

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS  
MICROSSATÉLITES E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
DUAS POPULAÇÕES DE *Anopheles (N.) triannulatus sensu lato*  
(DIPTERA: CULICIDAE) DA CIDADE DE MANAUS

PAULA FIGLIUOLO DA CRUZ

MANAUS

2011

**PAULA FIGLIUOLO DA CRUZ**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS  
MICROSSATÉLITES E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
DUAS POPULAÇÕES DE *Anopheles (N.) triannulatus sensu latu*  
(DIPTERA: CULICIDAE) DA CIDADE DE MANAUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: **Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos**

Co-orientadora: **Dra. Jacqueline da Silva Batista**

MANAUS

2011

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ricardo Wilson e Virgínia Maria

## EPÍGRAFE

*"Nas grandes batalhas da vida,  
o primeiro passo para a vitória  
é o desejo de vencer".  
(Gandhi)*

## AGRADECIMENTOS

♥ Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por sua companhia em todos os momentos de minha vida, tanto nos que julgam bons e ruins. Pela família maravilhosa que tenho e por todas as ótimas pessoas que apareceram no meu caminho;

♥ Aos meus pais, Virgínia e Ricardo, por tudo que sou! Pelo apoio emocional, amor incondicional e amizade. Pelo incentivo aos estudos, desejos e sonhos. Amo vocês demais! Vocês são tudo pra mim!!!

♥ Aos meus irmãos e amigos, Renata e André, que me apoiaram, deram força e carinho de forma incansável. Vocês são demais! Amo vocês!!!

♥ A minha sobrinha Tainá, minha linda Poti-poti (borboletinha), que trouxe ainda mais felicidade para toda a família. Sempre com suas graçinhas e brincadeiras, faz os momentos serem inesquecíveis;

♥ Ao meu avô Flávio (*in memoriam*) e avó Lélia (*in memoriam*) que amaram muito a mim e a meus irmãos e sempre torceram pelas nossas vitórias. Tenho certeza que eles continuam olhando e orando pela família.

♥ Aos meus avôs, Carmem e Wilson, que torcem por mim, em especial à minha avó Carmen, por sempre me colocar em suas orações;

♥ Ao meu fofinho e amor Gustavo, meu companheiro que está ao meu lado em mais esta conquista e, apesar da distância, me deu força e amor para ajudar a superar os desafios. Amo-te muito neném!!!

♥ Ao meu cunhado Márcio, pela amizade e consideração;

♥ À minha sogrinha Manuela, cunhadinha Emanuele, vó Hildete e Gabi, pelo carinho, atenção e por terem me recebido muito bem na família.

♥ Aos meus filhotinhos Kiko, Vivi, Leleka e Caramelo, que são muito amorosos e brincalhões;

♥ À Dra. Joselita, por ter me recebido muito bem no laboratório, orientando-me desde a graduação. Pela ótima orientação no mestrado, sempre com muito carinho, paciência e compreensão;

♥ À Dra. Jacqueline, que me co-orientou também desde a graduação. Pela contribuição e ajuda nos experimentos e nas análises dos dados com carinho e disposição;

♥ Ao MSc. Juracy pela colaboração na parte técnica, em experimentos, na geração e análises dos dados;

♥ À MSc. Kyara, pela contribuição no laboratório e ajuda na caracterização da biblioteca. A MSc. Luciana Batista, pelo apoio nas etapas de clonagem;

- ♥ A Dra. Miriam, por ter concedido o uso de alguns equipamentos;
- ♥ Agradeço a todos que injetaram minhas placas de genotipagem: Larissa, Luciana, Kyara, Giselle e Saulo;
- ♥ As minhas amigas Graciela, Mellina, Luciana, Giselle, Izaura e Larissa, pela amizade e carinho, ajuda na bancada, pelos almoços divertidos, brigadeiros de microondas, fugidas do laboratório e muitas gargalhadas;
- ♥ Aos amigos do Laboratório de Malária e Dengue: Letícia Bridi, Giselle Guimarães, Pedro Rael, Gilson Azevedo e Kétlen Christine, pelas tardes super divertidas de café com ciência;
- ♥ Aos meus amigos Adriel Lira e Saulo, pela ajuda e carinho;
- ♥ Aos amigos do Laboratório Temático de Biologia Molecular – LTBM: Adriel, Iamili, Saulo, Jane, Paola, Henrique, Karen, Waldir, Keroleny, Taiane e João;
- ♥ As minhas amigas da turma de mestrado Márcia, Ydrielly, Eunice, Dulcilene e Kétlen pela amizade durante os momentos compartilhados nas disciplinas e distrações;
- ♥ Ao Dr. Tadei, pelo apoio financeiro na compra de materiais para a realização trabalho, e por ter me recebido muito bem no Laboratório de Malária e Dengue;
- ♥ Aos técnicos do Laboratório de Malária que identificaram os mosquitos, Carlos Alberto, João Bosco e Gervilane Ribeiro. Ao Carlos Alberto, que gentilmente elaborou um curso intensivo aos alunos do laboratório para o esclarecimento sobre a identificação dos culicídeos. Ao Henrique, Bastos e Elias pelas coletas das larvas. Ao Augusto Alex, por sua gentileza e colaboração; Ao Rodrigo Fogaça, pelo apoio técnico;
- ♥ Agradeço à Universidade do Estado do Amazonas (UEA), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT;
- ♥ Aos professores do MBT, principalmente Prof. Helena e Prof. Lozano, pelo conhecimento adquirido e amizade;
- ♥ Aos secretários do MBT, Felipe, Claudete e Bervely, pela colaboração durante todo o curso;
- ♥ A Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas - FAPEAM, pelo financiamento da Bolsa de estudo;
- ♥ A Fundação Muraki, pela concessão do financiamento do 56º Congresso Brasileiro de Genética, realizado em setembro de 2010 em Guarujá – SP;
- ♥ Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, ao Laboratório Temático de Biologia Molecular - LTBM e Laboratório de Malária e Dengue, pela infra-estrutura para a realização dos experimentos desta dissertação.
- ♥ Ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Evolutiva, pela realização de algumas disciplinas;

♥ Aos professores que participaram da minha banca de qualificação: Dra. Miriam Rafael, Dra. Jacqueline Batista e Dra. Joselita, bem como aos que participaram da minha banca de defesa: Dr. Cleiton Fantin, Dra. Doriane e Dra. Joselita, pelos conhecimentos e correções, para que minha dissertação se tornasse melhor.

♥ Enfim, todos que convivem comigo, sendo família e amigos, foram muito importantes pra mim nesta etapa. Obrigada!!!

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Considerações sobre <i>Anopheles triannulatus</i>	15
1.2 A Malária e sua importância epidemiológica	17
1.3 Marcadores Moleculares	19
1.4 Microssatélites	20
 CAPÍTULO I - Marcadores de DNA microssatélite de <i>Anopheles triannulatus sensu lato</i> (Diptera: Culicidae): desenvolvimento, caracterização e amplificação interespecífica	 22
1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Construção de Biblioteca Genômica	23
1.2 Marcadores Microssatélites em <i>Anopheles sp.</i>	23
1.3 Amplificação Heteróloga em Locos Microssatélites	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Obtenção dos Mosquitos	28
3.2 Extração e Quantificação de DNA	28
3.3 Construção da Biblioteca Genômica de <i>Anopheles triannulatus</i>	29
3.3.1 Digestão do DNA, Ligação dos Adaptadores e Amplificação do DNA	29
3.3.2 Seleção dos Fragmentos Contendo Microssatélites	30
3.3.3 Transformação e Clonagem	30
3.4 Manutenção, Amplificação dos Insertos Clonados e Extração do DNA Plasmidial	31
3.5 Sequenciamento Nucleotídico dos Fragmentos Isolados	31
3.6 Identificação das Regiões com Microssatélites	31
3.7 Caracterização da Biblioteca Genômica e Desenho dos Locos Microssatélites (Primers) de <i>Anopheles triannulatus</i>	33
3.8 Teste e Caracterização dos Locos Microssatélites de <i>Anopheles triannulatus</i>	34
3.9 Análises e Estimativas dos Parâmetros Genéticos	35
3.10 Amplificação Heteróloga de Locos Microssatélites de <i>Anopheles triannulatus</i>	35



4. RESULTADOS	36
4.1 <i>Construção da Biblioteca Genômica enriquecida com Locos Microssatélites</i>	36
4.2 <i>Caracterização da Biblioteca Genômica de Anopheles triannulatus</i>	37
4.3 <i>Desenho dos Primers e Caracterização dos Locos Microssatélites de Anopheles triannulatus</i>	38
4.4 <i>Amplificação Heteróloga em Anopheles sp.</i>	44
5. DISCUSSÃO	46
5.1 <i>Construção da Biblioteca Genômica e Caracterização de Locos Microssatélites</i>	46
5.2 <i>Amplificação Heteróloga em Anopheles sp.</i>	48
6. CONCLUSÃO	50
CAPÍTULO II - Análise da Variabilidade Genética de Duas Populações de <i>Anopheles triannulatus sensu lato</i> (Diptera: Culicidae) da Cidade de Manaus	51
1. INTRODUÇÃO	52
1.1 <i>Variabilidade Genética em Anopheles sp.</i>	54
2. OBJETIVOS	55
2.1 Geral	55
2.2 Específicos	55
3. MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1 <i>Amplificação e Genotipagem de Anopheles triannulatus</i>	56
3.2 <i>Análise da Variabilidade de duas Populações de Anopheles triannulatus</i>	58
3.3 <i>Estrutura Genética das Populações de Anopheles triannulatus</i>	58
4. RESULTADOS	60
4.1 <i>Análise da Variabilidade Genética de Anopheles triannulatus</i>	60
4.2 <i>Estrutura Genética Populacional de Anopheles triannulatus</i>	63
5. DISCUSSÃO	65
5.1 <i>Variabilidade Genética em Anopheles triannulatus</i>	65
5.2 <i>Estrutura Genética Populacional de Anopheles triannulatus</i>	67
6. CONCLUSÃO	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

## LISTA DE TABELAS

		Página
CAPÍTULO I		
TABELA 1	Locos microssatélites desenvolvidos para <i>Anopheles</i> sp.	24
TABELA 2	Temperatura de anelamento dos locos microssatélites de <i>Anopheles triannulatus</i> obtidos a partir da otimização das reações de amplificação.	40
TABELA 3	Caracterização de 15 locos microssatélites polimórficos de <i>Anopheles triannulatus</i> , procedentes de Puraquequara, Manaus, Amazonas, Brasil.	43
TABELA 4	Amplificação heteróloga de 15 locos microssatélites isolados para <i>Anopheles triannulatus</i> em quatro espécies de <i>Anopheles</i> .	45
CAPÍTULO II		
TABELA 5	Locos microssatélites utilizados nas análises populacionais de <i>Anopheles triannulatus</i> em duas localidades na cidade de Manaus.	57
TABELA 6	Índices de variabilidade genética estimados em oito locos microssatélites de <i>Anopheles triannulatus</i> , analisados em duas populações da cidade de Manaus.	61
TABELA 7	Frequência de alelos exclusivos (valores entre parênteses) observados em oito locos microssatélites distribuídos em duas populações de <i>Anopheles triannulatus</i> da cidade de Manaus.	62
TABELA 8	Análise da variância molecular em duas populações do Estado do Amazonas de <i>Anopheles triannulatus</i> , utilizando oito locos microssatélites.	63

## LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Mapa de distribuição geográfica de <i>Anopheles triannulatus</i> .	16
FIGURA 2	Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).	19
CAPÍTULO I		
FIGURA 3	Edição e alinhamento das sequências de <i>Anopheles triannulatus</i> nos programas <i>CHROMAS 2.23</i> e <i>BIOEDIT 7.0.9.0</i> (HALL, 1999).	32
FIGURA 4	Formação dos <i>contigs</i> , sequência consenso de <i>Anopheles triannulatus</i> com o auxílio do programa <i>SEQMAN</i> .	32
FIGURA 5	Caracterização da biblioteca genômica e desenho dos <i>primers</i> de <i>A. triannulatus</i> pelo programa <i>WEBSAT</i> (MARTINS et al, 2009).	33
FIGURA 6	Produto de clivagem do DNA de <i>Anopheles triannulatus</i> utilizando enzima de restrição <i>RsaI</i> . Em destaque a faixa de digestão (entre 500 e 1200 pb). M = Marcador <i>Ladder 1 Kb Plus</i> .	36
FIGURA 7	Eletroferograma das sequências de dois locos microssatélites isolados para <i>Anopheles triannulatus</i> . A = Microssatélite Tetranucleotídico Perfeito (CCAG) <sub>7</sub> B = Microssatélite Dinucleotídico Imperfeito (AC) <sub>6</sub> t(AC) <sub>3</sub> t(AC) <sub>8</sub> .	37
FIGURA 8	Caracterização dos microssatélites de <i>Anopheles triannulatus</i> quanto ao número de nucleotídeos.	37
FIGURA 9	Motivo de repetição do tipo dinucleotídeo mais frequente encontrado na biblioteca genômica enriquecida de <i>Anopheles triannulatus</i> .	38
FIGURA 10	Caracterização dos microssatélites de <i>Anopheles triannulatus</i> quanto à natureza das repetições.	38
FIGURA 11	Caracterização dos locos ( <i>primers</i> ) microssatélites isolados para <i>Anopheles triannulatus</i> quanto ao número de nucleotídeos.	39
FIGURA 12	Caracterização dos locos ( <i>primers</i> ) microssatélites isolados para <i>Anopheles triannulatus</i> quanto à natureza das repetições.	39
FIGURA 13	Perfil eletroforético do loco <i>ATR18</i> e <i>ATR29</i> de 28 indivíduos de <i>Anopheles triannulatus</i> , em gel de agarose a 1,5%. M = Marcador <i>Ladder 1 Kb Plus</i> .	41
FIGURA 14	Eletroferogramas das genotipagens ilustrando os genótipos	42

heterozigotos e homozigotos dos locos *ATR19* (HEX = picos verdes) e *ATR04* (FAM = picos azuis) de *Anopheles triannulatus*.

- FIGURA 15 Perfil eletroforético do loco *ATR24* e *ATR48* de quatro indivíduos de *Anopheles sp.*, em gel de agarose a 1,5%. M = Marcador *Ladder 1 Kb Plus*. C+ = Controle Positivo (Miniprep); At = *Anopheles triannulatus*; C- = Controle Negativo. 44
- CAPÍTULO II
- FIGURA 16 Mapa satélite indicando as duas localidades utilizadas no estudo populacional de *Anopheles triannulatus*, (A) Puraquequara e (B) Lago Januari, Manaus, Estado do Amazonas. 57
- FIGURA 17 Triângulo (A) e *Barplot* (B) gerados pelo programa *STRUCTURE* 2.3.3, indicando duas populações distintas de *Anopheles triannulatus* ( $K = 2$ ). (1) Puraquequara (em laranja) e (2) Lago do Januari (em verde). 64

## RESUMO

Universidade do Estado do Amazonas. Rua Carvalho Leal, Nº 1777 CEP: 69055-001. Manaus – AM.

CRUZ, Paula, F. [paula.fcruz86@gmail.com](mailto:paula.fcruz86@gmail.com)

*Anopheles triannulatus* é um complexo de espécies crípticas constituído de pelo menos três espécies: *Anopheles triannulatus* s.s., *Anopheles halophylus*, e outra ainda não identificada, denominada *A. triannulatus* C. É uma espécie zoofílica, crepuscular e exofílica. No entanto, tem a capacidade endofágica e antropofílica. Sua importância como transmissora da malária humana ainda é controvertida. *A. triannulatus* já foi encontrada infectada por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, sendo considerada uma possível vetora da malária na Venezuela. Diante disso e do seu *status* taxonômico ainda controvertido, foi construída uma biblioteca genômica enriquecida com microssatélites (SSRs) e estes analisados em duas populações do Amazonas. Esta biblioteca gerou 96 clones com insertos e 84 sequências nucleotídicas de boa qualidade. Dos 75 contigs obtidos, 83 sequências continham SSRs, com apenas 1,31% de redundância. Foram isolados 51 pares de *primers*. Destes, 15 locos microssatélites foram caracterizados em 25 indivíduos de *A. triannulatus* coletados no bairro Puraquequara, Manaus (Amazonas). Foram obtidos 88 alelos, variando entre 3 a 10 alelos por loco, com uma média de 6,0 alelos. A heterozigotidade observada ( $H_O$ ) variou entre 0,157 a 0,866, enquanto a heterozigotidade esperada ( $H_E$ ) variou entre 0,322 a 0,843. A amplificação heteróloga de 15 locos microssatélites revelou quatro locos amplificados para todas as espécies (*A. benarrochi*, *A. rangeli*, *A. oswaldoi* e *A. darlingi*) e quatro para, pelo menos, uma espécie. Para análise da variabilidade genética foram selecionados oito locos que apresentaram maior polimorfismo e número de indivíduos genotipados. Desses oito locos analisados foram obtidos 71 alelos, com uma média de 6,25 e 7,25 alelos por loco em Puraquequara e Janauari, respectivamente. A heterozigotidade observada variou de 0,318 a 0,937 e a esperada variou de 0,455 a 0,838, nas duas populações, indicando elevada variabilidade genética. As estatísticas F de Wright revelaram alta estruturação genética entre as populações ( $F_{ST} = 0,282$ ), indicativa de diferenciação interespecífica para complexos de espécies, a qual foi confirmada pelo elevado valor de distância genética entre as duas populações ( $D = 1,832$ ) e pelos resultados da análise Bayesiana implementada no programa *STRUCTURE*, que evidenciou a existência de dois *clusters* ( $K=2$ ), sendo considerada duas populações distintas.

**Palavras chaves:** *Anopheles triannulatus*, DNA microssatélite, variabilidade genética, complexo de espécie e malária.

## ABSTRACT

*Anopheles triannulatus* is a complex of cryptic species consisting of at least three species: *Anopheles triannulatus* ss, *Anopheles halophylus* and another until now not identified species named *A. triannulatus* C. Yet, *A. triannulatus* is a zoophilic, twilight and exophilic species. Nevertheless, *A. triannulatus* has endophagous and anthropophilic abilities. The importance of *anopheles triannulatus* as a transmitter of human malaria is still an issue. *A. triannulatus* has been found infected with *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*, so is being considered as a possible vector of malaria in Venezuela. Given this, and that its taxonomic status lies upon controversies, it is constructed in this work a genomic library enriched with microsatellites (SSRs) which were analyzed in two populations from the Amazon Region. That library has generated 96 clones with inserts and 84 nucleotide sequences of good quality. Of the 75 contigs obtained, 83 sequences showed to contain SSRs with only 1.31% of inherent redundancy. 51 *primers* pairs were isolated, from which 15 loci microsatellites were characterized in 25 individuals of *A. triannulatus* collected in the neighborhood of the site Puraquequara, in the city of Manaus, in Amazonas State, Brazil. The work also shows were obtained 88 alleles, ranging from 3 to 10 alleles per locus, with an average of 6.0 alleles. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) ranged from 0.157 to 0.866, while expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranged between 0.322 to 0.843. The amplification of 15 heterologous microsatellite loci revealed four loci, amplified for all species (*A. benarrochi*, *A. rangeli*, *A. oswaldoi* and *A. darlingi*), and four amplified loci for at least one species. For the analysis of genetic variability eight loci were selected in which more polymorphism and number of individuals were genotyped. For those eight loci, 71 alleles were obtained with an average of 6.25 and 7.25 alleles per locus, at Puraquequara and Januari river, respectively. Both population have shown observed heterozygosity ranging from respectively 0.318 to 0.937 and from expected 0.455 to 0.838, what indicates high genetic variability. The Wright's F statistics showed high genetic structure among populations ( $F_{ST} = 0.282$ ), what is a fair indication of interspecific differentiation for complex species, what is confirmed, by one side, by the high figure for the genetic distance between the two populations ( $D = 1.832$ ), and by another side, by the results of the implemented Bayesian analysis, performed with the aid of the computational software STRUCTURE<sup>®</sup>, which revealed the existence of two clusters ( $K = 2$ ) taking into account two distinct populations.

**Keywords:** *Anopheles triannulatus*, DNA microsatellite, genetic variability, complex species and malaria.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Anopheles triannulatus*

*Anopheles triannulatus* pertence à classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae, gênero *Anopheles* e subgênero *Nyssorhynchus*. É um complexo de espécies crípticas (Pinto, 1939; Galvão, 1940; Galvão e Lane, 1941), com algumas variações morfológicas detectadas em adultos e em imaturos, porém difíceis de identificar.

Anteriormente, diversos autores (Pinto, 1939; Galvão, 1940; Galvão e Lane, 1941) acreditavam que o complexo era composto por cinco espécies: *A. triannulatus*, *Anopheles cuyabensis*, *Anopheles bachmanni*, *Anopheles davis* e *Anopheles perez*, devido às diferenças existentes nas manchas escuras presentes nos tarsômeros das fêmeas, e diferenças também encontradas nas larvas, pupas e ovos, coletadas na Fazenda de São João, no rio Cuiabá, estado do Mato Grosso. No entanto, Galvão e Lane (1941) e Galvão (1944), ao estudar fêmeas coletadas em água salobra, região do pantanal matogrossense, descreveram o complexo com duas subespécies, *A. triannulatus triannulatus* (Neiva e Pinto, 1922) e *A. triannulatus davis* (Peterson e Shannon, 1927), pois verificaram que as demais espécies anteriormente descritas eram apenas variações intraespecíficas.

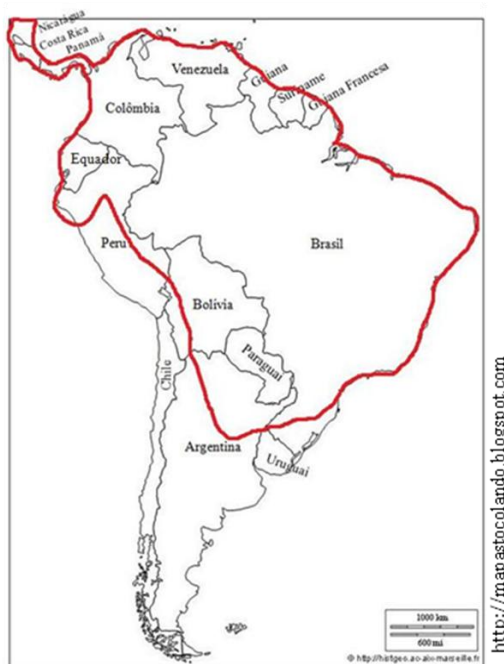
Estudos mais recentes revelaram informações importantes sobre o polimorfismo morfológico e molecular que possibilitaram identificar três espécies neste complexo: *Anopheles triannulatus sensu strictu* (Neiva e Pinto, 1922), *Anopheles halophylus* (Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira, 2002), e outra ainda não identificada morfológicamente, denominada *A. triannulatus* C. São espécies intimamente relacionadas sendo, portanto, diferenciadas pela larva de 4º estágio e pelo lóbulo ventral do clássper presente na genitália masculina. Essas três espécies foram diferenciadas por marcadores isoenzimáticos, amplificação aleatória – RAPD/PCR e características morfológicas (Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira et al., 2006).

Em insetos, especialmente em mosquitos, complexos de espécies são muito comuns e ocorrem com frequência. Espécies crípticas são aquelas que morfológicamente são idênticas ou quase idênticas e difíceis de identificá-las. Porém, é possível separá-las

geneticamente, por meio de técnicas moleculares. Como o complexo *A. triannulatus*, o gênero *Anopheles* contém outros complexos de espécies, como por exemplo, *Anopheles gambiae*, o mais eficiente vetor da malária no continente africano, e *Anopheles maculipennis*, o principal vetor da malária no norte, oeste e Europa oriental.

A distinção de espécies crípticas de insetos vetores é de grande importância, já que diferentes membros de um complexo podem exibir diferenças na ecologia, capacidade vetorial e na resposta às medidas de controle.

*A. triannulatus* possui uma ampla distribuição geográfica, como demonstrada na figura 1, ocorrendo desde o leste dos Andes, na América do Sul, incluindo Argentina, Brasil, Paraguai, parte da Bolívia e Guianas, Colômbia, Venezuela, Equador e Peru. Também foi encontrada na América Central, estendendo-se até a Nicarágua, oeste do Peru, no lado ocidental dos Andes (Faran, 1980).



**Figura 1** – Mapa de distribuição geográfica de *Anopheles triannulatus*.

As fases imaturas deste anofelino são frequentemente encontradas em criadouros naturais parcialmente sombreados, nas margens de rios, igarapés e lagos. A característica mais notada é a água limpa, pobre em cloreto e abundância de vegetação aquática: plantas flutuantes, como alface-d'água (*Pistia* sp) e plantas emergentes, como as gramíneas e algas verdes filamentosas. (Cerqueira, 1961; Faran, 1980).



É uma espécie essencialmente zoofílica e exofílica, ou seja, tem preferência alimentar em animais, como equinos e bovinos, e pouco frequentam o ambiente intradomiciliar, sendo comumente encontrada nas proximidades das matas (Charlwood e Wilkes, 1981; Arruda et al., 1986; Klein et al., 1991a). No entanto, tem a capacidade endofágica e antropofílica, que permite classificá-la como uma possível espécie vetora da malária humana, quando em altas densidades (Deane et al., 1948; Forattini, 2002; Charlwood e Wilkes, 1981; Tadei et al., 1993; Lourenço-de-Oliveira et al., 1989). Mesmo assim, a importância epidemiológica desta espécie como transmissora da malária humana ainda é controversa. A detecção das infecções dos mosquitos em condições naturais foi relatada por meio de dissecações e outras técnicas imunológicas.

Na Venezuela, *A. triannulatus* foi encontrada naturalmente infectada com oocistos de plasmódios por Gabaldon e Cova Garcia (1946) e incriminada como possível vetora da malária por Benarrochi (1931) durante um surto epidêmico. Sabe-se, entretanto, que algumas populações de *A. triannulatus* apresentam baixa susceptibilidade aos *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, quando em condições naturais, pois permitem que um pequeno número de esporozoítos consiga alcançar e invadir as suas glândulas salivares (Oliveira-Ferreira et al., 1990; Klein et al., 1991a,b).

Em algumas cidades do Pará, *A. triannulatus* foi incriminada como uma potencial vetora por, pelo menos, *P. vivax* (Arruda et al., 1986). Com o emprego de testes imunoenzimáticos com anticorpos monoclonais, Tadei et al., (1998) detectaram a infecção de *A. triannulatus* por *P. vivax* e *P. falciparum* em mosquitos procedentes do Amapá.

## 1.2. A MALÁRIA E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que invadem e se reproduzem em hemácias humanas. Os parasitas são transmitidos ao hospedeiro vertebrado pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo, tendo como principal espécie vetora no Brasil *Anopheles darlingi* (Forattini, 2003). Há quatro espécies do parasita que causam a malária humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*, sendo esta última não encontrada no Brasil. Na Amazônia, ocorrem com mais frequência *P. falciparum* e *P. vivax*.

A malária na sua forma típica caracteriza-se por episódios de calafrios, febre e sudorese. Têm duração variável de 6 a 12 horas e pode causar febre alta igual ou superior a 40 °C. Os acessos de febre podem ser com intervalos de 24, 48 ou 72 horas. Em geral, os sintomas são acompanhados por cefaléia, náuseas e vômitos.

O quadro clínico da malária pode ser leve, moderado ou grave, dependendo da espécie e quantidade de parasitas circulantes, do tempo de doença e do nível de imunidade adquirida pelo paciente. A forma mais virulenta é causada pelo *P. falciparum*, que se não for tratada, pode ser fatal em indivíduos não imunes e imunodepressivos, como gestantes, crianças, idosos e primoinfectados. A outra espécie, *P. vivax*, não é usualmente letal, mas pode se manifestar no mesmo indivíduo após um ano de aquisição da infecção, devido às formas resistentes presentes no fígado, os hipnozoítos (Sweeny, 1999).

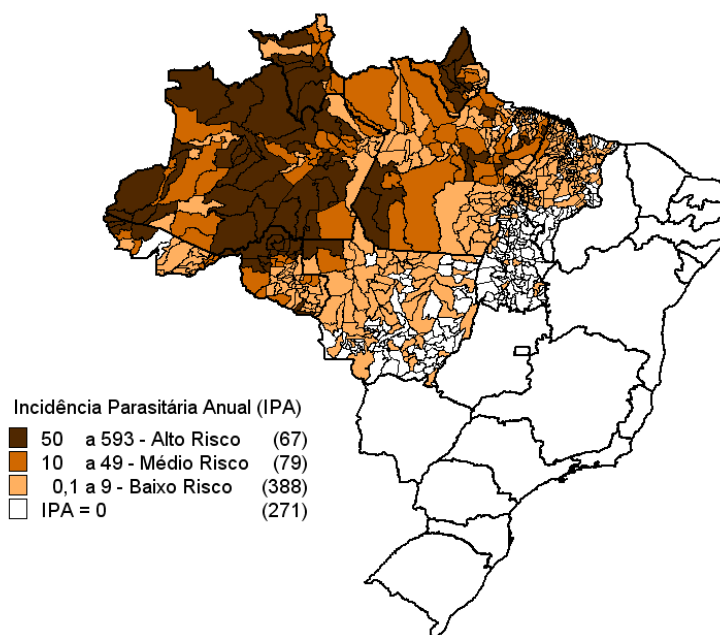
É uma doença parasitária grave que ocorre em áreas tropicais e subtropicais, porém tem um maior impacto nos países mais pobres, distribuídos pelos continentes asiático, africano e americano. É no continente africano que a malária é mais frequente e mais grave. É considerada uma das principais parasitoses, liderando a lista de doenças infecciosas de importância pública, com altos níveis de morbidade e mortalidade. Estima-se que mais de 40% da população mundial está exposta ao risco de adquirir malária.

Anualmente, a malária mata cerca de um milhão de crianças e afeta mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo (Snow, et al., 2005). É um problema de saúde global, um fenômeno biológico de co-evolução entre três espécies diferentes: o homem, o vetor e o parasita. Essa interação evolutiva é a problemática para o controle da doença (Gardner, 2002).

Em 2006, foi responsável por 34% das mortes calculadas em todo o mundo, causando 881.000 mortes nesse mesmo ano, das quais, 91% ocorreram na África e 85% em crianças menores de cinco anos de idade (OMS, 2010).

No ano de 2005, o total de pacientes infectados pela malária no Brasil chegou a 607.827 casos, desse total, 586.434 foi registrado na região Norte, sendo a espécie *P. vivax* a de maior incidência (73,4%). Nos anos seguintes, houve uma considerada redução no total de pacientes infectados, 315.630 em 2008 e 306.908 em 2009. Em 2010, até o primeiro semestre do ano, o número total de casos registrados foi de 132.000, e em Manaus, concentrou-se a maior porcentagem dos casos (15,1%), seguida da cidade de Coari (6,9%), dentre todos os municípios do Amazonas (Ministério da Saúde/FVS, 2010). O êxito da redução de pacientes pode ser atribuído a uma série de fatores, dentre os quais: maior investimento de recursos pelo governo, melhora no tratamento da malária por *P. falciparum*, aprimoramento do trabalho intersetorial e interinstitucional, capacitação dos profissionais de saúde, entre outros. (Ministério da Saúde/FVS, 2009).

Apesar da redução, em nosso país o quadro epidemiológico da malária é preocupante. Anualmente, cerca de 99,5% dos casos são registrados na Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Figura 2), e desses, cerca de 90% são causados por *P. vivax* (Ministério da Saúde/FVS, 2009).



**Figura 2** - Mapa do Brasil destacando as áreas de risco para malária pelos diferentes níveis de incidência parasitária anual (Ministério da Saúde/FVS, 2009).

Em 2009, de 306.908 casos ocorridos no país, 306.342 foram registrados na região amazônica, sendo 98.869 no Estado do Amazonas. De acordo com Tadei et al. (1993), isso ocorre, principalmente, devido à construção de grandes empreendimentos, conseqüentemente, causados por desmatamentos, o que provoca desequilíbrio ambiental, afetando assim a interação entre as espécies co-relacionadas.

Considerando a situação epidemiológica da malária no Brasil e no mundo, nota-se a necessidade de maior entendimento da biologia e genética dos vetores dessa doença, já que novos métodos moleculares têm auxiliado a encontrar respostas sobre essa problemática, tal como o uso dos marcadores moleculares microssatélites.

### 1.3. MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são locos gênicos que apresentam variabilidade e podem ser utilizados para detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos, duas ou mais populações. Podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo oriundo de um gene expresso ou locos presentes na molécula de DNA (Avisé, 2004). Foi a partir da década de 80, que os marcadores moleculares tornaram-se mais úteis para a estimativa da variabilidade genética dos organismos.

Existem vários tipos de marcadores moleculares e sua classificação pode ser feita a partir da metodologia utilizada, por hibridização ou amplificação do DNA, como: Isoenzimas, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), Minissatélites e Microsatélite - SSR (*Simple Sequence Repeats*). Entre eles, os microsatélites têm sido os mais utilizados por ser a classe de marcadores molecular mais polimórfica e eficiente quanto à estimativa da variabilidade genética das populações dos organismos (Schlotterer, 2004). Mesmo assim, estes marcadores ainda não foram utilizados em *A. triannulatus*, considerando que poucos estudos genéticos têm sido realizados nesta espécie, procurando elucidar esses problemas taxonômicos e conhecer a estrutura genética de populações desse Complexo (Santos et al., 1992; Santos et al., 2003; Santos et al., 2004; Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira, 2006).

#### 1.4. MICROSSATÉLITES

Marcadores Moleculares Microsatélites, também são conhecidos como Seqüências Simples Repetidas (SSR), *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), *Sequence Tagged Microsatellites* (STMS) ou *Single Sequence Length Polymorphisms* (SSLP). São regiões repetitivas do DNA, compostas de um a seis nucleotídeos, repetidas em *tandem*, distribuídas com freqüência pelo genoma nuclear de organismos (Avisé, 2004).

A partir da década de 90, tem sido o marcador molecular mais utilizado em estudos ecológicos e genéticos (Goldstein e Schlotterer, 1999; Schlotterer, 2004). Apresentam altos níveis de polimorfismo, são seletivamente neutros e com expressão codominante, ou seja, indivíduos homozigotos e heterozigotos podem ser identificados. São multialélicos, no qual um loco pode apresentar vários alelos diferentes, o que os torna a classe de marcadores moleculares mais polimórficos atualmente, devido à alta taxa de mutação, variando entre  $10^{-2}$  e  $10^{-6}$  nucleotídeos por loco e por geração (Estoup et al., 1995; Lanzaro et al., 1995; Schlotterer, 2000).

De acordo com Strand et al. (1993), diversos mecanismos têm sido sugeridos para explicar como essas regiões altamente repetitivas surgem no genoma com altos níveis de mutação, tais como: retrotransposons, erros durante a recombinação com o *crossing over* desigual, escorregões durante a replicação (*slippage*) e reparo do DNA. Segundo Nadir et al. (1996), os microsatélites podem estar associados com retrotransposons, quando a seqüência SSRs rica em adenina é gerada pela extensão terminal 3 dos retrotranscritos. Estes, por sua vez, são distribuídos no genoma e fazem autocópias e reinserção própria em locais aleatórios, podendo assim, formar um novo alelo com repetições diferentes. O

*crossing-over* desigual ocorre durante um erro no pareamento de cromossomos homólogos, causando mudanças drásticas, como perda ou ganho de um grande número de repetições (Levinson e Gutman, 1987). O erro durante a replicação é resultante de um escorregão da DNA Polimerase durante a replicação, o que pode levar a separação das fitas de DNA rapidamente, e em seguida, unidas em posição diferente, levando a erros no pareamento e alongamento, gerando alelos com números de repetições diferentes. Altas taxas de *slippage* explicam o surgimento de pequenas variações no número de repetições entre os alelos em um loco (Schlotterer e Tautz, 1992).

Segundo Weber (1990) e Goldsten e Schlotterer (1999), estes marcadores são classificados de duas formas, de acordo com a natureza das repetições dos microssatélites: perfeitos, não apresentam nenhuma interrupção na seqüência (TATATATATATA); imperfeitos, apresentam um par de nucleotídeos diferentes no meio da seqüência (TATATACTATATA); interrompidos, apresentam uma pequena seqüência no meio da seqüência repetitiva (TATATACGTGTTATATA), enquanto que, os microssatélites compostos apresentam duas seqüências diferentes (TATATAGTGTGT).

O outro método de classificação é conforme os motivos de repetição presentes nos microssatélites, podendo ser: mononucleotídeos, com apenas um tipo de nucleotídeo na seqüência (AAAAAAAAA); dinucleotídeos, que possuem dois tipos de nucleotídeos (ATATATATATAT); trinucleotídeos, com três tipos de nucleotídeos (ATCATCATCATC) e, os tetranucleotídeos, que apresentam quatro tipos de nucleotídeos diferentes na seqüência repetitiva dos microssatélites (ATCGATCGATCG) (Hamada et al., 1984).

Os microssatélites, nas últimas décadas, têm sido extremamente aplicados em estudos moleculares, nos diversos ramos da genética, incluindo genética de conservação, genética de populações, testes de paternidade e mapas genéticos de diversos organismos (Jarne e Lagoda, 1996; Schlotterer, 2000; Knapik et al., 1998). Apresentam inúmeras vantagens em sua aplicabilidade, como uma ferramenta eficiente em estudos moleculares, que permite a amplificação da mesma seqüência desejada, utilizando *primers* específicos, que flanqueiam estas regiões, por meio da técnica de PCR (Mullins, 1990); a transferibilidade de *primers* entre espécies geneticamente próximas e genotipagem dos alelos com sistema *multiplex* utilizando *primers* marcados com fluorescência em analisador automático ou gel de poliacrilamida.

**CAPÍTULO I - MARCADORES DE DNA MICROSSATÉLITE DE  
*Anopheles triannulatus sensu lato* (DIPTERA: CULICIDAE):  
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO  
INTERESPECÍFICA**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA

Os microssatélites têm sido uma das ferramentas mais utilizadas em estudos genéticos, como: hibridização, análise de paternidade, estimativa de diversidade genética e fluxo gênico, taxa de cruzamento, construção de mapas genéticos e estrutura genética populacional.

Sendo assim, para a obtenção de sequências microssatélites do genoma total de um organismo, é necessária a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com regiões repetitivas. Essa técnica é bastante eficiente e envolve a utilização da engenharia genética com base na clonagem, transformação, cultura de bactérias e seqüenciamento de DNA.

Tendo em vista a importância epidemiológica de *A. triannulatus* e nenhum registro encontrado na literatura com a utilização desses marcadores, foi necessário construir uma biblioteca genômica para a obtenção de locos microssatélites polimórficos, para serem utilizados em estudos de genética de populações.

### 1.2. MARCADORES MICROSSATÉLITES EM *Anopheles sp.*

Considerando a eficiência dos microssatélites em estudos de genética de populações, diversos locos já foram isolados e caracterizados para diferentes espécies do gênero *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, tais como: *Aedes aegypti* (Huber et al., 2001; Slotman et al, 2007) e *Aedes albopictus* (Porretta et al., 2006), *Aedes poplynesiensis* (Belbahani et al, 2004), *Culex pipiens* (Keyghobadi et al, 2004) e *Culex pipiens quinquefasciatus* (Fonseca, et al., 1998). Dentre os anofelinos, também já foram isolados locos microssatélites para 14 espécies (Tabela 1).

**Tabela 1** – Locos microssatélites desenvolvidos para *Anopheles* sp.

Espécie	Nº de Locos	Nº de Alelos	H <sub>o</sub>	Autor
<i>Anopheles gambiae</i>	11	3 – 13	0,732	LANZARO et al (1995)
<i>Anopheles maculatus</i>	4	8 – 12	0,25 – 0,54	RONGNOPARUT et al (1996)
<i>A. gambiae</i>	24	7 – 14	-	WANG et al (1999)
<i>Anopheles funestus</i>	9	5 – 11	0,62 - 0,84	SHARAKHOV et al (2001)
<i>Anopheles darlingi</i>	8	7 – 44	0,36 – 0,76	CONN et al (2001)
<i>A. funestus</i>	18	5 – 15	0,13 – 0,85	COHUET et al (2002)
<i>Anopheles stephensis</i>	16	3 – 13	0,50 – 0,95	VERARDI et al (2002)
<i>Anopheles flavirostris</i>	11	2 – 16	0,14 – 0,77	TORRES et al (2002)
<i>Anopheles maculipennis</i>	15	2 – 8	0,37 – 0,77	WEILL et al (2003)
<i>Anopheles moucheti</i>	17	4 – 16	0,43 – 0,87	ANNAN (2003)
<i>Anopheles nili</i>	11	9 – 28	0,58 – 0,96	BERTHOMEU et al (2003)
<i>Anopheles sacharovi</i>	15	5 – 17	0,30 – 0,92	GUILLEMIN et al (2003)
<i>A. funestus</i>	9	5 – 11	0,77 – 0,78	SCHERHORN et al (2003)
<i>Anopheles culicifacies</i>	31	2 – 12	0,04 – 0,60	SUNIL et al (2004)
<i>Anopheles albimanus</i>	4	4 – 19	0,33 – 0,90	MOLINA-CRUZ et al (2004)
<i>Anopheles marajoara</i>	11	11 - 52	0,64 – 0,95	LI et al (2005)
<i>Anopheles sinensis</i>	11	4 – 13	0,30 – 0,89	JUNG et al (2006)
<i>A. darlingi</i>	24	4 – 11	0,04 - 0,83	LIMA et al (2010)

- = valores não citados pelos autores.

A primeira biblioteca construída para o isolamento de locos microssatélites foi para *A. gambiae* (Lanzaro et al., 1995), com o objetivo de obter um mapa genético para estudos cromossômicos. Inicialmente, isolaram 11 locos a partir do cromossomo X, e posteriormente, esses mesmos autores isolaram mais 24 locos microssatélites.

Para *A. culicifacies*, foram isolados por Sunil et al. (2004) 31 locos microssatélites para um Complexo de cinco espécies crípticas, das quais quatro são vetoras da malária no subcontinente indiano. A variabilidade de cada loco foi avaliada em duas espécies irmãs de *A. culicifacies*, espécie A e B, encontradas em simpatria. A frequência do número de alelos variou de 2 a 12 na espécie A e de 2 a 7 na espécie B. A heterozigotidade observada (H<sub>o</sub>) variou entre 0,04 - 0,60 nas duas espécies. Foi detectada deficiência de heterozigotos devido à presença de alelos nulos.



O isolamento de marcadores microssatélites para *A. darlingi*, principal vetor da malária no Brasil, foi primeiramente realizado por Conn et al. (2001), que isolaram oito locos polimórficos a partir de amostras procedentes de Capanema (PA). A heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) variou de 0,368 a 0,769. Posteriormente, Lima et al. (2010), isolaram 24 locos para esta mesma espécie, utilizando mosquitos procedentes de Coari (AM), nos quais, a heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) variou de 0,037 a 0,833.

Li et al. (2005) isolaram 11 locos para *A. marajoara* (Complexo *Albitarsis*), principal vetor da malária no noroeste da Amazônia e considerado vetor secundário nos demais estados do Brasil. O número de alelos variou de 11 a 52 e a heterozigosidade observada de 0,64 a 0,95.

*A. maculipennis* (Weill et al. 2003) é um complexo de espécies que inclui os mais importantes vetores da malária no Paleártico Ocidental. Neste Complexo foram isolados 15 locos, dentre eles, três revelaram a presença de alelos nulos e 12 mostraram-se bons candidatos para estudos populacionais, com alelos variando de 2 a 8. Um membro deste Complexo é *A. sacharovi* (Guillemin et al. 2003), transmissora da malária no Oriente Médio. Também foram isolados 15 locos para esta espécie com  $H_o$  variando de 0,30 a 0,92. Destes, sete locos exibiram frequência significativa de alelos nulos e oito foram caracterizados como bons marcadores para estudos genéticos.

### 1.3. AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA EM LOCOS MICROSSATÉLITES

Apesar dos marcadores microssatélites serem considerados *primers* específicos para a espécie pela qual foram isoladas, a amplificação heteróloga, transferibilidade ou amplificação interespecífica é uma técnica muito utilizada, que permite a amplificação desses marcadores, desenvolvidos para uma espécie em outras espécies geneticamente relacionadas.

A amplificação heteróloga já foi realizada para diversos outros organismos, tais como: *Brachyplatystoma rousseauxii* - bagre migrador (Batista et al., 2009), cujos locos foram testados em seis espécies do mesmo gênero; *Hibiscus rosa-sinensis* - uma espécie botânica (Bruna et al., 2009), com os locos analisados em 12 espécies do mesmo gênero; *Natrix natrix* - serpente (Hille et al., 2002), cujos locos foram amplificados em outras duas espécies do mesmo gênero.

No entanto, em Culicídeos somente Lima et al. (2010) realizaram a amplificação heteróloga em três espécies de *Anopheles* do mesmo subgênero, *A. triannulatus*, *Anopheles rangeli* e *Anopheles benarrochi*, utilizando 24 locos desenvolvidos para *A. darlingi*. Nesse estudo, os autores conseguiram amplificar oito locos nas três espécies e 17 em pelo menos, uma delas. Em *A. triannulatus* foram amplificados 13 locos.

Diante disso, os locos microssatélites isolados para *A. triannulatus* foram testados em quatro espécies: *A. darlingi*, *A. rangeli*, *A. benarrochi* e *A. oswaldoi*, escolhidas por pertencerem ao mesmo grupo taxonômico, subgênero *Nyssshrynchus* e seção *Albimanus* (Forattini, 2002).

*A. darlingi* é considerada a principal vetora da malária humana no Brasil, especialmente, na região amazônica (Deane et al., 1948), por ser a espécie mais antropofílica e endofágica dentre as outras espécies de *Anopheles* nas Américas (Arruda et al., 1986; Forattini, 2003).

*A. oswaldoi* é um complexo de espécies crípticas e é amplamente distribuído em todos os países da América do Sul ao leste dos Andes e até o Norte da Argentina e do Uruguai. Está presente também no Panamá, Costa Rica e Trinidad (Faran, 1980). Foi apontado como um importante vetor da malária no estado do Acre, Brasil e Peru (Benarrochi et al., 1931).

*A. benarrochi* tem distribuição limitada na América do Sul, no leste dos Andes, algumas regiões da Colômbia e localidades do alto Amazonas, no Brasil (Rondônia, Acre, Amazonas) e Peru. É predominantemente zoofílica e, portanto, não tem grande importância na transmissão da malária (Faran, 1980). Por outro lado, na Colômbia, foi relatada como uma possível vetora dominante no oeste do Peru (Forattini et al., 2002).

*A. rangeli* está distribuída pela região norte da América do Sul, compreendendo a Colômbia, o Equador, a Venezuela e a Guiana Inglesa. No Brasil, encontra-se no Amazonas, Rio Branco, Acre e Rondônia. Suspeita-se que possa ser dotada de algum papel na transmissão da malária no Equador (Forattini et al., 2002).

## 2. OBJETIVO GERAL

### 2.1 GERAL

Isolar e caracterizar marcadores moleculares microssatélites para *A. triannulatus* através de uma biblioteca genômica enriquecida.

#### 2.1. ESPECÍFICOS

- Ligar e clonar em bactérias competentes os fragmentos de DNA com SSR;
- Obter sequências nucleotídicas dos clones recombinantes;
- Caracterizar a biblioteca genômica;
- Desenhar *primers* a partir das seqüências nucleotídicas dos clones que possuem regiões repetitivas;
- Testar os locos microssatélites para *A. triannulatus* e verificar os locos polimórficos que possam ser utilizados como marcadores em estudo de genética de populações;
- Testar por meio de amplificação heteróloga os locos microssatélites desenvolvidos para *A. triannulatus* em quatro espécies de *Anopheles* do mesmo subgênero (*A. benarrochi*, *A. rangeli*, *A. oswaldoi* e *A. darlingi*).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. OBTENÇÃO DOS MOSQUITOS

Larvas e pupas de *A. triannulatus* foram coletadas no bairro Puraquequara, em Manaus (AM) e transferidas para o Laboratório de Vetores de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foram triadas, colocadas em recipientes esmaltados e alimentadas com ração de farinha de peixe e pó de fígado (Santos et al., 1981) até a emergência dos adultos.

Os mosquitos recém emergidos não foram alimentados para a garantia de que a biblioteca genômica fosse construída somente com o material genético de *A. triannulatus*, já que a ração fornecida para os mosquitos em desenvolvimento produz uma camada de microorganismos na superfície da água. Estes servem de alimento para as larvas e, conseqüentemente, alojam-se em seu tubo digestivo.

Os espécimes foram identificados, segundo a chave entomológica de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) e congelados em *freezer* -80° C para as posteriores análises moleculares.

### 3.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A extração de DNA de todos os indivíduos utilizados nas análises moleculares seguiu o protocolo de Wilkerson et al. (1995). Para a construção da biblioteca genômica foi utilizado um *pool* de 15 mosquitos adultos, homogeneizados individualmente, com auxílio de um pistilo, numa solução Tampão de Lise - TL (1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, pH 8.0, 25mM NaCl e água Milli-Q esterilizada) para obtenção das amostras. Foram incubadas a 65°C por 1 hora e adicionada RNase (10 mg/mL). Após centrifugação a 14000 rpm/30 segundos foi acrescentado acetato de potássio (3M) e centrifugado a 14000 rpm/10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA precipitado com etanol absoluto (100%) e centrifugado a 14000 rpm/10 min. O sobrenadante foi descartado e DNA

precipitado ressuspendido em 30 µl de TE (10mM Tris, 1mM EDTA). As amostras de DNA estoques foram armazenadas em -20 °C.

A concentração do DNA genômico foi determinada em eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% por comparação com a concentração conhecida do DNA do bacteriófago *lambda* e corante *Gel Red (Uniscience)* para a visualização em luz ultravioleta, num transluminador *Benchtop UV Transluminator Bio Doc – It Imaging System*.

### **3.3. CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA DE *Anopheles triannulatus***

A obtenção da biblioteca genômica enriquecida com regiões microssatélites foi obtida utilizando o protocolo de Billotte et al. (1999).

#### **3.3.1. DIGESTÃO DO DNA, LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES E AMPLIFICAÇÃO DO DNA**

A digestão do DNA genômico de *A. triannulatus* foi realizada com a enzima de restrição *RsaI* (10U/µl), que possui o sítio de restrição de corte coesivo (5')GT↓AC(3') e (3')CA↑TG(5'). A confirmação da restrição foi visualizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1,2% com corante *Gel Red (Uniscience)* e visualizado em luz ultravioleta, em transluminador. A estas sequências obtidas, foram acrescentados adaptadores *Rsa21* e *Rsa25* para formar fragmentos de DNA com sequências flanqueadoras conhecidas, com a mesma terminação. A reação foi catalisada pela enzima T4 DNA ligase:

*Rsa21*: 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3'

*Rsa25* 5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3'

A amplificação das sequências ocorreu através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e, em seguida, a verificação da reação foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%. A purificação foi realizada com o Kit "*Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System*" (Promega® cat. n° 49280).

### 3.3.2. SELEÇÃO DOS FRAGMENTOS CONTENDO MICROSSATÉLITES

O processo de enriquecimento da biblioteca foi realizado com a seleção de fragmentos contendo regiões com microssatélites por meio de hibridização. Neste processo foram utilizadas sondas complementares (CT)<sub>8</sub> e (GT)<sub>8</sub> marcadas com biotina, que ligaram-se a esferas magnéticas recobertas por estreptavidina. A hibridização forma uma ligação estável, que ocorre devido à grande afinidade que as proteínas (biotina e estreptavidina) possuem, permitindo que as sondas ligadas às esferas magnéticas (*beads*) unam-se aos fragmentos de DNA de interesse.

Após a hibridização, várias lavagens foram realizadas para a remoção dos fragmentos de DNA não específicos. Em seguida, o DNA foi eluído em água ultra pura. Os fragmentos selecionados foram amplificados através de uma reação de PCR.

### 3.3.3. TRANSFORMAÇÃO E CLONAGEM

Os fragmentos selecionados ricos em repetições de *A. triannulatus* foram inseridos em vetores de clonagem molecular, os plasmídeos (pGEM-T). Estes são pequenas moléculas de DNA de fita dupla, circular, contendo elementos necessários para sua replicação e pelo menos um gene que confere resistência a antibióticos, capaz de copiar centenas de vezes a informação genética.

Esta etapa foi realizada através de um processo conhecido como transformação por eletroporação. Para isso, uma reação contendo os fragmentos selecionados de *A. triannulatus* e o plasmídeo (pGEM-T) foi incubada em termociclador a 4°C *over night*. Em seguida, realizou-se a transformação em eletroporador, em meio SOC, no qual se caracteriza pela incorporação do DNA recombinante em bactérias hospedeiras eletrocompetentes (linhagem TOPO 10 - Invitrogen®) através de choque elétrico que as tornam temporariamente suscetíveis a entrada de pequenas moléculas de DNA.

As moléculas recombinantes foram incubadas por uma hora a 37 °C em *termomixer* e foram inoculadas em placas de *petri* com meio *Circle Grow* sólido contendo ampicilina (100µg/ml), IPTG (*isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*) e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside). Estes reagentes são utilizados para a formação de colônias brancas, quando contêm o inserto (DNA recombinante) e, colônias azuis, quando não apresentam insertos. Isto ocorre porque o plasmídeo normalmente possui um gene que codifica o segmento amino-terminal da β-galactosidase, quando submetidas à indução por IPTG, formando as colônias azuis. As bactérias que apresentam insertos inativam o

fragmento aminoterminal da  $\beta$ -galactosidase do plasmídeo, conseqüentemente, geram colônias brancas.

### **3.4. MANUTENÇÃO, AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS CLONADOS E EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL**

As colônias brancas obtidas após o crescimento foram repicadas com a ajuda de palitos estéreis, colocadas individualmente em placas de ELISA contendo meio LB líquido e ampicilina (100 $\mu$ g/mL) e deixadas para crescer *overnight* a 37°C. Em seguida, foram colocadas em freezer - 20°C por 30 minutos e então armazenadas em freezer - 80°C.

O passo seguinte foi a extração do DNA plasmidial (NaOH 4M, KoAc 3M, Etanol 70%) dos clones, também conhecido como *mini prep*, seguindo a metodologia de Sambrook e Roussel (2001), a fim de isolar o DNA do plasmídeo das colônias recombinantes. Após a extração, foi realizada a amplificação por PCR utilizando *primers* universais M13 *Reverse* e *Foward* (5 $\mu$ M) e a confirmação por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

### **3.5. SEQUÊNCIAMENTO NUCLEOTÍDICO DOS FRAGMENTOS ISOLADOS**

A reação de sequenciamento foi realizada em duas placas, sendo uma com o *primer Reverse* e outra com o *primer Foward*. Utilizou-se o Kit de sequenciamento *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1 (Applied Biosystems®)* e os *primers* universais internos SP6-R e T7-F (5 $\mu$ M), com a seguinte ciclagem: 96°C por 2 minutos, 39 ciclos de 96°C por 30 segundos para desnaturação, 50°C em 20 segundos para o anelamento dos *primers*, e 60°C em 4 minutos para extensão.

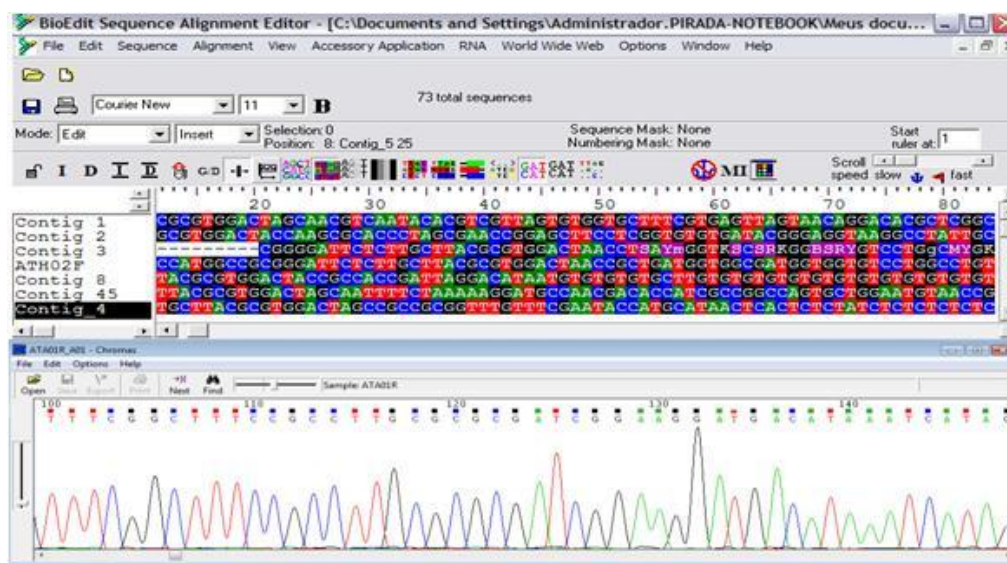
A precipitação da reação de sequenciamento foi realizada com isopropanol 65% e etanol 60%, e a reação ressuspensa em formamida *Hi-Di (Applied Biosystems®)*. O sequenciamento foi realizado no analisador automático ABI 3130.

### **3.6. IDENTIFICAÇÃO DAS REGIÕES COM MICROSSATÉLITES**

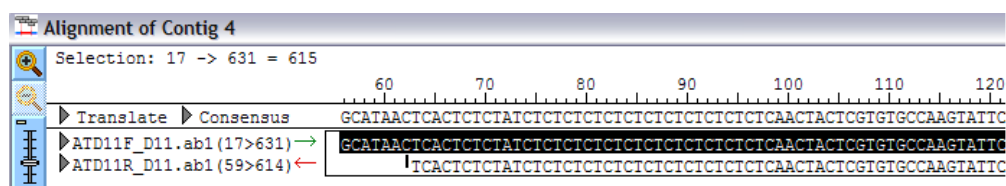
As sequências obtidas pelo sequenciamento foram analisadas, conferidas e editadas com o auxílio dos programas *CHROMAS 2.23* e *BIOEDIT 7.0.9.0* (Hall, 1999) para

verificação da qualidade e a presença de microssatélites. No programa *BIOEDIT* 7.0.9.0, as sequências de DNA do vetor de clonagem e dos adaptadores foram retiradas e realizadas a edição de nucleotídeos com códigos de ambiguidade (Figura 3).

Com o auxílio do programa *SEQMAN* (Figura 4), as sequências foram organizadas para a formação dos *contigs* (sequências consenso), que é a união das sequências *Reverse* e *Foward*.



**Figura 3** – Edição e alinhamento das sequências de *Anopheles triannulatus* nos programas *CHROMAS* 2.23 e *BIOEDIT* 7.0.9.0 (HALL, 1999).



**Figura 4** – Formação dos *contigs*, sequência consenso de *Anopheles triannulatus*, com o auxílio do programa *SEQMAN*.



### 3.7. CARACTERIZAÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA E DESENHO DOS LOCOS MICROSSATÉLIES (*PRIMERS*) DE *Anopheles triannulatus*

As sequências contendo regiões repetitivas de boa qualidade foram selecionadas para serem utilizadas na caracterização da biblioteca genômica e no desenho dos *primers*, realizados no programa *WEBSAT* (Martins et al, 2009), como mostra a figura 5.

**WebSat**  
Find microsatellites and design primers

Primer Size Min:  Opt:  Max:   
 Primer Tm Min:  Opt:  Max:   
 Primer GC% Min:  Max:   
 Product Size:   
 Max Tm Difference:  Max 3' Stability:   
 Max Self Compl:  Max #N's:   
 Max 3' Self Compl:  Max Poly-X:

Click on SSRs to design primers Save all primers designed in this session to a CSV file

SSR  
  Primer  
  Selected Primer  
  Overlaped SSR

>CONTIG\_8

```

1 ATCACGGTTT GGTAGAAAAC GATTTTTTTC TTATAATITC TATCTATCCT CGTGAGAGGG CCGACTGGTT
71 GGCTGGCAAT GGCTGCCCAA CGCAAACTG GTCAATACGA ATCGTTTACC GCTATGCTTA AGCTAGAAAT
141 AAAATATTGAA CACTTAGAGC AACGCTACAT GCACGGCGGA CTACACCTGG CTTTCTTAAT CGATACCGTG
211 GAACCAACCAC TGTCGGCTCTA TCACCCTACC CCTCTATATA GCTTGTGCAG AGCATTAAAC ACACACACAC
281 ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACAAACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC
351 ACACACATAT ACGCGGCGCTC ACAATATAT CTCCACACAC ACACGCATGA CACCCAGACC GCAAGAGGTC
421 AGAGTCCGCT GGGCGTCCCTC CGGGCCACTC ATGATTTGGG CGAACTTCTC TCATTTTAAG CTAGTCAAAG
491 AACAGAAATA CCATTGATGA TGTGACTCAG GATCGACAAG CGATGTTGGT CATAAGGACT AGGACTGTGG
561 GTGGCCCTGG TGGAGGGTAT GGTGACACAT TCCTGAAACT AAGGCAACA TACAAAATA AAACACTTTT
631 CCTCTGCCCT CTGCATCTAG TCAAGCATGT TGTGTGGAAG AGATAGGCGA GAAGGCTAGG CTGCTCAGAG
701 GACTCGGCTA TATTTGGACT CAAGCCTATA GTGACACAAA GAAGTTACTC CACCCCTAAG CAAGA
  
```

**Figura 5** - Caracterização da biblioteca genômica e desenho dos *primers* de *Anopheles triannulatus* pelo programa *WEBSAT* (Martins et al, 2009).

A caracterização da biblioteca genômica seguiu as seguintes estimativas: número de clones com microssatélites; número total de microssatélites presentes na biblioteca; número de microssatélites, considerando o motivo e a natureza das repetições; a densidade estimada de microssatélites encontrados no genoma de *A. triannulatus*; a redundância das sequências e o número de microssatélites selecionados para o desenho de *primers*.

Alguns critérios foram utilizados para a consideração das sequências nucleotídicas com microssatélites, tais como: um mínimo de seis repetições para o motivo de repetição do tipo dinucleotídeo; mínimo de cinco repetições para o tipo trinucleotídeo; mínimo de quatro repetições para o tipo tetranucleotídeo, e mínimo de três repetições para microssatélites do tipo hexanucleotídeo.

Os *primers* foram desenhados, utilizando os seguintes parâmetros: tamanho entre 18 e 23 pb; temperatura de anelamento entre 55 a 65°C, conteúdo de guanina-citosina (GC) de

50 a 80%, fragmentos entre 100 a 350 pb de tamanho e o mínimo de 3°C de diferença entre a temperatura de anelamento dos *primers forward* e *reverse*.

Os *primers forward* foram sintetizados com uma seqüência nucleotídica universal (calda M13) com fluorescência (HEX e FAM) na extremidade 5' (Schuelke, 2000).

### **3.8. TESTE E CARACERIZAÇÃO DOS LOCOS MICROSSATÉLITES DE *Anopheles triannulatus***

Os *primers* (locos) sintetizados foram testados, utilizando-se a temperatura de anelamento de 60°C.

Os locos amplificados foram utilizados em uma nova PCR com quatro indivíduos de *A. triannulatus* da população de Puraquequara e genotipados, segundo o protocolo de Schuelke (2000), a fim de verificar o padrão de alelos (presença de ruídos e *stutters*).

Os locos não amplificados a 60°C foram submetidos a gradientes de temperatura por meio de PCR entre 52 °C e 68°C, com a finalidade de verificar qual a melhor temperatura de pareamento dos *primers*. Com a temperatura de anelamento definida para os locos, estes também foram amplificados com quatro indivíduos de *A. triannulatus* da população de Puraquequara e genotipados.

As reações de amplificação foram realizadas com 40 indivíduos de *A. triannulatus*, com um volume final de 10µL, na qual se utilizou água Milli-Q; 2 µL de dNTP (1 mM), 1 µL de tampão (10X) da enzima Taq DNA Polimerase, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0,4 µL do *primer* marcado M13F (0,4 µM) universal com fluorescência FAM ou HEX; 0,8 µL do *primer Forward*; (0,4 µM) do *primer Reverse*; 1 Unidade de Taq DNA Polimerase, e aproximadamente 10 ng do DNA genômico de cada indivíduo de *A. triannulatus*.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial com 68°C por 2 minutos e 92°C por 30 segundos; a amplificação dos *primers* foi composta por 30 ciclos (92°C por 30 segundos; a respectiva temperatura de anelamento dos *primers* por 35 segundos; 68°C por 35 segundos) e o pareamento do *primer* M13F universal, marcado com fluorescência FAM ou HEX, aos fragmentos microsatélites composto por 20 ciclos (92°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos). Por fim, a extensão a 72°C por 15 minutos e 68°C por 15 minutos.

O resultado da reação foi visualizado em gel de agarose 1,5% e o tamanho do fragmento amplificado estimado por comparação ao marcador *Ladder 1kb Plus (Invitrogen®)*.

Os produtos amplificados foram genotipados por eletroforese capilar no analisador automático de DNA MegaBACE 1000 (*GE Healthcare*) do Laboratório Temático de Biologia Molecular – LTBM/INPA, com a seguinte reação: 1,5 µl do produto de PCR (FAM e HEX) e 8 µl de solução de *Tween 20* a 0,1% + ET 550 (padrão de bandas marcadas com ET-ROX,

*GE Healthcare*<sup>®</sup>). Os resultados da genotipagem foram analisados com o auxílio do programa *FRAGMENT PROFILER v.2.2* (*GE Healthcare*<sup>®</sup>).

Os genótipos com o tamanho dos alelos de todos os indivíduos genotipados foram inseridos em uma planilha de dados para as análises e estimativas de parâmetros genéticos.

### 3.9. ANÁLISE E ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS GENÉTICOS

A matriz de dados gerada a partir dos genótipos obtidos pela genotipagem foi analisada no programa *MSTOOLS* (Park, 2001), onde foram verificados os parâmetros de diversidade genética como: o número total de alelos (A) e suas frequências, a heterozigidade esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ) e o Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC). A presença de alelos nulos foi analisada com o programa *MICROCHECKER 2.2.3* (Van Oosterhout et al., 2004).

O programa *FSTAT 2.9.3.2* (Goudet, 2002) foi usado para estimar o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para cada loco e verificar se os locos encontravam-se em desequilíbrio de ligação.

O equilíbrio de Hard-Weinberg (EHW) foi calculado no programa *GENEPOP v4* (Raymond e Rousset, 1995), e os níveis de significância foram ajustados através da correção sequencial de Bonferroni ( $P: 0,05/15 \leq 0,003$ ) (Rice, 1989).

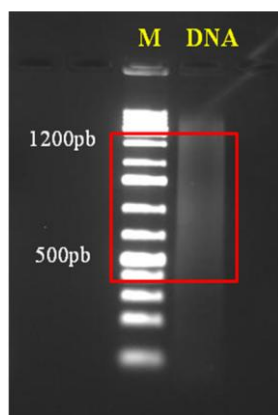
### 3.10. AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA DE LOCOS MICROSSATÉLITES DE *Anopheles triannulatus*

Os 15 *primers* caracterizados para *A. triannulatus* foram testados em quatro indivíduos de quatro espécies de *Anopheles* (*A. oswaldoi*, *A. nuneztovari*, *A. benarrochi* e *A. darlingi*). Para a reação de PCR foram utilizados os mesmos parâmetros de reagentes e de ciclagem no termociclador. O produto de PCR foi visualizado em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, comparado com marcador *Ladder 1Kb Plus*.

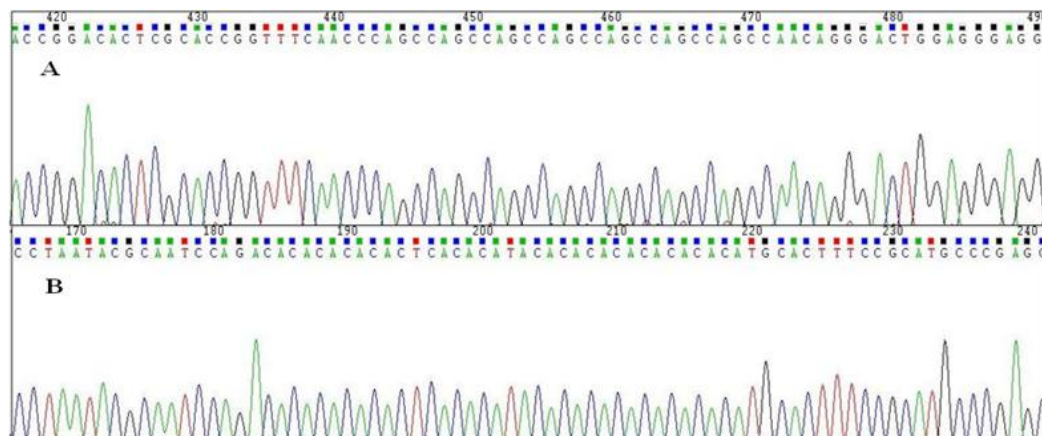
## 4. RESULTADOS

### 4.1. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA COM LOCOS MICROSSATÉLITES

Na digestão com a enzima *RsaI*, o DNA genômico gerou fragmentos de DNA entre 500 e 1200 pb (Figura 6). A partir de 96 clones contendo insertos, foram obtidas 84 sequências de boa qualidade distribuídos em 76 clones, dentre elas, 83 continham microssatélites (Figura 7). A partir dessas sequências, foram gerados 75 *contigs*, sendo dois redundantes e 72 *contigs* com microssatélites. A redundância da biblioteca foi estimada em 1,31%.



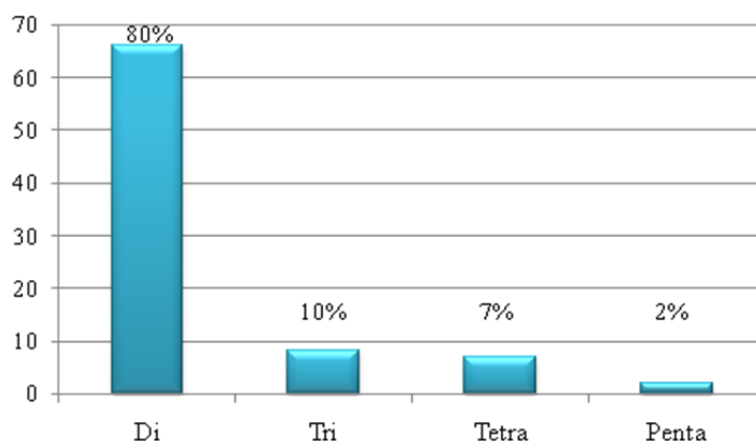
**Figura 6** – Produto de clivagem do DNA de *Anopheles triannulatus* utilizando enzima de restrição *RsaI*. Em destaque a faixa de digestão (entre 500 e 1200 pb). M = Marcador *Ladder 1 Kb Plus*.



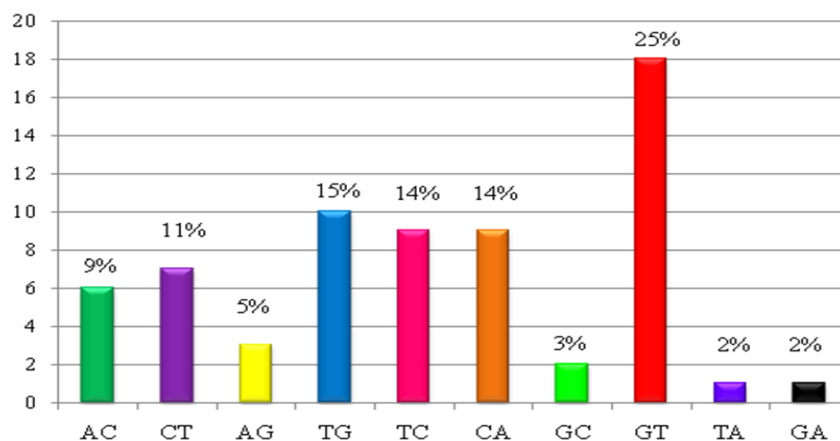
**Figura 7** – Eletroferograma das seqüências de dois locos microssatélites isolados para *Anopheles triannulatus*. A = Microssatélite Tetranucleotídico Perfeito (CCAG)<sub>7</sub> B = Microssatélite Dinucleotídico Imperfeito (AC)<sub>6</sub>t(AC)<sub>3</sub>t(AC)<sub>8</sub>.

#### 4.2. CARACTERIZAÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA DE *Anopheles triannulatus*

Na caracterização dos microssatélites isolados a partir da biblioteca genômica dessa espécie foram encontrados microssatélites conforme o número de nucleotídeos seguintes: 66 (80%) dinucleotídeos, oito (10%) trinucleotídeos, sete (8%) tetranucleotídeos e dois (2%) pentanucleotídeos (Figura 8). O motivo de repetição mais frequente encontrado nos microssatélites foi do tipo (AC/GT = 18), seguido de (CA/TG = 10) e os menos frequentes foram (AT/TA = 1) e (TC/GA = 1) (Figura 9).

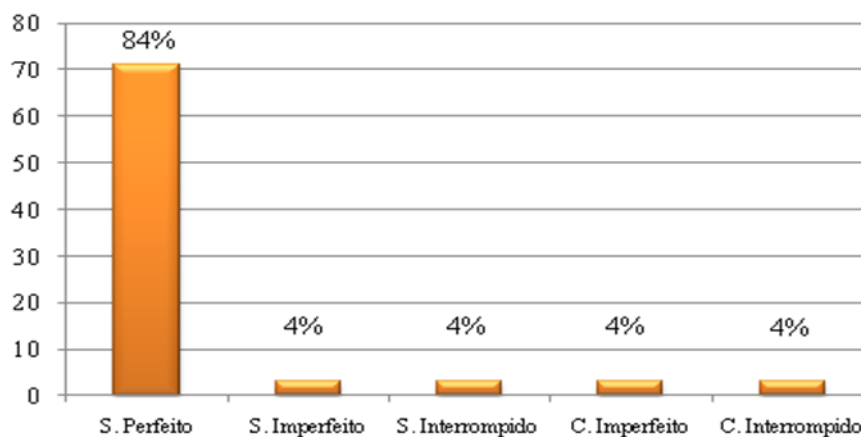


**Figura 8** – Caracterização dos microssatélites de *Anopheles triannulatus* quanto ao número de nucleotídeos.



**Figura 9** – Motivo de repetição do tipo dinucleotídeo mais frequente encontrado na biblioteca genômica enriquecida de *Anopheles triannulatus*.

Em relação à natureza de repetições dos microsatélites, a figura 10 ilustra as proporções encontradas: 71 (84%) de simples perfeitos, três (4%) de simples imperfeitos, três (4%) de simples interrompidos, três (4%) de compostos imperfeitos e três (4%) de compostos interrompidos.



**Figura 10** – Caracterização dos microsatélites de *Anopheles triannulatus* quanto à natureza das repetições.

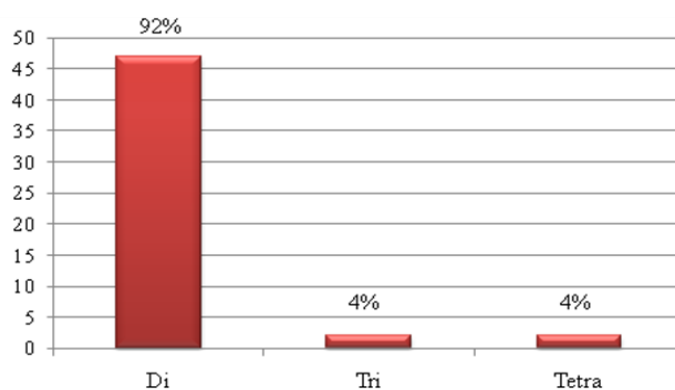
#### 4.3. DESENHO DOS *PRIMERS* E CARACTERIZAÇÃO DOS LOCOS MICROSATÉLITES DE *Anopheles triannulatus*

Foram desenhados 51 pares de *primers* flanqueadores de locos microsatélites para *A. triannulatus*, distribuídos em 50 *contigs*. Os locos foram nomeados como ATR01 a

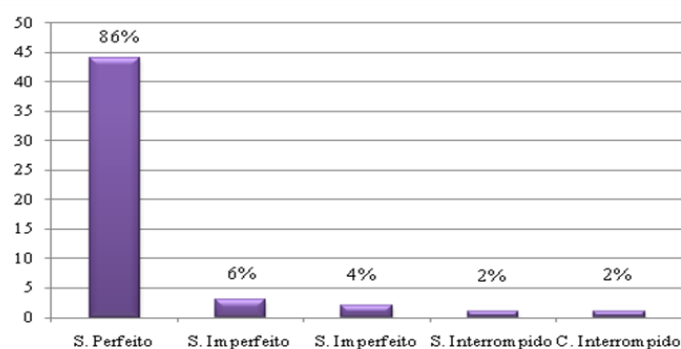
ATR51, selecionados com base nas regiões flanqueadoras dos microssatélites e avaliados quanto à eficiência de amplificação durante a padronização das condições de PCR.

A caracterização dos locos foi realizada segundo o número de nucleotídeos (Figura 11) como: 47 (92%) de dinucleotídeos, dois (4%) de trinucleotídeos e tetranucleotídeos. Não foi possível desenhar *primers* para SSR com cinco repetições (pentanucleotídeos), bem como para as outras 29 sequências microssatélites excluídas, devido à localização do microssatélite no *contig*.

Quanto à natureza de repetições (Figura 12): 44 (86%) de simples perfeitos, três (6%) de compostos interrompidos, dois (4%) de simples imperfeitos, um (2%) de simples imperfeitos e um (2%) de compostos interrompidos. O motivo de repetição mais frequente encontrado locos isolados foi do tipo (AC/GT = 9).



**Figura 11** – Caracterização dos locos (*primers*) microssatélites isolados para *Anopheles triannulatus* quanto ao número de nucleotídeos.



**Figura 12** – Caracterização dos locos (*primers*) microssatélites isolados para *Anopheles triannulatus* quanto à natureza das repetições.

Todos os 51 locos foram, primeiramente, testados com temperatura de anelamento a 60°C em reações em cadeia da Polimerase (PCR) e genotipados para a análise do padrão

dos alelos. Inicialmente, 22 locos amplificaram a 60°C, sendo que apenas cinco locos (*ATR04*, *ATR18*, *ATR19*, *ATR21* e *ATR34*) foram caracterizados com essa mesma temperatura de anelamento. Os demais foram submetidos a gradientes de temperatura entre 58 °C e 65 °C, para melhorar o padrão de genotipagem, junto com os locos que não demonstraram amplificação no primeiro momento. Na tabela 2, estão presentes os locos que amplificaram após a otimização das reações de amplificação.

**Tabela 2** – Temperatura de anelamento dos locos microssatélites de *Anopheles triannulatus* obtidos a partir da otimização das reações de amplificação.

Primer	Gradiente de Temperatura						
	60°C	59°C	62°C	63°C	64°C	65°C	66°C
<i>ATR04</i>	x	-	-	-	-	-	-
<i>ATR13</i>	-	-	-	x	-	-	-
<i>ATR18</i>	x	-	-	-	-	-	-
<i>ATR19</i>	x	-	-	-	-	-	-
<i>ATR21</i>	x	-	-	-	-	-	-
<i>ATR23</i>	-	-	-	x	-	-	-
<i>ATR24</i>	-	-	-	-	-	x	-
<i>ATR29</i>	-	-	-	-	-	x	-
<i>ATR30</i>	-	x	-	-	-	-	-
<i>ATR32</i>	-	x	-	-	-	-	-
<i>ATR34</i>	x	-	-	-	-	-	-
<i>ATR37</i>	-	x	-	-	-	-	-
<i>ATR39</i>	-	-	-	-	x	-	-
<i>ATR44</i>	-	-	-	-	-	x	-
<i>ATR48</i>	-	-	-	-	-	x	-
<i>ATR26</i>	-	-	-	-	-	x	-
<i>ATR42</i>	-	-	x	-	-	-	-
<i>ATR45</i>	-	-	x	-	-	-	-
<i>ATR50</i>	-	-	x	-	-	-	-
<i>ATR51</i>	-	-	x	-	-	-	-
<i>ATR38</i>	-	-	-	-	-	-	x
<i>ATR46</i>	-	-	-	-	x	-	-

x = locos que foram amplificados em PCR; - = locos não amplificados em PCR.

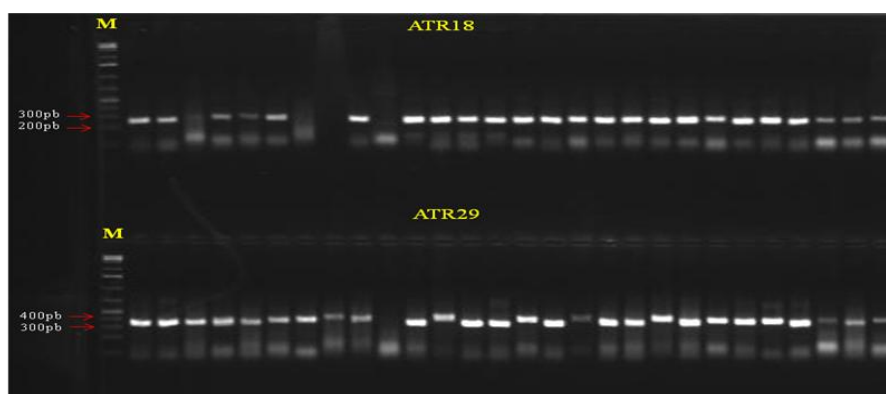


Foram caracterizados 15 locos microssatélites polimórficos para *A. triannulatus* (Tabela 3), com bom padrão de amplificação (Figura 13) e bom padrão de alelos (Figura 14). Uma média de 25 indivíduos, da população da Puraquequara, foram genotipados para todos os locos.

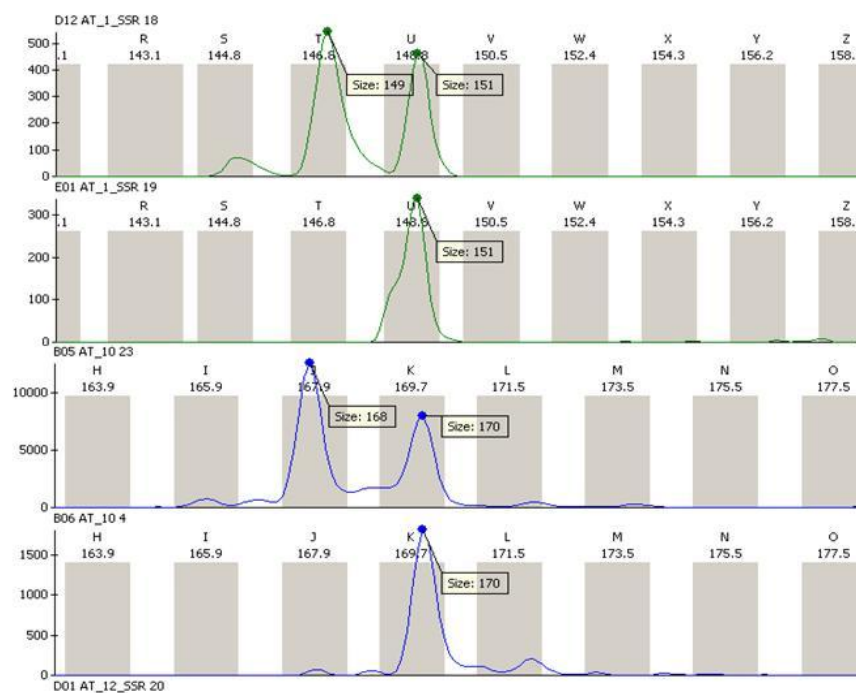
O número total de alelos foi 88, por loco variando de 3 a 10, sendo 6,0 a média de alelos por loco. A heterozigozidade observada ( $H_o$ ) variou entre 0,157 e 0,866 e a heterozigozidade esperada ( $H_e$ ) foi de 0,322 e 0,843. A média do Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) foi de 0.637, sendo o maior valor encontrado no loco 44 (0,789). O valor do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) foi de 0,039 para todos os locos.

A presença de alelos nulos foi sugerida para dois locos (*ATR13* e *ATR48*) dos 15 locos caracterizados. Isso é decorrente do número esperado de genótipos homozigotos ser maior que o número de genótipos homozigotos visualizados.

Quanto ao teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, nenhum loco apresentou-se fora do equilíbrio após a correção de Bonferroni ( $P \leq 0,003$ ) (Rice, 1989). Não foi observado desequilíbrio de ligação significativo entre os locos na população analisada ( $D= 0,000476$ ).



**Figura 13** – Perfil eletroforético do loco *ATR18* e *ATR29* de 28 indivíduos de *Anopheles triannulatus*, em gel de agarose a 1,5%. M = Marcador *Ladder* 1 Kb Plus.



**Figura 14** – Eletroferogramas das genotipagens ilustrando os genótipos heterozigotos e homozigotos dos locos *ATR19* (HEX = picos verdes) e *ATR04* (FAM = picos azuis) de *Anopheles triannulatus*.

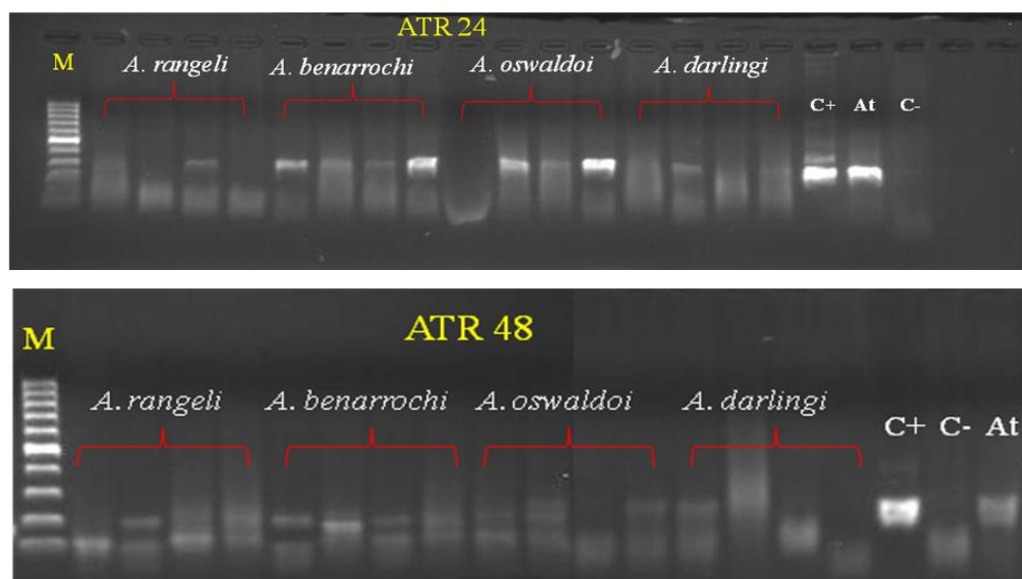
**Tabela 3** – Caracterização de 15 locos microssatélites polimórficos de *Anopheles triannulatus*, procedentes de Puraquequara, Manaus, Amazonas, Brasil.

Loco	Motivo de Repetição	Ta°C	A	Tamanho (pb)	PIC	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	P-WHE	F <sub>IS</sub>
ATR04	(AC)6	60	8	156 - 174	0,720	0,761	0,761	0,704	0,000
ATR13	(CT)13	63	10	207 - 229	0,768	0,521	0,810	0,015	0,362
ATR18	(GT)8	60	5	219 - 231	0,587	0,545	0,654	0,167	0,170
ATR19	(GT)6	60	5	141 - 151	0,513	0,708	0,592	0,603	-0,201
ATR21	(CTG)6	60	6	303 - 330	0,570	0,619	0,635	0,227	0,026
ATR23	(TG)7	63	6	290 - 306	0,673	0,681	0,734	0,755	0,074
ATR24	(TA)6	65	5	247 - 257	0,660	0,846	0,729	0,561	-0,168
ATR29	(CCAG)7	65	5	323 - 339	0,563	0,687	0,641	0,024	-0,075
ATR30	(CACG)4	59	5	223 - 243	0,644	0,722	0,712	0,334	-0,014
ATR32	(CA)8	59	6	155 - 165	0,557	0,583	0,620	0,552	0,061
ATR34	(CA)9	60	5	171 - 179	0,747	0,866	0,809	0,637	-0,074
ATR37	(TG)8	59	6	153 - 173	0,718	0,666	0,797	0,075	0,172
ATR39	(GA)19gc(GA)8	64	8	316 - 334	0,759	0,842	0,806	0,485	-0,045
ATR44	(CA)10	65	6	130 - 140	0,789	0,866	0,843	0,913	-0,028
ATR48	(AG)18	65	3	167 - 171	0,287	0,157	0,322	0,010	0,518

Ta°C = temperatura de anelamento. A = número de alelos; pb = estimativa da variação do tamanho dos alelos; PIC = Conteúdo de Polimorfismo Informativo; H<sub>O</sub> = heterozigidade observada; H<sub>E</sub> = heterozigidade esperada; P-WHE = Equilíbrio de Hardy-Weinberg; p<0,003 pela correção de Bonferroni; F<sub>IS</sub> = Coeficiente de Endogamia.

#### 4.4. AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA EM *Anopheles* sp.

Dos 15 locos de *A. triannulatus* utilizados na amplificação heteróloga nas quatro espécies de anofelinos (*A. oswaldoi*, *A. rangeli*, *A. benarrochi* e *A. darlingi*), quatro (*ATR13*, *ATR24*, *ATR37* e *ATR48*) mostraram-se como eficientes marcadores para todas as espécies. Os locos *ATR34*, *ATR04*, *ATR21* e *ATR39* amplificaram para, pelo menos, uma espécie (Tabela 4 e Figura 15).



**Figura 15** – Perfil eletroforético do loco *ATR24* e *ATR48* de quatro indivíduos de *Anopheles* sp., em gel de agarose a 1,5%. M = Marcador *Ladder* 1 Kb Plus. C+ = Controle Positivo (Miniprep); At = *Anopheles triannulatus*; C- = Controle Negativo.

**Tabela 4** – Amplificação heteróloga de 15 locos microssatélites isolados para *Anopheles triannulatus* em quatro espécies de *Anopheles*.

Primer	<i>A. darlingi</i>		<i>A. rangeli</i>		<i>A. oswaldoi</i>		<i>A. benarrochi</i>	
	Amplificação	N	Amplificação	N	Amplificação	N	Amplificação	N
<i>ATR04</i>	-	-	x	1	-	-	x	1
<i>ATR13</i>	x	4	x	4	x	4	x	4
<i>ATR18</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ATR19</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ATR21</i>	x	2	x	2	-	-	-	-
<i>ATR23</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ATR24</i>	x	1	x	1	x	3	x	4
<i>ATR29</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ATR30</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ATR32</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ATR34</i>	-	-	-	-	x	1	-	-
<i>ATR37</i>	x	4	x	4	x	4	x	4
<i>ATR39</i>	x	1	x	1	-	-	x	1
<i>ATR44</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ATR48</i>	x	1	x	1	x	3	x	3

x = loco amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); N = número de indivíduos amplificados; - = loco não amplificado em PCR.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES

Ainda que as características morfológicas sejam ferramentas básicas na taxonomia de anofelinos, as análises genéticas de espécies estreitamente relacionadas ou complexos de espécies mostram que o isolamento reprodutivo pode originar-se antes mesmo da divergência morfológica detectável. Diante disso, a especiação só pode ser observada por meio de caracteres genéticos (Kitzmilller, 1976; Coluzzi, 1988). Com isso, a utilização de marcadores moleculares para o reconhecimento de espécies crípticas neste gênero, tem sido muito importante e amplamente empregada para analisar a estrutura genética das populações desses mosquitos, possibilitando identificar espécies vetoras e não vetoras da malária.

Considerando a eficiência dos marcadores microssatélites em estudos de genética de populações, a importância epidemiológica das espécies de *Anopheles* por serem vetoras da malária e por conterem espécies crípticas, como no Complexo *A. triannulatus*, foi extremamente importante à construção de uma biblioteca genômica e a caracterização de locos microssatélites, para contribuir com o entendimento da dinâmica populacional e o *status* taxonômico desse Complexo.

Apesar de vários locos microssatélites já terem sido isolados e caracterizados para algumas espécies de *Anopheles* (Tabela 1), nem sempre a amplificação heteróloga tem mostrado bons resultados. Para a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com microssatélites que apresente clones com sequências de boa qualidade, com alta eficiência, é importante a escolha do protocolo, utilizado em espécies filogeneticamente próximas, como descrito por Lima et al. (2010) para *A. darlingi* e Sunil et al. (2004) para a *A. culicifacies*, que utilizaram a mesma enzima de restrição (*RsaI*) para a digestão do DNA. Assim como Verardi et al. (2002) para *A. stephensis* e Lima et al. (2010) para *A. darlingi*, que utilizaram o mesmo vetor de clonagem, pGEM-T.

A alta eficiência encontrada na biblioteca de *A. triannulatus* foi similar à obtida em *A. darlingi* por Lima et al. (2010), onde os autores conseguiram isolar 36 locos microssatélites e caracterizar 24 locos a partir de 77 clones, utilizando o mesmo protocolo da construção da biblioteca. Em *A. triannulatus*, foram isolados 51 locos microssatélites e, até o momento, caracterizados 15 locos, encontrados em 96 clones com insertos. Proporções similares de locos isolados e caracterizados obtidos neste trabalho foi encontrado por Li et al. (2005), que trabalhando com *A. marajoara*, espécie pertencente ao complexo *Albitaris* e vetor secundário da malária no Brasil, obtiveram 150 clones com insertos, dos quais foi possível isolar 40 locos microssatélites e caracterizar 11. Assim como para *A. maculipennis* (Weill et al, 2003), complexo de espécies que inclui o mais importante vetor da malária na Europa Oriental, obtiveram 59 clones positivos, 26 locos isolados e 15 locos microssatélites caracterizados.

Quanto à classificação dos SSRs, em *A. triannulatus* foi encontrado o microssatélite do tipo dinucleotídeo (AC/GT) com mais frequência em toda a biblioteca, bem como nos 15 locos caracterizados. Esse resultado é decorrente à sonda utilizada na construção da biblioteca genômica: (CT)<sub>8</sub> e (GT)<sub>8</sub>. O mesmo tipo de microssatélite foi encontrado em *A. gambie* (Lanzaro et al, 1995), *A. darlingi* (Lima et al, 2010), *A. moucheti* (Annan et al, 2003) e *A. culicifacies* (Sunil et al, 2004). Entretanto, Conn et al. (2001) encontraram com mais frequência microssatélites (TC/GA) em *A. darlingi*, assim como Verardi et al. (2002) e Weill et al. (2003), que isolaram em maior quantidade a repetição (TG/CA) em *A. stephensi* e *A. maculipennis*, respectivamente.

Ampla variação alélica em locos microssatélites têm sido comum nas diferentes espécies. A riqueza alélica observada em *A. triannulatus* (A= 3 a 10 alelos por loco) foi similar à encontrada em 24 locos isolados por Lima et al. (2010), em *A. darlingi*, variando de 4 a 11 alelos por loco. No entanto, nos oito locos isolados por Conn et al. (2001) nessa mesma espécie, o número de alelos detectados foi maior, os quais variaram de 7 a 44. Assim como em *A. marajoara* (Li et al., 2005), com alelos variando de 11 a 52, e diferindo de *A. triannulatus*. Valores de riqueza alélica similares também foram encontrados em *A. gambie* (Lanzaro et al, 1995), que variou de 3 a 13 alelos, em *A. culicifacies* (Sunil et al, 2004) e *A. maculipennis* (Weill et al, 2003), cuja variação alélica foi de 2 a 12, 2 a 8 e respectivamente.

Valores de heterozigotidade elevados em *A. triannulatus* ( $H_E = 0,697$ ;  $H_O = 0,671$ ) foram similares aos encontrados em *A. marajoara* (Li et al, 2005), onde a heterozigotidade observada foi de 0,42 a 0,79 e em *A. gambie* (Lanzaro et al, 1995), com média de heterozigotidade de 0,732. No entanto, valores mais baixos foram encontrados por Conn et al. (2001) e por Lima et al. (2010), em *A. darlingi*, que

apresentou heterozigotidade observada variando de  $H_o = 0,368$  a  $0,769$  e  $H_o = 0,037$  a  $0,833$ , respectivamente.

Todos os locos isolados para *A. triannulatus* revelaram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), após a correção de Bonferroni (Rice, 1989) e apenas dois locos (*ATR13* e *ATR48*) apresentaram alelos nulos. Estes são alelos que não são detectados em função de mutação que ocorre na região das sequências que flanqueiam os locos microssatélites (Jarne e Lagoda, 1996). A presença desses alelos faz com que alguns genótipos sejam classificados como homozigotos.

Locos em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) também foram reportados em *A. moucheti* (Annan et al, 2003), sendo sete com a presença de alelos nulos (total de 24 locos isolados). Baixo índice de alelos nulos também foi reportado em *A. maculipennis* (Weill et al, 2003), que de 15 locos microssatélites, apenas três apresentaram alelos nulos devido ao déficit de heterozigotos. Porém, em *A. darlingi* (Lima et al, 2010) foram encontrados 10 locos com a presença de alelos nulos, que podem ter sido responsáveis pelo significativo desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

## 5.2. AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA EM *Anopheles* sp.

A amplificação heteróloga tem sido uma estratégia bastante comum em estudos de genética de populações devido ao alto custo no isolamento e caracterização de locos microssatélites. Essa técnica foi utilizada com o intuito de validar os 15 locos isolados para *A. triannulatus*, bem como testá-los em espécies que ainda não apresentam marcadores microssatélites específicos, como *A. oswaldoi*, *A. rangeli* e *A. benarrochi*. Foram testados também em *A. darlingi*, que já contém um total de 32 locos microssatélites (Conn et al, 2001; Lima et al, 2010). Estas espécies utilizadas na amplificação heteróloga foram escolhidas por compartilharem do mesmo grupo taxonômico, subgênero *Nysshrynychus* e seção *Albimanus* (Forattini, 2002).

Dos 15 locos isolados e caracterizados para *A. triannulatus*, oito demonstraram amplificação satisfatória, sendo quatro locos amplificados em todas as espécies e quatro locos amplificados, em pelo menos, uma espécie. De 24 locos microssatélites isolados para *A. darlingi* (Lima et al, 2010), oito amplificaram em todas as espécies analisadas: *A. triannulatus*, *A. rangeli* e *A. benarrochi*, e 17 locos amplificaram, em pelo menos, uma espécie.

Sendo assim, se somarmos a quantidade de locos amplificados neste trabalho aos locos que funcionaram em Lima et al. (2010), podemos considerar que *A. rangeli*



contém 17 locos microssatélites, *A. benarrochi* com 19 locos e *A. oswaldoi* apenas cinco, já que não foi utilizado em amplificação interespecífica por outros autores. Com isso, estas três espécies compartilham marcadores microssatélites que poderão ser utilizados em estudos populacionais.

## 6. CONCLUSÕES

✓ A construção e caracterização da biblioteca genômica gerou 96 clones com insertos e 83 sequências com repetições microssatélites, mostrando-se eficientes para o isolamento de 51 locos microssatélites de *Anopheles triannulatus*;

✓ Os 15 locos microssatélites caracterizados mostraram-se altamente polimórficos e informativos, caracterizando-se como uma ferramenta útil na aplicação de estudos populacionais para *Anopheles triannulatus*;

✓ Estes locos revelaram-se úteis na amplificação heteróloga em quatro espécies do mesmo subgênero: *A. darlingi*, com seis locos amplificados; *A. oswaldoi*, com cinco locos; *A. rangeli*, com sete e *A. benarrochi*, com seis locos amplificados. Estes locos poderão ser utilizados em estudos da variabilidade genética de populações dessas espécies.

**CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
DUAS POPULAÇÕES DE *Anopheles triannulatus sensu lato*  
(DIPTERA: CULICIDAE) DA CIDADE DE MANAUS**

## 1. INTRODUÇÃO

A variabilidade genética é uma condição fundamental para que haja evolução adaptativa de uma espécie, uma vez que a seleção natural atua entre as variantes que ocorrem dentro das populações, em função da adaptação ao ambiente (Hartl, 1981). Ocorre naturalmente entre as populações, que é resultante da grande variação de genes nos organismos.

Com o intuito de entender, quantificar e explicar como a variabilidade atua na natureza afetando diretamente a evolução dos seres vivos, especialistas tem desenvolvido novos métodos para o entendimento quanto à origem, manutenção e importância para a evolução (Hartl, 1981). O estudo da variabilidade permite comparar indivíduos, populações e espécies diferentes (Ferguson et al., 1995). No estudo de genética de populações, a variabilidade genética é o atributo mais importante de uma população, sobre a qual a mutação, a migração, a deriva genética e, principalmente, a seleção natural, atuam diretamente.

Os marcadores moleculares microsatélites apresentam-se altamente eficientes em estudos de genética de populações, devido ao seu alto polimorfismo e alta taxa de mutação. Estes têm sido muito utilizados para analisar a estrutura genética das populações dos insetos vetores de doenças tropicais, na caracterização de genes de resistência a inseticidas e no sequenciamento dos genomas totais e funcionais, com o objetivo de entender a dinâmica populacional e tentar subsidiar em programas de controle. Esses estudos, associados a marcadores morfológicos e bioquímicos, têm contribuído também para o entendimento do *status* taxonômico e identificar complexos de espécies, que ocorre com frequência, em mosquitos do gênero *Anopheles*, tal como o Complexo *triannulatus*, que é constituído de pelo menos três espécies crípticas: *Anopheles triannulatus sensu strictu* (Neiva e Pinto, 1922), *Anopheles halophylus* (Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira, 2002), e outra ainda não identificada morfológicamente, denominada *A. triannulatus* C.

Apesar de vários estudos quanto à variabilidade genética já terem sido realizados em populações de espécies de *Anopheles*, estes ainda são muito incipientes em *A. triannulatus*.

O primeiro estudo sobre a variabilidade genética dessa espécie foi reportado por Santos (1992), que analisaram cinco locos isoenzimáticos das esterases de uma população procedente da Hidrelétrica de Balbina (AM) e encontraram elevada variabilidade genética ( $H_O = 0,3260 \pm 0,3700$ ;  $H_E = 0,5380 \pm 0,3181$ ), e desequilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os locos analisados, sendo esses resultados interpretados como decorrentes de alterações ambientais que estavam ocorrendo naquela área de estudo.

Posteriormente, Santos et al. (2003), analisaram a variabilidade isoenzimática de oito locos em populações da Amazônia brasileira de cinco espécies de *Anopheles*, entre elas *A. triannulatus*, em uma população de Mazagão, município do Amapá. A média do número de alelos por locos variou de 1,6 – 2,3 e a heterozigotidade observada variou de 0,060 a 0,284. De oito locos, somente um não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para todas as espécies.

Em outro estudo, Santos et al. (2004), estudando dezesseis locos isoenzimáticos em quatro populações de *A. triannulatus* procedentes de Macapá (AP), Aripuanã (MT), Ji-Paraná (RO) e Manaus-Lago Janauari (AM). O índice de maior polimorfismo ( $P = 56,3\%$ ) foi encontrado na população de Macapá e a menor variabilidade foi verificada na população de Manaus ( $P = 25\%$ ;  $H_O = 0,077 \pm 0,046$ ). Os resultados das estatísticas F de Wright mostraram desequilíbrio decorrente de excesso de homozigotos ( $F_{IS} > F_{ST}$ ), denotando certa diferenciação intra-populacional.

Silva-do-Nascimento et al. (2006) utilizaram aloenzimas para determinar o fluxo gênico e diferenciar as espécies descritas no Complexo. De 11 locos isoenzimáticos analisados, apenas um (*Mpi*) foi diagnóstico para a identificação de *A. halophylus* e *A. triannulatus*. Esse loco revelou uma terceira espécie irmã dentro do Complexo, identificada como *Anopheles triannulatus* C. Para a confirmação das espécies, os autores utilizaram amplificação aleatória – RAPD/PCR, que mostrou moderada divergência genética entre as três espécies ( $D = 0,145 - 0,428$ ). A distância genética entre *A. triannulatus* e *A. halophylus* foi de 0,288, entre *A. triannulatus* e *A. triannulatus* C foi de 0,428 e entre *A. triannulatus* C e *A. halophylus* foi de 0,145. A heterozigotidade observada ( $H_O$ ) entre as três espécies variou de  $0,055 \pm 0,031$  a  $0,153 \pm 0,074$ .

### 1.1. VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Anopheles* sp.

Diversos estudos têm sido realizados em espécies do *Anopheles* com o intuito de entender a variabilidade genética das espécies e suas dinâmicas populacionais, por ser um grupo de vetores da malária, utilizando marcadores moleculares de naturezas diferentes.

Santos et al. (1999), estudando populações de *A. darlingi* da Amazônia utilizando 19 locos isoenzimáticos, verificaram um elevado polimorfismo e uma pequena diferenciação genética de origem intrapopulacional. Outro estudo foi realizado por Santos et al. (2003), envolvendo cinco espécies do subgênero *Nyssorhynchus* e *Anopheles*, sendo elas *A. triannulatus*, *A. darlingi*, *Anopheles mattogrossensis*, *Anopheles albitarsis* e *Anopheles intermedius*. Baseado em oito locos isoenzimáticos para a análise da distância genética entre as espécies, evidenciaram divergência genética interespecífica que diferem das hipóteses filogenéticas com base nos caracteres morfológicos.

Em *Anopheles nuneztovari*, Scarpassa et al. (1999) utilizando 16 locos enzimáticos em quatro localidades da Amazônia brasileira e duas da Colômbia, encontraram alta diferenciação entre dois locos e pequena estruturação genética entre as populações analisadas.

Utilizando oito locos microssatélites em populações de *A. darlingi* dos estados do Amapá, Pará e Mato Grosso, Conn et al. (2006) encontraram estruturação genética, com 18% de diferenciação entre as populações das regiões norte e sul do rio Amazonas, justificando um grau de isolamento genético atribuído, possivelmente, a isolamento por distância. Resultados similares foram reportados por Scarpassa e Conn (2007), que utilizando os mesmos locos microssatélites e nove populações de *A. darlingi* da Amazônia brasileira, verificaram alta diferenciação populacional, com significativa distância genética e geográfica.

Na análise de 31 populações de *A. darlingi* procedentes da América Central, Amazônia peruana e brasileira, Mirabello et al. (2008) encontraram altos níveis de polimorfismo na Amazônia brasileira e peruana, e baixo nível na América Central. Foi revelada estrutura genética entre as populações e valores elevados altamente significativos de diferenciação genética entre populações da América Central e da Amazônia. Encontraram baixo fluxo gênico, com moderado nível de diferenciação genética, atribuído ao isolamento por distância.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Estimar a variabilidade genética entre duas populações de *A. triannulatus* da cidade de Manaus.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar a variabilidade genética e detectar os níveis de polimorfismos e heterozigosidades intra e interpopulacional;
- Verificar se as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- Verificar se existem locos nas populações em desequilíbrio de ligação;
- Analisar a estrutura genética entre as população;
- Estimar os valores de distância genética entre as populações.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

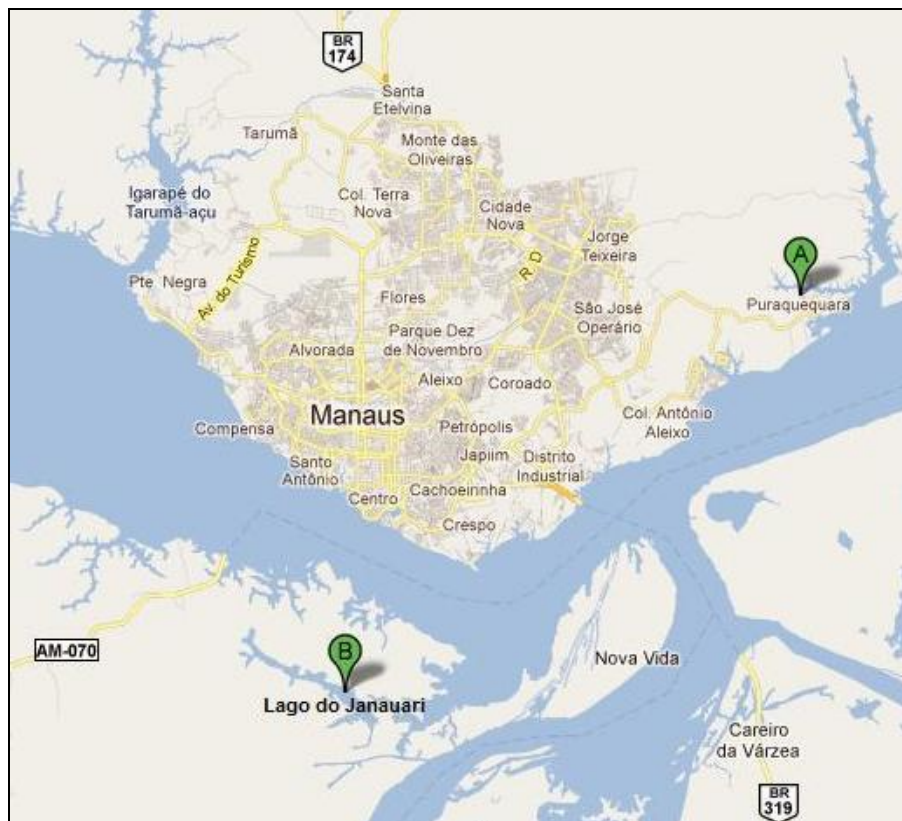
#### 3.1. AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE *Anopheles triannulatus*

A análise da variabilidade genética foi realizada em duas populações da cidade de Manaus (AM): Puraquequara (n = 27), com os dados obtidos na caracterização dos locos microssatélites, e Lago do Januari (n = 24) (Figura 16).

Os mosquitos da população de Januari foram coletados em 2008, criados em laboratório até o 4º estágio larval e identificados seguindo a chave entomológica de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Em seguida, foram armazenados em *freezer* - 70° C, no banco de amostras do Laboratório de Vetores de Malária e Dengue do INPA.

Para a análise populacional, foram selecionados oito locos (Tabela 5) com base no polimorfismo e no número de indivíduos genotipados, para estimar a variabilidade e diferenciação genética entre as duas populações.





**Figura 16** – Mapa satélite indicando as duas localidades utilizadas no estudo populacional de *Anopheles triannulatus*, (A) Puraquequara e (B) Lago Janauari, Manaus, Estado do Amazonas.

**Tabela 5** - Locos microssatélites utilizados nas análises populacionais de *Anopheles triannulatus* em duas localidades na cidade de Manaus.

Locos SSR	Motivo de Repetição	Ta°C	Tamanho (pb)
ATR 13	(CT) <sub>13</sub>	63	177 - 229
ATR18	(GT) <sub>8</sub>	60	219-231
ATR19	(GT) <sub>6</sub>	60	141-151
ATR21	(CTG) <sub>6</sub>	60	303-330
ATR29	(CCAG) <sub>7</sub>	65	323-339
ATR32	(CA) <sub>8</sub>	59	155-165
ATR44	(CA) <sub>10</sub>	65	130-140
ATR48	(AG) <sub>18</sub>	65	167-171

Ta = Temperatura de anelamento; pb = estimativa da variação do tamanho dos alelos.

As amplificações foram realizadas de acordo com o protocolo econômico de Schuelke (2000), que permite a marcação por fluorescência (FAM ou HEX) por meio da adição de uma cauda M13 na extremidade 5' de cada *primer forward*.

Foram utilizadas as mesmas concentrações de reagentes na PCR, nas reações de genotipagem, em analisador automático MegaBACE 1000, e as mesmas condições na termociclagem, utilizadas na caracterização dos locos microssatélites isolados.

### **3.2. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE DUAS POPULAÇÕES *Anopheles triannulatus***

Os resultados das genotipagens foram analisados no programa *FRAGMENT PROFILER v.2.2* (GE Healthcare) para a visualização do padrão dos alelos. Os genótipos das duas populações foram inseridos em uma matriz para a formação do banco de dados no programa *MSTOOLS* (Park, 2001). Nesse programa, foi calculado o Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) (Botstein et al., 1980) e a heterozigotidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ).

O programa *FSTAT 2.9.3.2* (Goudet, 2002) foi utilizado para estimar a riqueza alélica e o desequilíbrio de ligação.

Os valores de qui-quadrado para o equilíbrio de Hard-Weinberg foi calculado pelo programa *ARLEQUIN* (Excoffier et al., 2005) e os níveis de significância foram ajustados pela correção sequencial de Bonferroni ( $P: 0,05/8 \leq 0,006$ ) (Rice, 1989). A presença de alelos exclusivos foi verificada no programa *GENALEX 6.2* (Peakall e Smouse, 2006).

### **3.3. ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *Anopheles triannulatus***

As estatísticas F de Wright (Wright, 1951) foram calculadas no programa *FSTAT 2.9.3.2* (Goudet, 2002) e confirmada com os programas *ARLEQUIN* (Excoffier et al., 2005) e *TFGA* (Miller, 1997). Nestes mesmos programas, foram calculadas a distância de Nei (1978) e a identidade genética. A Análise da Variância Molecular (AMOVA) foi estimada no programa *ARLEQUIN* (Excoffier et al., 2005) com 10.000 permutações, realizada para verificar o grau de diferenciação genética entre as duas populações estudadas, com base nos valores de  $F_{ST}$ .

A partir do valor de  $F_{ST}$ , foi verificada a existência de estrutura genética entre as populações, confirmada pela análise bayesiana do programa *STRUCTURE 2.1* (Pritchard et al., 2000), onde atribui os indivíduos a um número  $K$  de populações assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados dentro de cada população.

Nas análises, foi utilizado o modelo de mistura (*admixture model*), onde cada indivíduo pode ter ancestrais de mais de uma população, e frequências alélicas correlacionadas, permitindo uma sensível identificação de populações subestruturadas (Falush et al., 2003). Foram realizadas 10 cópias para cada valor de  $K$  (*cluster*), variando de um a quatro, com valores de corte (*Burnin*) de 50.000 permutações e *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) com 1.000.000 permutações.

O número de *clusters* foi inferido pelo método proposto por Evanno et al. (2005). Para essa análise foram realizadas dez réplicas (*runs*) para cada valor de  $K$  ( $K= 1$  a  $K= 5$ ). Depois os agrupamentos foram definidos através do delta  $K$  ( $K$ ).  $K$  é inferido com base na média da primeira ordem de mudança das estimativas “*likelihood*”, dividido pelo desvio padrão da segunda ordem de mudanças das estimativas:  $K = m|L''(K)|/s[L(K)]$ ; onde :  $L''(K) = L'(K + 1) - L'(K)$ ,  $L'(K) = L(K) - L(K - 1)$ ,  $m$  (média) e  $s$  (desvio padrão). O  $K$  escolhido é aquele que apresenta o maior valor.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Anopheles triannulatus*

Em oito locos microssatélites utilizados para a análise da variabilidade genética de *A. triannulatus*, foram visualizados 71 alelos (A) entre os 51 indivíduos genotipados das duas populações, sendo 6,25 a média de alelos por loco em Puraquequara e 7,25 em Januári. O número de alelos por loco variou de 5 a 12 (Tabela 6) e o tamanho em pares de bases variou de 117 a 337.

Na população de Puraquequara, a heterozigozidade esperada ( $H_E$ ) variou de 0,571 a 0,844 e a heterozigozidade observada ( $H_O$ ) de 0,318 a 0,937, sendo a média igual a 0,683. Na população de Januári, a heterozigozidade esperada ( $H_E$ ) foi entre 0,455 e 0,838 e heterozigozidade observada ( $H_O$ ) de 0,318 e 0,904, sendo 0,676 de média. Entre as duas populações, a heterozigozidade esperada e observada ( $H_O$ ) variou de 0,318 (Januári/Puraquequara) a 0,937 (Puraquequara) e 0,455 (Januári) a 0,838 (Januári), respectivamente (Tabela 6).

O Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) variou de 0,529 a 0,792 em Puraquequara (média de 0,625) e, em Januári, variou de 0,417 a 0,796 (média de 0,628). Nas duas populações, o PIC foi entre 0,417 (Januári) e 0,796 (Januári). O coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) variou de - 0,001 na população de Puraquequara, a 0,512 na população de Januári.

Quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 6), quatro locos microssatélites revelaram-se em desequilíbrio, sendo dois (*ATR18* e *ATR44*) na população de Januári e dois (*ATR29* e *ATR48*) na população de Puraquequara, após a correção de Bonferroni ( $P = 0,006$ ) (Rice, 1989). Não foi observado desequilíbrio de ligação significativo entre os locos em nenhuma população ( $D = 0,001786$ ).

**Tabela 6** - Índices de variabilidade genética estimados em oito locos microssatélites de *Anopheles triannulatus*, analisados em duas populações da cidade de Manaus.

População		ATR13	ATR18	ATR19	ATR21	ATR29	ATR32	ATR44	ATR48
Puraquequara	A	9	5	6	7	5	6	6	6
	H <sub>O</sub>	0,521	0,583	0,769	0,666	0,764	0,640	0,937	0,318
	H <sub>E</sub>	0,827	0,721	0,609	0,637	0,623	0,639	0,844	0,571
	PIC	0,788	0,657	0,539	0,574	0,539	0,587	0,792	0,529
	F <sub>IS</sub>	0,374	0,195	-0,269	-0,046	-0,234	-0,001	-0,113	0,449
	HWE	0,012	0,504	0,262	0,260	0,002*	0,428	0,723	0,002*
Januari	A	5	6	8	10	5	5	7	12
	H <sub>O</sub>	0,4	0,318	0,608	0,904	0,409	0,59	0,411	0,642
	H <sub>E</sub>	0,612	0,706	0,826	0,765	0,455	0,49	0,721	0,838
	PIC	0,547	0,637	0,781	0,725	0,417	0,454	0,674	0,796
	F <sub>IS</sub>	0,365	0,512	0,267	-0,191	0,104	-0,199	0,437	0,224
	HWE	0,117	0,000*	0,021	0,987	0,466	1,000	0,005*	0,117

A= Número de alelos; H<sub>O</sub>= heterozigosidade observada; H<sub>E</sub>= Heterozigosidade esperada; F<sub>IS</sub>= Coeficiente de endogamia; HWE= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; \*p<0,006 em desequilíbrio de Hardy-Weinberg após a correção de Bonferroni.

Dentre os 71 alelos distribuídos nas duas localidades amostradas, nos 51 indivíduos de *A. triannulatus*, foram observados 66 alelos exclusivos (Tabela 7), sendo 29 alelos encontrados na população de Puraquequara e 36 alelos em Januari. A maior frequência (0,560) foi do alelo 163, encontrado no loco ATR32 em Puraquequara. A menor frequência alélica (0,022) foi dos alelos 155 e 173 presentes no loco ATR19 e do alelo 221 encontrado no loco ATR13 na população de Januari. O loco que apresentou maior quantidade de alelos exclusivos foi ATR13 (A = 14), seguido de ATR48 (A = 12).

**Tabela 7** – Frequência de alelos exclusivos (valores entre parênteses) observados em oito locos microssatélites distribuídos em duas populações de *Anopheles triannulatus* da cidade de Manaus.

População	Locos								Total
	<i>ATR13</i>	<i>ATR18</i>	<i>ATR19</i>	<i>ATR21</i>	<i>ATR29</i>	<i>ATR32</i>	<i>ATR44</i>	<i>ATR48</i>	
Puraquequara	207 (0,087)	226 (0,271)	141 (0,077)	303 (0,021)	329 (0,088)	163 (0,560)	131 (0,094)	165 (0,068)	29
	211 (0,109)	228 (0,417)	143 (0,038)		333 (0,324)	165 (0,200)	133 (0,156)	167 (0,159)	
	213 (0,065)	230 (0,188)			337 (0,529)		135 (0,125)	197 (0,045)	
	215 (0,348)						137 (0,188)		
	219 (0,109)						139 (0,250)		
	221 (0,022)						141 (0,188)		
	223 (0,043)								
	225 (0,174)								
Januari	229 (0,043)								37
	177 (0,025)	210 (0,023)	153 (0,239)	300 (0,024)	309 (0,045)	153 (0,068)	117 (0,059)	145 (0,036)	
	185 (0,025)	214 (0,045)	155 (0,022)	312 (0,452)	313 (0,023)		121 (0,088)	147 (0,071)	
	187 (0,200)	218 (0,182)	157 (0,043)	315 (0,095)	321 (0,068)		127 (0,500)	149 (0,393)	
	189 (0,175)	222 (0,295)	173 (0,022)	324 (0,024)			129 (0,029)	151 (0,071)	
	191 (0,575)						143 (0,147)	163 (0,036)	
							147 (0,088)	175 (0,036)	
							149 (0,088)	177 (0,036)	
							181 (0,071)		
							183 (0,071)		
Total	14	7	6	5	6	3	13	12	66

## 4.2. ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE *Anopheles triannulatus*

A estimativa das estatísticas F de Wright (Wright, 1951) envolvendo oito locos microssatélites mostrou o valor de  $F_{ST}$  (0,282) maior que o de  $F_{IS}$  (-0,0529), indicando diferenciação genética elevada, com baixo índice de fluxo gênico ( $Nm = 0,634$ ). Estes resultados mostram que a diferenciação genética foi entre as populações, pois o valor de  $F_{IS}$  foi negativo.

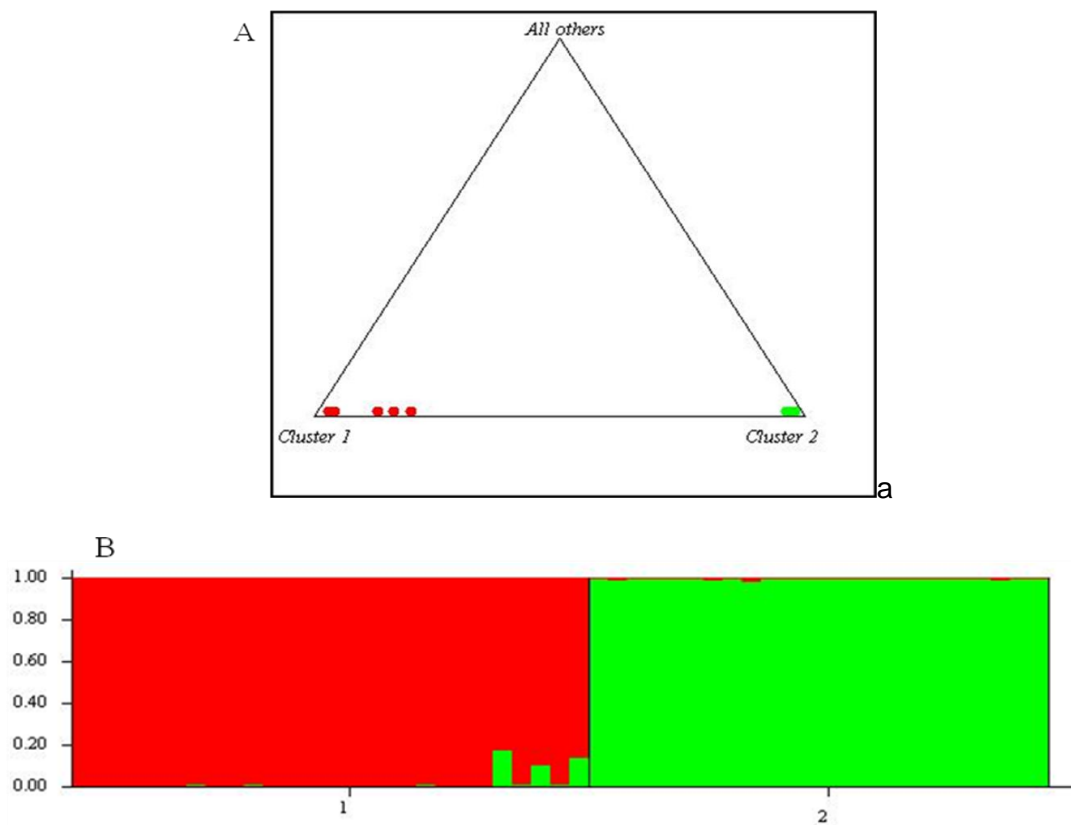
No entanto, a análise da variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior parte da variação ocorreu dentro das populações (62%), sendo observada apenas 28% entre as populações (Tabela 8).

**Tabela 8** – Análise da variância molecular em duas populações do Estado do Amazonas de *Anopheles triannulatus*, utilizando oito locos microssatélites.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação
Entre populações	47.941	1.06121	28.17
Entre grupos dentro das populações	124.278	0.35987	9.55
Dentro das populações	101.000	2.34676	62.28
Total	273.220	3.767	100

O alto valor de distância genética (1,833) é indicativo de duas populações geneticamente diferentes.

A análise da estrutura genética mostrou a presença de duas populações ou *clusters* distintos ( $K = 2$ ), como mostra o *barplot* e o triângulo gerado pelo programa (Figura 17), evidenciando estrutura genética elevada entre as duas populações, conforme as análises dos alelos exclusivos (Tabela 7), onde apenas seis alelos são compartilhados nas duas populações.



**Figura 17** – Triângulo (A) e *Barplot* (B) gerados pelo programa STRUCTURE 2.3.3, indicando duas populações distintas de *Anopheles triannulatus* ( $K = 2$ ). (1) Puraquequara (em vermelho) e (2) Lago do Janauari (em verde).



## 5. DISCUSSÃO

O estudo da variabilidade genética dos organismos envolve o entendimento das condições ecológicas, da dinâmica populacional e dos processos evolutivos para a sobrevivência e adaptação de uma espécie.

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética, já que fornecem novas perspectivas no estudo da genética de populações (Zucchi, 2002), assim como, no entendimento do *status* taxonômico de espécies crípticas (Silva-do-Nascimento et al., 2006).

Considerando que os marcadores microssatélites são codominantes, seletivamente neutros e multialélicos, estes têm sido muito eficientes no estudo de populações de diversos organismos e de espécies vetoras de doenças tropicais (Huber et al., 2001; Porreta et al., 2006; Fonseca, et al., 1998). Por esse motivo, o emprego desses marcadores será de grande importância para o futuro entendimento do Complexo *Triannulatus*.

### 5.1. VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Anopheles triannulatus*

Os oito locos microssatélites isolados de *A. triannulatus* mostraram-se bastante polimórficos nas duas populações analisadas. Esse polimorfismo pode ser visualizado pela riqueza alélica encontrada, que foi estimada na análise de 51 indivíduos contendo 71 alelos e média de 6,25 e 7,25 alelos por loco, em Puraquequara e Janauri, respectivamente, bem como, pelo alto valor de heterozigotidade observada, que variou de 0,318 a 0,937 nas duas populações.

Para a mesma espécie, Santos et al. (1992) utilizando populações procedentes da hidrelétrica de Balbina (AM) com base em marcadores isoenzimáticos, que também apresentam natureza codominante, identificaram seis zonas de atividade das esterases em cinco locos polimórficos e média da frequência alélica de 0,597. Analisando cinco espécies do subgênero *Nyssorhynchus*, incluindo também *A. triannulatus*, Santos et al. (2003), encontraram  $2,3 \pm 0,4$  alelos por locos isoenzimáticos, com a média da heterozigotidade

observada de  $0,077 \pm 0,046$ . Utilizando esses mesmos marcadores, Santos et al. (2004), em quatro populações da Amazônia brasileira dessa mesma espécie (Balbina-AM, Lago Januari-AM, Macapá-AP e Aripuaná-MT), encontraram baixa variabilidade comparada com os dados obtidos por marcadores microssatélites do presente estudo, no qual os autores reportam menor variabilidade no Lago Januari ( $P = 0,25$ ;  $H_0 = 0,077 \pm 0,046$ ;  $A = 1,4 \pm 0,2$ ), próximo a cidade de Manaus, e a maior variabilidade foi detectada na população de Macapá ( $P = 0,56$ ;  $H_0 = 0,133 \pm 0,054$ ), no Estado do Amapá.

Utilizando oito locos microssatélites, Conn et al. (2006) analisaram sete populações brasileiras de *A. darlingi*, sendo três do Amapá, três do Pará e uma do Mato Grosso do Sul, nas quais encontraram 109 alelos, com média de 13,5 alelos por loco, proporções maiores que os valores encontrados em *A. triannulatus*. Grande variação alélica também foi encontrada por Scarpassa e Conn (2007), para a mesma espécie, utilizando sete locos microssatélites em nove populações, também da Amazônia brasileira, com um total de 105 alelos, variando de 5 a 25 alelos por loco. No entanto, Lehmann et al. (1996) encontraram proporções de alelos mais baixos (2 – 13), sendo a média 7,8 e heterozigotidade observada de 0,592, em duas populações de *A. gambiae* do leste e oeste da África, similar a *A. arabiensis* (Muturi et al., 2010) em três populações do Quênia, com alelos variando de 3 a 10 e média de 5,3 por loco.

Os valores de qui-quadrado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, mostraram que a metade dos locos está em equilíbrio, considerando as duas populações, sendo dois locos (*ATR18* e *ATR44*) no Lago Januari e dois (*ATR29* e *ATR48*) em Puraquequara. Sugere-se que esses locos estejam em desequilíbrio devido ao tamanho amostral ser reduzido, a presença de alelo nulo no loco *ATR48* e ao excesso de heterozigotos no loco *ATR29*. Mesmo assim, todos os locos encontram-se em equilíbrio de ligação ( $D = 0,001786$ ).

Resultados similares foram obtidos por Santos et al. (1992), que estudando cinco locos isoenzimáticos das esterases de uma população de Balbina de *A. triannulatus*, evidenciaram três locos com valores de qui-quadrado altamente significativos, sendo as frequências observadas superiores às esperadas. No entanto, Santos et al. (2004), quando analisaram 16 locos isoenzimáticos em quatro populações dessa mesma espécie, da Amazônia brasileira, observaram equilíbrio genético em todas as populações.

Porém, em outras espécies de *Anopheles*, as populações têm mostrado vários locos em desequilíbrio genético, decorrentes em sua maioria do excesso de homozigotos como, por exemplo, em populações de *A. darlingi* (Santos et al., 1999), com base em marcadores isoenzimáticos, de *A. gambiae* (Lehmann et al., 2003) e de *A. albimanus* (Gutierrez et al., 2009) baseados em marcadores microssatélites. Utilizando também esses marcadores moleculares, Midega et al (2010), em populações de *A. gambiae*, encontraram cerca de 50% de locos microssatélites em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, dentre os onze analisados,

também devido à deficiência de heterozigotos, assim como, devido ao desvio no equilíbrio de ligação entre pares de locos, sugerindo a existência de subestruturação.

Resultados similares foram encontrados em populações de *A. funestus* das ilhas de Madagascar e Comoros, que de dez locos microssatélites analisados, quatro a nove locos encontraram-se em desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a um forte déficit de heterozigotos, além da presença de alelos nulos (Ayala et al, 2006).

Outro estudo, envolvendo cinco populações de *A. marajoara* da Colômbia foi realizado por Brochero et al (2010) a partir de nove locos microssatélites, gene ribossomal ITS2 e sequências de gene *white*. Esses autores verificaram que somente um loco microssatélite estava em equilíbrio e uma população estava com excesso de heterozigotos. Diversas hipóteses foram sugeridas para esse desvio, tais como: a influência dos alelos nulos, a deficiência de heterozigotos em algumas populações, efeito *Wahlund*, seleção em favor dos homozigotos e desequilíbrio de ligação.

## **5.2. ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE *Anopheles triannulatus***

A estrutura genética de populações é uma consequência dos padrões e cruzamentos dentro das populações e de trocas gênicas entre as subpopulações. Pela análise da estrutura genética das populações dos anofelinos, podemos entender como a variabilidade genética está organizada entre as populações desses insetos, na busca de mecanismos que possam contribuir para a redução dos índices de malária entre as populações humanas, contribuindo assim, na forma e métodos de controle dessa endemia.

*A. triannulatus* é considerada uma possível vetora da malária humana na Venezuela devido às ocorrências de malária naquela região. No Brasil, ainda não há registros de malária transmitida por essa espécie, já que a principal transmissora é *A. darlingi*, mesmo as duas vivendo em simpatria (Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira, 2007). Considerando este aspecto, tratar-se de um complexo de espécies e ter sido encontrada infectada naturalmente por *P. vivax* e *P. falciparum* (Oliveira-Ferreira et al., 1990), não podemos deixar de incriminar *A. triannulatus* como uma possível vetora secundária da malária em nosso país, assim como é considerada *A. albitarsis*.

A estrutura genética em uma população, geralmente inicia-se a partir da diferenciação genética intrapopulacional ( $F_{IS} > F_{ST}$ ). Entretanto, neste trabalho, o valor do  $F_{ST}$  (0,281) encontrado entre as duas populações foi maior que o  $F_{IS}$  (-0,0529), indicando estruturação genética muito elevada, decorrente possivelmente, de um processo de especiação recente, resultante de barreiras ao fluxo gênico ( $Nm = 0,634$ ) entre elas. O valor

negativo de  $F_{IS}$  mostra que a diferenciação genética é entre as populações e elevada presença de alelos exclusivos nas duas populações corroboram para esta estruturação. Estes altos valores do índice de fixação ( $F_{ST} = 0,281$ ) e da distância genética ( $D = 1,832$ ) encontrados nas duas populações de *A. triannulatus* estão de acordo com a diferenciação interespecífica para complexos de espécies em mosquitos, como reportados por Simard et al. (1999) em *A. arabiensis* ( $F_{ST} = 0,169$ ); por Kamau et al. (1998) e Midega et al. (2010) em *A. gambiae*, ( $F_{ST} = 0$  a  $1$ ;  $F_{ST} = 0,03$  a  $0,42$ , respectivamente); por Scarpassa et al. (1999), em *A. nuneztovari* ( $F_{ST} = 0,324$ ) e por Hasan et al. (2008), em *A. punctulatus* ( $F_{ST} = 0,878$ ).

Esses resultados diferem aos encontrados por Santos et al. (2004), em quatro populações de *A. triannulatus* de Macapá, Ji-Paraná, Aripuanã e Manaus, quando analisaram 16 locos isoenzimáticos. A análise da estrutura genética revelou a média de  $F_{IS}$  maior que a de  $F_{ST}$  ( $F_{IS} = 0,189 > F_{ST} = 0,110$ ), indicando diferenciação genética intrapopulacional. Embora as populações sejam geneticamente muito próximas ( $D = 0,003 - 0,0052$ ), com baixa diferenciação interpopulacional, o dendrograma separou as populações em dois grupos: 1 - Macapá, separado de Manaus; 2 - Ji-Paraná e Aripuanã. Diferenciação genética intrapopulacional ( $F_{IS} = 0,083 > F_{ST} = 0,026$ ) também foi encontrada em populações de *A. darlingi* da Amazônia, baseada em marcadores isoenzimáticos (Santos et al, 2003).

Outro estudo com o Complexo *A. triannulatus* foi realizado por Silva-do-Nascimento et al. (2006), analisando dois marcadores moleculares (isoenzimas e (RAPD/PCR), com o intuito de confirmar a diferença taxonômica entre *A. halophylus* (Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira, 2002) e *A. triannulatus*, e ainda, a existência de uma terceira espécie no Complexo. O loco *Mpi* foi utilizado como um marcador entre *A. halophylus* e *A. triannulatus*, que posteriormente identificaram três alelos diagnósticos para as três espécies do Complexo. O índice de fixação foi bastante variável entre *A. halophylus* ( $F_{IS} = 0,340$ ) e *A. triannulatus* ( $F_{IS} = 0,044$ ). Outros locos isoenzimáticos foram também analisados, sendo encontrada alta variação alélica entre as espécies. A média do número de alelos por loco variou de 1,5 a 1,8, e a de heterozigotidade esperada foi de 0,055 a 0,153. Nesse mesmo estudo, tendo por base RAPD/PCR verificaram que a distância genética entre *A. halophylus* e *A. triannulatus* foi 0,288, e entre *A. triannulatus* e a variante morfológica foi 0,428, e entre *A. halophylus* e a variante morfológica foi 0,145. Os resultados obtidos pelos dois marcadores corroboraram para a confirmação da identificação das três espécies do Complexo *Triannulatus*: *A. halophylus*, *A. triannulatus* e uma terceira espécie simpátrica, nomeada *A. triannulatus* C.

Em complexo de espécies, é freqüente a estruturação genética entre as populações. Em *A. arabiensis*, espécie pertencente ao Complexo *A. gambiae*, principal vetora da malária na África, foi encontrada significativa diferenciação genética entre quatro populações africanas, com valor de  $F_{ST} = 0,169$  e fluxo gênico variando de 0,91 a 2,88, indicando por

meio dos microssatélites, que as populações de *A. arabiensis* divergiram-se, mostrando que esses marcadores são eficientes para detectar unidades geograficamente diferenciadas. Os autores acreditam que o mar presente entre as ilhas de Madagascar tem atuado como uma barreira ao fluxo gênico (Simard et al., 1999).

Similares índices de fixação foram citados por Kamau et al. (1998), em populações africanas desse mesmo complexo de espécies, com valores de  $F_{ST}$  variando de 0 a 1, em sete aldeias muito próximas situadas no Quênia, e taxa de migração ( $Nm = 5,66$ ), indicativa de fluxo gênico entre as populações e não há evidências de isolamento por distância entre as vilas.

Santos et al. (2003), analisando cinco espécies do gênero *Anopheles*, uma delas *A. triannulatus*, encontraram consistente divergência genética interespecífica ( $D = 0,344 - 0,989$ ). Entre *A. triannulatus* e *A. intermedius* mostraram alta distância genética ( $D = 0,989$ ) por pertencerem a subgêneros diferentes, *Nyssorhychus* e *Anopheles*, respectivamente. Porém entre *A. albitarsis* e *A. darlingi*, as distâncias foram mais baixas ( $D = 0,344$ ).

Scarpassa et al. (1999), utilizando quatro populações do Brasil e duas Colômbia de *A. nuneztovari*, analisando 16 locos isoenzimáticos, encontraram pouca estruturação genética e baixa diferenciação geográfica entre as populações brasileiras baseadas nos valores de  $F_{IS}$  (0,029),  $F_{ST}$  (0,070) e distância genética ( $D = 0,0001 - 0,032$ ). Porém, entre Colômbia e Brasil, a média de  $F_{ST}$  (0,324) sugere uma considerável divergência genética entre as populações, com distância variando de 0,047 a 0,148.

Estrutura de população também foi encontrada por Midega et al. (2010) em *A. gambiae* em duas populações da costa do Quênia utilizando 11 locos microssatélites. Os dados obtidos pela AMOVA demonstraram diferenciação entre as populações, com baixo índice de fluxo ( $Nm = 0,08 - 1,35$ ) e significativo valor de  $F_{ST}$  (0,03 - 0,42), sugerindo a existência de diferenciação populacional e restrição de fluxo gênico. Considerando a mesma espécie, Lehmann et al (2003) encontraram valores elevados de estrutura genética, similares aos encontrados neste trabalho ( $F_{ST} = 0,02$  a 0,40), quando analisaram 11 locos microssatélites em dez populações da África. Os resultados sugerem que a migração entre as populações é baixa, ocorrendo em maior proporção no sul do continente. Segundo os autores, essa estrutura é constituída por efeito gargalo (*Bottleneck*).

Utilizando DNA ribossomal (ITS2), em populações de cinco espécies do Complexo *A. albitarsis*, Brochero et al. (2007) identificaram a sexta espécie e nomearam *A. albitarsis* F. Encontraram distância genética entre elas variando de 0,57 a 1,97. A distância genética entre *A. albitarsis* F e as demais espécies foi 1,41 a 1,97. Para o mesmo Complexo, Brochero et al (2010), analisando cinco populações de *A. marajoara* provenientes da Colômbia, por meio de marcadores microssatélites, encontraram moderados valores de estruturação genética ( $F_{ST} = 0,069$ ) e possíveis barreiras ao fluxo gênico (rios e montanhas).

*A. punctulatus*, *A. farauti* s.s. e *A. irenicus* são espécies crípticas, vivem em simpatria e são endêmicas da parte norte das ilhas de Guadalcanal, uma das províncias do arquipélago de Salomão. A partir dos dados da AMOVA obtidos pelas análises dos genes ITS2 e COII em cinco populações de Guadalcanal e duas populações de Malita (ilha de Salomão), Hasan et al (2008), verificaram que estas espécies encontram-se estruturadas ( $F_{ST} = 0,878$ ), com taxa de migração restrita entre as duas ilhas ( $Nm = 0,065$  e  $0,069$ ).

Em nove populações de *A. nili*, uma eficiente vetora da malária em savanas úmidas da África, foi revelado por análise Bayesiana no programa *STRUCTURE*, o mesmo utilizado neste trabalho, dois grupos genéticos, sendo um grupo, incluindo uma população (Kenge – República Democrática do Congo) e o outro, as demais populações. Isso se deve ao perfil de alelos das populações e aos elevados valores de  $F_{ST}$  ( $0,119 - 0,153$ ) (NDO et al., 2010).

Apesar da elevada estruturação encontrada entre as duas populações analisadas nesse estudo, os valores obtidos pela AMOVA (Tabela 8), indicaram que a maior variação ocorreu dentro das populações (62%). Entre as mesmas foi observada 28% de variação. Estes índices sugerem um processo de especiação recente entre as duas populações. Os dados são em parte, similares aos obtidos por Mirabello et al (2006), em populações de *A. darlingi* das Américas Central e do Sul, que detectaram 18,9% de variação entre os grupos e 77,9 % dentro das populações.

Os dados obtidos neste trabalho mostram relevância para o entendimento do *status* taxonômico de *A. triannulatus*, confirmando a complexidade desse táxon e sugerindo tratar-se de um complexo de espécies crípticas, conforme Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira (2002) e Silva-do-Nascimento et al. (2006), ou ainda duas populações diferenciadas em processo de especiação. Caso sejam duas espécies crípticas, os dados sugerem tratar-se de *A. triannulatus* e *A. triannulatus* C, ou até mesmo, uma quarta espécie ainda não identificada nesse Complexo. Esta hipótese é baseada ao fato de que, apenas *A. triannulatus* e *A. halophylus* foram totalmente caracterizadas.

Com isso, diante da complexa taxonomia, e para confirmar esses resultados, serão realizados estudos morfológicos mais acurados da genitália do macho, associados à análise de populações, utilizando os 15 locos microssatélites desenvolvidos neste trabalho, assim como, o estudo do DNA *barcode*.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Os oito locos microssatélites utilizados na análise da variabilidade e estrutura genética nessas populações de *A. triannulatus* revelaram elevada variabilidade genética (riqueza alélica variando de 6,25 a 7,25 e heterozigotidades observada e esperada, variando de 0,318 a 0,937);
- ✓ Os quatro locos encontrados nas duas populações com desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg, possivelmente, decorrem do excesso de homozigotos e/ou heterozigotos, bem como da presença de alelos nulos;
- ✓ Elevadas estruturação ( $F_{ST} = 0,282$ ) e distância genética ( $D = 1,832$ ), assim como baixo fluxo gênico ( $Nm = 0,634$ ), encontrados nessas populações de *A. triannulatus*, indicaram barreiras ao fluxo gênico, suficientes para propor a existência de mais de uma espécie neste táxon. Mesmo assim, diante da controversa taxonômica deste Complexo, serão realizados estudos morfológicos mais detalhados da genitália do macho associados à análise de populações, utilizando os 15 locos microssatélites desenvolvidos neste trabalho, assim como, o estudo do DNA *barcode*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNAN, Z.; KENGNE, P.; BERTHOMIEU, A.; ANTONIO-NKONDJIO, C.; ROUSSET, F.; FONTENILLE, D.; WEILL, M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from the mosquito *Anopheles moucheti*, malaria vector in Africa. **Molecular Ecology Notes**, DOI: 10.1046/j.1471-8286, 2003

ARRUDA, M.; CARVALHO, M.B.; NUSSENZWEIG, R.S.; MARACIC, M.; FERREIRA, A.W.; COCHRANE, A.H. Potential vectores of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. **Amazon Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 35, p. 873-881, 1986

AVISE, J.C. Molecular Markers, Natural history and evolution. 2nd edition, Sinauer Association, Sunderland, MA, 541 pp., 2004

AYALA, D.; LE GOFF, G.; ROBERT, V.; JONG, P.; TAKKEN, W. Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in Madagascar and Comoros. **Acta Tropica**, v. 97, p. 292–300, 2006

BATISTA, J.S.; FARIAS, I.P.; FORMIGA-AQUINO, K.; SOUSA, A.C.B.; ALVES-GOMES, J.A. DNA microsatellite markers for “dourada” (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. **Conservation Genetic Resources**, 2009

BEHBAHANI, A.; DUTTON, T.J.; RAJU, A.K.; TOWSON, H.; SISKINS, S.P. Polymorphic microsatellite loci in the mosquito *Aedes polynesiensis*. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 59-61, 2004

BENARROCHI, E.L. Studies on malaria in Venezuela. **Amazon Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 14, p. 690-693, 1931

BERTHOMIEU, A.; P. KENGNE, P; AWONO-AMBENE, P.P; RAYMOND, M.; FONTENILLE, D.; WEILL, M. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles nili*. **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.394-396, 2003

BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, n. 54, v. 4, p. 277-288, 1999

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Amazon Journal Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980



BROCHERO, H.L.; LI, C.; WILKERSON, R.C. A newly recognized species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreño, Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 76, n. 6, p. 1113-1117, 2007

BROCHERO, H.; LI, C.; WILKERSON, R.; CONN, J.; RUIZ-GARCIA, M. Genetic Structure of *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* (Diptera: Culicidae) in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 585–595, 2010

BRUNA, S.; PORTIS, E.; BRAGLIA, L.; BENEDETTI, L.; COMINO, C. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae) and cross-species amplifications. **Conservation Genetic Resources**, v. 10, n. 3, p.771-774, 2009

CERQUEIRA, N.L. Distribuição geográfica dos mosquitos da Amazônia. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 10, p. 111-168, 1961

CHARLWOOD, J.D.; WILKES, T.J. Observations on the biting activity of *Anopheles triannulatus bachmanni* from the Mato Grosso, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 11, p. 67-69, 1981

COLUZZI, M. Anopheline mosquitoes: genetic methods for species differentiation. IN: **Malaria - Principles and Practice of Malariology**, p.411-430, 1988

CONN, J.E.; BOLLBACK, J.; ONYABE, D.Y.; ROBBINSON, T.; WILKERSON, R.C.; PÓVOA, M.M. Isolation of polymorphic microsatellite markers from the malaria vector *Anopheles darlingi*. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 223-225, 2001

CONN, J.E.; VINEIS, J.H.; BOLLBACK, J.P.; ONYABE, D.Y.; WILKERSON, R.C.; POVOA, M.M. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 5, p. 798-806, 2006

CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. **Fiocruz**, Rio de Janeiro, Brasil. p. 228, 1994

COUHET, A.; SIMARD, F.; BERTHOMIEU, A.; RAYMOND, M.; FONTENILLE, D.; WEILL, M. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles funestus*. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p. 498-500, 2002

DEANE, L.M.; CAUSEY, O.R.; DEANE, M.P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e Amazônia do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 1, p. 827-965, 1948

ESTOUP, A.; GARNEY, I.; SOLIGNAC, M.; COURMET, J.M. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. **Genetics**, v. 140, p. 679-695, 1995

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of *clusters* of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**. v. 14, p. 2611-2620, 2005

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1. An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**. v. 1, p. 47-50, 2005

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. **Genetics**, v.164, p.1567-1587, 2003

FARAN, M.E. Mosquitos Studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revision of the *Albimanus* Section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. **Contributions of the American Entomological Institute**, v. 15, p. 1-215, 1980

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODHOL, A.; MCMEEL, O.; THOPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmon*. **Journal Fish Biology**, v. 47, p. 103-126, 1995

FONSECA, D.M.; ATKINSON, C.T.; FLEISCHER, R.C. Microsatellite *primers* for *Culex pipiens quinquefasciatus*, the vector of avian malaria in Hawaii. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1617-1619, 1998.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica** – Identificação, Biologia, Epidemiologia. Edusp, São Paulo, Brasil. v. 2, p. 864, 2002

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. v. 2, p. 383-390, 2003

GABALDON, A.; COVA-GARCIA, P. Zoogeografia de los anofelinos em Venezuela. Los dos vectores principales. **Tijeretazos Sobre Malaria**, v. 10, p. 19-32, 1946

GALVÃO, Contribuição ao conhecimento dos anofelinos do grupo *Nyssorhynchus* de São Paulo e regiões vizinhas (Diptera: Culicidae). **Arquivos de Zoologia**, p. 399-484, 1940

GALVÃO, A.L.A. Chaves para a identificação das espécies do subgênero *Nyssorrhynchus* do Brasil. **Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública**, v. 11, p. 141-153, 1944

GALVÃO e LANE, J. Observações sobre alguns anofelinos de Salobra, Mato Grosso (Diptera: Culicidae). **Revista de Biologia e Higiene**, v. 11, p. 10-18, 1941

GARDNER, M. J. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, 498–511, 2002.

GOLDSTEIN, D.B e SCHLOTTERER, C. Microsatellites: Evolution and Applications. **Oxford University Press**, New York, p. 343, 1999

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995), 2002

GUILEMIN, M.L.; SEVERINI, C.; BERTHOMIEU, A.; RAYMOND, M.; WEILL, M. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles sacharovi*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 338-340, 2003

GUTIÉRREZ, L.; NARANJO, N.J.; CIENFUEGOS, A.V.; MUSKUS, C.E.; LUCKHART, S.; CONN, J.E.; CORREA, M.M. Population structure analysed and demografic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. **Malaria Journal**, v. 8, n. 258, 2009

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T.; SEIDMAN, M.; STOLLAR, B.D. Characterization of genomic poly (dT-dG) poly (dC-dA) sequences: structure, organization, and conformation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, p. 2610-2621, 1984

HARTL, D.L. *A primer of populations genetics*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. Publisher. p. 191, 1981

HASAN, A.U.; SUGURI, S.; FUJIMOTO, C.; ITAKI, R.L.; HARADA, M.; KAWABATA, M.; BUGORO, H.; ALBINO, B. Genetic diversity in two sibling species of the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes on Guadalcanal in the Solomon Islands. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 318, 2008

HILLE, A.; JANSSEN, I.A.W.; MENKEN, M.S.; THORPE, R.S. Heterologous Amplification of Microsatellite Markers From Colubroid Snakes in European Natricines (Serpentes: Natricinae). **The Journal of Heredity**, v. 1, n. 93, p. 63-66, 2002

HUBER, K.; MOUSSON, F.; RODHAIN, F.; FAILLOUX, A.B. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 219-222, 2001

JARNE, P. e LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 424-429, 1996

JONES, A.G.; AVISE, J.C. Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex-role reversal. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 203-213, 1997

JUNG, J.; LEE, E.; KIM, W. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers of *Anopheles sinensis*, a malaria vector mosquito in the East Asia region. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 1272-1274, 2006

KAMAU, L.; LEHMANN, T.; WILLIAM, A.; HAWLEY, W.A.; ORAGO, A.S.S.; COLLINS, F.H. Microgeographic genetic differentiation of *Anopheles gambiae* mosquitos from Asembo Bay, Western Kenya: A comparison with Kilifi in Coastal Kenya. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 64-69, 1998

KEYGHOBADI, N.; MATRONE, M.A.; EBEL, G.D.; KRAMER, L.D.; FONSECA, D.M. Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 20-22, 2004

KLEIN, T.A.; LIMA, J.B.P.; TADA, M.S. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, p. 598-603, 1991a

KLEIN, T.A.; LIMA, J.B.P.; TADA, M.S.; MILLER, R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil, to infection by *P. vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 463-470, 1991b

KITZMILLER, J.B. Genetics, cytogenetics and evolution of mosquitoes. **Advances in Genetics**, v. 18, p. 315-433, 1976

- KNAPIK, E.W; GOODMAN, A.; EKKER, M.; CHEVRETTE, M.; DELGADO, J.; NEUHAUSS, S.; SHIMODA, N.; DRIEVER, W.; FISHMAN, M.C.; JACOB, H.J. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). **Nature Genetics**, v. 18, p. 338-343, 1998
- LANZARO, G.C.; ZHENG, L.; TOURE, Y.T.; TRAORE, S.F.; KAFATOS, F.C.; VERNICK, K.D. Microsatellite DNA and isoenzyme variability in a west African population of *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, v. 4, n. 2, p. 105-112, 1995
- LEHMANN, T.; HAWLEY, W.A.; KAMAU, L.; FONTENILLES, D.; SIMARDS, F.; COLLINS, F.H. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. **Heredity**, v. 77, p. 192-208, 1996
- LEVINSON, G. e GUTMAN, G.A. Slippedstrand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular and Biology Evolution**, v. 4, p. 203-221, 1987
- LI, C.; WILKERSON, R.C.; FONSECA, D.M. Isolation of polymorphic microsatellite markers from the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 65-67, 2005
- LIMA, G.N.; BATISTA, J.S.; FORMIGA, K.M.; CIDADE, F.W.; RAFAEL, M.S.; TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M. New 24 polymorphic DNA microsatellite loci for the major malaria vector *Anopheles darlingi* and transpecies amplification with another anophelines. **Conservation Genetic Resources**, DOI 10.1007/s12686-010-9237-y, 2010
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Some observations on the mosquitos of indian settlements in Xingu National Park, Mato Grosso State, Brazil, with emphasis on malaria vectors. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 49, p. 393-397, 1989
- MARTINS, W.S; LUCAS, D.C.S; NEVES, K.F.dS., BERTIOLI, D.J. WebSat - A web software for microsatellite marker development. **Bioinformatics** v. 3, p. 282-283, 2009
- MIDEGA, J.T.; MUTURIC, E.J.; BALIRAINED, F.N.; MBOGOA, C.M.; GITHUREE, J.; BEIERF, J.C.; YANG, G. Population structure of *Anopheles gambiae* along the Kenyan coast. **Acta Tropica**, v. 114, p. 103–108, 2010
- MILLER, M.P. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author, 1997
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – FVS. Malária – Controle da malária no Brasil. Brasília. p. 5, 2009
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – FVS. Malária – Controle da malária no Brasil. Brasília. p. 3, 2010
- MIRABELLO, L. e CONN, J.E. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Cenral and South America. **Heredity**, DOI: 10.1038/sj.hdy.6800805, 2006
- MIRABELLO, L.; VINEIS, J.H.; YANOVIK, S.P.; SCARPASSA, V.M.; PÓVOA, M.M.; PADILLA, N.; ACHEE, N.L.; CONN, J.E. Micosatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. **BCM Ecology**, p. 1-15, 2008
- MOLINA-CRUZ, A.; MERIDA, A.M.; MILLS, K.; RODRIGUEZ, F.; SCHOUA, C.; YURRITA, M.M.; MOLINA, E.; PALMIERI, M.; BLACK, W.C. Gene flow among *Anopheles albimanus* populations in Central America, South America, and the Caribbean assessed by

microsatellites and mitochondrial DNA. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 350-359, 2004

MULLINS, K. The Unusual Origin of the Polymerase chain Reaction. **Scientific American**, p. 56-65, 1990

MUTURI, E.J.; KIM, C-H.; BALIRAINÉ, F.N.; MUSANI, S.; JACOB, B.; GITHURE, J.; NOVAK, R.J. Population Genetic Structure of *Anopheles Arabiensis* (Diptera: Culicidae) in a Rice Growing Area of Central Kenya. **Journal of Entomology**, v. 47, n. 2, p.144-151, 2010

NADIR, E.; MARGALIT, H.; GALLILY, T.; BENSASSON, S.A. Microsatellite spreading in the human genome : evolutionary mechanisms and structural implications. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 93, p. 6470-6475, 1996

NDO, C.; NKONDJIO, C.A.; COUHET, A.; AYALA, D.; KENGNE, P.; MORAIS, I.; AMBENE, P.H.A.; COURET, D.; NGASSAM, P.; FONTENILLE, D.; SIMARD, F. Population genetic structure of the malaria vector *Anopheles nili* in sub-Saharan Africa. **Malaria Journal**, v.9, n.161, 2010

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978

NEIVA, A. e PINTO, C. Considerações sobre o gênero *Cellia* Theobald, com a descrição de uma nova espécie. **Brazilian Medicine**, v. 36, p. 355-357, 1922

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; TEVA, A.; DEANE, L.M.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, p. 6-10, 1990

Organização Mundial de Saúde (OMS), Global Malaria Programme – Malaria endemic countries ([www.who.int/malaria/malariaendemiccountries.html](http://www.who.int/malaria/malariaendemiccountries.html)). Acesso: 12/11/08, 2010

PARK, S.D.E. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Tese de Doutorado, *University of Dublin*, 2001

PEAKALL, R. e SMOUSE, P.E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006

PETERSON, G.C. e SHANNON, R.C. Mosquito de Embarcación (Salta) con notas sobre la zona biológica del Chaco (Chaco Life Zone). **3ª Reunión da Sociedade Argentina de Patología Regional do Norte**. Tucuman, v. 5, p. 649-658, 1927

PINTO, C. Disseminação da malaria pela aviação. Biologia do *Anopheles gambiae* e outros anofelinos no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 34, p. 239-430, 1939

PORRETTA, D.; GARGANI, M.; BELLINI, R.; CALVATTI, M.; URBANELLI, S. Isolation of microsatellites markers in the Tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 880-881, 2006.

PRITCHARD, J.K.; STEPHEENS, M.; DONNELLY, P. Interference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p. 945-959, 2000

- RAYMOND, M. e ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995
- RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989
- RONGNOPARUT, P.; YAICHAROEN, S.; SIRICHOTPAKORN, N.; RATTANARITHKUL, R.; LANZARO, G.C.; LINTHICUM, K.J. Microsatellites polymorphism in *Anopheles maculatus*, a malaria vector in Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 55, p. 589-594, 1996
- SAMBROOK, J. e RUSSELL, D.W. **A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2001
- SANTOS, J.M.M.; CONTEL, E.P.B.; KERR, W.E. Biologia de Anofelinos Amazônicos. II. Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus/Boa Vista. **Acta Amazonica**, v. 11, p. 789-797, 1981
- SANTOS, J.M.M. Variabilidade Genética em populações de *Anopheles (N.) darlingi* Root, 1992 (Diptera: Culicidae). Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 150pp, 1992
- SANTOS, J.M.M.; LOBO, J.A.; TADEI, W.P.; CONTEL, E.P.B. Intrapopulational genetic differentiation in *Anopheles (N.) darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) in the Amazon region. **Genetics and Molecular Biology**, v. 3, n. 22, p. 325-331, 1999
- SANTOS, J.M.M.; MAIA, J.F.; TADEI, W.P.; RODRIGUEZ, G.A.D. Izoenzymatic Variability among Five *Anopheles* Species Belonging to the Nyssorhynchus and *Anopheles* Subgenera of the Amazon Region, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 247-253, 2003
- SANTOS, J.M.M.; MAIA, J.F.; TADEI, W.P. Differentiation and genetic variability in natural populations of *Anopheles (N.) triannulatus* (NEIVA e PINTO, 1922) of Brazilian Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**. v. 64, p. 327-336, 2004
- SCARPASSA, V.M.; TADEI, W.P.; SUAREZ, M.F. Population structure and genetic divergence in *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 1010-1018, 1999
- SCARPASSA, V.M. e CONN, J.E. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 319-327, 2007
- SCHEMERHORN, B.J.; GREEMAN, S.; BANKS, M.; VULULE, J.; SAGNON, N.F.; COSTANTINI, C.; BESANSKY, N.J. Dinucleotide microsatellite markers from *Anopheles funestus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 505-507, 2003
- SCHLOTTERER, C. e TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 211-215, 1992
- SCHOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, v. 109, p. 365-371, 2000
- SCHOTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Natures Reviews**. v. 5, 2004

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234, 2000

SHARAKHOV, I.V.; BRAGINETS, O.; MBOGO, C.N.; YAN, G. Isolation and characterization of trinucleotide microsatellites in African malaria mosquito *Anopheles funestus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 289-292, 2001

SILVA-DO-NASCIMENTO, T. e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 801-811, 2002

SILVA-DO-NASCIMENTO, T.; WILKERSON, R.C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. MONEIRO, F.A. Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *An. triannulatus* in Central Brazil. **Journal Medicine of Entomology**, v. 43, p. 455-459, 2006

SILVA-DO-NASCIMENTO, T.F. e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Diverse population dynamics of three *Anopheles* species belonging to the *Triannulatus* Complex (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 102, p. 975-982, 2007

SIMARD, F.; FONTENILLE, D.; HELMANN, T.; GIROD, R.; BRUTUS, L.; GOPAUL, R.; DOURNON, C.; COLLINS, F.H. High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and Eastern outer islands. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 1000-1009, 1999

SLOTMAN, M.A; KELLY, N.B.; HARRINGTON, L.C.; KITTHAWEE, S.; JONES, J.W.; SCOTT, T.W.; CACCONE, A.; POWELL, J.R. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 168-171, 2007

SNOW, R. W., GUERRA, C. A., NOOR, A. M., MYINT, H. Y.; HAY, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, p. 214–217, 2005.

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 365, p. 274-276, 1993

SUNIL, S.; VENDRA, K.R.; SINGH, O.P. ; MALHOTRA, P. ; HUANG, Y. ; ZHENG, L. ; SUBBARAO, S.K. Isolation and characterization of microsatellite markers from malaria vector, *Anopheles culicifacies*. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 440–442, 2004

SWEENEY, A.W. Prospects for control of mosquito-borne diseases. **Journal of Medicine and Microbiology**, v. 48, p. 879-881, 1999

TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUEZ, I.B. Incidence, distribution and ecological aspects of *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) in natural and environmental impact of Brazilian Amazon. **Acta Amazonica**, p. 167-196, 1993

TADEI, W.P.; DUTUTARY-THATCHER, B.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUEZ, I.B.; RAFAEL, M.S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, p 325-335, 1998

TADEI, W.P.; RODRIGUEZ, I.B.; TERRAZAS, W.; LIMA, C.P.; SANTOS, J.M.M.; RAFAEL, M.S.; BAGGIO, J.B.; LAGO-NETO, J.C.; GONÇALVES, M.J.F.; FIGUEIREDO, E.O. Malaria: ecology, transmission and control. **Mosquitos Vetores de Doenças Tropicais e Controle Biológico**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, p. 149, 2003

TORRES, E.P; FISCHER, K.; FOLEY, D.H; KEMP, D. Characterization of microsatellite loci in *Anopheles flavirostris*, the principal malaria vector in the Philippines. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 527-528, 2002

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004

VERARDI, A.; DONNELLY, M.J.M.; ROWLAND, M.; TOWSON, H. Isolation and characterization of microsatellite loci in the mosquito *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 2, p. 488-490, 2002

WANG, R.; KAFATOS, F.C.; ZHENG, L. Microsatellite markers and genotyping procedures for *Anopheles gambiae*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 1, 1999

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> x (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics**, v. 7, p. 524-530, 1990

WEILL, M.; SEVERINI, C.; GUILLEMIN, M.L.; BERTICAT, C.; BERTHOMIEU, A.; ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the malaria vector *Anopheles maculipennis*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 417-419, 2003

WILKERSON, R.C.; PARSONS, T.J.; KLEIN, T.A.; GAFFIGAN, T.V.; BERGO, E.; CONSOLIM, J. Diagnosis by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. **Journal Medicine of Entomology**, v. 5, n. 32, p. 697-704, 1995

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Human Genetics**, v. 15, p. 323-354, 1951

ZUCCHI, M.L. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* utilizando marcadores RAPD e SSR. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 130, 2002