

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E**  
**BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG GCBE<sub>v</sub>**

**Localização física da subunidade I, do gene canal de sódio em cromossomos**  
**de *Anopheles darlingi*, Amazônia Central**

VALÉRIA SILVA SANTOS

Manaus, Amazonas  
março de 2017

VALÉRIA SILVA SANTOS

**Localização física da subunidade I do gene canal de sódio em cromossomos  
de *Anopheles darlingi*, Amazônia Central**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

**ORIENTADORA: MÍRIAM SILVA RAFAEL, Dra., INPA**

Manaus, Amazonas  
março de 2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação (CIP-Brasil)

S2371 Santos, Valéria

Localização física da subunidade I, do gene canal de sódio em cromossomos de *Anopheles darlingi*, Amazônia Central / Valeria Silva Santos; orientadora Miriam Silva Rafael. - Manaus: [s.l.], 2017.

1,16 MB

53p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. Citogenética . 2. gene canal de sódio . 3. *Anopheles darlingi*. I. Miriam Silva Rafael. II. Título

CDD 572.8 811 3

### Sinopse:

A análise preliminar das relações filogenéticas evolutivas e o mapeamento *in situ*, utilizando o *supercontig* do gene da subunidade I, do canal de sódio (*NaV*) de *Anopheles darlingi* foram realizadas. Registrou-se uma dinâmica evolutiva em dois caminhos em relação à evolução filogenética das 17 espécies de anofelinos entre os continentes. Infere-se, que pressões seletivas ambientais divergentes podem estar atuando para o surgimento de diferentes tamanhos de fragmentos do supercontig *NaV*, ou mesmo *gaps* (falhas) nas sequências de *NaV*, que podem estar causando essa distância filogenética evolutiva de *A. darlingi*. Uma nova região de desaparecimento de banda (16C, braço 2L) foi registrada. O gene *NaV* mapeou por hibridização *in situ* fluorescente a região 16 B (braço 2L) e a região 31A (braço 3R), cujos sítios não foram coincidentes com o mapeamento cromossômico *in silico* de *Anopheles gambiae*. Esses achados são importantes ao entendimento da variabilidade e evolução cromossômica desses mosquitos.

**Palavras chaves:** *Anopheles darlingi*, gene canal de sódio (*NaV*), filogenia molecular, Hibridização *In situ* Fluorescente; mapeamento físico

**Aos meus pais, Maria Helena e Luís Carlos**

**“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,  
mas o que melhor se adapta às mudanças”**

Charles Darwin

## AGRADECIMENTOS

Esta Dissertação foi realizada, com o apoio do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG GCBev) e Laboratório de Citogenética, Genômica e Evolução de Mosquitos (LCGEM) / INPA. Aos financiamentos fornecidos pelos projetos: Vetores da Malária e Dengue: do transcriptoma, expressão gênica, mapeamento físico cromossômico ao controle vetorial. EDITAL 020/ 2013 – FAPEAM e Mapeamento físico cromossômico de sequências gênicas do genoma de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). PRJ14.07 MCTI- INPA. A Agência de Fomento da Bolsa de Mestrado - CAPES.

Este trabalho não é resultados apenas de um esforço individual, mas também das contribuições significativas recebidas de pessoas e instituições, durante a minha trajetória profissional, acadêmica e como cidadã.

Agradeço muito à Dra. Míriam Rafael, minha orientadora, que certamente sente a importância que teve e tem para mim não só na condução do trabalho, mas também nas horas em que parece que nada está dando certo.

Gostaria de agradecer a Deus por ter me permitido concluir esse ciclo e realizar todas as minhas metas até agora, me fortalecendo para superar as dificuldades e continuar tentando sempre.

Agradeço aos meus pais, Maria Helena e Luis Carlos, que me educaram para ir atrás dos meus objetivos com muito amor e dedicação, jamais poupando esforços pela nossa família e agradeço também minhas irmãs Vanessa e Vanilse, que me acompanharam ao longo de toda minha vida, enchendo-a de orgulho e amor.

Quero externar o meu amor aos meus sobrinhos Carlos Daniel e Maria Júlia, que embora muito crianças não tenham consciência, mas eles me fizeram e continuam me fazendo feliz, por terem me ajudado a superar momentos difíceis, durante esta jornada da minha vida.

Registro, também, o meu carinho a toda equipe do LCGEM, em especial à Kiara que me acompanhou durante todo o mestrado, parceria e amizade que levarei pra vida. À Letícia, Gisele, Junielson, Sabrina, Luana, Dayane e Luis, também deixo meus profundos agradecimentos pela companhia diária e por terem contribuído com meu trabalho de alguma

forma. Ao meu querido amigo José, só posso dizer o que você já sabe, que sua amizade foi essencial nesse processo e tenho muito orgulho de você.

Ao Alexandre Almeida – a ele não tenho palavras que possam representar o carinho e a gratidão por sua companhia e ter estado ao meu lado nos melhores momentos vividos em Manaus e, também, em alguns dos piores, sempre com muita paciência e carinho por mim.

Aos amigos que fiz aqui e levarei pra vida, Amanda e Iuna, saber que posso contar com vocês sempre faz com que morar longe da família fique um pouco menos dolorido.

Agradeço aos meus amigos de longa data, Thayane, Pâmella, Marcos, Clarissa, Josilene, Hayssa, Kassya, Vivaldo e Carol que dividiram comigo alegrias e tristezas, que sempre acreditam no meu potencial e apoiaram minhas decisões. Sempre busco força e exemplo em vocês.

Ao Lucas Saturnino e Sid Alexandre que se fizeram presente ainda que longe, e igualmente me apoiaram e torceram pelas minhas conquistas, agradeço pela cumplicidade.

Por fim, agradeço ao INPA e todos os envolvidos na Divisão do Curso de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (DIGEN) DIGEN, pelas oportunidades que me foram dadas. Expresso aqui meu carinho pela instituição.

## RESUMO

*Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 é o principal vetor de protozoários do gênero *Plasmodium* da malária, na América do Sul, onde é responsável pela transmissão de 99% de registros da doença. As estratégias utilizadas no combate a esse vetor são focadas, principalmente, no uso de inseticidas piretróides, que interagem com os canais de sódio do axônio, causando a paralisia dos sistemas nervosos central e periférico. Os canais de sódio regulados por voltagem (*NaV*) são proteínas transmembranares compostas por subunidades, cuja principal é a subunidade I. A resistência a inseticidas, que resulta de mutações pontuais no gene, que codifica o canal de sódio, e isto é uma grande ameaça à eficácia da implementação dos programas de prevenção da doença e controle do seu vetor. Neste trabalho foi realizada a análise filogenética preliminar do *supercontig (scaffold)*, canal de sódio (*NaV*), de 17 espécies de anofelinos e o mapeamento físico, por meio do método de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) em núcleos politênicos de *A. darlingi*, para inferir sobre a evolução e variabilidade cromossômica desse gene. Na construção da árvore filogenética evolutiva do gene *NaV*, as sequências foram alinhadas no programa *AliView*, e analisadas por meio de inferência Bayesiana, utilizando o *software* MrBayes. Houve coincidências nas topologias da árvore do gene *NaV* de *A. darlingi* em relação às árvores filogenéticas de espécies do gênero *Anopheles*, mas foi observado que o gene *NaV* evolui em uma dinâmica diferente, e isso pode auxiliar no entendimento de processos evolutivos entre esses anofelinos. Uma nova região de despareamento (região 16C, braço 2L) foi registrada. A sonda ( *supercontig* do gene *NaV*) mapeou dois sítios: as regiões 16 B (braço 2L) e 31A (braço 3R), mas ambos os sítios não foram coincidentes com a marcação *in silico* de *NaV* ([www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)) para *A. gambiae* (2R, região 12C). Sugere-se, que o gene *NaV* pode estar evoluindo em caminhos diferentes, podendo auxiliar no entendimento da capacidade de resistência a inseticidas, variabilidade cromossômica, estrutura e organização genômica desses mosquitos.

**Palavras chaves:** *Anopheles darlingi*, gene canal de sódio (*NaV*), filogenia molecular, hibridização *in situ* fluorescente; mapeamento físico



## ABSTRACT

*Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 is the main vector of malaria in South America, where is responsible for transmitting the protozoan species of the genus of *Plasmodium* malaria, causing 99% of. Strategies employed to eliminate this vector are focused, mainly, on the use of pyrethroid insecticides. These insecticides interact with the sodium channels of the axon, causing paralysis of the central and peripheral nervous systems of the mosquito. Sodium channels regulated by voltage (NaV) are transmembrane proteins made of subunits, and the main of which is named subunit I. Resistance to insecticides, results in occasional mutations in the gene that codifies the sodium channel, and this is the greatest threat to the implementation of prevention and controlling programs against the mosquito. In this study, we performed a preliminary phylogenetic analysis of the supercontig (scaffold), sodium channel (NaV), of 17 species of *Anopheles*, and the physical mapping of the scaffold NaV in polytene nuclei of *A. darlingi* by Fluorescent in situ Hybridization (FISH) method, in order to better understand the evolutionary and chromosomal variability of this gene. The evolutionary phylogenetic tree of the NaV gene, was aligned in the AliView program and analyzed by means of Bayesian inference, using the software MrBayes. There were coincidences in the topology of the tree of the *A. darlingi* NaV gene in relation to other phylogenetic tree of *Anopheles* species. However, it was observed that the NaV gene evolves in a different dynamics, and this may assist in the understanding of evolutionary processes amongst *Anopheles*. A new unpaired chromatids region (16C, 2L arm) has been registered. The probe (NaV gene supercontig) mapped by FISH two sites: the 16 B region (2L arm) and the 31A region (3R arm), although both sites were not coincident with the *in silico* marking of NaV gene ([www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org)) for *A. gambiae* (2R, region 12C). It suggests that the NaV gene, because it is evolving in different ways, may be assisting in the understanding of the resistance capacity to insecticides, chromosomal variability, genomic structure and organization of these mosquitos.

Keywords: *Anopheles darlingi*, sodium channel gene (NaV), molecular phylogeny, fluorescent *in situ* hybridization, physical mapping.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. Malária e seus vetores.....	13
1.2. Considerações sobre o <i>Anopheles darlingi</i> .....	16
1.3. Controle de vetores da malária .....	17
1.4. Mecanismos dos Piretróides no Canal de Sódio e Resistência <i>knockdown</i> .....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1. Objetivo Geral .....	21
3.2. Objetivos Específicos .....	21
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	21
4.1. Filogenia do gene <i>NaV</i> .....	21
4.2. Mapeamento físico .....	21
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23

### **CAPITULO I- ANÁLISE PRELIMINAR DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO *SUPERCONTIG*, DA SUBUNIDADE I (*NaV*) DO CANAL DE SÓDIO EM 17**

<b>ANOFELINOS</b> .....	27
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>OBJETIVO</b> .....	29
<b>METODOLOGIA</b> .....	29
Obtenção da sequência do gene do canal de sódio.....	29
Análise filogenética evolutiva .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	30
<b>DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36

### **CAPITULO II- LOCALIZAÇÃO FÍSICA DO *SUPERCONTIG* DA SUBUNIDADE I, DO CANAL DE SÓDIO (*NaV*) EM CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DE *Anopheles darlingi***.....

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>OBJETIVO</b> .....	41

<b>METODOLOGIA</b> .....	41
Captura de Material .....	41
Desenvolvimento de <i>Anopheles darlingi</i> .....	41
Preparações de lâminas com cromossomos politênicos de <i>Anopheles darlingi</i> .....	42
Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente - FISH .....	42
Pré-tratamento das lâminas .....	43
Desnaturação da sonda e hibridização <i>in situ</i> .....	43
Lavagem das lâminas.....	44
Detecção dos sinais.....	44
Microfotografias.....	44
Análise dos Dados.....	44
<b>RESULTADOS</b> .....	45
<b>DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Distribuição geográfica da malária em áreas de risco de infecção (WHO, 2015).....	15
<b>Figura 2-</b>	Mapa da distribuição global das espécies de anofelinos. Fonte: Sinka <i>et al.</i> (2012) .....	15
<b>Figura 3-</b>	Mapa de risco por município de infecção, Brasil, 2015. Fonte: Portal da Saúde.....	16
<b>Figura 4-</b>	Mapa de distribuição prevista de <i>Anopheles darlingi</i> . Em vermelho são as áreas onde este mosquito é encontrado. Fonte: Sinka <i>et al.</i> , 2012.....	16
<b>Figura 5-</b>	Representação esquemática do canal de sódio com quatro domínios homólogos (I-IV), cada um composto por seis segmentos hidrofóbicos (S1 a S6). Fonte: Martins e Valle, 2012.....	17

## CAPITULO I

<b>Figura 1-</b>	Esquema referente à montagem de sequências de genomas. <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/help/definitions">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/help/definitions</a> .....	28
<b>Figura 2-</b>	Topologia da árvore filogenética evolutiva preliminar do gene <i>Nav</i> , gerada pelo programa <i>FigTree</i> (Rambaut, 2014) em comparação a 16 espécies de anofelinos e o <i>supercontig</i> AAEL018317, de <i>A. aegypti</i> ( <i>outgroup</i> ).....	31

## CAPITULO II

<b>Figura 1-</b>	Mapa dos locais de captura de <i>Anopheles darlingi</i> , no bairro Puraquequara, Manaus, Estado do Amazonas.....	41
<b>Figura 2-</b>	Localização física da sonda da subunidade I de <i>Nav</i> (ADAC000755) de <i>A. darlingi</i> no fotomapa desse mosquito (Rafael <i>et al.</i> , 2010).....	45
<b>Figura 3-</b>	Mapeamento físico da sonda ( <i>supercontig</i> da subunidade I do canal de sódio, ADAC000755), no braço 2L (região 16 B) e braço 3R (região 31A) dos cromossomos politênicos de <i>A. darlingi</i> .....	46
<b>Figura 4-</b>	Mapeamento <i>in silico</i> comparativo do <i>Supercontig</i> , de <i>Nav</i> ( <i>Scaffold</i> ADAC000755) de <i>A. darlingi</i> no braço 2R (região 12C) de <i>A. gambiae</i> (AGAP002577). Fonte: <a href="http://www.vectorbase.org">www.vectorbase.org</a> .....	46

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Malária e seus vetores

A malária é considerada um problema de saúde mundial, segundo Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015). Neste ano foram registrados 212 milhões de casos da doença em todo o mundo, e 90% na África Subsaariana, estimou-se que o número de óbitos é de 429 000 mortes sendo a principal causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade, por dia em 99 países (África, Ásia e América Latina), considerados endêmicos para malária (WHO, 2015), conforme a Figura 1.



Figura 1 - Distribuição geográfica da malária em áreas de risco de infecção (WHO, 2015).

A malária é, também, chamada de maleita, impaludismo, paludismo e febre terçã ou quartã, citada pela primeira vez na Era Pré-Cristã, por Hipócrates. No estudo de lâmina, com sangue fresco de um paciente com sintomas da malária, na década de 1870 o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran mostrou organismos (parasitos) em movimento (Neves, 2005).

A parasitose, malária, é causada em humanos por cinco espécies de parasitas do gênero *Plasmodium*: *Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* e *P. k nowlesi* (Rachou, 1958; Consoli e Oliveira, 1994; Collins, 2012). O *Plasmodium falciparum*, com predomínio no continente africano, é a forma mais grave e causa o maior índice de mortalidade correspondendo a 99% do total de mortes (WHO, 2015). A forma do *P. vivax* é menos grave que o *P. falciparum*; porém é a mais difundida no mundo, estima-se que o *P. vivax* tenha sido responsável por 3100 mortes em 2015, 86% destas ocorrendo fora da África. As outras espécies são encontradas com menor frequência (WHO, 2015).

Espécies de *Plasmodium* são transmitidos ao homem pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera e Família Culicidae (WHO, 2013).

As subfamílias Anophelinae e Culicinae, ambas da família Culicidae, apresentam divergência evolutiva a mais de 100 milhões de anos, cuja evolução ocorreu simultaneamente, sendo assim filogeneticamente grupos irmãos (Neafsey *et al.*, 2015). Os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* estão agrupados na subfamília Culicinae enquanto os do gênero *Anopheles* pertencem à subfamília Anophelinae; e, ainda, fazem parte dessa subfamília os gêneros *Bironella* e *Chagasia* (Paredes-Esquivel *et al.*, 2011; Harbach e Kitching, 2016).

O subgênero *Cellia*, do gênero *Anopheles* possui espécies, ocorrendo em todo o mundo, cujos principais vetores de protozoários da malária são: *Anopheles arabiensis*, *Anopheles funestus*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles moucheti* na África; *Anopheles balabacensis*, *Anopheles baimaii*, *Anopheles culicifacies*, *Anopheles dirus*, *Anopheles latens*, *Anopheles leucosphyrus*, *Anopheles maculatus*, *Anopheles minimus*, *Anopheles fluviatilis s.l.*, *Anopheles sunndaicus* e *Anopheles superpictus* no Oriente; alguns mosquitos dos complexos *Anopheles farauti* e *Anopheles punctulatus*, que ocorrem na Austrália; *Anopheles sergentii* e *Anopheles stephensi*, da Índia e Oriente Médio (Neafsey *et al.*, 2015; Paredes-Esquivel *et al.*, 2011).

O subgênero *Nyssorhynchus* tem larga distribuição geográfica na América Latina até o sul dos Estados Unidos da América. *Anopheles aquasalis*, *Anopheles argyritarsis*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles nuneztovari*, *Anopheles albitarsis*, *Anopheles aquasalis* são os principais vetores ao longo da distribuição deste subgênero, no qual o *Anopheles darlingi* e *Anopheles albimanus* são as espécies mais proximamente relacionadas (Harbach e Kitching, 2016). O subgênero *Kerteszia* ocorre nas Américas do Sul e Central, e dentre de suas espécies, seis podem transmitir os plasmódios da malária, mas somente *Anopheles bellator* e *Anopheles cruzii* possuem real importância vetorial (Paredes-Esquivel *et al.*, 2011; Harbach e Kitching, 2016).

No Subgênero *Anopheles* agrupam-se alguns vetores de importância histórica como *Anopheles sinensis*, *Anopheles atroparvus* e *Anopheles pseudopunctipennis*, de importância epidemiológica. As espécies restantes se dividem nos subgêneros *Baimaia*, *Christya*, *Stethomyia*, *Lophopodomyia* e não possuem importância médica para humanos (Neafsey *et al.*, 2015; Paredes-Esquivel *et al.*, 2011; Harbach e Kitching, 2016).

O gênero *Anopheles* inclui aproximadamente, 484 espécies, 70 apresentam competência vetorial para a malária humana, 41 delas consideradas espécies com capacidade vetorial dominante (Sinka *et al.*, 2012).

Os principais vetores dos parasitas da malária humana são o *A. gambiae*, *A. arabiensis* e *A. funestus*, na África; *A. albimanus* e *A. pseudopunctipennis*, no México e América Central; *A. stephensi* e *A. culicifacies* na Ásia. Na América do sul, as principais espécies envolvidas com a transmissão da malária pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus*: *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. nuneztovari*, *A. oswaldoi*, *A. triannulatus* e complexo *A. albittarsis* (Marrelli *et al.*, 1999; Tadei e Dutary- Tatcher, 2000; Sinka *et al.*, 2012) e *Kerstezia*: *A. cruzii* e *A. bellator* (Ramirez e Dassen, 1994, 1996). *Anopheles albimanus* é o principal vetor dos parasitos da doença na América Central (Sinka *et al.*, 2012), conforme a Figura 2.

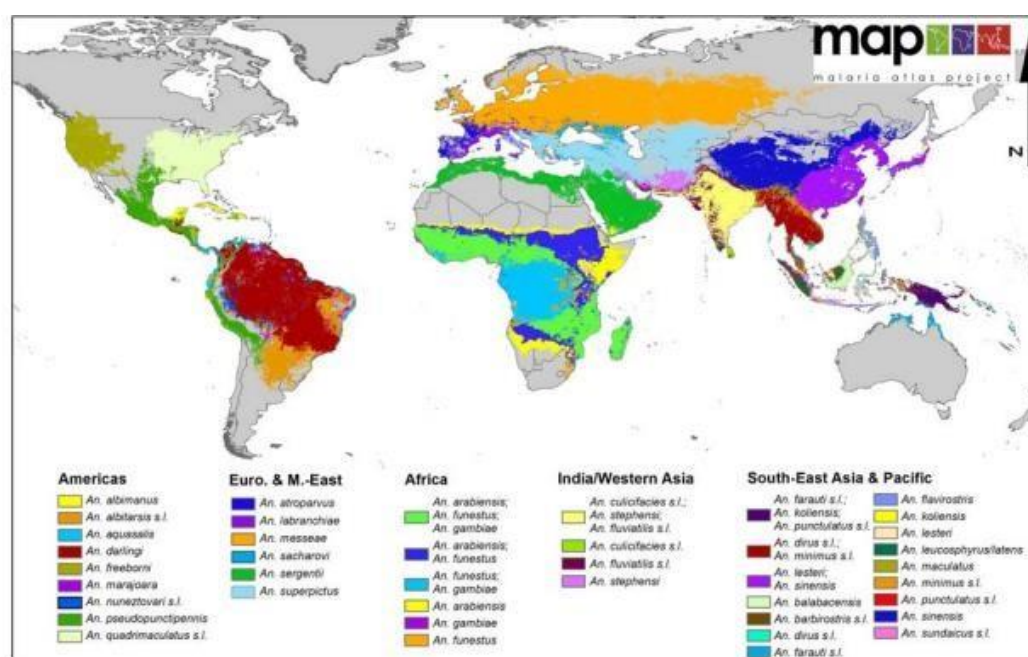


Figura 2. Mapa da distribuição global das espécies de anofelinos. Fonte: Sinka *et al.* (2012).

Nas Américas, 21 países são afetados pela malária, dentre estes o Brasil, que apresenta o maior número de casos (50,7%), com aproximadamente um milhão de ocorrências (SIVEP-Malária, 2013). Na Amazônia, encontra-se cerca de 99% dos casos da doença notificados nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins conforme Figura 3 (MS, 2014).

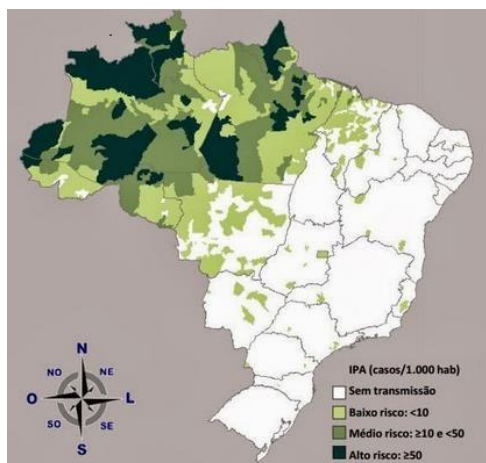


Figura 3- Mapa de risco por município de infecção, Brasil, 2015. Fonte: Portal da Saúde.

## 1.2. Considerações sobre *Anopheles darlingi*

O *A. darlingi* foi descrito por Root 1926 em homenagem ao Dr. Samuel Taylor Darling (1872-1925). *A. darlingi* é o principal vetor dos parasitos da doença na América do Sul, com distribuição geográfica, que abrange o leste dos Andes, a Colômbia, Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai, Argentina, as Guianas e o Brasil, mas é ausente no extremo nordeste brasileiro (Figura 4) (Forattini, 2002). Esta ampla distribuição associada ao alto grau de antropofilia, endofagia e susceptibilidade da espécie à infecção por plasmódios, favorecem o processo de transmissão dessa parasitose (Deane, 1986; Tadei *et al.*, 1998; Sinka *et al.*, 2012).



Figura 4- Mapa de distribuição prevista de *Anopheles darlingi*. Em vermelho são as áreas onde este mosquito é encontrado. Fonte: Sinka *et al.*, 2012.

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; Consoli e Oliveira, 1994; Gil *et al.*, 2003; Conn e Mirabello, 2007; Scarpassa e Conn, 2007), mesmo considerando que *A. darlingi* possa ser um complexo de 3 espécies bem estruturadas (Emerson *et al.*, 2015).



*Anopheles darlingi* foi encontrado infectado pelos *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (Rachou, 1958; Consoli e Oliveira, 1994). As fêmeas desse anofelino têm acentuada preferência por alimentar-se com sangue humano, além de néctar e outras fontes de açúcares, para o desenvolvimento dos embriões (Tadei *et al.*, 1998). Os machos alimentam-se apenas de néctar e outras fontes de açúcares (Deane, 1986).

### **1.3. Controle de vetores da Malária**

As estratégias para o combate à malária têm dois enfoques principais: prevenção, por meio do controle de mosquitos vetores e, gerenciamento de casos, utilizando diagnóstico e tratamento da doença (Consoli e Oliveira, 1994; Rose, 2001; WHO, 2013).

No controle vetorial são utilizadas práticas mecânicas (eliminação de criadouros), biológicas (uso de predadores ou parasitas) ou químicas (aplicação de inseticidas sintéticos) (Consoli e Oliveira, 1994; Rose, 2001). O controle químico é o principal meio de combate aos vetores da malária, e consiste no uso de inseticidas químicos, classificados em: Organoclorados, organofosforados; carbamatos e piretróides (Hemingway e Ranson, 2000).

O desenvolvimento de inseticidas de longo efeito residual foi um dos avanços mais importantes para a sua aplicação em saúde pública. O dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) foi o primeiro inseticida com efeito residual prolongado. É um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial (Rozendaal, 1997), mas que teve seu uso suspenso devido à sua persistência no ambiente.

Os Piretróides são compostos químicos sintéticos, que têm origem do éster do ácido crisântemo (piretrinas I) e do ácido pirétrico (piretrinas II), produzido pelas plantas do gênero *Chrysanthemum*. Atualmente, esta é a principal classe de inseticidas empregada no controle de vetores da malária, devido à sua rápida atuação contra o sistema nervoso do inseto e a baixa toxicidade em mamíferos (Hemingway e Ranson, 2000). Esses inseticidas são os únicos compostos aprovados pelo Programa de Avaliação de Pesticidas da WHOPES (*World Health Organization Pesticide Scheme*), para controle vetorial. Os piretróides são usados principalmente em campanhas de borrifação intradomiciliar IRS (*Indoor Residual Spraying*) e, também, para controlar pestes agrícolas (Consoli e Oliveira, 1994; Rose, 2001).

### **1.4. Mecanismos dos Piretróides no Canal de Sódio e Resistência *knockdown***

Os piretróides e o DDT e seus análogos são neurotóxicos; atuam na transmissão axônica e compartilham mecanismo de ação similar, como moduladores de canais de sódio dependentes de voltagem (*NaV*) (Phillips-Howard *et al.*, 2003).

Os piretróides interagem com os canais de sódio distribuídos ao longo do axônio, prolongando ou impedindo o seu fechamento normal após a transmissão do impulso nervoso e, permitem um fluxo excessivo de íons  $\text{Na}^+$  para o interior da célula nervosa. Esse mecanismo torna lento o processo de repolarização e o retorno da célula ao seu estado de repouso após a saída do sódio, o que causa a paralisia dos sistemas nervosos central e periférico (Phillips-Howard *et al.*, 2003; WHOPEs, 2014).

Os canais de sódio regulados por voltagem são proteínas transmembranares responsáveis pela fase inicial do potencial de ação em células eletricamente excitáveis (Catterall *et al.*, 2003). A subunidade I do *NaV* é a subunidade formadora do poro, sendo funcional por si só. Contudo, a cinética de abertura e fechamento do canal dependente de voltagem é modificada por outras subunidades (Catterall *et al.*, 2003). Em mamíferos são conhecidas as subunidades  $\beta 1$ , 2, 3 e 4 (Goldin, 2003; Yu e Catterall 2004).

Estruturalmente, o *NaV* está organizado em quatro domínios homólogos (I-IV), cada qual contendo seis alfa-hélices transmembranares, denominadas segmentos S1 a S6, e um *loop* adicional entre os segmentos S5 e S6, o *P-loop*. Os segmentos S4 são positivamente carregados e sensíveis às mudanças na corrente elétrica, de forma que se movem através da membrana para iniciar a ativação do canal em resposta à despolarização da membrana. A pequena região extracelular, de ligação entre os segmentos III e IV, funciona como uma “porta de inativação”, dobrando-se para dentro da estrutura do canal e bloqueando a entrada de  $\text{Na}^+$  durante a repolarização da membrana (Narahashi 1992, Catterall *et al.*, 2003, Goldin 2003; Davies *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2014), conforme a Figura 5.

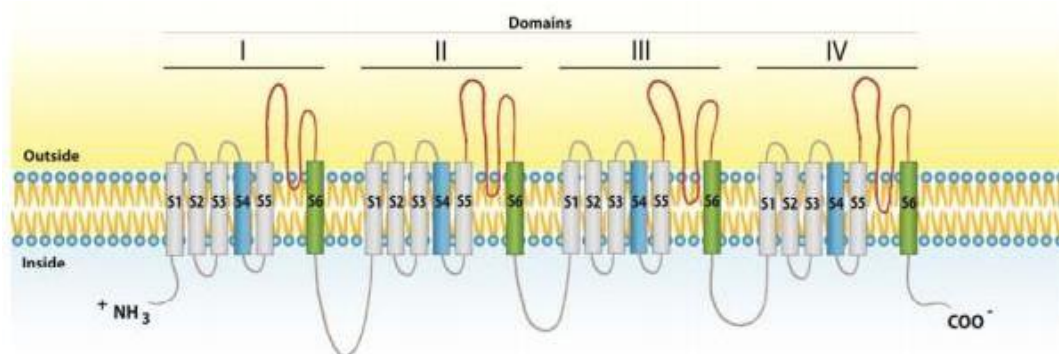


Figura 5. Representação esquemática do canal de sódio com quatro domínios homólogos (I-IV), cada um composto por seis segmentos hidrofóbicos (S1 a S6). Fonte: Martins e Valle (2012)

A resistência de mosquitos a inseticidas piretróides representa, potencialmente, a maior ameaça à implementação dos programas de prevenção da malária (Fanello *et al.*, 2003). Esse tipo de resistência é chamado *knockdown resistance (kdr)* e resulta de mutações pontuais no

gene que codifica o canal de sódio, pois altera a sua afinidade aos inseticidas, observado em vários insetos, como em *Musca domestica* (Soderlund, 1997).

A diminuição da sensibilidade do local alvo de atuação dos piretróides e, também, do DDT em *A. gambiae* foi descrita em associação a duas substituições alternativas a um único *codon* do gene do canal de sódio. A primeira resulta na substituição de um resíduo (L1014F) de leucina (TTA), presente no alelo selvagem, para uma fenilalanina (TTT) na posição aminoacídica do gene que codifica a subunidade transmembranar (S6 do domínio II), do canal de sódio. Esta mutação em *A. gambiae* está bastante dispersa na África Ocidental (Chandre *et al.*, 1999; Fanello *et al.*, 2003; Yawson *et al.*, 2004). A segunda é uma substituição (L1014S) do resíduo leucina (TTA) por uma serina (TCA) na mesma posição aminoacídica, que foi encontrada na África Oriental (Ranson *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2014).

Além de *A. gambiae*, em duas populações asiáticas de *A. sinensis* foram reportadas mais duas mutações (L1014C e L1014W), que alteram o aminoácido leucina para cisteína e triptofano, respectivamente. Além disso, no sítio imediatamente anterior à mutação *kdr*, clássica, ocorre a substituição N1013S, que muda o aminoácido asparagina para serina (Kim *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2012). Em populações de *A. culicifacies* da Índia, também em adição às substituições L1014F/L1014S, foi descrita uma nova mutação no sítio 1010, substituindo valina por leucina (V1010L) (Singh *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014).

Uma comparação da sequência do gene do canal de sódio regulado pela voltagem (*NaV*) em diferentes espécies de insetos (Davies *et al.*, 2007), mostrou que essa sequência é altamente conservada. Porém, diferentes números de *exons* são observados entre diferentes espécies (Davies *et al.*, 2007). A subunidade I ou  $\alpha$  de *NaV* de *A. gambiae* é composta por 6.417 nucleotídeos, apresentando uma ORF (*Open Reading Frame*), que codifica 2.139 aminoácidos, de massa molecular de 240 kDa. O gene *NaV* de *A. gambiae*, localizado no loco “para” (*paralysis*) do cromossomo X, tem aproximadamente 74 kpb em comprimento, composto por 35 *exons*, incluindo dois *exons* duplicados. Além disso, apresenta 32 *introns*, que podem sintetizar diferentes RNAs mensageiros (RNAm), por meio de *splicing* alternativo (Davies *et al.*, 2007).

O combate de *A. darlingi*, para a diminuição dos índices de malária no Brasil, tem sido realizado com ampla utilização de inseticidas piretróides em campanhas de controle vetorial. Porém, o uso desses inseticidas pode resultar na seleção de alelos de resistência ou modular proteínas do canal de sódio dos axônios do sistema nervoso, causando a morte do inseto.

Até o presente, mutações em *NaV* foram descritas em pelo menos em 13 diferentes espécies de anofelinos: *A. gambiae*, o mais estudado, que apresenta três variantes mutacionais

(L1014F, L1014S e N1575Y) em 20 dos 54 países da África, além de *A. arabiensis*, com duas variantes (L1014F e L1014S), presentes em sete países daquele continente (Davies *et al.*, 2007).

Considerando o *A. darlingi*, dois genes (*NaV*) putativos [AD07884 (98% de identidade) e AD00168 (45% de identidade) foram identificados no genoma desse mosquito (Marinotti *et al.*, 2013). Essas duas sequências *NaV* disponíveis no *VectorBase*, permitem o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico específicos para a detecção de resistência *kdr* nesta espécie. Vale ressaltar que, após exaustiva busca em bancos de dados públicos, a literatura não registra nenhuma análise filogenética, ainda que preliminar, do gene *NaV* em insetos.

Estudos de genes associados à estruturação do canal de sódio e às mutações *knockdown* (*kdr*) no gênero *Anopheles*, têm caracterizado resistência aos inseticidas piretróides. O gene *NaV* do genoma de *A. darlingi* está inserido em *Scaffold*, o qual é composto por *contigs* e *gaps*. Esses *gaps* não foram preenchidos no sequenciamento do genoma do *A. darlingi* (Marinotti *et al.*, 2013), e o seu preenchimento é necessário para a análise do genoma completo desse mosquito. Porém, ainda faltam estudos de mapeamento físico cromossômico desses genes em *A. darlingi*, bem como em outros mosquitos.

Neste trabalho a análise filogenética preliminar de *NaV* em *A. darlingi* foi comparada a outras 16 espécies de anofelinos, que auxiliará estudos sobre a evolução de *NaV* e na compreensão da organização genômica, segundo o mapa físico de *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2010) em comparação ao genoma de *A. gambiae*.

## **2. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar a organização genômica e o perfil evolutivo da subunidade I, do canal de sódio (*NaV*) em *Anopheles darlingi*.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Estudar a filogenia evolutiva da subunidade I (*NaV*).
- Mapear fisicamente o *Scaffold* do canal de sódio em *A. darlingi*.
- Determinar se há sintenia em termos ortólogos da subunidade I, entre os genes do canal de sódio nos cromossomos de *A. darlingi* e *A. gambiae*.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Filogenia evolutiva do gene *NaV***

Análise filogenética evolutiva do gene *NaV* em 17 anofelinos foi realizada por alinhamento das sequências do canal de sódio, depositadas no *Vector Base*. O *Aedes aegypti* foi selecionado como grupo externo. O alinhamento das sequências desses organismos foi por meio do *software* AliView (Larsson, 2014) e a análise Bayesiana, pelo *software* MrBayes (Ronquist e Huelsenbeck, 2003).

### **4.2. Mapeamento Físico**

Lâminas de núcleos politênicos foram preparadas, a partir de glândulas salivares de quarto estágio de larvas de *A. darlingi*. As glândulas foram dissecadas em solução de *Carnoy* e depois fixadas, passando por três fixadores para posterior tratamento e desidratação. Na marcação da sonda, usou-se o método de *Nick Translation System*, que foram utilizadas no método de Hibridização *In situ* Florescente (FISH).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e Discussões deste estudo estão apresentados em dois capítulos:

- Capítulo 1- LOCALIZAÇÃO FÍSICA DO *SUPERCONTIG* DA SUBUNIDADE I, DO CANAL DE SÓDIO (*NaV*) EM CROMOSSOMOS POLITÊNICOS DE *Anopheles darlingi*
- Capítulo 2 - ANÁLISE PRELIMINAR DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO *SUPERCONTIG* DA SUBUNIDADE I, DO CANAL DE SÓDIO (*NaV*) EM 17 ANOFELINOS

## REFERÊNCIAS

- Catterall, W.A.; Chandy, K.G.; Clapham, D.E.; Gutman, G.A.; Hofmann, F.; Harmar, A.J.; Abernethy, D.R.; Spedding, M. 2003. International Union of Pharmacology: Approaches to the nomenclature of voltage-gated ion channels. *Pharmacological Reviews*, 55(4): 573-574.
- Chandre, F.; Brengues, C.; Dossou-Yovo, J.; Ma, G.S.; Darriet, F.; Diabate, A.; Carnevale, P.; Guillet, P. 1999. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia*, 41: 319-322.
- Collins, W.E. 2012. "Plasmodium knowlesi: A malaria parasite of monkeys and humans". *Annual Review of Entomology* 57: 107–21.
- Conn, L.E. & Mirabello, L. 2007. The biogeography and population genetics of neotropical vector species. *Heredity*. 99 (3): 245-256. Consoli e Oliveira, 1994.
- Davies, T.G.E.; Field, L.M.; Usherwood, P.N.; Williamson, M.S. 2007. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Molecular Biology*, 16(3): 361-375.
- Deane, L.M. 1986. Malaria vectors in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 5-14.
- Emerson, K. J.; Conn, J. E.; Sallum, A. M.; Bergo, E. S.; Randel, M. A. M. 2015. "Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera:Culicidae) Clusters by Major Biogeographical Region". *Plos One* 10(7):e0130773. doi:10.1371/journal.pone.0130773.
- Fanello, C., Petrarca, V., della Torre, A., Santolamazza, F., Dolo, G., Coulibaly, M., Allouche, A., Curtis, C.F., Touré, Y.T. and Coluzzi, M., 2003. The pyrethroid knockdown resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. gambiae s.s.*. *Insect Molecular Biology*, 12(3), pp. 241-245.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia Médica*. EDUSP: São Paulo. 860 p.
- 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.
- Goldin A. L. 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 284–290. doi:10.1016/S0959-4388(03)00065-5.
- Harbach R.E, Kitching I.J. 2016 The phylogeny of Anophelinae revisited: inferences about the origin and classification of Anopheles (Diptera: Culicidae). *Zoologica Scripta*, 45, 34–47.
- Hemingway, J. ; Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45: 371-391.

Larsson, A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30 (22): 3276-3278. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>.

Marinotti, O.; Aerequeira, G. C.; De Almeida, G. G. P.; Ferro, M. I. T.; Loreto, E. L. D. S.; Zaha, A.; Teixeira, S. M. R.; Wespiser, A. R.; Almeida e Silva, A.; Schlindwein, A. D.; Pacheco, A. C. L.; SILVA, A. L. D. C. D.; Graveley, B. R. Walenz, B. P.; Lima, B. D. A.; Ribeiro, C. A. G.; Nunes-Silva, C. G.; De Carvalho, C.; R. Soares, C. M. D. A.; De Menezes, C. B. A.; Matioli, C.; Caffrey, D.; Araujo, D. A. M.; De Oliveira, D. M.; Golenbock, D; Grisard, E. C.; Fantinatti-Garboggini, F.; De Carvalho, F. M.; Barcellos, F. G.; Prosdociami, F.; May, G.; Azevedo Junior, G. M. D.; Guimaraes, G. M.; Goldman, G. H.; Padilha, I. Q. M.; Batista, J. D. S.; Ferro, J. A.; Ribeiro, J. M. C.; Fietto, J. L. R.; Dabbas, K. M.; Cerdeira, L.; Agnez-Lima, L. F.; Brocchi, M.; De Carvalho, M. O.; Teixeira, M. D.; M. Diniz Maia, M. D. M.; Goldman, M. H. S.; Cruz Schneider, M. P.; Felipe, M. S. S.; Hungria, M.; Nicolas, M. F.; Pereira, M.; Montes, M. A.; Cantao, M. E.; Vincentz, M.; Rafael, M. S.; Silverman, N.; Stoco, P. H.; Souza, R. C.; Vicentini, R.; Gazzinelli, R. T.; Neves, R. D. O.; Silva, R.; Astolfi-Filho, S.; Maciel, T. E. F.; Urmenyi, T. P.; Tadei, W. P.; Camargo, E. P.; D Vasconcelos, A. T. R. 2013 The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. *Nucleic Acids Research*, V. 41, P. 7387-7400.

Marrelli, M.T.; Malafrente, 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.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: Volume Único. [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/18/2015-009---Mal--ria-para-publica---o.pdf>.

NARAHASHI, T. (1992). Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13, 236-241.

Neafsey DE, Waterhouse RM, Abai MR, Aganezov SS, Alekseyev MA, Allen JE, et al., 2015. Highly evolvable malaria vectors: The genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. *Science*. 347(6217):43-53.

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

Paredes-Esquivel C, Harbach RE, Townson H (2011) Molecular taxonomy of members of the *Anopheles hyrcanus* group from Thailand and Indonesia. *Medical and Veterinary Entomology*, 25: 348–352. doi:10.1111/j.1365-2915.2010.00937.

Phillips-Howard, P.A.; Nahlen, B.L.; Kolczack, M.S.; Hightower, A.W.; Kuile, F.O.; Alaii, J.A.; Gimnig, J.E.; Arudo, J.; Vulule, J.M.; Odhacha, A.; Kachur, S.P.; Schoute, E.; Rosen, D.H.; Sexton, J.D.; Oloo, A.J.; Hawley, W.A. 2003. Efficacy of permethrin-treated bed nets in the prevention of mortality in young children in an area of high perennial malaria transmission in western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 23-29.



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

Rafael, M.S.; Rohde, C.; Bridi, L.C., Valente Gaiesky, V.L. S.; Tadei, W.P. 2010. Salivary Polytene Chromosome Map of *Anopheles darlingi*, the Main Vector of Neotropical Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83: 241–249. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0481.

Ramírez, C.C.L. & Dessen, E.M.B. 1994. Cytogenetic analysis of a natural population of *Anopheles cruzii*. *Rev. Bras. 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.; 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.

Ronquist, F.; Huelsenbeck J.P. 2003 MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 19:1572–1574.

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.

Rose, R.I. 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging infectious Diseases*, 7(1): 17-23.

Rozendaal, J. A., 1997. Vector control methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization. Disponível em: [http://www.who.int/whopes/resources/vector\\_rozendaal/en/](http://www.who.int/whopes/resources/vector_rozendaal/en/) [acedido a 3 de Outubro de 2011].

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.

Silva, A. P. B.; Santos, J. M. M.; Martins, A. J. 2014. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids -. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 450.

Singh, O.P.; Dykes, C.L.; Das, M.K.; Pradhan, S.; Bhatt, R.M.; Agrawal, O.P.; Adak, T. 2010. Presence of two alternative *kdr*-like mutations, L1014F and L1014S, and a novel mutation, V1010L, in the voltage gated Na<sup>+</sup> channel of *Anopheles culicifacies* from Orissa, India. *Malaria Journal*, 9: 146.

Sinka, M.E.; Bangs, M.J.; Manguin, S.; Rubio-Palis, Y.; Chareonviriyaphap, T.; Coetzee, M.; Mbogo, C.M.; Hemingway, J.; Patil, A.P.; Temperley, W.H.; Gething, P.W.; Kabaria, C.W.;

Burkot, T.R.; Harbach, R.E.; Hay, S.I. 2012. *A global map of dominant malaria vectors. Parasites & Vectors*, 5: 69.

SIVEP-Malaria. Notificações de casos de malária. Disponível em: [http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/). Data de acesso: 20 de março de 2017.

Soderlund, D.M., 1997. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In Sjut, V., Volume 13 (1997). *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals*. Berlin: Springer. pp. 21-56.

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.

WHO. 2013. *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*. World Health Organization: Geneva. 30 pp.

WHO, 2015. *The World Malaria Report 2015*. World Health Organization 280 pp.

WHOPES. WHO recommended long-lasting insecticidal nets. Disponível em: [http://www.who.int/whopes/Long\\_lasting\\_insecticidal\\_nets\\_06\\_Feb\\_2014.pdf?ua=1](http://www.who.int/whopes/Long_lasting_insecticidal_nets_06_Feb_2014.pdf?ua=1). Data de acesso: 06 de junho de 2015.

Yawson, A.E.; McCall, P.J.; Wilson, M.D.; Donnelly, M.J. 2004. Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Medical and Veterinary Entomology*, 18: 372-377.

Yu F.H. e Catterall W.A. 2004 The VGL channel: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science STKE* 253: re15.

## CAPÍTULO I

### ANÁLISE PRELIMINAR DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO *SUPERCONTIG* DA SUBUNIDADE I, DO CANAL DE SÓDIO (*NaV*) EM 17 ANOFELINOS

#### INTRODUÇÃO

*Anopheles darlingi* é o principal vetor de malária neotropical, responsável por mais de um milhão de casos da doença, por ano, no continente americano. Sua distribuição geográfica abrange o território do sul do México ao norte da Argentina e a Leste da cadeia dos Andes (SIVEP - Malaria, 2013), e esta ampla distribuição associada ao seu alto grau de antropofilia, endofagia e susceptibilidade à infecção por espécies de plasmódios, favorecendo o processo de transmissão dessa parasitose (Sinka *et al.*, 2012).

Devido a sua importância vetorial, o *A. darlingi* em sido submetido a diversos estudos que determinam as suas características biológicas. No entanto, aspectos moleculares e evolutivos ainda carecem de mais pesquisas. O sequenciamento do genoma de *A. darlingi* preenche algumas lacunas no conhecimento sobre seus genes e abriu várias possibilidades, dentre as quais é possível contemplar a história evolutiva dos anofelinos. Ele também fornece informações valiosas que podem levar a novas estratégias para reduzir a transmissão da malária no continente sul-americano (Marinotti *et al.*, 2013).

Análises robustas como o sequenciamento do genoma de *A. darlingi* (Marinotti *et al.*, 2013) só foi possível graças às novas tecnologias de sequenciamento, denominadas tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next generation DNA sequencing = NGS*), que tiveram início em 2005, e estão evoluindo rapidamente. Essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (Nei e Kumar, 2000; Matioli e Fernandes, 2012). O grande desafio associado à *NGS* é o processo de reconstrução da sequência de DNA original, a partir dos *reads* (fragmentos de DNA resultantes do sequenciamento), considerados curtos em comparação aos fragmentos produzidos pela tecnologia Sanger. Durante a montagem de genomas, os *reads* sobrepostos são organizados em *contigs*, que representam uma região de consenso de DNA original. Para a união de vários *contigs* dá-se o nome de *supercontig*, e quando o *supercontig* apresenta *gaps* de sequenciamento recebe o nome de *scaffod* (Matioli, 2001; Shendure, 2008) (Figura 1).

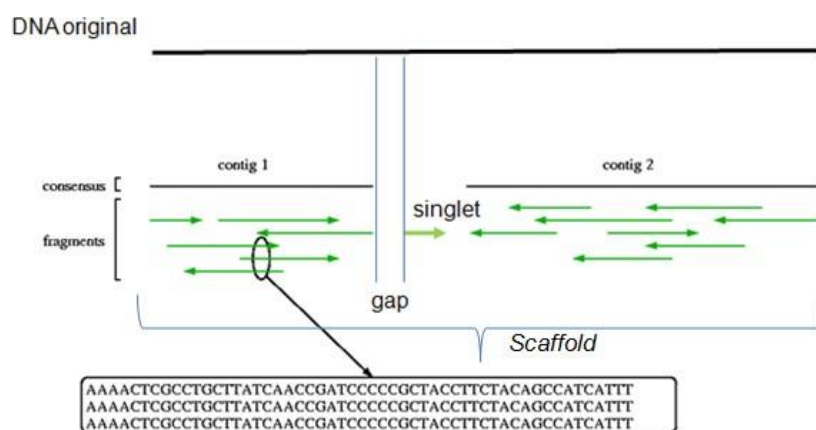


Figura 1- Esquema referente à montagem de sequências de genomas.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc/help/definitions>, Acesso: 11/03/2017

Mediante os crescentes avanços no sequenciamento de genes, alinhamento de sequências e desenvolvimento de programas computacionais para interpretação de dados, nos ramos da biologia, tal como a filogenética molecular, estarem incorporado aos seus estudos as abordagens mais refinadas que contribuem para as respostas referentes à evolução de espécies bem como análise de perfis evolutivos de um único gene dentro de um grupo (Nei e Kumar, 2000; Matioli, 2001; Suárez-Díaz e Anaya-Muñoz, 2008).

Em análises comparativas, para a reconstrução filogenética baseada em dados moleculares, faz-se necessário que as sequências gênicas possuam algumas propriedades, como a homologia, ou seja, apresentem uma ancestralidade em comum (Suárez-Díaz e Anaya-Muñoz, 2008; Schneider 2007). Apesar de existir três tipos de homologia (ortologia, paralogia e xenologia), apenas as sequências ortólogas, que apresentam um único e mesmo ancestral comum, fornecem informações filogenéticas na história de um gene (Ahlquist, 1999; Schneider 2007).

As análises filogenéticas de sequências gênicas usam a posição e a variação dos estados dos caracteres de cada nucleotídeo, para estabelecer as relações evolutivas entre genes (Nei e Kumar, 2000; Schneider 2007). Metodologias filogenéticas são essencialmente estatísticas e podem ser classificadas em dois tipos: o quantitativo, onde primeiro calcula-se a distância, para, a seguir, reconstruir a árvore filogenética, utilizando um algoritmo específico; e os qualitativos ou cladísticos, que incluem métodos muito utilizados como os de parcimônia, verossimilhança e inferência Bayesiana.

Em métodos cladísticos, as árvores são calculadas levando-se em consideração os possíveis caminhos da evolução (Schneider 2007). Citam-se a inferência Bayesiana, que é oriunda da aplicação do teorema de Bayes e as técnicas de inferência estatística derivadas dele. Na inferência Bayesiana, antes da análise dos dados, parâmetros tais como substituição

nucleotídica, taxas mutacionais, dentre outros são atribuídos em uma distribuição *a priori* que, então, são combinados aos dados, para gerar a distribuição *a posteriori*, a qual serve de base para as inferências sobre o perfil evolutivo do gene considerado (Schneider 2007; Mاتيoli, 2012).

A literatura registra poucos estudos em filogenia molecular de mosquitos de *Anopheles*, como o de Neafsey *et al.*, (2015), que geraram uma árvore filogenética molecular de 16 mosquitos de *Anopheles* e outros dípteros, como *outgroups*, por meio do método de Máxima Verossimilhança. Além deste estudo, Harbach e Kitching (2016), utilizando métodos cladísticos, revisaram as relações filogenéticas entre espécies de anofelinos.

Embora existam estudos de árvores filogenéticas de *Anopheles*, não há registros sobre o comportamento evolutivo de um único gene ou *contigs* com *gaps* (*Scaffolds*) nesses mosquitos. Neste sentido, o presente estudo que inclui *A. darlingi*, utilizando o gene da subunidade I, do canal de sódio (*NaV*), *scaffold* do genoma desse mosquito, que pode contribuir sobremaneira ao entendimento de aspectos biológicos e moleculares tais como adaptação, resistência a inseticidas e capacidade vetorial. (Collucci e Sallum, 2003; Yeates *et al.*, 2007).

## OBJETIVO

Estabelecer as relações filogenéticas evolutivas do *supercontig* (*scaffold*) do gene da subunidade I do canal de sódio (*NaV*) de *A. darlingi* para inferir sobre o perfil evolutivo desse gene em relação ao *A. gambiae* e outros anofelinos.

## METODOLOGIA

### Obtenção da sequência do gene do canal de sódio

A sequência do gene da subunidade I, do canal de sódio de *Anopheles darlingi* foi obtida, por meio do número de acesso ADAC000755, no [www.VectorBase](http://www.VectorBase). A partir dessa sequência foram registrados 37 ortólogos para o *supercontig* (*scaffold*), gene *NaV*. Estas 37 sequências foram analisadas obedecendo alguns critérios: no primeiro, foram excluídas sequências que não pertenciam aos mosquitos da família Culicidae; no segundo, foi registrado o número de cópias do gene, o *query* e o *target* de 16 anofelinos, excluindo sequências que tinham valores inferiores a 60% em relação ao *A. darlingi*. Para essa análise, *A. aegypti* foi escolhido como *outgroup* (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências ortólogas ao *supercontig* Canal de sódio para *A. darlingi* (ADAC000755) em comparação às 16 espécies de anofelinos e *A. aegypti* (*outgroup*), segundo o GeneOntology (GO).

Espécie Mosquito	Número de acesso	Target id%	Query id%	Ontology		
				Processo Biológico:	Função Molecular:	Componente Celular:
<i>Anopheles albimanus</i>	AALB00B211	91,53%	97,65%			
<i>Anopheles arabiensis</i>	AARA004282	72,73%	64,58%			
<i>Anopheles christyi</i>	ACHR003796	93,99%	96,69%			
<i>Anopheles coluzzii</i>	ACOM036769	99,59%	81,25%			
<i>Anopheles culicifacies</i>	ACUA006175	87,83%	96,51%			
<i>Anopheles dirus</i>	ADIR010287	70,10%	61,02%	0006811	0005216	0005891
<i>Anopheles epiroticus</i>	AEPI000312	96,80%	98,51%	0055085	0005245	0016020
<i>Anopheles farauti</i>	AFAF003910	65,91%	75,60%	0070588	00055	
<i>Anopheles funestus</i>	AFUN003713	67,54%	66,57%			
<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP002577	79,02%	82,50%			
<i>Anopheles melas</i>	AMEC011109	98,03%	92,89%			
<i>Anopheles merus</i>	AMEM015017	97,505	63,43%			
<i>Anopheles minimus</i>	AMIN004000	70,89%	64,40%			
<i>Anopheles quadriannulatus</i>	AQUA006922	72,82%	63,43%			
<i>Anopheles sinensis</i>	ASIS008573	95,58%	97,59%			
<i>Anopheles stephensi</i>	ASTE000312	70,45%	64,34%			
<i>Aedes aegypti</i>	AAEL018317	75,19%	76,52%			
<i>Anopheles darlingi</i>	ADAC000755	-	-			

Fonte: [www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org), acesso: 06/02/17

## Análise filogenética

O programa *AliView* (Larsson, 2014), que usa o *software MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation)*, segundo Edgar (2004), foi utilizado para realizar o alinhamento das sequências obtidas.

Ao realizar o *input* dos dados no *MrBayes* é preciso saber, antes, o modelo de substituição nucleotídica e, para isso, utilizaram-se os programas ModelTest (Posada e Crandall, 1998) PAUP (Maddison *et al.*, 1997), conjuntamente. Estes programas selecionam o modelo de substituição de nucleotídeos de melhor ajuste para um conjunto de sequências alinhadas. O padrão encontrado para as sequências de *Nav* foi o *General Time Reversible (GTR)*, que leva em conta as diferentes frequências de substituição, de uma base para a outra. Esse resultado foi inserido no *script* do programa *MrBayes* (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), e a corrida foi realizada com 10.000 repetições. A árvore filogenética do gene *NaV* foi gerada e visualizada no programa *FigTree* (Rambaut, 2014), para 17 espécies anofelinos, com o *A. aegypti* (*outgroup*).

## RESULTADOS

A árvore filogenética evolutiva do gene *NaV* foi gerada no *MrBayes* em 3 horas 52 minutos, visualizada no programa *FigTree*, e enraizada, a partir da sequência da sequência do *supercontig* AAEL018317, de *A. aegypti* (*outgroup*), (Figura 2).

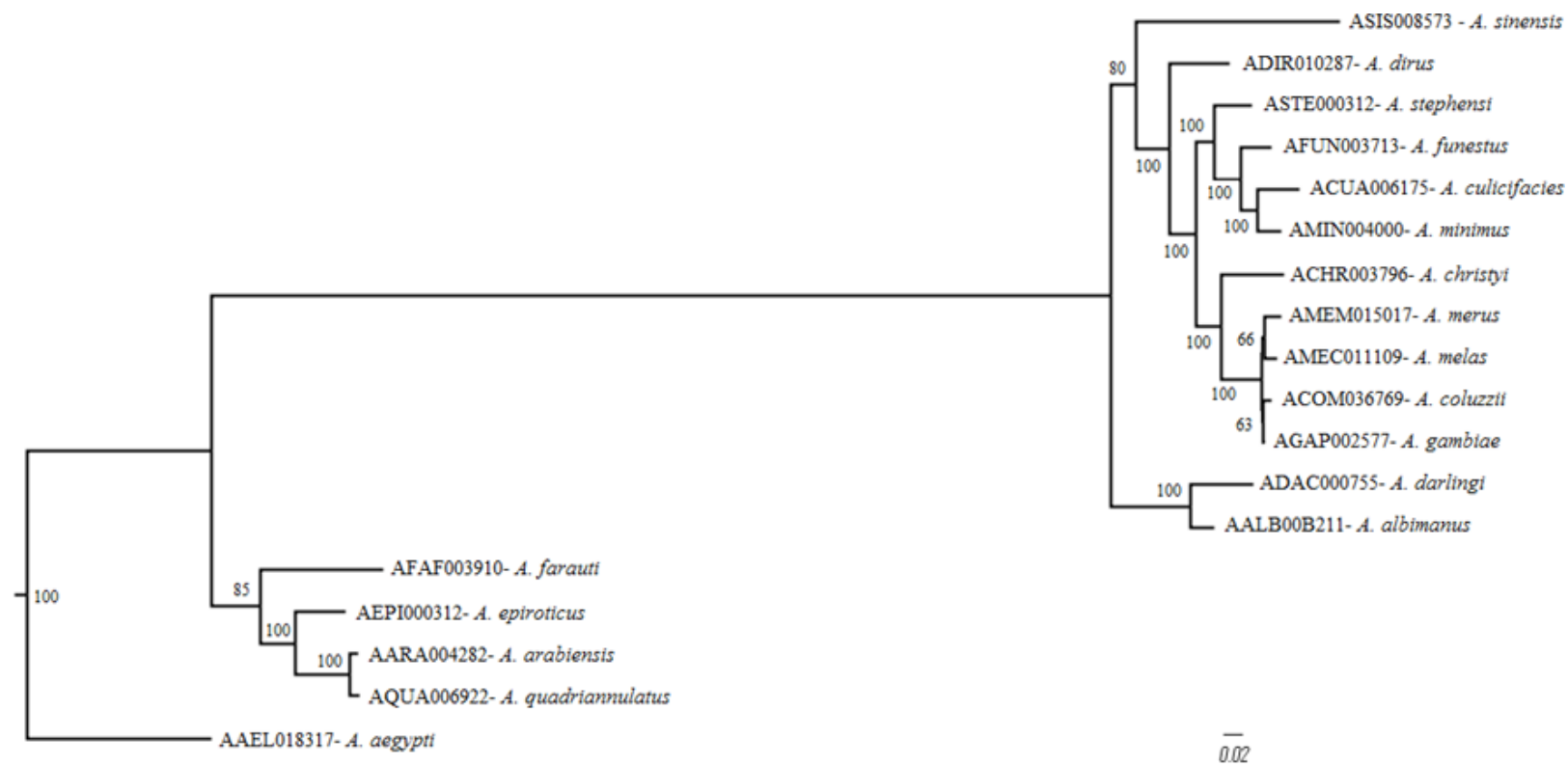


Figura 2. Topologia da árvore filogenética evolutiva do gene *NaV*, gerada pelo programa *FigTree* (Rambaut, 2014) em comparação com 16 espécies de anofelinos e o *supercontig* AAEL018317, de *A. aegypti* (*outgroup*).

As sequências do gene *NaV* dos 17 anofelinos se apresentaram em dois grandes clados. O mais basal é formado pelos genes *NaV* de *A. farauti*, aparecendo como grupo irmão de *A. epiroticus*; este último está evolutivamente mais relacionado com *A. arabiensis* e *A. quadriannulatus*.

O clado mais derivado apresenta dois subclados bem definidos: um composto por *A. darlingi* e *A. albimanus*, e o outro, que agrupa a maioria das sequências analisadas, de alguns anofelinos do complexo *A. gambiae* (*A. merus*, *A. melas*, *A. coluzzii* e *A. gambiae*), que juntamente com *A. christyi* formam um grupo irmão com os demais anofelinos: *A. minimus*, *A. culicifacies*, *A. funestus*, *A. stephensi*, *A. dirus* e *A. sinensis*.

## DISCUSSÃO

A árvore filogenética evolutiva do gene *NaV* gerada, a partir das sequências dos *supercontigs*, da subunidade I do gene canal de sódio de *A. darlingi* mostrou topologia, com algumas coincidências em relação aos achados sobre as árvores filogenéticas de algumas espécies de anofelinos (Neafsey *et al.*, 2015; Harbach e Kitching, 2016). Nas árvores filogenéticas apresentadas por esses autores, assim como na árvore evolutiva do gene *NaV*, *A. darlingi* e o *A. albimanus* apareceram como grupos irmãos. Foi registrado coincidência, ainda, no agrupamento de sequências do gene *NaV* de algumas espécies do complexo *A. gambiae* (*A. merus*, *A. melas*, *A. coluzzii* e *A. gambiae*). A sequência do gene *NaV* de *A. christyi* foi agrupada com as sequências do complexo *A. gambiae* (*A. merus*, *A. melas*, *A. coluzzii* e *A. gambiae*), cujo agrupamento ocorreu, também, nas topologias de árvores filogenéticas para as espécies (Neafsey *et al.*, 2015; Harbach e Kitching, 2016).

Apesar de *A. arabiensis* e *A. quadriannulatus*, também do complexo *A. gambiae*, participarem do clado mais basal, em contraste com a posição deles nas árvores filogenéticas para essas espécies, as sequências do *supercontig NaV*, desses dois anofelinos são mais próximas evolutivamente entre si, como ocorre nas topologias filogenéticas para as espécies de anofelinos considerados grupos irmãos (*A. arabiensis* e *A. quadriannulatus*) (Paredes-Esquivel *et al.*, 2011; Harbach e Kitching, 2016).

Ainda, no clado mais basal, notamos que as sequências de *A. farauti*, *A. epiroticus*, *A. arabiensis* e *A. quadriannulatus* seguem uma lógica evolutiva, onde o *A. farauti* apresenta a sequência de *NaV* mais derivada, seguida por *A. epiroticus*, que está relacionado com as espécies do complexo *A. gambiae* (*A. arabiensis* e *A. quadriannulatus*). Observamos esse mesmo padrão nas topologias de árvores filogenéticas, para algumas espécies de anofelinos (Paredes-Esquivel *et al.*, 2011; Neafsey *et al.*, 2015; Harbach e Kitching, 2016).



A árvore evolutiva de *NaV* gerada neste trabalho também representa bem as árvores de espécies encontradas na literatura para anofelinos da Ásia e Oceania (Paredes-Esquivel *et al.*, 2011). A sequência de *NaV*, de *A. sinensis* está proximamente relacionada em termos evolutivos à sequência de *NaV*, de *A. dirus*, que está associada às sequências de *A. stephensi*, *A. funestus*, *A. culicifacies* e *A. minimus*. De acordo com Neafsey *et al.* 2015; Harbach e Kitching (2016), estes anofelinos foram agrupados evolutivamente em um único clado, como grupos irmãos, nas árvores filogenéticas de espécies.

Os valores (100 a 63%) em cada ramo são referentes ao teste estatístico de reamostragem de *bootstrap* (Bradley Efron, 1979), que infere a confiabilidade dos ramos baseados nas gerações dessa corrida. A árvore filogenética evolutiva de *NaV* foi gerada com alta confiabilidade, e admitiu-se que valores de *bootstrap* abaixo de 70% são baixos para considerar o ramo verdadeiro e, acima de 90% o ramo é considerado com alto grau de suporte. A confiabilidade geral da árvore é de 99%, de acordo com os dados gerados no arquivo de informações do programa *MrBayes*.

Os ramos *A. merus* + *A. melas* e *A. coluzzii* + *A. gambiae* possuem um valor de *bootstrap* abaixo de 70%. Sugere-se, que isto ocorre devido às sequências apresentarem alto grau de similaridade entre si e não há como afirmar que a topologia que representa o gene *NaV*, para estas 4 espécies seja exatamente esta. No entanto, para dirimir essas dúvidas acerca da topologia da árvore de *NaV*, as sequências de *NaV* alinhadas foram submetidas, também, à análise de Máxima Verossimilhança. A topologia gerada foi exatamente a mesma (dados não mostrados), o que corrobora os achados deste trabalho, para a árvore do gene *NaV*.

Na análise Bayesiana, o comprimento dos ramos é influenciado pela distância genética entre as sequências de nucleotídeos (Schneider, 2007; Matioli, 2012). No presente estudo, a taxa de substituição nucleotídica foi de 0,02, e observamos que há um acúmulo de passos mutacionais entre os dois cladogramas principais. A distância entre estes dois cladogramas da árvore filogenética evolutiva do gene *NaV*, associado ao fato de que algumas sequências de *NaV* não foram agrupadas evolutivamente entre as espécies mais relacionadas, sugerem que as sequências do gene *NaV* estão evoluindo em dois sentidos diferentes, e que o clado mais basal mantém sequências mais conservadas em relação à sequência ancestral.

É importante ressaltar, que a evolução do gene canal de sódio ocorre em uma dinâmica diferente da evolução das espécies. Isto pode justificar as diferenças encontradas entre os cladogramas da árvore filogenética evolutiva do gene *NaV* em 17 espécies de anofelinos deste estudo. Apesar da árvore de um único gene (*NaV*), não poder representar a história evolutiva de espécies de

um gênero, sequências de genoma evoluem de maneira conservada, e isso faz com que as espécies se apresentem proximamente relacionadas, mediante análises de árvores de genes e suas coincidências na história evolutiva de espécies (Foley *et al.*, 1998; Collucci e Sallum, 2003; Matioli, 2012; Bridi e Rafael, 2016). Fatores biológicos como *habitat* e nicho ecológico, também, podem influenciar na diferenciação de um gene ao longo de sua história evolutiva, justificando algumas disparidades quando estudados isoladamente (Matioli, 2012; Bridi e Rafael, 2016). No entanto, podem ocorrer substituições alternativas mutacionais em um único *codon* do gene do canal de sódio, como tem sido relatado em *NaV*, para 13 espécies de anofelinos, dentre eles o *A. gambiae*, o mais estudado. Neste último foram registradas três variantes mutacionais (L1014F, L1014S e N1575Y) em 20 dos 54 países da África, em *A. A. sinensis*, com duas variantes (L1014F e L1014S), segundo Davies *et al.* (2007) e uma substituição (N1013S), conforme Kim *et al.* (2007) e Tan *et al.* (2012). Em *A. culicifacies*, da Índia foram registradas duas substituições (L1014F/L1014S), como uma nova mutação no sítio 1010 (Singh *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014). O presente estudo, que não objetivou a análise de diferenciação por meio de seleção purificadora, limita-nos a fazer inferências acerca de variantes mutacionais que porventura estejam levando à diferenciação e evolução dos *supercontigs* de *NaV* das 17 espécies de anofelinos.

Apesar das sequências ortólogas terem sido escolhidas com critérios rigorosos em relação ao *query* e *target*, para evitar viés nos dados, aventa-se a possibilidade de que a distância entre os clados e os agrupamento das sequências de *NaV* possam ter sido influenciados por erros de depósito de sequências desse gene no banco de dados (*Vectorbase*), já que em relação ao complexo *gambiae* (*A. merus*, *A. melas*, *A. coluzzii* e *A. gambiae*, *A. arabiensis* e *A. quadriannulatus*) não há grandes diferenças de pressão de seleção óbvias, já que vivem em *habitat* comum (Collucci *et al.*, 2002).

Sugere-se, ainda, que pressões seletivas diferentes atuantes podem favorecer o gene *NaV* a apresentar *gaps* e diferenças de tamanho de fragmentos das sequências que influenciam diretamente na distância de *A. darlingi* em relação às demais espécies analisadas. Outros estudos evolutivos de árvores de genes de *Anopheles* têm contribuído para entender processos de diferenciação, que atuam de forma independente em cada gene. Alguns trabalhos apresentam topologias semelhantes quando comparados às árvores de espécies, exemplifica-se o gene da viletogenina (Azevedo *et al.*, dados não publicados). A maioria das árvores geradas, a partir de genes, apresenta disparidades (Bridi e Rafael, 2016; Ohse e outros, dados não publicados); no domínio GGBP (Bridi e Rafael, 2016), algumas espécies do complexo *A. gambiae* não se

agrupam no mesmo clado, mas *A. arabiensis* e *A. quadriannulatus* aparecem como grupo irmão corroborando com o presente estudo. Ainda, fazem-se necessárias mais pesquisas, para compreender aspectos acerca de variantes mutacionais no *supercontigs* de *NaV* das 17 espécies de anofelinos entre os continentes, ou mesmo, de adaptação às pressões ambientais, que levaram ao sucesso evolutivo desses mosquitos

## CONCLUSÃO

Os dados preliminares do perfil evolutivo do gene do canal de sódio de *Anopheles* deste estudo carecem de análise mais robusta. Apesar da ocorrência de algumas coincidências evolutivas do gene canal de sódio em relação às árvores de espécies do grupo, esse gene evolui em uma dinâmica diferente e, por isso, não pode representar de forma fidedigna a filogenia evolutiva das 17 espécies de anofelinos entre os continentes aqui estudadas.

Os processos de diferenciação do gene *NaV* ainda são desconhecidos, mas pode-se pressupor que a sua evolução está ocorrendo em dois caminhos, e isso pode ajudar a inferir sobre a capacidade de resistências a inseticidas e processos evolutivos dentro de *Anopheles*.

## REFERÊNCIAS

Ahlquist, Jon E., 1999: Charles G. Sibley: A commentary on 30 years of collaboration. *The Auk*, vol. 116, no. 3 (July 1999).

Bradley E. 1979 Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *The Annals of Statistics*. 7 (1): 1–26. doi:10.1214/aos/1176344552.

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

Collucci, E., Sallum, M.A.M. 2003 Phylogenetic analysis of the subgenus *Kertessia* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological characters. *Insect Syst Evol* 34:361- 72.

Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, Di Deco MA, Petrarca V. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*. 2002;298:1415–1418.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.

Bradley E., 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *The Annals of Statistics*. 7 (1): 1–26. doi:10.1214/aos/1176344552.

Harbach R.E, Kitching I.J. 2016 The phylogeny of Anophelinae revisited: inferences about the origin and classification of Anopheles (Diptera: Culicidae). —*Zoologica Scripta*, 45, 34–47.

Larsson, A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics* 30 (22): 3276-3278.

<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>.

Foley, D.H., Bryan, J.H., Yeates, D., Saul, A. 1998. Evolution and systematic of Anopheles: insights from a molecular phylogeny of Australasian mosquitoes. *Mol. Phylogenet Evol.* 9:262-75.

Marinotti, O.; Aerqueira, G. C.; De Almeida, G. G. P.; Ferro, M. I. T.; Loreto, E. L. D. S.; Zaha, A.; Teixeira, S. M. R.; Wespiser, A. R.; Almeida e Silva, A.; Schlindwein, A. D.; Pacheco, A. C. L.; SILVA, A. L. D. C. D.; Graveley, B. R. Walenz, B. P.; Lima, B. D. A.; Ribeiro, C. A. G.; Nunes-Silva, C. G.; De Carvalho, C.; R. Soares, C. M. D. A.; De Menezes, C. B. A.; Matioli, C.; Caffrey, D.; Araujo, D. A. M.; De Oliveira, D. M.; Golenbock, D.; Grisard, E. C.; Fantinatti-Garboggini, F.; De Carvalho, F. M.; Barcellos, F. G.; Prosdocimi, F.; May, G.; Azevedo Junior, G. M. D.; Guimaraes, G. M.; Goldman, G. H.; Padilha, I. Q. M.; Batista, J. D. S.; Ferro, J. A.; Ribeiro, J. M. C.; Fietto, J. L. R.; Dabbas, K. M.; Cerdeira, L.; Agnez-Lima, L. F.; Brocchi, M.; De Carvalho, M. O.; Teixeira, M. D.; M. Diniz Maia, M. D. M.; Goldman, M. H. S.; Cruz Schneider, M. P.; Felipe, M. S. S.; Hungria, M.; Nicolas, M. F.; Pereira, M.; Montes, M. A.; Cantao, M. E.; Vincentz, M.; Rafael, M. S.; Silverman, N.; Stoco, P. H.; Souza, R. C.; Vicentini, R.; Gazzinelli, R. T.; Neves, R. D. O.; Silva, R.; Astolfi-Filho, S.; Maciel, T. E. F.; Urmenyi, T. P.; Tadei, W. P.; Camargo, E. P.; D Vasconcelos, A. T. R. 2013 The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. *Nucleic Acids Research*, V. 41, P. 7387-7400.

Matioli, 2012 S.R. (Ed.). *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

Matioli, Sérgio Russo e Fernandes, Flora Maria de Campos *Biologia Molecular e Evolução*. 2ª Edição, Ribeirão Preto: Holos Editora. 256 p.

Neafsey DE, Waterhouse RM, Abai MR, Aganezov SS, Alekseyev MA, Allen JE, et al., 2015. Highly evolvable malaria vectors: The genomes of 16 Anopheles mosquitoes. *Science*. 347(6217):43-53.

Nei, M. e Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford Univ. Press.

Paredes-Esquivel C, Harbach RE, Townson H (2011) Molecular taxonomy of members of the *Anopheles hyrcanus* group from Thailand and Indonesia. *Medical and Veterinary Entomology*, 25: 348–352. doi:10.1111/j.1365-2915.2010.00937.

Maddison, D.R.; Swofford, D.J.; Maddison, W.P. 1997. "NEXUS: an extensible file format for systematic information". *Systematic Biology*. **46** (4): 590–621. [doi:10.1093/sysbio/46.4.590](https://doi.org/10.1093/sysbio/46.4.590).

Posada, D. e Crandall K, A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14:817–818.

Rambaut. A. 2014. Figtree, a graphical viewer of phylogenetic trees. 1.4.2 ed. Edinburgh: The author, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.

Ronquist, F.; Huelsenbeck J.P. 2003 Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*.19:1572–1574.

Schneider, H. 2007. Métodos de Análise Filogenética - Um Guia Prático. 3ª Edição, Ribeirão Preto: Holos Editora. 200 p.

Shendure, J.; Ji, H. 2008 Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, v.26, n.10, p.1135-1145. Disponível em: . Acesso em: 5 jun. 2009. doi:10.1038/nbt1486.

Sinka, M.E.; Bangs, M.J.; Manguin, S.; Rubio-Palis, Y.; Chareonviriyaphap, T.; Coetzee, M.; Mbogo, C.M.; Hemingway, J.; Patil, A.P.; Temperley, W.H.; Gething, P.W.; Kabaria, C.W.; Burkot, T.R.; Harbach, R.E.; Hay, S.I. 2012. *A global map of dominant malaria vectors. Parasites & Vectors*, 5: 69.

SIVEP-Malaria. Notificações de casos de malária. Disponível em: [http://portalweb04.saude.gov.br/sivep\\_malaria/](http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/). Data de acesso: 20 de abril de 2013.

Suárez-Díaz, E. e Anaya-Muñoz, V. H. (2008) History, objectivity, and the construction of molecular phylogenies. *Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed. Sci.* 39:451–468.

Yeates D.K.; Wiegmann, B.M.; Courtney, G.W.; Meier, R.; Lambkin, C. & Pape, T. (2007) Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. *Zootaxa*, 1668, 565–590.

## CAPÍTULO II

### LOCALIZAÇÃO FÍSICA DO *SUPERCONTIG* DA SUBUNIDADE I, DO CANAL DE SÓDIO (*NaV*) EM CROMOSSOMOS POLITENICOS DE *Anopheles darlingi*

#### INTRODUÇÃO

Estudos citogenéticos em cromossomos são importantes para a compreensão da citotaxonomia, organização genômica e evolução de mosquitos (Rafael *et al.*, 2008). As abordagens citogenéticas clássicas em mosquitos se intensificaram a partir do primeiro registro de espécies crípticas no complexo *Anopheles maculipennis*, da Europa (revisão, Collins *et al.*, 2000). Mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus* apresentam variação cromossômica na morfologia do cromossomo X (acrocêntrico e submetacêntrico), enquanto que o Y é puntiforme (Rafael e Tadei, 1998; Rafael *et al.* 2005). O *Anopheles darlingi*, apresenta cariótipo com  $2n=6$  cromossomos, contendo o par I (cromossomos menores), o par II (cromossomos maiores) e o par III (cromossomos intermediários) sendo dois pares de cromossomos autossômicos (II e III) e um par de cromossomos sexuais heteromórficos, onde XX caracteriza as fêmeas e XY os machos (Rafael e Tadei, 1998). O cromossomo X, mitótico é submetacêntrico em *Anopheles aquasalis* (Kitzmilller e Chow, 1971) e *Anopheles nuneztovari* (Rafael e Tadei, 1998; 2000), enquanto que é acrocêntrico em *A. darlingi* (Rafael e Tadei 1998), *Anopheles argyritarsis*, *Anopheles cruzii* (Ramírez, 1989) e *Anopheles albitarsis* (Rafael e Tadei, 2000).

Nas últimas décadas, devido à necessidade de conhecer a variabilidade cromossômica e evolução de espécies de mosquitos de importância epidemiológica, a Citogenética Molecular, por meio do método de Hibridização *in situ* (ISH), teve início em 1970, com estudos de cromossomos politênicos, por meio de sondas de sequências de RNAr e DNAr complementares e específicas (Jones e Robertson, 1970; Pardue *et al.*, 1970). O método de FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*), que utiliza sondas marcadas com flourocromos que se anelam a determinado DNA/RNA alvos, surgiu posteriormente.

O método de FISH é uma ferramenta muito útil, para identificar genes específicos ou sequências de regiões cromossômicas (Guerra, 2004), desenvolver mapas físicos cromossômicos e genéticos (Munstermann e Conn, 1997), estudar a evolução cromossômica e sintonia gênica, esta última caracterizada pela conservação da ordem e conteúdo gênico (Sharakhov *et al.*, 2002) em cromossomos de mosquitos. O método de FISH em cromossomos politênicos e mitóticos de populações de *A. darlingi* e *A. nuneztovari*, de Manaus e Novo Airão (AM) e Macapá (AP) foi padronizado por Rafael *et al.* (2003).

Os cromossomos politênicos são formados pelo emparelhamento de cromátides homólogas, que sofrem sucessivas replicações do DNA. Citam-se os núcleos politênicos salivares e de células nutridoras de ovários de mosquitos anofelinos, cujos cromossomos são alvos de diversos estudos, por causa da presença de inversões cromossômicas de importância no processo de especiação desses mosquitos (Krzywinski e Besansky, 2003). Espécies morfológicamente semelhantes podem ser separadas pela análise do padrão de bandas das inversões fixadas nos cromossomos politênicos (White, 1973; 1980). Citam-se a heterogeneidade genética de espécies do complexo *Anopheles gambiae*, contribuindo para a determinação de 8 espécies crípticas: *A. gambiae s. s.*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles melas*, *Anopheles merus*, *Anopheles bwambae*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles amharicus* e *Anopheles quadriannulatus* (Della Torre *et al.*, 2002; Coetzee *et al.*, 2013).

Análises de variabilidade cromossômica em *A. darlingi* da Amazônia mostraram a ocorrência de polimorfismo de inversões em núcleos politênicos salivares, com altas frequências de inversões heterozigotas (Guedes *et al.*, 1957; Kreutzer *et al.*, 1972; Tadei *et al.* 1982, 1985, Rafael *et al.*, 2010). Tadei *et al.* (1982, 1985), descreveram três inversões: uma no cromossomo X (Xb), uma no cromossomo 2 (2Rd), e Rafael *et al.* (2010) descreveram mais uma inversão no cromossomo 3 (3Lc); além disso, foram descritas novas subseções cromossômicas. Outras inversões paracêntricas no cromossomo 3, sendo duas no braço direito e duas no braço esquerdo foram descritas (Cornel *et al.*, 2016) corroborando dados de que, populações de *A. darlingi* da Amazônia são altamente polimórficas quando comparadas às populações do sul do país. Nestas últimas foram descritas nove inversões independentes e um arranjo complexo (Guedes *et al.*, 1957; Kreutzer *et al.*, 1972).

O fotomapa é uma ferramenta útil para mapear fisicamente sequências gênicas de maneira mais precisa (Rafael *et al.*, 2010), do que o mapa de referência de Kreutzer *et al.*, (1972), que descreveram os núcleos politênicos de *A. darlingi* da Amazônia central, que apresentam alto grau de polimorfismo de inversões. O Fotomapa dos cromossomos politênicos de *A. darlingi* foi construído, a partir de amostras de *A. darlingi* de área periférica da bacia amazônica brasileira, porque possuem menos polimorfismo de inversões cromossômicas (Rafael *et al.*, 2010).

Análises citogenéticas envolvendo o mapeamento físico cromossômico em mosquitos, vetores da malária na América do Sul, ainda são escassas (Rafael *et al.*, 2008). Citam-se o mapeamento físico de genes para o DNA repetitivo (DNAr) em cromossomos e mitóticos politênicos de *A. darlingi* e *A. nuneztovari* (Rafael *et al.*, 2003), *HSP70* (Rafael *et al.*, 2004),

*Anopheles albitarsis* (Rafael *et al.*, 2008) e genes de sequências únicas actina (Bridi *et al.*, 2013), miosina e arrestina em *A. darlingi* (Grangeiro, 2013).

Neste trabalho foi mapeado fisicamente o *Supercontig (Scaffold)*, do canal de sódio (*NaV*) de *A. darlingi*, em núcleos politênicos de *A. darlingi* *Supercontig (Scaffold)*, do canal de sódio *NaV* em núcleos politênicos de *A. darlingi*, para auxiliar na construção do mapa físico cromossômico em andamento desse mosquito no LCGEM-INPA, e comparar regiões de sintenia de *NaV* no genoma de *A. gambiae*.

## OBJETIVO

Mapear fisicamente o *Scaffold*, da subunidade I do canal de sódio de *A. darlingi* e determinar se há sintenia desse gene em termos ortólogos nos cromossomos de *A. darlingi* e *A. gambiae*.

## METODOLOGIA

### Captura de Material

As capturas de *A. darlingi* foram realizadas no bairro Puraquequara (S 03° 03' 06.95'' e W 59° 52' 31.38''), Zona Leste, Município de Manaus, Estado do Amazonas (Figura 1).

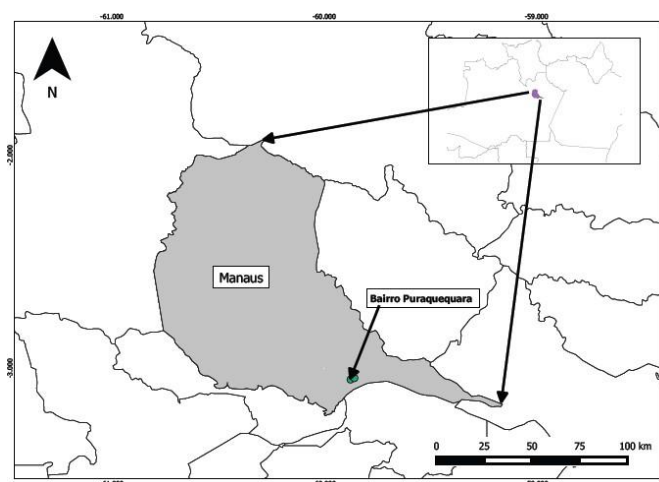


Figura 1 - Mapa dos locais de captura de *Anopheles darlingi*, no bairro Puraquequara, Manaus, Estado do Amazonas.

### Desenvolvimento de *Anopheles darlingi*

Após a captura dos exemplares em campo, as fêmeas adultas de *A. darlingi* foram transportadas ao Insetário do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue da CSAS / INPA e identificadas, segundo as chaves taxonômicas de Forattini (1962), Gorham *et al.* (1967), Faran e Linthicum (1981) e Consoli e Oliveira (1994). As fêmeas foram alimentadas com sangue de



pato doméstico (*Cairina moschata*). A oviposição foi realizada dentro de copos plásticos, contendo papel de filtro umedecido, e cada desova foi transferida para copos contendo água e papel filtro nas bordas. Após a eclosão dos ovos, as larvas foram alimentadas com ração comercial para peixe ornamental.

### **Preparações de lâminas com cromossomos politênicos de *Anopheles darlingi***

As preparações dos cromossomos politênicos de *A. darlingi* foram realizadas, segundo French *et al.* (1962) com modificações para *A. darlingi* (Rafael *et al.*, 2004). As glândulas salivares foram extraídas do protórax de larvas de 4º estágio, utilizadas para as preparações cromossômicas. Sobre as glândulas foram adicionados 3 fixadores: I (1,5 mL Carnoy: 5 mL água destilada), II (2 mL Carnoy: 2 mL água destilada) e III (2 mL ácido láctico 90%: 2 mL água destilada: 1 ml de ácido acético). Foi adicionada lamínula siliconada sobre as glândulas salivares, e estas foram esmagadas entre lâmina e lamínula. Em seguida, a lamínula foi removida em nitrogênio líquido e a lâmina foi desidratada em Etanol a 50%, 75% e 100%, por 3 minutos, cada. Após a secagem da lâmina, esta foi mantida em freezer a 20°C negativos.

### **Hibridização *in situ* Fluorescente- FISH**

#### **Preparo da sonda**

A sequência do *Scaffold* (subunidade I) do canal de sódio de *A. darlingi*, clone de Fosmideo, inserido no vetor de clonagem *pCMV SPORT6* (INVITROGEN) foi obtida do genoma desse mosquito (Marinotti *et al.*, 2013), e utilizada como sonda. A sequência está depositada no site: [www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org), com o numero de acesso ADAC000755.

#### **Crescimento das colônias de *Escherichia coli* e extração do cDNA plasmidial**

Bactérias *E. coli*, contendo clones (10 µg) em meio *Circle Grow* (CG) foram inoculadas em 1,5 ml de CG, com Cloranfenicol (50mg/mL para 100 mL de meio CG) em placas de 96 poços. A placa foi mantida a 37°C com agitação a 170 rpm, por 22 horas. A extração do DNA *phosmidial* foi realizada com o kit “*Concert Rapid Plasmid Miniprep System*”, de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizada a corrida do DNA *phosmidial* em gel de agarose a 1%, para verificar a sua integridade, e a quantificação desse DNA foi verificada em equipamento *NanoDrop*<sup>TM</sup>.

### Marcação do DNA por *Nick Translation System*

Em tubos de 1,5 mL foram adicionados 10x *reaction buffer* da DNA polimerase I (Fermentas), dNTPs *mix*, BSA 0.5 mg/mL, DNA (500 ng a 1 µg), *Cye<sup>3</sup>r*, DNase I (0.02U), DNA polimerase e completado o volume total para 25 uL. A sonda foi incubada a 15 °C, por 2h30 min.

### Purificação da sonda marcada

Foram acrescentados DNA de Salmon (1/10) do vol total e NaAc (3M) na sonda, que esteve protegida de luminosidade. Em seguida, a sonda foi purificada com Etanol (100% PA) a 1/10 do volume total da reação, e misturada a reação invertendo os tubos. A sonda foi mantida a 80 °C negativos por 2 horas ou *overnight*.

O material foi centrifugado a 4° C, 14,000 rpm, 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (sonda) seco à vácuo, 5 a 10 min. A sonda foi diluída em 2x solução de Hibridização (0.2 g Sulfato Dextran + Formamida ultra pura+ H2O + 20 x SSC) previamente aquecida a 37°C. O material foi misturado e centrifugado rapidamente.

### Pré-tratamento das lâminas

O pré-tratamento das lâminas consistiu na desnaturação dos cromossomos politênicos de *A. darlingi*. As lâminas foram fixadas em Etanol e Ácido Acético (3:1), por 10 minutos, e secas ao ar, depois desidratadas em Etanol 100% por 10 minutos. Após serem secas ao ar, as lâminas foram mergulhadas em cubeta, contendo PBS 1x (Tampão Fosfato salino), por 20 minutos. Cada lâmina foi colocada em cubeta, contendo paraformaldeído 4%, por 1 minuto. As lâminas foram desidratadas em etanol a 50%, 70%, 90% e 100% duas vezes, por 5 minutos cada e, secas ao ar.

### Desnaturação da sonda e hibridização *in situ*

Foram misturados 10 µL da sonda marcada com *Cye<sup>3</sup>r* e 20 µL de Sulfato Dextran 20% (em formamida) pré-aquecidos a 42°C. O tubo contendo a sonda será centrifugado brevemente.

As lâminas foram aquecidas a 90 °C, por 5 segundos e, imediatamente foi adicionado 30 µL da sonda sobre a lâmina que foi coberta com lamínula 22x22 mm. O DNA alvo e a sonda foram desnaturados a 90 °C, durante 10 minutos. As lâminas foram transferidas para a câmara úmida pré-aquecida com SSC 2x e incubadas a 37 °C, durante 18 horas.

### **Lavagem das lâminas**

As lâminas foram lavadas, removendo-se as lamínulas em SSC 0,2X, em T.A. (Temperatura Ambiente). Em seguida, as lâminas serão lavadas em SSC 0,2X a 42 °C, por 20 minutos por duas vezes, e a última lavagem será em PBS 1% a T.A, por 10 minutos.

### **Detecção dos sinais**

Foram adicionados 100 µL de *YOYO 10X* (*Invitrogen* – 895247, USA) previamente diluído em PBS 1X sobre cada lâmina, que foram cobertas com parafilme, em T.A. por 10 minutos. Em seguida, o parafilme foi removido com jatos de PBS 1x. Imediatamente foram adicionados 10 µL de *Prolong Gold antifade* (Life – P36934, USA) e uma lamínula de 22x22mm. As lâminas permaneceram a T.A, durante 10 minutos. Posteriormente, mantidas a 4°C e protegidas da luz.

### **Microfotografias**

A detecção e microfotografias de sinais de hibridizações nos cromossomos politênicos foram feitas com auxílio de máquina fotográfica digital (*Axio Cam MRc, Carl Zeiss*) e analisados em microscópio de luz *Axioplan Zeiss*, campo claro, com objetiva de 40x e 100x, e ocular projectiva 10x/25.

### **Análise dos Dados**

#### **Mapeamento físico cromossômico**

A localização *in situ* do gene *NaV* nos cromossomos politênicos de *A. darlingi* foi realizada, por meio do Fotomapa desse mosquito (Rafael *et al.*, 2010).

#### **Mapeamento *in silico* cromossômico**

Realizou-se a busca da sequência ortóloga do gene *NaV* de *A. darlingi* (*Scaffold ADAC000755*) em relação ao *A. gambiae* (AGAP002577), no banco de dados: [www.vectorbase.org](http://www.vectorbase.org) e, em seguida, realiza a análise *in silico* da homologia entre ambos *supercontigs*, por meio do *Blastx*. A análise ontológica foi realizada pelo *Gene Ontology (GO)*, por meio do *software Blast2go* (Conesa *et al.*, 2005), que mostra os números de acesso ao alinhamento.

## RESULTADOS

De um total de 57 preparações citológicas, apenas 15 lâminas foram submetidas ao método de FISH, com a sonda da subunidade I do canal de sódio, devido a perda expressiva de material cromossômico, durante a retirada das lamínulas das lâminas em nitrogênio líquido. Destas, apenas 7 preparações citológicas mostraram sinal de hibridização em núcleos politênicos salivares de *A. darlingi*. As localizações dos sinais de hibridizações foram realizadas por meio do fotomapa de *A. darlingi* (Rafael *et al.*,2010), como mostra a Figura 2.

O *supercontig* do gene *Nav* de *A. darlingi* foi mapeado em dois sítios dos cromossomos politênicos desse mosquito. O primeiro, no braço 2L (região 16 B), adjacente à região de desaparecimento de banda (16C) e, o outro ocorreu no braço 3R (região 31 A), conforme a Figura 3.

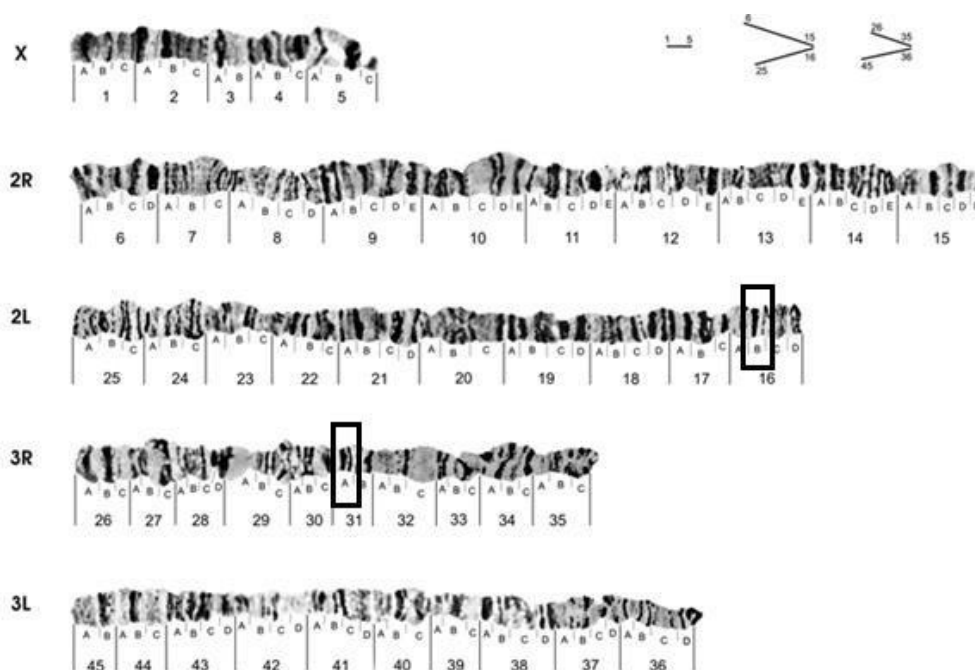


Figura 2. Localização física da sonda, (subunidade I de *Nav* (ADAC000755) de *A. darlingi* no fotomapa desse mosquito (Rafael *et al.*, 2010).

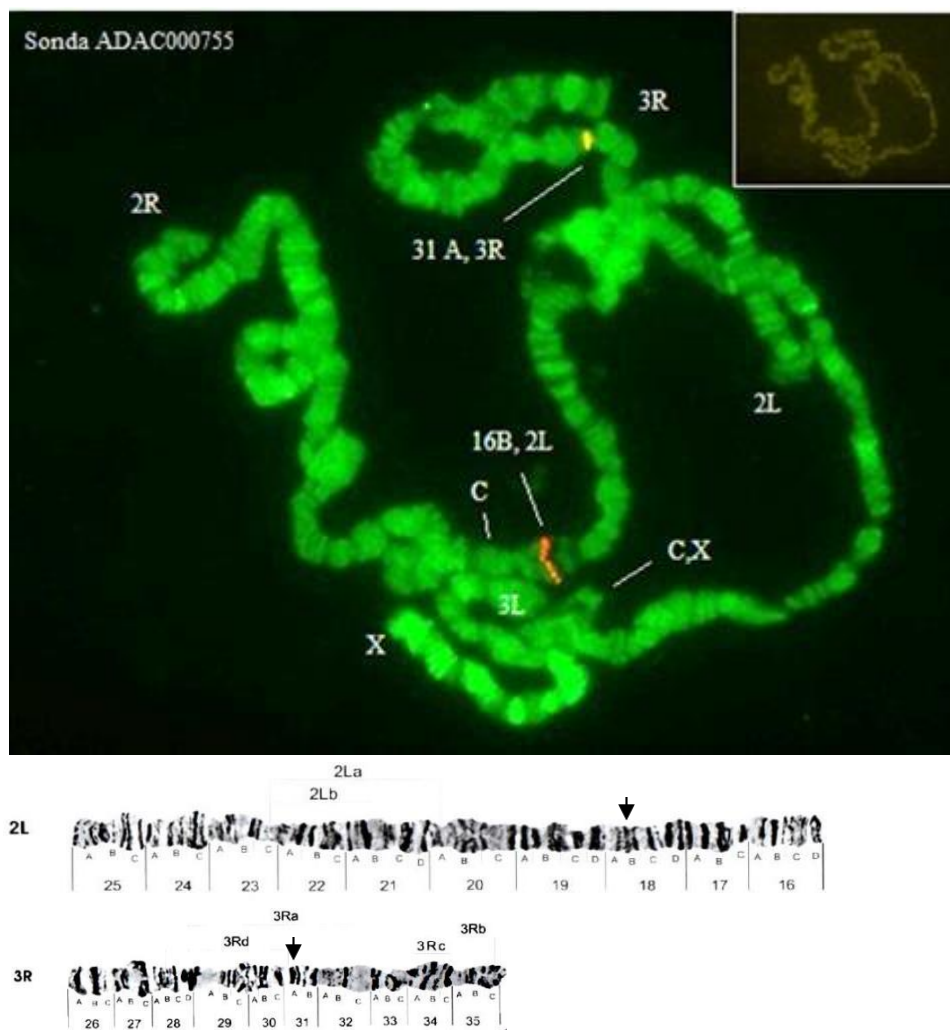


Figura 3- Mapeamento físico da sonda *supercontig* da subunidade I do canal de sódio, (ADAC000755) no braço 2L (região 16 B) e braço 3R (região 31A) dos cromossomos politênicos de *A. darlingi*.

A análise de mapeamento *in silico* da homologia do *supercontig*, do canal de sódio (*Scaffold* ADAC000755) de *A. darlingi* mostrou alto grau de identidade com o gene *Nav* de *A. gambiae* (AGAP002577), mapeando no braço 2R (região 12C) desse mosquito.

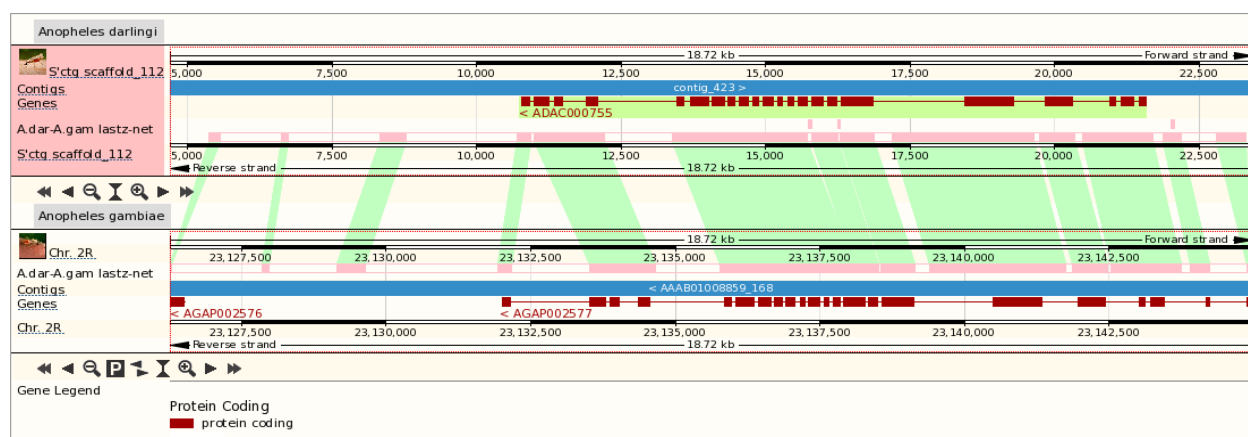


Figura 4. Mapeamento *in silico* comparativo do *Supercontig*, de *Nav* (*Scaffold* ADAC000755) de *A. darlingi* no braço 2R (região 12C) de *A. gambiae* (AGAP002577). Fonte: www.vectorbase.org, acesso: 09/02/17.

## DISCUSSÃO

O *Supercontig*, gene *NaV* foi utilizado para este estudo devido a sua importância para a compreensão de populações de anofelinos, que conferem resistências a inseticidas neurotóxicos, como o DDT e piretróides. Uma população que possui resistência a inseticidas, caracteriza-se por apresentar uma frequência crescente de indivíduos capazes de suportar doses de substâncias tóxicas, que seriam letais para a maioria dos representantes da população normal (Subramanyam e Hagstrum, 1996) sendo, portanto, um aspecto importante na composição genética dessa população, em resposta à pressão de seleção (Crow, 1957).

Em populações de mosquitos de maneira geral, podemos observar que, em cromossomos politênicos, a principal resposta a pressões ambientais é o surgimento de inversões cromossômicas, o que tem sido amplamente estudado em anofelinos (Tadei *et al.*, 2016; Cornel *et al.*, 2016). Teoricamente, a ocorrência de recombinações dentro de uma alça de inversão deveria diminuir a frequência de gametas normais e funcionais (Garcia, 2006). No entanto, a alta frequência deste tipo de polimorfismo nas espécies sugere que estes polimorfismos se mantêm de forma balanceada nas populações (Ananina *et al.*, 2004).

Os polimorfismos cromossômicos são adaptativos e balanceados, ou seja, a quantidade de polimorfismo em uma espécie ocorre em associação com a variedade de nichos ecológicos, que suas populações ocupam. Sendo assim, as inversões resultariam em blocos de genes coadaptados que confeririam adaptações específicas a nichos ou a condições ecológicas particulares. Em *A. darlingi*, sabem-se que os polimorfismos de inversões estão ligados à capacidade vetorial e à sua ampla distribuição (Tadei *et al.*, 1982; Rafael *et al.*, 2010; Bridi *et al.*, 2016; Cornel *et al.*, 2016).

A variabilidade cromossômica encontrada na natureza não pode ser explicada por um único mecanismo evolutivo, por isto, estudos têm sido realizados sobre vários fatores relacionados ao polimorfismo de inversões, tais como adaptabilidade a diversos ambientes, capacidade vetorial, dentre outros, (Cornel *et al.*, 2016), que estão, frequentemente sob seleção. No entanto, as múltiplas formas pelas quais os polimorfismos de inversões cromossômicas são mantidos continuam sendo uma importante questão a ser investigada (Tadei *et al.*, 1982; Rafael *et al.*, 2010; Cornel *et al.*, 2016).

Além das inversões cromossômicas, há dois eventos que estão associados às respostas de adaptabilidade dos mosquitos, por estresse a fator bióticos e/ou abióticos: os *puffs* e o desapareamento de cromátides irmãs (Feder e Hoffmann, 1999).

Os *puffs* são locais em que o gene entra em atividade transcricional, havendo uma intensa síntese de RNA; dessa forma, essas regiões consistem não apenas de DNA mas,

também, de RNA recém-sintetizados. Estas estruturas não são permanentes, podendo se formar e sofrer regressão, bem como surgir em outro local do genoma. Isso é uma evidência de que a atividade dos genes varia de acordo com as necessidades da célula (Feder e Hoffmann, 1999).

O desapareamento das cromátides (bandas) é um dos processos centrais do mecanismo adaptativo, que depende da ativação de um conjunto de genes que codificam as chamadas “proteínas de estresses” ou chaperonas. Nestas regiões de desapareamento, as chaperonas se mantêm associadas ao DNA, para aumentar as chances de sobrevivência dos organismos, por garantir a manutenção das estruturas terciárias e quaternárias de suas moléculas, incluindo o DNA (Feder e Hoffmann, 1999).

Dados citogenéticos da literatura não registram a descrição de desapareamento de bandas na região do 16B do braço 2L de *A. darlingi*. No presente estudo caracterizamos uma região de desapareamento de banda (16C, braço 2L). Isto pode ser explicado porque, assim como as inversões cromossômicas, regiões de desapareamento podem, também, apresentar variação de uma população a outra, dependendo da necessidade de sua adaptação ao ambiente (Cornel *et al.*, 2016; Tadei *et al.*, 2016). Sabe-se que, na fase de imaturos (larvas) há uma intensa e constante atividade de síntese proteica, para garantir o desenvolvimento larval (Beermann, 1956). Qualquer oscilação ambiental físico-química como *pH* da água, temperatura, concentração de matéria orgânica e de sais minerais em criadouros, etc. (Tadei *et al.*, 2016), pode ativar a expressão diferencial de genes codificadores de proteínas, para proteção e/ou reparo da molécula do DNA, garantindo que, locais de intensa atividade transcricional sejam protegidos (Montooth *et al.*, 2006).

A sonda do gene *NaV* mapeou por hibridização *in situ* o sítio 16B, adjacente à região de desapareamento (16C, braço 2L), e no sítio 31A (braço 3R), que ao compararmos com a hibridização *in silico* de *NaV* (região 12C, braço 2R) em *A. gambiae*, banco de dados do *Vectorbase*, este último possui no seu genoma apenas uma cópia desse gene, apesar dos *supercontigs* (sequências ortólogas) de ambas espécies possuírem 82,5 % de similaridade entre si (Figura 3).

Outros estudos de mapeamento físico com uma abordagem comparativa em relação a sintenia (conservação da ordem e conteúdo gênico) entre espécies de anofelinos (Sharakhov *et al.*, 2002), também apresentam diferenças nos locais de marcação. Citam-se os dados do mapeamento físico de genes para o DNA repetitivo (DNAr) (Rafael *et al.*, 2003), *HSP70* (Rafael *et al.*, 2004), actina (Bridi *et al.*, 2013), miosina e arrestina (Grangeiro, 2013), GNBP (Bridi e Rafael; 2016) e Vitelogenina (Azevedo, *et al.*, dados não publicados) de *A. darlingi* em relação ao *A. gambiae*. Em nosso estudo, a falta de sintenia do gene *NaV* de *A. darlingi* em

relação ao de *A. gambiae* pode ser explicada, por meio de respostas específicas às diversas interações ambientais de *A. darlingi*, do continente sul Americano e de *A. gambiae*, do continente africano.

Tadei *et al.*, 2016 apontaram mudanças ambientais e outros fatores envolvidos na ocorrência e controle de vetores, incluindo de *A. darlingi*, da Amazônia central, tais como dinâmica das águas e aspectos físico-químicos dos criadouros, que influenciam a densidade populacional e processos adaptativos, além de pressões naturais, *A. darlingi* também sofre pressão de seleção artificial em decorrência das medidas de controle vetorial, com inseticidas sintéticos (Tadei *et al.*, 2016). Nesse sentido, o gene da subunidade I de *NaV* de *A. darlingi* estaria sujeito à pressão mutacional? Mais estudos enfocando a capacidade vetorial de *A. darlingi* em relação à divergência dos genes e de seleção purificadora poderiam elucidar essa questão.

Devido ao uso extensivo de piretróides para controle de populações de *A. darlingi* da Amazônia central, sugere-se que o aumento da produção proteica das chaperonas associadas aos cromossomos politênicos na região 16C, braço 2L, é uma resposta ao estresse do mosquito a esses fatores, para proteção da estrutura da molécula do DNA no sítio do gene *Nav* já que o produto proteico deste gene é a molécula alvo de inseticidas neurotóxicos (Vlassova *et al.*, 1983; Montooth *et al.*, 2006). Neste sentido, um estudo de resposta cromossômica a estresses térmicos de *Drosophila* mostrou a importância dos produtos proteicos, para proteção e conservação de sequências do DNA, que codificam proteínas fisiológicas essenciais ao sistema nervoso do mosquito ao longo da evolução (Ffrench Constant *et al.*, 1998).

Nesse sentido, o sinal mapeado (16B) próximo à região de despareamento (16C, 2L) pode indicar que esteja ocorrendo uma associação das proteínas de estresse ou chaperonas nesse sítio, para garantir a conformação da estrutura do DNA e o equilíbrio fisiológico do produto proteico do gene *NaV*.

Estudos de mapeamento físico cromossômico, envolvendo inversões, *puffs* e despareamento de cromátides favorecem um melhor entendimento de processos evolutivos. Nesse sentido, tanto o mapeamento *in situ* duplicado do gene de *NaV* de *A. darlingi* (braços 2L e 3R) quanto a sua disparidade de marcação em relação ao sítio *in silico* de *A. gambiae* (braço 2R), sugerem que estes são eventos ocorridos por meio de quebras e inversões de pedaços cromossômicos nestes anofelinos em resposta às pressões ambientais.

O fato do gene *NaV* possuir duas cópias mapeadas nas regiões (16B, 2L; 31A, 3R) do genoma de *A. darlingi*, corrobora a inferência de que o ambiente e suas particularidades influenciam diretamente na estrutura dos seus cromossomos politênicos (Tadei *et al.*, 1982;



Cornel *et al.*, 2016; Azevedo *et al.*, dados não publicados). Neste sentido, mais estudos podem auxiliar ao preenchimento de *gaps* do genoma e no entendimento da história evolutiva desse gene.

## CONCLUSÃO

A ocorrência de uma nova região de desapareamento (16C, braço 2L) de *A. darlingi* pode ser um mecanismo de respostas específicas desse mosquito a estresses ambientais, entre outros aspectos, já que o desapareamento de bandas pode ocorrer com frequência em dípteros, que vivem em diferentes nichos ecológicos.

O mapeamento físico do gene *NaV* em dois sítios: regiões 16B (braço 2L), adjacente à região de desapareamento (16C, braço 2L) e em 31A (braço 3R) de *A. darlingi* comparado à hibridização *in silico* (12C, braço 2R) de *A. gambiae* não mostrou sintênia gênica, embora esse achado seja útil como marcador genético para estudos da organização genômica, variabilidade cromossômica e biologia evolutiva desses mosquitos.

## REFERÊNCIAS

- Ananina, G.; Peixoto, A.A.; Bitner-Mathé, B.C.; Souza, W.N.; Silva, L.B.; Valente, V.L.S. and Klaczko, L.B. 2004. Chromosomal inversion polymorphism in *Drosophila mediopunctata*: Seasonal, altitudinal, and latitudinal variation. *Genet Mol Biol* 27:61- 69.
- Beermann, W. 1956. Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21:217.
- 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.
- Bridi, L.C; Sharakhova, M.V; Sharakhov, I.V; Cordeiro, J; Azevedo-Junior, G.M; Tadei, W.P; Rafael, M.S., 2013. Chromosomal localization of actin genes in the malaria mosquito *Anopheles darlingi*. *Medical and Veterinary Entomology*. 27, 118–121.
- Bridi, L.C. e Rafael, M. S. 2016. GGBP domain of *Anopheles darlingi*: are polymorphic inversions and gene variation related to adaptive evolution? *Genetica* DOI 10.1007/s10709-016-9881-6.
- Coetzee M.; Richard H. H.; Richard W.; Alessandra D. T.; Mamadou B. C.; NORA J. B. 2013. “*Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex”. *Zootaxa* 3619 (3): 246–274.
- Collins, F.H., Kamau, L., Ranson, H.A., and Vulule, J.M., 2000. Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization*, 78 pp. 1412 -1423.
- Conesa, C.; Ruotolo, R.; Soularue, P.; Simms, T.A.; Donze, D.; Sentenac, A.; Dieci, G. 2005. Blast2go: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*.21:3674–3676.
- Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de-Oliveira, R. 1994. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro – Fiocruz, 228p.
- Cornell, A.J.; Brisco, K. K.; Tadei, W.P.; Secundino N.F.C.; Rafael, M.S.; Galardo, A.K.R.; Medeiros, J.F.; Pessoa, F.A.C.; Ríos-Velásquez, C.M.; Lee, Y.; Pimenta, P.F.P.; Lanzaro, G.C. 2016 *Anopheles darlingi* polytene chromosomes: revised maps including newly described inversions and evidence for population structure in Manaus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 111(5): 335-346.
- Crow, J.F. 1957. Genetics of insect resistance to chemicals. *Ann. Rev. Entomol.* 2: 227-246.
- Della Torre, A.; Constantini, C.; Besansky, N. J.; Caccone, A.; Petrarca, V.; Powell, J. R. e Coluzzi, M. 2002. *Speciation within Anopheles gambiae* – The glass is half full. *Science*, 298: 115.
- Faran, M.E. & Linthicum, K.J. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.*, 13 (1): 01-81.

Feder M. E., Hofmann G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243-282.

French-Constant R. H., Rocheleau T. A., Steichen J. C., Chalmers A. E., 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363: 449-451

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. and KITZMILLER J.B., 1962. - Preparation of mosquito chromosomes. *Mosquito News*, 22: 377-383.

Garcia, A. C. L. Evolução Cromossômica da Superespécie *Drosophila paulistorum* e ecologia de populações marginais. 2006. 185p. Tese (Pos-graduação em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

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.

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.

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

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.

Krzywinski, J. & Besansky, N. J. 2003. Molecular systematics of *Anopheles*: From subgenera to subpopulations. *Annu. Rev. Entomol.*, 48: 111 – 139.

Marinotti, O.; Aerequeira, G. C.; De Almeida, G. G. P.; Ferro, M. I. T.; Loreto, E. L. D. S.; Zaha, A.; Teixeira, S. M. R.; Wespiser, A. R.; Almeida e Silva, A.; Schlindwein, A. D.; Pacheco, A. C. L.; SILVA, A. L. D. C. D.; Graveley, B. R. Walenz, B. P.; Lima, B. D. A.; Ribeiro, C. A. G.; Nunes-Silva, C. G.; De Carvalho, C.; R. Soares, C. M. D. A.; De Menezes, C. B. A.; Matioli, C.; Caffrey, D.; Araujo, D. A. M.; De Oliveira, D. M.; Golenbock, D.; Grisard, E. C.; Fantinatti-Garboggini, F.; De Carvalho, F. M.; Barcellos, F. G.; Prosdoci, F.; May, G.; Azevedo Junior, G. M. D.; Guimaraes, G. M.; Goldman, G. H.; Padilha, I. Q. M.; Batista, J. D. S.; Ferro, J. A.; Ribeiro, J. M. C.; Fietto, J. L. R.; Dabbas, K. M.; Cerdeira, L.; Agnez-Lima, L. F.; Brocchi, M.; De Carvalho, M. O.; Teixeira, M. D.; M. Diniz Maia, M. D. M.; Goldman, M. H. S.; Cruz Schneider, M. P.; Felipe, M. S. S.; Hungria, M.; Nicolas, M. F.; Pereira, M.; Montes, M. A.; Cantao, M. E.; Vincentz, M.; Rafael, M. S.; Silverman, N.; Stoco, P. H.; Souza, R. C.; Vicentini, R.; Gazzinelli, R. T.; Neves, R. D. O.; Silva, R.; Astolfi-Filho, S.; Maciel, T. E. F.; Urmenyi, T. P.; Tadei, W. P.; Camargo, E. P.; D Vasconcelos, A. T. R. 2013 The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. *Nucleic Acids Research*, V. 41, P. 7387-7400.

Montooth K. L., Siebenthal K. T., Clark A. G. (2006). Membrane lipid physiology and toxin catabolism underlie ethanol and acetic acid tolerance in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 209, 3837-3850.

Munstermann, L. E. e Conn, J. E. 1997. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera, Culicidae): Impact of molecular biology and cladistic analysis. *Annu. Rev. Entomology*, 42: 351 – 369.

Pardue, M. L.; Gerbi, S. A.; Eclehardt, R. A. e Gall, J. G. 1970. Cytological localization of DNA complementar to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. *Chromosoma*, 29: 268 – 290.

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. e Tadei, W. P. 2000. Heterochromatin variation in chromosomes of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root and *A. (N.) nuneztovari* Galbadón (Diptera: Culicidae). *Genet. Mol. Biol.*, 23 (1): 67-70.

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

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

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

Rafael, M.S.; Rohde, C.; Bridi, L.C., Valente Gaiesky, V.L. S.; Tadei, W.P. 2010. Salivary Polytene Chromosome Map of *Anopheles darlingi*, the Main Vector of Neotropical Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83: 241–249. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0481

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.

Sharakhov, I.V.; Serazin, A.C.; Grushko, O.G.; Dana, A.; Lobo, N.; Hillenmeyerill, M.E.; Westerman, R.; Romero-Severson, J.; Costantini, C.; Sagnon, N.; Collins, F.H.; Besansky, N.J. 2002. Inversions and Gene Order Shuffling in *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. *Science*. 298.

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. ; RodrigueS, I. B. ; Rafael, M.S. ; Sampaio, R. T. M. ; Mesquita, H. G. ; Pinheiro, V. C. S. ; Zequi, J. A. C. ; Roque, R. A. ; Santos, J. M. M. 2016 . Adaptative processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region. *Hydrobiologia* (The Hague. Print), v. 000, p. 1-18, 2016. 0.1007/s10750-016-2960-y

Vlassova I. E., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 1983. Induction of giant heat-shock puffs in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* by 20-OH-ecdysone and ethanol. *Drosophila information service*, 59: 134-136

White, M. J. D. 1973. Animal cytology and evolution. 3 rd . Ed. *Cambridge Univ. Press*, London and New York.

White, G. B. 1980. Academic and applied aspects of mosquito cytogenetics. *Insect cytogenetics* (Blackman, R.L., Hewitt, G.M. and Ashburner, M., eds.) London. 245 – 274.