivas, identifica espécies relacionadas e contribui com estudos de aspectos funcional e evolutivo, de diversos dípteros (Lara 2002, Guerra, 2004). Cita-se o mapeamento do gene Hsp70 em cromossomos politênicos de *A. darlingi* hibridizados nas regiões 12A e 14A do cromossomo 2R, em populações de Manaus e Macapá (Rafael *et al.*, 2004).

Outro método de citogenética molecular muito utilizada é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH – *fluorescent in situ hybridization*) que utiliza sondas marcadas com fluorocromos ou enzimas para detectar, por exemplo, anomalias cromossômicas, pesquisas com aneuploidias e para mapeamento gênico. Destaca-se o estudo do mapeamento do DNA satélite na região de heterocromatina centromérica de *Chironomus plumosos* (Hankeln *et al*., 1994) e sequências de RNAr 18S-28S de *Aedes albopictus* hibridizadas em *Culex pipiens* no braço cromossômico 1 e em *Anopheles labranchinae* hibridizadas no braço longo heterocromático dos cromossomos sexuais X e Y (Marchi & Pili 1994). Os resultados sugerem uma localização preferencial dos genes RNAr sobre os cromossomos sexuais. Sharakhov *et al*. (2004) utilizaram marcadores microsatélites como sondas para determinar polimorfismo de inversões e assim, caracterizar a estrutura populacional de *Anopheles funestus*. Della Torre *et al.* (1996) utilizaram sequências de cDNAs como sondas para hibridizar núcleos politênicos em *A. gambiae* e encontraram 110 sítios.

Sequências de DNA complementar (cDNA) conhecidas ou sequências de aminoácidos de uma proteína de interesse têm sido utilizadas como sonda para hibridização *in situ* em diversos organismos (Malone *et al.*, 2006). Sharakhova *et al*. (2007) utilizaram cDNAs nos métodos de FISH e hibridização *in silico* na região

pericentromérica dos cromossomos politênicos de *A. gambiae* para otimizar os dados obtidos na análise do genoma desse mosquito. O método de hibridização *in situ* permitiu, também, o mapeamento físico da proteína *odorant binding protein* 1 (OBP1) em cromossomos politênicos da glândula salivar do *Culex quinquefasciatus* (Mcabee, *et al*., 2007).

Com relação à importância de conhecer a localização física de genes no genoma de dípteros, destacam-se as sondas de genes de proteínas utilizadas no presente estudo, com auxílio da metodologia de ISH. Cita-se a lisozima, uma proteína definida por sua atividade muramidase, cuja capacidade é quebrar a ligação entre o ácido *N-acetylmuramic* e *nacetyl glucosamine (GlcNAc*) na camada peptidioglicana da parede celular bacteriana. Esta ação resulta em lise celular (Paskewitz *et al*., 2008). Em invertebrados foram identificados grupos distintos de lisozimas dentre eles, o tipo *chicken* (tipo c) bem conhecido nos insetos (Hultmark, 1996) e bem caracterizado em *A. gambiae* os quais possuem considerável variação na estrutura e padrão de expressão (Kang *et al.,* 1996; Li *et al*., 2005). Vários genes expressos do tipo c são encontrados principalmente na fase larval, enquanto que outros são mais abundantes na fase adulta. Cita-se o genoma da *Drosophila melanogaster*, que contém 20 genes de lisozima tipo-c, a maioria dos quais são expressos em diferentes segmentos do intestino (Daffre *et al*., 1994), enquanto que o genoma de *A. gambiae* contém 8 genes (Li, *et al*., 2005).

Em *Aedes aegypti*, Ursic Bedoya *et al*. (2005) verificaram a expressão espacial e temporal dos transcritos de lisozima (Lys-A e Lys-E) com a metodologia de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). A presença da lisozima foi constatada em todos os tecidos de larvas e pupas; já na forma adulta de *Ae. aegypti*, os transcritos foram encontrados em tecidos específicos em resposta a estímulos de bactérias ou com alimentação sanguínea. A segunda família de lisozima é o tipo i (*invertebrate*), sendo dividido em dois genes Lys i-1 e Lys i-2 nos quais seus possíveis papéis funcionais podem estar relacionados com a alimentação de sangue ou de imunidade. As lisozimas tipo i podem desempenhar um papel desconhecido na defesa imunológica, podendo funcionar na digestão de sangue ou bactérias.

Genes i-1 e i-2 foram caracterizados e analisados por qRT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento e em diferentes tecidos, de mosquitos fêmeas adultas de *A. gambiae,* para verificar seus possíveis papéis na expressão funcional para essas proteínas (Paskewitz *et al*., 2008). Os autores concluíram que a Lys i-1 foi facilmente

detectável em todas as fases, enquanto a Lys i-2 foi mais abundante nos adultos. Além disso, elevados níveis nas transcrições de Lys i-1 foram observados em um dos ovários seguidos por alimentação com sangue, nos túbulos de Malpighi e corpo gorduroso. Paskewitz *et al*. (2008) mapeou os genes Lys i-1 no braço 3L, divisão 41C e Lys i-2 no cromossomo X, divisão 3D.

A troponina é o principal regulador da contração muscular. É formada por um complexo de três subunidades: troponina C (TpnC), troponina I (TpnI) e troponina T (TpnT) que se ligam à tropomiosina (revisão em Filatov *et al*. 1999; Gordon *et al*., 2000). A TpnC aumenta os níveis de cálcio intracelular e induz uma mudança conformacional no complexo troponina-tropomiosina desencadeando uma contração muscular (Reinach *et al*., 1997; Vassylyev *et al*., 1998; Herranz *et al*., 2005b). Dípteros como Drosophilidae, *A. gambiae*, e outros insetos holometábolos tais como *Apis mellifera* têm dois conjuntos diferentes de musculatura, um sendo formado dos embriões para as larvas e o outro formado durante a pupação para os adultos. Muitos dos músculos em adultos são fisiologicamente únicos para essa fase de desenvolvimento (Lovato *et al*., 2001; Herranz *et al*., 2005b). A contração muscular é regulada por mudanças na concentração de Ca^{2+} nas fibras. Em muitos invertebrados, incluindo insetos, esse controle é através de proteínas ligadas ao Ca^{2+} nos filamentos finos e grossos (Lehman *et al*., 1974; Lehman & Szent-Gyorgyi, 1975). Tais filamentos nos músculos esqueléticos são ativados quando o Ca^{2+} liga-se ao complexo troponina-tropomiosina, produzindo uma mudança na posição da tropomiosina, que parcialmente expõe a ligação da miosina ao sitio de actina (Huxley, 1972; Vibert *et al*., 1997; Qiu *et al.*, 2003).

A troponina I (TpnI), presente nos músculos, é um elemento-chave no complexo de proteínas que regulam ao longo da musculatura de filamentos finos e grossos (Maytum *et al*., 2003 *apud* Marín *et al.*, 2004). Marín *et al*. (2004) observaram a expressão da TpnI na fase embrionária de *D. melanogaster* e localizaram transcritos em células somáticas musculares com auxílio da metodologia de hibridização *in situ.* Em *D. melanogaster* a TnI é codificada pelo gene *wings-up A* (wupA) (Barbas *et al*., 1991), o qual foi posteriormente mapeado no cromossomo X, região 16F (Prado 1999). Herranz (*et al.*, 2005a) descreveram como as isoformas TpnI e TpnT evoluíram em insetos. Os autores realizaram um estudo sistemático dos genes de troponina, para compreender os mecanismos que levaram à divergência funcional na variação das isoformas e suas distintas expressões em tecidos

musculares e fases de desenvolvimento. Foram encontradas quatro espécies da família Drosophilidae: *D. melanogaster*, *D. subobscura*, *D. pseudoobscura*, e *D. virilis*, cujos genes divergiram nos últimos 60 milhões de anos. Por outro lado, *A. gambiae* e *Apis mellifera* divergiram de Drosophilidae há cerca de 250 e 300 milhões de anos, respectivamente (Powell 1997; Dudley 2000; Gaunt e Miles 2002).

A actina é outra proteína de fundamental importância, pois é responsável pela contração muscular; está envolvida com outros processos celulares tais como a morfogênese (Pollard & Weihing 1974). É encontrada em todas as células eucarióticas e é altamente conservada em níveis nucléicos e sequências de aminoácidos (Fyrberg *et al*., 1980; Zafar & Sodja, 1983; Mounier *et al*., 1987; Hadden & Sodja, 1994). Tem um amplo espectro de funções que incluem a determinação da forma celular, contração muscular, movimento celular e cromossômico, fagocitose e sinalização intracelular (Pollard *et al*., 2000; Fox, 2001; Sodja *et al.*, 2007). Em artrópodes, a actina pode ser dividida em três grupos funcionais: actina do citoesqueleto, actina dos músculos de adultos e actinas dos músculos de larvas-adultos (Salazar *et al*., 1994).

Salazar *et al*. (1994) identificaram em *A. gambiae,* cinco genes constitutivos que expressam actina, dos quais um foi mapeado, o gene designado *actWior*, localizado no cromossomo X, divisão 1D. Os genes identificados pelos autores apresentaram-se expressos em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito, o que indicou que tais genes estavam relacionados ao citoesqueleto. O gene *Act5C* foi utilizado como sonda por Bondinas *et al.* (2001) para mapear genes de actina *in situ* em quatro espécies de *Drosophila* paleárticas: *Drosophila ambigua, Drosophila tristis, Drosophila obscura, Drosophila subsilvestris* e a espécie "trans-paleártica" *Drosophila bifasciata*. Posteriormente, Bondinas *et al.* (2002) realizaram trabalho similar com o mesmo gene, no entanto utilizou cinco espécies neárticas do grupo *Drosophila*: *Drosophila pseudoobscura, Drosophila persimilis, Drosophila affinis, Drosophila algonquin* e *Drosophila azteca.* Nos dois trabalhos acima citados os autores concluíram que os genes de actina estão distribuídos de forma uniforme nos cromossomos das espécies estudadas, o que reforça a hipótese de que os elementos cromossômicos em *Drosophila* mantiveram suas características durante a evolução.

A glutationa transferase (GST) desempenha um papel central na desintoxicação de compostos endógenos e xenobióticos e está também envolvida

no transporte intracelular e na biossíntese de hormônios e proteção contra o estresse oxidativo (Salinas & Wong, 1999). Existem pelo menos dois grupos de glutationa transferase distribuídos e pouco relacionados, que são classificados de acordo com sua localização dentro da célula: microssomal e citosólica. E o terceiro grupo, a classe Kappa, que está localizado nas mitocôndrias de mamíferos (Morel *et al*., 2004; Lander *et al*., 2004). Os dois primeiros grupos são estruturalmente distintos do terceiro (Robinson *et al*., 2004). Um único gene de glutationa transferase microssomal foi encontrado no genoma da *D. melanogaster* e outros três genes microssomais foram encontrados em *A. gambiae* (Toba & Aigaki, 2000; Ranson *et al*., 2002). Para os autores, estudos mais específicos devem ser realizados para determinar fatores que regulam a expressão de genes individuais de glutationa transferase, pois as atividades desses genes variam em toda a fase da vida dos insetos. Como por exemplo, em *Ae. aegypti*, a atividade total desse gene aumenta durante a fase larval, atingindo o seu auge na fase de pupa e declínio em adultos (Hazelton & Laing, 1983).

Relatos de Enayati *et al.* (2005) mostraram elevadas atividades de glutationa transferase associadas à resistência a todas as principais classes de inseticidas como o DDT (Prapanthadara *et al*., 1993; Vontas *et al*., 2001). Em alguns casos, a resistência de mosquitos a inseticidas foi atribuída ao aumento na quantidade de uma ou mais enzimas de glutationa transferase, como resultado da amplificação de um ou mais genes e geralmente através de aumentos na taxa transcricional (Ranson *et al*., 2001). Avanços em genética e bioquímica revelaram a complexidade da família glutationa transferase em insetos. As funções específicas no papel de desintoxificação de xenobióticos foram identificadas, mas ainda há muito a ser conhecido sobre o substrato endógeno de glutationa transferase em insetos (Enayati *et al*., 2005).

Estudos preliminares apontam que a glutationa transferase D1 (GstD1) pode estar relacionada com a resistência ao inseticida DDT nas espécies *D. melanogaster* (Tang & Tu, 1994) e *A. gambiae* (Ranson *et al*., 2001), pois apresenta atividade elevada. Assim como *Drosophila mojavensis* e *Drosophila arizonae* que vivem em espécies de Cactos, dentro de tecidos em processo de necrose, estes produzem alguns compostos orgânicos tóxicos aos drosofilídeos que, por sua vez, sofrem pressão seletiva, os quais evoluem apresentando resistência a esses compostos orgânicos com auxílio da GstD1 (Matzkin, 2008).

Algumas populações de *Ae. aegypti* resistentes a inseticidas têm sido detectadas ao longo de sua distribuição geográfica (Cui *et al*., 2006). Lumjuan *et al*. (2007) caracterizaram a família da glutationa transferase em *Ae. aegypti*, e encontraram 24 transcritos distintos de glutationa transferase derivados de 22 genes, os quais foram identificados no banco de dados de ESTs para a espécie; concluíram que a família de genes de glutationa transferase é surpreendentemente conservada entre *Ae. aegypti* e *A. gambiae*. Ranson *et al*. (1997) hibridizaram dois clones de cDNA (aggst1–1 e aggst1–2) da classe I de glutationa transferase em cromossomos politênicos de ovários de *A. gambiae*; as sondas hibridizaram em uma única região, a divisão 18B do cromossomo 2R.

No presente trabalho foi determinado a localização *in situ* dos produtos gênicos (lisozima, troponina, actina e glutationa transferase) do seu genoma funcional em cromossomos politênicos, para auxiliar outras pesquisas e ações futuras de estratégia racional e seletiva de controle desse importante vetor da malária, especialmente na região amazônica.

2. OBJETIVOS

- Mapear sondas de ESTs *in situ* de *A. darlingi,* a partir de um banco de ESTs de *A. darlingi* adulto.

- Localizar fisicamente genes de interesse a partir de sondas de ESTs, nos cromossomos politênicos de *A. darlingi*, pelo método de ISH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

As coletas de *A. darlingi* foram realizadas na cidade de Coari, Amazonas (4º6'S, 63º3'W) (Figura 1).

Figura 1: Mapa do local de coleta de *A. darlingi,* na cidade de Coari (em destaque no mapa), no estado do Amazonas.

3.2 Desenvolvimento de *A. darlingi*

As fêmeas de *A. darlingi* coletadas na natureza foram mantidas no insetário do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue do CPCS / INPA. A identificação dos indivíduos foi realizada segundo as chaves taxonômicas de Forattini (1962), Gorham *et al.* (1967), Faran & Linthicum (1981) e Consoli & Lourenço de Oliveira (1994).

As fêmeas coletadas no campo foram alimentadas com sangue de pato doméstico (*Cairina moschata*). A oviposição foi realizada de forma individual em copos plásticos, contendo papel de filtro umedecido. As desovas foram, então, transferidas para copos contendo água e papel filtro nas bordas. Depois da eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas com pó de fígado e farinha de peixe (Santos *et al.*, 1981; Scarpassa & Tadei, 1990).

3.3 Obtenção dos cromossomos politênicos

As preparações das lâminas dos cromossomos politênicos de *A. darlingi* foram realizadas de acordo com as técnicas descritas por French *et al*. (1962) e Kumar & Collins (1994), com modificações para *A. darlingi* (Rafael *et al.,* 2004).

As lâminas foram preparadas a partir de glândulas salivares extraídas do pró-tórax de larvas de 4º estádio sobre as quais foram adicionados os fixadores I (1,5 mL Carnoy: 5 mL água destilada), II (2 mL Carnoy: 2 mL água destilada) e III (2 mL ácido lático 90%: 2 mL água destilada). O material foi esmagado entre lâmina e lamínula, sendo esta última siliconizada. As lâminas preparadas foram armazenadas em um recipiente com papel toalha umedecido com água destilada até o momento da extração da lamínula em nitrogênio líquido e as lâminas foram mantidas em refrigerador a 20ºC negativos.

3.4 Hibridização *in situ* - ISH

3.4.1 Preparo de sonda

As sequências dos produtos gênicos: lisozima, troponina, actina e glutationa, foram retirados do banco da biblioteca de cDNA de *A. darlingi* adulto obtidas a partir do Projeto Genoma Funcional de *A. darlingi* (Rafael *et al*., 2005b; Bridi *et al*., 2006), cujas sequências gênicas estão inseridas no plasmídeo *pCMV SPORT*6 (INVITROGEN), e no vetor de clonagem *Escherichia coli* e estão estocados em placas e armazenados em freezer 80°C negativos (tabela 1). O número de acesso ao banco de dados é restrito, pois tais dados ainda não foram publicados.

Tabela 1: Sondas utilizadas para ISH, a partir de colnes de ESTs com respectivas siglas depositadas no banco da biblioteca (LNCC) e quantidade de pares de bases das sequências gênicas.

Sondas de ESTs de *A. darlingi*	**Número de pares de bases**
Lisozima (pl29-C04)	571 pb
TPA_inf: Troponina tipo C IIIa (pl27-F06)	812 pb
Actina (pl17-G06)	779 pb
Glutationa Transferase epsilon4 (pl05-A08)	889 pb

3.4.1.1.Crescimento das Colônias de *Escherichia coli* e extração do cDNA plasmidial

As bactérias contendo os clones de interesse foram repicadas em meio de cultura *Cicle Grow* (CG) em ambiente estéril e mantidas a 37°C, por 22 horas. Após este período, foi realizado um novo crescimento das colônias em 100 µL de meio CG com Ampicilina (200µg/mL) e as bactérias foram transferidas com ajuda de um replicador. A placa foi mantida a 37°C com agitação de 170 rpm, por 22 horas. A extração do cDNA plasmidial foi realizada com o kit "*Concert Rapid Plasmid Miniprep System"*, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas com marcador lambda (λ) em gel de agarose a 8%.

3.4.1.2 Marcação do DNA por *Nick translation* (Invitrogen cat. nº 18160-010)

Foram adicionados em um microtubo de 1,5 mL os seguintes reagentes:

-1µg de DNA;

- 5 µL de dNTP (*minus* dATP);

- 2,5 µL de *Biotin*-14-dATP;

- 5 µL de PolI/DNAse I.

Foi acrescentada Água Milli Q autoclavada para completar 50 µL de solução em reação. A solução foi homogeneizada e o microtubo foi colocado a 15ºC no termociclador por 90 minutos. Em seguida, acrescentou-se 5 µL de *Stop Buffer;* 1,25 µL de SDS 5%; 28,12 µL de acetato de amônia (7,5 M); 168,74 µL de Etanol 98%. A amostra permaneceu *over-night* a 20ºC negativos.

3.4.1.3 Purificação e precipitação da sonda

Após o período de *over-night*, o material do microtubo foi centrifugado por 45 minutos a 4ºC a 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado com cuidado para não deslocar o *pellet*; foi adicionado 100 µL de Etanol 70% (gelado) e retirado logo em seguida. Foi adicionado novamente 100 µL de Etanol 70% (gelado) e centrifugou-se por 20 minutos a 4 ºC a 13.000 rpm. O microtubo foi levado à estufa a 37ºC até ocorrer sua secagem completa. O *pellet* foi ressuspendido em 75 µL de solução de hibridização, cujo conteúdo consta dos seguintes reagentes:

- 100 µL de 20x SSC;

- 200 µL de Dextran Sulfato 50%;

- 500 µL de Formamida;

- 200 µL de Água Milli Q autoclavada.

Os procedimentos acima foram os mesmos utilizados para as marcações das demais sondas utilizadas.

3.4.2 Pré-tratamento das lâminas e desnaturação da sonda

O pré-tratamento das lâminas consistiu de desnaturação dos cromossomos politênicos de *A. darlingi.* As lâminas foram mergulhadas em cubeta contendo 2x SSC a 65ºC por 55 minutos, em seguida permaneceram à temperatura ambiente (T.A.) até atingirem 35ºC. As lâminas foram transferidas para 2x SSC a T.A. por 5 minutos. Em seguida foram colocadas em cubeta, contendo NaOH (0,14 M) com 2xSSC a T.A. por 2 minutos. Foram transferidas para 2x SSC a T.A., por 5 minutos por duas vezes. Depois desidratadas em Etanol 70% por 10 minutos, este último passo, foi repetido por duas vezes. Em seguida, novamente desidratadas em Etanol 95% por 10 minutos. As lâminas permaneceram a T.A. até secarem completamente.

A desnaturação da sonda foi a 65ºC no termociclador por 5 minutos, em seguida colocada em gelo por 5 minutos.

3.4.3 Hibridização *in situ* e detecção dos sinais

Para a hibridização *in situ*, utilizou-se o método de LIM (1993). Foram aplicados 15 µL de sonda sobre as preparações citológicas, contendo os complementos politênicos de *A. darlingi*. As lâminas foram cobertas com lamínulas de 18x18 centímetros e transferidas para uma câmara úmida (recipiente com papel toalha umedecido) e levadas à estufa por 37ºC, para hibridização *in situ* por 20 horas.

Para a detecção dos sinais, as lâminas foram colocadas em 2xSSC a 37ºC, para a retirada da lamínula. Em seguida foram lavadas em 2xSSC a 37ºC, durante 10 minutos, por duas vezes. As lâminas foram colocadas em PBS 1X a T.A. durante 5 minutos, por duas vezes. Foram transferidas para uma cubeta, contendo Triton-x-100 (0,1%) com PBS 1x; depois lavadas com PBS 1x em T.A., por 5 minutos. Aplicou-se 200 µL de Tris com a adição dos reagentes A e B (kit de detecção *Vectastain* ABC - Cat. No. PK 6100) sobre cada lâmina. Estas foram cobertas com lamínulas de 32x22 centímetros, colocadas em câmara úmida e levadas para estufa a 37ºC, por 30 minutos. A lamínula foi retirada em PBS 1x, e as lâminas lavadas

duas vezes em PBS 1x a T.A., por 5 minutos. Em seguida foram transferidas para uma cubeta contendo DAB (*diaminobenzidine tetrahydrochloride* - Sigma, Cat. No. D-5637) e acrescidos o Tris e Peróxido de hidrogênio a 37ºC, por 20 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS 1x a T.A., por 5 minutos. Em seguida lavadas novamente em água Milli-Q, por duas vezes, durante 5 minutos. Para coloração da lâmina pingou-se Giemsa 1% em tampão fosfato sobre cada lâmina que secaram a T.A., por 10 minutos. Para tornar as lâminas permanentes, foi adicionada uma gota de Entellan (Merck), cobertas com lamínula 22x22 centímetros e colocadas para secar. Após isso, as hibridizações *in situ* foram visualizadas em microscópio de luz.

3.5 Microfotografias

Os cromossomos politênicos foram fotografados com auxílio de máquina fotográfica digital e analisados em microscópio de luz *Axioplan Zeiss*, campo claro e contraste de fase, com objetiva de 100x e ocular projectiva 10x/25.

4. RESULTADOS

As lâminas cujas preparações citológicas permaneceram com morfologia adequada para análise dos sinais totalizaram 125 lâminas. A perda de material cromossômico, durante a extração de lamínulas em nitrogênio líquido foi expressiva, pois foram descartadas 107 lâminas. Para a hibridização *in situ* foram utilizadas 39 lâminas, nas quais utilizamos 9 sondas, mas somente 4 sondas mostraram sinais de hibridização com os núcleos politênicos salivares de *A*. *darlingi*: lisozima (pl29-C04), TPA_inf: troponina C *type* IIIa (pl27-F06), actina (pl17-G06) e glutationa transferase *epsilon*4 (pl05-A08).

O desenho do mapa de referência de Kreutzer *et al.* (1972) e o fotomapa do *A. darlingi* (Rafael *et al.*, em preparação) foram essenciais para confirmação das localizações das regiões hibridizadas, como mostra a figura 2, no mapeamento físico das sondas de ESTs localizadas no fotomapa de *A. darlingi*.

No braço cromossômico 2R hibridizaram os genes da lisozima em uma das bandas escuras entre as seções 8C e 8D (Figura 3) e o gene da troponina na seção 14B (Figura 4). No braço cromossômico 2L obtivemos marcações *in situ* dos genes de actina na seção 23 (Figura 5) e o gene da glutationa transferase, hibridizou na seção 16C (Figura 6).

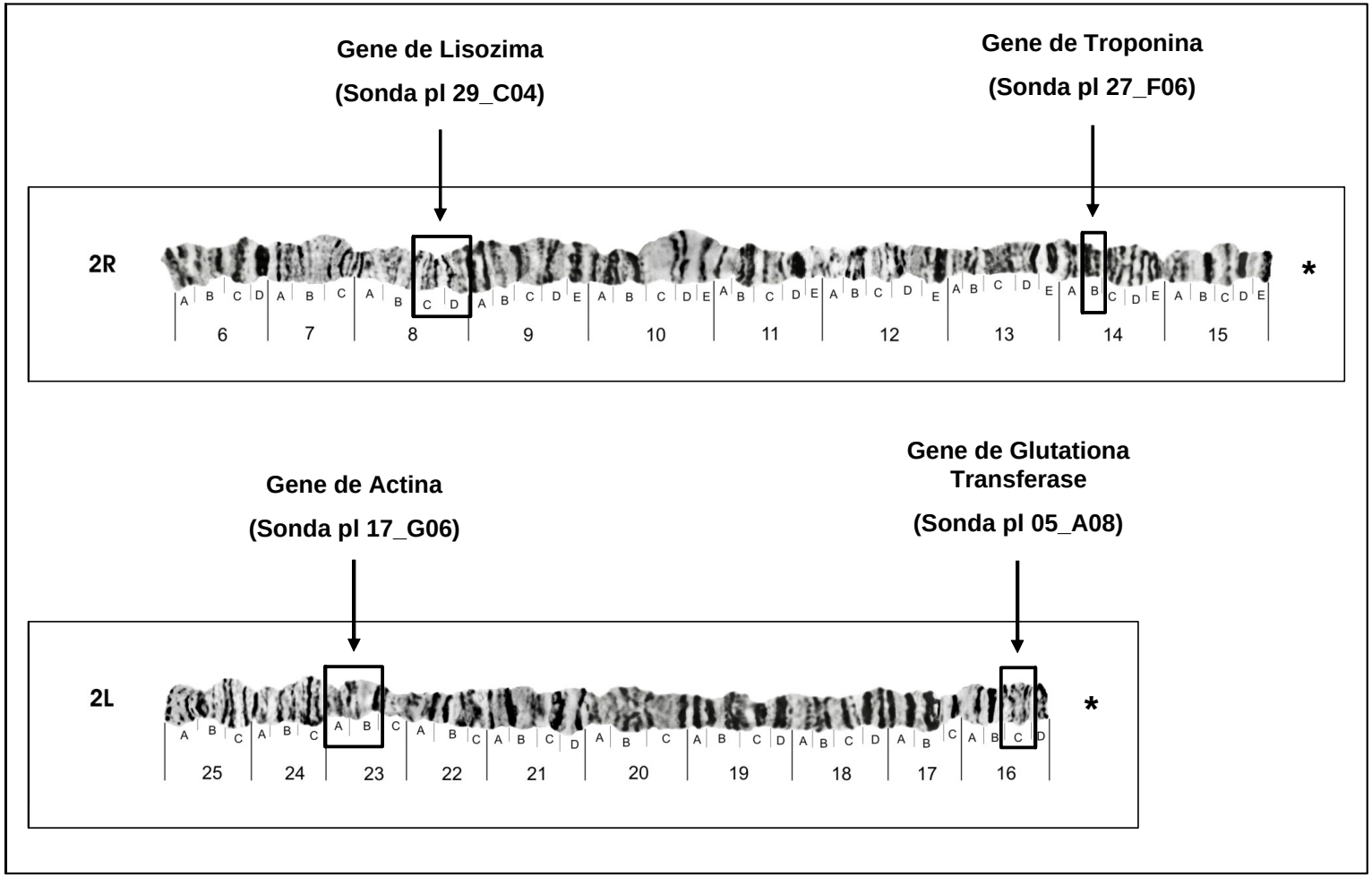

Figura 2: Localização física das 4 sondas de ESTs de *A. darlingi* (setas) no fotomapa (Rafael *et al*., em preparação) do cromossomo politênico 2, braços 2R e 2L. Os asteriscos indicam as localizações dos centrômeros.

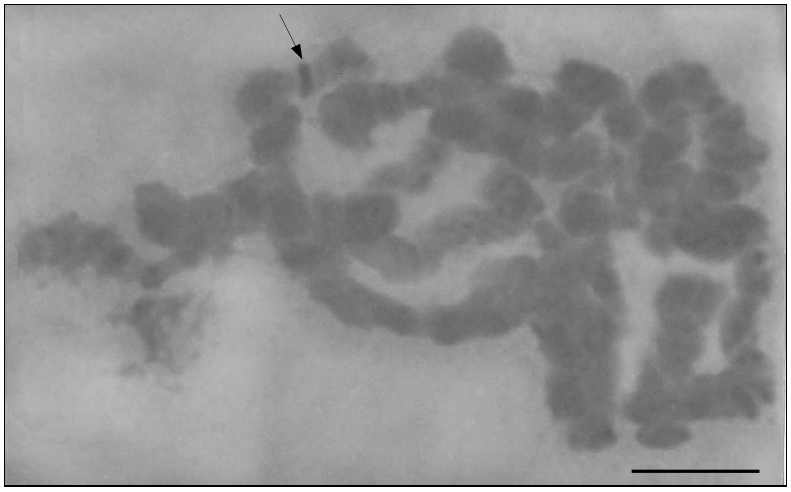

Figura 3: Mapeamento do gene da lisozima (pl29-C04) no cromossomo politênico 2, braço 2R, nas seções 8C e 8D (seta). Barra: 10µm.

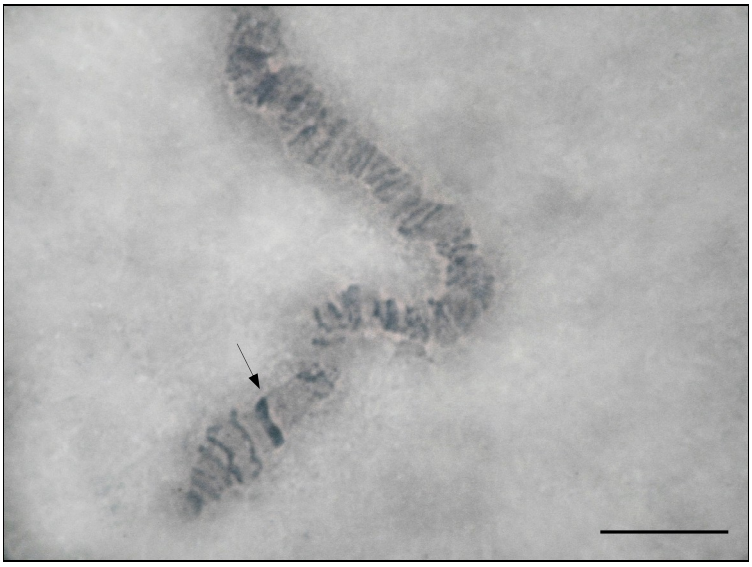

Figura 4: Mapeamento do gene da troponina (pl27-F06) no cromossomo 2, braço 2R, na seção 14B (seta). Barra: 10µm

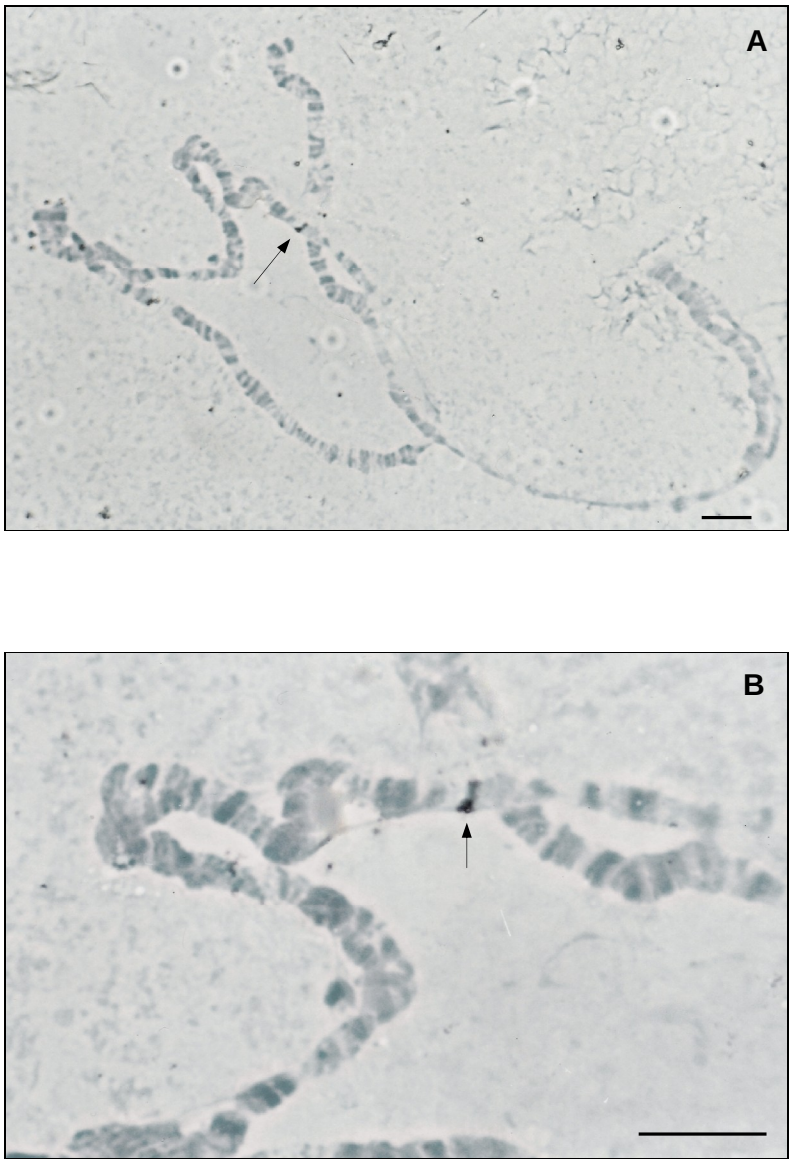

Figura 5: **A.** Mapeamento do gene de actina (pl17-G06) hibridizado no braço cromossômico 2L, seção 23 A e B (seta). Barra: 10µm. **B.** Aumento de 100x do sítio de hibridização. Barra: 10 µm

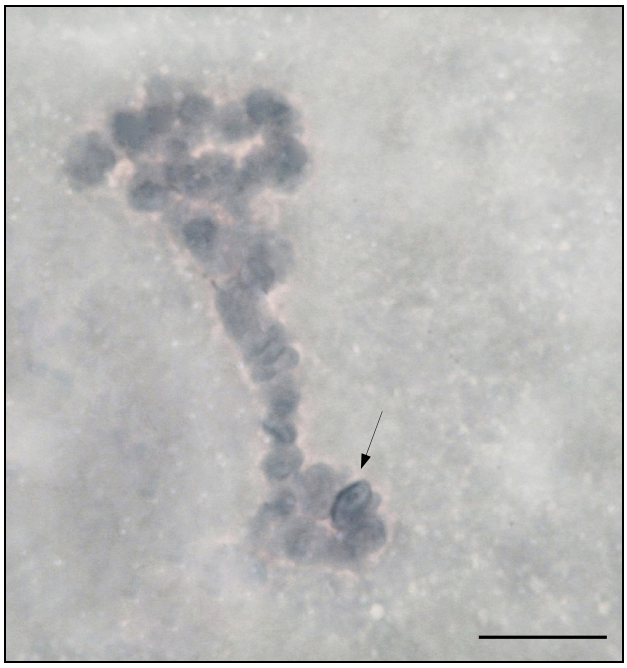

Foto 6: Mapeamento do gene da glutationa transferase (pl05-A08), localizado no braço cromossômico 2L, seção 16C (seta). Barra: 10µm.

5. DISCUSSÃO

Utilizamos neste estudo os genes lisozima, TPA_inf: troponina tipo C IIIa, actina e glutationa transferase epsilon4, do banco de ESTs do genoma funcional do *A. darlingi* (http:www.lncc.br e http:www.cenargen.embrapa.br), para o mapeamento *in situ* em cromossomos politênicos desse mosquito. Tais genes foram escolhidos, dada a sua importância nas funções biológica, molecular e processo metabólico mencionados anteriormente.

O mapeamento físico cromossômico em mosquitos vetores da malária na América do Sul ainda são escassos (Rafael, 2004). Cita-se o mapeamento físico de genes para o DNA repetitivo (DNAr) em cromossomos mitóticos e politênicos de *A. darlingi, Anopheles nuneztovari* (Rafael *et al.,* 2003) e *Anopheles albitarsis stricto sensu* (Rafael *et al*., 2006), da Amazônia brasileira. Nos cromossomos mitóticos dessas espécies o par sexual foi mapeado pelo DNAr na região pericentromérica, o que demonstrou relação direta da heterocromatina constitutiva (banda C) com a NOR. Os genes ribossomais apresentaram distribuição diferente dentro dos blocos de heterocromatina constitutiva do par sexual de ambas as espécies. Em núcleos politênicos de *A. darlingi* e *A. nuneztovari* (Rafael *et al.,* 2003), a sonda de DNAr mapeou grânulos de DNA ribossômico no cromossomo politênico X e no nucléolo, e mostrou diferentes localizações da NOR e distribuição de grânulos do DNAr.

As marcações *in situ* das sondas lisozima, TPA_inf: troponina tipo C IIIa, actina e glutationa transferase epsilon4, foram detectadas no fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al*., manuscrito em preparação) de uma maneira mais precisa. Isto porque este Fotomapa foi construído de amostras de área periférica da bacia amazônica brasileira, localidade de Guajará-Mirim, estado de Rondônia, fronteira do Brasil com a Bolívia. Essas amostras possuem menos polimorfismo de inversões cromossômicas, quando comparadas às amostras de *A. darlingi* da Amazônia central (mapa de referência de Kreutzer *et al*., 1972), o qual foi construído com núcleos politênicos das localidades de Manaus, Alixia e Itacoatiara (estado do Amazonas) e Araraquara (estado de São Paulo), que apresentam alto grau de inversões polimórficas. As novas sub-seções cromossômicas encontradas no Fotomapa proposto por Rafael *et al*. (*op cit.*) possibilitaram a detecção *in situ* mais refinada das sequências gênicas (sondas) utilizadas neste trabalho.

Considerando a lisozima, esta tem sido encontrada no trato digestivo de larvas e adultos e em glândulas salivares de dípteros, sugerindo seu papel na

digestão (Ursic Bedoya *et al*., 2005) e por mais de 40 anos seu papel tem sido implicado, também, na defesa anti bacteriana (Malke, 1965). O gene da lisozima foi mapeado em *A. gambiae*, com mapeamento gênico de baixa resolução por *Dot Blot*, e foi encontrado no braço 2L, divisão 27 (Kang *et al*.,1996). Os autores concluíram que o gene da lisozima é altamente conservado entre *Anopheles*, *Hyalophora* e *Drosophila.* Posteriormente, Sharakhov *et al*. (2002) também mapearam o gene da lisozima em *A. gambiae* e o localizaram no mesmo braço cromossômico, região 27D, mas em *A. funestus*, foi mapeado no cromossomo 3R, seção 30A. Os autores sugerem que pode ter ocorrido uma translocação entre os braços 2L e 3R, com base no comprimento relativo e padrão de bandeamento; o que explicaria a lisozima ter sido mapeada nos diferentes braços cromossômicos de *A. gambiae* e *A. funestus*.

Na família tipo-c da lisozima de *A. gambiae* foram encontrados sete novos tipos, totalizando oito genes, que foram denominados Lys c-1 a Lys c-8. Os genes estão divididos em dois conjuntos: o primeiro com os genes Lys c-1, Lys c-2, Lys c-3, Lys c-5, Lys c-8; e o segundo Lys c-4 e Lys c-7. Li *et al*. (2005) mapearam esses dois conjuntos de genes na mesma localização dos trabalhos anteriormente citados, braço 2L, região 27D; apenas o gene Lys c-6 foi localizado na região 22A do mesmo braço cromossômico. Os autores concluem que a lisozima em *A. gambiae* sofreu uma extensiva radiação e possui uma divergência evolutiva.

Em *A. darlingi* foi identificada a marcação do gene da lisozima no cromossomo 2R, seções 8C e 8D. Kreutzer *et al.* (1972) registraram uma inversão envolvendo as regiões 8A-8C (braço 2R). Tais inversões para esse braço cromossômico não são comuns no estado heterozigoto e os arranjos homozigotos para esta inversão são raros. No braço 2R, a presença de três inversões paracêntricas separadas: região 8A-8C, 10A-10B e 12A-12-B, resultam em oito diferentes padrões de bandeamento, corroborando com os dados de que populações de *A. darlingi* da região amazônica são altamente polimórficas, cujo grau de polimorfismo pode estar ligado à capacidade vetorial e a sua ampla distribuição.

Uma caracterização molecular dos genes de lisozima e seu padrão de expressão nos tecidos de indivíduos adultos podem estabelecer a base para investigações futuras a respeito de sua importância funcional em mosquitos. Alguns perfis de expressão indicam que os genes de lisozima podem estar ligados com a resposta imune. O fato de que vários genes expressos de lisozima são encontrados em grande quantidade na fase adulta pode estar ligado com as localizações únicas

nos sítios de hibridização, cujas sondas utilizadas para o mapeamento *in situ* foram de sequências de cDNA de adulto, o que pode sugerir ser o gene da lisozima um bom marcador para estudo de evolução cromossômica e organização genômica de *A. darlingi*.

A localização cromossômica para os genes ortólogos de troponina não é conservada entre os gêneros *Drosophila* e *Anopheles* (Sharakhov *et al*., 2002). A *Drosophila* era o único inseto no qual a troponina tipo C (TpnC) tinha sido estudada até 2003, pois Qiu *et al*. (2003) identificaram as isoformas de TnpC em músculos de *Lethocerus indicus* e as compararam com as isoformas similares em *D. melanogaster* e *A. gambiae.* Os autores destacam as localizações cromossômicas para as quatro isoformas de TnpC encontradas em *D. melanogaster*, presentes no braço 2R estão: DmTnC1 localizada na posição 41E, DmTnC2 na posição 47E e DmTnC4 na posição 41F; e no braço 3L a isoforma DmTnC3 na posição 73E. Para *A. gambiae* também são apresentadas quatro isoformas, das quais três delas estão presentes no braço 2L: AgTnC1 localizado na posição 22B-25D, AgTnC2 na posição 25D-28D, AgTnC3 na posição 22B-25D, e no braço 3R a presença da isoforma AgTnC4 na posição 33D-34A.

A localização cromossômica da proteína TpnC III em *D. melanogaster* foi encontrada por Herranz *et al*. (2005b) na região 41F do braço cromossômico 2R, mesma localização encontrada por Qiu *et al*. (2003) para troponina tipo C. Os genes TpnC IIIa e TpnC IIIb estão separados por 450 kb e em *A. gambiae* o gene TpnC III foi encontrado na região 25D do braço cromossômico 2L (Qiu *et al*., 2003) . Os genes de TpnC também são cromossomicamente dispersos em *Apis mellifera*, embora as localizações genômicas precisas ainda são desconhecidas. A troponina hibridizou, no presente trabalho, no braço 2R, seção 14B. Tadei *et al*. (1982) descreveram uma inversão nas seções 14A-14C nesse braço cromossômico. O braço cromossômico 2R, além de ser o maior braço do complemento politênico de *A. darlingi*, é o braço que apresenta maior número de inversões, como também ocorre em *A. gambiae* (Coluzzi & Kitzmiller, 1975). Kreutzer *et al*. (1972) quando estudaram populações de *A. darlingi* da Amazônia observaram alta incidência de inversões no estado heterozigoto nessa espécie. Segundo Da Cunha (1950), a quantidade de polimorfismo cromossômico tende a ser proporcional às variedades de habitats explorados por determinada espécie.

Em relação a isoforma tipo C IIIa da troponina estudada no presente trabalho, há um rápido aumento no número e especialização de tais sequências correlacionado com o desenvolvimento e funções dos músculos em insetos durante o processo evolutivo. Isso pode sugerir que a troponina é um bom marcador cromossômico para estudos evolutivos de *A. darlingi.*

A actina na maioria dos eucariotos possui uma sequência gênica altamente conservada (Hennessey *et al*., 1993). Vários trabalhos sugerem que as diferentes isoformas de actina possuem propriedades únicas, mas é conhecido também, que as isoformas não estão distribuídas de maneira uniforme nas células. Uma das principais isoformas, ausente nos músculos, é a ß-actina que juntamente com o RNA mensageiro que a codifica estão localizados nas membranas celulares (Hoock *et al*., 1991; Singer, 1992), sugerindo que as isoformas se apresentam de acordo com as funções subcelulares. A excessiva expressão ectópica de isoformas de actina em culturas de células confere fenótipos distintos (Scheznov *et al*., 1992), sugerindo novamente que as diferentes isoformas possuem propriedades únicas. Essas observações indicam que as isoformas de actina não possuem funcionalidades equivalentes, considerando as correlações das sequências com seus padrões de expressão. Segundo Fyrberg *et al*. (1983) há seis isoformas de actina para *D. melanogaster*, divididas em três pares: Act5C (mapeada no cromossomo X) e Act42A (localizada no cromossomo 2R), expressas no citoesqueleto; Act57B (mapeada no cromossomo 2R) e Act87E (localizada no cromossomo 3R), expressas em músculos de larvas e adultos e, por último, Act79B (localizado no cromossomo 3L) e Act88F (localizado no cromossomo 3R), expressas em músculos relacionadas ao vôo.

Fyrberg *et al*. (1994) isolaram e caracterizaram genes de proteínas relacionados com a codificação da actina em *D. melanogaster* e identificaram suas localizações nos cromossomos politênicos com a metodologia de hibridização *in situ*. Foram encontrados quatro genes, os quais foram designados: Arp14D, localizado na região 14D do cromossomo X; Arp53D, localizado na região 53D do braço cromossômico 2R; Arp66B, localizado no braço 3L cujo mapeamento foi realizado por Fyrberg & Fyrberg (1993) e Arp87C, localizado no braço 3R. O gene Arp53D não apresentou nenhuma similaridade com sequências de outros genes de actina depositados nos bancos de dados públicos. Então, os autores concluíram que era um gene novo e expresso apenas em machos.

No presente trabalho o gene da actina hibridizou em um único sítio do cromossomo 2, braço 2L, na seção 23 A-B de *A. darlingi*. Sharakhov *et al.* (2002) utilizando a metodologia de FISH, registrou única localização do gene de actina em núcleos politênicos de células nutridoras do ovário de *A. gambiae*, encontrando-o na seção 43B e em *A. funestus* seção 46D, ambos no braço 3L. Os autores sugerem que pode ter ocorrido um evento de transposição entre os braços 2L e 3L, o que responderia as diferenças sítios distintos de hibridizações do gene actina nos braços cromossômicos de *A. gambiae* e de *A. darlingi* do presente estudo.

No estudo de Kreutzer et al. (1972), a inversão descrita para o braço 2L de *A. darlingi* foi na região 22B-21A, que é composta por três diferentes rearranjos, todos são compostos por uma inversão paracêntrica simples, dois rearranjos são de populações cuja coleta foi realizada no estado de São Paulo e a terceira é da cidade de Manaus, e este último pode envolver a seção 23 B, mesma região hibridizada pelo gene de actina (Kreutzer *et al*., 1972). Posteriormente uma região de despareamento foi descrita para o braço 2L, na região 18A-18B (Tadei et al., 1982). Considerando que a actina é uma proteína encontrada em todas as células de eucariotos, é altamente conservada evolutivamente nos níveis nucleico e de sequências de aminoácidos (Sodja *et al*., 2007), exerce papel importante na determinação da forma celular, contração muscular, movimento celular e cromossômico, fagocitose e sinalização intracelular sugere-se, então, que esta proteína pode ser um excelente marcador para estudos de evolução cromossômica e de organização genômica de *A. darlingi*.

As glutationas transferases são enzimas multifuncionais que podem ser encontradas na maioria dos eucariotos aeróbios e procariotos (Frova, 2006). São conhecidas por seu papel na desintoxicação, que catalisa uma conjugação entre a GSH e várias combinações tóxicos eletrofílicas. A classe Delta, que é específica de insetos é de interesse particular, têm potencial para conferir resistência a grupos importantes de inseticidas e desempenhem um papel vital em proteger as células contra danos oxidativos (Ranson & Hemingway, 2005). Uma segunda grande classe de glutationa transferase é a Epsilon, também restrita a insetos (Ranson *et al*., 2001). As classes Delta e Epsilon têm expandido de forma independente em *D. melanogaster* e *A. gambiae*, sugerindo que estas enzimas desempenham um papel importante na adaptação dessas espécies (Ranson *et al*., 2002; Enayati *et al*., 2005). As classes Epsilon e GSTE2, têm sido associadas à resistência a DDT em *A.*

gambiae do Leste da África e *Ae. aegypti* da Tailândia (Ding *et al*., 2003; Lumjuan *et al*., 2005). Além das classes Delta e Epsilon, há outras quatro classes: Omega, Sigma, Theta e Zeta (Ranson *et al*., 2001), totalizando seis classes, cujos membros já foram identificados em *A. gambiae* e *D. melanogaster* (Ranson *et al*., 2002). Em *A. darlingi*, presente trabalho, o gene da glutationa transferase, classe epsilon, foi hibridizado no cromossomo 2L, seção 16C.

Ranson *et al*. (2000, 2001) registraram que no cromossomo 3R, divisão 33B contém o maior *locus* relacionado com resistência a DDT em *A. gambiae*, e estudos posteriores localizaram um cluster com oito sequências de glutationa transferase dentro desta região genômica (Ranson *et al*., 2002). Ranson (*et al.,* 2001) relatam a descoberta de uma nova classe de glutationa transferase, classe III, onde encontra-se os dois maiores *loci* relacionados com a resistência a DDT em *A. gambiae* e a classe epsilon: o primeiro é *loci* rtd1, que está localizado no cromossomo 3R entre as divisões 32C e 34C; o segundo é o *loci* rtd2, localizado no cromossomo 2L próximo a região 21, tal resultado está mais próximo daquele que foi encontrado para *A. darlingi*, região 16 C, braço 2L; o que responderia tal proximidade nas regiões hibridizadas entre *A. darlingi* e *A. gambiae* o alto grau de polimorfismo de inversões presentes em *A. darlingi* (Kreutzer *et al*., 1972; Tadei *et al*., 1982). Outra localização para hibridização da glutatona transferase foi encontrada por Sharakhov *et al*. (2002), seção 38B em *A. gambiae* e seção 38C em *A. funestus*, ambos no cromossomo 3L.

O estudo relacionado á glutationa transferase é de extrema importância tendo em vista seu papel na resistência ao DDT. Já que algumas classes de glutationa trasnferase são específicas a indivíduos na fase adulta, há provavelmente muitos genes ortólogos dentro da classe Epsilon (Strode *et al*., 2008), como o gene utilizado no presente estudo, cujo papel fisiológico em mosquitos ainda é desconhecido. Podemos sugerir, então, que o gene de glutationa transferase é um bom marcador no processo evolutivo de suas diferentes classes.

Os genes da lisozima, troponina, actina e glutationa transferase de *A. darlingi* são considerados bons marcadores para estudos de evolução cromossômica, organização genômica e relações entre populações de *A. darlingi*. O presente trabalho de mapeamento físico cromossômico dessas ESTs em *A. darlingi* representa a continuidade do estudo com genes expressos, iniciado por Rafael *et al*.

(2004) nesse mosquito, que é considerado historicamente o principal vetor da malária no Brasil.

6. CONCLUSÕES

- Considerando o alto grau de polimorfismo de inversões de *A*. *darlingi*, e que os genes da lizosima, troponina, actina e glutationa transferase hibridizaram em localizações únicas, diferente das hibridizações encontradas para espécies como *A. gambiae, A. funestus e D. melanogaster*, sugerem-se que os genes mapeados em *A. darlingi* podem ser úteis como marcadores genéticos para estudo da organização genômica desse mosquito.

- O presente mapeamento físico cromossômico, utilizando sondas de ESTs de *A. darlingi* representa uma oportunidade única para compreender a estrutura e organização do seu genoma, a biologia evolutiva e variabilidade cromossômica. Além de estudos futuros sobre as sintenias das localizações cromossomicas das sondas utilizadas no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Adams, M.D.; Celniker, S. E.; Holt, R. A.; Evans, C.A.; Gocayne, Amanatides, P.G.; Scherer, S.E.; Li, P.W.; Hoskins, R.A.; Galle, R.F.; George, R.A.; Lewis, S.E.; Richards, S.; Ashburner, M.; Henderson, S.N.; Sutton, G.G.; Wortman, J.R.; Yandell, M.D.; Zhang, Q.; Chen, L.X.; Brandon, R.C.; Rogers, Y.H.C.; Blazej, R.G.; Champe, M.; Pfeiffer, B.D.; Wan, K.H.; Doyle, C.; Baxter, E.G.; Helt, G.; Nelson, C.R.; Miklos, G.L.G.; Abril, J.F.; Agbayani, A.; An, H.J.; Andrews-Pfannkoch, C.; Baldwin, D.; Ballew, R.M.; Basu, A.; Baxendale, J.; Bayraktaroglu, L.; Beasley, E.M.; Beeson, K.Y.; Benos, P.V.; Berman, B.P.; Bhandari, D.; Bolshakov, S.; Borkova, D.; Botchan, M.R.; Bouck, J.; Brokstein, P.; Brottier, P.; Burtis, K.C.; Busam, D.A.; Butler, H.; Cadieu, E.; Center, A.; Chandra, I.; Cherry, J.M.; Cawley, S.; Dahlke, C.; Davenport, L.B.; Davies, P.; Pablos, B.de; Delcher, A.; Deng, Z.; Mays, A.D.; Dew, I.; Dietz, S.M.; Dodson, K.; Doup, L.E.; Downes, M.; Dugan-Rocha, S.; Dunkov, B.C.; Dunn, P.; Durbin, K.J.; Evangelista, C.C.; Ferraz, C.; Ferriera, S.; Fleischmann, W.; Fosler, C.; Gabrielian, A.E.; Garg, N.S.; Gelbart, W.M.; Glasser, K.; Glodek, A.; Gong, F.; Gorrell, J.H.; Gu, Z.; Guan, P.; Harris, M.; Harris, N.L.; Harvey, D.; Heiman, T.J.; Hernandez, J.R.; Houck, J.; Hostin, D.; Houston, K.A.; Howland, T.J.; Wei, M.H.; Ibegwam, C.; Jalali, M.; Kalush, F.; Karpen, G.H.; Ke, Z.; Kennison, Ketchum, K.A.; Kimmel, B.E.; Kodira, C.D.; Kraft, C.; Kravitz, S.; Kulp, D.; Lai, Z.; Lasko, P.; Lei, Y.; Levitsky, A.A.; Li, J.; Li, Z.; Liang, Y.; Lin, X.; Liu, X.; Mattei, B.; McIntosh, T.C.; McLeod, M.P.; McPherson, D.; Merkulov, G.; Milshina, N.V.; Mobarry, C.; Morris, J.; Moshrefi, A.; Mount, S.M.; Moy, M.; Murphy, B.; Murphy, L.; Muzny, D.M.; Nelson, D.L.; Nelson, D.R.; Nelson, K.A.; Nixon, K.; Nusskern, D.R.; Pacleb, J.M.; Palazzolo, M.; Pittman, G.S.; Pan, S.; Pollard, J.; Puri, V.; Reese, M.G.; Reinert, K.; Remington, K.; Saunders, R.D.C.; Scheeler, F.; Shen, H.; Shue, B.C.; Sidén-Kiamos, I.; Simpson, M.; Skupski, M.P.; Smith, T.; Spier, E.; Spradling, A.L.; Stapleton, M.; Strong, R.; Sun, E.; Svirskas, R.; Tector, C.;

Turner, R.; Venter, E.; Wang, Wang, X.; Wang, Z.V.; Wassarman, D.A.; Weinstock, G.M.; Weissenbach, J.; Williams, S.M.; Woodage, T.; Worley, K.C.; Wu, D.; Yang, S.; Yao, Q.A.; Ye, J.; Yeh, R.F.; Zaveri, J.S.; Zhan, M.; Zhang, G.; Zhao, Q.; Zheng, L.; Zheng, X.H.; Zhong, F.N.; Zhong, W.; Zhou, X.; Zhu, S.; Zhu, X.; Smith, H.O.; Gibbs, R.A.; Myers, E.W.; Rubin, G.M.; Venter. J.C. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster. Science*. 287: 2185-2195.

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.

Arruda, M.; Carvalho, M.B.; Nussenzweig, R.S.; Maracic, M.; Ferreira, A.W.; Cochrane, A.H. 1986. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Northern Brazil identified by immunoassay. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 35 (5): 873-881.

Barbas, J.A.; Galceran, J.; Krahjentgens, I.; Delapompa, J.L.; Canal, I.; Pongs, O.; Ferrus, A. 1991. Troponin-I is encoded in the haplolethal region of the shaker gene-complex of *Drosophila*. *Genes & Development*. 5(1): 132-140.

Bass, C.; Williamson, M.S.; Wilding, C.S.; Donnelly, M.J.; Field, L.M. 2007. Identification of the main malaria vectors in the *Anopheles gambiae* species complex using a TaqMan real-time PCR assay. *Malaria Journal*. 6:155.

Benedict, M.Q.; Cockburn, A.F.; Seawright, J.A. 1993. The Hsp70 heat-shock gene family of the mosquito *Anopheles albimanus*. *Insect Mol. Biol*. 2 (2): 93-102.

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

Boutanaev, A.M.; Kalmykova, A.I.; Shevelyov, Y.Y.; Nurminsky, D.I. 2002. Large clusters of co-expressed genes in the *Drosophila* genome. *Nature* 420:666–669.

Bridi, L.C; Tadei, W.P.; Nunes-Silva; C.G; Astolfi-Filho, S.; Santos, J.M.M dos; Rafael, M.S. 2006. Biblioteca de cDNA de Larva de *Anopheles darlingi* (Diptera; Culicidae). Anais do II Encontro de Genética do Norte: *II Engenor*, Belém, PA. 1: 26-26.

Caccone, A.; Min, G.S.; Powell, J.R. 1998. Multiple origins of cytologically identical chromosome inversions in the *Anopheles gambiae* complex. Genetics 150: 807–814.

Calvo, E.; Andersen, J.; Francischetti, I.M; Capurro, M. deL.; deBianchi, A.G.; James, A.A.; Ribeiro, J.M.C.; Marinotti, O. 2004. The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. *Insect Molecular Biology*. 13 (1): 73–88

Calvo, E.; Dao, A.; Pham, V.M.; Ribeiro, J.M.C. 2007. An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37, 164–175.

Calvo, E.; Pham, V.M; Marinotti, O.; Andersen, J.J; Ribeiro, J.M.C. 2009. The salivary gland transcriptome of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* reveals accelerated evolution of genes relevant to hematophagy. *BMC Genomics*.10:57.

Carlson, D.A. & Service, M.W. 1980. Identification of mosquitoes of *Anopheles gambiae* species complex A and B by analysis of cuticular components. *Science.* 207:1089-1091.

Chaudhry, S. 1986. Sex chromosome in mosquitoes. I. NOR associated gene activation and asynapsis in the salivary X-chromosome of *Anopheles subpictus* (Culicidae: Diptera). *Caryologia*. 39 (2): 211 – 215.

Coetzee, M.; Craig, M.; le Sueur D. 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol. Today*. 16:74-77.

Coetzee M. 2004. Distribution of the African malaria vectors of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg*. 70(2): 103-104.

Collins, F.H.; Kamau, L.; Ranson, H.A.; Vulule, J.M.; 2000. Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bull. World Health Organ.* 78: 1412-1423.

Coluzzi, M. & Kitzmiller, J.B, 1975. Anopheline mosquitoes. In: Handbook of Genetics (R.C. King. ed.) vol 3, Charpter 12, pp. 289-309. New York. Plenum.

Coluzzi, M.; Sabatini, A.; Petrarca, V.; Dideco, M.A. 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 intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. Boll Zool 52: 45–63.

Conn, J.E.; Freitas-Sibajev; M.G.R.; Luz, S.L.B.; Momen, H. 1999. Molecular population genetics of the primary neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. *J. Am. Mosq. Control Assoc.,* 15: 468- 474.

Conn, L.E. & Mirabello, L. 2007. The biogeography and population genetics of neotropical vector species. *Heredity*. 99 (3): 245-256.

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

Cui, F.; Raymond, M.; Qiao, C.L. 2006. Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. *Pest Manag. Sci.* 62, 1013–1022.

Da Cunha, A.B. 1955. Sobre duas raças de *Drosophila neocardini* Streisinger. Rev. Brasil. Biol. 15: 117-125.

Daffre, S.; Kylsten, P.; Samakovlis, C.; Hultmark, D. 1994. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol Gen Genet.* 242: 152-162.

Davidson, G. 1964. The five mating-types in the *Anopheles gambiae* complex *Riv. Malariol*. 43: 167.

Deane, L.M. 1992. Os grandes marcos na história do controle da malária no Brasil. *Rev. Soc. Brasil Med. Trop.* 25 (supl II): 12-22.

della Torre, A.; Favia, G.; Mariotti, G.; Coluzzi, M.; Mathiopoulos, K.D. 1996. Physical map of the malaria vector *Anopheles gambiae. Genetics*, 143: 1307-1311.

Ding, Y.; Ortelli, F.; Rossiter, L.C.; Hemingway, J.; Ranson, H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*. 4: 35.

Drezza, A.L.; Carvalho, B.O.; Uchima, C. A.; Nascimento, E. O.; Martini, I.J.; Oliveira, L.P.; Fregolente, M.C.D.; Carvalho, R.A.; Tsuneda, S.S.; Menossi, M. 2002. Análise *in silico* de proteínas desconhecidas da cana (*Saccharum Sp*). *X Congresso Interno de Iniciação Cientifica*, 25/09 - 26/09, pp 57-57. UNICAMP.

Dudley, R. 2000. *The biomechanics of insect flight: form, function, evolution.* Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 476p.

Enayati, A.A.; Ranson, H.; Hemingway, J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*. 14 (1): 3–8.

Faran, M.E. & Linthicum, K.J. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst*., 13 (1): 01-81.

Favia, G.; Lanfrancotti, A.; Spanos, L.; Siden-Kiamos, I.; Louis, C. 2001. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae s.s. Insect Mol. Biol*. 10:19-23.

Filatov, V.L.; Katrukha, A.G.; Bulargina, T.V.; Gusev, N.B. 1999. Troponin: Structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry (Mosc)*. 64:969–985.

Forattini, O.P. *Culicidologia Médica*. 2002. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. vol 2: 860 pp.

Forattini, O.P. *Entomologia Médica*. 1962. Faculdade de Saúde e Higiene Pública da USP. Editora da USP. vol 1: 662 p.

Fowlkes, C.C., Luengo Hendriks, C.L., Keränen, S.V., Weber, G.H., Rübel, O., Huang, M.-Y., Chatoor, S., DePace, A.H., Simirenko, L., Henriquez, C., Beaton, A.; Weiszmann, R.; Celniker, S.; Hamann, B.; Knowles, D.W.; Biggin, M.D.; Eisen, M.B.; Malik, J. 2008. A Quantitative Spatiotemporal Atlas of Gene Expression in the *Drosophila* Blastoderm. *Cell*. 133 (2): 364–374.

Fox, J.E. 2001. Cytoskeletal proteins and platelet signalling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 86, 198–213.

Francischetti, I.M.; Valenzuela, J.G.; Pham, V.M.; Garfield, M.K.; Ribeiro, J.M. 2002. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol*. 205: 2429–2451.

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

Fyrberg, E.A.; Kindle, K.L.; Davidson, N. 1980. The actin genes of *Drosophila*: A dispersed multigene family. *Cell*. 19:365.

Fyrberg, E.A.; Mahaffey, J.W.; Bond, B.J.; Davidson, N. 1983. Transcripts of the six *Drosophila* actin genes accumulate in a stage and tissue-specific manner. *Cell*. 33:115.

Fyrberg, C. & Fyrberg, E. 1993 A *Drosophila* homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* act2 gene. *Biochem. Genet*. 31, 329-341.

Fyrberg, C.; Ryan, L.; Kenton, M.; Fyrberg, E. 1994. Genes encoding actin-related proteins of *Drosophila melanogaster. J. Mol. Biol*. 241:498.

Gaunt, M.W. & Miles, M.A. 2002. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol. Biol. Evol*. 19(5):748–761.

Gentile, G.; Slotman, M.; Ketmaier, V.; Powell, J. R.; Caccone, A. 2001. Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae s.s. Insect Mol. Biol*. 10: 25-32.

Giglioli, G.; M.D.; M.R.C.P.; D.T.M.; H. 1956. Biological variations in *Anopheles darlingi* and *gambiae*. Their effect on practical malaria control in the Neotropical Region. *Bull.Wld Hlth Org*. 15: 461-471.

Gil, L.H.S.; Alves, F.P.; Zieler, H.; Salcedo, J.M.V.; Durlacher, R.R.; Cunha, R.P.A.; Tada, M.S.; Camargo, L.M.A.; Camargo, E.P.; Pereira-Da-Silva, L.H. 2003. Seasonal malaria transmission and variation of anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia. *Journal of Medical Entomology*. 40 (5): 636-641.

Gordon, A.M.; Homsher, E.; Regnier, M. 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* 80:853–924.

Gorham, J.R.; Stojanovich, J.C.; Scott. H.G. 1967. *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica Oriental*. Department of Healther. Education, and Welfare Public Health Service. 64 p.

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.

Hadden, T.J. & Sodja, A., 1994. An oligogene family encodes actins in the housefly, *Musca domestica. Biochemical and Biophysical Research Communications*. 303, 523–531.

Hankeln, T.; Fillippova, M.A.; Kiknadze, I.I.; Aimanova, K.G.; Schmidt, E.R. 1994. Centromeric heterochromatin and satellite DNA in the *Chironomus plumosus* species group. *Genome,* 37: 925-934.

Harris, A.F.; Matias-Arnéz, A.; Hill, N. 2006. Biting time of *Anopheles darlingi* in the Bolivian Amazon and implications for control of malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 100, 45-47.

Hazelton, G.A. & Laing, C.A. 1983. Glutathione S-transferase activities in the yellow-fever mosquito *Aedes aegypti* (Loisville) during growth and aging. *Biochemical Journal*. 210: 281-287.

Hennessey, E.S.; Drummondt, D.R.; Sparrow, J.C. 1993. Molecular genetics of actin function. *Biochem. J.* 282, 657-671.

Herranz, R.; Mateos, J.; Mas, J.A.; García-Zaragoza, E.; Cervera, M.; Marco, R. 2005(a). The Coevolution of Insect Muscle TpnT and TpnI Gene Isoforms. *Mol. Biol. Evol*. 22(11):2231–2242.

Herranz, H.; Mateos, J.; Marco, R. 2005(b). Diversification and Independent Evolution of Troponin C Genes in Insects. *J Mol Evol*. 60: 31–44.

Hild, M.; Beckmann, B.; Haas, S.A.; Koch, B.; Solovyev, V.; Busold, C.; Fellenberg, K.; Boutros, M.; Vingron, M.; Sauer, F.; Hoheisel, J.D.; Paro, R. 2003. An integrated gene annotation and transcriptional profiling approach towards the full gene content of the *Drosophila* genome. *Genome Biology*. 5:R3. 1-17.

Holt, R.A.; Subramanian, G.M.; Halpern, A.; Sutton, G.G.; Charlab, R.; Nusskern, D.R.; Wincker, P.; Clark, A.G.; Ribeiro, J.M.; Wides, R.; Salzberg, S.L.; Loftus, B.; Yandell, M.; Majoros, W.H.; Rusch, D.B.; Lai, Z.; Kraft, C.L.; Abril, J.F.;

Anthouard, V.; Arensburger, P.; Atkinson, P.W.; Baden, H.; Berardinis, V.de; Baldwin, D.; Benes, V.; Biedler, J.; Blass, C.; Bolanos, Boscus, D.; Barnstead, M.; Cai, S.; Center, A.; Chatuverdi, K.; Christophides, G.K.; Chrystal, M.A.; Clamp, M.; Cravchik, A.; Curwen, V.; Dana, A.; Delcher, A.; Dew, I.; Evans, C.A.; Flanigan, M.; Grundschober-Freimoser, A.; Friedli, L.; Gu, Z.; Guan, P.; Guigo, R.; Hillenmeyer, M.E.; Hladun, S. L.; Hogan, J.R.; Hong, Y.S.; Hoover, J.; Jaillon, O.; Ke, Z.; Kodira, C.; Kokoza, E.; Koutsos, A.; Letunic, I.; Levitsky, A.; Liang, Y.; Lin, J.J.; Lobo, N.F.; Lopez, J.R.; Malek, J.A.; McIntosh, T.C.; Meister, S.; Miller, J.; Mobarry, C.; Mongin, E.; Murphy, S.D.; O'Brochta, D.A.; Pfannkoch, C.; Qi, R.; Regier, M.A.; Remington, K.; Shao, H.; Sharakhova, M.V.; Sitter, C.D.; Shetty, J.; Smith, T.J.; Strong, R.; Sun, J.; Thomasova, D.; Ton, L.Q.; Topalis, P.; Tu, Z.; Unger, M.F.; Walenz, B.; Wang, A.; Wang, J.; Wang, M.; Wang, X.; Woodford, K.J.; Wortman, J.R.; Wu, M.; Yao, A.; Zdobnov, E.M.; Zhang, H.; Zhao, Q.; Zhao, S.; Zhu, S.C.; Zhimulev, I.; Coluzzi, M.; Della Torre, A.; Roth, C.W.; Louis, C.; Kalush, F.; Mural, R.J.; Myers, E.W.; Adams, M.D.; Smith, H.O.; Broder, S.; Gardner, M.J.; Fraser, C.M.; Birne, E.; Bork, P.; Brey, P.T.; Venter, J.C.; Weissenbach, J.; Kafatos, F.C.; Collins, F.H.; Hoffman, S.L. 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 298: 129-149.

Hoock, T. C.; Newcomb, P. M.; Herman, I. M. 1991. Actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J. Cell Biol*. 112:653.

Hultmark, D. 1996. Insect lysozymes. Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology (Jollés, P., ed.), pp. 87-102. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Hurst, L.D.; Williams, E.J.; Pal, C. 2002. Natural selection promotes the conservation of linkage of co-expressed genes. *Trends Genet*. 18:604–606.

Jabbari, K. & Bernardi, G. 2004. Comparative genomics of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Gene.* 333, 183–186.

Jablonka, E. & Lamb, M.J. 1990. The evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Biol. Rev.* 65: 249-276.

Kang, D.; Romans, P.; Lee, J.Y. 1996. Analysis of a lysozyme gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Gene*. 174: 239-244.

Kitzmiller, J.B. & Chow, G.Y. 1971. The salivary gland chromosomes of *Anopheles aquasalis*. *R*ev. *Bras. Mal. D. Trop.,* XXIII: 65-85.

Kitzmiller, J.B.; Kreutzer, R.D.; Talaferro, E. 1973. Chromosomal differences in populations of *Anopheles nuneztovari.* Bull. Wld. Hlth. Org., 48: 435- 445.

Kitzmiller, J.B. 1977. Chromosomal differences among species of *Anopheles* mosquitoes. *Mosq. Syst*. 9: 112-122.

Korochkina, S.; Barreau, C.; Pradel, G.; Jeffery, E.; Li, J.; Natarajan, R.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.; Frevert, U.; Vernick, K.D. 2006. A mosquito-specific protein family includes candidate receptors for malaria sporozoite invasion of salivary glands. *Cell Microbiol.* 8(1):163-175.

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.

Krzywinski, J.; Nusskern, D.R.; Kern, M.K.; Besansky, N.J. 2004. Isolation and characterization of Y chromosome sequences from the African malaria mosquito *Anopheles gambiae. Genetics.* 166:1291-1302.

Krzywinski, J.; Sangare, D.; Besansky, N. 2005. Satellite DNA from the Y chromosome of the malaria vector *Anopheles gambiae. Genetics*. 169:185-196.

Krzywinski, J.; Chrystal, M.A.; Besansky, N.J. 2006. Gene finding on the Y: fruitful strategy in *Drosophila* does not deliver in *Anopheles*. *Genetica.* 126:369-375.

Kumar, V. & Collins, F.H. 1994. A technique for nucleic acid *in situ* hybridization to polytene chromosome of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Mol. Biol*. 3 (1): 41-47.

Lander, J.E.; Parsons, J.F.; Rife, C.L.; Gilliland, G.L.; Armstrong, R.N. 2004. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanims of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1–1. *Biochemistry*. 43: 352–261.

Lara, Francisco 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.

Lehman, W.; Bullard, B.; Hammond, K. 1974. Calcium-dependent myosin from insect flight muscles. *J. Gen. Physiol*. 63, 553–563.

Lehman, W. & Szent-Gyorgyi, A. 1975. Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom. *J. Gen. Physiol*. 66, 1–30.

Lewin, B. 1994. *Genes V*. Oxford University Press. 1260 p.

Li, B.; Calvo, E.; Marinotti, O.; James, A.A.; Paskewitz, S.M. 2005. Characterization of the c-type lysozyme gene family in *Anopheles gambiae. Gene*. 360, 131–139.

Lim, J.K. 1993. *In situ* hybridization with biotinylated DNA. Techniques Notes. *DIS* 72, 73-77p.

Loiola, C.C.P.; Silva, C.J.M.da; Tauil, P.L. 2002. Controle da Malária no Brasil: 1965 a 2001. *Rev. Panam. Salud. Publica*. Washington. 11: 4.

Lounibos, L.P. & Conn. J.E. 2000. Malaria Vector Heterogeneity in South America. *American Entomologist*, 46: 4.

Lovato, T.L.; Meadows, S.M.; Baker, P.W.; Sparrow, J.C.; Cripps, R.M. 2001 Characterization of muscle actin genes in *Drosophila virilis* reveals significant molecular complexity in skeletal muscle types. *Insect Mol Biol*. 10:333–340.

Lumjuan, N.; Stevenson, B.J.; Prapanthadara, L.; Somboon, P.; Brophy, P.M.; Loftus, B.J.; Severson, D.W.; Ranson, H. 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem. Mol. Biol*. 37: 1026–1035.

Mahon, R.J.; Green, C.A.; Hunt, R.H. 1976. Diagnostic allozymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera, Culicidae). *Bull Entomol Res*. 66: 25-31.

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 (1): 07-13.

Marchi, A. & Pilli, E. 1994. Ribosomal RNA genes in mosquitoes: Localization by fluorescence *in situ* hybridizatoin (FISH). *Heredity,* 72(6): 599-605.

Marín, M.C.; Rodríguez, J.R.; Ferrús, A. 2004. Transcription of *Drosophila* Troponin I Gene Is Regulated by Two Conserved, Functionally Identical, Synergistic Elements. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 15: 1185–1196.

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 (6): 679-684.

Marrelli, M.T.; Floeter-Winter, L.M.; Malafronte, R.S.; Tadei, W.P.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Flores-Mendoza, C.; Marinotti, O. 2005. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology.* 19: 208-218.

Matzkin, L.M. 2008. The Molecular Basis of Host Adaptation in Cactophilic *Drosophila*: Molecular Evolution of a Glutathione S-Transferase Gene (GstD1) in *Drosophila mojavensis*. *Genetics.* 178: 1073–1083.

McAbee, R.D.; Christiansen, J.A.; Cornel. A.J. 2007. A Detailed Larval Salivary Gland Polytene Chromosome Photomap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Johannesburg, South Africa. *J. Med. Entomol.* 44(2): 229-237.

Miles, S.J. 1979. A biochemical key to adult members of the *Anopheles gambiae* group of species (Diptera:Culicidae). *J Med Entomol*. 15:297-299.

Morel, F.; Rauch, C.; Petit, E.; Piton, A.; Theret, N.; Coles, B.; Guillouzo, A. 2004. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. *J Biol Chem.* 279: 16246–16253.

Moreno, M.; Cano, J.; Nzambo, S.; Bobuakasi, L.; Buatiche, J.N.; Ondo, M.; Micha, F.; Benito, A. 2004. Malaria Panel Assay versus PCR: detection of naturally infected *Anopheles melas* in a coastal village of Equatorial Guinea. *Malaria Journal*. 3: 20.

Mounier, N.; Gouy, M.; Mouchirand, D.; Prudhome, J.C. 1987. Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins. *Journal of Molecular Evolution*. 34: 406–415.

Nene, V.; Wortman, J.R.; Lawson, D.; Haas, B.; Kodira, C.; Tu, Z.J.; Loftus, B.; Xi, Z.; Megy, K.; Grabherr, M.; Ren, Q.; Zdobnov, E.M.; Lobo, N.F.; Campbell, K.S.; Brown, S.E.; Bonaldo, M.F.; Zhu, J.; Sinkins, S.P.; Hogenkamp, D.G.; Amedeo, P.; Arensburger, P.; Atkinson, P.W.; Bidwell, S.; Biedler, J.; Birney, E.; Bruggner, R.V.; Costas, J.; Coy, M.R.; Crabtree, J.; Crawford, M.; deBruyn, B.; DeCaprio, D.; Eiglmeier, K.; Eisenstadt, E.; El-Dorry, H.; Gelbart, W.M.; Gomes, S.L.; Hammond, M.; Hannick, L.I.; Hogan, J.R.; Holmes, M.H.; Jaffe, D.; Johnston, J.S.; Kennedy, R.C.; Koo, H.; Kravitz, R.; Kriventseva, E.V.; Kulp, D.; LaButti, K.; Lee, E.; Li, S.; Lovin, D.D.; Mao, C.; Mauceli, E.; Menck, C.F.M.;

Miller, J.R.; Montgomery, P.; Mori, A.; Nascimento, A.L.; Naveira, H.F.; Nusbaum, C.; O'Leary, S.; Orvis, J.; Pertea, M.; Quesneville, H.; Reidenbach, K.R.; Rogers, W.Y.; Roth, C.H.; Schneider, J.R.; Schatz, M.; Shumway, M.; Stanke, M.; Stinson, E.O.; Tubio, J.M.C.; VanZee, J.P.; Verjovski-Almeida, S.; Werner, D.; White, O.; Wyder, S.; Zeng, Q.; Zhao, Q.; Zhao, Y.; Hill, C.A.; Raikhel, A.S.; Soares, M.B.; Knudson, D.L.; Lee, N.H.; Galagan, J.; Salzberg, S.L.; Paulsen, I.T.; Dimopoulos, G.; Collins, F.H.; Birren, B.; Fraser-Liggett, C.M.; Severson, D.W. 2007. Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. *Science*. 316: (5832) 1718 - 1723.

Neves, D.P. 2005. *Parasitologia Humana*, 11. Ed. Editora Atheneu: São Paulo.

Palsson, B. 2000. The challenges of *in silico* biology. *Nature Biotechnology,* 18: 1147-1150.

Palsson, B. 2002. *In silico* biology through "omis". *Nature Biotechnology*, 20: 649-650.

Paskewitz, S.M.; Li, B.; Kajla, M.K. 2008. Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*. 17(3): 217–225.

Pollard, T.D. & Weihing, R.R. 1974. Actin and myosin and cell movement. *CRC Crit. Rev. Biochem*. 2: 1-65.

Pollard, T.D.; Blanchoin, L.; Mullins, R.D. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 29, 545–576.

Portal da Saúde: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seg_noticia=34177 Acesso em 16 agosto 2007.

Portal da Saúde http://189.28.128.100/portal/aplicacoes/reportagensEspeciais/default.cfm?pg=dspDetalhes&id_area=124&CO_NOTICIA=1980. Acesso em 02 de março de 2009.

Powell, J. R. 1997. *Progress and prospects in evolutionary genetics: the Drosophila model*. Oxford University Press, USA. 576p.

Prado, A.; Canal, I.; Ferrús, A. 1999. The Haplolethal Region at the 16F Gene Cluster of *Drosophila melanogaster*: Structure and Function. *Genetics*. 151: 163–175.

Prapanthadara, L.; Hemingway, J.; Ketterman, A.J. 1993. Partial purification and characterization of glutathione S-transferase involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pest. Biochem. Physiol.* 47: 119–133.

Prosdocimi, F.; Cerqueira, G.C.; Binneck, E.; Silva, A.F.; Reis, N.A.; Junqueira, A.C.M.; Santos, A.C.F.; Nabani Junior, A.; Wust, C.I.; Filho, F.C.; Kessedjian, J.L.; Petretski, J.H.; Camargo, L.P.; Ferreira, R.G.M.; Lima, R.P.; Pereira, R.M.; Jardim, S.; Sampaio, V.S.; Folgueiras-Flatschart, A. 2003. Bioinformática: Manual do Usuário*. Biotec. Ciênc. e Desenvolv*. 29:18-31.

Qiu, F.; Lakey, A.; Agianian, B.; Hutchings, A.; Butcher, G.W; Labeit, S.; Leonard, K.; Bullard, B. 2003. Troponin C in different insect muscle types: identification of two isoforms in *Lethocerus*, *Drosophila* and *Anopheles* that are specific to asynchronous flight muscle in the adult insect. *Biochem. J.* 371: 811–821.

Rabello, A.R.; Rangel, P.H.N.; Guimarães, C.M.; Sales, R.M.O.B.; Silva, F.R.da.; Costa, M.M.C.; Togawa, R.C.; Ferreira, M.E.; Mehta, A. 2006. Expressão diferencial em genótipos de *Oriza sativa* contrastantes para a tolerância a seca. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 156, EMBRAPA. Brasília.

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 (4): 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(5): 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.; Santos-Junior, I.P.; Tadei, W.P.; Mureb-Sallum, M.A.; Forattini, O.P. 2005a. Karyotype of Brazilian *Anopheles albitarsis sensu lato* (Diptera: Culicidae). *Genet. Mol. Res*. 4 (4): 684-690.

Rafael, M.S.; Nunes–Silva, C.G.; Astolfi–Filho, S., Tadei, W.P. 2005b. Biblioteca de cDNA de Anopheles darlingi (Díptera: Culicidae). In: 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia/ São Paulo: Zeppelini Editorial & Comunicação. v.CD. pp. 145-145.

Rafael, M.S.; Santos, I.P.; Tadei, W.P.; Carvalho, K.A.; Recco-Pimentel, S.M.; Sallum, M.A.M.; Forattini, O.P. 2006. Cytogenetic study of *Anopheles albitarsis* (Diptera: Culicidae) by C-banding and *in situ* hybridization. Hereditas. 143:62-67.

Rafael, M.S.; Nunes-Silva, C.G.; Azevedo Junior, G.M.; Guimaraes, G.M.; Bridi, L.C.; Assunção, E.N.; Astolfi-Filho, S.; Tadei, W.P. 2008. Banco de Genes Expressos de *Anopheles darlingi* adulto (Diptera; Culicidae), Coari, Amazonas. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador. Ribeirão Preto: Editora da SBG.

Rai, K.S. 1963. A comparative study of mosquitos karyotypes. *Ann. Ent. Soc. Amer*. 56: 160-170.

Ramírez, C.C.L. 1989. Estudo cromossômico em uma população de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab, 1909. Tese de mestrado, Inst. de Biociências, USP, São Paulo, 96p.

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.

Ranson, H.; Prapanthadara, L.; Hemingway, J. 1997. Cloning and characterization of two glutathione S -transferases from a DDT resistant strain of *Anopheles gambiae. Biochem. J.* 324: 97–102

Ranson, H.; Jensen, B.; Wang, X.; Prapanthadara, L.; Hemingway, J.; Collins, F. H. 2000. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae. Insect Mol. Biol.* 9: 499–507.

Ranson, H.; Rossiter, L.; Ortelli, F.; Jensen, B.; Wang, X.; Roth, C.W.; Collins, F.H.; Hemingway, J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases. involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae. Biochem. J.* 359: 295–304.

Ranson, H.; Claudianos, C.; Ortelli, F.; Abgrall, C.; Hemingway, J.; Sharakhova, M.V.; Unger, M.F.; Collins, F.H.; Feyereisen, R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*. 298: 179–181.

Ranson, H. & Hemingway, J. 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods in Enzymology*. 401: 226–241.

Rao, P.N. & Rai, K.S. 1987. Comparative karyotypes and chromosomal evolution in some genera of *Nematocerous* (Diptera: Nematocera) families. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 80: 321-332.

Reed, J.L. & Palsson, B.O. 2003. Thirteen years of building constraint-based *in silico* models of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 185 (9): 2692-2699.

Reinach, F.C.; Farah, C.S.; Monteiro, P.B.; Malnic, B. 1997. Structural interactions responsible for the assembly of the Troponin Complex on the muscle thin filament. *Cell Struct Funct*. 22: 219–223

Ren, X.Y.; Fiers, M.W.; Stiekema, W.J.; Nap, J.P. 2005. Local coexpression domains of two to four genes in the genome of *Arabidopsis. Plant Physiol*. 138: 923–934.

Ribeiro, J.M.C.; Arcà, B.; Lombardo, F.; Calvo, E.; Phan, V.M.; Chandra, P.K.; Wikel, S.K. 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti. BMC Genomics.* 8:6.

Root, F.M. 1926. Studies on Brazilian mosquitoes. I. The anophelines of the *Nyssorhynchus* group. *Am. J. Hyg.* 6: 684-717.

Rosa-Freitas, M.G.; Broomfield, G.; Priestmann, A.; Milligan, P.; Momen, H.; Molyneux, D.H. 1992. Studies on cuticular components, isoenzymes and behaviour of 3 populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J. Am. Mosq. Contol Assoc.* 8: 357-366.

Salazar, C.E.; Hamm, D.M.; Wesson, D.M.; Beard, C.B.; Kumar, K.; Collins, F.H. 1994. A cytoskeletal actin gene in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*. 3(1): 1 – 13.

Salinas, A.E. & Wong, M.G. 1999. Glutathione S-transferases — a review. *Current Medicinal Chemistry*. 6(4): 279–309.

Santos, J.M.M.; Contel, E.P.B.; Kerr, W.E. 1981. Biologia de Anofelinos Amazônicos. 1. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae). *Acta Amazônica.* 11(4): 789-797.

Santos, J.M.M.; Lobo, J.A.; Tadei, W.P.; Contel, E.P.B. 1999. Intrapopulational genetic differentiation in *Anopheles (N) darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) in the amazon region. *Genet. Mol. Biol.* 22 (3): 325-331.

Scarpassa, V.M. & Tadei, W.P. 1990. Biologia de Anofelinos Amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Acta Amazônica*. 20, n. único, p. 95-118.

Scarpassa, V.M. & Conn, J.E. 2007. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102: 319-327.

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

Schreiber, G. & Guedes, A.S. 1961. Cytological aspects of the taxonomy of anophelines (Subgenus *Nyssorhynchus*). *Bull* W.H.O. 24: 657-658.

Scheznov, G.; Lloyd, C.; Gunning, P. 1992. High level expression of transfected beta- and gamma-actin genes differentially impacts myoblast morphology. *J. Cell Biol*. 117: 775.

Scott, J.A.; Brogdon, W.G.; Collins, F.H. 1993. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 49: 520-529.

Service, M.W. 1996*. Medical Entomology*. First Edition. London: Chapman & Hall.

Sharakhov, I.V.; Sharakhova, M.V.; Mbogo, C.M.; Koekemoer, L.L.; Yan, G. 2001. Linear and Spatial Organization of Polytene Chromosomes of the African Malaria Mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics*. 159: 211-218.

Sharakhov, I.V.; Serazin, A.C.; Grushko, O.G.; Dana, A.; Lobo, N.; Hillenmeyer, M.E.; Westerman, R.; Romero-Severson, J.; Costantini, C.; Sagnon, N'F.; Collins, F.H.; Besansky, N.J. 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, W.M.; Boccolini, D.; Weill, M.; Costantini, C.; Sagnon, N'F.; Fontenille, D.; Yan, G.; Besansky, N.J. 2004. A Microsatellite Map of the African Human Malaria Vector *Anopheles funestus*. *Journal of Heredity*. 95(1): 29–34

Sharakhova, V.M.; Hammond, M.P.; Lobo, N.F.; Krzywinski, J.; Unger, M.F.; Hillenmeyer, M.E.; Bruggner, R.V.; Birney, E.; Collins, F.H. 2007. Update of the *Anopheles gambiae* PEST genome assembly. *Genome Biology*, 8: R5 1-13.

Silva, L.H.P.da & Oliveira, V.E.G.de. 2002. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. *Ciência & Saúde Coletiva*. 7(1): 49-63.

Singer, R. H. 1992. The cytoskeleton and mRNA localization. *Curr. Opin. Cell Biol*. 4:15.

Slotman, M.A.; della Torre, A.; Calzetta, M.; Powell, J.R. 2005. Differential introgression of chromosomal regions between *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 73(2): 326–335.

Sodja A.; Fujiokab, H.; Lemosc, F.J.A.; Donnelly-Domand, M.; Jacobs-Lorenad, M. 2007. Induction of actin gene expression in the mosquito midgut by blood ingestion correlates with striking changes of cell shape. *Journal of Insect Physiology.* 53: 833–839.

Spellman, P.T. & Rubin, G.M. 2002. Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. *J Biol*. 1:5.

Strode, C.; Wondji, C.S.; David, J.P.; Hawkes, N.J.; Lumjuan, N.; Nelson, D.R.; Drane, D.R.; Karunaratne, S.H.P.P.; Hemingway, J.; Black IV, W.C.; Ranson, H. 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 113–123.

Tadei, W.P.; Santos, J.M.M.; Rabbani, M.G. 1982. Biologia de anofelinos amazônicos. V. Polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Díptera: Culicidae). *Acta Amaz*. 12: 353-369.

Tadei, W.P. 1985. Biology of Amazonian mosquitoes IX. On chromosome polymorphism of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* and a new arrangement in the X-chromosome. *Ciênc. Cult*. 37(8): 1329-1331.

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* (2): 87-94.

Tang, A.H., & Tu, C.P.D. 1994 Biochemical characterization of *Drosophila* Glutathione s-transferases D1 and D21. *J. Biol. Chem*. 269: 27876–27884.

Tatusov, R.L.; Fedorova, N.D.; Jackson, J.D.; Jacobs, A.R.; Kiryutin, B.; Koonin, E.V.; Krylov, D.M.; Mazumder, R.; Mekhedov, S.L.; Nikolskaya, A.N.; Rao, B.S.; Smirnov, S.; Sverdlov, A.V.; Vasudevan, S.; Wolf, Y.I.; Yin, J.J.; Natale, D.A. 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*. 4: 41.

Terenius, O.; Oliveira, C.D.de; Pinheiro, W.D.; Tadei, W.P.; James, A.A.; Marinotti, O. 2008. 16S rRNA Gene Sequences from Bacteria Associated with Adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. *J. Med. Entomol*. 45(1): 172-175.

Toba, G. & Aigaki, T. 2000. Disruption of the microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*. *Gene*. 253(2): 179-187.

Tsy, J.; Duchemin, J.B.; Marrama, L.; Rabarison, P.; Le Goff, G.; Rajaonarivelo, V.; Robert, V. 2003. Distribution of the species of the *Anopheles gambiae* complex and first evidence of *Anopheles merus* as a malaria vector in Madagascar. *Malaria Journal*. 2:33.

Ursic Bedoya, R.J.; Mitzey, A.M.; Obraztsova, M.; Lowenberger, C. 2005. Molecular cloning and transcriptional activation of lysozyme-encoding cDNAs in the mosquito *Aedes aegypti. Insect Mol Biol*. 14: 89–94.

Valenzuela, J.G.; Francischetti, I.M.B.; Pham, V.M.; Garfield, M.K.; Mather, T.N.; Ribeiro, J.M.C. 2002a. Exploring the sialome of the tick, *Ixodes scapularis. J Exp Biol*. 205: 2843–2864.

Valenzuela, J.G.; Pham, V.M.; Garfield, M.K.; Francischetti, I.M.; Ribeiro, J.M.C. 2002b. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti. Insect Biochem Mol Biol*. 32: 1101–1122.

Valenzuela, J.G.; Francischetti, I.M.; Pham, V.M.; Garfield. M.K.; Ribeiro, J.M. 2003 Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem Mol Biol*. 33: 717–732.

Vassylyev, D.G.; Takeda, S.; Wakatsuki, S.; Maeda, K.; Maeda, Y. 1998. The crystal structure of TpnC in complex with N-terminal fragment of troponin I. The mechanism of how the inhibitory action of troponin I is released by Ca(2+)-binding to TpnC. *Adv Exp Med Biol*. 453:157–167.

Vibert, P.; Craig, R.; Lehman, W. 1997. Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J. Mol. Biol*. 266:8–14.

Vyazunova, I. & Lan, Q. 2004. Stage-specific expression of two actin genes in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti. Insect Molecular Biology*. 13 (3), 241–249.

White, G.B. 1985. *Anopheles bwambae* sp. n., a malaria vector in Semliki Valley, Uganda, and its relationships with other sibling species of the *An. gambiae* complex. *Syst Entomol*. 10:501-522.

Zafar, R.S. & Sodja, A. 1983. Homology in the actin coding and adjacent sequences in two widely divergent species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 111: 67–73.

Zdobnov, E.M.; Mering, C.v.; Letunic, I.; Torrents, D.; Suyama, M.; Copley, R.R.; Christophides, G.K.; Thomasova, D.; Holt, R.A.; Subramanian, G.M.; Mueller, H.M.; Dimopoulos, G.; Law, J.H.; Wells, M.A.; Birney, E.; Charlab, R.; Halpern, A.L.; Kokoza, E.; Kraft, C.L.; Lai, Z.; Lewis, S.; Louis, C.; Barillas-Mury, C.; Nusskern, D.; Rubin, G.M.; Salzberg, S.L.; Sutton, G.G.; Topalis, P.; Wides, R.; Wincker, P.; Yandell, M.; Collins, F.H.; Ribeiro, J.; Gelbart, W.M.; Kafatos, F.C.; Bork, P. 2002. Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster. Science*. 298: 149-159.

Zhan, S.; Horrocks, J.; Lukens, L.N. 2006 Islands of co-expressed neighbouring genes in *Arabidopsis thaliana* suggest higher-order chromosome domains. *Plant J*. 45: 347–357.

ANEXO 1

Tabela 2: Produtos gênicos de *Anopheles darlingi* que apresentaram similaridade ao serem hibridizados *in silico* no genoma de *Anopheles gambiae* (totalizaram 178). E-value = Índice estatístico de valor esperado, *COG* = *Clusters of Ortologous Groups.*

Cluster	Produtos Gênicos	E-value	Informações encontradas dos produtos gênicos ENSANGP nos bancos de dados NCBI, EMBL e Panther.	COG
Cluster 10	ENSANGP00000015791 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	7.00E-049	NADH: ubiquinone oxidoreductase, NDUFS5. Acesso: EMBL PF10200	C
Cluster 12	ENSANGP00000010075 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	8.00E-053	Transketolase, central region Acesso: EMBL IPR005475	P
Cluster 17	ENSANGP00000010437 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	7.00E-063	Zinc finger, RING-type Acesso: EMBL IPR001841	R
Cluster 22	ENSANGP00000017618 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-059	Ribosomal protein S25 Acesso: EMBL IPR004977	J
Cluster 25	ENSANGP00000011028 *[Anopheles gambiae* str. PEST]	e-115	Ribosomal protein L3 Acesso: EMBL IPR000597	J
Cluster 27	ENSANGP00000013298 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	1.00E-036	ATPase, F0 complex, subunit E, mitochondrial Acesso: EMBL IPR008386	P
Cluster 41	ENSANGP00000025118 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	3.00E-046	Ribosomal protein 60S Acesso: EMBL IPR001813	J
Cluster 48	ENSANGP00000017452 *[Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-010	Ubiquitin related modifier 1 (Urm1) Acesso: EMBL IPR015221	C
Cluster 57	ENSANGP00000019065 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	3.00E-071	Calcium-binding EF-hand Acesso: EMBL IPR002048	P, K
Cluster 65	ENSANGP00000025315 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-067	Glutamate/phenylalanine/leucine/ valine dehydrogenase Acesso: EMBL IPR006095	E
Cluster 66	ENSANGP00000010198 *[Anopheles gambiae* str. PEST]	1.00E-048	Vps52/Sac2 Acesso: EMBL IPR007258	Q
Cluster 69	ENSANGP00000013957 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	1.00E-077	Ribosomal protein S19/S15 Acesso: EMBL IPR002222	J
Cluster 71	ENSANGP00000019453 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	8.00E-045	Ribosomal protein S27e Acesso: EMBL IPR000592	J
Cluster 96	ENSANGP00000020828 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-114	Fumarate hydratase, class II Acesso: EMBL IPR005677	C
Cluster 106	ENSANGP00000020662 *[Anopheles gambiae* str. PEST]	4.00E-096	Ribosomal protein L4/L1e Acesso: EMBL IPR002136	J
Cluster 110	ENSANGP00000016770 *[Anopheles gambiae* str. PEST]	3.00E-026	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, catalytic region Acesso: EMBL IPR006139	C

Cluster	Produtos Gênicos	E-value	Informações encontradas dos produtos gênicos ENSANGP nos bancos de dados NCBI, EMBL e Panther.	COG
Cluster 117	ENSANGP00000019363 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	6.00E-050	UNCHARACTERIZED Acesso Panther: PTHR12336	S
Cluster 123	ENSANGP00000021056 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	6.00E-087	UNCHARACTERIZED Acesso Panther: PTHR21106	S
Cluster 132	ENSANGP00000024604 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-019	ATPase, F1 complex, alpha subunit Acesso: EMBL IPR005294	Q
Cluster 154	ENSANGP00000022149 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-033	Ribosomal protein L35Ae Acesso: EMBL IPR001780	J
Cluster 167	ENSANGP00000022175 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	0.0	Actin/actin-like Acesso: EMBL IPR004000	N, Z
Cluster 170	ENSANGP00000016831 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	1.00E-026	UNCHARACTERIZED Acesso Panther: PTHR14167:SF1	S
Cluster 171	ENSANGP00000016963 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	9.00E-066	MD-2-related lipid-recognition Acesso: EMBL IPR003172	I
Cluster 190	ENSANGP00000016419 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-115	No itens found http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez	S
Cluster 191	ENSANGP00000012069 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-123	ATPase, F0 complex, subunit B, mitochondrial Acesso: EMBL IPR008688	P
Cluster 195	ENSANGP00000013568 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	5.00E-096	Peptidase aspartic, catalytic Acesso: EMBL IPR009007	Q
Cluster 202	ENSANGP00000018702 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	1.00E-046	Ribosomal protein L37e Acesso: EMBL IPR001569	J
Cluster 210	ENSANGP00000017869 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	3.00E-062	ETC complex I subunit Acesso: EMBL IPR006806	C
Cluster 213	ENSANGP00000016817 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	6.00E-048	Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap Acesso: EMBL IPR001254	N
Cluster 254	ENSANGP00000010167 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-155	ATPase, F1 complex, gamma subunit Acesso: EMBL IPR000131	C
Cluster 258	ENSANGP00000018480 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	7.00E-091	Signal peptidase subunit Acesso NCBI: gi|42762505|gb|AY432333.1	N
Cluster 264	ENSANGP00000011882 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-105	ATPase, F1 complex, OSCP/delta subunit Acesso: EMBL IPR000711	C
Cluster 267	ENSANGP00000019329 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	1.00E-025	Proteasome, alpha and beta subunits Acesso: EMBL IPR001353	P

Cluster	Produtos Gênicos	E-value	Informações encontradas dos produtos gênicos ENSANGP nos bancos de dados NCBI, EMBL e Panther.	COG
Cluster 280	ENSANGP00000019108 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	3.00E-039	similar to *Drosophila* CG30415 Acesso NCBI: gi|158289474|ref|XM_311195.4	S
Cluster 287	ENSANGP00000023852 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-061	ATP: guanido phosphotransferase Acesso: EMBL IPR000749	C
Cluster 290	ENSANGP00000011949 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	3.00E-090	GPCR, rhodopsin-like superfamily Acesso: EMBL IPR017452	R
Cluster 292	ENSANGP00000018253 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	8.00E-059	Insect cuticle protein Acesso: EMBL IPR000618	M
Cluster 293	ENSANGP00000023017 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-110	Glutathione S-transferase, C-terminal-like Acesso: EMBL IPR010987	Q
Cluster 297	ENSANGP00000010247 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-108	Glutathione transferase Acesso NCBI: AY440193.1	Q
Cluster 299	ENSANGP00000016706 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	4.00E-064	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type Acesso: EMBL IPR001179	N
Cluster 300	ENSANGP00000021902 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-042	Glycosyl transferase, family 20 Acesso EMBL: IPR001830	M
Cluster 302	ENSANGP00000015417 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-079	Ribosomal protein S11 Acesso: EMBL IPR001971	J
Cluster 307	ENSANGP00000028234 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-045	Translocon-associated beta (TRAP_beta) Acesso: EMBL IPR008856	N
Cluster 309	ENSANGP00000015019 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-113	Ribosomal protein L1 Acesso: EMBL IPR002143	J
Cluster 318	ENSANGP00000012302 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-084	family Ribosomal_S27 (*Ae. aegypti)* Acesso NCBI: gi|42764020|gb|AY432783.1	J
Cluster 320	ENSANGP00000021011 [Anopheles gambiae str. PEST]	9.00E-025	Protein of unknown function DM9 Acesso: EMBL IPR006616	S
Cluster 321	ENSANGP00000017702 [Anopheles gambiae str. PEST]	6.00E-067	Ribosomal protein L32e Acesso: EMBL IPR001515	J
Cluster 327	ENSANGP00000030559 [Anopheles gambiae str. PEST]	7.00E-088	Ferritin, N-terminal Acesso: EMBL IPR001519	Q
Cluster 342	ENSANGP00000010360 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-040	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GlycerAld_3-P_DH) Acesso: EMBL IPR000173	Q
Cluster 347	ENSANGP00000010983 [Anopheles gambiae str. PEST]	e-134	Ribosomal protein S3Ae Acesso: EMBL IPR001593	J

Cluster	Produtos Gênicos	E-value	Informações encontradas dos produtos gênicos ENSANGP nos bancos de dados NCBI, EMBL e Panther.	COG
Cluster 348	ENSANGP00000018253 [Anopheles gambiae str. PEST]	3.00E-059	Insect cuticle protein Acesso: EMBL IPR000618	M
Cluster 391	ENSANGP00000021345 [Anopheles gambiae str. PEST]	e-106	NADH dehydrogenase I, D subunit Acesso: EMBL IPR010219	C
Cluster 394	ENSANGP00000021862 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-066	Ribosomal protein L22 Acesso: EMBL IPR002671	J
Cluster 411	ENSANGP00000015800 [Anopheles gambiae str. PEST]	e-138	Phosphoglycerate mutase 1 (Phosphogly_mut1) Acesso: EMBL IPR005952	C
Cluster 428	ENSANGP00000012669 [Anopheles gambiae str. PEST]	3.00E-089	ATPase, F0 complex, subunit D, mitochondrial Acesso: EMBL IPR008689	C
Cluster 443	ENSANGP00000022122 [Anopheles gambiae str. PEST]	2.00E-075	Translation protein SH3-like Acesso: EMBL IPR008991	J
Cluster 473	ENSANGP00000020091 [Anopheles gambiae str. PEST]	5.00E-057	Cytochrome c, class IA/ IB Acesso: EMBL IPR002327	P
Cluster 475	ENSANGP00000023428 [Anopheles gambiae str. PEST]	3.00E-049	Insect cuticle protein Acesso: EMBL IPR000618	M
Cluster 476	ENSANGP00000031573 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-033	Cytochrome c oxidase subunit Vic Acesso: EMBL IPR004204	Q
Cluster 478	ENSANGP00000014100 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-057	Cytochrome bd ubiquinol oxidase, 14 kDa subunit Acesso: EMBL IPR003197	Q
Cluster 480	ENSANGP00000021887 [Anopheles gambiae str. PEST]	3.00E-040	Ubiquinol-cytochrome C reductase hinge Acesso: EMBL IPR003422	Q
Cluster 484	ENSANGP00000014881 [Anopheles gambiae str. PEST]	5.00E-099	Mitochondrial substrate carrier Acesso: EMBL IPR001993	C
Cluster 488	ENSANGP00000012460 [Anopheles gambiae str. PEST]	e-135	Phosphoglycerate kinase Acesso: EMBL IPR001576	C
Cluster 490	ENSANGP00000018909 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-058	Ribosomal protein L30e Acesso: EMBL IPR000231	J
Cluster 492	ENSANGP00000016601 [Anopheles gambiae str. PEST]	6.00E-060	Ribosomal protein S26e Acesso: EMBL IPR000892	J
Cluster 496	ENSANGP00000012363 [Anopheles gambiae str. PEST]	4.00E-012	FAMILY NOT NAMED Acesso: Panther PTHR22147	S
Cluster 501	ENSANGP00000022070 [Anopheles gambiae str. PEST]	4.00E-075	Cytochrome c oxidase, subunit Va Acesso: EMBL IPR003204	Q
Cluster 505	ENSANGP00000010802 [Anopheles gambiae str. PEST]	7.00E-044	Insect cuticle protein Acesso: EMBL IPR000618	M

Cluster	Produtos Gênicos	E-value	Informações encontradas dos produtos gênicos ENSANGP nos bancos de dados NCBI, EMBL e Panther.	COG
Cluster 513	ENSANGP00000012588 [Anopheles gambiae str. PEST]	3.00E-067	Insect pheromone/odorant binding protein PhBP Acesso EMBL: IPR006625	S
Cluster 515	ENSANGP00000016723 [Anopheles gambiae str. PEST]	3.00E-080	Translation initiation factor 1A (eIF-1A) (TIF_eIF-1A) Acesso: EMBL IPR001253	J
Cluster 518	ENSANGP00000011122 [Anopheles gambiae str. PEST]	5.00E-066	Cytochrome c oxidase, subunit Vb Acesso: EMBL IPR002124	M
Cluster 521	ENSANGP00000024683 [Anopheles gambiae str. PEST]	9.00E-041	Cytochrome c oxidase, subunit VIb Acesso: EMBL IPR003213	M
Cluster 526	ENSANGP00000011949 [Anopheles gambiae str. PEST]	7.00E-070	7TM GPCR, rhodopsin-like Acesso: EMBL IPR000276	R
Cluster 532	ENSANGP00000017569 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-079	Plectin/S10, N-terminal Acesso: EMBL IPR005326	J
Cluster 536	ENSANGP00000007514 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-087	NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Subunit Acesso Panther: PTHR21382	C
Cluster 541	ENSANGP00000011949 [Anopheles gambiae str. PEST]	e-173	GPCR, rhodopsin-like superfamily Acesso: EMBL IPR017452	R
Cluster 550	ENSANGP00000014823 [Anopheles gambiae str. PEST]	4.00E-042	Insect cuticle protein Acesso: EMBL IPR000618	M
Cluster 551	ENSANGP00000019347 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-049	UNCHARACTERIZED Acesso Panther: PTHR12336	S
Cluster 552	ENSANGP00000020184 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-044	L-lactate/malate dehydrogenase Acesso: EMBL IPR001557	C
Cluster 556	ENSANGP00000010360 [Anopheles gambiae str. PEST]	1.00E-086	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I Acesso: EMBL IPR006424	C
Cluster 573	ENSANGP00000012579 [Anopheles gambiae str. PEST]	7.00E-082	NADH:ubiquinone oxidoreductase, 42 kDa subunit Acesso: EMBL IPR015828	C
Cluster 579	ENSANGP00000028538 [Anopheles gambiae str. PEST]	3.00E-067	Ribosomal protein L27e Acesso: EMBL IPR001141	J
Cluster 589	ENSANGP00000015322 [Anopheles gambiae str. PEST]	e-129	Ribosomal protein S5 Acesso: EMBL IPR000851	J
Cluster 590	ENSANGP00000016795 [Anopheles gambiae str. PEST]	3.00E-075	Hemocyanin, N-terminal Acesso EMBL: IPR005204	P
Cluster 592	ENSANGP00000022284 [Anopheles gambiae str. PEST]	5.00E-072	Ribosomal protein S12e Acesso: EMBL IPR000530	J
Cluster 595	ENSANGP00000012569 [Anopheles gambiae str. PEST]	0.0	Arrestin Acesso EMBL: IPR000698	T

Cluster	Produtos Gênicos	E-value	Informações encontradas dos produtos gênicos ENSANGP nos bancos de dados NCBI, EMBL e Panther.	COG
Cluster 602	ENSANGP00000016695 [Anopheles gambiae str. PEST]	e-101	Beta-ketoacyl synthase Acesso EMBL: IPR000794	I
Cluster 626	ENSANGP00000016795 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	1.00E-028	Hemocyanin, N-terminal Acesso: EMBL IPR005204	P
Cluster 632	ENSANGP00000018155 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-111	EF-Hand type Acesso: EMBL IPR011992	P
Cluster 635	ENSANGP00000004582 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	4.00E-048	Thioredoxin-like Acesso: EMBL IPR017936	Q
Cluster 638	ENSANGP00000018406 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	3.00E-075	Molecular chaperone, heat shock protein, Hsp40, DnaJ Acesso: EMBL IPR015609	O
Cluster 643	ENSANGP00000021358 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	e-112	Ribosomal protein L15e Acesso: EMBL IPR000439	J
Cluster 205	40S ribosomal protein S15/S22 [*Aedes aegypti*]	7.00E-067	_	J
Cluster 350	40S ribosomal protein S13 [*Aedes aegypti*]	3.00E-079	_	J
Cluster 417	40S ribosomal protein S21 [*Aedes aegypti*]	3.00E-040	_	J
Cluster 451	40S ribosomal protein S29	2.00E-028	_	J
Cluster 469	40S ribosomal protein S16	4.00E-075	_	J
Cluster 491	40S ribosomal protein S8 [*Aedes aegypti*]	e-104	_	J
Cluster 524	40S ribosomal protein S7	4.00E-082	_	J
Cluster 564	40S ribosomal protein S4 [*Aedes aegypti*]	e-144	_	J
Cluster 572	40S ribosomal protein S20 [*Aedes albopictus*]	3.00E-057	_	J
Cluster 575	40S ribosomal protein S17	6.00E-068	_	J
Cluster 33	60S acidic ribosomal protein P1 [*Aedes aegypti*]	9.00E-051	_	J
Cluster 38	60S ribosomal protein L11 [*Anopheles funestus*]	4.00E-098	_	J
Cluster 138	60S ribosomal protein L40 (CEP52)	2.00E-020	_	J
Cluster 344	60S ribosomal protein L37 [*Aedes aegypti*]	2.00E-045	_	J
Cluster 360	60S ribosomal protein L19 [*Aedes aegypti*]	1.00E-071	_	J
Cluster 390	60S ribosomal protein L18a [*Aedes aegypti*]	3.00E-094	_	J
Cluster 486	60S ribosomal protein L21 [Aedes aegypti]	6.00E-075	_	J
Cluster 535	60S ribosomal protein L35 [*Aedes aegypti*]	3.00E-054	_	J
Cluster 576	60S ribosomal protein L44 [*Aedes aegypti*]	9.00E-056	_	J

Cluster	Produtos Gênicos	E-value	Informações encontradas dos produtos gênicos ENSANGP nos bancos de dados NCBI, EMBL e Panther.	COG
Cluster 593	60S acidic ribosomal protein P1 [*Aedes aegypti*]	1.00E-050	_	J
Cluster 598	60S ribosomal protein L27a [*Aedes albopictus*]	2.00E-075	_	J
Cluster 610	60S ribosomal protein L2/L8 [*Aedes aegypti*]	e-141	_	J
Cluster 151	ribosomal protein L39 [*Culex pipiens pallens*]	7.00E-022	_	J
Cluster 275	ribosomal protein L9 [*Aedes aegypti*]	2.00E-095	_	J
Cluster 392	ribosomal protein S23 [*Aedes albopictus*]	8.00E-078	_	J
Cluster 426	ribosomal protein L24 [*Anopheles funestus*]	5.00E-073	_	J
Cluster 457	ribosomal protein L40 CG2960-PA [*Drosophila melanogaster]*	1.00E-068	_	J
Cluster 474	ribosomal protein S18 [*Aedes aegypti*]	2.00E-076	_	J
Cluster 470	ribosomal protein S6 [*Anopheles stephensi*]	7.00E-078	_	J
Cluster 489	ribosomal protein L23a [*Anopheles stephensi*]	2.00E-034	_	J
Cluster 529	ribosomal protein L7 [*Aedes aegypti*]	e-116	_	J
Cluster 583	ribosomal protein P0 [*Aedes aegypti*]	2.00E-053	_	J
Cluster 587	ribosomal protein S3 [*Aedes aegypti*]	e-119	_	J
Cluster 618	ribosomal protein L41 CG30425-PA [*Drosophila melanogaster]*	8.00E-006	_	J
Cluster 118	actin [*Spodoptera exigua*]	9.00E-012	_	N, Z
Cluster 152	actin [*Aedes aegypti*]	e-137	_	N, Z
Cluster 166	actin [*Anopheles gambiae*]	e-123	_	N, Z
Cluster 519	ADP,ATP carrier protein 1 (ADP/ATP translocase 1) (Adenine	3.00E-028	_	C
Cluster 641	ATP synthase beta subunit [*Aedes aegypti*]	e-128	_	C
Cluster 236	alpha tubulin [*Aedes aegypti*]	2.00E-083	_	N
Cluster 393	calcium-transporting atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type	2.00E-055	_	P
Cluster 542	cytochrome c oxidase subunit iv [*Aedes aegypti*]	3.00E-080	_	C
Cluster 39	conserved hypothetical protein [*Aedes aegypti*]	3.00E-046	_	R

Cluster	Produtos Gênicos	E-value	Informações encontradas dos produtos gênicos ENSANGP nos bancos de dados NCBI, EMBL e Panther.	COG
Cluster 103	conserved hypothetical protein [*Geobacter bemidjiensis* Bem]	4.00E-019	_	R
Cluster 158	conserved hypothetical protein [*Aedes aegypti*]	5.00E-052	_	R
Cluster 624	conserved hypothetical protein [*Aedes aegypti*]	6.00E-067	_	R
Cluster 288	cuticle protein, putative [*Aedes aegypti*]	4.00E-050	_	M
Cluster 558	elongation factor 1 alpha [*Culicoides sonorensis*]	e-145	_	J
Cluster 50	GA15316-PA [*Drosophila pseudoobscura*]	9.00E-054	_	Q
Cluster 619	GA15316-PA [*Drosophila pseudoobscura*]	6.00E-062	_	Q
Cluster 128	hexamerin 2 beta [*Aedes aegypti*]	1.00E-009	_	M
Cluster 42	hypothetical protein [*Eimeria tenella*]	3.00E-048	_	R
Cluster 211	hypothetical salivary protein 16 [*Anopheles stephensi*]	1.00E-017	_	R
Cluster 256	hypothetical protein PY04651 [*Plasmodium yoelii yoelii* str. 17XNL]	3.00E-009	_	R
Cluster 527	hypothetical protein [*Thermobia domestica*]	3.00E-076	_	R
Cluster 379	myosin light chain 1, putative [*Aedes aegypti*]	1.00E-041	_	N, Z
Cluster 352	neuromusculin [*Aedes aegypti*]	6.00E-029	_	M
Cluster 487	PREDICTED: similar to Guanine nucleotide-binding protein gamma-e	5.00E-082	_	R
Cluster 270	putative MLC1 protein [*Anopheles gambiae*]	1.00E-016	_	R
Cluster 353	stretchin-mlck [*Aedes aegypti*]	1.00E-080	_	V
Cluster 253	TPA_inf: troponin C type IIIa [*Anopheles gambiae* str. PEST]	2.00E-054	_	Z
Cluster 414	TPA_inf: troponin T isoform 3 [*Anopheles gambiae* str. PEST]	9.00E-007	_	Z
Cluster 622	tropomyosin invertebrate [*Aedes aegypti*]	1.00E-092	_	Z
Cluster 78	tropomyosin invertebrate [*Aedes aegypti*]	4.00E-034	_	Z
Cluster 384	tropomyosin invertebrate [*Aedes aegypti*]	9.00E-058	_	Z
Cluster 279	translation initiation factor 3, subunit S9, putative [*Aedes*]	8.00E-016	_	J

Cluster	Produtos Gênicos	E-value	Informações encontradas dos produtos gênicos ENSANGP nos bancos de dados NCBI, EMBL e Panther.	COG
Cluster 6	unc-13 CG2999-PC, isoform C [*Drosophila melanogaster*]	4.00E-018	_	R
Cluster 262	ubiquinol cytochrome C oxidoreductase-subunit 6.4kD	5.00E-054	_	Q
Cluster 28	Ubiquitin B [*Mus musculus*]	1.00E-046	_	C
Cluster 14	Vacuolar ATP synthase subunit H [*Aedes aegypti*]	0	_	_
Cluster 46	No hits found	0	_	_
Cluster 51	No hits found	0	_	_
Cluster 62	No hits found	0	_	_
Cluster 86	No hits found	0	_	_
Cluster 104	No hits found	0	_	_
Cluster 112	No hits found	0	_	_
Cluster 134	No hits found	0	_	_
Cluster 150	No hits found	0	_	_
Cluster 223	No hits found	0	_	_
Cluster 230	No hits found	0	_	_
Cluster 311	No hits found	0	_	_
Cluster 323	No hits found	0	_	_
Cluster 361	No hits found	0	_	_
Cluster 497	No hits found	0	_	_
Cluster 546	No hits found	0	_	_

Tabela 3: Produtos gênicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no cromossomo 2, braço 2L de *A. gambiae*.

	Braço 2L
Cluster	**Produto gênico**
Cluster 14	No hits found
Cluster 17	ENSANGP00000010437 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 27	ENSANGP00000013298 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 39	conserved hypothetical protein [Aedes aegypti]
Cluster 42	hypothetical salivary protein 16 [Anopheles stephensi]
Cluster 48	ENSANGP00000017452 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 57	ENSANGP00000019065 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 71	ENSANGP00000019453 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 104	No hits found
Cluster 118	actin [Spodoptera exigua]
Cluster 132	ENSANGP00000024604 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 152	actin [Aedes aegypti]
Cluster 158	conserved hypothetical protein [Aedes aegypti]
Cluster 166	actin [Anopheles gambiae]
Cluster 167	ENSANGP00000022175 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 210	ENSANGP00000017869 [Anopheles gambiae str. PEST]

Cluster 287	ENSANGP00000023852 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 307	ENSANGP00000028234 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 311	No hits found
Cluster 320	ENSANGP00000021011 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 350	40S ribosomal protein S13 [Aedes aegypti]
Cluster 353	TPA_inf: troponin C type IIIa [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 361	No hits found
Cluster 393	calcium-transporting atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type
Cluster 394	ENSANGP00000021862 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 475	ENSANGP00000023428 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 489	ribosomal protein L23a [Anopheles stephensi]
Cluster 497	No hits found
Cluster 505	ENSANGP00000010802 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 519	ADP,ATP carrier protein 1 (ADP/ATP translocase 1) (Adenine
Cluster 521	ENSANGP00000024683 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 536	ENSANGP00000007514 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 558	elongation factor 1 alpha [Culicoides sonorensis]
Cluster 564	40S ribosomal protein S4 [Aedes aegypti]
Cluster 575	40S ribosomal protein S17
Cluster 590	ENSANGP00000016795 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 610	60S ribosomal protein L2/L8 [Aedes aegypti]
Cluster 618	Ribosomal protein L41 CG30425-PA [Drosophila melanogaster]
Cluster 626	ENSANGP00000016795 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 643	ENSANGP00000021358 [Anopheles gambiae str. PEST]

Tabela 4: Produtos gênicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no cromossomo 2, braço 2R de *A. gambiae.*

	Braço 2R
Cluster	**Produto gênico**
Cluster 22	ENSANGP00000017618 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 25	ENSANGP00000011028 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 28	Vacuolar ATP synthase subunit H [Aedes aegypti]
Cluster 41	ENSANGP00000025118 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 46	No hits found
Cluster 62	No hits found
Cluster 65	ENSANGP00000025315 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 69	ENSANGP00000013957 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 78	tropomyosin invertebrate [Aedes aegypti]
Cluster 96	ENSANGP00000020828 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 106	ENSANGP00000020662 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 152	actin [Aedes aegypti]
Cluster 154	ENSANGP00000022149 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 166	actin [Anopheles gambiae]
Cluster 167	ENSANGP00000022175 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 171	ENSANGP00000016963 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 191	ENSANGP00000012069 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 195	ENSANGP00000013568 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 213	ENSANGP00000016817 [Anopheles gambiae str. PEST]

Cluster 223	No hits found
Cluster 230	No hits found
Cluster 236	alpha tubulin [Aedes aegypti]
Cluster 253	TPA_inf: troponin T isoform 3 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 262	Ubiquitin B [Mus musculus]
Cluster 264	ENSANGP00000011882 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 270	stretchin-mlck [Aedes aegypti]
Cluster 279	unc-13 CG2999-PC, isoform C [Drosophila melanogaster]
Cluster 290	ENSANGP00000011949 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 292	ENSANGP00000018253 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 299	ENSANGP00000016706 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 302	ENSANGP00000015417 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 318	ENSANGP00000012302 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 321	ENSANGP00000017702 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 327	ENSANGP00000030559 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 347	ENSANGP00000010983 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 348	ENSANGP00000018253 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 360	60S ribosomal protein L19 [Aedes aegypti]
Cluster 392	ribosomal protein S23 [Aedes albopictus]
Cluster 411	ENSANGP00000015800 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 414	tropomyosin invertebrate [Aedes aegypti]
Cluster 443	ENSANGP00000022122 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 451	40S ribosomal protein S29
Cluster 457	Ribosomal protein L40 CG2960-PA [Drosophila melanogaster]
Cluster 470	ribosomal protein S6 [Anopheles stephensi]
Cluster 480	ENSANGP00000021887 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 484	ENSANGP00000014881 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 487	putative MLC1 protein [Anopheles gambiae]
Cluster 490	ENSANGP00000018909 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 491	40S ribosomal protein S8 [Aedes aegypti]
Cluster 515	ENSANGP00000016723 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 526	ENSANGP00000011949 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 527	myosin light chain 1, putative [Aedes aegypti]
Cluster 535	60S ribosomal protein L35 [Aedes aegypti]
Cluster 541	ENSANGP00000011949 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 546	No hits found
Cluster 552	ENSANGP00000020184 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 558	elongation factor 1 alpha [Culicoides sonorensis]
Cluster 576	60S ribosomal protein L44 [Aedes aegypti]
Cluster 583	ribosomal protein P0 [Aedes aegypti]
Cluster 587	ribosomal protein S3 [Aedes aegypti]
Cluster 589	ENSANGP00000015322 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 622	tropomyosin invertebrate [Aedes aegypti]
Cluster 632	ENSANGP00000018155 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 638	ENSANGP00000018406 [Anopheles gambiae str. PEST]

Tabela 5: Produtos gênicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no cromossomo 3, braço 3L de *A. gambiae*.

	Braço 3L
Cluster	**Produto gênico**
Cluster 6	ubiquinol cytochrome C oxidoreductase-subunit 6.4kD-subunit,
Cluster 12	ENSANGP00000010075 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 38	60S ribosomal protein L11 [Anopheles funestus]
Cluster 151	ribosomal protein L39 [Culex pipiens pallens]
Cluster 152	actin [Aedes aegypti]
Cluster 166	actin [Anopheles gambiae]
Cluster 167	ENSANGP00000022175 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 170	ENSANGP00000016831 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 236	alpha tubulin [Aedes aegypti]
Cluster 256	hypothetical protein [Thermobia domestica]
Cluster 258	ENSANGP00000018480 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 293	ENSANGP00000023017 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 297	ENSANGP00000010247 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 309	ENSANGP00000015019 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 379	neuromusculin [Aedes aegypti]
Cluster 384	translation initiation factor 3, subunit S9, putative [Aedes
Cluster 390	60S ribosomal protein L18a [Aedes aegypti]
Cluster 428	ENSANGP00000012669 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 469	40S ribosomal protein S16
Cluster 474	ribosomal protein S18 [Aedes aegypti]
Cluster 478	ENSANGP00000014100 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 486	60S ribosomal protein L21 [Aedes aegypti]
Cluster 492	ENSANGP00000016601 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 501	ENSANGP00000022070 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 524	40S ribosomal protein S7
Cluster 572	40S ribosomal protein S20 [Aedes albopictus]
Cluster 573	ENSANGP00000012579 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 579	ENSANGP00000028538 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 590	ENSANGP00000016795 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 592	ENSANGP00000022284 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 598	60S ribosomal protein L27a [Aedes albopictus]
Cluster 619	hexamerin 2 beta [Aedes aegypti]
Cluster 626	ENSANGP00000016795 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 641	ATP synthase beta subunit [Aedes aegypti]

Tabela 6: Produtos genicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no comossomo 3, braço 3R de *A. gambiae*.

	3R
Cluster	**Produto gênico**
Cluster 10	ENSANGP00000015791 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 33	60S acidic ribosomal protein P1 [Aedes aegypti]
Cluster 50	GA15316-PA [Drosophila pseudoobscura]
Cluster 51	No hits found
Cluster 66	ENSANGP00000010198 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 86	No hits found

Cluster 103	conserved hypothetical protein [Geobacter bemidjiensis Bem]
Cluster 110	ENSANGP00000016770 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 112	No hits found
Cluster 117	ENSANGP00000019363 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 123	ENSANGP00000021056 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 128	hypothetical protein [Eimeria tenella]
Cluster 134	No hits found
Cluster 138	60S ribosomal protein L40 (CEP52)
Cluster 150	No hits found
Cluster 190	ENSANGP00000016419 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 205	40S ribosomal protein S15/S22 [Aedes aegypti]
Cluster 254	ENSANGP00000010167 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 267	ENSANGP00000019329 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 275	ribosomal protein L9 [Aedes aegypti]
Cluster 288	cuticle protein, putative [Aedes aegypti]
Cluster 300	ENSANGP00000021902 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 318	ENSANGP00000012302 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 342	ENSANGP00000010360 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 344	60S ribosomal protein L37 [Aedes aegypti]
Cluster 352	PREDICTED: similar to Guanine nucleotide-binding protein gamma-e
Cluster 353	TPA_inf: troponin C type IIIa [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 417	40S ribosomal protein S21 [Aedes aegypti]
Cluster 426	ribosomal protein L24 [Anopheles funestus]
Cluster 457	Ribosomal protein L40 CG2960-PA [Drosophila melanogaster]
Cluster 473	ENSANGP00000020091 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 476	ENSANGP00000031573 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 488	ENSANGP00000012460 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 496	ENSANGP00000012363 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 518	ENSANGP00000011122 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 529	ribosomal protein L7 [Aedes aegypti]
Cluster 542	cytochrome c oxidase subunit iv [Aedes aegypti]
Cluster 550	ENSANGP00000014823 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 551	ENSANGP00000019347 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 556	ENSANGP00000010360 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 593	60S acidic ribosomal protein P1 [Aedes aegypti]
Cluster 595	ENSANGP00000012569 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 602	ENSANGP00000016695 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 624	conserved hypothetical protein [Aedes aegypti]
Cluster 635	ENSANGP00000004582 [Anopheles gambiae str. PEST]

Tabela 7: Produtos gênicos de *A. darlingi* hibridizados *in silico* no cromossomo X de *A. gambiae*.

	Braço X
Cluster	**Produto gênico**
Cluster 62	No hits found
Cluster 152	actin [Aedes aegypti]
Cluster 166	actin [Anopheles gambiae]
Cluster 167	ENSANGP00000022175 [Anopheles gambiae str. PEST]

Cluster 202	ENSANGP00000018702 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 205	40S ribosomal protein S15/S22 [Aedes aegypti]
Cluster 211	hypothetical protein PY04651 [Plasmodium yoelii yoelii str. 17XNL]
Cluster 280	ENSANGP00000019108 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 323	No hits found
Cluster 323	No hits found
Cluster 391	ENSANGP00000021345 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 513	ENSANGP00000012588 [Anopheles gambiae str. PEST]
Cluster 532	ENSANGP00000017569 [Anopheles gambiae str. PEST]

This document was created with Win2PDF available at http://www.win2pdf.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.