

Caracterização genética do complexo *Anopheles albitarsis*, usando DNA nuclear e mitocondrial de três localidades da Amazônia

Mellina Vilhena NAICE¹; Gislene Almeida CARVALHO-ZILSE³; Jacqueline da Silva BATISTA⁴; Míriam Silva RAFAEL²

¹ Bolsista PIBIC CNPq/INPA; ² Orientador INPA/CPCS/Laboratório de Vetores da Malária e Dengue; ³ Colaborador INPA/GPA; ⁴ Laboratório Temático de Biologia Molecular.

O complexo *Anopheles albitarsis* transmite a malária em algumas áreas da Amazônia. Este complexo apresenta cinco espécies crípticas, onde 3 já foram descritas: A (*A. albitarsis sensu strictu*), C (*A. marajoara*) e D (*A. deaneorum*) (Wilkerson *et al.*, 1995), e 2 ainda não descritas: B e E (Lehr *et al.*, 2005). Para uma melhor caracterização do *status* taxonômico do grupo, estudou-se pela primeira vez, o fragmento ND5 do DNA mitocondrial (Merida *et al.*, 1995) e o ITS2 do DNA nuclear (Orita *et al.*, 1989). O DNA genômico foi extraído segundo Williams *et al.* (1993), a partir de larva de 4º estágio de cada postura, totalizando 15 indivíduos de Manaus (AM 010 Km 33), Cacau Pirera e Coari, Amazonas. O DNA quantificado em gel de agarose a 0,8% foi foto documentado. O método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizado com o par de *primers* P1 e M2, para o fragmento ND5 e, para o gene ITS2 utilizou-se o par de *primers* CP16 e CP17. O produto de PCR foi purificado com o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*. Obteve-se 393 pares de bases (pb) para o ND5 e 415 pb para o ITS2. Padronizou-se o método PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism*) em *A. albitarsis*. O DNA em gel de poliacrilamida a 8% mostrou bandas com o mesmo perfil eletroforético (sem polimorfismo), um único haplotipo nas amostras de Manaus e Cacau Pirera, tanto para os genes ND5 como para o ITS2 (**Figura 1**). Em indivíduos de Coari, observou-se três haplotipos utilizando o gene ND5 (**Figura 2E**), enquanto que para o ITS2 foram observados dois haplotipos (**Figura 2F**). Os resultados obtidos com o fragmento ND5 foram comparados pelo método do seqüenciamento automático (Naice *et al.*, 2006). A estimativa dos índices de diversidade molecular indicou baixa variabilidade genética nos indivíduos de Manaus e Cacau Pirera e alta variabilidade genética em Coari. Os índices estimados para as três localidades foram: nº de haplotipos (H = 3; 3; 3), nº de haplotipos únicos (NS = 2; 1; 1), nº total de mutações (ETA = 3; 2; 13) e a média de diferenças nucleotídicas par a par (K = 0,514; 0,380; 4,800), respectivamente. Considerando as amostras analisadas dessas três localidades foram encontrados 7 haplotipos, sendo 03 haplotipos únicos (um em cada localidade amostrada), 02 compartilhados entre Manaus e Cacau Pirera e 03 haplotipos somente em Coari. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou estruturação genética, com diferenças significativas do gene ND5 entre Coari, Cacau Pirera e Manaus (Fst = 0,68 p < 0,0005). Porém, não houve diferenciação genética significativa entre os exemplares de Manaus e Cacau Pirera (p = 0,999). Esta análise mostrou, que 68% da variabilidade genética ocorreu entre as populações e 32% dentro de cada população. A distância genética média foi de 1,835% ± 0,10 entre todos os haplotipos amostrados. A distância genética não corrigida ("p") variou entre 3,136 a 0,254%, sendo que a maior foi encontrada entre os indivíduos de Cacau Pirera e Coari. O mesmo comparativo foi realizado com o fragmento ITS2, com 24 exemplares, sendo 11 de Coari, sete de Manaus e 6 de Cacau Pirera, cujo resultado mostrou variabilidade genética menor do que a do fragmento ND5. Estimou-se para as três localidades índices de diversidade molecular: nº de haplotipos (H = 3; 1; 2), nº de haplotipos únicos (NS = 1; 0; 0), nº total de mutações (ETA = 2; 0; 2) e a média de diferenças nucleotídicas par a par (K = 0,866; 0; 0,872), respectivamente. Nas amostras dessas três localidades, registrou-se 3 haplotipos (1 haplotipo único encontrado apenas em Cacau Pirera e 2 compartilhados entre as três localidades). Os dados da Variância Molecular (AMOVA) não mostraram estruturação genética, entre as três localidades (Fst = 0,02826 p < 0,32747). Nesta análise a variabilidade genética entre as populações foi de 2,83% e dentro de cada população de 97,17%. A distância genética média foi de 0,32% ± 0,13 entre todos os haplotipos amostrados (**Tabela 1**). Os dados do PCR-SSCP confirmam os resultados do seqüenciamento do gene ND5 em *A. albitarsis*. Há forte indício de haver mais de um táxon nesse complexo de espécies, considerando que as amostras de Coari mostraram maiores valores de variabilidade genética. Este estudo é importante para auxiliar outras pesquisas que visem o controle de *A. albitarsis*, vetor primário da malária na Amazônia.

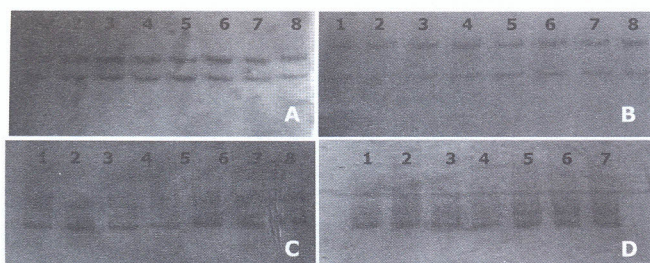


Figura 1: Gel de Poliacrilamida 8% mostrando um único haplótipo encontrado. **A=** Cacau Pirera com gene ND5; **B=** Manaus com gene ND5; **C=** Cacau Pirera com gene ITS2; **D=** Manaus com gene ITS2.

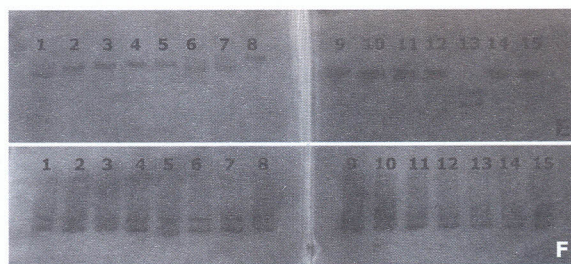


Figura 2: Gel de Poliacrilamida 8% mostrando os diferentes haplótipos encontrados em Coari. **E=** Com o gene ND5, os números **1, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14** e **15** representam o haplótipo 1; **2, 3, 4, 5** e **8** representam o haplótipo 2; e **13**, o haplótipo 3; **F=** Com o gene ITS2, os números **1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14** e **15** representam o haplótipo 1; **3** e **13** representam o haplótipo 2.

Tabela 1: Índices de diversidade molecular entre amostras de *Anopheles albitarsis* de Manaus, Coari e Cacau Pirera para os genes NDH5⁺ e ITS2. N= n° de amostras; H= n° de haplótipos; NS = N° de haplótipos únicos; TS = N° de transições; TV= N° de transversões; ETA = N° total de mutações, S = n° de sítios polimórficos, HD= diversidade haplotípica, Pi= diversidade nucleotídica e K= média de diferenças nucleotídicas par a par.

Mutações											
Localidade	Gene	N	H	NS	S	ETA	TS	TV	HD	Pi	K
Cacau Pirera	ND5	15	3	2	3	3	2	1	0,257±0,257	0,001±0,001	0,514±0,458
	ITS2	6	3	1	2	2	1	1	0,600±0,215	0,002±0,001	0,866±0,700
Manaus	ND5	15	3	1	2	2	2	0	0,361±0,144	0,001±0,010	0,380±0,380
	ITS2	7	1	0	0	0	0	0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Coari	ND5	15	3	1	13	13	13	0	0,447±0,134	0,012±0,007	4,800±2,483
	ITS2	11	2	0	2	2	1	1	0,600±0,215	0,002±0,001	0,872±0,661
TODAS	ND5	45	7	3	19	19	17	2	0,635±0,063	0,011±0,006	4,626±2,312
	ITS2	24	3	1	2	2	1	1	0,359±0,110	0,002±0,001	0,634±0,513

Palavras-chave: complexo *Anopheles albitarsis*, ITS2, ND5, PCR-SSCP

Apoio Financeiro: PIPT/FAPEAM (Proc. 15138/03), Projeto PIATAM/Petrobrás, PPI/MCT/IN

Bibliografias citadas

Lehr, M.A.; Kilpatrick, C.W.; Wilkerson, R.C.; Conn, J.E., 2005. Cryptic Species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) Complex: Incongruence Between Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Identification and Analysis of Mitochondrial DNA *COI* Gene Sequences. *Ann Entomol. Soc. Am*, 98(6): 908-917.

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

Naice, M.V.; Tadei, W.P.; Batista, J.S.; Rafael, M.S., 2006. Caracterização Genética do Complexo *Anopheles albitarsis* (Diptera: Culicidae) da Amazônia Central, por meio de marcadores mitocondriais. *XV Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq/FAPEAM/INPA*, 117-118.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770.

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

Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A.; Tingey, S.C., 1993. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Meth. in Enzimol.* 218:704-740.