

MAPEAMENTO DO GENE CATALASE *in situ* EM CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DE *Anopheles darlingi*, Root 1926 (DIPTERA: CULICIDAE).

Giselle Palmeira Neves¹; Letícia Cegatti Bridi²; Miriam Silva Rafael³

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Co-orientadora CPCS /INPA; ³Orientadora CPCS/INPA.

1. Introdução

A malária é a doença que causa mais mortes no mundo (Coura *et al.*, 2006). No Brasil são mais de 600.000 casos de doença por ano. De acordo com o Ministério da Saúde (2009) de janeiro a outubro de 2009, Manaus registrou 13.575 casos de malária. Os parasitas, responsáveis pela doença, são protozoários do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos de uma pessoa a outra pela picada do mosquito do gênero *Anopheles*. O *Anopheles darlingi* é o principal vetor da malária na Amazônia, onde ocorre o maior número de casos e cuja preferência é alimentar-se de sangue humano (Tadei *et al.*, 1998).

Considerando dados citogenéticos clássicos, 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). Estudos de citogenética molecular para mapeamento físico de DNA/RNA, por meio de método de hibridização *in situ* – HIS (*in situ* hybridization) têm auxiliado na identificação do genes específicos ou sequências de regiões cromossômicas desse mosquito (Rafael *et al.* 2004). A HIS 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 (Kumar & Collins, 1994).

Considerando a biblioteca de Etiquetas de Sequência Expressa (ESTs) de *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2005; Bridi *et al.*, 2006), a sequência gênica Catalase, do banco de ESTS de adultos desse mosquito foi utilizada pela primeira vez, para mapeamento físico em cromossomos politênicos de *A. darlingi*. Estudo de algumas linhagens de *Anopheles gambiae* por DeJong *et al.* (2007) demonstrou que a redução da fecundidade desses mosquitos está relacionada com a idade das fêmeas, que é provavelmente causado por dano oxidativo, presente em diferentes alelos de catalase. Além disso, os resultados do estudo indicam que *A. gambiae* e possivelmente outros insetos utilizam a catalase para proteger o ovário e ou embriões de danos oxidativos. A catalase da biblioteca de ESTs de *A. darlingi* foi utilizada para hibridizar *in situ* os cromossomos politênicos de *A. darlingi*.

Objetivou-se mapear a sequência do gene da catalase *in situ* de *A. darlingi*, a partir de um banco de ESTs de *A. darlingi* adulto e detectar a sua localização física nos cromossomos politênicos de *A. darlingi*, pelo método de ISH.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta e manutenção dos anofelinos - As coletas de *A. darlingi* foram realizadas na cidade de Coari, Amazonas (4°6'S, 63°3'W). As fêmeas de *A. darlingi* coletadas 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).

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 lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido para fixação do material, depois foram mantidas em refrigerador a 20°C negativos.

2.2 Preparo de sonda - A sonda pl35_B09 (sequência do produto gênico catalase) contendo 431 pares de bases, foi retirada do banco da biblioteca de cDNA de *A. darlingi* adulto obtidas a partir do Projeto Genoma Funcional de *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2005; Bridi *et al.*, 2006). Essas sequências gênicas estão inseridas no vetor de clonagem plasmídeo *pCMV SPORT6* (INVITROGEN) e mantido na bactéria hospedeira *Escherichia coli* em placas em freezer 80°C negativos. As bactérias contendo os clones da catalase foram repicadas em meio de cultura *Cycle Grow* (CG) contendo 100 µL de Ampicilina (200µg/mL). Foram mantidas a 37°C, 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 0,8%.

2.3 Marcação do DNA por Nick translation (*Invitrogen cat. n° 18160- 010*) - Foram adicionados em um microtubo de 1,5 mL os reagentes: 1 μ g de DNA; 1/10 μ L de dNTP (*minus dATP*); 1/20 μ L de *Biotin-14-dATP*; 1/10 μ L de *Poll/DNAse I* e água Milli Q autoclavada para completar 50 μ L de ~~solução~~ em reação. A solução foi homogeneizada e o microtubo foi colocado a 15°C no termociclador por 90 minutos. Em seguida, acrescentou-se 1/10 μ L de *Stop Buffer*; 1/40 μ L de SDS 5%; 0,5 μ L de acetato de amônia (7,5 M). Foi precipitado com 2 volumes de Etanol 98% e mantido em *over-night* a 20°C negativos.

2.4 Purificação e precipitação da sonda - Após o período de *over-night*, o material foi centrifugado por 45 minutos a 4°C a 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e lavado o *pellet* com 100 μ L de Etanol 70% (gelado). Foram adicionados novamente 100 μ L de Etanol 70% (gelado) e centrifugou-se por 20 minutos a 4 °C a 13.000 rpm. O microtubo foi levado à estufa a 37°C até ocorrer sua secagem completa. O *pellet* foi ressuscitado em 75 μ L de solução de hibridização, cujo conteúdo consta dos seguintes reagentes: 100 μ L de 20x SSC; 200 μ L de Dextran Sulfato 50%; 500 μ L de Formamida; 200 μ L de Água Milli Q autoclavada.

2.5 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 65°C por 55 minutos, em seguida permaneceram à temperatura ambiente (T.A.) até atingirem 35°C. 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, 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 65°C no termociclador por 5 minutos, em seguida colocada em gelo por 5 minutos.

2.6 Hibridização in situ e detecção dos sinais - Para a hibridização *in situ*, utilizou-se o método de Lim (1993). Foram aplicados 15 μ L de sonda sobre as preparações citológicas (complementos politênicos de *A. darlingi*). As lâminas foram cobertas com lamínulas de 18x18 centímetros e transferidas para uma câmara úmida e levadas à estufa por 37°C, para hibridização *in situ* por 20 horas. Para a detecção dos sinais, as lâminas foram colocadas em 2xSSC a 37°C, para a retirada da lamínula. Em seguida foram lavadas em 2xSSC a 37°C, 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 μ L 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 a 37°C, 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 37°C, 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.

2.7 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.

3. Resultados e Discussão

Para realização da metodologia de hibridização *in situ* analisamos 12 lâminas, destas apenas duas lâminas apresentaram sinal de marcação, o que comprova a dificuldade de mapear fisicamente sondas de ESTs. Além disso, obter preparações citológicas de cromossomos politênicos por esmagamento apresentando bandas intactas é uma tarefa difícil, porque muitos núcleos são removidos ou tem sua morfologia danificada quando a lâmina é mergulhada em nitrogênio líquido, para a retirada da lamínula. A catalase, alvo do estudo, é a principal enzima antioxidante envolvida com a destruição protetora do peróxido de hidrogênio gerado durante o metabolismo celular (Masters & Holmes 1977). O gene da catalase foi mapeado em *Drosophila melanogaster* no cromossomo 3L, no intervalo das regiões 75D-76A (Lubinsky & Bewley 1979). Sharakhov *et al.* (2002) hibridizaram o gene da catalase em *A. gambiae* no cromossomo 2L, seção 21A e em *Anopheles funestus* no cromossomo 3R, seção 35C. E no presente trabalho a catalase hibridizou no braço 2R, seção 11D e braço 2L, seção 24C (Figura 1). Os sinais de marcação da sonda puderam ser detectados, a partir do fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al.*, aceito

para publicação) (Figura 2) de uma maneira mais precisa em relação ao mapa de referência de Kreutzer (*et al.*, 1972). Esse fotomapa foi construído com os cromossomos politênicos de uma população de *A. darlingi* de Guajará-Mirim, Estado de Rondônia, que apresenta baixo grau de polimorfismo de inversões.

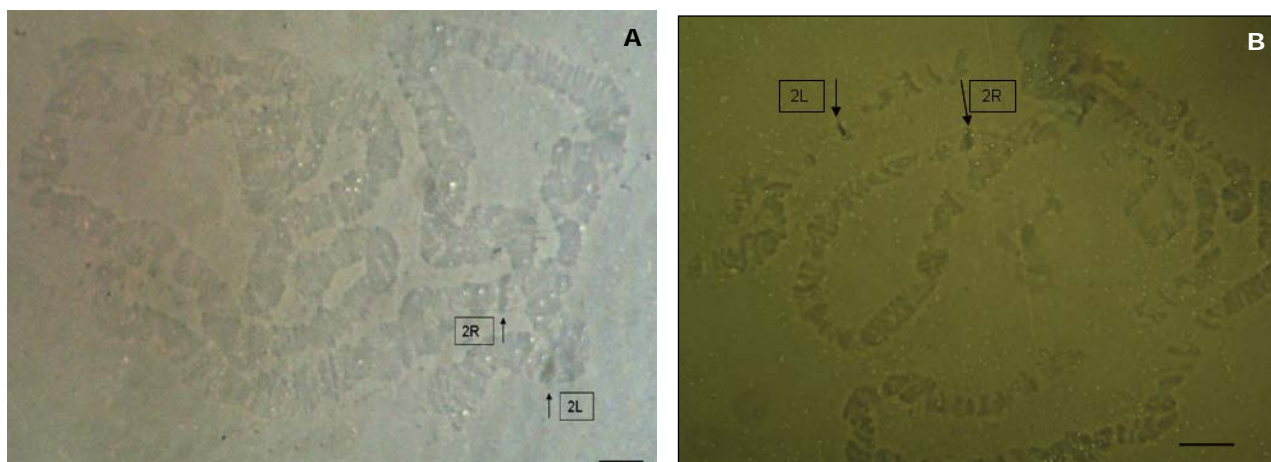


Figura 1 - Mapeamento do gene catalase (pl35_B09) no cromossomo politênico apresentando duas marcações: **A** - braço 2R, na seção 11D (seta) e **B** - braço 2L na seção 24C (seta). Barra: 10µm.

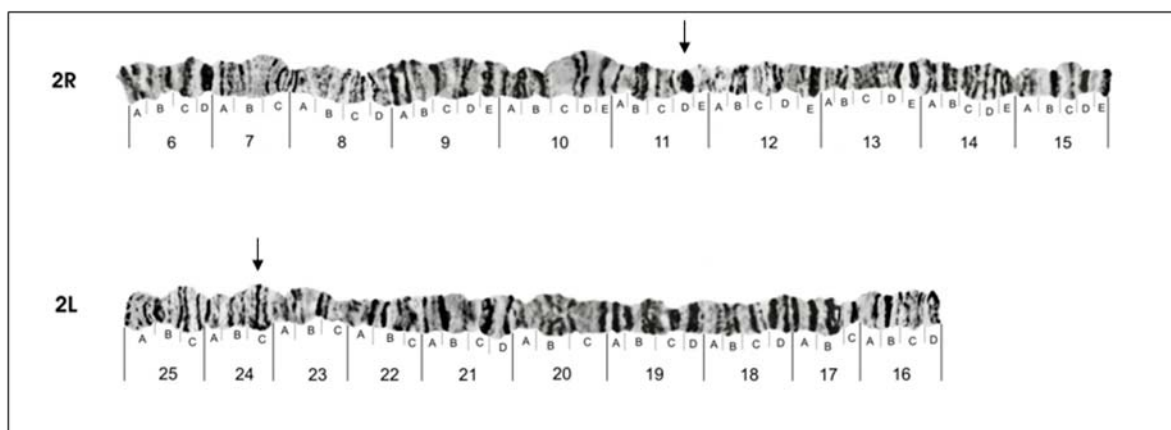


Figura 2- Fotomapa do cromossomo 2 (braço 2R e 2L), com as setas indicando as localizações da hibridização da sonda pl35_B09 nas bandas 11 D (2R) e 24 C (2L). Fonte: Rafael *et al.*, *in press*

4. Conclusão

Considerando o alto grau de polimorfismo de inversões de *A. darlingi*, e que o gene da catalase hibridizou em localizações únicas, diferente das hibridizações encontradas para espécies como *A. gambiae*, *A. funestus* e *D. melanogaster*, sugerem-se que o gene mapeado em *A. darlingi*, pode ser útil como marcador genético 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 a sintonia da localização cromossômica da sonda utilizada no presente estudo.

5. Referências

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.

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

Coura, J.R.; Mutis, M.S.; Andrade, S.L. 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo*. 101(3): 229-237.

- DeJong, R. J.; Miller, L. M.; Molina-Cruz, A.; Gupta, L.; Kumar, S.; Barillas-Mury, C. 2007. Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pnas* – Vol. 104, nº7.
- Faran, M.E. & Linthicum, K.J. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.*, 13 (1): 01-81.
- Forattini, O.P. *Entomologia Médica*. 1962. Faculdade de Saúde e Higiene Pública da USP. Editora da USP. vol 1: 662 p.
- French, W.L.; Baker, R.H.; Kitzmiller, J.B. 1962. Preparation of mosquito chromosomes. *osq. News*, 22: 377-383.
- Gorham, J.R.; Stojanovich, J.C.; Scott. H.G. 1967. *Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica Oriental*. Department of Health, Education, and Welfare Public Health Service. 64 p.
- Kreutzer, R.D.; Kitzmiller, J.B.; Ferreira, E. 1972. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. *Mosq. News*, 32: 555-556.
- 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.
- Lim, J.K. 1993. *In situ hybridization with biotinylated DNA*. Techniques Notes. *DIS 72*, 73-77p
- Lubinsky, S. & Bewley, G.C. 1979. Genetics of catase in *Drosophila melanogaster* rates of synthesis and degradation of the enzyme in flies aneuploid and euploid for the structural gene. *Genetics* 91: 723-742.
- Masters, C. & Holmes, R. 1977. Peroxisomes: new aspects of cell physiology and biochemistry. *Physiol. Rev.* 57: 816-882.
- Ministério da Saúde, 2009. (<http://www.pmm.am.gov.br/noticias/ministerio-da-saude>). Acesso: 08/02/2010.
- Rafael, M.S. & Tadei, W.P. 1998. Metaphase karyotypes 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.; 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.; Nunes–Silva, C.G.; Astolfi–Filho, S., Tadei, W.P. 2005. Biblioteca de cDNA de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). In: 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia/ São Paulo: Zepelini Editorial & Comunicação. v.CD. pp. 145-145.
- 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 Amazonica*. 11(4): 789-797.
- Scarpassa, V.M. & Tadei, W.P. 1990. Biologia de Anofelinos Amazônicos. XIII. Estudo do ciclo biológico de *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Acta Amazonica*. 20, n. único, p. 95-118
- 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.
- 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.