

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**Análise da variabilidade genética em populações de
Anopheles darlingi Root, 1926 (Diptera: Culicidae) do
Estado do Amazonas, usando marcadores RAPD**

ANA PAULA BARBOSA DA SILVA

Dissertação apresentada à Coordenação de Pós-Graduação da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Manaus - Amazonas
Julho – 2007

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**Análise da variabilidade genética em populações de
Anopheles darlingi Root, 1926 (Diptera: Culicidae) do
Estado do Amazonas, usando marcadores RAPD**

ANA PAULA BARBOSA DA SILVA

Orientadora: Joselita Maria Mendes dos Santos, Dra.

Dissertação apresentada à Coordenação
de Pós-Graduação da Universidade do
Estado do Amazonas - UEA, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia e Recursos
Naturais.

Manaus - Amazonas
Julho - 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Ana Paula Barbosa da

Análise da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) do Estado do Amazonas, usando marcadores RAPD / Ana Paula Barbosa da Silva. - Manaus, 2005.

96p.

Dissertação de Mestrado – Universidade do Estado do Amazonas

1. *Anopheles darlingi* 2. Genética de populações 3. RAPD 4. Variabilidade genética 5. Malária.

SINOPSE

Foi realizado o estudo da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* da região amazônica, usando marcadores RAPD. Elevada variabilidade genética foi encontrada nessas populações, sendo maior em São Gabriel da Cachoeira, e menor em Manaus. A estruturação genética mostrou certa diferenciação entre as populações, porém dentro das variações intraespecíficas. Foram analisadas subpopulações de mosquitos capturados no intra, peri e extradomicílio. Os resultados para esses parâmetros mostraram que as subpopulações do intradomicílio apresentaram maior variabilidade genética, e a menor foi detectada no extradomicílio (gado). Apesar de certa diferenciação, os dados de distância e similaridade genética indicam que as populações são muito próximas geneticamente.

Palavras chave: *Anopheles darlingi*, Genética de populações, RAPD, Variabilidade genética, Malária.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Raimundo e Raimunda, pelo amor, carinho e incentivo, e por terem proporcionado suporte para minha formação profissional. Aos meus irmãos, por todo carinho e companheirismo. E a uma pessoa (Triptom) que muito contribuiu em minha vida, incentivando e compartilhando dificuldades, amor e afeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida...

Aos meus pais, pelo amor, companheirismo e, principalmente, incentivo para a minha formação profissional.

Aos meus irmãos, por estarem sempre presentes na minha vida, em todos os momentos.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde - CPCS e Laboratório de Vetores da Malária e Dengue pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela concessão da bolsa.

À Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos, minha orientadora, pelos ensinamentos, dedicação, confiança e, principalmente pela orientação, carinho e amizade demonstrados durante toda a realização deste trabalho.

Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei pelo apoio logístico no desenvolvimento deste projeto.

Ao Mestre Juracy de Freitas Maia pela valiosa colaboração, apoio técnico e esclarecimentos sempre que solicitado e pela amizade.

Ao colega Carlos Eduardo, pela colaboração, incentivo e companheirismo em todos os momentos.

Aos colegas Fábio "Paraíba", Gerlândia, Fábio Cáuper, Paula, Cleonice, Eunice, Miriam, Lígia e Socorro, pelo companheirismo.

À equipe do Laboratório de Vetores da Malária e Dengue, em especial Adelina Loureiro, Maria do Desterro, Zilá Oliveira, Bastos, Cristóvão, pela colaboração

técnica, solidariedade, boa vontade, amizade e carinho durante o período em que estive neste laboratório.

Aos colegas de turma do curso: Carol, Thana, Lina, Rachel, Gisele, Manoel, Thiago e Danny, pela amizade, convivência e companheirismo durante o mestrado.

RESUMO

Foram analisadas populações de *Anopheles darlingi* procedentes de Manaus, Coari, São Gabriel da Cachoeira e Tabatinga, usando marcador molecular RAPD, com o objetivo de estimar a variabilidade e diferenciação genética entre essas populações. Foram analisadas também populações capturadas no intra, peri e extradomicílio, em Coari e Manaus, entre os horários de 17:00 h e 05:00 h, nos meses de janeiro e julho de 2006. Nas análises estatísticas utilizou-se o Programa TFPGA, para Marcadores Dominantes. Os resultados da variabilidade genética foram elevados nas quatro populações desses mosquitos, sendo maior em São Gabriel da Cachoeira ($P= 97,37\%$; $H_e= 0,3202$), e menor em Manaus ($P= 78,94\%$; $H_e= 0,2741$). O teste de qui-quadrado foi significativo ($\chi^2= 1589,5700$; $GL= 304$; $P < 0,001$). A estrutura genética foi testada com base no método θ , sendo o valor de F_{ST} ($F_{ST}= 0,0851 \pm 0,0075$) significativo, indicando uma estruturação microgeográfica, decorrente de alguma redução no fluxo gênico. O índice de consistência do “bootstrapping” para 1000 replicações foi de 95%. A distância genética entre as populações foi baixa ($D= 0,0095 - 0,0502$), sendo menor entre Coari e Tabatinga, e maior entre São Gabriel da Cachoeira e Tabatinga. Apesar dessas duas últimas apresentarem maior distância genética e geográfica, os dados não mostraram clara relação com o Modelo de Isolamento por Distância (IBD), pois Coari e Tabatinga revelaram maior similaridade genética, no entanto, a menor distância geográfica foi entre Manaus e Coari. A análise da variabilidade genética, com base nos padrões da atividade de picar do mosquito, mostrou que os mosquitos capturados no intradomicílio apresentam maior variabilidade genética, onde o polimorfismo e a heterozigidade média esperada foram maiores em ambas as populações (Coari:

P= 84,86% e $H_e= 0,3069$; Manaus: P= 78,94% e $H_e= 0,2741$). O teste de qui-quadrado para esses parâmetros foi significativo ($\chi^2= 695,8958$; GL= 304; $P < 0,001$). A análise da estrutura genética também mostrou valor de F_{ST} significativo ($F_{ST}= 0,0775 \pm 0,0072$). A distância genética entre as populações foi baixa. Para Manaus, a distância entre as subpopulações do intra e do peridomicílio foi 0,0004, havendo certa homogeneidade entre as mesmas. Para Coari, as distâncias foram um pouco maiores, sendo a maior entre a do extradomicílio (gado) e a do intradomicílio ($D = 0,0296$), e a menor entre a do intradomicílio e a do peridomicílio ($D= 0,0081$). Os dados como um todo mostraram elevada similaridade genética entre as populações analisadas, apesar de certa estruturação genética observada. A maior variabilidade genética encontrada no intradomicílio, nas populações de Coari e de Manaus, indica uma maior plasticidade genética, e assim, talvez possa conferir maior adaptabilidade dessas às mudanças ambientais.

ABSTRACT

Anopheles darlingi populations from Manaus, Coari, São Gabriel da Cachoeira and Tabatinga were analyzed by using the RAPD molecular marker, for the purpose of assessing the genetic variability and differentiation between them. Populations captured indoor and outdoor (around the house, corral) were also analyzed in Coari and Manaus, between 17:00h and 05:00h, in January and February of 2006. Genetic variability findings were high for mosquito's four populations, showing it to be higher in São Gabriel da Cachoeira ($P= 97.37\%$; $H_e= 0.3202$), and lower in Manaus ($P= 78.94\%$; $H_e= 0.2741$). The chi-square test was significant ($\chi^2= 1589.5700$; $GL= 304$; $P < 0.001$). The genetic structure analysis showed significant F_{ST} value ($F_{ST}= 0,0851 \pm 0,0075$), indicating a reduced gene flow between populations. The "bootstrapping" consistency index for 1000 replicates was 95%. The genetic distance between populations was low ($D= 0.0095 - 0.0502$), showing to be lower between Coari and Tabatinga, and higher between São Gabriel da Cachoeira e Tabatinga. Despite the latter presenting higher genetic and geographic distance, data showed no clear relation with the Isolation by Distance Model (IBD), since Coari and Tabatinga revealed higher genetic similarity; however the lower geographic distance was between Manaus and Coari. Genetic variability analysis based on mosquito biting activity patterns, showed mosquitoes captured indoors presented highest genetic variability, where the polymorphism and expected heterozygosity were higher in both populations (Coari: $P= 84.86\%$ e $H_e= 0.3069$; Manaus: $P= 78.94\%$ e $H_e= 0.2741$). The chi-square test for the parameters was significant ($\chi^2= 695.8958$; $GL= 304$; $P < 0.001$). Genetic structure analysis also showed a significant F_{ST} value ($F_{ST}= 0.0775 \pm 0.0072$). The genetic distance between populations was low. For Manaus, the genetic distance between indoor and outdoor sub-populations was 0.0004, there being certain homogeneity among them. For Coari, the genetic distances were slightly higher, the highest being that between the outdoor (cattle) and the indoor ($D= 0.0296$), and the lowest between the indoor and the outdoor ($D= 0.0081$). As a whole, the data showed high genetic similarity between the analyzed populations, despite the little genetic structuring found. The highest genetic variability found the indoor, in the Coari and Manaus populations, indicates a higher genetic plasticity, and so it might confer them highest adaptability to the changes occurring in the environment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagem de Satélite do Estado do Amazonas, destacando as quatro cidades onde foram feitas coletas de <i>Anopheles darlingi</i>	21
Figura 2.	Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM01.....	36
Figura 3.	Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM05.....	37
Figura 4.	Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM06.....	38
Figura 5.	Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM08.....	39
Figura 6.	Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM09.....	40
Figura 7.	Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM20.....	41
Figura 8.	Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer OPK04.....	42
Figura 9.	Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer OPK07.....	43
Figura 10.	Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer OPK10.....	44

Figura 11. Perfil da variabilidade genética em populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer OPK16.....	45
Figura 12. Imagem de Satélite do Estado do Amazonas, destacando a distância geográfica (via fluvial) das quatro localidades estudadas.....	49
Figura 13. Dendrograma agrupando as populações de <i>Anopheles darlingi</i> do Estado do Amazonas com base na distância genética, obtida por análise RAPD.....	50
Figura 14. Distribuição da atividade de picar <i>Anopheles darlingi</i> entre 18:00 e 22:00 hrs., no intra, peri e extradomicílio (gado), na cidade de Coari-AM.....	51
Figura 15. Distribuição da atividade de picar <i>Anopheles darlingi</i> entre 14:00 e 06:00 hrs., no intra e peridomicílio, na cidade de Manaus-AM.....	52
Figura 16. Perfil da variabilidade genética em populações de <i>Anopheles darlingi</i> de Coari (AM), coletadas no intra, peri e extradomicílio (gado), baseado em análise RAPD, usando o primer AM06.....	53
Figura 17. Perfil da variabilidade genética em populações de <i>Anopheles darlingi</i> de Manaus, coletadas no intra e peridomicílio, baseado em análise RAPD, usando o primer AM06.....	54
Figura 18. Dendrograma agrupando as populações de <i>Anopheles darlingi</i> de Coari e Manaus, coletados no intra, peri e extradomicílio, com base na distância genética, obtida por análise RAPD.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Designação e seqüência dos primers, número de locos e tamanho dos fragmentos obtidos da amplificação do DNA de populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, usando RAPD.....	35
Tabela 2.	Estimativa da variabilidade genética em quatro populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseadas em análises RAPD.....	46
Tabela 3.	Matriz de similaridade e distância genética entre quatro populações de <i>A. darlingi</i> do Estado do Amazonas, baseadas em análises RAPD.....	48
Tabela 4.	Estimativa da variabilidade genética na população de <i>A. darlingi</i> de Coari (AM), capturada no intra, peri e extradomicílio, baseadas em análises RAPD.....	56
Tabela 5.	Estimativa da variabilidade genética na população de <i>A. darlingi</i> de Manaus, coletada no intra e peridomicílio, baseadas em análises RAPD.....	57
Tabela 6.	Matriz de similaridade e distância genética entre populações de <i>A. darlingi</i> de Coari e Manaus coletadas no intra, peri e extradomicílio, baseadas em análises RAPD.....	58

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	1
I.1. Considerações gerais sobre <i>Anopheles darlingi</i>	1
I.2. Aspectos gerais da malária na região amazônica	6
I.3. Marcadores genéticos RAPD	10
I.4. Análise da variabilidade genética em populações de anofelinos .	13
 II - OBJETIVOS	 20
II.1. Objetivo geral	20
II.2. Objetivos específicos	20
 III - MATERIAL E MÉTODOS.....	 21
III.1. Área de coleta	21
III.2. Obtenção das amostras	22
III.3. Extração do DNA genômico de linhagens de mosquito obtidas em laboratório – Protocolo I	23
III.4. Extração do DNA genômico de mosquitos obtidos da natureza – Protocolo II	25
III.5. Quantificação do DNA genômico	26
III.6. Amplificação do DNA e Corrida Eletroforética	27
III.7. Primers	28
III.8. Análise Estatística	29
III.8.1. Freqüência Alélica	29
III.8.2. Análise da Estrutura Genética Populacional	30
III.8.3. Análise da Distância e Similaridade Genética entre as Populações	32
III.8.4. Análise de Dendrograma	33
 IV - RESULTADOS	 35
IV.1. Análise descritiva dos locos RAPD	35
IV.2. Análise da variabilidade genética	45

IV.3. Padrões comportamentais em populações de <i>Anopheles darlingi</i> de Manaus e Coari (AM) – Atividade de Picar	50
IV.4. Análise da variabilidade genética em populações de <i>Anopheles darlingi</i> de Manaus e Coari (AM) capturadas no intra, peri e extradomicílio	52
V - DISCUSSÃO	60
V.1. Análise descritiva dos locos RAPD	60
V.2. Análise da variabilidade genética	63
V.3. Padrões comportamentais em populações de <i>Anopheles darlingi</i> de Manaus e Coari – Atividade de Picar	71
V.4. Análise da variabilidade genética em populações de <i>Anopheles darlingi</i> , com base nos padrões de comportamento da atividade de picar	73
VI - CONCLUSÕES	76
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

I - INTRODUÇÃO

I.1. Considerações gerais sobre *Anopheles darlingi*

Anopheles darlingi Root, 1926 é considerado o principal vetor da malária humana no Brasil, sendo o transmissor em praticamente todo o interior do país (DEANE *et al.*, 1948). Está classificado na ordem Diptera, família Culicidae, gênero *Anopheles*, subgênero *Nyssorhynchus*. Apresenta pequeno ou médio porte, com tarsos posteriores III a V completamente brancos ou apresentando pequeno anel escuro basal nos tarsômeros (FARAN, 1980).

A espécie *A. darlingi* foi primeiramente descrita por Root, em 1926, no Rio de Janeiro, Brasil. Entretanto, a descrição de Root foi incompleta e baseada em comparações com *Anopheles albitarsis*. Posteriormente, Galvão *et al.* (1937) descreveram a variedade *paulistensis*, coletada perto de São Paulo, com base em comparações com material coletado no Novo Oriente. As variações encontradas nas fêmeas adultas, genitália dos machos e ovos têm sido consideradas variações normais dentro da espécie, sendo a variedade *paulistensis* sinonimizada como *A. darlingi* por Causey *et al.* (1942).

Esse mosquito possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sudeste do México ao norte da Argentina, e do leste dos Alpes andinos até a costa atlântica da América do Sul (FORATTINI, 1987). No Brasil, foi encontrado em quase todos os Estados, com exceção de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FERREIRA, 1964).

A. darlingi utiliza corpos d'água onde existe pouca correnteza para o desenvolvimento de suas larvas e pupas. Seus criadouros são de águas

profundas, limpas, pouco turvas e ensolaradas ou parcialmente sombreadas, onde suas formas imaturas habitam as margens, escondidas entre a vegetação emergente ou flutuante e os detritos vegetais caídos na superfície líquida. Estes criadouros são utilizados, indiscriminadamente, durante todo o ano e, por serem permanentes, funcionam como focos de resistência durante a estação mais seca. Contudo, durante a estação chuvosa, *A. darlingi* pode empregar uma grande variedade de coleções líquidas de tamanho e profundidade menores, tais como: valas, poças e impressões de patas de animais (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Analisando a dinâmica da população de uma área endêmica de malária no Estado do Amazonas, durante um ciclo anual, Hayes & Charlwood (1980) observaram um aumento da população e maior incidência de malária na estação seca.

Estudos realizados com populações de *A. darlingi* provenientes dos rios Solimões, Negro e do lago Coari mostraram diferenças na densidade desse mosquito. No rio Solimões, um rio de água branca, existe uma alta incidência de espécies de culicídeos. O índice de mosquitos por hora picando o homem é alto e os dados mostram que o gênero *Mansonia* é altamente freqüente, sendo *A. darlingi* o de menor densidade. No rio Negro, assim como no lago Coari, ambos de água preta, a incidência de *A. darlingi* foi bastante elevada, representando 99% dos anofelinos em contato com o homem. Esses resultados indicam que existe um risco maior de transmissão da malária nas comunidades que ficam ao longo dos rios de água preta (TADEI *et al.*, 2003).

Esta espécie é considerada a mais antropofílica e endofágica dentre as dos anofelinos das Américas (ARRUDA *et al.*, 1986; FORATTINI,

1987; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1989). Estudos realizados em diferentes localidades da Amazônia revelaram que esse mosquito apresenta um padrão de atividade de picar que se estende por toda a noite. Um padrão bimodal também foi constatado, com dois picos de atividade, sendo um muito intenso no início da noite e outro menor ao amanhecer (TADEI *et al.*, 1984). Ainda em relação a este parâmetro, Tadei (1993) relatou que a atividade pode sofrer modificações em sua intensidade, no início da noite, de acordo com o período de inverno e verão.

Outros dados sobre o padrão de atividade de picar mostraram que *A. darlingi* costuma atacar o homem no intradomicílio, nas horas mais altas da noite. Em áreas onde as habitações são borrifadas internamente com inseticidas, também pode atacar o homem, em elevada densidade, no peridomicílio, nas primeiras horas da noite. Há áreas do país, que correspondem à minoria, onde *A. darlingi* pode ser preferentemente exófago. De qualquer modo, nas áreas onde ocorre, é o anofelino mais freqüente dentro do domicílio (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Segundo Tadei *et al.* (1993), os níveis de exofilia e endofilia são parâmetros relevantes nos estudos das populações de anofelinos. Em locais nos quais predominam a exofilia, o uso de inseticida borrifado no interior das residências exerce pouca ação, devido à falta de contato com os mosquitos, necessitando a implementação de outras medidas de controle.

Apesar de *A. darlingi* ser o principal transmissor de malária na maior parte do território oriental da América do Sul, é relativamente reduzido o número de observações mais recentes, sobre a biologia, a genômica e a

proteômica desse mosquito. Vários autores têm apontado para a variabilidade geográfica do seu comportamento. A antropofilia, a exofilia, e mesmo o ritmo nictemeral, têm revelado variações regionais, em maior ou em menor grau (GIGLIOLI, 1956; CHARLWOOD & HAYES, 1978).

Por causa das variações comportamentais e ecológicas, acreditou-se que *A. darlingi* não seria uma espécie, e sim um complexo de espécies crípticas. Linthicum (1988), analisando populações de *A. darlingi* coletadas por toda a sua distribuição geográfica, encontrou pouca variação morfológica interpopulacional. Portanto, essa espécie foi definida como um subgrupo monotípico e fazendo parte da seção *Argyritarsis*. Entretanto, uma recente análise filogenética (DANOFF-BURG J.A., CONN J.E., dados não publicados) usando dados moleculares e morfológicos sugeriu que a seção *Argyritarsis* é parafilética com respeito à seção *Albimanus* e *A. darlingi* tem sido colocada como categoria basal no subgênero *Nyssorhynchus* (MANGUIN *et al.*, 1999).

Alguns trabalhos usando marcadores genéticos também indicaram que *A. darlingi* não é um complexo de espécies crípticas. Entretanto, muitos estudos ainda são necessários para se ter uma melhor compreensão da complexidade comportamental exibida por esse mosquito (MANGUIN *et al.*, 1999).

Espécies crípticas podem ser definidas como aquelas que apresentam características morfológicas idênticas ou semelhantes, de modo a dificultar a sua identificação, sendo o conjunto dessas espécies denominado de complexo (COLLINS & PASKEWITZ, 1996).

No gênero *Anopheles*, assim como em outros gêneros (*Aedes*, *Culex*), foram descritos complexos de espécies crípticas e o reconhecimento dos membros desses complexos se reveste de grande importância na epidemiologia, pois permite conhecer o papel de cada uma na transmissão da malária (TADEI, 1993).

Durante as primeiras décadas do século XX, os esforços para entender e controlar a transmissão da malária levaram a uma importante descoberta: ficou evidente que o principal vetor dessa doença na Europa, *Anopheles maculipennis*, não era uma espécie monotípica, mas sim um complexo de várias espécies com características morfológicas de difícil distinção (COLLINS & PARKEWITZ, 1996). Esta descoberta, combinada com as demonstrações subseqüentes de que várias diferenças são encontradas entre estas espécies crípticas, com relação à ecologia, à distribuição geográfica e às preferências por hospedeiros, esclareceu o fenômeno do *anofelismo sem malária*, que tem sido observado em várias regiões do mundo, inclusive em estados do Brasil. Contribuiu também para o desenvolvimento de estratégias mais efetivas e racionais para o controle e erradicação dessa enfermidade (MARELLI, 2000).

Outro exemplo de diferenciação em populações de *Anopheles* foi verificado em *Anopheles quadrimaculatus*, uma espécie neártica do complexo *Maculipennis*, que mostra ampla distribuição geográfica em parte da região oriental dos Estados Unidos. Estudos sobre hibridação de populações, análise dos cromossomos politênicos e variabilidade isoenzimática revelaram tratar-se de um complexo, sendo identificadas, até o momento, quatro espécies: A e B

(LANZARO *et al.*, 1988; KAISER *et al.*, 1988a), espécie C (KAISER *et al.*, 1988b; NARANG *et al.*, 1989a) e espécie D (NARANG *et al.*, 1989b).

Analisando várias espécies do complexo *Anopheles culicifacies*, na Índia, Subbarao *et al.* (1998) encontraram diferenças na resistência ao DDT (diclorodifeniltricloroetano). Nesse caso, a resistência ao DDT foi associada, principalmente, a um dos membros, denominado de espécie B, que não é considerado um eficiente vetor de malária nessa região.

Estes exemplos ilustram a necessidade da caracterização das espécies de populações locais em projetos de controles de vetores. A elucidação taxonômica desses complexos poderá ajudar a resolver problemas na epidemiologia da transmissão da malária ou nas medidas de controle, já que diferentes espécies dentro de um complexo exibem diferenças na ecologia, podendo apresentar variações quanto à capacidade vetorial e a resposta a medidas de controle (WHITE, 1982).

I.2. Aspectos gerais da malária na região amazônica

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Na sua forma típica, caracteriza-se por acessos de febre com intervalos de 24, 48 ou 72 horas. A forma mais virulenta é causada pela espécie *Plasmodium falciparum*, que se não for tratada, pode ser fatal em indivíduos não imunes. A outra espécie, *Plasmodium vivax*, não é usualmente letal, mas pode se manifestar no mesmo

indivíduo após três anos de aquisição da infecção por causa das formas resistentes presentes no fígado (SWEENEY, 1999).

A doença é também conhecida por febre terçã, febre quartã, febre palúdica, sezão, impaludismo, febre palustre, maleita, paludismo, febre dos pântanos, febre do brejo e febre romana. Vale ressaltar que o nome malária surgiu por se achar que fosse decorrente do ar contaminado – “mal ar”, pois no início do aparecimento da doença não se sabia da existência do agente etiológico, que foi descoberto somente em 1880 por Charles Alphonse Laveran, e nem do papel do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* como vetor, descoberto oito anos mais tarde por Patrick Manson e Ronald Ross (NEVES, 1988; LITSIOS, 1996).

De todas as afecções consideradas endêmicas, nenhuma marcou a vida humana como a malária, fazendo vítimas ao longo dos séculos, até mais que todas as grandes epidemias de peste, de cólera e de varíola reunidas (SOURNIA & RUFFIE, 1984). Essa endemia continua sendo uma das principais parasitoses, causando de 1,5 a 2,7 milhões de morte por ano, o que corresponde a 4% da mortalidade total mundial (GUERRANTE & BLACKWOOD, 1999).

Ela ocorre em maior incidência nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, principalmente, do continente africano, onde se concentram 90% dos casos anuais. Além dos países africanos, o Brasil e a Índia também apresentam alta incidência de malária (WHO, 1984). O número de casos notificados das Américas em 1997 foi de 1.075.445. O Brasil informou o maior número absoluto de casos, 392.976 (36% do total), o que equivale

quase ao total de toda a sub-região Andina (Bolívia, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela) com 448.867 (43% do total) (OPS, 1998).

A incidência da malária no Brasil tem aumentado durante anos recentes, com mais de 630.000 casos reportados em 1999. Assim sendo, pode-se dizer que a malária é um dos graves problemas de saúde pública no país, afetando grande parte da população rural e, conseqüentemente, causando grandes prejuízos econômicos. Quase toda transmissão de malária (mais de 99%) ocorre na bacia amazônica, habitada por mais de 20 milhões de pessoas, representando aproximadamente 12% da população brasileira (SINGER & CASTRO, 2001).

Nos últimos 30 anos, a cidade de Manaus experimentou três epidemias de malária. Uma delas teve o seu pico máximo durante o ano de 1972, outra, durante o ano de 1993, e a terceira em 1997 (GONÇALVES, 1999). De 1990 a 1994 foram diagnosticados 52.040 casos. Em 1996 foram 70.712 (ALECRIM, 1995). Em 1997, foram registrados 94.377. Já em 1999 atingiu aproximadamente 167.722 casos. Esses resultados demonstram o índice crescente dessa endemia, principalmente, na área urbana (OPS, 1998).

Neste cenário de aumento da incidência da malária na cidade de Manaus, e conseqüentemente, no Estado do Amazonas, destaca-se como fator preponderante a malária urbana, um evento muito freqüente nas últimas décadas. O intenso fluxo migratório das populações do interior para as áreas periféricas dos povoados e cidades contribuiu fortemente para um impacto maior da infecção malárica (TADEI, 2001).

Segundo Tadei (1993), os dados da literatura possibilitaram verificar que existem problemas básicos na biologia de anofelinos brasileiros que precisam ser conhecidos em maior profundidade, os quais constituem parâmetros relevantes no controle da malária. Destes, vale ressaltar:

- conhecimento da morfologia no sentido de definir espécies ou complexos de espécies que mostrem variabilidade, em diferentes áreas de ocorrência, e o nível de diferenciação interpopulacional;
- aspectos adaptativos das espécies face às alterações ambientais, em áreas de assentamentos e de grandes projetos, na região amazônica;
- a colonização em laboratório das espécies de anofelinos brasileiros;
- a biologia reprodutiva das populações evidencia que a importância epidemiológica das populações está correlacionada a aspectos reprodutivos.
- os padrões comportamentais das espécies que são relevantes, pois, além de estarem interrelacionados com as populações humanas, podem nortear sensivelmente as medidas a serem adotadas para evitar o contato homem/vetor;
- a contínua aplicação de DDT na região amazônica, em um período superior a duas décadas, constitui um parâmetro que necessita ser avaliado. Este fator seletivo, correlacionado à variabilidade genética das populações de *A. darlingi*, leva à reestruturação das populações naturais, com predominância de variantes genéticas adaptadas a estas novas condições. Embora evidências para a resistência fisiológica aos inseticidas não tenham sido verificadas, já existem registros de resistência de comportamento.

I.3. Marcadores genéticos RAPD

Por marcador genético define-se todo e qualquer fenótipo molecular, oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). É considerada uma característica qualitativa com herança mendeliana simples, facilmente reconhecida e cuja expressão não é influenciada pelo ambiente (ALFENAS *et al.*, 1998).

Esses marcadores são identificados por técnicas específicas e podem ser empregados nos mais diversos estudos. Dentre elas, tem-se: Tipagem de Isoenzimas, Cariotipagem de cromossomos politênicos, Análises de minissatélites e microsatélites, RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), DNA ribossômico (rDNA), DNA mitocondrial (mtDNA) e RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

No estudo de variabilidade genética, um método baseado na amplificação do polimorfismo do DNA usando “primers” (iniciadores) arbitrários (RAPD), tem sido bastante utilizado. Essa técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos, mas Williams *et al.* (1990) patentearam a tecnologia. É uma variação da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), caracterizada por utilizar apenas um primer, ao invés de um par, sendo este arbitrário, que amplifica regiões desconhecidas da molécula de DNA, utilizadas para a verificação de polimorfismo genético (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Essa técnica não necessita do conhecimento prévio da seqüência a ser amplificada, possibilita um maior

número de marcadores possíveis de serem mapeados, aumentando a possibilidade de identificar grupos de ligação (linkage) relacionados a caracteres quantitativos (Quantitative Trait Locus-QTL's) (WILLIAMS *et al.*, 1990). Além disso, ela permite:

- A análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, em populações de melhoramento e bancos de germoplasma;
- O estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies;
- A construção de mapas genéticos (RAFALSKI *et al.*, 1991; CAETANO-ANNÓLES *et al.*, 1991; WILLIAMS *et al.*, 1993).

A estratégia é utilizar um oligonucleotídeo de 10-15 bases, como iniciador para amplificar o DNA genômico, empregando a reação em cadeia da polimerase (desnaturação, anelamento e extensão enzimática) (KAMBHAMPATI *et al.*, 1992).

Para que haja amplificação, é necessário que a seqüência nucleotídica reconheça um sítio de homologia em uma das fitas com a mesma seqüência, porém com orientação invertida na outra fita da molécula de DNA dentro do intervalo limite da PCR – 4 Kilobases (Kb). Os oligonucleotídeos dispostos nas extremidades da seqüência a ser amplificada fornecem a extremidade 3' livre para a atuação da DNA Polimerase. A reação é aquecida a 90 - 95°C, para permitir a desnaturação dos oligonucleotídeos aos sítios apropriados no DNA molde. Sofre um resfriamento entre 36 - 42°C para permitir o anelamento dos oligonucleotídeos, que irão se ligar nas fitas originais de DNA e também nas sintetizadas nos ciclos anteriores. E, por último, sofre um

resfriamento de aproximadamente 72°C para o ciclo de extensão final (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Em função da grande quantidade de DNA produzido pela reação, os segmentos podem ser visualizados diretamente na forma de bandas num gel de eletroforese. A eletroforese é geralmente conduzida em gel de agarose e a visualização é feita com brometo de etídeo, em luz ultravioleta (KAMBHAMPATI *et al.*, 1992).

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do primer com o sítio de iniciação, e assim, impedir a amplificação de um segmento (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que permite a DNA Polimerase percorrer (< 4000 pares de bases - pb). Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Uma caracterização fundamental dos marcadores RAPDs é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes. Dominância, nesse caso, não se refere ao conceito clássico da interação gênica entre os alelos de um mesmo loco, e sim puramente do ponto de vista da interpretação relativa entre o genótipo e o fenótipo de um indivíduo. Portanto, ao se observar uma banda RAPD no gel, não é possível distinguir se aquele segmento se

originou a partir de uma ou de duas cópias da seqüência amplificada (PUTERKA *et al.*, 1993).

I.4. Análise da variabilidade genética em populações de anofelinos

Uma espécie é formada por populações espalhadas por sua área de distribuição geográfica. Uma população é um conjunto de indivíduos pertencentes à mesma espécie e que convivem em uma área geográfica de tamanho suficientemente restrito, para que qualquer desses indivíduos tenha a chance de se cruzar com qualquer outro do sexo oposto. Os indivíduos de uma espécie raramente se distribuem homoganeamente no espaço. Quase sempre formam agregados, bandos, colônias ou outro tipo de associação, que com o passar dos anos, pode influenciar na estrutura genética dos mesmos (ALFENAS *et al.*, 1998).

A variabilidade genética em populações naturais é considerada um fenômeno biológico de grande importância. Isso tem levado os geneticistas populacionais a investigar métodos para quantificar e explicar essa variabilidade em termos de sua origem, manutenção e importância para a evolução. Ela 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).

Em muitos locos, as freqüências alélicas diferem de uma população para a outra, de modo que a variação resultante de alelos novos que

surge dentro de determinada população, num dado período de tempo, se transforma em variação entre populações (FUTUYMA, 1992).

Os estudos sobre a variabilidade genética em mosquitos mostraram que neste grupo de insetos os níveis de polimorfismos e heterozigosidades médias são bastante heterogêneos. Entre os diferentes gêneros de mosquitos existentes, os mais estudados são: *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, em decorrência de sua importância médica como vetores de doenças, bem como, pela sua complexa posição taxonômica (SANTOS, 1992).

Bianchi (1968) e Bianchi & Pirodda (1968) utilizaram uma fosfatase alcalina como marcador genético para diferenciar espécies do gênero *Anopheles* pertencentes ao complexo *maculipennis*. Esses estudos mostraram bastante eficiência não só para diferenciar mosquitos desse gênero, como também para diferenciar insetos dos gêneros *Aedes* (MATTHEWS & MUNSTERMANN, 1983) e *Culex* (URBALENNI & BULLINI, 1985).

Outro importante trabalho em populações de anofelinos foi o realizado por Bianchi & Chessa (1970), que utilizaram o sistema enzimático xantino desidrogenase (XDH) em *Anopheles atroparvus*. A partir dessa época diversos sistemas enzimáticos em populações de *Anopheles* têm sido analisados, com a finalidade de avaliar o grau de variação inter e intrapopulacional e identificar a presença de possíveis espécies crípticas.

Analisando os sistemas enzimáticos de várias espécies do gênero *Anopheles*, Souza (1980) constatou que a maioria deles é decorrente de herança autossômica codominante. Entre as diferentes enzimas, as esterases são as mais estudadas em mosquitos, possivelmente, por serem mais

polimórficas, por hidrolisarem vários substratos, por serem usadas como marcadores genéticos no estudo das mudanças que ocorrem durante a ontogenia (BRIEGEL & FREYVOGEL, 1971; BRIEGEL, 1972; VEDBRAT & WHITT, 1975; SANTOS, 1979; SANTOS *et al.*, 1985) e por suas relações com a resistência a inseticidas organofosforados (PASTEUR & SINEGRE 1975; SOUZA, 1980).

Narang *et al.* (1979a; 1979b), analisando locos enzimáticos em três espécies do gênero *Anopheles*, verificaram que o grau de variabilidade genética é diferente de loco para loco, sendo *A. aquasalis* e *A. nuneztovari* mais polimórficas que *A. darlingi*, apesar desta apresentar maior identidade genética com *A. aquasalis* ($I = 0,624$) do que com *A. nuneztovari* ($I = 0,497$). Esse estudo foi feito com 19 locos enzimáticos para a primeira espécie, 26 para a segunda e 26 para a terceira.

Wilkerson *et al.* (1995), estudando populações de *A. albitarsis* procedentes do Paraguai, Argentina, Brasil e Venezuela, com base na análise de RAPD-PCR, identificaram quatro espécies diferenciadas geneticamente, denominadas A, B, C e D. Nesse estudo foi proposto que a espécie A provavelmente, seria *A. albitarsis sensu stricto*, pois foi a única espécie coletada em Baradero (Argentina), localidade tipo de *A. albitarsis*, e além disso, a morfologia das amostras estava de acordo com a redescrição da espécie. A espécie C seria *A. marajoara*, coletada na Ilha de Marajó, a localidade tipo da espécie. A espécie D exibiu caracteres morfológicos de *A. deaneorum*. E a espécie B não pôde ser relacionada a nenhuma outra descrita.

No sentido de aumentar o conhecimento molecular em anofelinos, Dimopoulos *et al.* (1996) desenvolveram um mapa genético integrado de *Anopheles gambiae*, usando RAPD-PCR e Seqüências de Sítios Alvo (STs), e compararam esse com as bases de dados já existentes para essa espécie. Nesse estudo, foram obtidas 36 bandas RAPDs, nomeadas R1 a R34 e R36 a R37, que foram clonadas e geraram 34 STs. Quando comparado com as bases de dados BLAST e SWISSPROT não houve significância entre os resultados, revelando a insuficiência dos dados das seqüências de *A. gambiae* existentes.

Analisando a região ITS2 do DNA ribossômico de dezesseis espécies do gênero *Anopheles*, com a finalidade de identificar indivíduos muito semelhantes morfologicamente, Marelli *et al.* (2005) verificaram dois distintos grupos de espécies pertencentes a dois subgêneros, *Anopheles* e *Nyssorhynchus*. O comprimento da região ITS2 variou de 323 a 410 pares de bases, com conteúdo GC variando de 50.7% a 66.5% e identidade de seqüência de 25% a 99%. As espécies pertencentes ao subgênero *Anopheles* foram: *A. eiseni*, *A. mattogrossensis*, *A. mediopunctatus* e *A. peryassui*. As espécies pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus* foram: *A. albitarsis*, *A. aquasalis*, *A. benarrochi*, *A. braziliensis*, *A. darlingi*, *A. deaneorum*, *A. dunhami*, *A. evansae*, *A. nuneztovari*, *A. oswaldoi*, *A. rangeli* e *A. triannulatus*. Para este último subgênero, a árvore que reúne grupos próximos, gerada a partir da relação da seqüência ITS2, é compatível com a chave de taxonomia morfológica estabelecida para espécies amazônicas.

Os primeiros registros sobre a variabilidade cromossômica de *A. darlingi* foram realizados por Guedes *et al.* (1957) e Schreiber & Guedes (1960;

1961). Esses autores assinalaram a ocorrência de duas inversões em um dos cromossomos politênicos, no estado heterozigoto, de material procedente da região de Bocaiúva (MG).

Outro importante estudo sobre a variabilidade genética da espécie foi feito por Kreutzer *et al.* (1972). Foram estudados cromossomos politênicos de duas populações brasileiras de *A. darlingi*, sendo uma da Amazônia e outra do sul do país, os quais identificaram nove inversões independentes e um arranjo complexo. Esses resultados indicaram que a população do norte é altamente polimórfica quando comparada com a população do sul, sendo que essa última fixou determinados arranjos com reduzido polimorfismo.

Analisando o polimorfismo cromossômico de populações de *A. darlingi* da BR-174 (Manaus/Boa Vista), Tadei & Santos (1982) detectaram doze arranjos para essa espécie. A análise da constituição cromossômica evidenciou que nenhuma fêmea produziu descendentes homozigotos para os três pares de cromossomos, simultaneamente. Altas frequências de heterozigotos foram observadas, com valores significativos acima de 50%, e os resultados foram interpretados como indicativos de uma adaptabilidade maior dos heterozigotos, em relação à heterogeneidade ambiental.

Rafael & Tadei (1998; 2000) estudando cariótipos metafásicos de células ganglionais cerebrais e bandeamento C de duas populações de *A. darlingi* da Amazônia encontraram diferenças quanto à constrição secundária dos cromossomos. A população de Manaus apresentou diferença no cromossomo II e a de Macapá no cromossomo III. Duas formas de

cromossomo X foram observadas, X1 – marcado em cerca de 1/3 a partir do centrômero e o X2 – com marcação apenas centromérica. O padrão de marcação dos blocos heterocromáticos dos cromossomos sexuais e da região centromérica dos autossomos mostrou apenas variação intra-específica.

Santos (1979) e Santos *et al.* (1985) trabalhando com o polimorfismo enzimático de *A. darlingi*, realizado com esterases em populações da BR-174 (Manaus/Boa Vista), obtiveram um perfil eletroforético complexo e modificações na expressão gênica dessa espécie durante o desenvolvimento ontogenético.

Análises feitas em quatro populações da Amazônia de *A. darlingi*, baseadas em 19 locos enzimáticos, mostraram que as populações são muito semelhantes geneticamente, mas que apresentam certa diferenciação genética intrapopulacional maior do que a interpopulacional, resultante do excesso de indivíduos homozigotos, dentro de cada população (SANTOS, 1992; SANTOS *et al.*, 1996). No entanto, pequena divergência interpopulacional foi obtida por Freitas-Sibajev *et al.* (1995) na população de Manaus comparada com três outras populações da Amazônia e duas do sudeste brasileiro, num estudo baseado em sítios de restrição do DNA mitocondrial e caracteres morfológicos. Nesse estudo, a divergência nucleotídica (0,011 - 0,019) mostrou-se dentro do limite inferior de distância genética interespecífica reportado para membros do complexo *Anopheles quadrimaculatus* (MITCHELL *et al.*, 1992). Essas diferenças têm levado alguns autores a proporem a hipótese de *A. darlingi* ser um complexo de espécies crípticas (CHARLWOOD, 1996; STEINER *et al.*, 1982).

Entretanto, estudos mais recentes baseados em caracteres morfológicos, isoenzimas, DNA mitocondrial, DNA ribossômico e RAPD, feitos em populações procedentes de Belize, Bolívia, Brasil, Guiana Francesa e Venezuela, mostraram que *A. darlingi* é uma espécie monotípica, embora significativa divergência genética tenha sido observada na população de Mato Grosso (Brasil), quando comparada com outras populações brasileiras (MANGUIN *et al.*, 1999).

Uma análise visando selecionar locos polimórficos baseada em marcadores microssatélites em populações de *A. darlingi* de Capanema (Estado do Pará) revelou o desenvolvimento e a otimização de oito locos. Estes, apresentaram heterozigosidade média esperada (H_e) variando de 0,632 a 0,987. Os resultados indicaram que esses locos são apropriados para futuras análises de variabilidade genética populacional (CONN *et al.*, 2001).

Estudando populações de *A. darlingi* provenientes dos Estados do Amapá, Pará e Mato Grosso, usando polimorfismos de microssatélites, CONN *et al.* (2006) encontraram valores de heterozigosidade média esperada e de F_{ST} bastante elevados ($H_e= 0,834$; $F_{ST}= 0,1841$). Os resultados indicaram diferenças significativas entre as regiões norte e sul do rio Amazonas, sugerindo um grau de isolamento genético, atribuído, possivelmente, a isolamento por distância.

II – OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a variabilidade genética entre populações de *A. darlingi*, procedentes de localidades ao longo dos rios Negro e Solimões (AM), utilizando marcadores moleculares de RAPD-PCR

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a distribuição de mosquitos no intra, peri e extradomicílio;
2. Analisar a variabilidade genética intra, peri e extradomiciliar, e correlacionar com a capacidade vetorial e a adaptabilidade da espécie;
3. Identificar a presença de possíveis variantes alélicas que possam estar separadas por barreiras geográficas (rios Negro e Solimões);
4. Verificar a função dos rios Negro e Solimões como agentes mantenedores e propiciadores da diversidade genética desses insetos na Amazônia;
5. Determinar os índices de similaridade e distância genética a partir do índice de Nei (1978);
6. Determinar o grau de diferenciação genética entre as populações;
7. Estimar os níveis de polimorfismo e heterozigosidade média entre as quatro populações do Estado do Amazonas.

III – MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Área de coleta

Foram estudadas populações de *A. darlingi* procedentes de quatro municípios do Estado do Amazonas (Figura 1): Coari, que está localizada à margem direita do rio Solimões; Tabatinga, que está localizada à margem esquerda desse rio; Manaus e São Gabriel da Cachoeira, que estão localizadas à margem esquerda do rio Negro.



Figura 1 – Imagem de Satélite do Estado do Amazonas, destacando as quatro cidades onde foram feitas coletas de *Anopheles darlingi*.

FONTE: www.siglab.inpa.gov.br

III.2. Obtenção das Amostras

Para a obtenção das amostras, os mosquitos foram coletados na forma alada, entre 18:00 e 24:00 horas, nos meses de janeiro e julho de 2006. Os espécimes foram capturados com auxílio de aspirador, quando pousaram nas pessoas para se alimentar. As fêmeas foram transportadas para o Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e após o repasto sanguíneo, que foi feito usando um hamster (*Mesocricetus auratus*), foram isoladas para postura individual. A identificação de adultos, ovos e larvas foi feita utilizando as chaves de Gorham *et al.* (1967) e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994).

Na manutenção dos mosquitos em laboratório, foi utilizado o método descrito em Santos *et al.* (1981). Cada desova foi colocada em cubas esmaltadas de 13 cm e 16 cm de diâmetro, por 6 cm de altura. Em cada cuba, foram adicionados 450 ml e 500 ml de água destilada, respectivamente. A troca de água foi realizada a cada dois dias. A alimentação das larvas foi feita de acordo com a comumente usada no laboratório, que apresenta modificação segundo a metodologia descrita por Rabanni *et al.* (1976) e Santos (1979). O alimento foi preparado à base de pó de fígado e farinha de peixe, na proporção de 1:8, diluídos em 500 ml de água destilada. Esta mistura foi feita no momento de ser colocada nas cubas, sendo cerca de 2 ml para cada cuba. Em seguida, uma pequena quantidade (ponta da espátula) de germe de trigo foi também adicionada às cubas.

Os mosquitos foram criados em um insetário com temperatura constante de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa entre 80% e 90%. Algumas

desovas, após a eclosão das larvas, foram mantidas até atingirem o 4º estágio larval, e outras foram mantidas até atingirem o estágio adulto. Feito isso, os espécimes foram mantidos sob congelamento a -70°C até o início das análises moleculares.

Além de estudar linhagens F1 criadas em laboratório, foram analisados mosquitos adultos obtidos da própria natureza. Para isso, as fêmeas foram coletadas, a cada 60 minutos, no período compreendido entre 14:00 e 06:00 horas, nos meses de janeiro e julho de 2006. Os espécimes foram capturados com auxílio de aspirador, quando pousaram para se alimentar nas pessoas e no gado. Foram coletados indivíduos no curral, no peri e no intradomicílio de cada ponto de coleta.

A identificação dos mosquitos foi feita usando as chaves de Gorham *et al.* (1967) e Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). Cada indivíduo foi colocado em tubos eppendorf (1,5 ml) contendo Isopropanol, devidamente etiquetados com hora e local de coleta. Em seguida, os mesmos foram transportados para o Laboratório de Malária e Dengue do INPA, sendo mantidos em freezer a -20°C até o início das análises moleculares.

III.3. Extração do DNA genômico de linhagens de mosquito obtidas em laboratório - Protocolo I

Para a extração do DNA de linhagens de mosquito obtidas em laboratório seguiu-se o protocolo descrito em Wilkerson *et al.* (1995), com algumas modificações. Foi extraído DNA genômico de 50 indivíduos da

população de São Gabriel da Cachoeira e 50 da população de Tabatinga, totalizando 100 amostras.

Etapa 1: Foram realizadas extrações individuais de larvas de 4^o estágio, onde cada larva foi homogeneizada em 50 µL de Tampão de Lise - TL (SDS 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 25 mM, pH 8.0 e NaCl 52 mM) com auxílio de um bastão de acrílico, em microtubos do tipo Eppendorf de 1,5 ml. Em seguida, foram adicionados 100 µL de TL para remover resíduos das paredes do tubo e do bastão. As amostras foram encubadas a 65°C por 30 minutos em banho-maria. Posteriormente foram submetidas à centrifugação a 14000 rpm por 30 segundos e então foram adicionados 100 µL de Acetato de Potássio em cada tubo. As amostras foram misturadas em vórtex e mantidas em gelo por 1 hora no refrigerador. Após esse período, foram centrifugadas novamente a 14000rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos Eppendorf de 1,5 ml. Então foram adicionados 500 µL de Etanol (100%) gelado e as amostras foram mantidas a -20°C por 1 hora (ou “overnight”).

Etapa 2: Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos e descartado o sobrenadante. Adicionou-se ao precipitado 500 µL de Etanol (70%) gelado e centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos. Foi retirado novamente o sobrenadante e secado o precipitado em fluxo laminar. Após a evaporação do Etanol, os precipitados foram ressuspensos em 15 µL de água Milli-Q autoclavada e estocado em temperatura a -20°C para posterior quantificação.

III.4. Extração do DNA genômico de mosquitos obtidos da natureza – Protocolo II

Foi extraído DNA genômico de 50 indivíduos da população de Coari e 50 da população de Manaus, totalizando 100 amostras. Para isso, também foi utilizado o protocolo descrito em Wilkerson *et al.* (1995), com algumas modificações, conforme abaixo.

Etapa 1: Foram realizadas extrações individuais de mosquitos adultos, onde cada mosquito foi homogeneizado em 50 μ L de TL, com auxílio de um bastão de acrílico, em microtubos do tipo Eppendorf de 1,5 ml. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de TL para remover resíduos das paredes do tubo e do bastão e 15 μ L de solução de Proteinase K. As amostras foram encubadas a 50°C por 1 hora em banho-maria. Posteriormente foram adicionados 150 μ L de Fenol em TE (Tris-EDTA). Os tubos foram misturados em vórtex e centrifugados a 14000 rpm por 1 minuto. Em seguida, as fases aquosas (superiores) foram transferidas para novos tubos e foram adicionados 300 μ L de Fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico. Os tubos foram misturados novamente em vórtex e centrifugados a 14000 rpm por 1 minuto. Novamente, as fases aquosas foram transferidas para novos tubos, e estes receberam 600 μ L de Clorofórmio-álcool-isoamílico. Os tubos foram misturados em vórtex, centrifugados a 14000 rpm por 1 minuto e as fases aquosas transferidas para novos tubos. Adicionou-se 120 μ L de Acetato de Sódio e 1200 μ L de Etanol (100%) gelado. Em seguida, as amostras foram mantidas a -20°C por 1 hora (ou “overnight”).

Etapa 2: Nessa etapa foram realizados os mesmos procedimentos descritos na etapa 2 do protocolo anterior.

III.5. Quantificação do DNA genômico

Após a extração foi realizada a quantificação para verificar a concentração do DNA das amostras, pois normalmente as bases aminadas encontradas nos ácidos nucleicos são cromóforos muito fortes que permitem uma rápida e eficiente quantificação desses polímeros em solução. As quatro bases encontradas no DNA absorvem entre 250 a 270 nm, de forma que é observado um pico em torno de 260 nm em DNA de alta massa molecular (AZEVEDO *et al.*, 2003).

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Gene Quant Pro-Pharmacia) com os seguintes procedimentos: Adicionou-se 68 μL de água Milli-Q autoclavada e 2 μL do DNA (fator de diluição 35) na cubeta. Em seguida foram realizadas as leituras. Para a amplificação do DNA a concentração considerada ótima foi entre 100 a 3000 ng/ μL e razão de 1400 a 2000, conforme Caccone *et al.* (1996).

Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água Milli-Q autoclavada para a obtenção de amostras com uma concentração final de 10 ng/ μL de solução. Posteriormente, tanto as amostras puras (DNA estoque) quanto às diluídas foram mantidas em freezer a -20°C até o início da amplificação via RAPD.

III.6. Amplificação do DNA e Corrida Eletroforética

No presente trabalho foram feitas amplificações de 50 amostras de cada população para cada primer, totalizando 2000 amplificações. A reação de amplificação do DNA de cada indivíduo foi realizada mediante o protocolo descrito em Wilkerson *et al.* (1995), com algumas modificações. Foram utilizadas as amostras diluídas do DNA genômico em tubo tipo Eppendorf de 0,2 ml com a seguinte composição:

- 1 μL de DNA;
- 2,5 μL de PCR buffer;
- 1,5 μL de MgCl_2 ;
- 2,5 μL de dNTP;
- 2,5 μL de iniciador (primer);
- 0,3 μL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen);
- 14,7 μL de água Milli-Q autoclavada.

O volume total da reação foi de 25 μL . Os tubos foram levados ao termociclador (marca Eppendorf), programado para realizar 45 ciclos com os seguintes perfis de temperatura:

- 1 minuto a 94°C, para desnaturação das fitas de DNA;
- 1 minuto a 36°C, para anelamento dos iniciadores (primer);
- 2 minutos a 72°C, para alongamento das fitas sintetizadas;
- 7 minutos a 72°C, para o ciclo de alongamento final.

Os produtos amplificados foram fracionados em gel de Agarose (1,5%). A eficiência da amplificação foi verificada mediante a aplicação de 12

μL do produto amplificado de cada reação e 3 μL de Azul de Bromofenol no gel (1,5%), e Marcador Molecular (Ladder 100 pb - Invitrogen).

O gel foi submetido à corrida eletroforética por 4 horas, sendo 10 minutos a 70 V e 230 minutos a 120 V. Após esse período, cada gel foi corado com Brometo de Etídeo (5 ng/ μL) e fotografados num aparelho de fotodocumentação de gel, modelo Eagle Eye II (marca Stratagene), sob luz ultravioleta de 300 nm de comprimento de onda.

III.7. Primers

Foram utilizados dez oligonucleotídeos – primers (Operon Technologies Inc. Alameda, CA.), sendo seis baseados nos trabalhos de Sanguino & Santos (2002), e quatro obtidos a partir de testes realizados em laboratório. Para a análise da variabilidade genética com base no comportamento da atividade de picar do mosquito também foram usados os dez oligonucleotídeos.

Os primers utilizados por Sanguino & Santos (2002) apresentam as seguintes seqüências:

AM01: 5'-CAGGCCCTTC-3';

AM05: 5'-GTGACGTAGC-3';

AM06: 5'-GGGTAACGCC-3';

AM08: 5'-GTTGCGATCC-3';

AM09: 5'-GGACTGGAGT-3';

AM20: 5'-TGCCGAGCTG-3'.

Foram feitos testes rápidos com 07 primers do Kit K (OPK-02, OPK-04, OPK-07, OPK-08, OPK-10, OPK-13 e OPK-16) (Operon Technologies Inc. Alameda, CA.), visando à seleção de mais quatro primers. O critério utilizado para isso foi o padrão de bandas fortes e claramente distinguíveis das bandas vizinhas, para evitar ambigüidade. Os primers selecionados foram:

OPK04: 5'-CCGCCCAAAC-3';

OPK07: 5'-AGCGAGCAAG-3';

OPK10: 5'-GTGCAACGTG-3';

OPK16: 5'-GAGCGTCGAA-3'.

III.8. Análise Estatística

III.8.1. Freqüência Alélica

As bandas nos géis corados com Brometo de Etídio foram analisadas por comparação, utilizando-se o critério de ausência e presença dessas bandas. Os fragmentos foram selecionados e os tamanhos dos pares de bases determinados para cada fragmento, de acordo com o Marcador Molecular (Ladder 100pb - Invitrogen).

Marcadores de RAPD foram tratados como alelos mendelianos do tipo dominante. Nesse caso, é impossível a estimativa direta das freqüências alélicas, sendo essas obtidas a partir da raiz quadrada das freqüências de bandas ausentes observadas.

Os dados de RAPD são de natureza binária (presença ou ausência de bandas) e a partir das matrizes (binárias) são calculados os

coeficientes de similaridade. Embora a técnica de RAPD tenha limitações, como a de não poder identificar genótipos heterozigotos de homozigotos dominantes, seu poder de detecção de polimorfismo é uma vantagem significativa para a determinação da variabilidade genética.

Para a análise da variabilidade genética das populações de *A. darlingi* utilizou-se o Programa Tools for Population Genetics Analyses (TFPGA) na Opção – Marcadores Dominantes para Organismos Diplóides (MILLER, 1997). Nesse caso, cada banda é assumida como sendo um loco. A presença da banda representa o alelo dominante. Logo, esta contém os dois genótipos (homozigoto dominante e heterozigoto). Por outro lado, a ausência da banda representa o genótipo homozigoto recessivo. Além disso, foi assumido que as freqüências genótípicas nos locos RAPD estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

III.8.2. Análise da Estrutura Genética Populacional

O parâmetro utilizado para medir o grau de fixação gênica resultante da endogamia biparental é o coeficiente F , de Wright (1951), definido como a correlação entre os alelos nos gametas que formam um zigoto. O referido autor utilizou o índice F inicialmente para descrever a endogamia sob diferentes esquemas de cruzamento. Mais tarde, estendeu esse procedimento para quantificar a diferenciação genética de populações, seguindo o nível hierárquico de endogamia.

A estatística F baseia-se na probabilidade de obter o mesmo alelo por amostragem em uma população diplóide finita com N indivíduos. Essa

probabilidade é de $1/(2N)$. Conseqüentemente, uma proporção $1/(2N)$ dos zigotos formados será portadora de alelos idênticos por descendência em cada loco, em função simplesmente do tamanho efetivo da população.

Wright descreveu os seguintes coeficientes de endogamia, aplicáveis a uma população com um nível hierárquico de subdivisão:

F = o desvio das freqüências genóticas da população em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esses desvios são aplicáveis por cruzamentos não ao acaso (compreendendo a endogamia por autofecundação, quando esta for possível, e a endogamia biparental).

Θ = o coeficiente de ancestralia, representando a probabilidade de que dois indivíduos pertencentes a subpopulações diferentes possuam um alelo idêntico por descendência (ou seja, proveniente de um ancestral comum).

f = a endogamia, no nível de indivíduo (ou seja, a probabilidade de que os dois alelos presentes no mesmo indivíduo sejam idênticos por descendência).

O coeficiente f apresenta as seguintes propriedades:

$$f = (F - \Theta)/(1 - \Theta) \text{ e } f = (1 - t)/(1 + t)$$

sendo t a taxa de fecundação cruzada na população. Como $t = 1 - s$, sendo s o coeficiente de autofecundação, pode-se demonstrar que

$$f = s/(2 - s)$$

Com esses coeficientes, descreveu-se a variância genética das freqüências alélicas na população para locos com dois alelos como

$$\text{Var}(p) = p(1-p) [\Theta + (F - \Theta)/N + (1 - F)/2N]$$

e a partir dos coeficientes f , F e Θ derivou a seguinte relação:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{ST}) \cdot (1 - F_{IS})$$

em que os diferentes valores de F representam, respectivamente,

$$F_{IT} = F \qquad F_{IS} = f \qquad F_{ST} = \Theta$$

Nesse trabalho será analisado o valor de F_{ST} , que é o índice que avalia o grau de diferenciação das populações (NEI, 1978). Esses dados serão calculados usando o programa Tolls for Population Genetics Analyses (TFPGA) e a significância desse coeficiente será testada por χ^2 . Para isso, os valores de χ^2 e graus de liberdade serão:

$$\chi^2 = 2N(a-1)F_{ST} \qquad GL = (a-1)(n-1)$$

onde,

N = número de indivíduos na população

a = número de alelos por loco

n = número de subpopulações.

III.8.3. Análise de Distância e Similaridade Genética entre as Populações

Os valores de similaridade e distância genética foram obtidos a partir do índice de Nei (1978), usando o programa Tolls for Population Genetics Analyses (TFPGA). A similaridade genética se fundamenta na probabilidade de amostrar alelos idênticos entre duas populações, dividida pela probabilidade de

amostrar alelos idênticos em cada uma das duas populações. É obtida através da seguinte fórmula:

$$I = \frac{xy}{\sqrt{(x+y)}}$$

onde x é a frequência do alelo A na população x e y a frequência do mesmo alelo na população y. Se duas populações x e y são monomórficas para o mesmo alelo, dizemos que a identidade é igual a um. No entanto, quando duas populações x e y são monomórficas para alelos diferentes, a identidade é igual a zero. A distância genética entre duas populações é dada pelo negativo do logaritmo neperiano da identidade.

$$D = -1_n I$$

A similaridade segue uma escala de 0 a 1 e a distância de 0 a ∞ (infinito).

III.8.4. Análise de Dendrograma

Com base na matriz de distância e similaridade genética entre as populações foi construído um dendrograma, mostrando o agrupamento das mesmas a partir de suas frequências alélicas. Para isso, utilizou-se o método UPGMA (Unweighted Pairing Group Method with Arithmetic Mean) do programa TFPGA.

Neste método, o critério utilizado para formação dos grupos é a média das distâncias entre todos os pares de itens que formam cada grupo,

como a própria denominação informa. A distância intergrupo é a média das distâncias pareadas dos membros dos dois grupos (ALFENAS *et al.*, 1998). Algebricamente, a distância entre os itens i e j , para $i \neq j$, é dada por

$$d_{(ij)} = \text{mín} (d_{ij})$$

A distância do item K em relação ao primeiro grupo formado por i e j , com $k \neq i, j$, fica definido por

$$d_{(ij)k} = \frac{1}{2} (d_{ik} + d_{jk})$$

E a distância entre dois grupos (ij) e (kl) , com $i, j \neq k, l$, é dada por

$$d_{(ij)(kl)} = \frac{1}{4} (d_{ik} + d_{il} + d_{jk} + d_{jl})$$

Neste método, as populações com menores distâncias são sucessivamente agrupadas até construir um diagrama hierárquico que representa a proximidade das diferentes populações a diferentes níveis de distância genética (MILLER, 1997).

IV - RESULTADOS

IV.1 Análise descritiva dos locos RAPD

A reação em cadeia da polimerase do DNA de *A. darlingi*, com um único primer de seqüência arbitrária, resultou na amplificação de uma série de fragmentos. Destes, foram selecionados 152 locos (bandas) para a análise da variabilidade genética, os quais apresentaram peso molecular variando de aproximadamente 200 a 2300 pb (Tabela 1).

Tabela 1 – Designação e seqüência dos primers, número de locos e tamanho dos fragmentos obtidos da amplificação do DNA de populações de *A. darlingi* do Estado do Amazonas, usando RAPD.

Designação/Seqüência do Primer	Quantidade de Locos selecionados	Tamanho dos Fragmentos (Pares de base)
AM01/5'-CAGGCCCTTC-3'	15	400, 500, 700, 800, 900, 950, 1050, 1100, 1150, 1500, 1650, 1750, 2100, 2200 e 2300
AM05/5'-GTGACGTAGC-3'	18	400, 480, 520, 600, 700, 780, 850, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1700, 1900, 2000, 2100 e 2300
AM06/5'-GGGTAACGCC-3'	14	370, 430, 570, 600, 650, 700, 780, 870, 900, 1020, 1050, 1300, 1700 e 2000
AM08/5'-GTTGCGATCC-3'	18	400, 480, 520, 600, 650, 700, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1180, 1300, 1500, 1750, 1900 e 2072
AM09/5'-GGACTGGAGT-3'	14	200, 400, 520, 600, 700, 760, 800, 1100, 1160, 1200, 1300, 1750, 2072 e 2200
AM20/5'-TGCCGAGCTG-3'	21	300, 400, 480, 520, 570, 700, 760, 850, 900, 1000, 1050, 1100, 1200, 1250, 1300, 1400, 1470, 1530, 1750, 1900 e 2100
OPK04/5'-CCGCCCAAAC-3'	14	580, 600, 640, 700, 800, 920, 950, 1080, 1170, 1250, 1450, 1520, 1900 e 2072
OPK07/5'-AGCGAGCAAG-3'	12	250, 330, 500, 550, 600, 720, 850, 1000, 1250, 1420, 1530 e 1850
OPK10/5'-GTGCAACGTG-3'	13	350, 400, 550, 700, 800, 950, 1000, 1100, 1300, 1400, 1600, 1750 e 2072
OPK16/5'-GAGCGTCGAA-3'	13	400, 480, 550, 620, 780, 1000, 1100, 1200, 1300, 1500, 1600, 2072 e 2100

Para o primer AM01, foram selecionados 15 locos/bandas, que variaram de 400 a 2300 pb (Figura 2). Verificou-se um padrão de bandas muito semelhantes, exceto para a população de São Gabriel da Cachoeira, que apresentou maior número de fragmentos amplificados. Bandas com cerca de 900 e 1650 pb foram detectadas em todas as populações. Outras, presentes nas regiões com cerca de 400, 500 e 550 pb, foram detectadas somente na população de São Gabriel da Cachoeira.

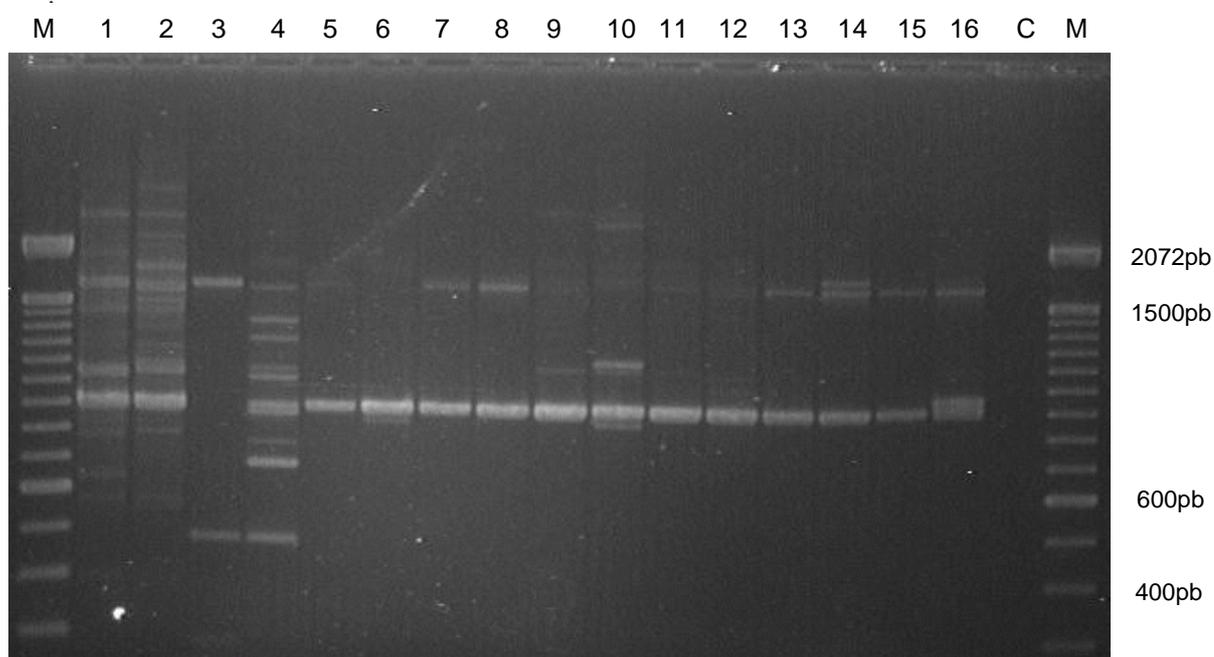


Figura 2 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM01. De 1 a 4 (São Gabriel da Cachoeira), de 5 a 8 (Coari), de 9 a 12 (Tabatinga), de 13 a 16 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

O perfil eletroforético das populações de *A. darlingi* usando o primer AM05 revelou amplo número de fragmentos amplificados e padrões de bandas diferenciais (Figura 3). Para esse primer, foram selecionados 18

locos/bandas, que variaram de 400 a 2300 pb. Observou-se que pelo menos uma banda, com cerca de 480 pb, foi revelada em todas as populações. Enquanto que outras foram mais específicas. Na região com cerca de 780 pb foram detectadas bandas presentes somente nas populações de Coari e Tabatinga. Outra região, com aproximadamente 1700 pb, foi revelada somente na população de São Gabriel da Cachoeira. Em todos os géis analisados, observou-se a presença simultânea de dois locos, situados nas regiões com cerca de 400 e 520 pb (bandas destacadas na Figura 3), o que talvez indique uma certa ligação entre ambos.

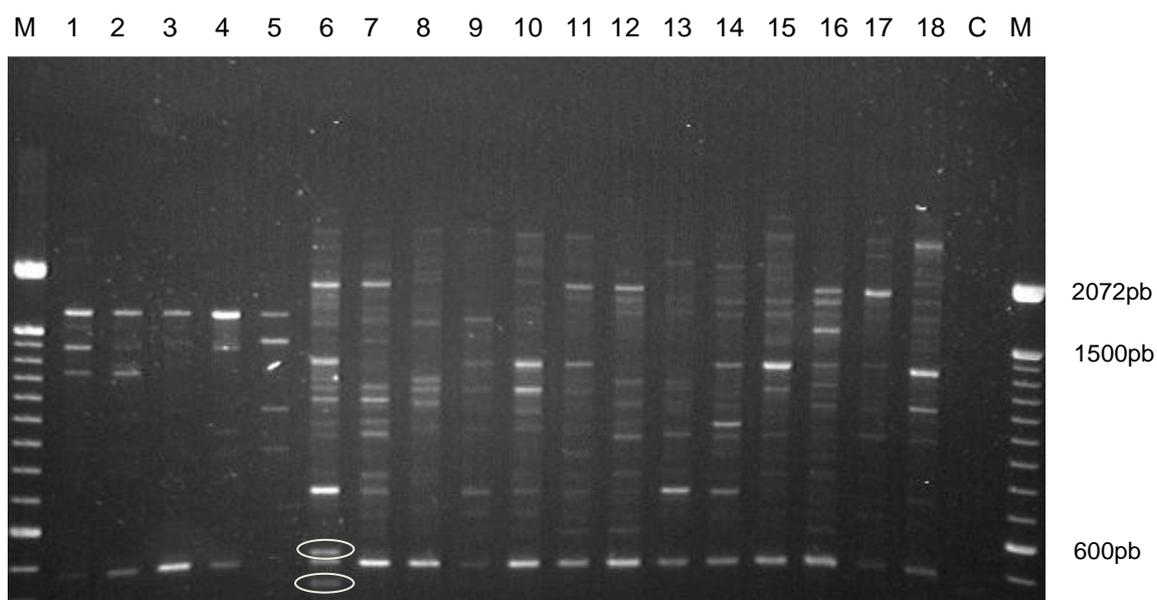


Figura 3 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM05. De 1 a 5 (São Gabriel da Cachoeira), de 6 a 10 (Coari), de 11 a 14 (Tabatinga), de 15 a 18 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

O perfil eletroforético das populações de *A. darlingi* usando o primer AM06, revelou padrões de bandas muito semelhantes (Figura 4). Para

esse primer, foram selecionados 14 locos/bandas, que variaram de aproximadamente 370 a 2000 pb. Desses, quatro foram detectados em todas as populações, com fragmentos de aproximadamente 370, 780, 1020 e 1030 pb. Na população de São Gabriel da Cachoeira foram observadas duas regiões, com cerca de 570 e 2000 pb, que estavam ausentes nas demais.

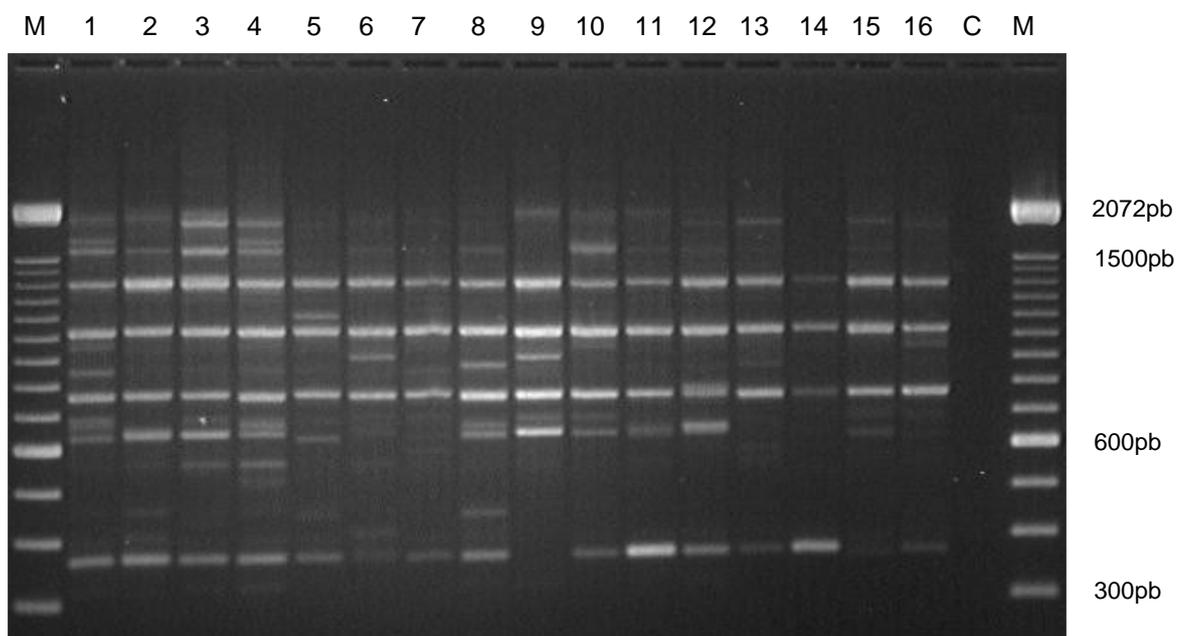


Figura 4 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM06. De 1 a 4 (São Gabriel da Cachoeira), de 5 a 8 (Coari), de 9 a 12 (Tabatinga), de 13 a 16 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

Para o primer AM08 foram selecionados 18 locos/bandas, que variaram de aproximadamente 400 a 2072 pb (Figura 5). O perfil eletroforético revelou um grande número de fragmentos amplificados, exceto para a população de São Gabriel da Cachoeira, que apresentou poucos fragmentos e padrões de bandas diferenciais. Nela, foram detectadas três regiões, com

cerca de 420, 600 e 1700 pb, que estavam ausentes nas outras populações. Por outro lado, outras três regiões, com aproximadamente 650, 1300 e 1900 pb, foram reveladas em todas as populações, com exceção de São Gabriel da Cachoeira. Pelo menos dois locos, com cerca de 1000 e 2072 pb, foram revelados em todas as populações.

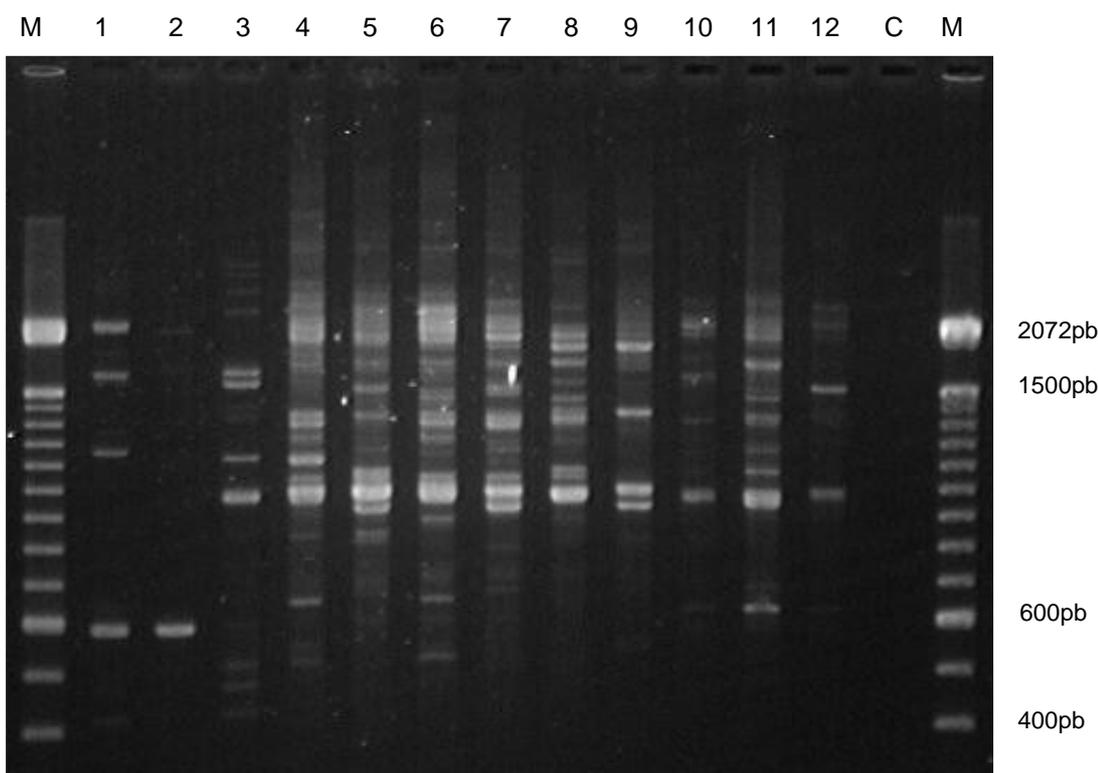


Figura 5 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM08. De 1 a 3 (São Gabriel da Cachoeira), de 4 a 6 (Coari), de 7 a 9 (Tabatinga), de 10 a 12 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

O perfil eletroforético das populações de *A. darlingi* usando o primer AM09, revelou amplo número de fragmentos amplificados e padrões de bandas diferenciais (Figura 6). Para esse primer, foram selecionados 14 locos/bandas, que variaram de aproximadamente 200 a 2200 pb. Observou-se certa diferenciação com relação aos padrões de bandas nas populações de

São Gabriel da Cachoeira e Manaus. Pelo menos três locos, com cerca de 400, 700 e 760 pb, foram detectados em todas as populações. Duas regiões, com cerca de 200 e 1650 pb, foram reveladas somente na população de São Gabriel da Cachoeira. Na população de Manaus foi observada a presença de uma região, com cerca de 900 pb, que esteve ausente nas demais.

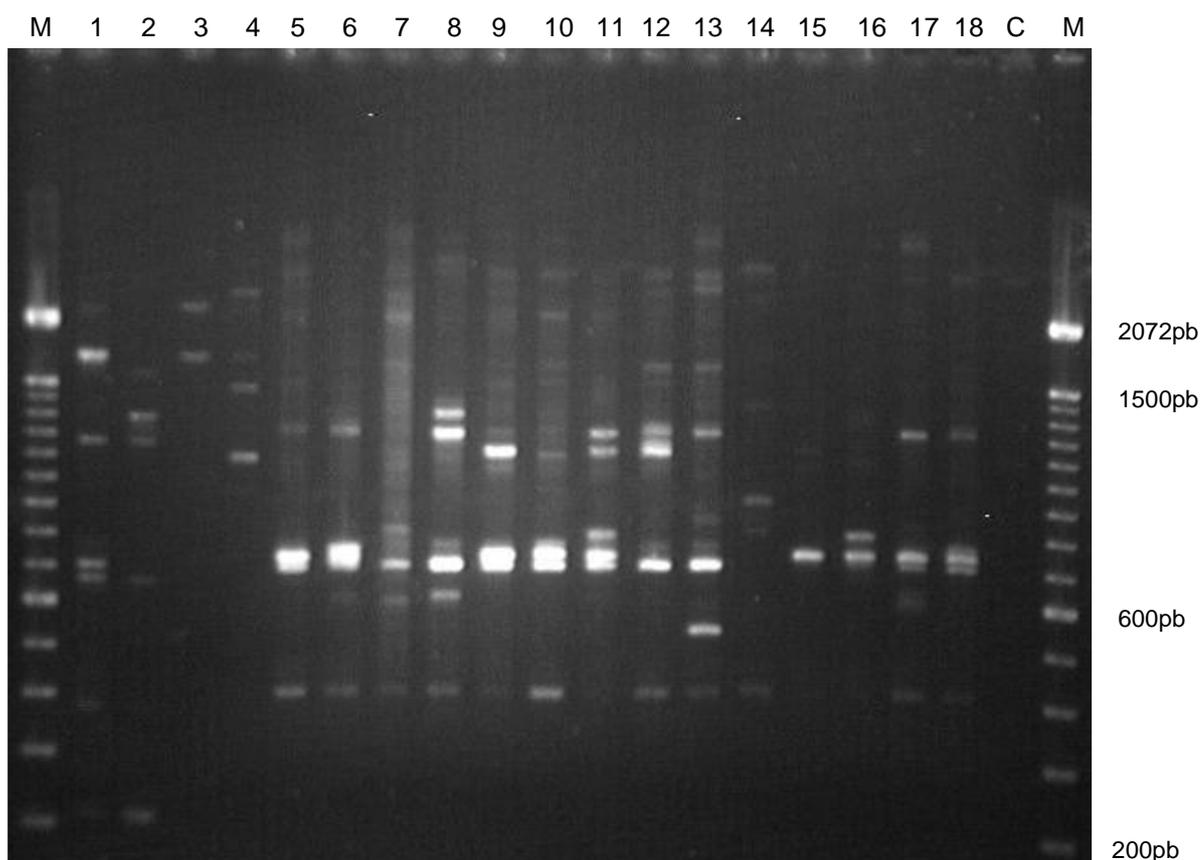


Figura 6 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM09. De 1 a 4 (São Gabriel da Cachoeira), de 5 a 8 (Coari), de 9 a 13 (Tabatinga), de 14 a 18 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

O primer AM20 foi o que apresentou maior número de fragmentos amplificados, sendo selecionados 21 locos/bandas, que variaram de 300 a 2100 pb (Figura 7). Observou-se que pelo menos quatro locos, com cerca de 700, 1100, 1400 e 2100 pb, foram revelados em todas as populações. Observou-se ainda que as populações de São Gabriel da Cachoeira e de

Manaus mostraram padrões de bandas diferenciais. Para a primeira, foram reveladas duas regiões, com cerca de 400 e 500 pb, que não foram detectados nas outras populações. Para a segunda, não foi detectada a presença de bandas com cerca de 760 pb, que foram reveladas nas demais.

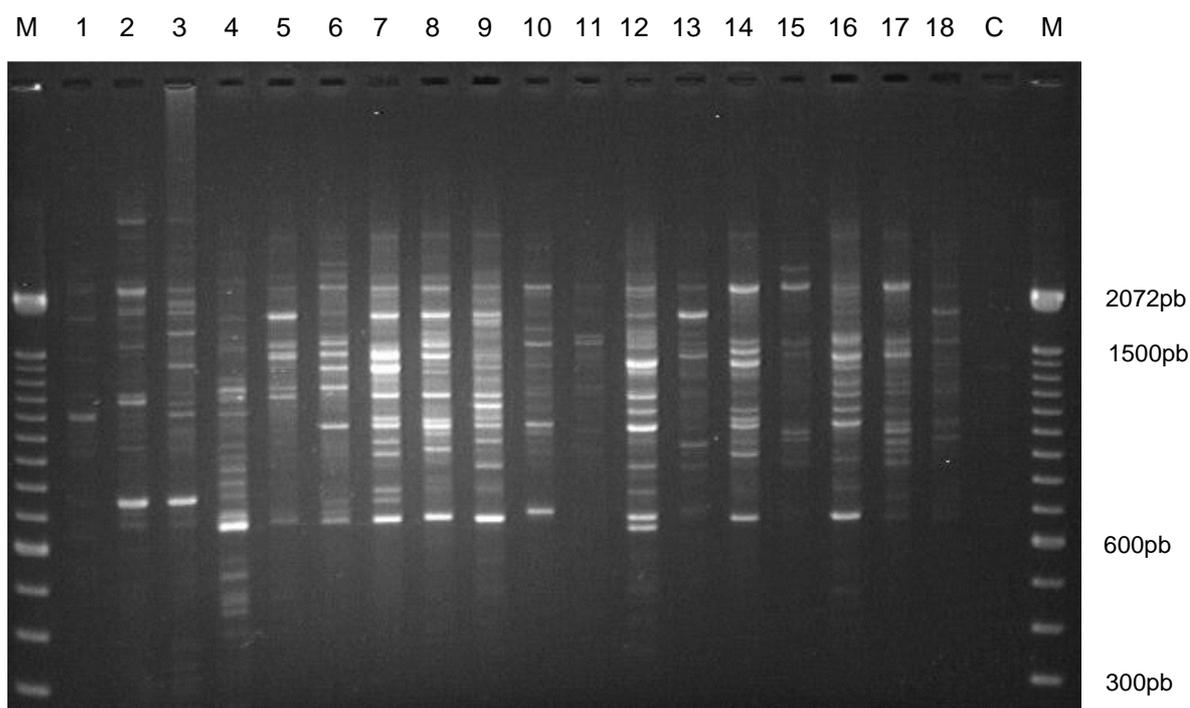


Figura 7 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer AM20. De 1 a 4 (São Gabriel da Cachoeira), de 5 a 8 (Coari), de 9 a 13 (Tabatinga), de 14 a 18 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

Para o primer OPK04 foram selecionados 14 locos/bandas, que variaram de 580 a 2072 pb (Figura 8). Observaram-se padrões de bandas semelhantes entre as populações. Cerca de cinco locos, com aproximadamente 600, 920, 1170, 1400 e 2072 pb, foram revelados em todas elas. Entretanto, um loco, com cerca de 800 pb, foi revelado somente nas populações de São Gabriel da Cachoeira e de Manaus.

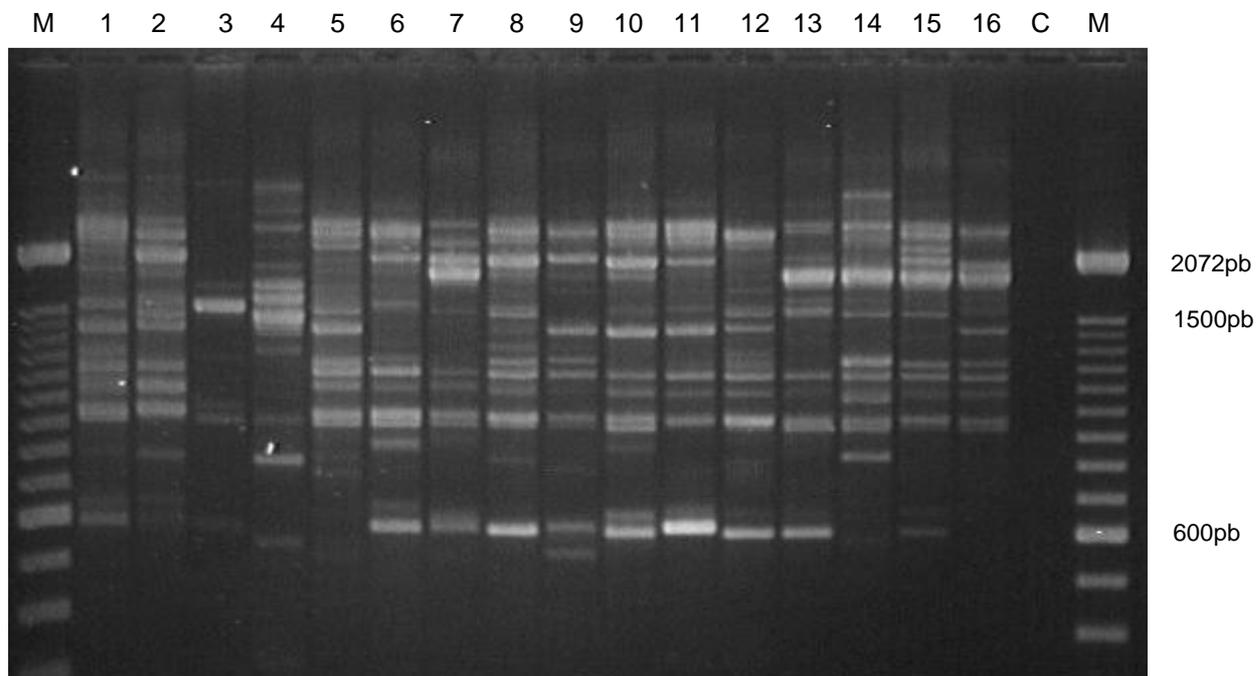


Figura 8 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer OPK04. De 1 a 4 (São Gabriel da Cachoeira), de 5 a 8 (Coari), de 9 a 12 (Tabatinga), de 13 a 16 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

O primer OPK07 foi o que obteve menor número de locos/bandas selecionados (12), que variaram de 250 a 1850 pb (Figura 9). Observaram-se padrões de banda similares, com pouca variação entre as populações. Quatro locos, com cerca de 250, 500, 850 e 1000 pb, foram revelados em todas as populações. Na população de São Gabriel da Cachoeira não foi observada a presença do loco, com aproximadamente 700 pb, presente nas demais.

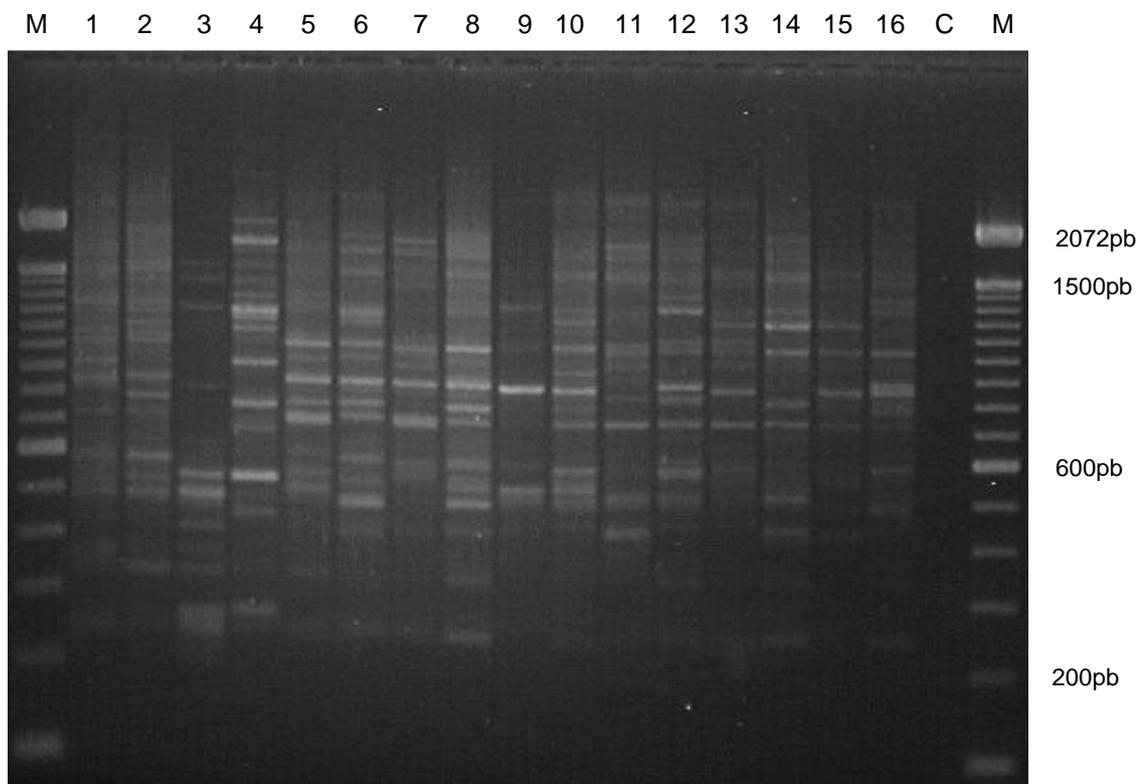


Figura 9 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer OPK07. De 1 a 4 (São Gabriel da Cachoeira), de 5 a 8 (Coari), de 9 a 12 (Tabatinga), de 13 a 16 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

O perfil eletroforético das populações de *A. darlingi* usando o primer OPK10, revelou amplo número de fragmentos, com pouca variação entre as populações (Figura 10). Para esse primer foram selecionados 13 locos/bandas, que variaram de 350 a 2072 pb. Pelo menos cinco locos, com cerca de 550, 720, 850, 1000 e 1600 pb, foram revelados em todas as populações. Na população de Manaus não foi detectado o loco, com aproximadamente 350 pb, presente nas demais.

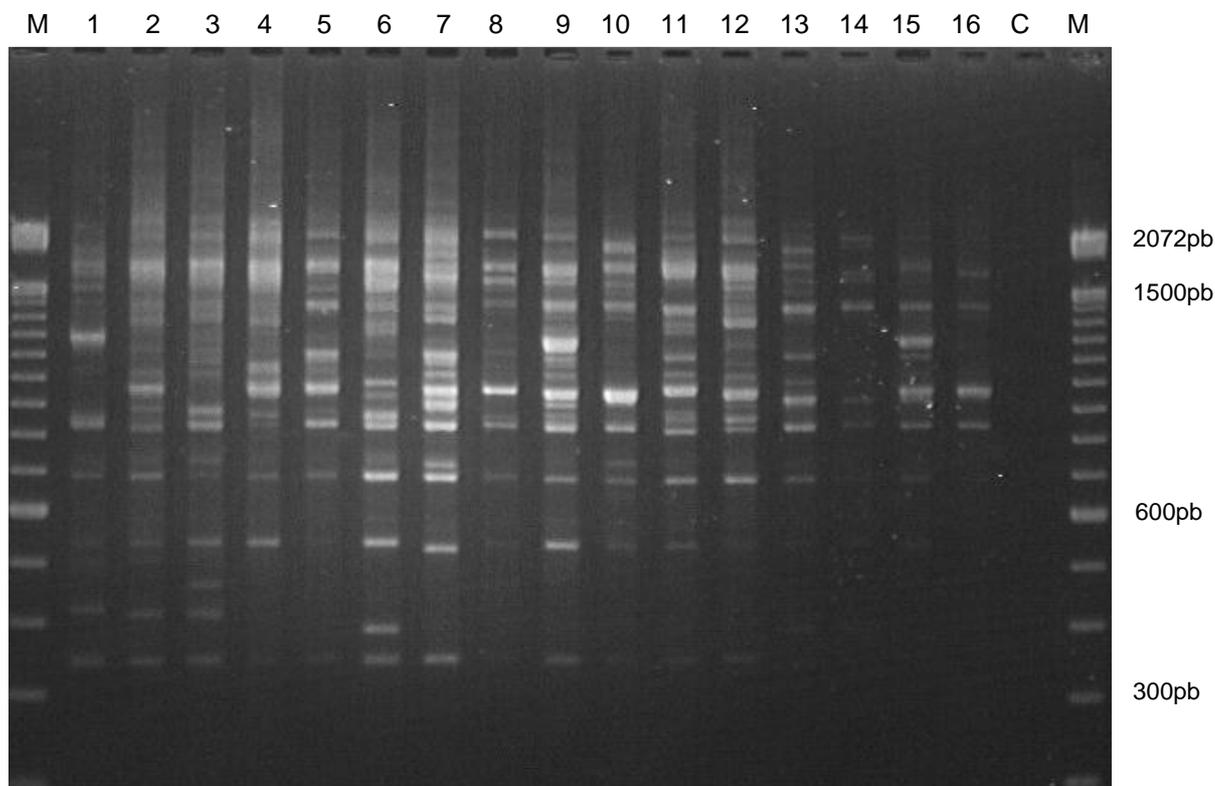


Figura 10 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer OPK10. De 1 a 4 (São Gabriel da Cachoeira), de 5 a 8 (Coari), de 9 a 12 (Tabatinga), de 13 a 16 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

Para o primer OPK16 foram selecionados 13 locos/bandas, que variaram de 400 a 2100 pb (Figura 11). Observou-se pouca variação nos padrões de bandas entre as populações. Foram detectados pelo menos cinco locos, com aproximadamente 620, 780, 1000, 1300 e 1500 pb, em todas as populações. Entretanto, na população de São Gabriel da Cachoeira não foi observada a presença de um loco, com cerca de 2100 pb, que estava presente nas demais.

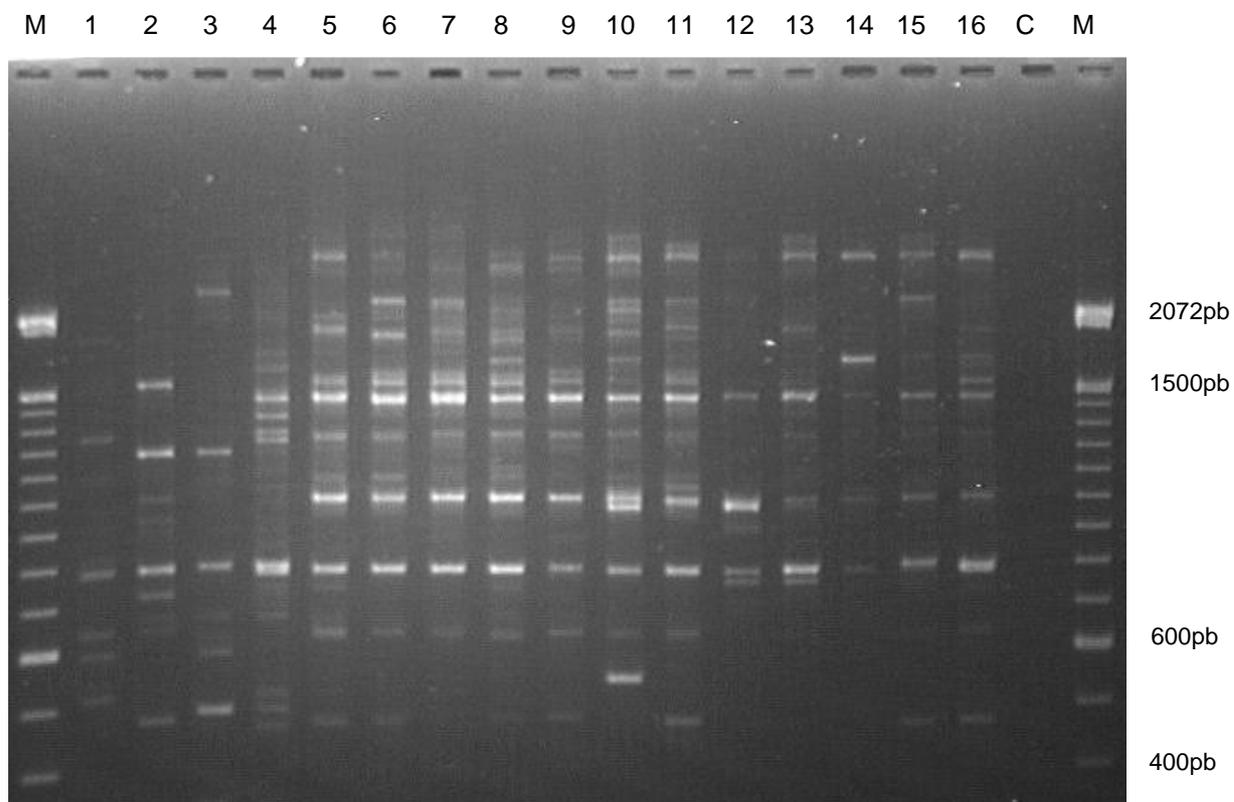


Figura 11 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseado em análise RAPD, usando o primer OPK16. De 1 a 4 (São Gabriel da Cachoeira), de 5 a 8 (Coari), de 9 a 12 (Tabatinga), de 13 a 16 (Manaus); C = Controle negativo; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

IV.2 Análise da variabilidade genética

Com base nos dados apresentados na tabela 2, verificou-se um nível de variabilidade genética elevado, obtido a partir dos valores de porcentagem de locos polimórficos (P) e de heterozigosidade média esperada (H_e). Das quatro populações analisadas, a de São Gabriel da Cachoeira apresentou maior variabilidade genética ($P = 97,37\%$; $H_e = 0,3202$), e a menor foi observada na população de Manaus ($P = 78,94\%$; $H_e = 0,2741$). Por outro

lado, a variabilidade genética obtida para as populações de Coari ($P = 86,18\%$; $H_e = 0,3076$) e Tabatinga ($P = 84,85\%$; $H_e = 0,3073$) foi muito similar.

Tabela 2. Estimativa da variabilidade genética em quatro populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseada em análises RAPD.

População	Número médio de amostras por loco	Porcentagem de locos polimórficos *	Heterozigosidade média	
			Observada	Esperada **
Coari	50	86,18	0,3055	0,3076
S. G. da Cachoeira	50	97,37	0,3183	0,3202
Manaus	50	78,94	0,2717	0,2741
Tabatinga	50	84,87	0,3044	0,3073

* Freqüência do alelo mais comum, menor ou igual a 0,95;

** Estimativa não enviesada (NEI, 1978).

Apesar das populações de São Gabriel da Cachoeira e de Manaus estarem localizadas às margens de um mesmo rio (Negro), a variabilidade genética apresentada por ambas foi bastante diferente, conforme descrito acima. Em São Gabriel da Cachoeira, os valores obtidos da variabilidade genética podem estar relacionados, principalmente, com os efeitos da seleção natural, que favorece populações altamente variáveis. Na população de Manaus, a baixa variabilidade pode estar relacionada com a redução no tamanho efetivo da população, provocada pelas intensivas campanhas de controle do mosquito na cidade, e essas medidas talvez possam fazer com que essa população seja recomposta por poucos indivíduos (Efeito do Fundador), e quanto maior a taxa de extinção e recolonização da população, menor a variância nas freqüências alélicas. Por outro lado, essa

população pode estar sofrendo um estrangulamento demográfico, e conseqüentemente, deriva genética e endogamia, cuja conseqüência é a diminuição da variabilidade genética.

No caso de Coari e Tabatinga, os resultados foram divergentes daqueles encontrados em São Gabriel da Cachoeira e Manaus. Essas duas cidades estão localizadas às margens de um mesmo rio (Solimões-Amazonas) e a variabilidade genética de ambas foi muito similar. Isso implica dizer que entre essas duas populações está ocorrendo um constante fluxo gênico.

O teste para determinar se existe diferença nas freqüências alélicas entre as populações, a partir do “Exact Test” (RAYMOND & ROUSSET, 1995) foi significativo ($\chi^2 = 1589,5700$; GL= 304; $P < 0,001$), indicando redução no fluxo gênico entre elas. A estrutura genética foi testada com base no método θ para verificar o coeficiente de endocruzamento, sendo o valor F_{ST} significativo ($F_{ST} = 0,0851 \pm 0,0075$). O índice de consistência do “bootstrapping” para 1000 replicações foi de 95%.

Apesar da significativa diferenciação, a distância genética entre as quatro populações analisadas foi baixa (Tabela 3), sendo a menor distância observada entre Coari e Tabatinga ($D = 0,0095$), e a maior entre Tabatinga e São Gabriel da Cachoeira ($D = 0,0502$). Em populações naturais, espera-se que quanto mais distanciadas geograficamente elas estejam, mais diferentes elas sejam em termos de base genética, provocadas, principalmente, pelo isolamento por distância (IBD). No entanto, nem sempre isso ocorre. Entre São Gabriel da Cachoeira e Tabatinga, considera-se que a distância genética

esteja, possivelmente, relacionada com a distância geográfica (Figura 12). Por outro lado, o mesmo não foi observado entre Tabatinga e Coari, que apresentaram menor distância genética, e não são tão próximas geograficamente, quando comparada com Manaus. Em outra análise, observa-se que São Gabriel da Cachoeira e Tabatinga estão localizadas às margens de rios diferentes e esse fato pode estar influenciando a redução no fluxo gênico entre essas duas populações, provocando o conseqüente distanciamento entre ambas. Em contrapartida, Coari e Tabatinga estão localizadas às margens de um mesmo rio e como apresentaram menor distância genética, isso pode indicar que o rio Solimões-Amazonas esteja facilitando o intercâmbio entre essas duas populações.

Tabela 3. Matriz de similaridade e distância genética entre quatro populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas, baseadas em análises RAPD. Valores acima da diagonal correspondem à distância genética não enviesada e abaixo da diagonal correspondem à similaridade genética não enviesada (NEI, 1978).

População	S. G. da Cachoeira	Coari	Tabatinga	Manaus
S. G. da Cachoeira	*****	0,0480	0,0502	0,0314
Coari	0,9532	*****	0,0095	0,0294
Tabatinga	0,9511	0,9905	*****	0,0262
Manaus	0,9691	0,9710	0,9741	*****



Figura 12 – Imagem de Satélite do Estado do Amazonas, destacando a distância geográfica (via fluvial) das quatro localidades estudadas.

FONTE: www.siglab.inpa.gov.br

Com base nos resultados obtidos, foi possível construir um dendrograma de similaridade e distância genética (Figura 13), o qual separou as quatro populações em três clusters. O primeiro foi formado por Coari e Tabatinga, o segundo por Manaus, e o terceiro por São Gabriel da Cachoeira. Analisando esses três clusters, observou-se que o rio talvez esteja facilitando/dificultando o fluxo gênico entre as populações de *A. darlingi*. As cidades de Coari e Tabatinga estão às margens do mesmo rio e suas populações foram agrupadas dentro do mesmo cluster. As cidades de Manaus e São Gabriel da Cachoeira estão localizadas às margens de um mesmo rio, conforme descrito anteriormente. Entretanto, foram agrupadas em clusters diferentes. Este fato pode estar relacionado com as modificações ambientais

resultantes da ação antrópica (campanhas de combate ao mosquito) realizadas em Manaus.

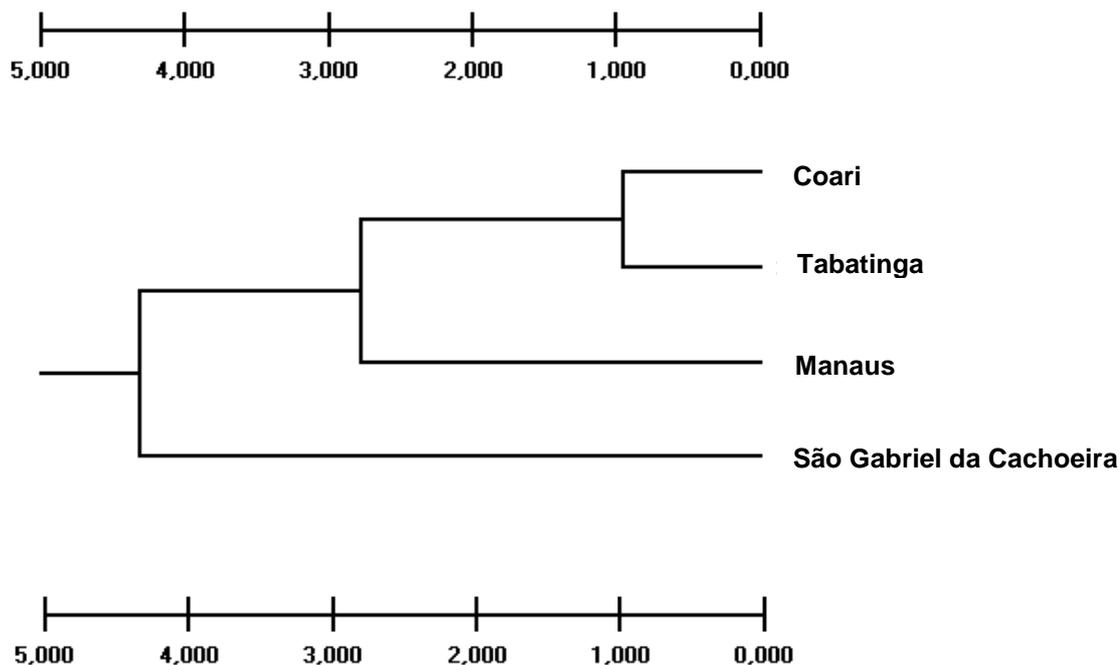


Figura 13 – Dendrograma agrupando as populações de *Anopheles darlingi* do Estado do Amazonas com base na distância genética, obtida por análise RAPD. Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética - UPGMA (NEI, 1978).

IV.3 Padrões comportamentais em populações de *Anopheles darlingi* de Manaus e Coari (AM) – Atividade de Picar

A análise com base no comportamento da atividade de picar: endofagia (intradomicílio), exofagia (peridomicílio e extradomicílio), foi realizada nas populações de Coari e Manaus. No entanto, a análise no extradomicílio foi realizada somente na população de Coari.

Nas coletas realizadas em Coari, no período compreendido entre 18:00 h e 22:00 h, houve diferença na densidade de *A. darlingi* no intra, peri e extradomicílio (gado). Com base nos dados mostrados na figura 14, observou-se que, em todos os horários analisados, foram capturados mais mosquitos dentro dos domicílios, revelando que a atividade de picar ocorre principalmente dentro das casas e no horário compreendido entre 18:00/19:00 h. Por outro lado, a densidade no peridomicílio começa baixa no início da noite, depois aumenta consideravelmente no horário entre 19:00/20:00 h, diminuindo com o transcorrer da noite. No extradomicílio (gado), foram observadas as menores densidades, sendo que só foram detectados insetos entre 19:00 h e 21:00 h.

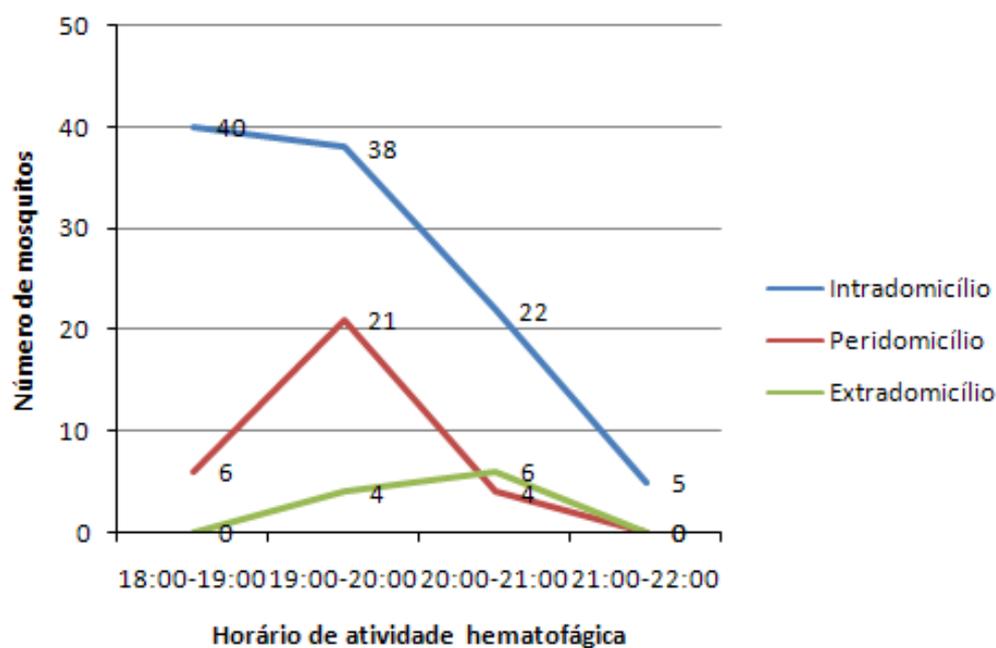


Figura 14 – Distribuição da atividade de picar de *Anopheles darlingi* entre 18:00 e 22:00 hrs., no intra, peri e extradomicílio (gado), na cidade de Coari-AM.

Nas coletas realizadas em Manaus, no período compreendido entre 14:00 e 06:00 h também foram detectadas diferenças na densidade de *A.*

darlingi dentro e fora dos domicílios. Com base nos dados mostrados na figura 15 observou-se que até as 23:00 h a densidade de mosquitos no peridomicílio foi maior, diminuindo após esse horário, voltando a aumentar entre 23:00 até 03:00 h da manhã, voltando a diminuir até o dia amanhecer. Para esse caso, observou-se, pelo menos, três picos de atividade de picar do mosquito, nos horários entre 18:00/19:00 h, 22:00/23:00 h e 01:00/02:00 h. No intradomicílio, em geral, foram detectadas as menores densidades, exceto no horário entre 22:00 h a 24:00 h, sendo observado pelo menos dois picos de atividade, nos horários entre 18:00/19:00 h e 23:00/24:00 h.

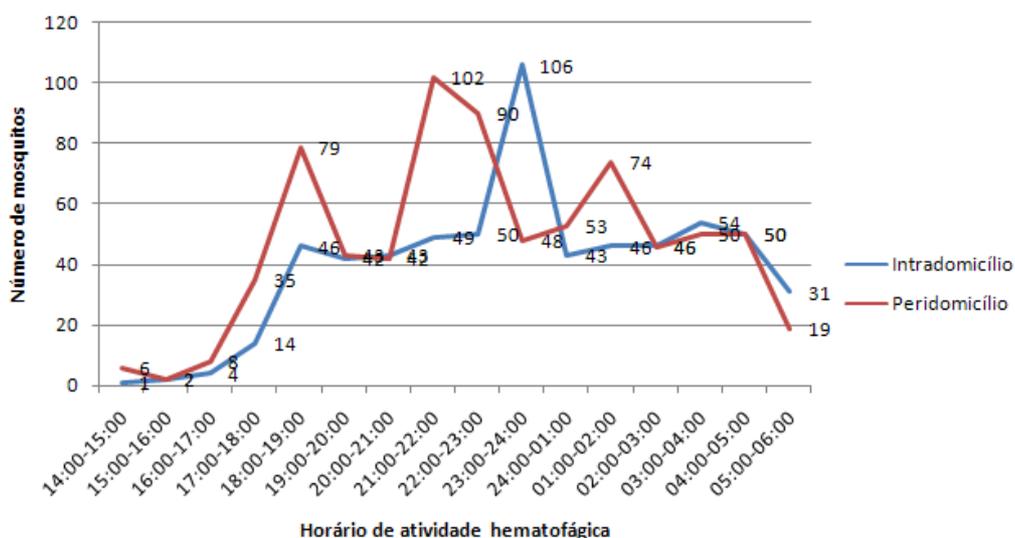


Figura 15 – Distribuição da atividade de picar de *Anopheles darlingi* entre 14:00 e 06:00 hrs., no intra e peridomicílio, na cidade de Manaus-AM.

IV.4 Análise da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* de Manaus e Coari (AM) capturadas no intra, peri e extradomicílio

A análise da variabilidade genética baseada no comportamento da atividade de picar em populações de *A. darlingi* foi feita usando os 10 oligonucleotídeos (primers). Entretanto, para ilustração, foi selecionado

somente o AM06, por apresentar o melhor perfil. A figura 16 ilustra o perfil eletroforético obtido da amplificação do DNA da população de *A. darlingi* coletada na cidade de Coari (AM), usando esse primer. Verificou-se nesta figura um padrão de bandas semelhante entre os três níveis de comportamento da atividade de picar do mosquito. No entanto, observou-se que os mosquitos capturados no extradomicílio (gado) apresentaram maior número de fragmentos amplificados. Enquanto que, os mosquitos capturados no peridomicílio apresentaram menor número desses fragmentos. Pelo menos quatro locos (bandas) foram revelados em todas as localidades, com cerca de 620, 780, 1000 e 1300pb. Nos mosquitos coletados no extradomicílio, observou-se a presença de fragmentos acima da região de 2072 pb, ausente nos demais locais.

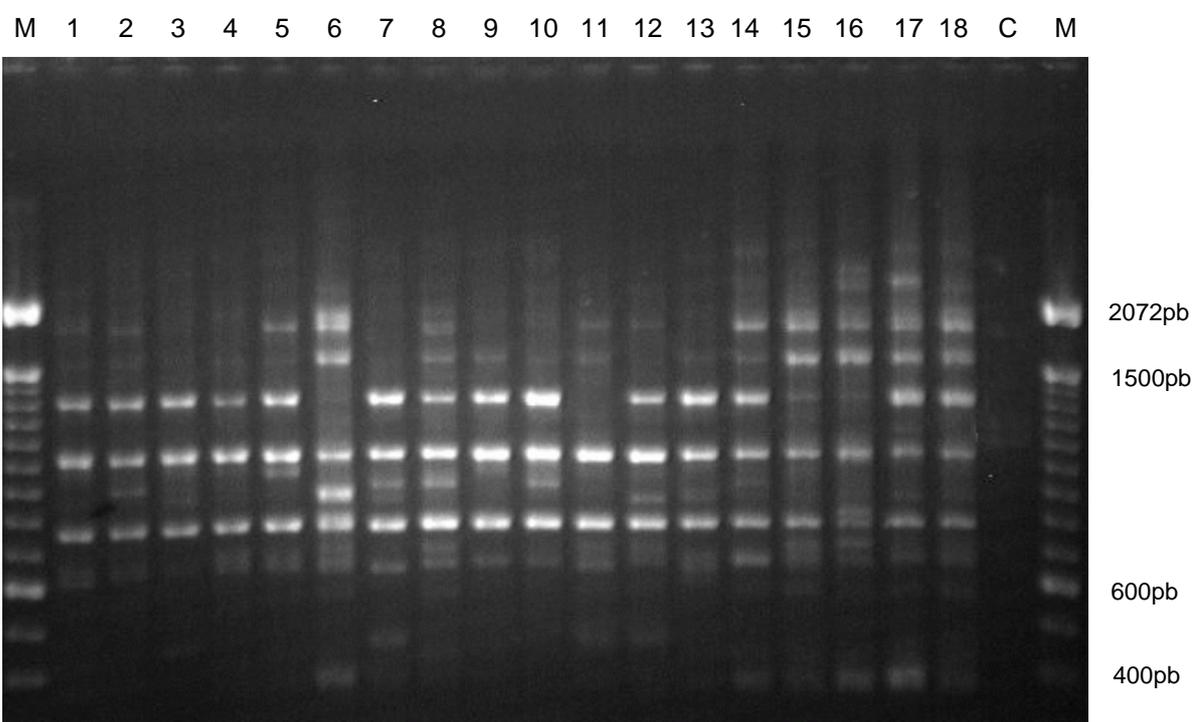


Figura 16 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* de Coari (AM), coletadas no intra, peri e extradomicílio (gado), baseado em análise RAPD, usando o primer AM06. De 1 a 6 (peridomicílio), de 7 a 12 (intradomicílio), de 13 a 18 (extradomicílio); C = Controle; M = Marcador Molecular (Ladder 100 pb).

A figura 17 ilustra o perfil eletroforético da população de *A. darlingi* coletada em Manaus (AM), usando o primer AM06. Verificou-se nesta figura um padrão de bandas muito semelhante entre os dois níveis de comportamento da atividade de picar do mosquito. Observou-se que, pelo menos seis locos (bandas), com cerca de 370, 780, 1000, 1300, 1600 e 2072 pb, foram revelados nos dois locais analisados. Comparando com os fragmentos obtidos na população de Coari, para o mesmo primer, observou-se que três locos foram revelados para as duas populações, com cerca de 780, 1000 e 1300 pb, não sendo revelado nenhum loco característico de uma população.

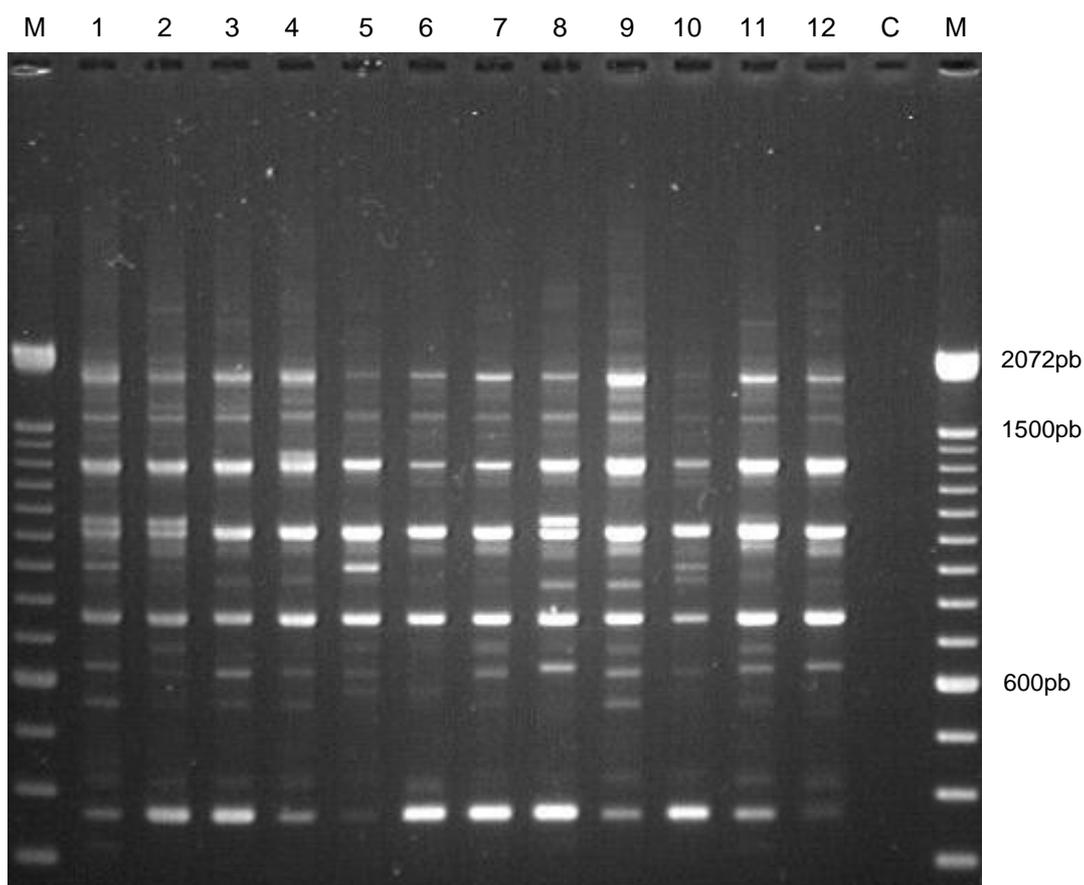


Figura 17 - Perfil da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* de Manaus, coletadas no intra e peridomicílio, baseado em análise RAPD, usando o primer AM06. 1, 3, 5, 7, 10 e 12 (intradomicílio); 2, 4, 6, 8, 9 e 11 (peridomicílio); C = Controle; M = marcador molecular (Ladder 100 pb).

Com base nos dados apresentados na tabela 4, verificou-se um nível de variabilidade genética elevado na população de Coari, com a porcentagem de locos polimórficos variando de 77,63 (extradomicílio) a 84,86% (intradomicílio), e heterozigosidade média esperada de 0,2851 (extradomicílio) a 0,3069 (intradomicílio). Nos três parâmetros analisados, as amostras do intradomicílio apresentaram os maiores valores de porcentagem de locos polimórficos e de heterozigosidade média esperada, conforme descrito anteriormente.

A alta variabilidade genética encontrada para esses mosquitos pode estar relacionada, principalmente, com a seleção natural que, em condições de pressão ambiental, favorece a população menos homogênea. Uma das principais medidas de controle desse mosquito é a borrifação de inseticidas, realizada tanto no interior e quanto nos arredores da casa. Entretanto, no intradomicílio o inseticida permanece por mais tempo impregnado nas paredes (residual). Esse método pode estar selecionando os indivíduos que apresentam maior polimorfismo.

Os menores valores de polimorfismo e de heterozigosidade média esperada foram encontrados nos mosquitos capturados no extradomicílio, e essa baixa variabilidade pode estar relacionada com a deriva genética ou até mesmo com o desvio correspondente ao “efeito Wahlund”.

Tabela 4. Estimativa da variabilidade genética na população de *A. darlingi* de Coari (AM), capturada no intra, peri e extradomicílio, baseadas em análises RAPD.

População	Número médio de amostras por loco	Porcentagem de locos polimórficos *	Heterozigosidade média	
			Observada	Esperada **
Intradomicílio	20	84,86	0,3012	0,3069
Peridomicílio	20	79,60	0,2916	0,2960
Extradomicílio (Gado)	10	77,63	0,2634	0,2851

* Frequência do alelo mais comum, menor ou igual a 0,95;

** Estimativa não enviesada (NEI, 1978).

Com base nos dados apresentados na tabela 5, verificou-se um nível de variabilidade genética mais baixo na população de Manaus, quando comparada com a população de Coari. Os valores de porcentagem de locos polimórficos e de heterozigosidade média esperada entre os dois locais foram muito próximos. As amostras capturadas no intradomicílio apresentaram os maiores valores de porcentagem de locos polimórficos ($P = 78,94\%$) e de heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,2741$). Com base nas análises desses dados, ficou evidente que, tanto na população de Manaus quanto na de Coari, a maior variabilidade genética foi observada no intradomicílio.

Tabela 5. Estimativa da variabilidade genética na população de *A. darlingi* de Manaus, coletada no intra e peridomicílio, baseadas em análises RAPD.

População	Número médio de amostras por loco	Porcentagem de locos polimórficos *	Heterozigosidade média	
			Observada	Esperada **
Intradomicílio	25	78,94	0,2695	0,2741
Peridomicílio	25	75,00	0,2683	0,2732

* Freqüência do alelo mais comum, menor ou igual a 0,95;

** Estimativa não enviesada (NEI, 1978).

Para análise da distância e similaridade genética, e também para a obtenção do coeficiente de diferenciação, cada parâmetro foi assumido como sendo uma população. Baseado nisso, o teste para determinar se existem diferenças nas freqüências alélicas entre as subpopulações de Coari e Manaus, a partir do “Exact Test” (RAYMOND & ROUSSET, 1995) foi significativo ($\chi^2= 695,89$; GL= 304; $P < 0,001$), indicando redução no fluxo gênico entre elas. A estrutura genética foi testada, com base no método θ para verificar o coeficiente de endocruzamento, sendo o valor F_{ST} significativo ($F_{ST} = 0,0775 \pm 0,0072$), onde o índice de consistência do “bootstrapping” para 1000 replicações foi de 95%, indicando uma estruturação microgeográfica. Enquanto algumas variações genéticas foram observadas entre as localidades, nenhuma barreira completa para o fluxo gênico foi identificada.

Com base nos dados apresentados na Tabela 6, verificou-se baixa distância genética entre as subpopulações dos locais analisados. Para a subpopulação de Coari, a maior distância foi observada entre o intra e o extradomicílio ($D = 0,0296$), e a menor entre o peri e o intradomicílio ($D = 0,0081$). Para Manaus, também foi observada uma baixa distância genética entre as duas subpopulações ($D = 0,0004$).

Tabela 6. Matriz de similaridade e distância genética entre populações de *A. darlingi* de Coari e Manaus coletadas no intra, peri e extradomicílio, baseadas em análises RAPD. Valores acima da diagonal correspondem à distância genética não enviesada e abaixo da diagonal correspondem à identidade genética não enviesada (NEI, 1978).

População	1	2	3	4	5
1	*****	0,0081	0,0261	0,0297	0,0296
2	0,9920	*****	0,0296	0,0334	0,0337
3	0,9742	0,9708	*****	0,0633	0,0624
4	0,9707	0,9672	0,9387	*****	0,0004
5	0,9708	0,9668	0,9395	1,0004	*****

1 = Coari peridomicílio; 2 = Coari intradomicílio; 3 = Coari extradomicílio (Gado); 4 = Manaus intradomicílio; 5 = Manaus peridomicílio.

Com base nos resultados obtidos, foi possível construir um dendrograma de similaridade e distância genética, que agrupou as subpopulações em três clusters (Figura 18). O primeiro foi formado pelas amostras coletadas no intra e peridomicílio da população de Manaus. Nesse caso observou-se que as subpopulações são geneticamente muito próximas, havendo certa homogeneidade entre as mesmas. Por outro lado, a distância

genética obtida para as subpopulações de Coari foram maiores do que as de Manaus. Nesse caso, elas foram agrupadas em clusters diferentes e com maior distância genética. Um deles agrupou as amostras coletadas no intra e peridomicílio. O outro agrupou as amostras do extradomicílio.

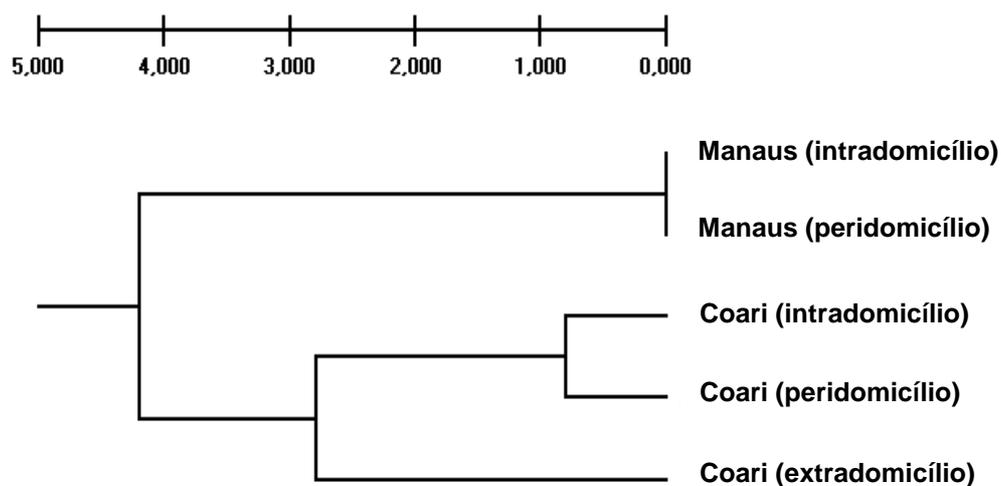


Figura 18 – Dendrograma agrupando as populações de *Anopheles darlingi* de Coari e Manaus, coletados no intra, peri e extradomicílio, com base na distância genética, obtida por análise RAPD. Método não ponderado de agrupamento de pares de populações com média aritmética - UPGMA (NEI, 1978).

V - DISCUSSÃO

V.1 Análise descritiva dos locos RAPD

Estudos de variabilidade genética em nível molecular têm demonstrado que regiões diferentes, em todo o genoma, apresentam diferentes taxas de mutação (CALVO *et al.*, 2004). Genes de cópia única têm relativamente baixa taxa de substituição, possivelmente porque mudanças nas regiões codificadoras podem produzir um defeito sério na proteína codificada. Da mesma forma, algumas mudanças na região regulatória do genoma também podem ter efeitos desfavoráveis. Em contraste, o DNA repetitivo, aparentemente, não está sob restrições funcionais e, ainda, a variabilidade nessa região do genoma é maior do que nas dos genes de cópia única, por isso, ele é um dos principais alvos de estudo molecular (LI & GRAUR, 1991).

Analisando os perfis eletroforéticos de DNA amplificado via RAPD observa-se um grande número de fragmentos polimórficos. Tais polimorfismos podem ser resultantes de pequenas alterações nas seqüências dos sítios de iniciação (inserções/deleções/substituições) ou de alterações que modifiquem o tamanho da seqüência a ser amplificada (WILLIAMS *et al.*, 1990). Diferenças em apenas um par de bases podem ser detectadas pela técnica e, por isso, grande número de polimorfismos pode ser revelado em indivíduos estreitamente relacionados.

Dentre os fragmentos obtidos nesse trabalho, alguns foram observados em todas as amostras. Por outro lado, poucos se mostraram exclusivos à determinada população. Calado & Navarro-Silva (2005), analisando a variabilidade genética em indivíduos de uma mesma progênie de

A. cruzii e *A. bellator* encontraram diferenças quanto ao padrão de bandas geradas entre progênies e até mesmo entre indivíduos irmãos. Esses autores analisaram o perfil eletroforético da amplificação do DNA genômico de linhagens F1 dessas espécies, obtidas em laboratório. Os resultados revelaram que as gerações F1 apresentaram alguns fragmentos detectados em todas as progênies. Por outro lado, outros se mostraram exclusivos a determinado indivíduo ou progênie.

Trabalhos realizados por Sanguino & Santos (2002) com populações de *A. darlingi* da Amazônia, procedentes de Macapá (AP), Novo Airão (AM) e Aripuanã (MT), usando marcadores RAPD, revelaram amplo número de fragmentos polimórficos. Esses autores selecionaram aproximadamente 75 locos para a análise da variabilidade genética, com diferenças quanto aos padrões de banda, tanto dentro, quanto entre as populações.

Amplo número de fragmentos polimórficos também foi detectado em populações de *A. darlingi* da Amazônia peruana por Pinedo-Cancino *et al.* (2006). Estes autores usaram seis primers (OPA09, OPA08, OPA05, OPB04 e 1283) e detectaram cerca de 65 locos RAPD, com peso molecular variando de 387 a 1.570 pb. Os primers OPA09 e OPB04 têm a mesma seqüência dos primers AM06 e AM09 usados nesse trabalho. Comparando o perfil eletroforético, observa-se a presença de fragmentos (bandas) que foram revelados em todas as populações. Para o OPA09/AM06, foram detectados cerca de quatro locos, com aproximadamente 620, 750, 1000 e 1200 pb, que estiveram presentes tanto nas populações do Peru quanto do Brasil. Para o OPB04/AM09, foram revelados cerca de cinco locos, com aproximadamente

400, 700, 720, 1100 e 1200 pb, que também estiveram presentes nas populações dos dois países. Esses podem ser usados como “locos diagnósticos” intraespecíficos. Entretanto, não foi possível identificar a presença de nenhum fragmento característico de uma população.

Analisando a estrutura populacional de amostras de *A. darlingi* procedentes de países das Américas Central e do Sul, usando marcador RAPD, Manguin *et al.* (1999) detectaram cerca de 35 locos, com peso molecular variando de 0.350 a 2.323 kilopares de base. O perfil eletroforético revelou que alguns desses locos foram monomórficos, ou seja, ocorreram em mais de 95% dos indivíduos analisados, sendo que desses apenas dois ocorreram em todos os indivíduos. Números similares de marcadores diagnósticos foram encontrados por Wilkerson *et al.* (1995) em populações de *A. albitarsis*, procedentes do Paraguai, Argentina e Brasil, e por Dimopoulos *et al.* (1996) no complexo *A. gambiae*, da África. Todos esses resultados mostraram amplo número de fragmentos polimórficos detectados pela técnica RAPD.

Os primers usados neste trabalho mostraram serem bons candidatos para identificação de *A. darlingi*, usando como ferramenta RAPD, pois este marcador revelou locos que foram detectados em todos os indivíduos nas quatro populações, corroborando com os resultados obtidos por Marelli *et al.* (2005). Esses autores analisaram a relação filogenética de várias espécies do subgênero *Nyssorhynchus*, usando os mesmos primers citados acima para amplificar o DNA genômico e, a partir daí, identificar cada uma delas, sendo que os resultados obtidos revelaram alguns fragmentos exclusivos de *A. darlingi*.

Em populações de *A. marajoara* procedentes de alguns países da América do Sul, usando marcadores RAPD, Wilkerson *et al.* (1995) descreveram a existência de sete bandas diagnósticas para identificação da espécie. Entretanto, o autor enfatiza a não necessidade de um único indivíduo apresentar todos os sete fragmentos, e que somente a presença de duas bandas diagnósticas seria suficiente para a correta classificação.

V.2 Análise da variabilidade genética

A variabilidade genética é considerada um fenômeno biológico de grande importância, sendo 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 (HARTL, 1981).

Conforme assinala Nevo (1978) a variabilidade genética intrapopulacional, interpopulacional e interespecífica são requisitos fundamentais para a evolução, levando à seleção de genótipos, mediante as pressões ambientais. Sendo assim, a variabilidade genética pode ser medida por três parâmetros: o número de locos polimórficos, heterozigosidade média (esperada/observada) e tamanho amostral. Segundo Nei (1972) ela também pode ser medida pela distância genética. De acordo com Lounibos & Conn (2000) todos os estudos de *A. darlingi*, sem levar em conta o tipo de marcador (cromossomos politênicos, aloenzimas, mtDNA, RFLPs e seqüências ITS2), têm detectado níveis elevados de variabilidade genética e esses dados estão de acordo com os resultados obtidos nas quatro populações desse mosquito aqui analisadas.

Kreutzer *et al.* (1972), analisando cromossomos politênicos de duas populações brasileiras de *A. darlingi*, sendo uma da Amazônia e outra do sul do país, detectaram que a do norte é mais polimórfica que a do sul, e que isso poderia estar relacionado com a heterogeneidade da floresta amazônica. Para esses autores, a diversidade reflete as complexas interações do ecossistema, com altos índices de produtividade e alto poder de recuperação, quando alterado pela natureza ou pela intervenção do homem. Nesse contexto, diferentes autores têm enfatizado o caráter heterogêneo das florestas amazônicas e a diversidade de habitats que ocorre na região.

Para Moran (1981) as florestas tropicais fluviais apresentam elevada diversidade de animais, de composição florística e também unidade de espaço. Uma espécie para explorar e se adaptar aos variados ecossistemas talvez necessite de certa plasticidade genética para obter êxito (KERR, 1978). Conforme assinala Dobzhansky (1970) a capacidade adaptativa a novas condições ambientais bruscas requer uma plasticidade maior, a qual é conferida por uma variabilidade genética adequada. Populações predominantemente homozigotas não dispõem de meios para se adaptarem a modificações do ambiente. Sendo assim, é possível sugerir que a alta variabilidade apresentada por *A. darlingi* talvez esteja relacionada com a heterogeneidade ambiental da região amazônica.

Os dados obtidos a partir da análise de marcadores RAPD revelaram níveis elevados de variabilidade genética ($P = 78,94 - 97,37\%$; $H_e = 0,2741 - 0,3202$) nas quatro populações analisadas. Comparando com um estudo realizado por Sanguino & Santos (2002), em populações de *A. darlingi* procedentes de outras regiões da Amazônia brasileira, para esse mesmo

marcador, observam-se diferenças nos valores obtidos. Os resultados encontrados por esses autores foram elevados ($P = 62 - 68\%$; $H_e = 0,2014 - 0,2508$), porém menores que os obtidos para as populações de Manaus, São Gabriel da Cachoeira, Coari e Tabatinga.

Manguin *et al.* (1999), analisando a estrutura genética de populações de *A. darlingi*, procedentes de Belize, Brasil, Venezuela, Guiana Francesa e Bolívia, usando esse mesmo marcador, detectaram moderada variabilidade genética e para esses autores, os resultados seriam condizentes com os encontrados para organismos co-específicos. Nesse estudo, foi observado que a população de Belize apresentou a menor variabilidade genética ($P = 16\%$; $H_e = 0,019$), possivelmente causada pela perda de alelos polimórficos em populações que estão confinadas a ambientes restritos. Por outro lado, a população com maior variabilidade foi a de São Paulo ($P = 48\%$; $H_e = 0,130$), e esses resultados também foram bem menores que os obtidos neste trabalho.

Pinedo-Cancino *et al.* (2006), estudando populações de *A. darlingi* da Amazônia peruana, usando marcadores RAPD, encontraram valores de heterozigosidade ($H_e = 0,27 - 0,32$) similares aos obtidos em populações da Amazônia brasileira. Para esses autores, não foi possível associar a variabilidade genética com o ambiente, na qual as amostras foram coletadas. Sendo assim, as populações de *A. darlingi* da Amazônia peruana procedentes de áreas de floresta primária, secundária ou desmatada mantêm elevado fluxo gênico entre si. O que não foi observado nas populações do Brasil.

Análises realizadas com outras espécies de anofelinos também têm mostrado diferenças quanto ao nível de variabilidade genética. Posso *et al.* (2003) avaliou o grau de diferenciação genética entre populações de *A. nuneztovari* da Colômbia, usando RAPD-PCR. Os resultados obtidos mostraram heterozigosidade média esperada de 0,343. Para essa mesma espécie em quatro populações brasileiras e duas da Colômbia, a heterozigosidade média variou de 0,087 a 0,116 (SCARPASSA *et al.*, 1999).

Análises realizadas em populações de outro importante gênero de mosquito, o *Aedes*, mostraram altos níveis de variabilidade genética. Em populações de *A. albifasciatus* procedentes da Argentina Central, usando marcadores RAPD, encontraram porcentagem de locos polimórficos variando de 60,7% a 89,3% e heterozigosidade média esperada de 0,19 a 0,31, e esses valores foram um pouco menores que os obtidos nesse trabalho (SOUSA *et al.*, 1999). Já em populações de *A. aegypti* da Argentina, esses valores foram maiores, com porcentagem de locos polimórficos de 100% e heterozigosidade média esperada variando de 0,279 a 0,497 (AYRES *et al.*, 2003).

Apesar das populações de São Gabriel da Cachoeira e de Manaus estarem localizadas às margens de um mesmo rio (Negro), a variabilidade genética apresentada por ambas foi bastante diferente. Em São Gabriel da Cachoeira, os maiores valores obtidos de variabilidade genética podem estar relacionados, principalmente, com os efeitos da Seleção Natural, que favorece populações altamente variáveis. A população de Manaus apresentou menor variabilidade genética e isso pode estar relacionada com a ação antrópica. Na cidade são realizadas intensas atividades de combate ao mosquito e essas medidas podem estar contribuindo para a redução no

tamanho efetivo dessa população, que para se restabelecer, deve ser recomposta por poucos indivíduos (Efeito do Fundador). Quanto maior a taxa de extinção e recolonização da população, menor será a variância nas freqüências alélicas (FUTUYMA, 1992). Outro fator que pode contribuir para a redução da variabilidade genética na população é a deriva genética e endogamia.

A ampla variabilidade comportamental e ecológica mostrada por *A. darlingi* levou alguns autores a sugerir que o mesmo fosse um complexo de espécies crípticas (CHARLWOOD, 1996). Conforme assinala Marelli (2000) existem controvérsias se essa espécie faz parte ou não de um complexo. De acordo com Dusfour *et al.* (2007) a elucidação de complexo de espécies de *Anopheles* é um pré-requisito para determinar quais “unidades genéticas” desse complexo são transmissoras de malária, e esclarecer as diferenças ecológicas e etológicas que estão relacionadas com a capacidade vetorial.

Para entender o “status” taxonômico de *A. darlingi*, alguns trabalhos foram realizados, utilizando análises morfológicas, padrões de isoenzimas, análise do mtDNA e bandeamento de cromossomos politênicos, mostrando diferenças morfológicas e moleculares em várias populações procedentes do Brasil, Suriname, Guiana Francesa, Colômbia e Venezuela (KREUTZER *et al.*, 1972; CHARLWOOD & HAYES, 1978; ROSA-FREITAS *et al.*, 1992; FREITAS-SIBAJEV *et al.*, 1995; CHARLWOOD, 1996). Mas, segundo alguns autores, essas diferenças são apenas variações intraespecíficas.

Os dados de estrutura genética, a partir do índice de fixação (F_{ST}) – coeficiente de ancestralia (θ), mostraram diferenciação genética ($F_{ST} =$

0,0851 \pm 0,0075), cujo índice de consistência do “bootstrapping” para 1000 replicações foi de 95%. Valores significantes de F_{ST} (0,102 - 0,204) foram obtidos, também, por Manguin *et al.* (1999) em populações de *A. darlingi* das Américas Central e do Sul. No entanto, esses valores diferem dos obtidos por Pinedo-Cancino *et al.* (2006) (F_{ST} = 0,030), em populações desse mosquito da Amazônia peruana, com esse mesmo marcador. Para esses autores, o valor de F_{ST} foi insignificante, sendo essas populações consideradas altamente homogêneas.

Estudando a variabilidade genética em populações de *A. darlingi* da Amazônia brasileira, usando análise de isoenzimas, Santos (1992) encontraram valores F_{ST} menores (F_{ST} = 0,013 – 0,070) do que os obtidos neste trabalho, e segundo esses autores, a variabilidade das frequências alélicas detectadas eram maior dentro do que entre as populações. Já outro estudo, realizado por Conn *et al.* (2006), usando marcadores de microssatélites, encontraram valores maiores de F_{ST} (0,1841) em populações de *A. darlingi*, procedentes dos Estados do Amapá, Mato Grosso e Pará.

Comparando-se os dados obtidos nesse trabalho com os obtidos para outros em gêneros de mosquito, usando esse mesmo marcador, verifica-se que há diferença quanto aos valores de F_{ST} . Menor valor (F_{ST} = 0,025) foi obtido em estudos realizados com populações do mosquito da dengue, *A. aegypti* da Argentina (SOUSA *et al.*, 2001). Em outros, realizados com populações dessa mesma espécie de diferentes Estados do Brasil e em *A. albifasciatus* da Argentina, os valores de F_{ST} foram maiores, sendo 0,098 e 0,303, respectivamente (SOUSA *et al.*, 1999; AYRES *et al.*, 2003).

De acordo com Narang *et al.* (1989a) a divergência genética entre populações pode ser constatada quando certo grau de isolamento reprodutivo já se estabeleceu nessas populações. Apesar da significativa diferenciação, a distância genética entre as quatro populações analisadas foi baixa ($D = 0,0502$), indicando similaridade genética, sem evidência de espécies crípticas, corroborando com o obtido por Manguin *et al.* (1999).

Segundo Conn *et al.* (2006) a distribuição de *A. darlingi* dentro da bacia amazônica está bem documentada, parecendo ser contínua, sem evidências da existência de barreiras no fluxo gênico, e uma situação similar é encontrada em *A. gambiae* na África sub-saariana (LEHMAN *et al.*, 2003). Entretanto, para essa última espécie, alguns autores consideram que o modelo de isolamento por distância (IBD) é um dos principais fatores que pode promover divergência genética entre as populações desse mosquito. O modelo IBD também tem sido proposto para explicar a diferenciação genética no vetor da malária *A. funestus* na África (COHUET *et al.*, 2004). No entanto, o suporte para esse modelo de estudo em *A. darlingi* ainda está confuso.

Analisando populações desse mosquito oriundas da Venezuela, Brasil e Bolívia, usando dados de RFLP, Conn *et al.* (1999) encontraram relação entre divergência genética e modelo IBD. Para Malafronte *et al.* (1999), o isolamento por distância seria um fator que influencia cerca de 4 a 5% da divergência genética observada na região ITS2 do rDNA das populações do sudeste do Brasil, quando comparadas com outras do nordeste e da Amazônia brasileira. Por outro lado, uma recente análise em populações de *A. darlingi* capturadas em 19 localidades, distribuídas desde o sul do México até o sul do Brasil, usando a seqüência parcial da subunidade do Citocromo Oxidase I do

mtDNA, revelou somente uma fraca associação entre distância genética e distância geográfica, não formando um modelo IBD simples (MIRABELLO & CONN, 2006). Em nível continental, Manguin *et al.* (1999) encontraram evidência de divisão geográfica em populações de *A. darlingi* oriundas de cinco países das Américas do Sul e Central, usando RAPD.

Posso *et al.* (2003) avaliaram o grau de diferenciação genética entre populações de *A. nuneztovari* da Colômbia usando RAPD. Eles verificaram que populações separadas por 325 km mostraram padrões mais elevados de mutação, do que as populações separadas por somente 250 km e divididas por barreiras geográficas. No entanto, os resultados aqui obtidos não mostraram uma clara relação entre distância genética e distância geográfica.

As populações de São Gabriel da Cachoeira e de Tabatinga são as que apresentam maior distância geográfica (2.205 km via fluvial) das quatro estudadas, e conseqüentemente, maiores distância genética ($D = 0,0502$). No entanto, o mesmo não foi observado entre a população de Manaus e a de Coari, que apresentam menor distância geográfica (463 km via fluvial). Porém, a menor distância genética foi observada entre a de Coari e a de Tabatinga ($D = 0,0095$), que estão separadas por 1.144 km (via fluvial).

É possível que essa menor distância genética entre a população de Coari e a de Tabatinga possa estar relacionada com o rio Solimões-Amazonas. Ambas estão localizadas às margens desse rio, tendo a hidrovia como principal meio de transporte entre essas populações. E assim, existe a possibilidade que por meio de embarcações também sejam transportados

mosquitos, os quais passam a entrecruzar com outros da população local, propiciando um fluxo gênico contínuo entre elas.

Dessa forma, os resultados aqui obtidos revelaram que a variabilidade genética encontrada para *A. darlingi* é condizente com a existência de uma única espécie. Embora tenha sido encontrada moderada diferenciação genética entre essas populações, indicando redução no fluxo gênico, as mesmas são geneticamente semelhantes e esses resultados corroboram com os obtidos por Rosa-Freitas *et al.* (1998) e Manguin *et al.* (1999).

V.3 Padrões comportamentais em populações de *Anopheles darlingi* de Manaus e Coari – Atividade de Picar

Segundo Tadei *et al.* (1993), os níveis de exofilia e endofilia, relacionados com o hábito de picar do mosquito fora e dentro das residências, são parâmetros relevantes em estudos de populações de anofelinos, pois revelam os padrões dos mecanismos de transmissão da malária. Alguns estudos realizados em populações de *A. darlingi* da Venezuela mostraram que a malária refratária nesse país, decorre da acentuada exofilia demonstrada pela espécie, em áreas restritas de sua distribuição geográfica (GABALDÓN & GUERRERO, 1959; GABALDÓN *et al.*, 1975). Este comportamento na região é apontado como causa principal da ineficiência dos inseticidas depositados no interior das residências.

Os dados sobre o grau de exofilia e endofilia de *A. darlingi* em Coari e Manaus evidenciaram variação conforme a região. De acordo com Van

Thiel (1962), essa espécie, assim como as demais do gênero *Anopheles*, apresenta um padrão característico de comportamento, em relação à atividade de picar, e variações podem ser observadas quanto à endofilia-exofilia e zoofilia-antropofilia, ao longo da área de sua distribuição geográfica.

Conforme assinala Tadei *et al.* (1988), os padrões de comportamento da atividade de picar podem mudar, dependendo se a área for natural ou alterada, além da densidade populacional, que se modifica conforme o período de inverno e verão.

Os resultados das coletas realizadas em Coari revelaram maior densidade desse mosquito no intradomicílio e essa população tem uma atividade crepuscular acentuada nas primeiras horas da noite (18:00 e 20:00 h), decrescendo a medida que o dia clareava. Esses mesmos resultados foram encontrados por Couto *et al.* (2001) em coletas realizadas em áreas de garimpo no Estado do Amapá. Entretanto, esses resultados contrastam com os encontrados por Tadei *et al.* (1993). Esses últimos autores analisaram o comportamento da atividade de picar de *A. darlingi* em Ariquemes (RO) e ao longo da BR-174 (Manaus-Boa Vista), observando maior densidade de mosquitos no peridomicílio.

Comparando a preferência alimentar das coletas realizadas em Coari, observou-se que *A. darlingi* parece ter predileção por humanos (antropofagia), pois em quase todos os horários, a densidade de mosquitos capturados no gado foi baixa. Um estudo similar foi realizado por Tadei *et al.* (1998) na zona rural de Ariquemes (RO). Esses autores analisaram o grau de antropofilia e zoofilia durante os períodos de inverno, verão, e o de transição

entre esses dois períodos, observando que essa espécie mostrou-se altamente antropofágica, com cerca de 59% de exemplares capturados alimentando-se no homem, e esses índices não mudaram considerando o período do ano (inverno, verão ou transição).

Lourenço-de-Oliveira *et al.* (1987; 1989) e Oliveira-Ferreira *et al.* (1988), analisando o comportamento da atividade de picar dessa espécie, no Município de Ariquimes e Pólos de colonização, em Rondônia, detectaram maior nível de exofilia. Padrões similares foram encontrados na população de Manaus desse trabalho, porém com dois picos de atividade, sendo um no começo da noite, entre 18:00 e 19:00 h, e outro entre 21:00 e 24:00 h. A constatação de uma exofilia acentuada, nos diferentes pontos da Amazônia, indica que deve haver um redirecionamento nas medidas de controle da malária. Um padrão bimodal de comportamento foi observado por Tadei *et al.* (1993), e esses autores sugeriram que, em algumas localidades, o padrão bimodal permite diferenciar essa espécie das demais.

V.4 Análise da variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* com base nos padrões de comportamento da atividade de picar

Segundo levantamentos prévios, nenhum estudo tinha sido realizado relacionando o comportamento da atividade de picar de *A. darlingi* e a variabilidade genética, os quais reunidos podem trazer informações epidemiológicas valiosas que possam estar relacionadas com a capacidade vetorial da espécie.

No complexo *A. gambiae* da África, os estudos sobre polimorfismo cromossômico, envolvendo as duas principais espécies transmissoras da malária humana naquele continente, *A. gambiae* e *A. arabiensis*, mostraram que arranjos gênicos específicos estão associados a variações no comportamento, quanto à exofilia e endofilia, levando as conseqüências evolutivas e epidemiológicas relevantes (COLUZZI *et al.*, 1979).

Na população de Coari, foi observada maior variabilidade genética nas amostras capturadas no intradomicílio ($P = 84,86\%$; $H_e = 0,3069$), e o mesmo foi constatado na população de Manaus ($P = 78,94\%$; $H_e = 0,2741$). Isso pode indicar que essas populações apresentam maior plasticidade genética, que conferem uma adaptabilidade maior às mudanças ambientais. Conforme Dobzhansky (1970) essa capacidade adaptativa a novas condições ambientais bruscas requer uma plasticidade maior, a qual é conferida por uma variabilidade genética adequada; e populações predominantemente homozigotas não dispõem de meios para se adaptarem a modificações do ambiente.

Segundo Tadei *et al.* (1993) e Akhavan *et al.* (1999), na região amazônica, costumam-se usar, como medida de controle do mosquito transmissor da malária, inseticidas borrifados no interior das residências. Essa medida de controle altera as condições ambientais, que poderiam eliminar os mosquitos com baixa variabilidade genética, favorecendo os que apresentam maior plasticidade.

Conforme citado anteriormente, estudos analisando a variabilidade genética e correlacionando com os padrões da atividade de picar

ainda não tinham sido feitos. Portanto, torna-se difícil a comparação dos resultados aqui obtidos. Entretanto, alguns trabalhos foram realizados levando em conta as variações genéticas de acordo com a sazonalidade da região.

Tadei & Santos (1982), analisando inversões cromossômicas em populações de *A. darlingi* e correlacionando com as estações de verão e inverno, observaram diferenças quanto ao padrão de bandejamento. Os dados obtidos por esses autores evidenciaram modificações nas frequências dos arranjos cromossômicos no decorrer dos períodos de amostragem. Estudos anteriores em populações de *A. darlingi* de Manaus e da BR-174, realizados por Kreutzer *et al.* (1972) e Tadei *et al.* (1982) também evidenciaram esta característica das populações da Amazônia. As frequências elevadas e significativas de heterozigotos, para a maioria das inversões, foram interpretadas, pelos últimos autores, como indicativas de uma adaptabilidade maior dos heterozigotos em relação à heterogeneidade ambiental.

Estudos realizados por BAYOH *et al.* (2001), em populações de *A. gambiae*, procedentes do oeste da África, mostraram que as formas cromossômicas dessa espécie parecem ter preferência por condições climáticas específicas. Naquele estudo as formas denominadas de Floresta e Bissau ocorreram em lugares úmidos (precipitação anual média de 1.438 mm), a forma Mopti foi encontrada em lugares secos (precipitação anual média de 938 mm) e a forma Savana ocorreu em lugares intermediários entre seco e úmido (precipitação anual média de 1.067 mm).

VI – CONCLUSÕES

A análise dos dados de populações de *A. darlingi*, com base no estudo de marcadores RAPD, possibilitou as seguintes conclusões:

1. As quatro populações estudadas apresentaram variabilidade genética elevada, possivelmente, decorrente da própria estrutura genética das populações no ambiente amazônico.
2. As populações de Manaus e São Gabriel da Cachoeira, apesar de estarem às margens de um mesmo rio (Negro), não apresentaram variabilidade genética similar. Nesse contexto, supõe-se que a população de Manaus esteja sofrendo intensas pressões antrópicas, o que tem favorecido a perda de alelos heterozigotos, possivelmente, resultante do Efeito Fundador (“bottleneck”).
3. Os dados das amostras analisadas revelaram valores de F_{ST} altamente significativos, porém com baixa distância genética entre as populações, com valores dentro dos limites de divergência genética de uma espécie monotípica.
4. Apesar da grande similaridade genética, as populações foram agrupadas em três clusters: um constituído por Coari e Tabatinga, ambas localizadas às margens do rio Solimões-Amazonas; outro por Manaus, situada às margens do rio Negro, mas, próxima ao encontro das águas desse rio com o Solimões-Amazonas; e o

último por São Gabriel da Cachoeira, que está às margens do rio Negro.

5. Não houve uma correlação clara entre distância genética e distância geográfica entre as populações analisadas. É possível que o fluxo gênico seja induzido pelos rios amazônicos, que servem como meio de dispersão das populações desse mosquito.
6. Nas populações de Manaus e Coari, foram observadas diferenças quanto à intensidade da hematofagia desses mosquitos no intra, peri e extradomicílio, revelando que a espécie *A. darlingi* apresenta estratégias comportamentais conforme o ambiente considerado.
7. Houve maior variabilidade genética nas populações capturadas no intradomicílio, revelando maior plasticidade genética, e esta, possivelmente, confere a essa espécie maior adaptabilidade às mudanças ambientais e/ou às medidas de controle da malária.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHAVAN, D.; MUSGROVE, P.; ABRANTES, A.; D'GUSMAO, R. Cost-effective malaria control in Brazil. Cost-effectiveness of a malaria control program in the Amazon Basin of Brazil, 1988-1996. *Society of Science and Medicine*, v.49, p.1385-1399, 1999.

ALECRIM, J.K.C. *Os impactos econômicos da malária na cidade de Manaus*. 1995. 60 p. Monografia (Faculdade de Estudos Sociais, Departamento de Economia e Análise) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

ALFENAS, A.C.; DUSI, A.; ZERBINI JÚNIOR, F.C.; ROBINSON, I.P.; MICALES, J.A.; OLIVEIRA, J.R. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: UFV. 1998. 574 p.

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

AYRES, C.F.J.; MELO-SANTOS, M.A.V.; SOLÉ-CAVA, A.M.; FURTADO, A. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *Journal of Medicine and Entomology*, v.40, n.4, p.430-435, 2003.

AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRIGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M. *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. Brasília: Ed. Universidade de Brasília. 2003. 211 p.

BAYOH, M.N.; THOMAS, C.J.; LINDSAY, S.W. Mapping distributions of chromosomal forms of *Anopheles gambiae* in West Africa using climate data. *Medical and Veterinary Entomology*, v.15, p.267-274, 2001.

BIANCHI, U. Homologous alkaline phosphatase and homologous *loci* in two sibling species of european anopheline mosquitoes. *Nature*, v.45, p.50-62, 1968.

BIANCHI, U.; CHESSA, G. Alloenzimi ad attivita xantin-deidrogenasica in *Anopheles atroparvus*. *Revista Parasitologica*, v.31, p.299-303, 1970.

BIANCHI, U.; PIRODDA, G. Enzimi omologhi in species neoarthiche e paleoartiche del genere *Anopheles*. 1. Fosfatasi alcaline de *A. freeborni* e *A. labranchiae*. *Revista Parasitologica*, v.29, p.297-303, 1968.

BRIEGEL, H. Non-specific esterases in females *Aedes aegypti* (L.). *Experientia*, v.28, p.1166-1168, 1972.

BRIEGEL, H.; FREYVOGEL, T.A. Non specific esterases during development of culicine mosquitoes. *Acta Tropical*, v.28, n.3, p.291-297, 1971.

CACCONE, A.; GARCIA, B.A.; POWELL, J.R. Evolution of the mitochondrial DNA control region in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Molecular Biology*, v.5, p.51-69, 1996.

CAETANO-ANÓLLES, G.; BASSAM, B.; GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting a strategy for genome analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.9, p.292-305, 1991.

CALADO, D.C.; NAVARRO-SILVA, M.A. Polimorfismos em *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab (Diptera, Culicidae) detectados através de PCR-RAPD. Variabilidade genética em indivíduos de mesma progênie. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.22, n.4, p.1121-1126, 2005.

CALVO, E.; ANDERSEN, J.; FRANCISCHETTI, I.M.; CAPURROT, M.; BIANCHI, A.G.; JAMES, A.A.; RIBEIRO, J.M.C.; MARINOTTI, O. The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. *Insect Molecular Biology*, v.13, n.1, p.73-88, 2004.

CAUSEY, O.R.; DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Note clarifying the status of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles darlingi*. *Proceedings of Entomological Society of Washington*, v.44, p.122-126, 1942.

CHARLWOOD, J.D. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.91, p.391-398, 1996.

CHARLWOOD, J.D.; HAYES, J. Variações geográficas no ciclo de picadas do *Anopheles darlingi* Root no Brasil. *Acta Amazonica*, v.8, p.601-603, 1978.

COHUET, A.; DIA, I.; SIMARD, F.; RAYMOND, M.; FONTENILLE, D. Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data. *Insect Molecular Biology*, v.13, p.251-258, 2004.

COLLINS, F.H.; PASKEWITZ, S.M. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, v.5, p.1-9, 1996.

COLUZZI, M.; SABATINI, A.; PETRARCA, V.; DI-DECO, M.A. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.73, n.5, p.483-497, 1979.

CONN, J.E.; BOLLBACK, J.; ONYABE, D.Y.; ROBINSON, 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.; ROSA-FREITAS, M.G.; LUZ, S.L.; MOMEN, H. Molecular population genetics of the primary neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. *Journal of American Mosquitoes Control Association*, v.15, p.468-474, 1999.

CONN, J.E.; VINEIS, J.H.; BOLLBACK, J.P.; ONYABE, D.Y.; WILKERSON, R.C.; PÓVOA, 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*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 1994. 225 p.

COUTO, A.A.; CALVOSA, V.S.; LACERDA, R.; CASTRO, F.; ROSA, E.S.; NASCIMENTO, J.M. Controle da transmissão da malária em área de garimpo

no Estado do Amapá com participação da iniciativa privada. *Caderno de Saúde Pública*, v.17, n.4, p.897-907, 2001.

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 Serviços e Saúde Pública*, v.1, p.827-965, 1948.

DIMOPOULOS, G.; ZHENG, L.; KUMAR, V.; TORRE, A.D.; KAFATOS, F.C.; LOUIS, C. Integrated genetic map of *Anopheles gambiae*: use de RAPD polymorphisms for Genetic, Cytogenetic and STS Landmarks. *Genetics*, v.143, p.953-960, 1996.

DOBZHANSKY, T.H. *Genetics of the evolutionary process*. New York: Columbia University Press. 1970.

DUSFOUR, I.; MICHAUX, J.R.; HARBACH, R.E.; MANGUIN, S. Speciation and phylogeography of the Southeast Asian *Anopheles sundaicus* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, v.7, n.4, p.484-493, 2007.

FARAN, M.E. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXXIV. A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contribution of American Entomology Institute (Ann Arbor)*, v.15, p.1-215, 1980.

FERREIRA, E. Distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil e sua relação com o estado atual da erradicação da malária. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v.16, p.329-348, 1964.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 220 p.

FORATTINI, O.P. Comportamento exofílico de *Anopheles darlingi* Root, em região meridional do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.21, p.291-304, 1987.

FREITAS-SIBAJEV, M.G.R.; CONN, J.E.; MITCHELL, S.E.; COCKBURN, A.F.; SEAWRIGHT, J.A.; MOMEN, H. Mitochondrial DNA and morphological analysis of *Anopheles darlingi* populations from Brasil (Diptera: Culicidae). *Systematic Mosquitoes*, v.27, n.2, p.78-99, 1995.

FUTUYMA, D.J. *Biologia Evolutiva*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq. 1992. 646 p.

GABALDÓN, A.; GARCIA-MARTIN, G.; SIFONTES, R. Necesidades en el campo de la investigación del programa nacional de erradicación y control de la malaria de Venezuela. *Bolletín Diretor del Malaria Y Sanidad Ambiental*, v.15, n.6, p.263-285, 1975.

GABALDÓN, A.; GUERRERO, L. An attempt to eradicate malaria by the weekly administration of pyrimethamine in areas of out - of - doors transmission in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.8, p.433-439, 1959.

GALVÃO, A.L.A.; LANE, J.; CORREA, R.R. Notas sobre *Nyssorhynchus* de São Paulo. V. Sobre os *Nyssorhynchus* de Novo Oriente. *Journal of Biology and Hygiene.*, v.8, p.27-45, 1937.

GIGLIOLI, G. Biological variations in *Anopheles darlingi* and *Anopheles gambiae*: their effect on practical malaria control in the neotropical region. *Bulletin World Health Organization*, v.15, p.461-471, 1956.

GONÇALVES, M.J.F. *Estudo sobre a relação da malária com as alterações ambientais e urbanização em Manaus/AM (1986-1997)*. 1999. 159 p. Dissertação (Ciências Ambientais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

GORHAM, J.R.; STOJANOVICH, C.J.; SCOTT, H.G. *Clave ilustrada para los Mosquitos Anofelinos de Sudamérica Oriental*. Atlanta: Communicable Disease Center, United States Public Health Service. 1967. 64 p.

GUEDES, A.S.; AMORIN, E.M.; SCHREIBER, G. Análise dos cromossomos salivares em anofelinos brasileiros. *Revista Brasileira de Malária e Doenças Tropicais*, v.9, p.247-250, 1957.

GUERRANTE, L.R.; BLACKWOOD, B.L. Threats to global health and survival: the growing crises of tropical infectious diseases - our "unfinished agenda". *Clinical and Infective Diseases*, v.28, n.5, p.966-986, 1999.

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

HAYES, J.; CHARLWOOD, J.D. Observações sobre a biologia de *Anopheles darlingi* numa área endêmica de malária. *Ciência e Cultura*, v.3, p.120-122, 1980.

KAISER, P.E.; MITCHELL, S.E.; LANZARO, G.C.; SEAWRIGHT, J.A. Hibridization of laboratory strain of sibling species A and B of *Anopheles quadrimaculatus*. *Journal of American Mosquitoes Control Association*, v.4, p.34-38, 1988a.

KAISER, P.E.; NARANG, S.K.; SEAWRIGHT, J.A.; KLINE, D.L. A new member of the *Anopheles quadrimaculatus* complex, species C. *Journal of American Mosquitoes Control Association*, v.4, p.494-499, 1988b.

KAMBHAMPATI, S.; BLACK IV, W.C.; RAI, K.S. Random Amplified Polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, Statistical Analysis, and Applications. *Journal of Medicine and Entomology*, v.29, n.6, p.936-945, 1992.

KERR, W.E. *Papel das abelhas sociais na Amazônia*. Apicultura em clima quente. Florida: Simpósio Internacional, 1978. p.

KREUTZER, R.D.; KITZMILLER, J.B.; FERREIRA, E. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. *Mosquitoes News*, v.32, p.355-365, 1972.

LANZARO, G.C.; NARANG, S.K.; MITCHELL, S.E.; KAISER, P.E.; SEAWRIGHT, J.A. Hybrid male sterility in crosses between field and laboratory strains of *Anopheles quadrimaculatus* (say) (Diptera: Culicidae). *Journal of Medicine and Entomology*, v.25, p.248-255, 1988.

LEHMANN, T.; LICHT, M.; ELISSA, N.; MAEGA, B.T.; CHIMUMBWA, J.M.; WATSENGA, F.T.; WONDJI, C.S.; SIMARD, F.; HAWLEY, W.A. Population structure of *Anopheles gambiae* in Africa. *Heredity*, v.94, p.133-147, 2003.

LI, W.H.; GRAUR, D. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinderland: Sinauer. 1991.

LINTHICUM, K.J. A revision of the *Argyritarsis* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Mosquitoes Systematic*, v.20, p.98-271, 1988.

LITSIOS, S. *The tomorrow of malaria*. Geneva: Pacific/ECOTRENDS. 1996. 181 p.

LOUNIBOS, L.; CONN, J.E. Malaria vector heterogeneity in South America. *American Entomology*, v.46, p.238-249, 2000.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; GUIMARÃES, A.E.; ARLÉ, M.; SILVA, T.F.; CASTRO, M.G.; MOTTA, M.A.; DEANE, L.M. Anopheline species, some of their habitats and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.84, p.501-514, 1989.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; GUIMARÃES, A.E.; DANIEL-RIBEIRO, C.; DANIEL, L.M. Studies in progress on malaria transmission in Rondonia State, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.84, n.4, p.485-491, 1987.

MALAFRONTA, R.S.; MARELLI, M.T.; MARINOTTI, O. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medicine and Entomology*, v.36, p.631-634, 1999.

MANGUIN, S.; WILKERSON, R.C.; CONN, J.E.; RUBIO-PALIS, Y.; DANOFF-BURG, J.A.; ROBERTS, D.R. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified

polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.60, n.3, p.364-376, 1999.

MARELLI, M.T. *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae): análise do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico e da susceptibilidade à infecção com *Plasmodium vivax*. 2000. 67 p. Tese (Instituto de Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARELLI, M.T.; FLOETER-WINTER, L.M.; MALAFRONTA, R.S.; TADEI, W.P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FLORES-MENDOZA, C.; MARINOTTI, O. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, v.19, p.208-218, 2005.

MATTHEWS, T.C.; MUNSTERMANN, L.E. Genetic diversity and differentiation in northern populations of the tree - hole mosquito *Aedes heudersoni* (Diptera: Culicidae). *Annals of Entomology Society of American*, v.76, p.1005-1010, 1983.

MILLER, M.P. *Tools for population genetic analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data, version 1.3*. Arizona: Northern Arizona University. 1997.

MIRABELLO, L.; CONN, J.E. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *Heredity*, v.96, p.311-321, 2006.

MITCHELL, S.E.; NARANG, S.K.; COCKBURN, A.F.; SEAWRIGHT, J.A.; GOLDENTHAL, M. Mitochondrial and ribosomal DNA variation among

members of the *Anopheles quadrimaculatus* species complex. *Genome*, v.35, p.939-950, 1992.

MORAN, E.F. *Developing the Amazon*. Bloomington: Indiana University Press. 1981

NARANG, S.K.; KAISER, P.E. Identification of species D, a new member of the *Anopheles quadrimaculatus* species complex: a biochemical key. *Journal of American Mosquitoes Control Association*, v.5, p.317-324, 1989b.

NARANG, S.K.; KAISER, P.E.; SEAWRIGHT, J.A. Dichotomous electrophoretic key for the identification of sibling species A, B and C of the *Anopheles quadrimaculatus* (say) complex (Diptera: Culicidae). *Journal of Medicine and Entomology*, v.26, p.94-99, 1989a.

NARANG, S.K.; KITZMILLER, J.B.; GALLER, R.; RIOS, I.R.; NARANG, N. Genética de populações de anofelinos III. Análise eletroforética de *Anopheles aquasalis*. *Revista Brasileira de Pesquisa em Medicina e Biologia*, v.12, n.4/5, p.303-309, 1979b.

NARANG, S.K.; SANTOS, J.M.M.; GARCIA, J.C.; CRISTAKOU, H.D.; NARANG, N. Genética de Populações de anofelinos IV. Estudos eletroforéticos das populações naturais de *Anopheles nuneztovari* e *Anopheles darlingi*. Correlação genética entre espécies. *Acta Amazonica*, v.9, n.3, p.529-542, 1979a.

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

NEVES, D.P. *Parasitologia humana*. São Paulo: Atheneu. 1988. 462 p.

NEVO, E. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoretical Popular Biology*, v.13, p.121-177, 1978.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; TÊVA, A.; DOMINGOS-DA-SILVA, E.; GUIMARÃES, A.E.G.; MANGUEIRA-ESTE, M.G.; DEANE, L.M.; DANIEL-RIBEIRO, C. Malaria transmission and development of immune response in individuals from Ariquemes, Rondonia State. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.83, p.210, 1988.

OPS. *Organización Mundial de la Salud. Situación de Los Programas de Malaria en Las Americas. Informe XLII. XXV Conferencia Sanitaria Panamericana. 50a. Sesión del Comité Regional. Washington, D.C. 21 al 25 de septiembre. 1998.*

PASTEUR, N.; SINEGRE, G. Esterase polymorphism and sensitivity to Dursban organophosphorus insecticides in *C.p. pippiens* populations. *Biochemistry Genetics*, v.13, p.789-803, 1975.

PINEDO-CANCINO, V.; SHEEN, P.; TARAZONA-SANTOS, E.; OSWALD, W.E.; JERI, C.; VITTOR, A.Y.; PATZ, J.A.; GILMAN, R.H. Limited diversity of *Anopheles darlingi* in the Peruvian Amazon Region of Iquitos. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.74, p.1-17, 2006.

POSSO, C.; GONZALEZ, R.; CARDENAS, H.; GALLEGUE, G.; DUQUE, M.; SUAREZ, M. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from western and northeastern Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, p.469-476, 2003.

PUTERKA, G.J.; BLACK, W.C.; STEINER, W.M.; BURTON, R.L. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid. *Diuraphis noxia* (Morkvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity*, v.70, p.604-618, 1993.

RABANNI, M.B.; SEAWRIGHT, J.A.; LEATHERWOOD, L.B. A method for culturing single families of *Anopheles albimanus*. *Mosquitoes News*, v.36, n.1, p.100-102, 1976.

RAFAEL, M.S.; TADEI, W.P. Heterocromatin variation in chromosomes of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root and *A. (N.) nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae). *Genetics and Molecular Biology*, v.23, n.1, p.67-70, 2000.

_____. Metaphase karyotypes of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root and *A. (N.) nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae). *Genetics and Molecular Biology*, v.21, n.3, p.351-354, 1998.

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.; WILLIAMS, J.G.K. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News and Information*, v.3, p.645-648, 1991.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Heredity*, v.86, p.248-249, 1995.

ROSA-FREITAS, M.G.; BROOMFIELD, G.; PRIESTMAN, A.; MILLIGAN, P.J.; MOMEN, H.; MOLYNEUX, D.H. Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *Journal of American Mosquitoes Control Association*, v.8, p.357-366, 1992.

ROSA-FREITAS, M.G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; CARVALHO-PINTO, C.J.; FLORES-MENDOZA, C.; SILVA-DO-NASCIMENTO, T.F. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.93, p.651-655, 1998.

SANGUINO, E.C.B.; SANTOS, J.M.M. *Análise da variabilidade genética e detecção de infecção por Plasmodium falciparum em Anopheles darlingi, por meio de técnicas moleculares*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Manaus, p.25. 2002.

SANTOS, J.M.M. *Aspectos biológicos e isoenzimáticos de Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera: Culicidae)*. 1979. 87 p. Dissertação (Ciências Biológicas) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

_____. *Variabilidade genética em populações naturais de Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera: Culicidae)*. 1992. 150 p. Doutorado (Ciências Biológicas) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

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.; TADEI, W.P.; CONTEL, E.P.B. Ontogeny of esterases, leucine aminopeptidase and alfa-glycerophosphate dehydrogenase in

Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root, 1926 (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v.56, n.3, p.591-598, 1996.

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, p.1010-1018, 1999.

SCHREIBER, G.; GUEDES, A.S. Cytological aspects of the taxonomy of Anophelines (Subgenus *Nyssorhynchus*). *Bulletin World Health Organization*, v.24, p.657-658, 1961.

_____. Perspectivas citológicas na sistemática dos anofelinos (S.G. *Nyssorhynchus*). *Revista Brasileira de Malária e Doenças Tropicais*, v.12, p.355-358, 1960.

SINGER, B.H.; CASTRO, M.C. Agricultural colonization and malaria on the Amazon frontier. *Annals of the New York Academy of Science*, v.954, p.184-222, 2001.

SOURNIA, J.C.; RUFFIE, J. *As epidemias na história do homem*. Lisboa: Edições 70. 1984. 247 p.

SOUSA, G.B.; BLANCO, A.; GARDENAL, C.N. Genetic relationships among *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Argentina using Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction Markers. *Journal of Medicine and Entomology*, v.38, n.3, p.371-375, 2001.

SOUSA, G.B.; DUTARI, G.P.; GARDENAL, C.N. Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) populations in central Argentina determined by Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Reaction Markers. *Journal of Medicine and Entomology*, v.36, n.3, p.400-404, 1999.

SOUZA, M.T.B. *Genética e variabilidade de isoesterases no mosquito Culex pipiens fatigans e suas relações com o ambiente*. 1980. 129 p. Dissertação (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

STEINER, W.W.M.; NARANG, S.K.; KITZMILLER, J.B.; SWOFFORD, D.L. Genetic divergence and evolution in neotropical *Anopheles* (subgenus *Nyssorhynchus*). In. *Recent developments in the genetics of insect disease vectors*. Illinois: Stipes Pub. Cy, 1982, p.523-551.

SUBBARAO, S.K.; VASANTHA, K.; SHARMA, V.P. Responses of *Anopheles culicifacies* sibling species A e B to DDT e HCH in India: implications in malaria control. *Medical and Veterinary Entomology*, v.2, p.219-223, 1988.

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

TADEI, W.P. Biologia de anofelinos amazônicos. XVIII. Considerações sobre as espécies *Anopheles* (Culicidae), transmissão e controle da malária na Amazônia. *Revista da Universidade do Amazonas*, v.2, n.1-2, p.1-34, 1993.

_____. Controle da malária na Amazônia. *Anais/Resumo da 7a. Reunião Especial da SBPC*, v.CD Room, p.1-6, 2001.

TADEI, W.P.; DUTARY-THATCHER, B.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES, 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, n.2, p.325-335, 1998.

TADEI, W.P.; RODRIGUES, 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, 2003. 149 p.

TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M. Biologia de anofelinos amazônicos. VII. Estudo da variação de frequências das inversões cromossômicas de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). *Acta Amazonica*, v.12, n.4, p.759-785, 1982.

TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M.; CUNHA, S.A. Sobre o polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae). *Ciência e Cultura*, v.36, n.7, p.916, 1984.

TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M.; RABANNI, M.B. Biologia de Anofelinos Amazônicos. V. Polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae). *Acta Amazonica*, v.12, n.2, p.353-369, 1982.

TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES, I.B. Incidência, Distribuição e Aspectos Ecológicos de Espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em Regiões Naturais e Sob Impacto Ambiental da Amazônia Brasileira. In: FERREIRA, E.J.G.; SANTOS, G.M.; LEÃO, E.L.M.; OLIVEIRA, L.A. (Eds.). *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e*

Desenvolvimento da Amazônia. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, v.2, 1993, p.167-196.

URBANELLI, L.; BULLINI, L. Electrophoretic studies on *Culex quinquefasciatus* Say from Africa. Genetic variability and divergence from *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomology Research*, v.75, p.291-304, 1985.

VAN-THIEL, P.H. Malaria problems arising from the construction of a reservoir in the interior of Surinam. *Tropical Medicine*, v.14, p.259-278, 1962.

VEDBRAT, S.S.; WHITT, G.S. *Isozyme ontogeny of the mosquito, Anopheles albimanus*. San Francisco: C.L. Market Academic Press. 1975.

WHITE, G.B. Malaria vectors ecology and genetics. *British Medical Bulletin*, v.38, p.207-212, 1982.

WHO. *Malaria vectores species complexes and intraespecific variations: relevance for malaria control and orientation for further research*. World Health Organization. Bangkok: 29 october - 3 november. 1984.

WILKERSON, R.C.; PARSON, T.J.; KLEIN, T.A.; GAFFGAN, 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 of Medicine and Entomology*, v.32, n.5, p.697-704, 1995.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; TINGY, S.V. DNA polymerase amplified by arbitrary primers are used as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods Enzymology*, v.218, p.704-740, 1993.

WRIGHT. The genetical structure of populations. *Annals Eugenetics*, v.15, p.313-354, 1951.