

GUSTAVO STARVAGGI FRANÇA

**SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DA REGIÃO ITS2 DE *Anopheles*
(*Kerteszia*) *cruzii* Dyar & Knab 1908 (Diptera: Culicidae)
PROVENIENTE DA POPULAÇÃO DA FLORESTA ESTADUAL DO
PALMITO – PARANAGUÁ – PR**

CURITIBA

2005

GUSTAVO STARVAGGI FRANÇA

**SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DA REGIÃO ITS2 DE *Anopheles*
(*Kerteszia*) *cruzii* Dyar & Knab 1908 (Diptera: Culicidae)
PROVENIENTE DA POPULAÇÃO DA FLORESTA ESTADUAL DO
PALMITO – PARANAGUÁ – PR**

Monografia apresentada ao Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Roseli Wassem

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva

CURITIBA

2005

AGRADECIMENTOS

Devo agradecer em especial à Prof. Dra. Roseli Wassem pela orientação, esteve presente em todos os momentos e decisões e sempre demonstrou rara compreensão, paciência e sobretudo dedicação, tornando a convivência muito agradável.

Agradeço ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza, com quem tive o primeiro contato e que no mesmo instante demonstrou interesse e logo me apresentou um projeto de trabalho, oferecendo todas as condições e subsídios para que o mesmo pudesse ser realizado no Núcleo de Fixação de Nitrogênio, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

Agradeço ao Prof. Dr. Mário Navarro, que nos forneceu a “matéria-prima” e a situação-problema a ser investigada, dando liberdade para conduzirmos o trabalho sem se eximir das sugestões e contribuições.

Aos colegas e funcionários do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, cujas contribuições foram significantes e das quais fui dependente em várias ocasiões. Com receio de não mencionar alguém, devo agradecer ao Valter pelo incentivo e por realizar as eletroforeses das reações de seqüenciamento; ao Marco, Anelis, Michelle, Helisson, Giovani e Tuca, que sempre ajudaram desde as mais simples tarefas e de quem foram exigidos bastante paciência, pelos mesmos motivos agradeço ao Jefferson e Fernanda do LabGem.

À Ana, Ricardo e Eduardo do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da UFPR, que coletaram, identificaram e cederam os mosquitos.

SUMÁRIO

RESUMO	v
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária.....	2
1.2 Principais vetores da malária no Brasil.....	4
1.2.1 Considerações sobre a malária no Paraná.....	6
1.3 Complexos de espécies crípticas no Brasil.....	7
1.3.1 <i>Anopheles cruzii</i>	7
1.4 Estrutura e evolução do DNA ribossômico.....	8
1.4.1 Características do espaçador ITS2.....	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos específicos.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Área de estudo e coleta.....	14
3.2 Identificação morfológica.....	15
3.3 Extração de DNA.....	15
3.4 Amplificação do DNA.....	16
3.5 Eletroforese.....	16
3.6 Sequenciamento de DNA.....	17
3.7 Análise das seqüências.....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS	28

RESUMO

O gênero *Anopheles* compreende cerca de 500 espécies, das quais, menos de 50 são transmissoras do agente etiológico da malária. A identificação dos anofelinos tem sido um desafio para a taxonomia, principalmente porque muitas espécies pertencem à complexos de espécies crípticas. A identificação das espécies e caracterização dos complexos têm grandes implicações para a epidemiologia da malária e para o estabelecimento de medidas de controle. *Anopheles cruzii* é um importante vetor na região Sul e Sudeste do Brasil, sendo que algumas evidências morfológicas, citogenéticas e moleculares apontam *A. cruzii* como um complexo de espécies crípticas. Análises das seqüências do espaçador ITS2 têm sido amplamente utilizadas em estudos taxonômicos, surgindo como um método adicional na identificação de espécies crípticas. Em vista da possibilidade de *A. cruzii* compreender um complexo, foram analisadas as seqüências do espaçador ITS2 para uma amostra da população da Floresta Estadual do Palmito – Paranaguá – PR e comparadas com as seqüências depositadas no GenBank de amostras de Juquiá e Peruíbe, no estado de São Paulo. O sequenciamento revelou dois tipos de seqüência ou genótipos. O genótipo Paranaguá 1 é diferente em 1,84% da população de Juquiá e 1,61% da população de Peruíbe. O genótipo Paranaguá 2 diverge em 10,3% e 10,1% destas duas populações respectivamente. Variações entre indivíduos identificados por ambos os genótipos não foram observadas. As populações de Paranaguá e do estado de São Paulo podem ser diferenciadas pela restrição com a enzima *Hpy188I*. Os dois genótipos de Paranaguá podem ser diferenciados pela restrição com as enzimas *TaqI* ou *HincII*. A existência destes dois genótipos evidencia a possível presença de espécies crípticas, porém os significados destas diferenças devem ser esclarecidos através de novos estudos, que conciliem metodologias e abordagens mais abrangentes.

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Anopheles* Meigen são conhecidas por transmitirem os protozoários do gênero *Plasmodium*, o agente etiológico da malária. Segundo HARBACH (2004), o gênero é composto por 444 espécies formalmente nominadas e 40 com nomes provisórios (dados de Julho de 2004), classificadas em quatro subgêneros: *Anopheles* Meigen, *Cellia* Theobald, *Nyssorhynchus* Blanchard e *Kerteszia* Theobald (SALLUM *et al.*, 2000). A distribuição destes mosquitos varia desde ambientes desérticos até florestas tropicais (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Dentre as espécies de anofelinos, menos de 50 são consideradas importantes vetores, isto porque algumas não se alimentam de sangue humano, outras não vivem o tempo necessário para que o ciclo de vida do parasito se complete ou não suportam a fase de esporogonia ou são raros na natureza (BEIER & VANDERBERG, 1998).

Numerosos esforços têm sido despendidos na identificação das espécies do gênero *Anopheles*, já que a maioria delas pertencem à complexos de espécies crípticas (COLLINS *et al.*, 2000). A variação críptica geralmente não vem acompanhada de mudanças morfológicas evidentes, mas pode ser uma fonte emergencial de plasticidade evolutiva e fisiológica (GIBSON & DWORKIN, 2004). Neste sentido, as diferenças biológicas entre membros de um complexo podem ser determinantes quanto à potencialidade vetorial (WALTON *et al.*, 1999).

No complexo *Anopheles oswaldoi* por exemplo, foi observado que *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *oswaldoi* Peryassu é mais susceptível à infecção por *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti do que *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *konderi* Galvão & Damasceno (MARRELLI *et al.*, 1999a). Diferenças quanto à resistência a inseticidas também foram investigadas. O exemplo clássico ocorreu no Zimbábue, no início dos anos 70, com espécies do complexo *Anopheles* (*Cellia*) *gambiae* Giles, que foram testados quanto à resistência/susceptibilidade ao BHC (benzeno hexaclorado). Os indivíduos mortos e vivos foram identificados por bandeamento de cromossomos politênicos como *Anopheles* (*Cellia*) *arabiensis* Patton. Contudo, a identificação através de ensaios imunoenzimáticos revelou que todos os sobreviventes eram *A. arabiensis*, um importante vetor do complexo, e que todos os mortos eram *Anopheles*

(*Cellia*) *quadriannulatus* Theobald, não envolvidos com a transmissão da doença (GREEN, 1981, *apud* COLLINS *et al.*, 2000; MARRELLI, 2000).

A identificação das espécies bem como a caracterização dos complexos, é portanto, uma ferramenta essencial para a epidemiologia (WALTON *et al.*, 1999) e, associada à compreensão da estrutura genética das populações, detecção e monitoramento da resistência à inseticidas e aos estudos ecológicos e comportamentais, podem contribuir de maneira significativa com a elaboração de estratégias eficientes para o controle da malária (COLLINS *et al.*, 2000).

1.1 Malária

Desde a antiguidade a malária se apresenta como uma das maiores causas de morte em todo o mundo. Foram encontradas em registros históricos referências à esplenomegalia e febre periódica, indicando a ocorrência da malária há mais de 4000 anos em regiões entre os rios Tigre e Eufrates, na Índia (1500 a 800 a.c) e no Egito (há 3000 anos). Não há registros da presença da malária no novo mundo antes da chegada de colonizadores e exploradores europeus. Acredita-se que a forma mais grave da doença, transmitida por *Plasmodium falciparum* Welch, foi introduzida nas Américas através do tráfico de pessoas provenientes da África. Em meados de 1800 a malária já estava distribuída por todas as partes do globo (SHERMAN, 1998).

A malária é a doença infecciosa mais importante no mundo. Atinge cerca de 300 a 500 milhões de pessoas por ano. Dentre os indivíduos infectados 1,5 a 2,7 milhões evoluem à morte (WHO, 1998). A malária está presente em aproximadamente 105 países e ocorre em maior frequência nas regiões de clima quente, tropicais e subtropicais (FORATTINI, 1962). Atualmente mais de 40% da população mundial vive em áreas endêmicas (SUH *et al.*, 2004). Cerca de 90% dos casos mundiais de infecções e mortes decorrentes desta doença ocorrem na África. Nas Américas o foco da doença é a região da bacia Amazônica onde concentram-se dois terços dos casos, em parte por conta da mineração e colonização. No Brasil, a região Amazônica é responsável por 99% dos casos registrados (TADEI & THATCHER, 2000).

A malária está intimamente relacionada a problemas sócio-econômicos, devido às condições precárias de moradia, alimentação e pouco acesso a tratamento médico (TRIGG & KONDRACHINE, 1998; SUH *et al.*, 2004). Em locais onde há alta endemicidade é comum que os habitantes desenvolvam resistência imune. Portanto, a alta prevalência deve-se às infecções em crianças, mulheres grávidas e pessoas suscetíveis, geralmente viajantes, que não possuem imunidade e conseqüentemente desenvolvem sintomas mais severos da doença (FORATTINI, 1962). Surtos epidêmicos não são incomuns e podem ser resultado de mudanças climáticas como aumento de umidade e altas temperaturas, desastres naturais, guerras, movimentos migratórios e políticas de controle ineficientes (TRIGG & KONDRACHINE, 1998).

A descoberta do agente etiológico e a forma de transmissão da malária merecem destaque na história da ciência. Segundo SHERMAN (1998), os primeiros estudos foram em 1879, quando Edwin Klebs e Corrado Tomassi-Crudelli isolaram uma bactéria da urina de um paciente com malária e a denominaram de *Bacillus malarie*. Outros pesquisadores tentaram cultivá-la em sangue de pacientes infectados, mas não obtiveram sucesso. Em 1880 Charles Louis Alphonse Laveran, observando ao microscópio o sangue de um soldado que sofria de febre intermitente, identificou corpos em forma de fuso rodeados por grânulos pigmentados (hemossóina), caracterizando assim o agente causador da malária. Análises de diversas amostras permitiram a identificação dos atualmente conhecidos gametócitos masculinos e femininos e trofozoítos. Posteriormente outros pesquisadores determinaram que o parasito pertencia ao gênero *Plasmodium*.

Ronald Ross, em 1897, forneceu outra grande contribuição, estudando a malária em aves, onde descobriu que a transmissão do parasito ocorria através da picada de mosquitos. Anos depois, Grassi, Bastianelli e Bignami confirmaram a transmissão em humanos através da forma proposta por Ross e demonstraram que os anofelinos eram os vetores da malária humana (SHERMAN, 1998)

1.2 Principais vetores da malária no Brasil

De acordo com FORATTINI (1962), para que uma espécie seja considerada um importante vetor de malária é necessário que o seu tempo de vida seja suficiente para que o ciclo vital do parasito se complete e ao mesmo tempo ser susceptível à infecção, ter hábito antropofílico, frequentar o ambiente doméstico e ser capaz de manter a densidade populacional relativamente alta.

Existem no Brasil mais de 50 espécies de anofelinos, porém aquelas consideradas vetores eficientes pertencem somente aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (DEANE, 1986).

a) As espécies pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus* se desenvolvem em lagoas, rios, represas, lagos ou onde há reservatórios de água em ambiente terrestre (FERREIRA, 1964).

Anopheles darlingi Root é o principal vetor no Brasil (DEANE, 1986). Exerce um papel fundamental na transmissão da doença em todo o interior do país (FERREIRA, 1964), destacando-se na região Amazônica. Não ocorre no extremo Sul e regiões mais secas do Nordeste (DEANE, 1986). Pode ser encontrada no litoral norte da América do Sul, mas é tipicamente um vetor de interior (FORATTINI, 1962). É uma espécie altamente susceptível à infecção por plasmódios (REY, 1991), é encontrada freqüentemente no ambiente doméstico, apresentando alto grau de antropofilia (FORATTINI, 1962; DEANE, 1986). Demonstra plasticidade quanto ao horário de atividade hematofágica, variando de um local para outro, o que pode ser considerada uma característica que confere maior potencialidade vetorial (VOORHAM, 2002). A densidade pode aumentar em virtude das atividades humanas como a construção de represas, açudes, etc. e elevadas precipitações, possibilitando a ocorrência de surtos graves (FORATTINI, 1962).

Anopheles aquasalis Curry é o principal vetor nas regiões litorâneas do Brasil e responde, junto ao *A. darlingi*, por quase toda a transmissão acima do paralelo 25°S. Ocorre desde o extremo Norte até o Sul do Estado de São Paulo e não é encontrada nos estados do Sul do Brasil e naqueles não banhados pelo mar (FERREIRA, 1964).

A zoofilia é mais evidente que a antropofilia, mas o aparecimento em altas densidades condiciona a esta espécie um importante papel na transmissão da malária (FORATTINI, 1962). Possui raio de vôo de 8 km, um valor expressivo em comparação com os outros anofelinos (REY, 1991). Na maioria das vezes é exofílica e crepuscular, mas podem adentrar nas casas e picar humanos durante a noite (DEANE, 1986).

b) Espécies pertencentes ao subgênero *Kerteszia*: Esses anofelinos caracterizam-se pelo desenvolvimento em águas que se acumulam em bromeliáceas, são freqüentes no litoral, onde a Floresta Atlântica abriga grande quantidade e variedade destas plantas. O regime de chuvas equilibrado ao longo do ano, com máximo no verão favorece a ocorrência dos *Kerteszia* (FERREIRA, 1964).

Anopheles bellator Dyar & Knab contribui com a transmissão nos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (FERREIRA, 1964). FORATTINI *et al.* (1999) constataram endofilia relativamente alta e grande tendência em frequentar residências que se encontravam a cerca de 20 m da Floresta Atlântica no Estado de São Paulo. Estes mosquitos apresentam características em comum com *Anopheles cruzii*. São encontrados dentro e fora do domicílio, picando o homem durante o dia e a noite no interior ou exterior da mata (FERREIRA, 1964). *A. cruzii* suga durante o dia com maior freqüência do que *A. bellator* (DEANE, 1986). A endofilia parece ser maior em *A. bellator* (FORATTINI *et al.*, 1996). Em outro estudo feito por FORATTINI *et al.* (2000) observou-se que estas duas espécies retornam ao ambiente natural logo após fazerem o repasto nas residências, com raio de vôo variando em torno de 1500 metros (REY, 1991). *A. cruzii* e *A. bellator* exercem acrodendrofilia e zoofilia (DEANE, 1986), a potencialidade vetorial destas espécies está relacionada com a densidade, alta incidência domiciliar e antropofilia (FERREIRA, 1964).

Anopheles cruzii Dyar & Knab é considerado um vetor potencial no Sul e Sudeste do Brasil e geralmente tem distribuição sobreposta com *A. bellator*. *A. cruzii* é bastante representativa nos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro (FERREIRA, 1964). É uma espécie predominantemente litorânea, que pode ser encontrada desde o Rio Grande do Sul até o Nordeste (ARAGÃO, 1964). As características compartilhadas com *A. bellator* citadas anteriormente retratam a

importância desses vetores na epidemiologia da malária. Um aspecto epidemiológico interessante desta espécie é a veiculação do plasmódio entre macacos, outros mamíferos e aves (DEANE, 1986; FERREIRA & LUZ, 2003). Estes mosquitos se dispersam do solo para a copa das árvores e vice-versa, sugerindo possibilidade de infecções esporádicas no homem pelo plasmódio dos macacos (DEANE *et al.*, 1984).

1.2.1 Considerações sobre a malária no Paraná

De forma geral, *A. cruzii* e *A. bellator* são responsáveis pela transmissão no litoral e na parte à leste da Serra do Mar e *A. darlingi* no interior do Estado, nas porções Norte, Noroeste e Oeste. *A. cruzii* e *A. bellator* são comuns em Antonina, Guaraqueçaba, Morretes, Guaratuba e Paranaguá (RACHOU, 1954). *A. darlingi* é encontrada freqüentemente ao longo dos rios Paranapanema e Paraná até o rio Guaíra, e também nos seus tributários próximos de sua foz. Às vezes se dispersa por longas extensões rio acima (FERREIRA & LUZ, 2003).

Segundo os relatos de FERREIRA & LUZ (2003), em 1944 a malária era altamente incidente no litoral e no interior do Estado do Paraná, tendo queda acentuada em 1948. Por volta de 1955 e 1962 houve um novo aumento no número de casos na região litorânea. Com o fechamento da barragem da hidrelétrica de Itaipu, a suspensão das dedetizações e a migração de pessoas infectadas do Norte do país e do Paraguai, mesmo depois da malária ter sido considerada “erradicada” em 1976, favoreceram um surto em 1989. Os autores ressaltam que onde houver movimentos de pessoas provenientes de regiões endêmicas, a malária pode ser reintroduzida em qualquer localidade do Estado onde os transmissores estiverem presentes. Nos anos de 1990, 1995 e 2001 registrou-se um aumento no número de casos. A reintrodução da malária não foi registrada no litoral paranaense, bem como no restante do Estado, exceto na região do lago de Itaipu.

1.3 Complexos de espécies crípticas no Brasil

As espécies crípticas são consideradas morfologicamente muito semelhantes ou indistinguíveis, mas podem divergir em outras características biológicas (FUTUYMA, 2002), condicionadas pelas diferenças genéticas entre elas. Estas espécies podem ser reunidas em complexos de espécies crípticas. Em uma síntese feita por ROSA-FREITAS *et al.* (1998) em relação aos complexos de anofelinos no Brasil, *A. darlingi* é indicada como uma espécie monotípica, hipótese reforçada por MANGUIN *et al.* (1999) estudando populações da América do Sul. *A. aquasalis* e *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Galbadon, esta última não relacionada à transmissão no Brasil, possivelmente formam complexos. *A. albitarsis* é um complexo formado por pelo menos quatro espécies crípticas, porém não está determinado o papel de cada um na transmissão da malária. *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* Neiva & Pinto é um complexo formado por pelo menos três espécies crípticas e *A. oswaldoi*, um potencial vetor em algumas localidades da Amazônia, é formado por pelo menos duas espécies crípticas, *A. oswaldoi sensu stricto* e *A. konderi*.

1.3.1 *Anopheles cruzii*

Variações morfológicas, citogenéticas e moleculares entre as populações de *A. cruzii* apontam para a existência de um complexo de espécies crípticas.

Diferenças morfológicas entre larvas de populações do estado do Rio de Janeiro e Santa Catarina foram observadas, indicando a possibilidade de espécies diferentes (ZAVORTINK, 1973).

MALAFRONTTE *et al.* (1997) obtiveram as seqüências da região ITS2 e parte dos genes 5,8S e 28S de populações do Vale do Ribeira (Juquiá, Shangrilá e Sete Barras) e região Litorânea (Peruíbe e Cananéia) do estado de São Paulo e verificaram um polimorfismo de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para a enzima *NruI*.

Estudos citogenéticos em populações de São Paulo e Santa Catarina revelaram dois padrões de bandeamento de cromossomos politênicos, designados A e

B, que na ausência de heterozigotos indicam a presença de duas entidades (RAMIREZ & DESSEN, 2000a). Posteriormente identificou-se um terceiro padrão de bandeamento, forma C, em duas populações do estado de São Paulo, sugerindo três espécies crípticas denominadas provisoriamente A, B e C (RAMIREZ & DESSEN, 2000b).

Análises dos perfis isoenzimáticos em amostras de populações dos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Bahia mostraram que a população do Nordeste difere significativamente das demais e que possivelmente constitui uma espécie distinta ou população isolada (CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2004).

Estudos moleculares através das técnicas de PCR-RAPD e PCR-RFLP para o marcador ITS2 foram realizados por CALADO (2005) em populações dos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. Os resultados de PCR-RAPD mostraram um grande número de bandas polimórficas dentro e entre as populações e não foram detectadas bandas específicas relacionadas ao local de coleta. Os dados de distância genética e identidades genéticas sugerem uma única espécie. O tratamento com enzimas de restrição na região ITS2 e parte dos genes 5.8S e 28S não evidenciou variação intraespecífica e os resultados entre as populações foram bastante semelhantes.

Apesar dos estudos já conduzidos, o complexo *A. cruzii* permanece a ser esclarecido e para tanto, a integração de diferentes abordagens e metodologias são essenciais.

1.4 Estrutura e evolução do DNA ribossômico

A utilização de caracteres morfológicos geralmente apresentam pouca resolução para a distinção de espécies crípticas, desta forma, métodos baseados em dados moleculares adquiriram grande importância na resolução de problemas taxonômicos. Técnicas que envolvem a utilização de DNA mostraram-se eficientes uma vez que os indivíduos de ambos os sexos e em todos os estágios de desenvolvimento podem ser identificados, os exemplares podem estar preservados em isopropanol, frescos ou congelados (MARRELLI, 2000). Uma das abordagens

comumente utilizada é o seqüenciamento de regiões codificadoras do RNA ribossomal (rRNA), denominada rDNA.

O rDNA de eucariotos é uma família de multigenes composta por unidades de transcrição repetidas em *tandem* separadas por espaçadores. Cada unidade contém os genes que codificam para as subunidades ribossômicas, espaçadores transcritos externo (ETS), interno (ITS) e espaçadores intergênicos (IGS). O espaçador interno transcrito 1 (ITS1) separa as seqüências codificadoras das subunidades 18S e 5,8S e o ITS2 separa a região 5,8S da 28S (FRITZ *et al.*, 1994; NAHUM, 2001). A figura 1 representa a organização geral do rDNA de eucariotos.

As seqüências do rDNA são responsáveis pela síntese dos RNAs ribossômicos, os mais abundantes produtos de transcrição de uma célula (GORAB, 2001). O arranjo destas seqüências em múltiplas cópias no genoma pode refletir a necessidade da síntese destes produtos em grandes quantidades (NAHUM, 2001). O número de cópias, tamanho e localização cromossômica variam entre as espécies. Em *Drosophila melanogaster* por exemplo, os genes do rDNA estão localizados nos cromossomos X e Y, com tamanho aproximado de 8 kb para cada unidade e cerca de 200 cópias por genoma haplóide (SINGER & BERG, 1991).

Dentro de uma família de multigenes, as seqüências geralmente exibem uma extraordinária similaridade entre indivíduos de uma espécie enquanto divergem entre espécies próximas (MUIR *et al.*, 2001; LI, 1997; LIAO, 2000). Isto sugere que a evolução ocorre de forma não independente, ou seja, os membros de uma família multigênica evoluem em conjunto dentro de uma espécie (LI, 1997). Este processo é conhecido como evolução em concerto (DOVER, 1982). Mecanismos que promovam a homogeneização das seqüências entre as unidades de repetição foram propostos, dentre os quais os mais importantes são o *crossing-over* desigual e a conversão gênica (LI, 1997), que envolvem a transferência não recíproca de informação genética (POLANCO *et al.*, 1998).

Como as seqüências de nucleotídeos envolvidas nestes processos são muito semelhantes ou até mesmo iguais, há a tendência de ocorrerem recombinações entre seqüências que se pareiam desalinhadamente dentro e entre cromossomos homólogos ou não (DOVER, 1982). Na conversão gênica, duas seqüências similares interagem por recombinação onde não há pareamento

absoluto entre todos os nucleotídeos e o resultado é a conversão de uma seqüência pela outra (LI, 1997; LIAO, 1999).

O *crossing-over* desigual é uma recombinação que pode criar deleção em uma cromátide e duplicação da seqüência correspondente na outra cromátide (DOVER, 1982). Este processo promove a expansão e contração dos membros da família multigênica e que ao longo do tempo levam à homogeneização destas seqüências nos cromossomos (LEWIN, 2000).

Através dos processos de homogeneização, novas variantes podem se espalhar pelas unidades de repetição e se tornarem fixas em uma população ou espécie (DOVER, 1982). A taxa de evolução depende da taxa de mutações que são incorporadas e da taxa de fixação das mesmas (COEN *et al.*, 1982; TAUTZ *et al.*, 1987). A homogeneização é rápida e indiscriminada. Se uma cópia de seqüências repetidas adquire uma nova mutação, há baixa probabilidade de ser fixada pelo processo de homogeneização, se ocorrer individualmente, mas aumenta proporcionalmente em relação ao número de cópias que obtiveram as novas mutações. Deste modo, toda a unidade de repetição evolui como um único gene, isto é, diverge entre espécies da mesma forma que outros genes (DIETHARD TAUTZ, comunicação pessoal). A consequência é que há grande similaridade nas famílias de multigenes em uma dada população ou espécie e divergência entre as espécies.

Determinadas regiões do rDNA estão sujeitas a pressões seletivas distintas, o que implica em diferentes graus de conservação e portanto podem ser utilizadas para fins taxonômicos específicos (MUIR *et al.*, 2001).

1.4.1 Características do espaçador ITS2

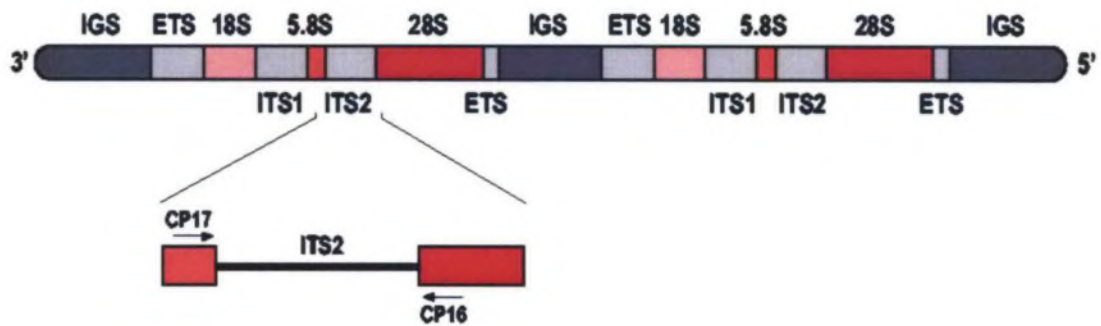
O seqüenciamento da região ITS2 do rDNA tem sido bastante empregado em estudos taxonômicos de anofelinos, contribuindo para a identificação de espécies crípticas (FRITZ *et al.*, 1994; HACKETT *et al.*, 2000; KEGNE *et al.*, 2003; MALAFRONTTE *et al.*, 1999; MARRELLI *et al.*, 1999b; WILKERSON *et al.*, 2004).

A ampla utilização de ITS2 pode ser atribuída ao fato de possuir regiões flangeadoras bem conservadas, possibilitando a amplificação com *primers* universais (SCHLÖTTERER *et al.*, 1994), o tamanho e o elevado número de cópias, que facilitam

a amplificação e o seqüenciamento (WALTON *et al.*, 1999) e o grande número de seqüências já depositadas no GenBank, que permitem inúmeras comparações.

Em análises taxonômicas, é desejável que um marcador molecular não apresente excesso de variação, pois o elevado número de polimorfismos intraespecíficos dificulta as comparações com outras espécies. Por outro lado, trechos altamente conservados podem ser pouco informativos (MEYER, 1997). Portanto, é fundamental que se conheça o modo de evolução da molécula e como ela pode divergir. Estudos em *Saccharomyces cerevisiae* indicaram que a região ITS2 está ativamente envolvida no processamento do RNA 26S (VAN DER SANDE *et al.*, 1992), o que sugere alguma pressão seletiva que mantenha certas regiões conservadas. Neste sentido, SCHLÖTTERER *et al.* (1994) estimaram que aproximadamente 40% das seqüências dos espaçadores ITS de *Drosophila* não estão livres para divergir e que mais da metade evolui próximo à taxa de evolução neutra de seqüências em *Drosophila*.

Desta forma, através da evolução em concerto do rDNA novas mutações podem se espalhar e tornarem-se fixas rapidamente (TAUTZ *et al.*, 1987), permitindo a distinção entre espécies muito próximas (WALTON *et al.*, 1999). Contudo, a completa homogeneização depende do balanço entre a taxa de mutações e a taxa com que ocorrem os mecanismos de homogeneização. Se a taxa de homogeneização for inferior, espera-se encontrar variação intraespecífica ou intragenômica, o que dificulta as análises taxonômicas (SCHLÖTTERER *et al.*, 1994).



IGS: Espaçoador intergênico, separa as unidades de repetição.

ETS: Espaçoador transcrito externo.

18S: Gene que codifica para a subunidade 18S do rRNA.

5.8S: Gene que codifica para a subunidade 5,8S do rRNA.

28S: Gene que codifica para a subunidade 28S do rRNA.

ITS1: Espaçoador transcrito interno 1, separa os genes 18S e 5,8S

ITS2: Espaçoador transcrito interno 2, separa os genes 5,8 e 28S.

CP16 e CP17: Oligonucleotídeos iniciadores (ver materiais e métodos).

Figura 1. Organização do rDNA de eucariotos (modificado de SINGER & BERG, 1991).

2 OBJETIVOS

Em consequência da importância epidemiológica e da possibilidade de compreender um complexo de espécies crípticas, este trabalho tem como objetivo analisar a variabilidade da região ITS2 em amostras da população de *A. cruzii* em área de preservação florestal na Planície Litorânea do Estado do Paraná.

2.1 Objetivos específicos

- Obter sequências que compreendem a região ITS2 e parte dos genes 5,8S e 28S de *A. cruzii*.
- Avaliar a similaridade das seqüências obtidas quanto à variabilidade intrapopulacional.
- Comparar as seqüências obtidas com as dispostas no GenBank para avaliar as diferenças interespecíficas e interpopulacionais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e coleta

As amostragens foram feitas na Floresta Estadual do Palmito, situada no município de Paranaguá – PR, entre as coordenadas 25°35'S e 48°32'O, com uma área de 500 ha, atualmente administrada pelo Instituto Ambiental do Paraná. O local compreende principalmente Florestas de Restinga, com diferentes graus de interferência e pequenas porções de manguezais. O clima predominante é o Af segundo Köppen, caracterizado como clima superúmido, sem estação seca e ausência de geadas, com temperaturas médias anuais de 18°C e precipitação média do mês mais seco de 60 mm (IAPAR, 1978).

A captura dos anofelinos foi realizada através da técnica pouso homem, manejando o aspirador manual movido a bateria com intuito de reter os mosquitos que se aproximam para sugar o operador. As coletas foram realizadas nos períodos matutino e crepuscular com duração determinada pelo número de exemplares de *A. cruzii* capturados. As amostragens foram feitas em locais aleatórios, em área de Floresta sombreada e úmida e sub-bosque repleto de bromélias. Os mosquitos foram acondicionados em potes cilíndricos e ao final da coleta, colocados dentro de gaiolas enroladas com pano umedecido e transportados ao laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, no Departamento de Zoologia da UFPR.



Figura 2. Área de acesso à Floresta Estadual do Palmito (Foto: Ana Dalla Bona.)

3.2 Identificação morfológica

Os indivíduos coletados foram identificados ao nível de espécie, mediante observação direta dos caracteres morfológicos ao microscópio estereoscópico, com base nas chaves dicotômicas clássicas para Anophelinae (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994; FORATTINI, 2002). Os mosquitos foram separados e enviados para o Núcleo de Fixação de Nitrogênio no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR para a realização dos experimentos descritos a seguir.

3.3 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita de acordo com o protocolo desenvolvido por CHEUNG *et al.* (1993) com algumas modificações. Os insetos frescos foram macerados individualmente em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml contendo 160 µl de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8.0; NaCl 2 M; EDTA 70 mM), adicionados 20 µl de SDS 10% e incubados a 60°C por 1h. Após resfriamento até a temperatura ambiente, foram adicionados 50 µl de fenol clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1). A solução foi centrifugada por 15 min a 13000 rpm, o sobrenadante foi transferido a um novo tubo de 1,5 ml onde se adicionou 80 µl de acetato de amônio 7,5 M e 300 µl de etanol 96%. As amostras foram homogeneizadas por inversão e levadas ao congelador a -20°C durante 2 h para precipitação do DNA. Após centrifugação por 15 min a 13000 rpm, descartou-se o sobrenadante, o precipitado foi lavado com etanol 70% e seco em estufa a 37°C. O DNA foi ressuspensionado em 20 µl de água Milli-Q estéril e armazenado a -20°C. As concentrações e qualidade do DNA foram determinadas em espectrofotômetro Beckman DU7000 em 260 e 280 nm.

3.4 Amplificação do DNA

A região ITS2 do rDNA foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações foram feitas em tubos de 200 µl com volume final de 50 µl. Utilizou-se 100 a 200 ng de DNA genômico, tampão de PCR (1x), MgCl₂ (2 mmol/l), dNTPs (0,2 mmol/l), *Taq* DNA polimerase (2,5 U) e 10 pmol dos *primers* CP16 (5'-GCGGGTACCATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3') e CP17(5'-GCGCCGCGGTGTGAACTGCAGGACACATG-3') (MALAFRONTTE *et al.*, 1997).

As reações foram conduzidas em um termociclador Thermocycler (Eppendorf) com os seguintes ciclos de temperatura: um ciclo de desnaturação a 94°C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 50°C por 2 min, extensão a 72°C por 1 min e um ciclo final a 72°C por 5 min.

Após a análise por eletroforese, os produtos de DNA amplificado foram precipitados em tubo de microcentrífuga de 500 µl, adicionando-se 32 µl de acetato de amônio 7,5 M e 120 µl de etanol 96%. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 15 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado com 500 µl de etanol 70% e centrifugado por 5 min a 13000rpm. O DNA foi seco em estufa a 37°C e ressuspendido em 20 µl de água Milli-Q estéril.

3.5 Eletroforese

Os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% com tampão de corrida TBE 1X concentrado (Tris-base 89 mmol/l, ácido bórico 89 mmol/l e EDTA 2 mmol/l pH 8). Para aplicação das amostras foram utilizados 2 µl de solução FSUDS [azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno cianol 0,25% (p/v), Ficoll 25% (p/v), SDS 0,5% (p/v), Tris-HCl 10 mmol/l pH 8 e EDTA 1 mmol/l pH 8] e 2 µl do DNA amplificado. Após eletroforese a 60 V por 1 h, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/ml, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (312 nm) e registrado fotograficamente através do sistema de vídeo Bio Chemi System (UVP Bio Imaging Systems).

3.6 Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento foi baseado no método de terminação de cadeia por incorporação de dideoxiribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977). Foram utilizados entre 50 e 100 ng do produto de PCR purificado de uma amostra de 22 indivíduos. Utilizou-se 5 pmol de um dos oligonucleotídeos (CP16 ou CP17) e 3 µl da mistura para seqüenciamento "DYEnamic ET sequence premix terminator" (DYEnamic ET DYE Terminator Kit: Thermo Sequenase II DNA polymerase, DYEnamic ET DYE terminators – Amersham Biosciences), com volume final de 13,5 µl. As reações foram realizadas em termociclador Thermocycler (Eppendorf) com os seguintes parâmetros: 94°C por 30 seg., 50°C por 45 seg. e 60°C por 1 min e 30 seg., repetidos 35 vezes.

Após as reações, os produtos foram purificados completando-se o volume para 20 µl com água Milli-Q estéril, adicionados 2 µl de acetato de amônio 7,5 M e 65 µl de etanol 96%. Após centrifugação por 15 min a 13000 rpm, o precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado por 6 min a 13000 rpm e o sobrenadante descartado. As amostras foram secas em estufa a 37°C e submetidas à eletroforese no Sequenciador Automático de DNA ABI377 (Perkin-Elmer).

3.7 Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1997), analisadas e editadas com auxílio dos programas MacVector® 8.1 Trial (Accelrys) e BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). As seqüências consenso foram comparadas com aquelas dispostas no GenBank (AF035227 e AF027165) através do programa BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar dos poucos estudos realizados até o momento, tem sido proposto que *A. cruzii* possa constituir um complexo de espécies crípticas. Uma das primeiras evidências foi a observação de diferenças morfológicas nas larvas de populações dos estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina (ZAVORTINK, 1973). Análises dos padrões de bandeamento de cromossomos politênicos foram realizadas em populações de São Paulo e Santa Catarina e os autores sugerem três espécies crípticas (RAMIREZ & DESSEN, 2000a,b). Através dos perfis isoenzimáticos, CARVALHO-PINTO & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA (2004) observaram uma diferença significativa em uma população da Bahia quando comparada com as de São Paulo, Santa Catarina e Rio de Janeiro. Por outro lado, os estudos feitos por CALADO (2005) com populações do Paraná, Santa Catarina e São Paulo através das técnicas de PCR-RAPD e PCR-RFLP não indicaram a presença de espécies crípticas nestes locais. Análises das seqüências do espaçador ITS2 ainda são escassas para as espécies do subgênero *Kerteszia* e não permitem uma análise mais detalhada. Estas seqüências foram determinadas para *A. cruzii* em populações do estado de São Paulo onde foram encontradas diferenças em 5 nucleotídeos, incluindo um polimorfismo de RFLP para a enzima *Nrul* (MALAFRONTTE *et al.*, 1997). Análises da região ITS2 foram também foram feitas para *A. cruzii*, *A. bellator*, *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp e *Anopheles (Kerteszia) laneanus* Correia & Cerqueira em locais do estado de São Paulo (MALAFRONTTE *et al.*, 2003). Entretanto, estas seqüências não estão depositadas em bancos de dados de seqüência públicos.

Com o objetivo de fornecer mais informações referentes à *A. cruzii* quanto à possível presença de espécies crípticas, uma amostra da população da Floresta Estadual do Palmito (Paranaguá – PR) foi caracterizada através do seqüenciamento da região ITS2. Foram coletados 22 indivíduos no período matutino e crepuscular, os exemplares tiveram seu DNA total extraído e quantificado. A quantidade de DNA obtida variou desde 1 até 6 µg por indivíduo,

suficiente para realizar o seqüenciamento da região ITS2. O DNA genômico de todos os indivíduos foi utilizado para amplificação de ITS2 através de PCR (Fig. 3) seguido do seqüenciamento do produto obtido, utilizando-se os mesmos *primers* da reação de PCR. Ambas as fitas de DNA foram lidas e para cada indivíduo foram realizadas de 4 a 8 reações para produzir seqüências de alta confiabilidade. As seqüências obtidas de cada indivíduo foram alinhadas utilizando-se o programa MacVector e Bioedit (ver material e métodos) para gerar uma seqüência consenso individual. Estas seqüências foram alinhadas e permitiram a identificação de dois genótipos diferentes, designados Paranaguá 1 e 2 (Fig. 4). Em sete indivíduos da amostra, não foi possível obter seqüências de alta qualidade em toda sua extensão, entretando, foi suficientemente boa para permitir a distinção entre os genótipos.

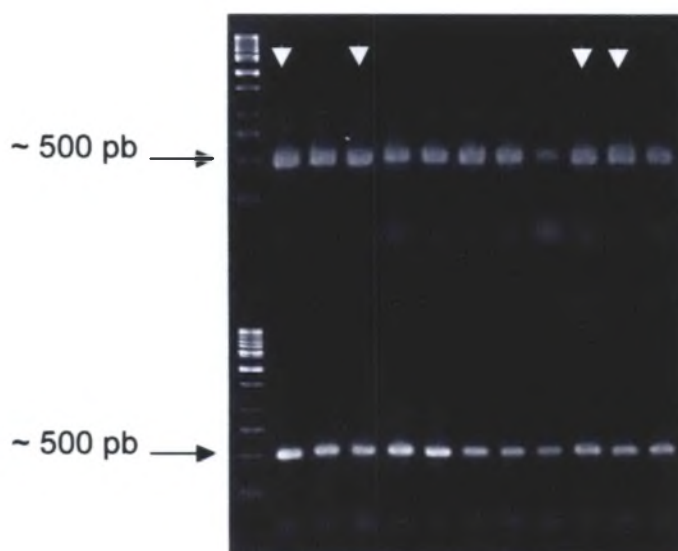


Figura 3. Região ITS2 e parte dos genes 5,8S e 28S amplificada por PCR para os 22 indivíduos coletados. O marcador de peso molecular utilizado foi o GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas). Os indivíduos indicados possuem o genótipo 2.

O genótipo 1 foi identificado em 18 indivíduos enquanto o genótipo 2 foi detectado em quatro indivíduos. Não foi observada variação dentro dos respectivos grupos, ou seja, os 18 indivíduos identificados pelo genótipo 1 apresentaram seqüências idênticas entre si, assim como os 4 indivíduos identificados pelo

genótipo 2. Estes resultados indicam que houve completa homogeneização das seqüências através do mecanismo de evolução em concerto. A taxa de homogeneização dos espaçadores ITS não é constante entre as espécies e por isso a variação intraespecífica ou intrapopulacional deve ser sempre analisada (SCHLÖTTERER *et al.* 1994). Variações intraespecíficas e intraindividuais na seqüência da região ITS2 não tem sido de fato observadas com freqüência para espécies do gênero *Anopheles* (BEEBE *et al.*, 1999; PROFT *et al.*, 1999; MARRELLI *et al.*, 2005; HACKETT *et al.*, 2000).

O alinhamento dos dois genótipos obtidos nese trabalho com as duas seqüências de ITS2 de *A. cruzii* depositadas no banco de dados GenBank (AF027165 e AF035227) mostra que Paranaguá 1 difere das populações de São Paulo apenas nas posições 107, 109-111, 197-200 e 216-217. A posição 107 é uma transversão C→G enquanto nas outras posições há inserções ou deleções (indels). Diferentemente de Paranaguá 1, o genótipo 2 exibe diferenças em um grande número de posições, que incluem transições, transversões e indels (Fig. 4)

Com o objetivo de avaliar o grau de divergência entre os dois genótipos observados nesta população e as seqüências de ITS2 de *A. cruzii* depositadas no GenBank, todos os polimorfismos observados foram contados e sua freqüência foi determinada em porcentagem em relação ao número total de bases seqüenciadas (435 pb). Paranaguá 1 possui 436 pb, diferindo 1,84% da população de Juquiázinho (AF035227) e 1,61% daquela de Peruíbe (AF027165). A seqüência Paranaguá 2 contém 423 pb e difere 8,5% do genótipo 1, 10,3% em relação à Juquiázinho e 10,1% da população de Peruíbe.

A delimitação exata entre o espaçador ITS2 e os genes 5,8S e 28S descrita na literatura varia entre as espécies de anofelinos. Neste trabalho, a região ITS2 está indicada na figura 4 com base nos resultados de FRITZ *et al.* (1994).

```

Par1  1 ATGAACACCGATACGTTGAACGCATATTGCGCATCGCACGACACAGTGCG 50
Par2  1 ATGAACACCGATACGTTGAACGCATATTGCGCATCGCACGACACAGTGCG 50
Per   1 ATGAACACCGATACGTTGAACGCATATTGCGCATCGCACGACACAGTGCG 50
Juq   1 ATGAACACCGATACGTTGAACGCATATTGCGCATCGCACGACACAGTGCG 50
      *****

```

↓

```

Par1 51 ATGTACACATTTTTGAGTGCCCATCCTCACCGCATAGCCAACCTATCGGGC 100
Par2 51 ATGTACACATTTTTGAGTGCCCATCCTCACCGCATAGCCAACCTATCGGGC 100
Per 51 ATGTACACATTTTTGAGTGCCCATCCTCACCGCATAGCCAACCTATCGGGC 100
Juj 51 ATGTACACATTTTTGAGTGCCCATCCTCACCGCATAGCCAACCTATCGGGC 100
*****

Par1 101 CCGCAAGGGCTCCGATGCATAGTGATGCGTTGCCCGGCCTCGCGGCTGGT 150
Par2 101 CCGCAAGGGCTCCGATGCATATTGATGTGTTGCCCGGCCTCGCGGCTGGT 150
Per 101 CCGCAACG---CCGATGCATAGTGATGCGTTGCCCGGCCTCGCGGCTGGT 147
Juj 101 CCGCAACG---CCGATGCATAGTGATGCGTTGCCCGGCCTCGCGGCTGGT 147
***** * *****

Par1 151 CAATCATTGAAACTGTGTGCGTAGGAGGGGCGGACCGGAGCGTGCGCGCG 200
Par2 151 CAATCATTGAAACTGTGTGCGTAGGAGGGGCGGACCGGAGCGTACGCGCG 200
Per 148 CAATCATTGAAACTGTGTGCGTAGGAGGGGCGGACCGGAGCGTGCGCGC- 196
Juj 148 CAATCATTGAAACTGTGTGCGTAGGAGGGGCGGACCGGAGCGTGCG---- 193
***** **

Par1 201 AGGTCCGCTTTCGCGAGTGTCTTCCGTCACGGCTGAGCCACCTTACGACT 250
Par2 201 AGGTCCGCTTTCGCGAGTGTCTTCCGTCACGGCCGAGCCACCTTACGACT 250
Per 197 AGGTCCGCTTTCGCG--TGTCTTCCGTCACGGCTGAGCCACCTTACGACT 244
Juj 194 AGGTCCGCTTTCGCGAGTGTCTTCCGTCACGGCTGAGCCACCTTACGACT 243
*****

Par1 251 CTCACCAGGAACCCCGTGGTGCAGATCTTTATCGAACGACCCAACGCGT 300
Par2 251 CTCACCAGAGA-----AGGTAAAT-----TCGAACGACCCACGCGT 287
Per 245 CTCACCAGGAACCCCGTGGTGCAGATCTTTATCGAACGACCCAACGCGT 294
Juj 244 CTCACCAGGAACCCCGTGGTGCAGATCTTTATCGAACGACCCAACGCGT 293
***** * * * *

Par1 301 TCGGTGGCTTGAGCGCAGTGACGACGGAGCGGGAAGACACCAGAGTATCG 350
Par2 288 TCGGTGGCTTGTGCGCTGCGACGATAGAGCGGGAAGACACCAGAGTATCG 337
Per 295 TCGGTGGCTTGAGCGCAGTGACGACGGAGCGGGAAGACACCAGAGTATCG 344
Juj 294 TCGGTGGCTTGAGCGCAGTGACGACGGAGCGGGAAGACACCAGAGTATCG 343
***** * * * *

Par1 351 CTTGAGAGCGGGATGCCTCGCGTGCACGTGACGGCGC-GGTCCCACACA 399
Par2 338 TTTGAGAGCGCGA-ACCTGGCGTGCACGGCGACGGTGCAGGTCCCACACA 386
Per 345 CTTGAGAGCGGGATGCCTCGCGTGCACGTGACGGCGC-GGTCCCACACA 393
Juj 344 CTTGAGAGCGGGATGCCTCGCGTGCACGTGACGGCGC-GGTCCCACACA 392
***** ** * * * *

↓
Par1 400 CATCCTATAGTGGGCCTCAAATAATGTGTGACTACCC 436
Par2 387 CATCCTTAGTGGGCCTCAAATAATGTGTGACTACCC 423
Per 394 CATCCTATAGTGGGCCTCAAATAATGTGTGACTACCC 430
Juj 393 CATCCTATAGTGGGCCTCAAATAATGTGTGACTACCC 429
*****

```

Figura 4. Alinhamento das seqüências da região ITS2 de *Anopheles cruzii* obtidas para a Floresta Estadual do Palmito – Paranaguá e aquelas depositadas no

GenBank (AF027165 - Peruíbe e AF035227 – Juquiázinho). As setas indicam a delimitação do espaçador de acordo com FRITZ *et al.* (1994).

Não há consenso acerca do grau de divergência entre as seqüências de ITS2 que possa servir como critério para distinção de espécies crípticas de anofelinos. O complexo *Anopheles minimus* é composto por pelo menos duas espécies crípticas denominadas A e C (SHARPE *et al.*, 2000). Estas duas espécies foram coletadas em populações da China e Tailândia e puderam ser identificadas pela diferença de 5,8% nas seqüências de ITS2 (ZHOU *et al.*, 2002). Dentro do complexo *A. gambiae*, cinco espécies foram distinguidas por diferenças de 0,4 a 1,6% (PASKEWITZ *et al.*, 1993). As espécies crípticas *Anopheles (Anopheles) freeborni* Aitken e *Anopheles (Anopheles) hermsi* Barr & Guptaranij não são distinguíveis morfologicamente, por bandeamento de cromossomos politênicos e polimorfismos de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial, e apresentaram diferenças em 11 posições (3,6%) neste espaçador (PORTER & COLLINS. 1991). Em seis espécies do complexo *Anopheles maculipennis*, as diferenças encontradas variaram de 7,3% a 24% (PROFT *et al.*, 1999).

MARRELLI *et al.* (1999b) analisaram as seqüências de ITS2 de *A. oswaldoi* nos estados do Espírito Santo, Acre, Rondônia, Amazonas, Amapá e de Ocamo (Venezuela) e Yurimaguas (Peru). O maior grau de divergência observado foi para a população do Peru, que difere entre 12,1 e 13% das populações Brasileiras e Venezuelana. Os autores propõem quatro grupos, que podem corresponder a quatro espécies crípticas. Um grupo é formado pelas amostras do Acre, Amazonas e Rondônia, que apresentaram similaridades superiores a 99%. O segundo grupo é composto por espécimes do Amapá e Venezuela, com 100% de similaridade, e os mosquitos do Espírito Santo e do Peru formando grupos separados.

Resultados semelhantes aos anteriormente descritos foram encontrados por FRITZ *et al.* (1994) em *A. nuneztovari*, analisando nove populações da América do Sul. Apesar da diferença de apenas 13 nucleotídeos, foi possível reunir as populações analisadas em três grupos. 1) Colômbia, Venezuela e Bolívia, sendo que as seqüências da Colômbia e Venezuela são idênticas e diferem em apenas dois nucleotídeos daquela da Bolívia. 2) Suriname e Brasil (Boa Vista), com seqüências

idênticas e 3) duas populações do Brasil (Utinga e Velha Timboteua, no Pará), também com seqüências idênticas. Além destes três grupos, estes autores verificaram que na população de Puraquequara (Amazonas) dois indivíduos apresentaram seqüências iguais às do grupo 2 e um indivíduo possuía seqüência que difere em apenas dois nucleotídeos do grupo 3. Estes dois tipos de seqüências no mesmo local sugere imigração de indivíduos provenientes destes dois grupos. Os resultados de MARRELLI *et al.* (1999b) e FRITZ *et al.* (1994) mostram que as populações mesmo habitando zonas ecológicas diferentes e regiões muito distantes, podem exibir seqüências idênticas, o que provavelmente as define como espécies únicas. Se para populações geograficamente distantes é possível obter estes resultados, pressupondo a existência de uma única espécie, seria razoável esperar pouca ou nenhuma variação dentro da população de Paranaguá. Contudo as variações observadas são relativamente significantes e podem sugerir a existência de espécies crípticas neste local. Neste caso, seria necessário que em estudos posteriores sejam estabelecidos parâmetros sobre o grau de variação intraespecífica que *A. cruzii* pode apresentar.

As diferenças observadas na população da Floresta Estadual do Palmito em relação às populações do estado de São Paulo permitem considerações sobre a existência de espécies crípticas. Tais diferenças podem representar apenas variações intraespecíficas ou a presença de duas entidades na população de Paranaguá, que podem ter divergido simpatricamente ou mesmo o resultado de imigração, conforme observaram FRITZ *et al.*, (1994). O fato é que o genótipo Paranaguá 2 apresenta um grau de divergência marcante, sugerindo uma possível espécie críptica. As diferenças entre Paranaguá 1, Juquiazinho e Peruíbe estão confinadas a 8 e 7 nucleotídeos respectivamente, e não são suficientes para apontá-las como espécies crípticas, com base somente nestes dados. Contudo, esta hipótese não deve ser desconsiderada já que o mesmo número de polimorfismos foi suficiente para distinguir cinco espécies do complexo *A. gambiae* (PASKEWITZ *et al.*, 1993).

Neste trabalho foram seqüenciados 22 indivíduos, dos quais 13 foram confirmados como fêmeas. Os indivíduos restantes provavelmente são fêmeas porém não tiveram o sexo confirmado. Em algumas espécies de *Anopheles* o rDNA

ocorre em um locus único, no cromossomo X (COLLINS *et al.* 1987). Considerando que em *A. cruzii* o espaçador ITS2 seja herdado desta forma, em nenhuma das 13 seqüências obtidas a partir de fêmeas foram obtidas evidências da ocorrência de cruzamento entre indivíduos com genótipos diferentes, ou seja, nenhuma fêmea heterozigota foi observada. Considerando a freqüência dos dois genótipos (Paranaguá 1, 0,82 e Paranaguá 2, 0, 18) e assumindo que a população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o número esperado de fêmeas heterozigotas é de aproximadamente 4, na amostra analisada. Isto sugere que os dois genótipos observados são provenientes de indivíduos reprodutivamente isolados e reforça a hipótese de existência de espécies crípticas de *A. cruzii* nesta população.

A. homunculus, *A. bellator* e *A. laneanus* pertencem ao subgênero *Kerteszia* (HARBACH, 2004) e são espécies bastante próximas de *A. cruzii*. O seqüenciamento do marcador ITS2 destas espécies em diferentes populações poderia gerar informações relevantes quanto ao grau de diferença entre espécies próximas do subgênero *Kerteszia*, auxiliando na interpretação das variações entre as populações de *A. cruzii*. Aparentemente, o único estudo deste tipo foi feito por MALAFRONTI *et al.* (2003). Indivíduos coletados no estado de São Paulo tiveram suas seqüências determinadas. A diferença observada entre *A. cruzii* e *A. bellator* foi de 1,5% e entre *A. cruzii* e *A. homunculus* foi de 9,5%.

Com o objetivo de avaliar o grau de divergência entre as quatro seqüências de ITS2 de *Anopheles cruzii* e de outras espécies de *Anopheles* foi realizada uma análise utilizando o programa ClustalW, que produziu o dendrograma mostrado na figura 5. Para construir este dendrograma foram utilizadas as seqüências de ITS2 disponíveis de *A. cruzii* e de três outras espécies de *Anopheles*, estas do subgênero *Nyssorhynchus*. Conforme esperado, as espécies do subgênero *Nyssorhynchus* agruparam separadamente de *A. cruzii*, uma vez que pertencem a subgêneros diferentes. Nota-se também que o genótipo Paranaguá 2 é o mais divergente do grupo de *A. cruzii*. Entretanto, esta diferença não é suficiente para indicar a existência de espécie críptica pois não existem seqüências disponíveis de outras espécies do subgênero *Kerteszia*. Análises mais abrangentes da população da Floresta do Palmito e de outras populações serão necessárias para definir o grau de variação intraespecífica na região ITS2 de *A. cruzii*.

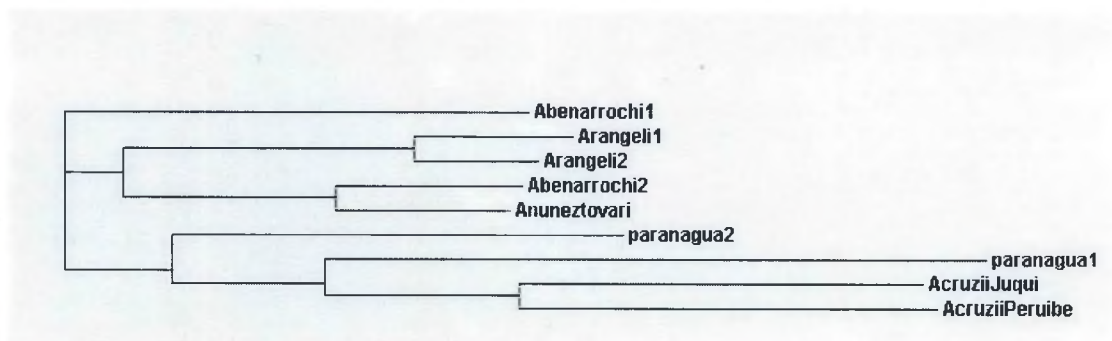


Figura 5. Dendrograma produzido a partir das seqüências de ITS2 de três espécies de *Nyssorynchus* disponíveis no GenBank e as seqüências disponíveis para *Kerteszia*. *A. benarrochi* 1 (AF462383), *A. benarrochi* 2 (AF462384), *A. rangeli* 1 (AF462381), *A. rangeli* 2 (AF462382), *A. nuneztovari* (AF461749).

Com a intenção de fornecer um método de identificação mais rápido e menos oneroso dos diferentes genótipos encontrados na população da Floresta Estadual do Palmito, o perfil de restrição teórico da região ITS2 foi analisado. Para isso as seqüências disponíveis foram analisadas quanto à presença de sítios de restrição que produzissem diferentes perfis, capazes de diferenciar os diferentes genótipos existentes tanto na Floresta do Palmito quanto nas populações de São Paulo. Os indivíduos coletados na Floresta Estadual do Palmito podem ser distinguidos dos de São Paulo pela presença de um sítio de restrição para a enzima *Hpy188I* na posição 112 (Fig. 4), o qual está ausente nas seqüências de Juquiá e Peruíbe. Conforme previsto por MALAFRONTI *et al.* (1997), a população de Peruíbe é diferenciada de Juquiá pela ausência do sítio para a enzima *NruI*. Os genótipos de Paranaguá podem ser distinguidos entre si pela presença de dois sítios para a enzima *TaqI* e um sítio para a enzima *HincII* em Paranaguá 1, enquanto Paranaguá 2 possui apenas um sítio para *TaqI* e nenhum para *HincII*. Análises de restrição com estas duas enzimas foram feitas por CALADO (2005) em indivíduos coletados em Paranaguá (Ilha do Mel e Floresta Estadual do Palmito) e não foram observadas diferenças no perfil de restrição. Os indivíduos analisados por CALADO (2005) apresentaram um perfil de restrição para as enzimas utilizadas, compatível

com o genótipo Paranaguá 1, o mais abundante na amostra realizada no presente trabalho.

O seqüenciamento da região ITS2 de indivíduos da espécie *A. cruzii* da Floresta Estadual do Palmito fornece resultados preliminares que indicam a provável existência de espécies crípticas. Entretanto, a elucidação do significado biológico das diferenças observadas deve ser acompanhada de estudos multidisciplinares, que envolvem análises morfológicas, moleculares, ecológicas, comportamentais, etc. Desta forma, a utilização de um marcador molecular deve servir como método adicional numa abordagem muito abrangente, que visa compreender a estrutura das populações e determinar o *status* taxonômico de *Anopheles cruzii*.

5 CONCLUSÕES

1. O sequenciamento da região ITS2 de *A. cruzii* a partir de uma amostra de 22 indivíduos da população da Floresta Estadual do Palmito produziu dois tipos de seqüência, Paranaguá 1 e Paranaguá 2.
2. Dezoito indivíduos apresentaram o genótipo 1 e quatro apresentaram o genótipo 2, não sendo observada variação dentro dos dois grupos.
3. O genótipo 1 apresenta 436 pb e diferenças de 1,84% e 1,61% quando comparado com as seqüências de Juquiá e Peruíbe respectivamente. O genótipo 2 possui 423 pb e difere em 10,3% da população de Juquiá, 10,1% em relação à Peruíbe e 8,5% do genótipo 1.
4. Análises com enzimas de restrição revelaram que as populações de Paranaguá e do estado de São Paulo podem ser diferenciadas através da restrição com a enzima *Hpy188I* e os genótipos Paranaguá 1 e 2 podem ser diferenciados pela restrição com as enzimas *TaqI* ou *HincII*.
5. As diferenças observadas, por si só, não são suficientes para afirmar que os genótipos 1 e 2 pertencem à espécies crípticas, mas são evidências que estimulam uma investigação mais aprofundada utilizando-se diferentes abordagens e metodologias.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". **Nucleic Acids Research**, **25**: 3389-3402.
- ARAGÃO, M. B. 1964. Distribuição geográfica e abundância das espécies de *Anopheles (Kerteszia)* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, **16**: 73-109.
- BEEBE, N. W.; ELLIS, J. T.; COOPER, R. D. & SAUL, A. 1999. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. **Insect Molecular Biology**, **8**: 381-390.
- BEIER, J. C. & VANDERBERG, J. P. 1998. Sporogonic development in the mosquito. In: SHERMAN, I.W. **Malaria: Parasite biology, Pathogenesis and Protection**. American Society for Microbiology, Washington, DC. p. 49-61
- BioEdit Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/2000/XP**. Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- CALADO, D. C. 2005. **Polimorfismos em *Anopheles cruzii* Dyar & Knab, 1908 Detectados através de marcadores moleculares (RAPD e RFLP) e comparação com *Anopheles bellator* Dyar & Knab, 1906 e *Anopheles homunculus* Komp, 1937 (Diptera, Culicidae, Anophelinae)**. Tese de Doutorado, Área de Concentração em Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 138p.

- CARVALHO-PINTO, C. J. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 2004. Isoenzimatic analysis of four *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) populations of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99**: 471-475.
- CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N. & LANDRY, B. S. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications**, **3**: 69-70.
- COEN, E.; STRACHAN, T. & DOVER, G. 1982. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. **Jornal of Molecular Biology** **158**: 17-35.
- COLLINS, F. H.; MENDEZ, M. A.; RASMUSSEN, M. O.; MAHAFFEY, P. C.; BESANSKY, N. J & FINNERTY, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates members species of the *Anopheles gambiae* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **37**: 37-41.
- COLLINS, F. H.; KAMAU, L.; RANSON, H. A. & VULULE, J. M. 2000. Molecular entomology and prospects for malaria control. **Bulletin of the World Health Organization**, **78**: 1412-1423.
- CONSOLI, R. A. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 1994. Classificação e principais espécies de importância sanitária. In: _____. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 17-92.
- DEANE, L. M.; FERREIRA NETO, J. A. & LIMA, M. M. 1984. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a forest in southern Brazil suggests that human cases of malaria simian origin might be expected. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **79**: 461-463.
- DEANE, L. M. 1986. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **81**: 5-14.

- DOVER, G. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature**, 299: 111-117.
- FERREIRA, E. 1964. Distribuição geográfica dos anofelinos no Brasil e sua relação com o estado atual da erradicação da malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, 16: 329-348.
- FERREIRA, S. R. & LUZ, E. 2003. Malária no Estado do Paraná – Aspectos históricos e prognose. **Acta Biológica Paranaense**, 32: 129-156.
- FORATTINI, O. P. 1962. **Entomologia médica**. Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo. 1º v. 662p.
- FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I.; MASSAD, E. & MARUCCI, D. 1996. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment 11- Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles (Kerteszia)* in South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, 30: 107-114.
- FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I.; SANTOS, R. La C.; UENO, H. M. & KOBAYASHI, K. M. 1999. Role of *Anopheles (Kerteszia) bellator* as malaria vector in Southeastern Brazil (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94: 715-718.
- FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I.; SANTOS, R. La C.; KOBAYASHI, K. M.; UENO, H. M. & FERNÁNDEZ, Z. 2000. Potencial sinantrópico de mosquitos *Kerteszia* e *Culex* (Diptera: Culicidae) no Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 34: 565-569.
- FORATTINI, O. P. 2002. **Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia**. vol. 2. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 860p.

- FRITZ, G. N.; CONN, J.; COCKBURN, A. & SEAWRIGHT, J. 1994. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Molecular Biology and Evolution**, **11**: 406-416.
- FUTUYMA, D. J. 2002. **Biologia Evolutiva**. 2 ed. Funpec, Ribeirão Preto, SP. 631p.
- GIBSON, G. & DWORKIN, I. 2004. Uncovering cryptic genetic variation. **Nature Reviews Genetics**, **5**: 681-690.
- GORAB, E. 2001. Evolução dos genes nucleares de RNA ribossômico. In: MATIOLI, R.S. **Biologia Molecular e Evolução**. Holos, Ribeirão Preto, SP. p. 64-69.
- HACKETT, B. J.; GIMNIG, J.; GUELBEOGO, W.; COSTANTINI, C.; KOEKEMOER, L. L.; COETZEE, M.; COLLINS, F. H. & BESANSKY, N. J. 2000. Ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover cryptic taxon. **Insect Molecular Biology**, **9**: 369-374.
- HARBACH, R.E. 2004. The classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. **Bulletin of Entomological Research**, **94**: 537-553.
- IAPAR. 1978. **Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná**. Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, 38p.
- KEGNE, P.; AWONO-AMBENE, P.; ANTONIO-NKONDJIO, C.; SIMARD, F. & FONTENILLE, D. 2003. Molecular identification of the *Anopheles nili* group of African malaria vectors. **Medical and Veterinary Entomology**, **17**: 67-74.
- LEWIN, B. 2000. **Genes VII**. Oxford University Press, New York, NY, 990p.
- LI, W. H. 1997. **Molecular Evolution**. Sinauer, USA. 487p.

- LIAO, D. 1999. Molecular evolution. Concerted evolution: Molecular mechanism and biological implications. **American Journal of Human Genetics**, **64**: 24-30
- LIAO, D. 2000. Gene conversion drives within genic sequences: Concerted evolution of ribosomal RNA genes in Bacteria and Archaea. **Journal of Molecular Evolution**, **51**: 305-317.
- Macvector 8.1 Trial**. 2001-2005. Accelrys Software Inc.
- MALAFRONTTE, R. S.; MARRELLI, M. T.; CARRERI-BRUNO, G. C.; URBINATTI, P.R. & MARINOTTI, O. 1997 Polymorphism in the second internal spacer (ITS2) of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera: Culicidae) from State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **92**: 306.
- MALAFRONTTE, R. S.; MARRELLI, M. T. & MARINOTTI, O. 1999. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, **36**: 631-634.
- MALAFRONTTE, R. S.; MARINOTTI, O.; MARRELLI, M. T.; TUBAKI, R.; CURADO, I. & NASSAR, M. N. 2003. Phylogeny and polymorphism of the *Kerteszia* subgenus assessed by second internal transcribed spacer (ITS2) of rDNA. **Revista de Medicina Tropical**, **45**: 208-209.
- MANGUIN, S.; WILKERSON, R. C.; CONN, J. E.; RUBIO-PALIS, Y.; DONOFF-BURG, J. A. & ROBERTS, D.R. 1999. 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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **60**: 364-376.
- MARRELLI, M. T.; HONORIO, N. A.; FLORES-MENDOZA, C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; MARINOTTI, O. & KLOETZEL, J. K. 1999a. Comparative susceptibility of two members of the *Anopheles oswaldoi* complex, *An. oswaldoi*

- and *An. konderi*, to infection by *Plasmodium vivax*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **93**: 381-384.
- MARRELLI, M. T.; MALAFRONTTE, R. S.; FLORES-MENDOZA, C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; KLOETZEL, J. K. & MARINOTTI, O. 1999b. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, **36**: 679-684.
- MARRELLI, M. T. 2000. *Anopheles oswaldoi* (Diptera: Culicidae): **Análise do segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNA ribossômico e da susceptibilidade à infecção por *Plasmodium vivax***. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 60p.
- MARRELLI, M. T.; FLOETER-WINTER, L. M.; MALAFRONTTE, R. S.; TADEI, W. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FLORES-MENDOZA, C. & MARINOTTI, O. 2005. Amazonian malaria vector anophelinae relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. **Medical and Veterinary Entomology**, **19**: 208-218.
- MEYER, D. 1997. Análise filogenética de seqüências de DNA. In: AMORIM, D. S. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. 2 ed, Holos, Ribeirão Preto, SP. p. 184-212.
- MUIR, G.; FLEMING, C. C. & SCHLÖTTERER, C. 2001. Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. **Molecular Biology and Evolution**, **18**: 112-119.
- NAHUM, L. A. 2001. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Holos, Ribeirão Preto, SP. p. 82-96.
- PASKEWITZ, S. M.; WESSON, D. M. & COLLINS, F. H. 1993. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. **Insect Molecular Biology**, **2**: 247-257.

- POLANCO, C.; GONZÁLEZ, A. I.; FUENTE, A. de la. & DOVER, G. A. 1998. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions: A possible mechanism to resolve this paradox. **Genetics**, **149**: 243-256.
- PORTER, C. H. & COLLINS, F. H. 1991. Species diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **45**(2): 271-279.
- PROFT, J.; MAIER, W. A. & KAMPEN, H. 1999. Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. **Parasitology Research**, **85**: 837-843.
- RACHOU, R. G.; LÔBO, A. G. S. & LUZ, E. 1954. Atualização da distribuição geográfica dos anofelinos do Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, **6**: 525-532.
- RAMIREZ, C. C. & DESSEN, E. M. 2000a. Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles cruzii*. **Genome**, **43**: 143-151.
- RAMIREZ, C. C. & DESSEN, E. M. 2000b. Chromosome differentiated populations of *Anopheles cruzii*; evidence for a third sibling species. **Genetica**, **108**: 73-80.
- REY, L. 1991. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, p. 315-327.
- ROSA-FREITAS, M. G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; CARVALHO-PINTO, C. J.; FLORES-MENDOZA, C. & SILVA-DO-NASCIMENTO, T. F. 1998. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **93**: 651-655.

- SALLUM, M .A. M.; SCHULTZ, T. R. & WILKERSON, R. C. 2000. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on morphological characters **Annals of Entomological Society of America**, **93**: 745-775.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **74**: 5463-5467.
- SCHLÖTTERER, C.; HAUSER, M. T.; VON HAESLER, A. & TAUTZ, D. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, **11**: 513-522.
- SHARPE, R. G.; HARBACH, R. E. & BUTLIN, R. K. 2000. Molecular variation and phylogeny of members of the Minimus group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). **Systematic Entomology**, **25**: 263-272.
- SHERMAN, I. W. 1998. A brief history of malaria and discovery of the parasite's life cycle. In: _____. **Malaria: Parasite biology, Pathogenesis and Protection**. American Society for Microbiology, Washington, DC. p. 3-10
- SINGER, M. & BERG, P. 1991. **Genes & Genomes**. University Science Books, California, USA. 929p.
- SUH, K. N.; KAIN, K. C. & KEYSTONE, J. S. 2004. Malaria. **Canadian Medical Association Journal**, **170**: 1693-1702.
- TADEI, W. P. & THATCHER, B. D. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **42(2)**: 84-94.
- TAUTZ, D.; TAUTZ, C.; WEBB, D. & DOVER, G. A. 1987. Evolutionary divergence of promoters and spacers in the rDNA family of four *Drosophila* species: implications

- TAUTZ, D.; TAUTZ, C.; WEBB, D. & DOVER, G. A. 1987. Evolutionary divergence of promoters and spacers in the rDNA family of four *Drosophila* species: implications for molecular coevolution in multigene families. **Journal of Molecular Biology**, **195**: 525-542.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGUIN, F. & HIGGINS, D.J. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. **Nucleic Acids Research**, **24**: 4876-4882.
- TRIGG, P. I. & KONDRACHINE, A. V. 1998. The current global malaria situation. In: SHERMAN, I. W. **Malaria: Parasite biology, Pathogenesis and Protection**. American Society for Microbiology, Washington, DC. p. 11-22.
- VAN DER SANDE, C. A. F. M.; KWA, M.; VAN NUES, R. W.; VAN HEERIKHUIZEN, H.; RAUÉ, H. A. & PLANTA, R. J. 1992. Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. **Journal of Molecular Biology**, **223**: 899-910.
- VOORHAM, J. 2002. Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera: Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, **36**: 75-80.
- WALTON, C.; SHARPE, R. G.; PRITCHARD, S. J, THELWELL, N.J. & BUTLIN, R. K. 1999. Molecular identification of mosquito species. **Biological Journal of the Linnean Society**, **68**: 241-256.
- WILKERSON, R. C.; REINERT, J. F. & LI, C. 2004. Ribosomal DNA ITS2 differentiate six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, **41**: 392-401.

WHO. **The world health report 1998. Life in the 21st century: A vision for all.**
Report of the director general. Geneva. World Health Organization, 1998.

ZAVORTINK, T. J. 1973. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. **Contributions of the American Entomological Institute, 9:** 1-54.

ZHOU, S. S.; TANG, L. H.; GU, Z. C. & WANG, Y. 2002. Sequence difference of ribosomal DNA second internal transcribed spacer in *Anopheles minimus* in different localities. **Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases, 20(1):** 29-31.