

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundaçāo Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-graduação em Biologia Parasitária

Rachel Canto Bottino

**Genética de populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara*
(Diptera: Culicidae), utilizando o gene *timeless* como marcador molecular.**

Orientador: Dr. Alexandre Afranio Peixoto

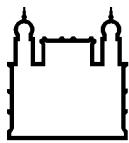
RIO DE JANEIRO

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundaçao Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-graduação em Biologia Parasitária

Rachel Canto Bottino

Genética de populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae),
utilizando o gene *timeless* como marcador molecular.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Parasitária, com área de
concentração em Genética.

Orientador: Dr. Alexandre Afranio Peixoto

RIO DE JANEIRO

2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FIOCRUZ - RJ

C232 Canto, Rachel

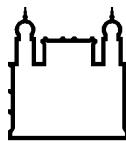
Genética de populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae), utilizando o gene *timeless* como marcador molecular /
Rachel Canto Bottino. – Rio de Janeiro, 2007.
xi, 98 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária,
2007.

Bibliografia: f. 39-44.

1. Anopheles darlingi.
2. Anopheles marajoara.
3. Relógios biológicos.
4. População – genética. I. Título.

CDD: 595.772



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Autor: *Rachel Canto Bottino*

Genética de populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae), utilizando o gene *timeless* como marcador molecular.

Orientador: *Dr. Alexandre Afranio Peixoto*

Aprovada em: *12/04/2007*

Examinadores:

Dr. Luiz Guilherme Soares da Rocha Bauzer – Presidente

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Dr. Luciano Andrade Moreira

FIOCRUZ / Centro de Pesquisa René Rachou / Laboratório de Malária

Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Unesp / Instituto de Biociências / Departamento de Parasitologia

Dr. Cristiano Valentim da Silva Lazoski

UFRJ / Departamento de Genética / Laboratório de Biodiversidade Molecular

Dr. José Bento Pereira Lima

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Departamento de Entomologia

Rio de Janeiro, 12 de abril de 2007.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz e financiado por Howard Hughes Medical Institute, Fundação Oswaldo Cruz e CAPES.

À minha mãe, que me criou com garra e força e me ajudou a ser quem sou, e à minha irmã, por todo amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

Bom, acho que essa é a hora em que, realmente, “a ficha cai” e vemos onde chegamos e com quem podemos contar em cada momento de mais uma etapa. E nada mais justo que agradecer a todos por cada pedacinho que acrescentaram na minha vida.

Gostaria de agradecer ao Alexandre por, antes de mais nada, confiar em mim! Por me orientar, incentivar a crescer e mostrar que a vida sempre pode ser vista por um outro ângulo. Por me ensinar que competência e humildade não precisam estar em direções opostas. Pelas conversas, pelas explicações, pelos puxões de orelha...por tudo que me ajudou a amadurecer! Obrigada por tudo, Alex.

À toda a minha família por todo apoio que me deram e por toda preocupação durante esse tempo, mesmo aqueles que nem sabem muito bem o que é uma tese (né, vó??!!). À minha mãe, que mesmo não entendendo muito bem as minhas viradas de noite escrevendo, sempre esteve ao meu lado me mimando; à minha irmã, que precisou ir pra longe pra eu perceber o quanto a amava...mas que nem com a distância deixou de me apoiar nas minhas horas de desespero e de vibrar nas minhas alegrias! Sorella, que falta você me faz!!! Ao meu padrinho, com quem sempre pude contar, pra tudo, e que, não satisfeito em ser meu porto seguro, junto com a Carla me deu um dos meus dois melhores presentes em todos esses 25 anos: a Carolina, minha afilhada, minha pequena pipoca, uma pessoa de só seis anos mas que tem me ensinado muito, talvez mais do que eu ensine a ela. O meu outro grande presente? O Guilherme, meu “filhado”, meu branquinho, que tem sempre aqueles dois braços abertos pra um abraço. A Dinda ama vocês!!! E ao meu pai que, mesmo de longe, sempre fez questão de me lembrar o quanto me ama!!

Aos meus amigos, que nesse tempo me dei conta de que são vários... que sempre me apoiaram e entenderam as minhas ausências em algumas horas importantes. À minha turma do mestrado, onde descobri mais amigos ainda!

Ao Alvaro, por toda confiança, carinho e apoio por todo esse tempo... por tantos momentos felizes, que às vezes me faziam esquecer minhas preocupações e meu nervosismo... e por me ensinar que, muitas vezes, as coisas são mais simples do que parecem! Obrigada...

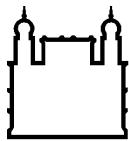
A todos do laboratório, que com bom humor, o tornavam um ambiente descontraído e agradável para se trabalhar. À Chel por, no começo, não me dar muito papo e tentar se mostrar uma menina má, mas depois virar uma enorme amiga, daquelas que podemos contar em qualquer hora e qualquer lugar!!! À Tammy, uma menina muito ciumenta que eu conheço (risos), mas que, nesses dois anos, também se tornou minha grande amiga!!! Adoro vocês,

meninas! Ao Paulo (Feijão) e ao Gabi, por se mostrarem tão companheiros e amigos...ah, e também muito implicantes!! Mas sabe que eu até sinto falta das implicâncias de vocês??! À Carla, por me “adotar” na minha entrada para o laboratório, me apresentando a bancada, com muita paciência e dedicação!!! À Camila, por me ajudar nas minhas primeiras análises de populações e também por tornar os programas pra essas análises menos misteriosos!! À Saori (também conhecida por “Japa”. Aliás, Japa...Lapa...heim, heim, Saori??!), Docinho (Ingrid), Robson, Lourdes, Ricardo, Vigoder, João, Renata, Antônio, Denise, Luísa, Patrícia, Rafaela, Sabrina, Almina, Jutta, Ademir e Tatú e aos que, infelizmente, não estão mais no lab mas que são meus amigos e tenho um grande carinho, Thiago (te adoro, cabeção!), Gogô e Ronaldo!!

Ao Kiko (também conhecido por Luiz Guilherme Bauzer!), por revisar minha dissertação e proporcionar momentos divertidos nessa fase de tanta preocupação.

Ao Dr. José Bento Lima por, além das conversas e sugestões, me doar alguns de seus “filhotes” anofelinos, e ao Dr. Paulo Ribolla, por me ceder amostras de *Anopheles darlingi*, ambos essenciais para o desenvolvimento dessa dissertação.

E, por fim, à CAPES, pela bolsa de estudos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

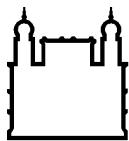
Genética de populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae), utilizando o gene *timeless* como marcador molecular.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rachel Canto Bottino

Anopheles darlingi e as espécies que compõem o complexo Albitarsis, entre elas *Anopheles marajoara* e *Anopheles albitarsis s.s.*, são importantes vetores da malária no Brasil. Devido à sua ampla distribuição geográfica e um comportamento contrastante em diferentes regiões, elucidar o real *status taxonômico* de *An. darlingi*, como uma única espécie ou um complexo de espécies crípticas, tornou-se um grande alvo de pesquisas. Neste trabalho, foi utilizado como marcador molecular um fragmento do gene *timeless*, envolvido no controle dos ritmos circadianos, para analisar a diferenciação genética entre populações de *An. darlingi* coletadas em Macapá (Estado do Amapá) e em Portchuelo (Estado de Rondônia). Em uma análise temporal e microgeográfica realizada com a população de Portchuelo, não observamos nenhuma diferenciação significativa entre os indivíduos coletados em diferentes horários. Porém, a diferenciação encontrada entre aqueles coletados no intra e no peridomicílio foi significativa e cerca de metade daquela observada entre Macapá e Portchuelo. Nós também estudamos o grau de divergência entre *An. darlingi* e *An. marajoara*. Os dados mostram que, embora pertencendo ao mesmo subgênero, estas duas espécies são bastante diferenciadas. Foi estimada, também, a divergência entre *An. marajoara* e uma seqüência de *An. albitarsis s.s.*. Esses resultados indicam que a diferenciação entre essas duas espécies do complexo Albitarsis é muito maior que aquela observada entre as populações de *An. darlingi* de Macapá e Portchuelo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundaçao Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Genética de populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae), utilizando o gene *timeless* como marcador molecular.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rachel Canto Bottino

Anopheles darlingi and species of the Albitarsis complex, such as *Anopheles marajoara* and *Anopheles albitasis* s.s., are important vectors of malaria in Brazil. Because of its wide geographical distribution and distinct behaviour in different regions, elucidation of the real taxonomic status of *An. darlingi*, as single species or a species complex, has become an interesting research aim. In this work, a fragment of *timeless*, a gene involved in the control of circadian rhythms, was used as a molecular marker to analyse the genetic differentiation between populations of *An. darlingi* collected in Macapá (Amapá State) and Portuchuelo (Rondônia State). Temporal and microgeographic analyses carried out within Portuchuelo have shown no significant differentiation among individuals collected at different hours. However, the differentiation observed among those collected from intra and peridomicile was significant and about half of that observed between Macapá and Portuchuelo. We also studied the degree of divergence between *An. darlingi* and *An. marajoara*. Although they belong to the same subgenus, the data from the *timeless* gene shows that they are highly differentiated. The divergence between *An. marajoara* and one sequence of *An. albitarsis* s.s. was also estimated. The results indicate that the differentiation between these two species of the Albitarsis complex is much higher than that observed between the populations of *An. darlingi* from Macapá and Portuchuelo.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1. Malária.....	1
1.2. <i>Anopheles darlingi</i>	3
1.2.1. <i>Anopheles darlingi</i> , um complexo de espécies?.....	5
1.3. Complexo Albitarsis.....	7
1.3.1. <i>Anopheles marajoara</i>	8
1.4. Gene <i>timeless</i>	9
2. Objetivos.....	12
3. Material e Métodos.....	13
4. Resultados.....	17
4.1. Isolamento de um fragmento do gene <i>timeless</i>	17
4.2. Genética de populações de <i>An. darlingi</i> , utilizando o gene <i>timeless</i> como marcador molecular	21
4.3. Análise de polimorfismos em <i>Anopheles marajoara</i> e da divergência genética entre as espécies estudadas	28
5. Discussão.....	33
6. Conclusões.....	38
7. Referências Bibliográficas.....	39
8. Anexos.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. MALÁRIA

Mosquitos são dípteros, pertencentes à família Culicidae, que podem estar envolvidos na transmissão de patógenos que causam importantes doenças humanas, sendo uma delas a malária, também conhecida como paludismo. Essa é uma doença infecciosa tropical que afeta de 300 a 500 milhões de pessoas, causando, aproximadamente, um milhão de mortes anuais, em sua maioria de crianças na África (WHO, 2005). A malária está distribuída em algumas ilhas do Caribe, nas Américas do Sul e Central, em partes da Ásia e, em maior endemicidade, na África (WHO, 2005), como é observado na figura 1.1. Dos casos relatados nas Américas, aproximadamente 40% encontram-se no Brasil, estando 99% desses concentrados na região Amazônica, onde, em 2006, foram detectados aproximadamente 540 mil casos (Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006).

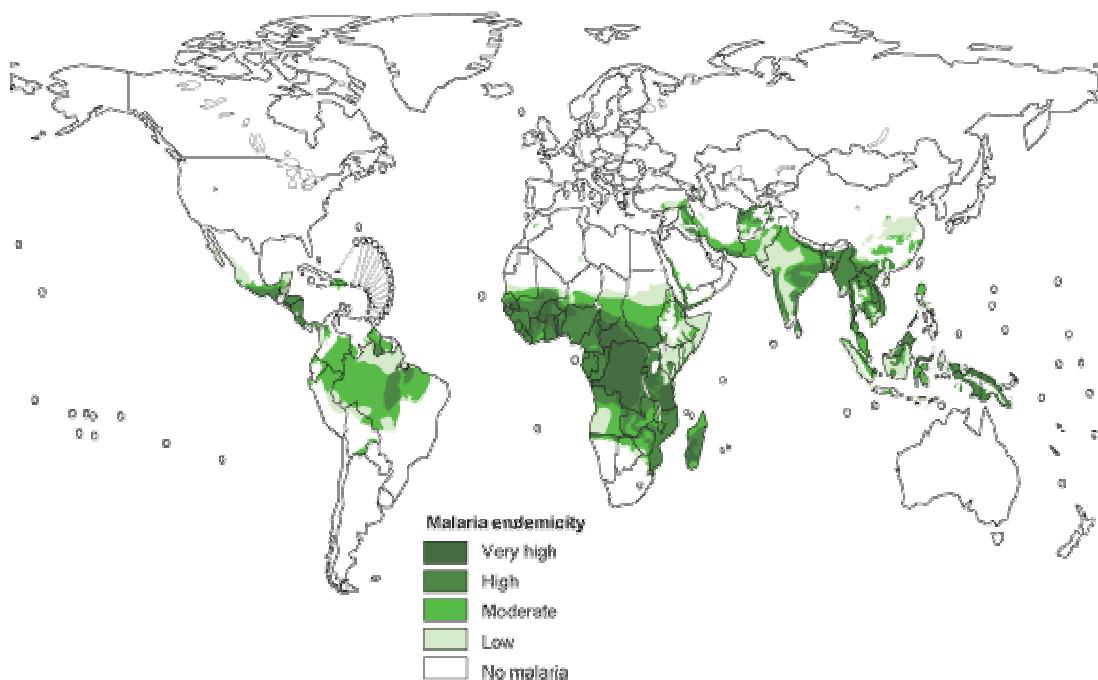


Figura 1.1: Mapa da distribuição do grau de endemicidade da malária nos continentes (WHO, 2005).

A malária humana é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* de quatro diferentes espécies: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sendo a primeira a causadora da forma mais letal da doença. No ciclo dessa parasitose, os esporozoítas são introduzidos na corrente sanguínea do homem através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos pertencentes ao gênero *Anopheles*, observando-se, assim, a obrigatoriedade do encontro homem-mosquito e a influência de comportamento tanto de humanos quanto de mosquitos nesse ciclo. Dessa forma, fatores como local (intra, peri ou extradomicílio), horário de picada preferencial e o grau de antropofilia de cada espécie vetora são determinantes para a endemicidade em diferentes localidades, indicando que a melhor medida de prevenção dessa doença é a redução do contato do vetor com seu hospedeiro. Portanto, o uso de mosquiteiros, telas nas janelas e roupas que evitem grande exposição corporal, além da escolha de locais e material adequados à construção das casas, mostram-se bastante eficientes como profilaxia dessa parasitose (Rey, 2001; Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006).

O número de casos de malária sofreu aumentos significativos, principalmente na Amazônia brasileira, na década de 1990, como consequência de ações antrópicas que mudaram o ambiente, como colonização humana descontrolada de florestas fechadas, práticas de irrigação e construção de represas, tornando um local propício à instalação de novos habitats de vetores (Tadei et al., 1998; Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). A construção de represas, além de criar áreas adequadas ao desenvolvimento dos mosquitos, promove o encontro hospedeiro-vetor nos locais de construção, aumentando os riscos de aquisição da doença (Tadei et al., 1998; Tubaki et al., 2004). Porém, atualmente, essa região conta com uma política permanente de prevenção e controle de endemia, por meio do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) do Ministério da Saúde, o qual tem investido em infra-estrutura adequada para ações de controle (Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006).

Além do necessário contato com o homem, a transmissão de doenças por insetos é potencializada por alguns fatores relacionados aos vetores, como abundância, susceptibilidade a infecções e longevidade (Gillies, 1988 *apud* Charlwood, 1996), assim como propensão a entrar nos domicílios para se alimentar, escolha de hospedeiros e comportamento após a alimentação (Charlwood, 1996). De acordo com essas características, algumas espécies são consideradas vetoras potenciais e dominantes em determinadas localidades. Na África, por exemplo, a espécie primariamente responsável pela transmissão da malária é *Anopheles gambiae* s.s., pertencente ao complexo *An. gambiae* (della Torre et al., 2002). Na região Neotropical, mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus* são considerados

os mais importantes vetores da malária, sendo representados por, dentre outros, *Anopheles darlingi* e *An. albitalis* (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

1.2. *Anopheles darlingi*

Anopheles darlingi (figura 1.2) foi descrito por Root, em 1926, e é considerado o principal vetor da malária no Brasil, principalmente na Amazônia, contribuindo para a endemicidade dessa parasitose nessa região. Distribui-se, predominantemente, no continente sul-americano (abrangendo a Colômbia e o leste da Cordilheira dos Andes, até o norte da Argentina e o sul do Brasil), porém encontra-se também na América Central, desde o sul do México até a Nicarágua (Forattini, 2002). No Brasil, é visto em todo o interior, exceto nos locais mais secos do Nordeste, no extremo Sul e em locais de maior altitude, sendo mais presente ao longo de grandes rios e próximo a florestas (Deane, 1986). Sua distribuição e densidade estão claramente relacionadas à transmissão da malária (Deane, 1986; Forattini, 1987; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).



Figura 1.2: Fêmea de *An. darlingi* realizando o repasto sanguíneo.

Fonte: fmel.ifas.ufl.edu/gallery.htm

Os mosquitos dessa espécie utilizam como criadouros, na estação seca, grandes coleções de água permanentes, como margens de rios e lagos, dotadas de vegetação abundante, ensolaradas ou parcialmente sombreadas mas, na estação chuvosa, quaisquer tipos distintos de depósitos transitórios de água, incluindo poças, valas e impressões de patas de animais, servem para abrigar estágios imaturos (Deane, 1986; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

A densidade de anofelinos pode variar ao longo do ano de acordo com as estações. Assim, torna-se claro imaginar que a densidade aumenta nas estações chuvosas, uma vez que aumentam também os criadouros temporários para os mosquitos; o contrário é visto nas estações secas, onde a densidade diminui devido ao menor número de criadouros existentes (Tadei & Thatcher, 2000). Em alguns estudos, a maior densidade de anofelinos foi encontrada nos períodos de transição entre essas duas estações (Tadei & Thatcher, 2000; Souza-Santos, 2002), porém, ao observar *An. darlingi*, comprova-se que essa espécie é encontrada em todos os períodos do ano, reforçando que medidas de controle desse vetor devem ser contínuas, administradas durante todo o ano (Souza-Santos, 2002).

Esses mosquitos são freqüentemente encontrados com suas glândulas salivares infectadas por esporozoítas de *Plasmodium*, principalmente *P. vivax* e *P. falciparum* (Deane, 1989; Tadei et al., 1998). Essa susceptibilidade à infecção combinada ao seu comportamento, em geral, altamente antropofílico (Deane, 1989; Rosa-Freitas et al., 1998; Tadei et al., 1998; Souza-Santos, 2002; Marrelli et al., 2005; Zimmerman et al., 2006), embora já tenha sido capturado picando animais (Deane, 1989; Charlwood, 1996), são as principais razões para que essa espécie seja considerada vetor primário do paludismo no Brasil.

Sua atividade hematofágica é observada, na maioria das vezes, à noite (Deane, 1986), mas esse ciclo pode apresentar variações quando comparado entre suas diferentes áreas de distribuição, podendo ser caracterizado como, normalmente, bimodal (com um pico mais substancial ao anoitecer e picos ocasionais ao amanhecer, evidenciando uma preferência crepuscular), mas também trimodal (no qual, além dos picos crepusculares, é observada também uma atividade por volta de meia-noite) ou unimodal (Forattini, 1987; Klein & Lima, 1990; Rosa-Freitas et al., 1992; Charlwood, 1996; Tadei et al., 2000). As diferenças encontradas nos horários preferenciais de hematofagia podem ser influenciadas pelo local onde os mosquitos estão inseridos. Tadei & Thatcher (2000), por exemplo, observaram em áreas rurais uma atividade contínua com picos crepusculares e, em áreas urbanas, uma atividade concentrada no intervalo de 18h às 19h. Essas diferenças podem ser também resultantes de adaptações aos hábitos humanos, onde as pessoas se tornam mais vulneráveis quando voltam para casa do trabalho ou estão dormindo, não apresentando resistência à

picada, o que facilitaria a transmissão. A plasticidade nos padrões de atividade pode apresentar uma variação intra-populacional tão grande quanto a inter-populacional e ter como consequência um aumento no potencial vetorial dessa espécie (Voorham, 2002).

Anopheles darlingi é um anofelino extremamente endofílico, ou seja, tem o hábito de entrar nas casas para picar o homem, o que lhe confere mais uma garantia de sucesso na sua capacidade vetorial. Embora, em algumas áreas, seja encontrado preferencialmente dentro e ao redor de casas (Deane, 1989; Charlwood, 1996; Tadei et al., 1998; Tadei et al., 2000), em outras, pode apresentar comportamento exofílico (Forattini, 1987; Deane, 1989; Xavier & Rebêlo, 1999). A exofilia desses mosquitos pode ser explicada pelas mudanças dos hábitos humanos ou do ambiente onde essa espécie é naturalmente encontrada. A partir do momento em que o homem invade as florestas para a construção de estradas ou hidrelétricas, por exemplo, não é mais necessário que o mosquito entre nas habitações para conseguir alimento, realizando o repasto sangüíneo ali mesmo, no extradomicílio.

Ao estudarem as variações no ciclo de picada dessa espécie, Charlwood & Hayes (1978) comentam a possibilidade de um provável isolamento geográfico entre as diferentes populações, uma vez que a distribuição de *An. darlingi* é muito ampla. Dessa forma, as linhagens geneticamente adaptadas a determinadas localidades originariam novas espécies ou subespécies de mosquitos (Charlwood & Hayes, 1978). Seria, então, *An. darlingi* um complexo de espécies??

1.2.1. *Anopheles darlingi*, UM COMPLEXO DE ESPÉCIES?

Em espécies de mosquitos anofelinos neotropicais, principalmente dentro do subgênero *Nyssorhynchus*, é comum a presença de complexos de espécies crípticas, o que, a princípio, compromete o conhecimento adequado das espécies vetoras e prejudica o desenvolvimento de medidas de prevenção e controle, tanto da parasitose quanto de seus vetores (Rosa-Freitas et al., 1998; Voorham, 2002).

Como observado em algumas outras espécies, o *status taxonômico* de *An. darlingi* também se encontra sob discussões e controvérsias. Em razão das diversas variações comportamentais de *An. darlingi* citadas anteriormente, tem sido levantada a hipótese de que este anofelino pode tratar-se de um complexo de espécies crípticas (Rosa-Freitas et al., 1998) e vários estudos vêm sendo realizados para que se chegue a uma possível conclusão sobre essa espécie. Como esse é comprovadamente o vetor primário da malária no interior do Brasil, saber se forma ou não um complexo é de grande importância para o planejamento de controle do paludismo no país.

Alguns trabalhos baseados na técnica de RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction*), na morfologia e nas análises de alguns marcadores, como seqüências do gene ITS2 (*internal transcribed spacer 2*) de DNA ribossomal, DNA mitocondrial e variação enzimática, foram realizados com o objetivo de tentar esclarecer o *status taxonômico* de *An. darlingi* e demonstraram similaridades, genética e morfológica, consistentes com a existência de uma única espécie (Freitas-Sibajev et al., 1995; Malafronte et al., 1999; Manguin et al., 1999; Santos et al., 1999).

Porém, sua intensa plasticidade quanto ao comportamento hematofágico, incluindo a escolha do hospedeiro, horário do pico de atividade e local da realização do repasto sanguíneo – dentro ou fora das casas, sugere uma diferenciação geográfica entre populações dessa espécie (Charlwood & Hayes, 1978; Freitas-Sibajev et al., 1995; Voorham, 2002), o que pode ser explicado por ser uma característica polimórfica que sofre influências de fatores ambientais, como as diferentes estações do ano, por exemplo (Rosa-Freitas et al., 1992).

Malafronte et al. (1999) analisaram seqüências de ITS2 de mosquitos coletados em alguns estados do norte do Brasil (Rondônia, Roraima e Acre), na Bahia e em São Paulo e observaram que essas eram praticamente idênticas, exceto as referentes aos mosquitos coletados em Dourado (São Paulo), uma região não endêmica de malária. Nessa localidade, as seqüências apresentavam diferenças quando comparadas com as populações dos outros locais estudados, fato que reforça outros aspectos que separam essa população, como comportamentais, por exemplo (Forattini, 1987; Freitas-Sibajev et al., 1995).

Uma interessante técnica utilizada para a identificação de complexos de espécies críticas é o bandeamento C, o qual é feito com base nas diferenças na morfologia, distribuição e quantidade de blocos heterocromáticos dos cromossomos, principalmente dos sexuais, X e Y (Baimai et al., 1993). Ao fazer um estudo da variação nos blocos heterocromáticos de cromossomos em metáfase de populações de Manaus e Macapá, Rafael & Tadei (2000) observaram variação intra-específica na quantidade e na distribuição dos blocos nos cromossomos X (mostrando dois tipos de cromossomos, X₁ e X₂) e nas regiões centroméricas dos autossomos de *An. darlingi* e *An. nuneztovari*, com os cromossomos X apresentando maior variação que os autossomos.

Também através de pesquisas baseadas em polimorfismos cromossômicos, Tadei et al. (1982) encontraram duas novas inversões nas amostras da Amazônia (Manaus/Boa Vista) e concluíram que as populações dessa localidade são mais polimórficas que as populações do Sul, o que havia sido demonstrado também por Kreutzer et al. (1972), que observaram inversões cromossômicas em maior grau nas populações setentrionais do Brasil que nas meridionais.

Embora Manguin et al. (1999) tenham considerado *An. darlingi* como sendo uma única espécie, analisando dados de DNA ribossomal, encontraram inserções/deleções fixadas em amostras coletadas em Belize, mas não as encontraram nas amostras da América do Sul.

Recentemente, Mirabello & Conn (2006) estudaram a possibilidade da existência de uma divisão no *pool* gênico dessa espécie entre as Américas Central e do Sul. Para isso, analisaram seqüências do gene mitocondrial COI (*mitochondrial cytochrome oxidase subunit I*) e encontraram uma divisão das amostras em dois grupos: um contendo amostras somente da América do Sul e um segundo englobando as amostras da América Central e Colômbia. O primeiro grupo foi, ainda, subdividido entre as amostras do norte da Amazônia e as outras amostras coletadas na Amazônia e no sul da América do Sul. Além da alta diferenciação genética encontrada entre as Américas, foi estimado pouco, ou praticamente nenhum, fluxo gênico entre as populações referentes a essas regiões, o que poderia ser uma consequência de barreiras naturais que o estariam obstruindo.

Através dos experimentos citados acima, observa-se que o *status* taxonômico de *An. darlingi* é controverso e nada se pode afirmar, ainda, sobre a existência ou não de um complexo.

1.3. COMPLEXO ALBITARSIS

Outro *Nyssorhynchus*, também exercendo importante papel na transmissão da malária, é o *Anopheles albitalis lato sensu*. Essa é uma espécie amplamente distribuída no Brasil e também em vários outros países das Américas do Sul e Central, como Uruguai, Paraguai, Venezuela, Guianas, Colômbia, Panamá, Costa Rica, Guatemala, entre outros (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Estudos baseados em eletroforese de enzimas, RAPD-PCR e cruzamentos confirmaram que *An. albitalis l.s.* é um complexo formado por quatro espécies críticas: *An. albitalis senso stricto* Lynch-Arribálzaga 1878, *An. marajoara* Galvão e Damasceno 1942, *An. deaneorum* Rosa-Freitas 1989, e uma quarta espécie ainda não formalmente descrita (Wilkerson et al., 1995a; Rosa-Freitas et al., 1998; Lima et al., 2004), sendo a terceira a única espécie morfológicamente distinguível das outras. Uma outra técnica, para identificar os diferentes componentes do complexo, aplicada recentemente foi a utilização de oligos para reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) do gene ITS2 de DNA ribossomal, a qual teve seus resultados comparados com prévios resultados obtidos através de RAPD-PCR e mostrou-se eficiente para esse objetivo (Li & Wilkerson, 2005). Wilkerson et al. (1995a)

designou essas espécies como: A (*An. albitarsis s.s.*), B (a espécie ainda não descrita), C (*An. marajoara*) e D (*An. deaneorum*).

De acordo com Li & Wilkerson (2005), a distribuição para cada uma das espécies que compõem esse complexo é a seguinte: *An. albitarsis s.s.*, distribuída ao longo do sul do Brasil, norte da Argentina e Paraguai; espécie B (nome utilizado segundo Wilkerson et al., 1995a), sendo encontrada no sul, centro e leste do Brasil; *An. marajoara*, vista no Brasil, Venezuela, Colômbia e sul da América Central; e, por fim, *An. deaneorum*, encontrada do norte da Argentina ao Oeste do Brasil. Embora os membros do complexo Albitarsis sejam considerados importantes na transmissão de parasitos da malária, devido a sua semelhança morfológica, torna-se complicado avaliar o papel de cada um desses como vetores em determinado local (Wilkerson et al., 1995b).

Por não apresentar preferências muito claras quanto ao seu comportamento, *Anopheles albitarsis l.s.* é considerado o *Nyssorhynchus* mais eclético daqueles relacionados à transmissão da malária (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Pode apresentar como criadouros variados tipos de coleções de água e, também, ser encontrado picando por todo o ano. Além disso, embora preferencialmente exofílico e zoófilo, é visto também dentro de casas picando o homem (Deane, 1986; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A maioria dos membros desse complexo foi encontrada com infecções naturais apenas de oocistos, porém, em alguns poucos lugares, tem sido observada infecção por esporozoítas de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malarie* (Póvoa et al., 2001; da Silva-Vasconcelos et al., 2002). Dessa forma, *An. albitarsis l.s.* é considerado um vetor secundário ou apenas local, visto que, em poucas localidades, é tido como vetor principal (Deane, 1986; Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

1.3.1. *Anopheles marajoara*

Anopheles marajoara foi descrito por Galvão e Damasceno, em 1942, na Ilha de Marajó, e é uma das espécies que constituem o complexo Albitarsis. É considerado vetor secundário ou local da malária nas Américas Central e do Sul, distribuído da Costa Rica à Bolívia (Rubio-Palis et al., 2003), porém foi apontado como vetor primário dessa parasitose no estado do Amapá (Conn et al., 2002).

Nessa localidade, foi considerado como uma espécie exofílica (Conn et al., 2002; Voorham, 2002) e mostrou altas taxas de infecção tanto para *P. falciparum* quanto para *P. vivax* (Conn et al., 2002). O seu comportamento exofílico explica sua pronunciada importância vetorial em locais onde o controle do vetor da malária é feito dentro das casas

(Voorham, 2002). Além disso, demonstrou ser uma espécie antropofílica (Conn et al., 2002; Zimmerman et al., 2006) o que, juntamente com sua susceptibilidade à infecção, o torna um vetor, nesse local, mais perigoso que o *An. darlingi*.

Essa espécie mostrou-se de hábito noturno, porém com variações quanto ao horário. Em estudos realizados em São Paulo, seu pico hematofágico começava na segunda metade da noite, ou seja, às 2 horas da manhã e se estendia até as 5 h (Kakitani et al., 2003); o contrário foi observado em Trinidad e Tobago, onde a alimentação era predominante na primeira metade da noite, nos crepúsculos vespertinos, tanto no intra quanto no extradomicílio (Forattini, 2002). Apesar dessas diferenças encontradas, essa espécie apresenta padrões mais estáveis de atividade hematofágica se comparada a *An. darlingi*, com um pico representativo durante as três primeiras horas da noite (Voorham, 2002).

A explicação para que *An. marajoara* tenha se tornado o vetor principal da malária em determinadas regiões é dada pelas modificações ambientais, em sua maioria causadas por ações antrópicas, que acarretaram em novos habitats adequados ao desenvolvimento de mosquitos dessa espécie. Simultaneamente a isso, observa-se uma ocupação humana desordenada de locais com criadouros já existentes, estabelecendo um contato maior do hospedeiro com o vetor e também de mosquitos não infectados com pessoas que possuem o parasita malárico, aumentando também a infecção vetorial (Conn et al., 2002).

1.4. GENE *timeless*

Cada espécie apresenta uma particularidade quanto às suas preferências, como local e horário para o repasto sanguíneo, condições adequadas ao estabelecimento de habitats, escolha de hospedeiro, entre outras, e conhecer essa dinâmica comportamental de insetos vetores auxilia na elaboração de medidas de controle e, também, no levantamento de áreas de risco para certas doenças.

Essas diferenças nos ritmos de atividade e alimentação de diferentes insetos vetores são, provavelmente, controladas pelo relógio biológico interno (Clements, 1999). Alguns genes que constituem esse relógio já foram identificados e seqüenciados em *Drosophila*, sendo um deles o *timeless* (*tim*). Esse, juntamente com *period* (*per*), *Clock* (*Clk*) e *cycle* (*cyc*), faz parte da alça central de regulação do relógio circadiano, o qual regula ritmicamente os processos biológicos. De forma simplificada, este é o modelo de funcionamento do relógio circadiano em *Drosophila*: os fatores de transcrição *CLOCK* (*CLK*) e *CYCLE* (*CYC*) ativam a expressão dos RNAs mensageiros de *per* e *tim*, os quais entram no citoplasma e são

traduzidos em proteínas PERIOD (PER) e TIMELESS (TIM), respectivamente. Ao atingirem altas concentrações no citoplasma, essas proteínas dimerizam-se formando complexos PER/TIM, que entram no núcleo da célula no meio da noite. No núcleo, esses complexos bloqueiam a função dos seus ativadores transcripcionais, CLK e CYC, causando uma diminuição dos níveis dos mRNAs de *per* e *tim* e, consequentemente, uma queda na quantidade das proteínas expressas por esses genes. Ao amanhecer, as proteínas PER e TIM são degradadas e novos complexos CLK/CYC são formados ativando, novamente, os genes *per* e *tim*, dando continuação ao ciclo (Stanewsky, 2003; Hardin, 2005).

O gene *timeless* apresenta um papel muito importante para o acerto do relógio biológico, uma vez que, no início do dia, sua proteína é marcada para degradação pela proteína CRY (cryptochrome), a qual é ativada pela luz. Como a estabilidade da proteína PER depende de TIM, uma vez que na ausência desta última PER é fosforilada, o complexo PER/TIM acaba sendo afetado pelos efeitos da luz em TIM (Ashmore & Sehgal, 2003).

Dessa forma, como parte da alça molecular de regulação do relógio circadiano, *timeless* exerce influência decisiva no controle dos ritmos de atividade do organismo, podendo estar envolvido na regulação de características de comportamento que variam entre espécies, como os ritmos de alimentação. Além disso, *timeless* e outros genes do relógio circadiano estão potencialmente envolvidos na determinação dos ritmos de acasalamento (Sakai & Ishida, 2001; Tauber et al., 2003), podendo exercer um importante papel no processo de especiação. Sendo assim, este gene é um excelente marcador molecular para investigação de complexo de espécies. O uso da técnica de PCR e oligos degenerados tem permitido o isolamento de fragmentos homólogos a genes do comportamento de *Drosophila* em insetos vetores (Peixoto et al., 2001; Meireles-Filho et al., 2006a,b) e, recentemente, o gene *timeless* de *Aedes aegypti* foi clonado e seqüenciado (Gentile et al., 2006). Isso tem permitido o isolamento de fragmentos do gene *timeless* em anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus* como *Anopheles aquasalis* e outros (Gentile & Peixoto, dados não publicados).

Como uma das características marcantes de *An. darlingi* é sua variação no padrão de comportamento entre diferentes populações, como o horário de preferência para realização do repasto sanguíneo, a realização de um estudo de populações de *An. darlingi*, tendo como alvo um gene que pode estar envolvido na regulação desse aspecto do comportamento, como é o caso do gene *timeless*, pode auxiliar na elucidação dessas questões.

Neste trabalho, utilizamos o gene *timeless* para analisar o grau de divergência entre populações de *An. darlingi* e também a variação molecular nesse gene em espécimes coletados em diferentes horários para investigar se existe alguma associação entre haplótipos específicos e o horário de atividade. Posteriormente, analisamos o grau de divergência entre

An. darlingi e uma espécie próxima a essa, *An. marajoara*. Finalmente, comparamos a diferenciação encontrada entre as populações de *An. darlingi* analisadas com aquela encontrada entre as espécies *An. marajoara* e *An. albitarsis s.s.*

2. OBJETIVOS:

- ✓ Isolar um fragmento homólogo ao gene *timeless* de *Drosophila* em *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara*;
- ✓ Analisar a relação entre variações no gene *timeless* e horário de captura nos indivíduos da população de Portuchuelo;
- ✓ Analisar o grau de divergência entre populações de *An. darlingi* de diferentes localidades (Macapá e Rondônia);
- ✓ Estudar o grau de divergência no gene *timeless* entre *An. darlingi* e *An. marajoara*.
- ✓ Comparar o grau de divergência entre as populações de *An. darlingi* e aquele encontrado entre *An. marajoara* e *An. albitalis s.s.*

3. MATERIAL E MÉTODOS:

Obtenção das amostras:

Nesta dissertação, foram analisadas amostras de duas espécies, *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara*. Os exemplares da espécie *An. darlingi* foram obtidos em dois locais diferentes, uma amostra oriunda de uma região denominada setor B em Portuchuelo, localidade próxima à cidade de Porto Velho, estado de Rondônia, e outra, de Macapá, Amapá. Da primeira amostra, cedida pelo Dr. Paulo Ribolla (UNESP, Botucatu), foram obtidos os DNAs já extraídos individualmente de fêmeas, capturadas no período das 06 horas da tarde às 06 horas da manhã, tanto no intra quanto no peridomicílio. A amostra de Macapá, obtida com o Dr. José Bento Lima e Dra. Denise Valle (Instituto de Biologia do Exército e Departamento de Entomologia, IOC), são fêmeas de mosquitos coletados no campo usando o boi como isca.

Os mosquitos da espécie *An. marajoara* também foram doados pelo Dr. José Bento Lima e pela Dra. Denise Valle e são fêmeas coletadas no campo, na localidade de Macapá, Amapá.

Extração de DNA individual:

A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo de extração descrito por Jowett (1998), com algumas modificações. Nessa etapa, os mosquitos foram individualmente macerados, juntamente com 200 µl de uma solução de lise celular - Sq buffer (Triton X-100 0,2%, TrisHCl 10 mM pH 8,2, EDTA 2 mM) e, posteriormente, foram adicionados 4 µl de proteinase K (20 mg/ml). Os tubos foram colocados a 37°C em banho-maria e, após uma hora, colocados em um outro banho a, aproximadamente, 100°C por 10 minutos, para desnaturar a proteinase K, inativando-a. Por último, os tubos foram colocados no gelo.

Reações de PCR:

O fragmento inicial (“tim3”) do gene *timeless*, parcialmente sobreposto a um outro (“tim2”) previamente seqüenciado (Gentile & Peixoto, comunicação pessoal), foi obtido através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando DNA de *An. darlingi*, gentilmente cedido por Carla Gentile e extraído com o kit *Genomic Prep Cells & Tissue DNA isolation* (Amersham Biosciences) a partir de 20 mosquitos, e os

oligonucleotídeos degenerados 5timdeg3 e 3timdeg3 (Gentile et al., 2006). A reação continha: 3,0 µl de MgCl₂ (25 mM), 4,0 µl de tampão 10X (10 mM Tris-HCl pH 8,5; KCl 50 mM e MgCl₂ 1,5 mM), 0,4 µl de dNTPs (10 mM cada), 0,4 µl de Taq DNA polimerase (5 unidades / µl) (Promega), 8 µl de cada um dos oligos degenerados (10 µM), 1 µl de DNA genômico (~ 50 ng/µl) e água mili-Q para completar os 40 µl totais. Nesse caso, foi necessária a reamplificação do produto, utilizando-se 1 µl do DNA amplificado na primeira reação e modificada a quantidade de MgCl₂ (de 3,0 µl para 3,2 µl). Tanto na amplificação quanto na reamplificação as condições de ciclagem foram: 94°C / 1 min de desnaturação inicial; 15 ciclos com 94°C / 1 min de desnaturação, 48°C / 1 min de anelamento (com o decréscimo de um grau por ciclo – método *touchdown*) e 72°C / 1 min na etapa de extensão; posteriormente, foram feitos 20 ciclos com 94°C / 1 min de desnaturação, 48°C / 1 min de anelamento e 72°C / 1 min de extensão. Finalmente, a temperatura era reduzida a 4°C e permanecia estável até que o produto fosse retirado do termociclador.

A partir da obtenção desse fragmento, foi possível desenhar um par de oligos específicos 5darltim2a (5' GAACGCAGGTCGAGAAGGAATC 3') e 3darltim3 (5' GGTATCGATTGCACTTGCT 3'), onde darl = *darlingi* e tim = *timeless*, que amplificasse juntamente os dois fragmentos (“tim2-3”) utilizados nas análises das populações estudadas nesse trabalho.

Nas amplificações feitas para as amostras da população de Portuchuelo foram testadas diferentes DNAs polimerases e condições de ciclagem. Desta forma, foi possível estabelecer a melhor condição de amplificação, a qual apresentava em cada uma de suas reações: 4,0 µl de tampão 10X, 3,2 µl de MgCl₂, 0,4 µl de dNTPs, 0,8 µl de Tth (1 u / µl) (Biotools), 4,0 µl de cada oligo específico (10 µM cada), 1,0 µl de DNA (concentração desconhecida) e água mili-Q para completar o volume final de 40 µl. As concentrações dos reagentes não citadas são semelhantes às já descritas anteriormente. A ciclagem foi feita com 94°C / 5 min de desnaturação inicial e 35 ciclos com 94°C / 30s de desnaturação, 62°C / 30s de anelamento e 72°C / 1,5 min de extensão. Para a amostra da população de *An. darlingi* de Macapá foram feitas algumas modificações para as amplificações. Nessa, utilizou-se o PCR Master Mix (Promega) com cada amostra contendo: 25 µl de PCR Master Mix, 4,0 µl de cada oligo, 1,0 µl de DNA (concentração desconhecida – 1 mosquito/200 µl) e água mili-Q para completar os 50 µl totais. As temperaturas usadas foram: 94°C / 5 min de desnaturação inicial e 30 ciclos de 94°C / 30s de desnaturação, 60°C / 30s de anelamento e 72°C / 2 min de extensão. Por fim, a temperatura era reduzida a 4°C até que as amostras fossem retiradas do termociclador. Em alguns indivíduos foram feitas modificações na quantidade de DNA

utilizada e no número de ciclos, sendo essas de 1,0 µl para 2,0 µl e de 30 para 35 ciclos, respectivamente. Cabe lembrar que, ao mudar a quantidade de DNA, ajustamos, concomitantemente, a quantidade de água para completar o volume final de 50 µl. Essas últimas condições, com suas devidas modificações, foram também utilizadas nas amostras de *An. marajoara*, para as quais os oligos específicos desenhados para *An. darlingi* funcionaram perfeitamente. Em todas as reações de PCR foram feitos controles negativos, onde o DNA era substituído por água mili-Q.

Para confirmar o sucesso dos produtos amplificados foram feitas eletroforeses utilizando géis de agarose 2% com brometo de etídio (0,05 µg / 100 ml) e TAE 1X (Tris-Aacetato EDTA 1X) como tampão de corrida, em uma voltagem que variava entre 80 e 120 V, usando como marcador de peso molecular o *100 Base-Pair Ladder* (Amersham Biosciences). Finalmente, os resultados das amplificações foram visualizados e fotografados utilizando um transiluminador UV.

Purificação e clonagem dos produtos de PCR:

A purificação do fragmento inicial foi feita utilizando o kit *Wizard PCR Preps DNA Purification System* (Promega); já na população de *An. darlingi* de Portuchuelo e em alguns indivíduos da mesma espécie de Macapá foi aplicado o kit *Wizard SV Gel e PCR clean-up System* (Promega). Finalmente, no restante dos indivíduos de Macapá e nas amostras de *An. marajoara* foi usado o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences). Todas as purificações foram realizadas seguindo instruções do fabricante.

Na etapa de ligação dos fragmentos purificados a um vetor plasmidial foram utilizados os seguintes kits: *pGEM-T Easy vector System I* (Promega) (fragmento inicial), *pMosblue blunt-ended cloning* (Amersham Biosciences) (população de Portuchuelo) e *TOPO TA Cloning* (Invitrogen) (populações de *An. darlingi* de Macapá e de *An. marajoara*).

As ligações foram, então, utilizadas na transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5- α e, essas, crescidas em meio LB sólido que continha ampicilina (100 µg / µl) (ou canamicina 50 µg / ml, no caso do kit *TOPO TA*), X-gal (2%) e IPTG (100 mM). Após o crescimento, as colônias brancas e azuis claras foram inoculadas em um meio (LB ou CG líquidos) contendo ampicilina (75 µg / µl) (ou canamicina 50 µg / ml) e colocadas sob agitação de cerca de 200 RPM, a uma temperatura de 37°C, por 16 – 22 horas. Posteriormente, foram feitos a centrifugação dessas células e o isolamento do DNA plasmidial utilizando o kit *Flexiprep* (Amersham Biosciences), nos experimentos referentes ao fragmento inicial, e o método de mini-preparação em microplacas de 96 poços, através da

técnica de lise alcalina (Sambrook & Russel, 2001) e filtrados em placa Millipore, nas análises populacionais.

Para a certificação da presença do inserto desejado, 5 – 10 µl do DNA plasmidial obtido foram digeridos em um volume total de reação de 20 µl contendo 0,5 µl de cada uma das enzimas de restrição - EcoRI (12 u / µl) e PstI (10 u / µl), ambas da Promega. As digestões foram separadas em eletroforese de gel de agarose e aquelas que representaram os clones com inserto foram seqüenciadas.

Seqüenciamento:

As reações de seqüenciamento foram feitas com o *kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V3.0* e *V3.1* (Applied Biosystems) utilizando o oligonucleotídeo T7 ou o M13 forward. Os seqüenciadores utilizados foram ABI Prism 377 DNA Sequencer com géis de acrilamida a 4,75%, no seqüenciamento do fragmento inicial, e ABI 3730 de 48 capilares, nos seqüenciamentos posteriores para as análises populacionais. As amostras foram precipitadas com etanol, ressuspendidas em formamida HiDi ou em *Blue Dextran* com formamida e desnaturadas a 95°C por 3 minutos antes de aplicadas no sequenciador. As reações foram processadas em 25 ciclos (para o ABI 377) e 40 ciclos (para o ABI 3730), ambos com as seguintes condições: 96°C / 10 segundos, 50°C / 5 segundos e 60°C / 4 minutos.

Análise das seqüências:

A similaridade das seqüências obtidas com o gene *timeless* de *Drosophila* foi confirmada através do programa *BlastX*, disponível no site do National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>).

A edição e o alinhamento das seqüências foram feitos através do programa GCG (Wisconsin Package Version 9.1, Genetic Computer Group, Madison – Wisconsin, USA).

A análise de polimorfismos e diferenciação entre populações foi feita através dos programas DnaSP ver4.1 (Rozas et al., 2003) e Proseq ver2.91 (Filatov & Charlesworth, 1999). Por fim, para a análise filogenética foi utilizado o programa MEGA ver 3.1 (Kumar et al., 2004).

4. RESULTADOS:

4.1. Isolamento de um fragmento do gene *timeless*:

O passo inicial dessa dissertação foi a obtenção de um fragmento (o fragmento 3) do gene *timeless* em *An. darlingi*, complementar a um outro previamente seqüenciado, o fragmento 2 (Gentile & Peixoto, comunicação pessoal), com a utilização de oligos degenerados. Para isso, a princípio, foi feito um alinhamento da seqüência da proteína codificada por *timeless* entre as espécies *Drosophila melanogaster* e *An. gambiae* e, no local desejado para o seqüenciamento, foram escolhidas as regiões mais conservadas, cujos aminoácidos fossem codificados por poucos codons, para o desenho dos oligos degenerados a serem utilizados, 5TimDeg3 e 3TimDeg3 (Gentile et al., 2006).

Com esses oligos foram realizadas reações de PCR utilizando DNA genômico de *An. darlingi* (cedido por Carla Gentile). O produto foi, então, clonado e cerca de 12 clones foram seqüenciados. A próxima etapa foi comparar as seqüências obtidas com um banco de dados de seqüências protéicas do BlastX - NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e confirmar a similaridade dessas seqüências com o gene *timeless* de *D. melanogaster* e *An. gambiae*. A figura 4.1 mostra um dos resultados obtidos da comparação entre a seqüência de aminoácidos traduzida de um dos fragmentos de *An. darlingi* e a proteína do gene *timeless* de *D. melanogaster*. Os valores de identidade e similaridade, também computados por esse programa, são de 72 % (67/93) e 80,6 % (75/93), respectivamente.

```

gi|45550927|ref|NP_722914.3|timeless CG3234-PB, isoform B [Drosophila melanogaster]
gi|45444944|gb|AAF51098.4|CG3234-PB, isoform B [Drosophila melanogaster]
Length=1398

Score = 80.9 bits (198), Expect = 1e-13
Identities = 37/46 (80%), Positives = 42/46 (91%), Gaps = 0/46 (0%)
Frame = -2

Query   543  INMKGLMHVPTDDDISHILKEFTVDFLLKGYGYLVQELHTQLLSD  406
          INMKGL+ H PTDDDIS++LKEFTVDFLLKGY YLV+ELH QLLS+
Sbjct   566  INMKGLVQHTPTDDDISNLLKEFTVDFLLKGYSYLVHEELHMQLLSN  611

Score = 52.0 bits (123), Expect = 6e-05
Identities = 30/47 (63%), Positives = 33/47 (70%), Gaps = 5/47 (10%)
Frame = -1

Query   823  TQVE-KESISTSSNEDDTPQQKPVHQKPPSNQKQRFNAANKQRNPVS  686
          TQVE +ESISTSSN+DD PQ KP HQKPP N K R      NK R +S
Sbjct   503  TQVENQESISTSSNDDGPQGKPQHQKPPCNTKPR---NKPRTIMS  545

```

Figura 4.1: Alinhamento do fragmento traduzido do gene *timeless* de *An. darlingi* demonstrando a homologia com o mesmo fragmento de *D. melanogaster*, realizado através do programa BlastX.

Após confirmada a homologia com o gene *timeless* de *Drosophila*, foi criada uma seqüência consenso através do alinhamento dos fragmentos de *An. darlingi* obtidos e, a partir dessa, tornou-se possível a confecção de oligos específicos. Dessa forma, contendo as seqüências dos fragmentos 2 e 3, foi desenhado um par de oligos específicos (5darltim2a e 3darlim3) que unia os dois fragmentos (Figura 4.2).

Todas as reações de PCR posteriores, tanto para as populações estudadas de *An. darlingi* quanto para *An. marajoara*, foram realizadas utilizando esse par de oligos específicos, o qual originou fragmentos de 735 pares de base para a primeira espécie e 752 pb para a segunda espécie. Para maiores detalhes a respeito das reações de PCR e das seqüências dos oligos, ver Material e Métodos.

(GAACGCAGGTCGAGAAGGAATC) 5'darlim2a→

GGAAAt TcGATTGAcT GcGGgTAcG GaACg CAGGTGAGAAGGAATC CATTTCGaCCTCGA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CCTTaAgCTAACTgACgCCcATgCCtTGcGTCCAGCTTCCTTAGGTAAAGCtGGAGCT

a G I R L T A G T E R R S R R N P F R P R -
 b E F D * L R V R N A G R E G I H F D L E -
 c N S I D C G Y G T Q V E K E S I S T S S -
 5'TimDeg2 (DCGYGTQ) →

GTAACGAGGAcGACACACCTCAGCAGAAGGCCAGTGCACCAGAACGCCACCGTCAAATCAA
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 CATTGCTCCTgCTGTGTGGAGTCGCTTCGGTCACGTTGGCTTCGGTGGCAGTTAGTT

a V T R T T H L S R S Q C T R S H R Q I K -
 b * R G R H T S A E A S A P E A T V K S K -
 c N E D D T P Q Q K P V H Q K P P S N Q K -

AGCACACGCTtAACGCCGCCAACAGCAACGTAATCCTGTTCCGTGCAAGAGAAGAAGG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 TCGTTGCGAaaTTGCGGGGTTGTCGTTGCATTAGGACAAAGGCACGTTCTTCTTCC

a S N A L T P P T S N V I L F P C K R R R -
 b A T L * R R Q Q A T * S C F R A R E E G -
 c Q R F N A A N K Q R N P V S V Q E K K E -

AACTTCGGCGCAAGAAGCTGGTAAAGCgTGGCAAGAGCAATATCTGTTCTTATT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 TTGAAGCCGCGTTCTCGACCATTGcACCGTCTCGTTACAATCATaTAGGAATAA

a N F G A R S W * S V A R A I C * Y I L I -
 b T S A Q E A G K A W Q E Q Y V S I S L F -
 c L R R K K L V K R G K S N M L V Y P Y S -

CTGTGACAATGGCGTGGACGCTCATCTTAATCATCATCTCACACTGTTTCACGCGT
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 GACACTGTTACCGCACCTGCGAGTAGAATTAGTAGTAGAGTAGTGTGACAAAAGTGC

a L * Q W R G R S S * S S S H H T V F T R -
 b C D N G V D A H L N H H L I T L F S R V -
 c V T M A W T L I L I I I S S H C F H A * -

AAC GAATCAACATGAAGGGTTAATGCATCATGTACCGACCGACGACATCTCGCAC
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 TTGTCTTAGTTGACTTCCCAAATTACGTAGTACATGGCTGGCTGCTGTAGAGCGTG

a N R I N M K G L M H H V P T D D D I S H -
 b T E S T * R V * C I M Y R P T T T S R T -
 c Q N Q H E G F N A S C T D R R R H L A H -

ATACTCAAGGAGTTCACGGTcGACTTCTGTTaAAGGCTACGGATATCTAGTCAGGAG
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 TATGAGTTCTCAAGTGCCAgCTGAAAGACGAATTCCGATGCCATAGATCACGTCTC

a I L K E F T V D F L L K G Y G Y L V Q E -
 b Y S R S S R S T F C L K A T D I * C R S -
 c T Q G V H G R L S A * R L R I S S A G A -
 ← 3'TimDeg2 & 5'TimDeg3 →

CTGCACACACAGCTTATCGGACCTG GTGAGTACActTGAGCGGAAGCGGTAGCAACTAA
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 GACGTGTGTCGACAATAGCCTGGACCACTCATGTgACTCGCCTCGCCATCGTTGATT

a L H T Q L L S D L V S T L S G S G S N * -
 b C T H S C Y R T W * V H * A E A V A T N -
 c A H T A V I G P G E Y T E R K R * Q L I -

TTGCGGAACTTTCCGTATCGCATGTCATGTTCTATCAGaATTCAAGCAATGCACT
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
 AACGCCTGAAAAGGCATAGCGTACAGTACAAAGCAAGATAgtTAAGTCGTTACGTGA

a L R N F S V S H V M F R S I R I Q Q C T -
 b C G T F P Y R M S C F V L S E F S N A L -
 c A E L F R I A C H V S F Y Q N S A M H S -

intron = 82 pb

intron = 334 pb

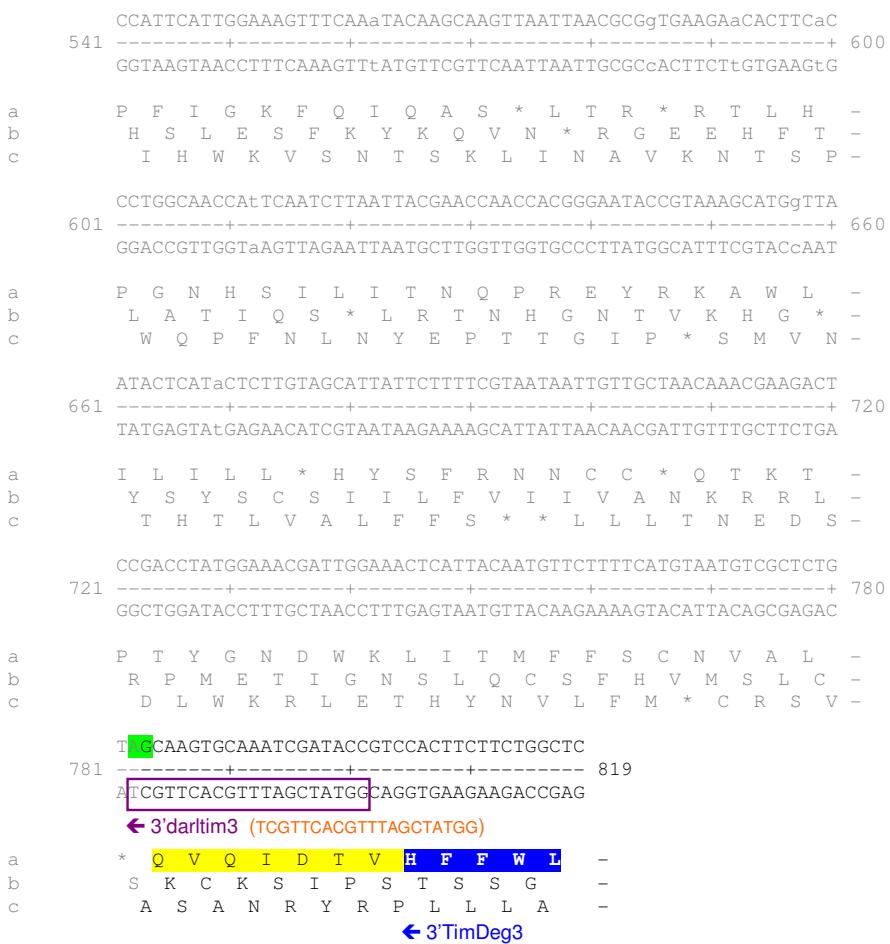


Figura 4.2: Mapa da seqüência do fragmento de interesse do gene *timeless* de *Anopheles darlingi*. As regiões referentes ao exons contêm a seqüência de proteína codificada, marcada em amarelo, logo abaixo. As cerca de 350 primeiras bases correspondem ao fragmento previamente obtido (Gentile & Peixoto, dados não publicados) e incluem 82 bases de seqüência intrônica, marcada em cinza claro. As restantes foram obtidas na presente dissertação. As seqüências “GT” e “AG” marcadas em verde indicam início e final, respectivamente, de cada um dos dois introns. As setas indicam a posição aproximada dos oligonucleotídeos utilizados. Marcados em azul, encontram-se as regiões dos oligos degenerados e envolvidos por um retângulo roxo estão os oligos específicos, com suas seqüências reescritas, em vermelho, entre parênteses.

4.2. Genética de populações de *An. darlingi*, utilizando o gene *timeless* como marcador molecular:

Neste trabalho, para a espécie *An. darlingi*, foram analisadas populações das localidades de Portuchuelo (Rondônia) e Macapá (Amapá).

A população de Portuchuelo foi coletada em intervalos de uma hora, que começavam às 18:00 h e acabavam às 6:00 h, tanto no intra como no peridomicílio. Dessa forma, foi possível avaliar se havia diferenciação entre os indivíduos de acordo com o horário e o local de coleta. Na tabela 4.1 encontram-se os horários e local de coleta de cada indivíduo analisado nessa dissertação.

Tabela 4.1: Horário e local (intra ou peridomicílio) onde cada indivíduo estudado da população de Portuchuelo foi coletado. Para os horários marcados com um X não foram obtidas amostras.

horário/local de coleta	intradomicílio	peridomicílio
18:00-19:00	# 1, 4, 10	# 21, 39
19:00 - 20:00	# 12, 30	# 3, 28
20:00 - 21:00	# 2, 20	# 11, 19, 37
21:00 - 22:00	X	X
22:00 - 23:00	# 14, 23, 32	# 16, 41, 42
23:00 - 0:00	# 13, 22, 31, 40	
0:00 - 1:00	# 24, 33	# 6
1:00 - 2:00	X	X
2:00 - 3:00	X	X
3:00 - 4:00	# 25, 34, 43	# 36
4:00 - 5:00	# 8, 17, 35	# 45
5:00 - 6:00	# 9, 26, 44	# 18, 27

Foram processados 40 indivíduos no total, sendo 25 do intra e 15 do peridomicílio. Para essa população foram obtidas 173 seqüências, das quais foi possível gerar 71 seqüências consenso (representando um ou dois alelos de cada indivíduo), 44 do intra e 27 do peridomicílio. O alinhamento dessas seqüências encontra-se nos anexos I e III. Nessa população, nenhum indivíduo foi considerado homozigoto. O critério utilizado nas análises para que um indivíduo fosse tratado como homozigoto foi de que todas as suas seqüências obtidas fossem iguais (excluindo-se singletons), porém essas deveriam estar em quantidade igual ou superior a 8. O fragmento analisado tem 735 pares de bases e apresenta 2 introns, o primeiro com 82 pb e o segundo, 334 pb. Foram observados 20 sítios polimórficos, em sua maioria ocorrendo nos introns, e daqueles encontrados nos exons somente 1, no segundo exon, representava uma substituição não-sinônima de I por L, na posição 306 ($a \rightarrow c$), apenas no haplótipo referente a um dos alelos do indivíduo 42 (DP42eR7D05). Vale ressaltar que esse alelo foi representado por somente duas seqüências. Sendo assim, existe a possibilidade, ainda que pequena, dessa mudança de aminoácido ter sido causada por erro de PCR.

A população de Macapá possui 15 indivíduos e, na tentativa de conseguir os dois alelos de cada um, foram obtidas 132 seqüências ao todo, e geradas 29 seqüências consenso, com dois indivíduos sendo considerados homozigotos. Nessa população, o fragmento apresenta os mesmos padrões citados acima (735 pb, no total, e mesmo tamanho de introns) e possui 7 sítios polimórficos, com 4 desses ocorrendo nos introns e 3 nos exons. Daqueles encontrados nos exons, nenhum modifica o aminoácido.

Na tabela 4.2, pode-se observar o número de seqüências analisadas em cada população (n), número de sítios segregantes (S), número total de mutações (Eta) e número de haplótipos em cada população (h), tanto da população de Portuchuelo, considerada como um todo e também subdividida em intra e peridomicílio, quanto da população de Macapá. De todas as amostras analisadas, as de Macapá foram as mais homogêneas, apresentando a menor quantidade de polimorfismos, e aquela coletada no intradomicílio de Portuchuelo a mais variável, com a maior quantidade de sítios polimórficos.

Tabela 4.2: Polimorfismos observados no fragmento do gene *timeless* de populações de Portuchuelo (intra e peridomicílio) e de Macapá de *An. darlingi*.

População	n	S	Eta	h
Portuchuelo	71	20	20	17
Portuchuelo intradomicílio	44	16	16	13
Portuchuelo peridomicílio	27	14	14	10
Macapá	29	7	7	8

n, número de seqüências consenso de DNA de cada população; **S**, número de sítios segregantes; **Eta**, número total de mutações; **h**, número de haplótipos de cada população.

Os valores de diversidade nucleotídica foram medidos por π (baseado no número médio de diferenças par-a-par entre as seqüências) e θ (ou parâmetro neutro, calculado com base no número de sítios polimórficos) e são mostrados na tabela 4.3.

Dessa forma, mais uma vez, observamos que a população de Macapá mostrou-se menos polimórfica quando comparada à população de Portuchuelo, com $\pi = 0,00343$ e $\theta = 0,00242$. Através dessa tabela, pode-se também observar os valores do teste D de Tajima, D_T (1989), que testa as diferenças entre π e θ , indicando se há ou não desvios significativos ao modelo neutro de evolução. Em nenhuma das populações estudadas de *An. darlingi* esse teste apresentou valores significativos, com um $P > 0,10$.

Tabela 4.3: Polimorfismos observados no fragmento do gene *timeless* de populações de Portuchuelo (intra e peridomicílio) e de Macapá de *An. darlingi*.

População	π	θ	D_T
Portuchuelo	0,00388	0,00562	-0,9406
Portuchuelo intradomicílio	0,00375	0,00500	-0,7905
Portuchuelo peridomicílio	0,00389	0,00494	-0,7251
Macapá	0,00343	0,00242	1,2445

π , diversidade nucleotídica; θ , parâmetro neutro baseado no número de sítios segregantes; D_T , teste D de Tajima, que em nenhuma das amostras apresentou valor significativo ($P > 0,10$), não indicando desvios ao modelo neutro.

Na tabela 4.4, estão indicados os valores de F_{ST} (índice de fixação par-a-par) e Nm (número de migrantes), ambos indicando a divergência genética entre duas populações, calculados entre as populações de Portuchuelo e Macapá, comparando, também, as amostras coletadas no intra e no peridomicílio, em Portuchuelo. Como os mosquitos de Portuchuelo foram coletados em diferentes horários, inicialmente foram calculados os valores de F_{ST} entre os grupos de indivíduos coletados em cada horário, ou agrupando as coletas feitas de 18:00 a 21:00, 22:00 a 01:00 e 03:00 a 06:00, mas em nenhum desses casos foram observados valores significativamente diferentes de zero (dados não mostrados).

De acordo com a classificação de Wright (citado em Hartl, 2000), valores de F_{ST} variando de 0 até 0,05 indicariam uma diferenciação genética pequena; entre 0,05 até 0,15 indicariam diferenciação genética moderada; de 0,15 até 0,25 representariam uma grande diferenciação genética e valores superiores a 0,25 corresponderiam a uma diferenciação genética muito grande. Os valores de F_{ST} obtidos foram, em geral, moderados e significativamente diferentes de zero em todas as comparações. As maiores estimativas de F_{ST} observadas foram entre os indivíduos coletados no intradomicílio de Portuchuelo e Macapá ($F_{ST} = 0,1011$, $P = 0,001$), onde naturalmente se obteve também o menor número estimado de migrantes ($Nm = 2,22$) e entre os indivíduos de Portuchuelo (quando analisados em geral) e Macapá ($F_{ST} = 0,0808$; $P = 0$; $Nm = 2,8430$). Já a menor diferenciação genética foi observada entre os indivíduos coletados no intra e peridomicílio de Portuchuelo, onde o F_{ST} foi baixo, porém significativo ($F_{ST} = 0,0397$; $P=0,031$), principalmente quando comparado à diferenciação entre Portuchuelo e Macapá.

Tabela 4.4: Valores das estimativas de F_{ST} , Dxy, Da e Nm entre as populações de *An. darlingi*.

Populações	F_{ST}	P (F_{ST})	Nm	Dxy	Da
Port. intra X Port. peri	0,0397	0,031	6,0400	0,0040	0,0002
Portuchuelo X Macapá	0,0808	0	2,8430	0,0040	0,0003
Portuchuelo intra X Macapá	0,1011	0,001	2,2200	0,0040	0,0004
Portuchuelo peri X Macapá	0,0725	0,005	3,1997	0,0039	0,0003

F_{ST}, índice de fixação par-a-par (A significância dos valores de F_{ST} foi testada com 1000 permutações); **Nm**, número de migrantes por geração; **Dxy**, divergência bruta (número médio de substituições nucleotídicas por sítio entre as populações); **Da**, divergência líquida (número de substituições nucleotídicas líquida por sítio entre as populações).

Ainda na tabela 4.4, podem ser observados também os valores de Dxy e Da. O primeiro, também chamado divergência bruta, indica a divergência entre seqüências de duas populações comparadas baseada no número de diferenças par-a-par. Porém, nessa medida, está inclusa também a variabilidade intra-populacional, ao contrário da segunda medida, Da ou divergência líquida, a qual mede apenas a divergência entre as populações (Nei & Kumar, 2000). Observa-se, então, que o maior valor de Da foi encontrado entre indivíduos do intradomicílio de Portuchuelo e Macapá ($Da = 0,0004$), o que confirma a maior diferenciação, também indicada pelos valores de F_{ST} e Nm, para essas populações.

A tabela 4.5 indica o número de polimorfismos compartilhados (Ss) e diferenças fixas (Sf) entre as populações de *An. darlingi*, além dos polimorfismos exclusivos a cada uma das populações analisadas. Não foi encontrada nenhuma diferença fixa entre as amostras.

Tabela 4.5: Distribuição das categorias de sítios polimórficos.

Populações x / y	Ss	Sf	Sx	Sy
Portuchuelo peri X Portuchuelo intra	10	0	4	6
Portuchuelo X Macapá	3	0	17	4
Portuchuelo intra X Macapá	3	0	13	4
Portuchuelo peri X Macapá	3	0	11	4

Ss, número de polimorfismos compartilhados entre as populações; Sf, número de diferenças fixas entre as populações; Sx e Sy, número de sítios polimórficos exclusivos da população "x" e "y", respectivamente.

A figura 4.3 mostra uma árvore construída através do programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004) relacionando as seqüências consenso das populações de Portuchuelo (intra e peridomicílio) e Macapá da espécie *An. darlingi*. A construção dessa árvore foi feita utilizando a distância p, a qual mede a proporção de diferenças por sítio em relação ao total de sítios analisados comparando as seqüências par-a-par, e o método de Evolução Mínima (nesse, para cada árvore possível ou examinada, a soma S de todos os comprimentos de braços é estimada e aquela que apresentar o menor valor de S é selecionada como melhor árvore). Nessa árvore, podemos notar um agrupamento de seqüências referentes aos indivíduos do intradomicílio de Portuchuelo, ilustrando o F_{ST} significativo encontrado entre essa população e a do peridomicílio. Observamos, também, alguns grupos contendo somente seqüências de Macapá confirmado a diferenciação encontrada entre essas duas populações.

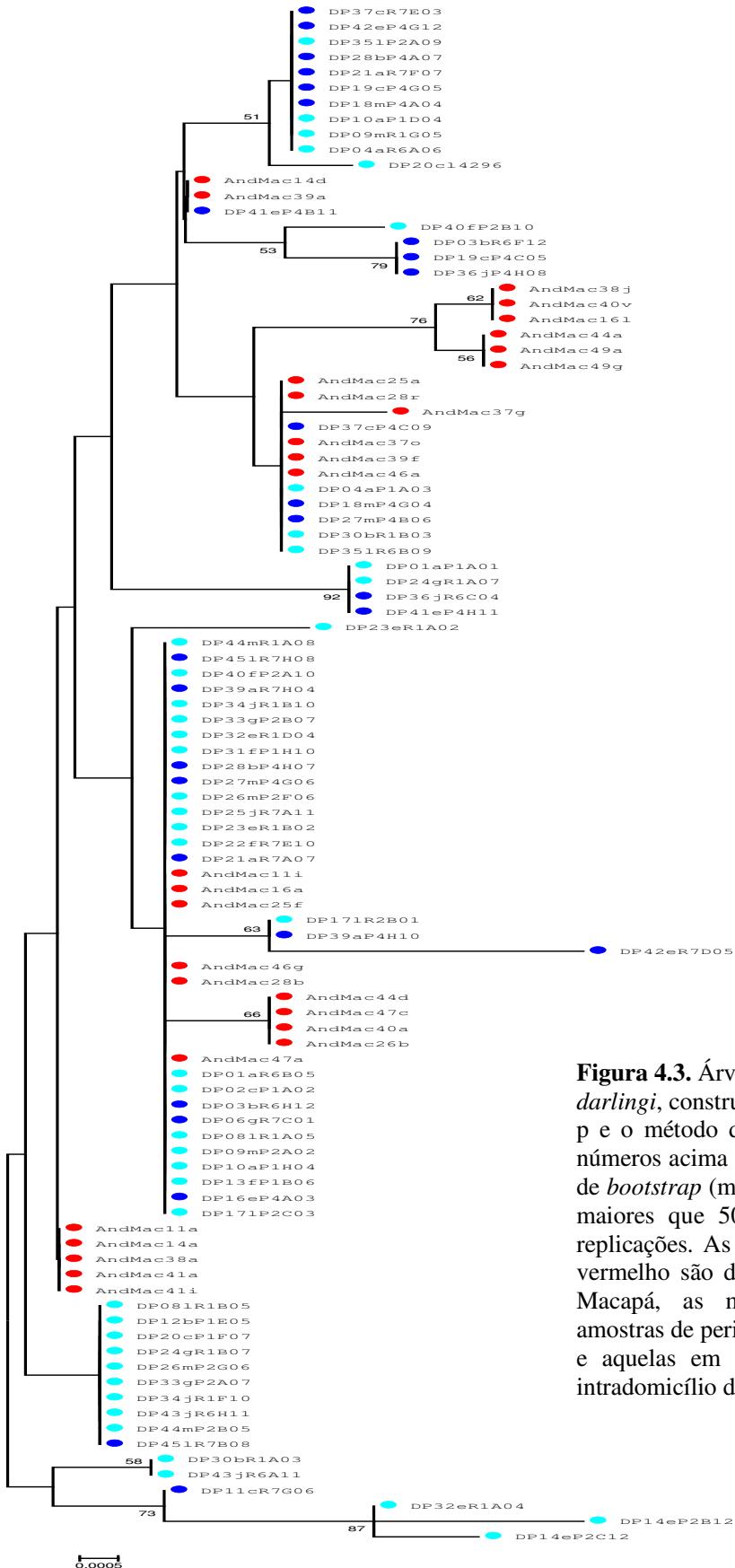


Figura 4.3. Árvore das seqüências de *An. darlingi*, construída utilizando a distância p e o método de Evolução Mínima. Os números acima dos braços são os valores de bootstrap (mostrados somente aqueles maiores que 50%), baseados em 1000 replicações. As seqüências marcadas em vermelho são de amostras coletadas em Macapá, as marcadas em azul são amostras de peridomicílio de Portuchuelo e aquelas em azul mais claro são do intradomicílio de Portuchuelo.

4.3. Análise de polimorfismos em *Anopheles marajoara* e da divergência genética entre as espécies estudadas.

Para os 16 indivíduos utilizados da espécie *An. marajoara*, o fragmento do gene *timeless* estudado apresentava 752 pares de bases e dois introns, o primeiro com 89 pb e o segundo, 344 pb. Foram obtidas e analisadas 183 seqüências ao todo e, a partir dessas, foram geradas 32 seqüências consenso, representando um ou dois alelos de cada indivíduo. O alinhamento dessas seqüências encontra-se no anexo II.

Ao comparar as seqüências de *An. darlingi* e *An. marajoara* (alinhamento mostrado no anexo III), observam-se alguns *indels* (inserções/deleções) nas regiões dos introns, o que explica a diferença de tamanho do fragmento encontrada entre as espécies. Na tabela 4.6, encontram-se o número total de seqüências, de sítios polimórficos, número total de mutações e de haplótipos dos indivíduos de *An. marajoara* e *An. darlingi* analisados como um todo, ou seja, sem separar suas populações, para que comparações pudessem ser feitas entre as duas espécies. Para isso, foi utilizado o alinhamento mostrado no anexo III.

Tabela 4.6: Polimorfismos encontrados nas seqüências de *An. darlingi* e *An. marajoara*.

Espécies	n	S	Eta	h
<i>An. darlingi</i>	100	21	21	18
<i>An. marajoara</i>	32	12	12	10

n, número de seqüências consenso de DNA de cada população; **S**, número de sítios segregantes; **Eta**, número total de mutações; **h**, número de haplótipos de cada população.

O mesmo foi feito na tabela 4.7, onde foram estimados os valores de diversidade nucleotídica (π e θ) e o teste D de Tajima, o qual não foi significativo para nenhuma das duas espécies. Assim, podemos observar que *An. marajoara* é menos variável que *An. darlingi*, quando observado com suas populações agrupadas.

Tabela 4.7: Polimorfismos encontrados nas seqüências de *An. darlingi* e *An. marajoara*.

Populações	π	θ	D_T
<i>An. darlingi</i>	0,00390	0,00570	-1,3307
<i>An. marajoara</i>	0,00331	0,00421	-0,6947

π , diversidade nucleotídica; θ , parâmetro neutro baseado no número de sítios segregantes; D_T , teste D de Tajima, que em nenhuma das populações apresentou valor significativo ($P>0,10$), não indicando desvios ao modelo neutro.

Foram calculados entre essas duas espécies os valores de F_{ST} , número de migrantes (Nm), Dxy e Da, além dos polimorfismos compartilhados entre elas (Ss), diferenças fixas (Sf), sítios exclusivos de *An. darlingi* (Sx) e sítios exclusivos de *An. marajoara* (Sy) (Tabelas 4.8 e 4.9).

Tabela 4.8: Valores das estimativas de F_{ST} , Nm, Dxy e Da entre as populações de *An. darlingi* e *An. marajoara*.

Populações	F_{ST}	P (F_{ST})	Nm	Dxy	Da
<i>An. darlingi X An. marajoara</i>	0,9746	<0,001	0,0065	0,1280	0,1247

F_{ST} , índice de fixação par-a-par (A significância dos valores de F_{ST} foi testada com 1000 permutações); Nm, número de migrantes por geração; Dxy, divergência bruta; Da, divergência líquida.

Tabela 4.9: Distribuição das categorias de sítios polimórficos.

Populações x / y	Ss	Sf	Sx	Sy
<i>An. darlingi</i> X <i>An. marajoara</i>	0	81	21	12

Ss, número de polimorfismos compartilhados entre as populações; **Sf**, número de diferenças fixas entre as populações; **Sx e Sy**, número de sítios polimórficos exclusivos da população "x" (*An. darlingi*) e "y" (*An. marajoara*), respectivamente.

Através do alto valor de F_{ST} obtido, próximo a 1, e do baixo valor de número de migrantes ($Nm = 0,0065$), pode-se afirmar que *An. darlingi* e *An. marajoara* são duas espécies bastante diferenciadas, mesmo pertencendo ao mesmo subgênero, *Nyssorhynchus*.

Finalmente, comparamos as seqüências obtidas de *An. marajoara* com uma seqüência de *An. albitarsis s.s.* (Gentile & Peixoto, comunicação pessoal) para analisar o grau de divergência encontrado entre essas duas espécies pertencentes ao complexo Albitarsis. O valor encontrado de F_{ST} foi de 0,9507*, o número de migrantes foi igual a 0,0130 e Dxy de 0,0344. Comparando o F_{ST} resultante entre *An. albitarsis s.s.* e *An. marajoara* com aquele estimado entre as populações de Portuchuelo e Macapá da espécie *An. darlingi*, pode-se afirmar que a diferenciação encontrada entre as populações de *An. darlingi*, pelo menos no gene *timeless*, são muito menores que aquela encontrada entre as duas espécies do complexo Albitarsis. Embora o fato de ter sido usada apenas uma seqüência de *An. albitarsis s.s.* poder “inflar” o valor de Fst, este efeito não é necessariamente observado no valor de Dxy que é quase 10 vezes maior entre *An. albitarsis s.s.* e *An. marajoara* que entre as duas populações de *An. darlingi* (0,0344 x 0,0039).

Essa diferenciação, que se mostrou maior entre as espécies *An. albitarsis s.s.* e *An. marajoara* que entre as populações de *An. darlingi*, se torna evidente na árvore mostrada na figura 4.4. Essa árvore foi construída excluindo todas as regiões de “gaps” das seqüências analisadas, utilizando a distância p e o método de Evolução Mínima. Nela estão relacionadas todas as populações utilizadas nessa dissertação (ou seja, seqüências de Portuchuelo e Macapá da espécie *An. darlingi*, seqüências de *An. marajoara* e uma seqüência de *An. albitarsis s.s.*) e, para tal, foi utilizado o alinhamento mostrado no Anexo III. Os valores de *bootstrap* (o qual analisa estatisticamente, através de reamostragens, a confiabilidade dos agrupamentos) abaixo

* Embora este valor de F_{ST} não seja significativo quando calculado utilizando as seqüências obtidas no alinhamento do anexo III, ele é significativo ao ser calculado utilizando um alinhamento semelhante ao do anexo II, porém incluindo a seqüência de *An. albitarsis s.s.*. Essa diferença deve-se, provavelmente, ao fato de sítios informativos de *An. marajoara* e *An. albitarsis s.s.* serem perdidos na análise feita a partir do alinhamento III por estarem em região de gap.

de 50% foram omitidos, sendo mostrados somente aqueles superiores a esse valor. Através dessa árvore, podemos comprovar o que foi dito anteriormente que, comparando as populações de Portuchuelo e Macapá, observa-se uma distância muito menor que aquela observada em comparações entre *An. marajoara* e *An. albitarsis s.s.*

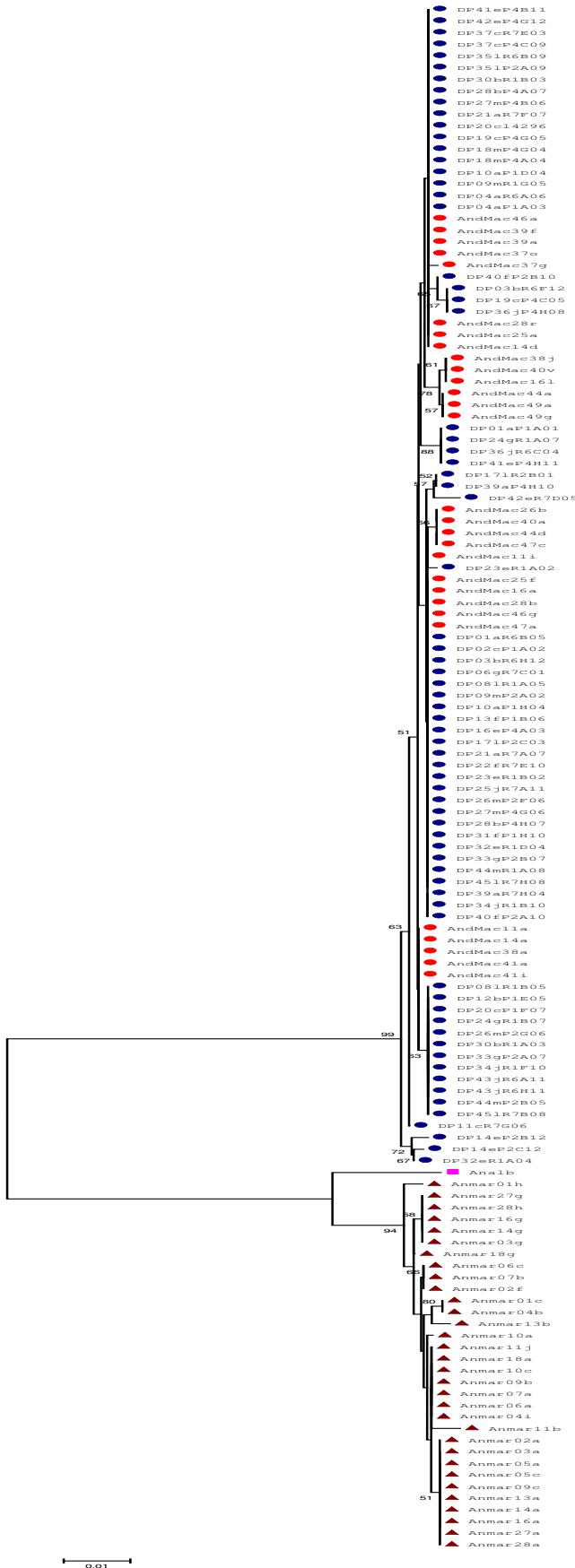


Figura 4.4. Árvore das seqüências de *An. albitalis* s.s., *An. marajoara* e *An. darlingi* construída utilizando a distância p e o método de Evolução Mínima. Os números acima dos braços são os valores de bootstrap (mostrados somente aqueles maiores que 50%), baseados em 1000 replicações. As seqüências marcadas em círculo vermelho correspondem aos indivíduos da espécie *An. darlingi* coletados em Macapá; aquelas em círculo azul referem-se aos indivíduos de *An. darlingi* coletados em Portuchuelo; em quadrado rosa está representada a seqüência de *An. albitalis* e, em triângulo marrom, aquelas referentes à *An. marajoara*.

5. DISCUSSÃO

Anopheles darlingi é o vetor da malária mais importante no interior do Brasil (Deane, 1988) e vários fatores contribuem para sua eficiência vetorial, entre eles ampla distribuição geográfica (Forattini, 2002), freqüente susceptibilidade a infecção por esporozoítas em suas glândulas salivares (Deane, 1989; Tadei et al., 1998), antropofilia (e.g. Deane, 1989; Rosa-Freitas et al., 1998) e plasticidade comportamental (Voorham, 2002), a qual aumenta seu potencial vetorial sob diferentes condições impostas pelo habitat.

Confirmando o que foi dito na introdução, é comum detectar complexos de espécies crípticas em mosquitos pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus* (Rosa-Freitas et al., 1998; Voorham, 2002) e, em alguns casos, esses complexos talvez sejam resultantes de processos de especiação incipientes influenciados pelo homem (Coluzzi et al., 1979).

Dessa forma, torna-se importante conhecer a estrutura genética populacional desse vetor para compreender a dinâmica da transmissão da malária e criar medidas que a controlem em localidades ainda endêmicas, como a Amazônia brasileira (Tadei & Thatcher, 2000). Della Torre et al. (2002), ao se referirem ao complexo *Gambiae*, classificaram o conhecimento dessa estrutura populacional como um “pré-requisito para determinar quais unidades genéticas do complexo são vetoras da malária e revelar as diferenças ecológicas e etiológicas que são relevantes para a transmissão da doença”. Assim, o planejamento das medidas de controle seria feito baseando-se em características e hábitos conhecidos dos verdadeiros vetores e agiriam com maior sucesso sobre eles. Com esse objetivo, estão sendo realizados diversos estudos, tanto comportamentais quanto moleculares, que tentam elucidar a questão do *status taxonômico* de *An. darlingi*.

Nesse trabalho, analisou-se, em nível molecular através do gene *timeless*, a diferenciação entre populações de *An. darlingi* em diferentes aspectos. Como já citado anteriormente, essa espécie apresenta variação comportamental relacionada aos diversos locais em que se distribui e um importante exemplo dessa variação é a preferência pelo local e horário onde será realizado o repasto sangüíneo (Charlwood & Hayes 1978; Deane 1989; Charlwood 1996; Tadei et al. 1998; Tadei et al. 2000). Uma das amostras pertencentes a essa espécie, a população de Portuchuelo, foi coletada separadamente de acordo com seus horários e locais de coleta (intra e peridomicílio) e, com essas informações foi possível fazer, nessa população, uma análise microgeográfica e temporal da variação genética encontrada entre os diferentes indivíduos dessa amostra. Usando *timeless*, um gene de relógio associado à atividade de insetos, foi possível analisar, dentro da população de Portuchuelo, a

diferenciação observada entre os indivíduos coletados em diferentes horários e aquela observada entre indivíduos coletados no intra e peridomicílio.

Um dos primeiros trabalhos relacionando ciclo de picada e distribuição geográfica nessa espécie foi realizado por Charlwood & Hayes (1978) no qual foi demonstrada a existência de uma variação no ciclo de picada de acordo com os locais analisados. Assim, em cada local observava-se a predominância de mosquitos em um determinado horário, que foi diferente para todas as localidades estudadas. Contudo, ao analisarmos e compararmos, molecularmente, os indivíduos coletados em diferentes horários para um estudo temporal, nossos resultados não indicaram nenhuma diferenciação genética significativa entre eles. Porém, é importante ressaltar que as amostras de cada horário eram muito pequenas.

Posteriormente, seguimos para uma análise microgeográfica para avaliarmos se era encontrada alguma diferenciação entre as amostras do intra e do peridomicílio. Observamos uma diferenciação genética baixa ($F_{ST} = 0,0397$), porém significativa, entre elas, o que nos dá margem a pensar em duas possíveis hipóteses. A primeira sugere que o gene *timeless* está associado a uma inversão cromossômica, o que é comum em *An. darlingi* (Tadei et al., 1982), ou está muito próximo a um outro gene que controla a preferência por determinado habitat (intra ou peridomicílio), e, por efeito carona (Barton, 2000), estaria sendo “carregado” juntamente com esse gene ou inversão. A influência de inversões cromossômicas na escolha por determinado habitat é muito bem fundamentada em estudos realizados com o complexo *Gambiae*, composto por sete espécies críticas. Coluzzi et al. (1979) demonstraram diferenças cromossômicas significativas entre as amostras de mosquitos, principalmente entre aqueles coletados dentro das casas e aqueles fora delas, reforçando seu papel na escolha do local onde será realizado o repasto sanguíneo. Um exemplo é *An. gambiae* s.s., uma das espécies do complexo *Gambiae* e principal vetor da malária na África, onde os arranjos cromossômicos mais freqüentes em coletas feitas dentro das casas eram aqueles favorecidos pelos ambientes mais secos, enquanto aqueles encontrados fora das casas eram favorecidos por locais mais úmidos. Assim, em populações com polimorfismos cromossômicos, aqueles indivíduos que carregam arranjos alternativos teriam diferentes probabilidades de entrar em contato com o ambiente doméstico (Coluzzi et al., 1979), embasando a hipótese citada acima.

Uma segunda possível hipótese é de que a diferenciação entre essas duas amostras refletiria a ocorrência, em simpatria, de duas espécies incipientes, uma mais freqüente no intra e outra mais freqüente no peridomicílio, o que explicaria o baixo F_{ST} encontrado nessa comparação. Processos de especiação incipiente em anofelinos são evidenciados, já há alguns anos, em *An. gambiae* s.s. (e.g. Bryan et al., 1982; Coluzzi et al., 1985). Essa espécie, distribuída desde o sul do Deserto do Sahara até o norte da África do Sul, apresenta extrema

heterogeneidade genética, caracterizada tanto por inversões cromossômicas quanto por marcadores moleculares (e.g. Coluzzi et al., 1979; Carnahan et al., 2002; Gentile et al., 2002). Através desses últimos, tornou-se possível a caracterização de duas formas moleculares simpátricas dessa espécie, M e S, as quais em alguns locais da África (como Mali, por exemplo) correspondem às formas cromossômicas Mopti e Savanna, respectivamente, porém essa correspondência entre as formas nem sempre acontece. Diferenças ecoetológicas foram observadas naqueles locais onde as formas cromossômicas Mopti e Savanna correspondem às moleculares M e S, respectivamente, e demonstraram que a forma M está mais associada ao ambiente doméstico que a forma S, comprovando a relação entre os polimorfismos cromossômicos e a distribuição microgeográfica dessas diferentes formas (della Torre et al., 2002).

Em cruzamentos realizados entre M e S, a progênie apresenta-se fértil, contudo é raro encontrar híbridos resultantes dessas duas formas na natureza. A ausência de híbridos aliada à baixa taxa de inseminação encontrada entre as formas (cerca de 1%), mesmo quando juntas no espaço e no tempo, indicam um isolamento pré-copulatório confirmado a existência de barreiras ao fluxo gênico entre M e S e sugerindo passos iniciais de um processo de especiação com persistência de variação compartilhada devido a um ancestral comum muito recente e baixos níveis de fluxo gênico homogeneizando regiões do genoma que não estariam envolvidas no processo (della Torre et al., 2002; Tripet et al., 2005). De acordo com os marcadores utilizados, encontram-se variações quanto à diferenciação molecular entre as formas o que, segundo Gentile et al. (2002), que analisaram a região ITS de DNA ribossomal encontrando duas variantes, tipos I e II (referentes às formas S e M, respectivamente), seria explicado pela existência, no genoma, de partes completamente diferenciadas as quais impediriam o fluxo gênico e partes livres ao fluxo entre os tipos. Isso esclareceria o contraste encontrado entre os resultados aplicando diferentes marcadores.

Uma segunda abordagem envolvendo a espécie *An. darlingi* nesse trabalho foi a de uma análise macrogeográfica, onde foram comparadas as populações de Portchuelo e de Macapá. Essa última demonstrou-se uma população mais homogênea que a de Portchuelo, com praticamente metade dos polimorfismos encontrados na primeira. Entre as amostras dessas localidades, foi encontrada uma diferenciação considerada moderada ($F_{ST} = 0,0808$) e significativa que, quando comparada com o resultado obtido na análise microgeográfica a torna ainda mais significativa. O valor resultante de uma comparação entre amostras coletadas no mesmo local (Portchuelo) é, aproximadamente, a metade daquele encontrado entre populações coletadas em localidades de dois diferentes estados (Rondônia e Amapá) e distantes em mais de 1500 Km, o que deixa a diferenciação intra/peri ainda mais interessante.

Ao analisar as diferenciações encontradas entre a população de Macapá e aquelas do intra e peridomicílios de Portuchuelo, observamos um valor de F_{ST} menor entre Macapá e peridomicílio ($F_{ST} = 0,0725$) quando comparado com Macapá e intradomicílio ($F_{ST} = 0,1011$). Uma maneira de explicar essa diferença (assumindo que ela seja significativa, o que não foi testado) é considerar a população de Macapá uma população homogênea e trabalhar com a hipótese de que intra e peri seriam formadas pela mistura de duas espécies incipientes. Dessa forma, possivelmente os indivíduos de Macapá seriam a mesma espécie que hipoteticamente apresenta maior freqüência no peridomicílio de Portuchuelo.

Os valores de F_{ST} encontrados em todas as comparações feitas, nessa dissertação, entre as amostras de *An. darlingi* são bastante baixos quando comparados àqueles encontrados em um estudo utilizando o gene COI entre amostras de diversas localidades das América Central e do Sul, as quais foram nitidamente separadas em dois *clusters*, cada um correspondendo às populações de cada uma das Américas (Mirabello & Conn, 2006). Entretanto, isso não exclui o fato de que, nos locais estudados nessa dissertação, essa espécie também possa estar se diferenciando, passando, porém, por uma recente separação, onde seu F_{ST} , nesse momento, ainda seja considerado baixo para indicar uma diferenciação significativa entre espécies.

A segunda etapa desse trabalho foi uma comparação de divergências entre as diferentes espécies estudadas. Uma primeira análise foi observar a diferenciação encontrada entre *An. darlingi* e *An. marajoara*, que são comprovadamente duas espécies distintas. O F_{ST} encontrado entre essas duas espécies, como esperado, foi bastante alto ($F_{ST} = 0,9746$, praticamente igual a 1) e o número de migrantes muito baixo ($Nm = 0,0065$), comprovando que realmente são espécies diferentes, embora ambas sejam pertencentes ao subgênero *Nyssorhynchus*. Essa grande diferenciação pode ser confirmada também através da árvore ilustrada na figura 4.4 que mostra as seqüências referentes à *An. darlingi* agrupadas e bem separadas das seqüências obtidas de *An. marajoara*, com um valor de *bootstrap* muito alto (99%). A população de *An. marajoara* mostrou-se mais homogênea que as populações de *An. darlingi*, apresentando os menores valores de π e θ quando comparados a esta.

Aqui, estimamos também o grau de divergência encontrado entre duas espécies do complexo Albitarsis, *An. albitarsis s.s.* e *An. marajoara* que, ao serem submetidas a experimentos de cruzamentos, demonstraram-se isoladas reprodutivamente, com total esterilidade dos machos híbridos (José B. Lima, comunicação pessoal). O valor de F_{ST} encontrado entre essas duas espécies foi muito alto e a estimativa de D_{xy} foi cerca de 10 vezes maior que os valores encontrados entre as populações de *An. darlingi*. Essa separação é bastante consistente com a árvore filogenética observada (figura 4.4) onde, mesmo utilizando

somente uma seqüência para *An. albitalis s.s.*, a distância entre elas pôde ser demonstrada. Na verdade, pretendíamos obter uma amostra de vários indivíduos de *An. albitalis s.s.* para fortalecer esse resultado, o que, infelizmente, não foi possível antes do término desta dissertação. Porém, isso será feito posteriormente.

A idéia de se fazer uma análise entre duas espécies do complexo Albitarsis que apresentam esterilidade dos machos híbridos surgiu para que tentássemos mensurar uma provável divergência necessária para concluir que as duas populações de *An. darlingi* provavelmente representam espécies crípticas com isolamento pós-zigótico. Ao compararmos as divergências, observamos que aquela presente entre as populações de *An. darlingi*, pelo menos em análises no gene *timeless*, é bem menor que a encontrada entre as espécies do complexo citadas acima. Pode-se pensar em uma influência do tamanho da amostra, uma vez que, para *An. albitalis s.s.* utilizamos somente uma seqüência, o que poderia acabar aumentando o valor de F_{ST} , contudo este artefato não é esperado no caso dos valores de D_{xy} , e estes, como mencionado anteriormente, apresentaram-se bem mais altos entre *An. albitalis s.s.* e *An. marajoara* que entre as populações analisadas de *An. darlingi*.

Pode ser que o gene *timeless* não esteja marcando tão bem uma possível divergência entre as populações de *An. darlingi* aqui analisadas quanto, por exemplo, o gene mitocondrial COI, o qual dividiu as amostras estudadas separando as duas Américas, Central e do Sul, como já dito acima, além de subdividir as amostras da América do Sul em dois outros grupos, que separaram as amostras do norte da Amazônia das outras amostras coletadas na Amazônia e no sul da América do Sul (Mirabello & Conn, 2006). Nesse mesmo trabalho é citada uma análise realizada em amostras das mesmas localidades utilizando um gene nuclear conservado (*white*), cujas análises dão suporte à divisão entre as Américas.

Embora nossos resultados não comprovem que *An. darlingi* seja um complexo de espécies crípticas, as análises da estrutura de algumas populações dessa espécie demonstraram uma certa diferenciação entre elas, indicando a necessidade de expandir esse trabalho com mais populações de outras localidades nas quais esses mosquitos apresentem comportamento extremamente contrastante, como é o caso da população de Dourado (Forattini, 1987). Além disso, seria muito interessante incluir outros genes às comparações do nível de divergência entre as espécies do complexo Albitarsis e entre as populações de *An. darlingi*, para se obter estimativas da diferenciação dentro destes dois grupos em diferentes partes do genoma.

6. CONCLUSÕES

- ✓ As análises moleculares do gene *timeless* nas populações de *An. darlingi* de Portuchuelo (intra e peridomicílio) e Macapá indicaram uma diferenciação significativa entre as amostras coletadas no intra e no peridomicílio de Portuchuelo, a qual se torna ainda mais interessante quando comparada à diferenciação moderada existente entre as populações de Portuchuelo e Macapá.
- ✓ Não foi demonstrada diferenciação genética entre as amostras coletadas em diferentes horários em Portuchuelo.
- ✓ Ao compararmos as espécies analisadas nesse trabalho, observamos que a população de *An. marajoara* foi menos polimórfica que as populações de *An. darlingi*.
- ✓ A diferenciação observada no gene *timeless* entre as populações de *An. darlingi* analisadas é cerca de 10 vezes menor que a diferenciação entre *An. marajoara* e *An. albitarsis s.s.*, duas espécies do complexo Albitarsis que apresentam isolamento pós-zigótico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashmore JA, Sehgal A. A fly's eye view of circadian entrainment. *J Biol Rhythms* 2003;18(3):206-216.

Baimai V, Kijchalao U, Rattanarithikul R, Green CA. Metaphase karyotypes of *Anopheles* of Thailand and Southeast Asia: II. *Maculatus* group, *Neocellia* series, subgenus *Cellia*. *Mosq Syst* 1993;25:116-123.

Barton NH. Genetic hitchhiking. *The Royal Society* 2000;355:1553-1562.

Bryan JH, Di Deco MA, Tetrarca V, Coluzzi M. Inversion polymorphism and incipient speciation in *Anopheles gambiae* s.str. in The Gambia, West Africa. *Genetica* 1982;59:167-176.

Carnahan J, Zheng L, Taylor CE, Touré YT, Norris DE, Dolo G, et al. Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. populations in Mali, West Africa, using microsatellite loci. *J Hered* 2002;93(4):249-253.

Charlwood JD, Hayes J. Variações geográficas no ciclo de picada do *Anopheles darlingi* Root no Brasil. *Acta Amazônica* 1978;8(4):601-603.

Charlwood JD. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996;91(4):391-398.

Clements AN. The biology of mosquitoes. Sensory reception and behaviour. Editora CABI publishing 1999;vol.2:740pp.

Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979;73(5):483-497.

Coluzzi M, Petrarca V, Di Deco MA. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Boll Zool* 1985;52:45-63.

Conn JE, Wilkerson RC, Segura MNO, Souza RTL, Schlichting CD, Wirtz RA, et al. Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in land use. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66(1):18-22.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz;1994.

da Silva-Vasconcelos A, Kato MYN, Mourão EM, Souza RTL, Lacerda RNL, Sibajev A et al. Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of Anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97(2):151-161.

Deane LM. Malaria vectors in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1986;81(Suppl. II):5-14.

Deane LM. A Cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira. Mem Inst Oswaldo Cruz 1989;84(Suppl.IV):149-156.

della Torre A, Constantini C, Besansky NJ, Caccone A, Tetrarca V, Powell JR et al. Speciation within *Anopheles gambiae* – the glass is half full. Science 2002;298:115-117.

Filatov DA, Charlesworth D. DNA polymorphism, haplotype structure and balancing selection in the *Leavenworthia PgiC* locus. Genetics 1999;153:1423-1434.

Forattini OP. Comportamento exófilo de *Anopheles darlingi* Root, em região meridional do Brasil. Rev Saúde Pública 1987;21(4):291-304.

Forattini OP. Culicidologia Médica: Identificação, biologia, epidemiologia. vol 2. Editora Usp, 2002;860pp.

Freitas-Sibajev MGR, Conn J, Mitchell SE, Cockburn AF, Seawright JA, Momem H. Mitochondrial DNA and morphological analyses of *Anopheles darlingi* populations from Brazil (Diptera: Culicidae). Mosq Syst 1995;27(2):78-99.

Gentile G, della Torre A, Maegga B, Powell JR, Caccone A. Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s., and the problem of taxonomic status. Genetics 2002;161(4):1561-78.

Gentile C, Meireles-Filho AC, Britto C, Lima JB, Valle D, Peixoto AA. Cloning and daily expression of the *timeless* gene in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Insect Biochem Mol Biol 2006;36(11):878-884.

Hardin PE. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. Curr Biol 2005;15(17):R714-722. Review.

Hartl DL. A Primer of Population Genetics, 3rd Ed. 2000;2:142-143.

Jowett, T. Preparation of nucleic acids. In: Roberts, D.B., (Ed.). *Drosophila: A practical approach*. IRL press, Oxford. 1998; p.347-371.

Kakitani I, Ueno HM, Forattini OP. Paridade e influência do vento sobre a freqüência de *Anopheles marajoara*, São Paulo. Rev Saúde Pública 2003;37(3):280-284.

Klein TA, Lima JBP. Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. J Am Mosq Control Assoc 1990;6(4):700-707.

Kreutzer RD, Kitzmiller JB, Ferreira E. Inversion polymorphism in the salivary gland chromossomes of *Anopheles darlingi* Root. Mosq News 1972;32:555-565.

Kumar S, Tamura K & Nei M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. Briefings in Bioinformatics 2004;5:150-163.

Li C, Wilkerson RC. Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100(5):495-500.

Lima JBP, Valle D, Peixoto AA. Analysis of Reproductive Isolation Between Sibling Species *Anopheles albitarsis sensu stricto* and *Anopheles deaneorum*, Two Malaria Vectors Belonging to the Albitarsis Complex (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 2004b;41(5):888-893.

Malafronte RS, Marrelli MT, Marinotti O. Analysis of ITS2 DNA sequences from brazilian *Anopheles darlingi* (Ditera: Culicidae). J Med Entomol 1999;36(5):631-634.

Manguin S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio-Palis Y, Danoff-Burg JA, Roberts DR. 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. Am J Trop Med Hyg 1999;60(3):364-376.

Marrelli MT, Floeter-Winter LM, Malafronte RS, Tadei WP, Lourenço-de-Oliveira R, Flores-Mendoza C, et al. Amazonian malaria vector anopheline relationships interpreted from ITS2 rDNA sequences. Med Vet Entomol 2005;19:208-218.

Meireles-Filho AC, da S Rivas GB, Gesto JS, Machado RC, Britto C, de Souza NA, et al. The biological clock of an haematophagous insect: locomotor activity rhythms, circadian expression and downregulation after a blood meal. FEBS Lett 2006a;580(1):2-8.

Meireles-Filho AC, Amoretty PR, Souza NA, Kyriacou CP, Peixoto AA. Rhythmic expression of the cycle gene in a haematophagous insect vector. BMC Mol Biol 2006b;p.7-35.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Tópicos de Saúde: Malária. [online]. Brasília; 2006 [capturado 15 mar. 2007] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21818

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil. [online]. Brasília; 2006 [capturado 20 jun. 2007] Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2006_web.pdf

Mirabello L, Conn JE. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. Heredity 2006;96(4):311-321.

Nei M, Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University Press. 2000;333p.

Peixoto AA, Gomes CA, Amoretty PR, Lins RMMA, Meireles-Filho ACA, Souza NA, et al. New molecular markers for Phlebotomine sand flies. Int J Parasit 2001;31:635-9.

Póvoa MM, Wirtz RA, Lacerda RNL, Miles MA, Warhurst D. Malaria vectors in the municipality of Amapá, Amazon Region, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96(2):179-184.

Rafael MS, Tadei WP. Heterochromatin variation in chromosomes of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root and A. (*N.*) *nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae). Genet Mol Biol 2000;23(1):67-70.

Rey L. Os plasmódios e a malária: Ecologia e epidemiologia. In: Parasitologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2001. p. 371–385.

Rey L. Os plasmódios e a malária: Controle e erradicação. In: Parasitologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2001. p. 386-396.

Rosa-Freitas MG, Broomfield G, Priestman A, Milligan PJ, Momem H, Molyneux DH. Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. J Am Mosq Control Assoc 1992;8(4):357-66.

Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Carvalho-Pinto CJ, Flores-Mendoza C, Silva-do-Nascimento TF. Anopheline Species Complexes in Brazil. Current Knowledge of Those Related to Malaria Transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998;93(5):651-665.

Rozas J, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 2003;19:2496-2497.

Rubio-Palis Y, Wilkerson R, Guzmán H. Morphological characters of adult *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* in Venezuela. J Am Mosq Control Assoc 2003;19(2):107-114.

Sakai T, Ishida N. Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci 2001;98(16):9221-9225.

Sambrook D, Russell J. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor;2001.

Santos JMM, Lobo JA, Tadei WP, Contel EPB. Intrapopulational genetic differentiation in *Anopheles (N.) darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) in the Amazon region. Genet Mol Biol 1999; 22(3):325-331.

Souza-Santos R. Distribuição sazonal de vetores da malária em Machadinho d'Oeste, Rondônia, Região Amazônica, Brasil. Cad Saúde Pública 2002;18(6):1813-1818.

Stanewsky R. Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. J Neuroscience 2003;54:111-47.

Tadei WP, Santos JMM, Rabbani MG. Biologia de anofelinos amazônicos: V. Polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae). Acta Amazônica 1982;12(2):353-369.

Tadei WP, Thatcher BD, Santos JMM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS. Ecologic observations on Anopheline vectors of malaria in the brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg 1998;59(2):325-335.

Tadei WP, Thatcher BD. Malaria vectors in the brazilian Amazon. Rev Inst Med Trop 2000;42(2):87-94.

Tauber E, Roe H, Costa R, Hennessy JM, Kyriacou CP. Temporal mating isolation driven by a behavioral gene in *Drosophila*. Curr Biol 2003;13(2):140-5.

Triplet F, Dolo G, Lanzaro GC. Multilevel analyses of genetic differentiation in *Anopheles gambiae* s.s. reveal patterns of gene flow important for malaria-fighting mosquito projects. Genetics 2005;169:313-324.

Tubaki RM, Menezes RMT, Cardoso Junior RB, Bergo ES. Studies on entomological monitoring: mosquito species frequency in riverine habitats of the Igarapava dam, Southern region, Brazil. Rev Inst Med Trop 2004;46(4):223-229.

Voorham J. Intra-population plasticity of *Anopheles darlingi*'s (Diptera: Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. Rev Saúde Pública 2002;36(1):75-80.

Xavier MMSP, Rebêlo JMM. Espécies de *Anopheles* (Culicidae, Anophelinae) em área endêmica de malária , Maranhão, Brasil. Rev Saúde Pública 1999;33(6):535-41.

Wilkerson RC, Parsons TJ, Klein TA, Gaffigan TV, Bergo E, Consolim J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitalis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. J Med Entomol 1995a;32(5):697-704.

Wilkerson RC, Gaffigan TV, Lima JB. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhyncus) albitalis* by Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1995b;90(6):721-732.

World Health Organization. World Malaria Report [online]. 2005 [capturado 20 nov. de 2006] Disponível em: <http://www.rollbackmalaria.org/wmr2005>.

Zimmerman RH, Galardo AKR, Lounibos LP, Arruda M, Wirtz R. Bloodmeal hosts of *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) in a malaria-endemic area of the Brazilian Amazon. J Med Entomol 2006;43(5):947-956.

8. ANEXOS

ANEXO I

Exon 1:

```
      1 111 111 111 222 222 233 333 333 334 444 444 444 555 555 566 666 666 667 777 777 777 888 888 888 899 999 999 99
1 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 89
#AndMac11a C ATT TCG ACC TCG AGT AAC GAG GAC GAC ACA CCT CAG CAG AAG CCA GTG CAC CAG AAG CCA CCG TCA AAT CAA AAG CAA CGC TTT AAC GCC GCC AAC AA
#AndMac11i .
#AndMac14a .
#AndMac14d .
#AndMac16a .
#AndMac16l .
#AndMac25a .
#AndMac25f .
#AndMac26b .
#AndMac28b .
#AndMac28r .
#AndMac37g .
#AndMac37o .
#AndMac38a .
#AndMac38j T .
#AndMac39a .
#AndMac39f .
#AndMac40a .
#AndMac40v T .
#AndMac41a .
#AndMac41i .
#AndMac44a T .
#AndMac44d .
#AndMac46a .
#AndMac46g .
#AndMac47a .
#AndMac47c .
#AndMac49a T .
#AndMac49g .
#DP01aP1A01 .
#DP01aR6B05 .
#DP02cP1A02 .
#DP03bR6F12 .
#DP03bR6H12 .
#DP04aP1A03 .
#DP04aR6A06 .
#DP06gR7C01 .
#DP08lR1A05 .
#DP08lR1B05 .
#DP09mP2A02 .
#DP09mR1G05 .
#DP10aP1D04 .
#DP10aP1H04 .
```

```

#DP11cR7G06 . . . . . C . . . . .
#DP12bP1E05 . . . . . C . . . . .
#DP13fP1B06 . . . . . C . . . . .
#DP14eP2B12 . . . . . C . . . . .
#DP14eP2C12 . . . . . C . . . . .
#DP16eP4A03 . . . . . C . . . . .
#DP17lP2C03 . . . . . C . . . . .
#DP17lR2B01 . . . . . C . . . . .
#DP18mP4A04 . . . . . C . . . . .
#DP18mP4G04 . . . . . C . . . . .
#DP19cP4C05 . . . . . C . . . . .
#DP19cP4G05 . . . . . C . . . . .
#DP20cI4296 . . . . . C . . . . .
#DP20cP1F07 . . . . . C . . . . .
#DP21aR7A07 . . . . . C . . . . .
#DP21aR7F07 . . . . . C . . . . .
#DP22fR7E10 . . . . . C . . . . .
#DP23eR1A02 . . . . . C . . . . .
#DP23eR1B02 . . . . . C . . . . .
#DP24gR1A07 . . . . . C . . . . .
#DP24gR1B07 . . . . . C . . . . .
#DP25jR7A11 . . . . . C . . . . .
#DP26mP2F06 . . . . . C . . . . .
#DP26mP2G06 . . . . . C . . . . .
#DP27mP4B06 . . . . . C . . . . .
#DP27mP4G06 . . . . . C . . . . .
#DP28bP4A07 . . . . . C . . . . .
#DP28bP4H07 . . . . . C . . . . .
#DP30bR1A03 . . . . . C . . . . .
#DP30bR1B03 . . . . . C . . . . .
#DP31fP1H10 . . . . . C . . . . .
#DP32eR1A04 . . . . . C . . . . .
#DP32eR1D04 . . . . . C . . . . .
#DP33gP2A07 . . . . . C . . . . .
#DP33gP2B07 . . . . . C . . . . .
#DP34jR1B10 . . . . . C . . . . .
#DP34jR1F10 . . . . . C . . . . .
#DP35lP2A09 . . . . . C . . . . .
#DP35lR6B09 . . . . . C . . . . .
#DP36jP4H08 . . . . . C . . . . .
#DP36jR6C04 . . . . . C . . . . .
#DP37cP4C09 . . . . . C . . . . .
#DP37cR7E03 . . . . . C . . . . .
#DP39aP4H10 . . . . . C . . . . .
#DP39aR7H04 . . . . . C . . . . .
#DP40fpP2A10 . . . . . C . . . . .
#DP40fpP2B10 . . . . . C . . . . .
#DP41eP4B11 . . . . . C . . . . .
#DP41eP4H11 . . . . . C . . . . .
#DP42eP4G12 . . . . . C . . . . .
#DP42eR7D05 . . . . . C . . . . .
#DP43jR6A11 . . . . . C . . . . .
#DP43jR6H11 . . . . . C . . . . .
#DP44mP2B05 . . . . . C . . . . .
#DP44mR1A08 . . . . . C . . . . .
#DP45lR7B08 . . . . . C . . . . .
#DP45lR7H08 . . . . . C . . . . .

```

Exon 1 (continuação):

#DP20c14296
#DP20cP1F07
#DP21aR7A07
#DP21aR7F07
#DP22fR7E10
#DP23eR1A02
#DP23eR1B02
#DP24gR1A07
#DP24gR1B07
#DP25jR7A11
#DP26mP2F06
#DP26mP2G06
#DP27mP4B06
#DP27mP4G06
#DP28bP4A07
#DP28bP4H07
#DP30bR1A03
#DP30bR1B03
#DP31fP1H10
#DP32eR1A04
#DP32eR1D04
#DP33gP2A07
#DP33gP2B07
#DP34jR1B10
#DP34jR1F10
#DP35lP2A09
#DP35lR6B09
#DP36jP4H08
#DP36jR6C04
#DP37cP4C09
#DP37cR7E03
#DP39aP4H10
#DP39aR7H04
#DP40fP2A10
#DP40fP2B10
#DP41eP4B11
#DP41eP4H11
#DP42eP4G12
#DP42eR7D05
#DP43jR6A11
#DP43jR6H11
#DP44mP2B05
#DP44mR1A08
#DP45lR7B08
#DP45lR7H08

Intron 1:

1111111111 1111111111 1122222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 22
7788888888 8899999999 9900000000 0011111111 1122222222 2233333333 3344444444 4455555555 55
8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 89
#AndMac11a GTTAGTATAT CCTTATTCTG TGACAATGCC GTGGACGCTC ATCTTAATCA TCATCTCATC ACACTGTTT CACGCGTAAC AG
#AndMac11i
#AndMac14a
#AndMac14d
#AndMac16a
#AndMac16l
#AndMac25a
#AndMac25f
#AndMac26b
#AndMac28b
#AndMac28r
#AndMac37g
#AndMac37o
#AndMac38a
#AndMac38j
#AndMac39a
#AndMac39f
#AndMac40a
#AndMac40v
#AndMac41a
#AndMac41i
#AndMac44a
#AndMac44d
#AndMac46a
#AndMac46g
#AndMac47a
#AndMac47c
#AndMac49a
#AndMac49g
#DP01aP1A01
#DP01aR6B05
#DP02cP1A02
#DP03bR6F12 . . A
#DP03bR6H12
#DP04aP1A03
#DP04aR6A06
#DP06gR7C01
#DP081R1A05
#DP081R1B05
#DP09mP2A02
#DP09mR1G05
#DP10aP1D04
#DP10aP1H04
#DP11cR7G06
#DP12bP1E05
#DP13fP1B06
#DP14eP2B12
#DP14eP2C12
#DP16eP4A03
#DP17lP2C03
#DP17lR2B01
#DP18mP4A04
#DP18mP4G04
#DP19cP4C05 . . . A
#DP19cP4G05

#DP20c14296 T
#DP20cP1F07
#DP21aR7A07
#DP21aR7F07 T
#DP22fR7E10
#DP23eR1A02
#DP23eR1B02
#DP24gR1A07
#DP24gR1B07
#DP25jR7A11
#DP26mP2F06
#DP26mP2G06
#DP27mP4B06
#DP27mP4G06
#DP28bP4A07
#DP28bP4H07 T
#DP30bR1A03
#DP30bR1B03
#DP31fP1H10
#DP32eR1A04
#DP32eR1D04
#DP33gP2A07
#DP33gP2B07
#DP34jR1B10
#DP34jR1F10
#DP35lP2A09 T
#DP35lR6B09
#DP36jP4H08 A
#DP36jR6C04
#DP37cP4C09
#DP37cR7E03 T
#DP39aR4H10
#DP39aR7H04
#DP40fp2A10
#DP40fp2B10 A
#DP41eP4B11
#DP41eP4H11
#DP42eP4G12 T
#DP42eR7D05
#DP43jR6A11
#DP43jR6H11
#DP44mP2B05
#DP44mR1A08
#DP45lR7B08
#DP45lR7H08

Exon 2:

#DP20c14296
#DP20cP1F07
#DP21aR7A07
#DP21aR7F07
#DP22fR7E10
#DP23eR1A02
#DP23eR1B02
#DP24gR1A07
#DP24gR1B07
#DP25jR7A11
#DP26mP2F06
#DP26mP2G06
#DP27mP4B06
#DP27mP4G06
#DP28bP4A07
#DP28bP4H07
#DP30bR1A03
#DP30bR1B03
#DP31fP1H10
#DP32eR1A04
#DP32eR1D04
#DP33gP2A07
#DP33gP2B07
#DP34jR1B10
#DP34jR1F10
#DP35lP2A09
#DP35lR6B09
#DP36jP4H08
#DP36jR6C04
#DP37cP4C09
#DP37cR7E03
#DP39aP4H10
#DP39aR7H04
#DP40fpP2A10
#DP40fpP2B10
#DP41eP4B11
#DP41eP4H11
#DP42eP4G12
#DP42eR7D05
#DP43jR6A11
#DP43jR6H11
#DP44mP2B05
#DP44mR1A08
#DP45lR7B08
#DP45lR7H08

Exon 2 (continuação) :

```
3 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 344
5 666 666 666 677 777 778 888 888 888 999 999 999 999 900
9 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901
#AndMac11a A TAT CTA GTG CAG GAG CTG CAC ACA CAG CTG TTA TCG GAC CTG
#AndMac11i . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac14a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac14d . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac16a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac16l . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac25a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac25f . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac26b . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac28b . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac28r . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac37g . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac37o . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac38a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac38j . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac39a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac39f . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac40a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac40v . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac41a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac41i . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac44a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac44d . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac46a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac46g . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac47a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac47c . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac49a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#AndMac49g . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP01aP1A01 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP01aR6B05 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP02cP1A02 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP03bR6F12 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP03bR6H12 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP04aP1A03 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP04aR6A06 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP06gR7C01 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP081R1A05 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP081R1B05 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP09mP2A02 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP09mR1G05 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP10aP1D04 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP10aP1H04 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP11cR7G06 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP12bP1E05 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP13fP1B06 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP14eP2B12 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP14eP2C12 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP16eP4A03 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP17lP2C03 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP17lR2B01 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP18mP4A04 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP18mP4G04 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
#DP19cP4C05 . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
```

```
#DP19cP4G05 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP20c14296 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP20cP1F07 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP21aR7A07 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP21aR7F07 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP22fR7E10 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP23eR1A02 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP23eR1B02 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP24gR1A07 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP24gR1B07 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP25jR7A11 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP26mP2F06 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP26mP2G06 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP27mP4B06 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP27mP4G06 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP28bP4A07 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP28bP4H07 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP30bR1A03 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP30bR1B03 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP31fP1H10 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP32eR1A04 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP32eR1D04 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP33gP2A07 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP33gP2B07 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP34jR1B10 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP34jR1F10 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP35lP2A09 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP35lR6B09 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP36jP4H08 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP36jR6C04 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP37cP4C09 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP37cR7E03 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP39aP4H10 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP39aR7H04 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP40fP2A10 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP40fP2B10 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP41eP4B11 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP41eP4H11 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP42eP4G12 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP42eR7D05 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP43jR6A11 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP43jR6H11 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP44mP2B05 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP44mR1A08 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP45lR7B08 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#DP45lR7H08 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
```

Intron 2:

4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444
0000000011 1111111122 2222222233 3333333344 4444444455 5555555566 6666666677 777777788 8888888899 999999990
2345678901 2345678901 2345678901 2345678901 2345678901 2345678901 2345678901 2345678901 2345678901 234567890
#AndMac11a GTGAGTACAC TGACCGGAAG CGGTAGCAAC TAATTGCGGA ACTTTCCGT ATCGCATGTC ATGTTCGTT CTACCAAGAT TCAGCAATGC ACTCCATTC
#AndMac11i
#AndMac14aG
#AndMac14d
#AndMac16a
#AndMac16lG
#AndMac25aG
#AndMac25f
#AndMac26b
#AndMac28b
#AndMac28rG
#AndMac37gG
#AndMac37oG
#AndMac38a
#AndMac38jG
#AndMac39aG
#AndMac39fG
#AndMac40a
#AndMac40vG
#AndMac41a
#AndMac41i
#AndMac44aG
#AndMac44d
#AndMac46aG
#AndMac46g
#AndMac47a
#AndMac47c
#AndMac49aG
#AndMac49gG
#DP01aP1A01G
#DP01aR6B05
#DP02cP1A02
#DP03bR6F12G
#DP03bR6H12
#DP04aP1A03G
#DP04aR6A06G
#DP06gR7C01
#DP081R1A05
#DP081R1B05
#DP09mP2A02
#DP09mR1G05G
#DP10aP1D04G
#DP10aP1H04
#DP11cR7G06
#DP12bP1E05
#DP13fP1B06
#DP14eP2B12
#DP14eP2C12
#DP16eP4A03
#DP17lP2C03
#DP17lR2B01
#DP18mP4A04G
#DP18mP4G04G
#DP19cP4C05G
#DP19cP4G05G

.....T.....
.....G.....C.....T.....
.....C.....T.....

#DP20c14296 G
#DP20cP1F07
#DP21aR7A07
#DP21aR7F07 G
#DP22fR7E10
#DP23eR1A02
#DP23eR1B02
#DP24gR1A07
#DP24gR1B07
#DP25jR7A11
#DP26mP2F06
#DP26mP2G06
#DP27mP4B06 G
#DP27mP4G06
#DP28bP4A07 G
#DP28bP4H07
#DP30bR1A03
#DP30bR1B03 G
#DP31fP1H10
#DP32eR1A04
#DP32eR1D04 T
#DP33gP2A07
#DP33gP2B07
#DP34jR1B10
#DP34jR1F10
#DP35lP2A09 G
#DP35lR6B09 G
#DP36jP4H08 G
#DP36jR6C04 G
#DP37cP4C09 G
#DP37cR7E03 G
#DP39aR4H10
#DP39aR7H04
#DP40fp2A10
#DP40fp2B10 G
#DP41eP4B11 G
#DP41eP4H11 G
#DP42eP4G12 G
#DP42eR7D05
#DP43jR6A11
#DP43jR6H11
#DP44mP2B05
#DP44mR1A08
#DP45lR7B08
#DP45lR7H08

Intron 2 (continuação) :

5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555
0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 555555556 6666666667 7777777778 8888888889 999999999
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
#AndMac11a ATTGGAAAGT TTCAAATACA AGCAAGTTAA TTAACGCGGT GAAGAGCACT TCACCCTGGC AACCATTCAA TCTTAATTAC GAACCAACCA CGGGAATAC
#AndMac11i
#AndMac14a
#AndMac14d
#AndMac16a
#AndMac16l
#AndMac25a
#AndMac25f
#AndMac26b
#AndMac28b
#AndMac28r
#AndMac37g G
#AndMac37o
#AndMac38a
#AndMac38j
#AndMac39a
#AndMac39f
#AndMac40a A
#AndMac40v
#AndMac41a
#AndMac41i
#AndMac44a
#AndMac44d A
#AndMac46a
#AndMac46g
#AndMac47a
#AndMac47c A
#AndMac49a
#AndMac49g
#DP01aP1A01
#DP01aR6B05
#DP02cP1A02
#DP03bR6F12
#DP03bR6H12
#DP04aP1A03
#DP04aR6A06
#DP06gR7C01
#DP081R1A05
#DP081R1B05 C
#DP09mP2A02
#DP09mR1G05
#DP10aP1D04
#DP10aP1H04
#DP11cR7G06
#DP12bP1E05 C
#DP13fp1B06
#DP14eP2B12
#DP14eP2C12
#DP16eP4A03
#DP17lP2C03
#DP17lR2B01
#DP18mP4A04
#DP18mP4G04
#DP19cP4C05

#DP19cP4G05
#DP20c14296
#DP20cP1F07
#DP21aR7A07	C.
#DP21aR7F07
#DP22fR7E10
#DP23eR1A02
#DP23eR1B02
#DP24gR1A07	C.	.	.	.
#DP24gR1B07
#DP25jR7A11
#DP26mP2F06
#DP26mP2G06	C.
#DP27mP4B06
#DP27mP4G06
#DP28bP4A07
#DP28bP4H07
#DP30bR1A03	C.
#DP30bR1B03
#DP31fP1H10
#DP32eR1A04
#DP32eR1D04
#DP33gP2A07	.	.	.	C.
#DP33gP2B07
#DP34jR1B10
#DP34jR1F10	.	.	.	C.
#DP35lP2A09
#DP35lR6B09
#DP36jP4H08
#DP36jR6C04
#DP37cP4C09
#DP37cR7E03
#DP39aP4H10
#DP39aR7H04
#DP40fP2A10
#DP40fP2B10
#DP41eP4B11
#DP41eP4H11
#DP42eP4G12
#DP42eR7D05
#DP43jR6A11	.	.	.	C.
#DP43jR6H11	.	.	.	C.
#DP44mP2B05	.	.	.	C.
#DP44mR1A08
#DP45lR7B08	.	.	.	C.
#DP45lR7H08

Intron 2 (continuação) :

6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666
0000000000 1111111111 2222222222 3333333333 4444444444 5555555555 6666666666 7777777777 8888888888 999999999
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 0123456789 012345678
#AndMac11a CGTAAAGCAT GTTTAATACT CATTCTCTTG TAGCATTATT CTTTCGTA ATAATTGTG CTAACAAACG AAGACTCCGG CCTATGGAAA CGATTGCAA
#AndMac11i
#AndMac14a
#AndMac14d
#AndMac16a
#AndMac16l
#AndMac25a
#AndMac25f
#AndMac26b
#AndMac28b
#AndMac28r
#AndMac37g
#AndMac37o
#AndMac38a
#AndMac38j
#AndMac39a
#AndMac39f
#AndMac40a
#AndMac40v
#AndMac41a
#AndMac41i
#AndMac44a
#AndMac44d
#AndMac46a
#AndMac46g
#AndMac47a
#AndMac47c
#AndMac49a
#AndMac49g
#DP01aP1A01
#DP01aR6B05
#DP02cP1A02
#DP03bR6F12
#DP03bR6H12
#DP04aP1A03
#DP04aR6A06
#DP06gR7C01
#DP081R1A05
#DP081R1B05
#DP09mP2A02
#DP09mR1G05
#DP10aP1D04
#DP10aP1H04
#DP11cR7G06
#DP12bP1E05
#DP13fP1B06
#DP14eP2B12
#DP14eP2C12
#DP16eP4A03
#DP17lP2C03
#DP17lR2B01
#DP18mP4A04
#DP18mP4G04
#DP19cP4C05
#DP19cP4G05

#DP20c14296	A
#DP20cP1F07
#DP21aR7A07
#DP21aR7F07
#DP22fR7E10
#DP23eR1A02	A
#DP23eR1B02
#DP24gR1A07
#DP24gR1B07
#DP25jR7A11
#DP26mP2F06
#DP26mP2G06
#DP27mP4B06	A
#DP27mP4G06
#DP28bP4A07
#DP28bP4H07
#DP30bR1A03	C
#DP30bR1B03	A
#DP31fP1H10
#DP32eR1A04	.	.	.	A.	C	.	.	.
#DP32eR1D04
#DP33gP2A07
#DP33gP2B07
#DP34jR1B10
#DP34jR1F10
#DP35lP2A09	A
#DP35lR6B09
#DP36jP4H08
#DP36jR6C04
#DP37cP4C09	A
#DP37cR7E03
#DP39aR4H10
#DP39aR7H04
#DP40fp2A10
#DP40fp2B10	C	.	.	.
#DP41eP4B11
#DP41eP4H11
#DP42eP4G12
#DP42eR7D05	G	T.
#DP43jR6A11	C
#DP43jR6H11
#DP44mP2B05
#DP44mR1A08
#DP45IR7B08
#DP45lR7H08

Intron 2 (continuação) :

```
6777777777 7777777777 7777777777 77777777  
9000000000 011111111 1222222222 23333333  
9012345678 9012345678 9012345678 90123456  
#AndMac11a ACTCATTGCA ATGTTCTTT CCATGTAATG TCGCTCTG  
#AndMac11i .....  
#AndMac14a .....  
#AndMac14d .....  
#AndMac16a .....  

```

```

#DP19cP4G05 ..... .
#DP20c14296 ..... .
#DP20cP1F07 ..... .
#DP21aR7A07 ..... .
#DP21aR7F07 ..... .
#DP22fR7E10 ..... .
#DP23eR1A02 ..... C .
#DP23eR1B02 ..... .
#DP24gR1A07 ..... .
#DP24gR1B07 ..... .
#DP25jR7A11 ..... .
#DP26mP2F06 ..... .
#DP26mP2G06 ..... .
#DP27mP4B06 ..... .
#DP27mP4G06 ..... .
#DP28bP4A07 ..... .
#DP28bP4H07 ..... .
#DP30bR1A03 ..... .
#DP30bR1B03 ..... .
#DP31fP1H10 ..... .
#DP32eR1A04 ..... .
#DP32eR1D04 ..... .
#DP33gP2A07 ..... .
#DP33gP2B07 ..... .
#DP34jR1B10 ..... .
#DP34jR1F10 ..... .
#DP35lP2A09 ..... .
#DP35lR6B09 ..... .
#DP36jP4H08 ..... A .
#DP36jR6C04 ..... .
#DP37cP4C09 ..... .
#DP37cR7E03 ..... .
#DP39aP4H10 ..... .
#DP39aR7H04 ..... .
#DP40fP2A10 ..... .
#DP40fP2B10 ..... .
#DP41eP4B11 ..... .
#DP41eP4H11 ..... .
#DP42eP4G12 ..... .
#DP42eR7D05 ..... .
#DP43jR6A11 ..... .
#DP43jR6H11 ..... .
#DP44mP2B05 ..... .
#DP44mR1A08 ..... .
#DP45lR7B08 ..... .
#DP45lR7H08 ..... .

```

Anexo I: Alinhamento das seqüências (consensos representando um ou dois alelos por indivíduo) do fragmento *timeless* das populações de *An. darlingi* analisadas nesse trabalho. Os pontos representam identidade com os nucleotídeos da primeira seqüência e os traços indicam os *gaps* encontrados nas regiões dos introns. O codon marcado em vermelho representa a substituição não-sinônima encontrada no 2º exon de um dos indivíduos de *An. darlingi* coletados em Portuchuelo. As seqüências que começam com **AndMac** representam os indivíduos de *An. darlingi* coletados em Macapá e aquelas com **DP** representam indivíduos de *An. darlingi* coletados em Portuchuelo.

ANEXO II

Exon 1:

Exon 1 (continuação) :

```
1 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 11  
0 000 000 000 111 111 122 222 222 333 333 333 444 444 444 444 455 555 555 556 666 666 666 777 777 77  
0 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 67  
#Anmar28h G CAA CGC AAT CCT GTT TCC GTG CAG GAG AAG GAA CTT CGG CGC AAA AAG TTG GTG AAA CGT GGC AAG AGC AAT AT  
#Anmar28a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar27g . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar27a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar18g . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar18a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar16g . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar16a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar14g . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar14a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar13b . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar13a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar11j . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar11b . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar10c . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar10a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar09c . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar09b . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar07b . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar07a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar06c . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar06a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar05c . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar05a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar04i . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar04b . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar03g . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar03a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar02f . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar02a . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar01h . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar01c . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
```

Intron 1:

```
1111111111 1111111111 1122222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222  
7788888888 8899999999 9900000000 0011111111 1122222222 2233333333 3344444444 4455555555 5566666666  
8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 890123456  
#Anmar28h GTAGTATAT CCTTATTCTG TGACTATGCA GTGGTCGCTC ATCTTCATCT TACTCTCCC TCTTATCAC AATGCCTTCGC GTGTAACAG  
#Anmar28a .....  
#Anmar27g .....  
#Anmar27a .....  
#Anmar18g .....  
#Anmar18a .....  
#Anmar16g .....  
#Anmar16a .....  
#Anmar14g .....  
#Anmar14a .....  
#Anmar13b ..... G  
#Anmar13a .....  
#Anmar11j .....  
#Anmar11b .....  
#Anmar10c .....  
#Anmar10a ..... A  
#Anmar09c .....  
#Anmar09b .....  
#Anmar07b .....  
#Anmar07a .....  
#Anmar06c .....  
#Anmar06a .....  
#Anmar05c .....  
#Anmar05a .....  
#Anmar04i .....  
#Anmar04b ..... G  
#Anmar03g .....  
#Anmar03a .....  
#Anmar02f .....  
#Anmar02a .....  
#Anmar01h ..... G  
#Anmar01c ..... G
```


Exon 2 (continuação) :

```
3 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 444 444 444 444  
6 666 777 777 777 788 888 888 889 999 999 999 999 000 000 000 000  
6 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678  
#Anmar28h A TAT CTA GTG CAG GAA CTG CAC ACA CAG CTG TTA TCG GAT CTG  
#Anmar28a . . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar27g . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar27a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar18g . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar18a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar16g . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar16a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar14g . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar14a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar13b . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar13a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar11j . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar11b . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar10c . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar10a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar09c . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar09b . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar07b . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar07a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar06c . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar06a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar05c . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar05a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar04i . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar04b . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar03g . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar03a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar02f . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar02a . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar01h . . . . . . . . . . . . . . . .  
#Anmar01c . . . . . . . . . . . . . . . .
```

Intron 2:

```
4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4555555555  
0111111111 1222222222 2333333333 3444444444 4555555555 5666666666 6777777777 7888888888 8999999999 900000000  
9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678 9012345678  
#Anmar28h GTAAAGTACAC TGGGCGGAAG CGGCAGCTAC TAATTGCGGA ACTTTCCGT ATCGCATTTC ACGATTCACT CTACCGGAAT CATTCAACAC ACTCCATCC  
#Anmar28a .....  
#Anmar27g .....  
#Anmar27a .....  
#Anmar18g .....  
#Anmar18a .....  
#Anmar16g .....  
#Anmar16a .....  
#Anmar14g .....  
#Anmar14a .....  
#Anmar13b .....  
#Anmar13a .....  
#Anmar11j .....  
#Anmar11b T .....  
#Anmar10c .....  
#Anmar10a .....  
#Anmar09c .....  
#Anmar09b .....  
#Anmar07b .....  
#Anmar07a .....  
#Anmar06c .....  
#Anmar06a .....  
#Anmar05c .....  
#Anmar05a .....  
#Anmar04i .....  
#Anmar04b .....  
#Anmar03g .....  
#Anmar03a .....  
#Anmar02f .....  
#Anmar02a .....  
#Anmar01h .....  
#Anmar01c .....
```

Intron 2 (continuação) :

```
5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555 5555555555  
0011111111 1122222222 2233333333 3344444444 4455555555 5566666666 6677777777 7788888888 8899999999 9900000000  
8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567  
#Anmar28h ACT----GG ACGGGTTGAA GTGAAATACC AGCAAGTTAA TGATGCCGGG TTAAGAGCAT TTCACCGTGG CAACCATTAA ATCTTAATTAA CGAACCAAC  
#Anmar28a .....  
#Anmar27g .....  
#Anmar27a .....  
#Anmar18g .....  
#Anmar18a .....  
#Anmar16g .....  
#Anmar16a .....  
#Anmar14g .....  
#Anmar14a .....  
#Anmar13b .....  
#Anmar13a .....  
#Anmar11j .....  
#Anmar11b .....  
#Anmar10c .....  
#Anmar10a .....  
#Anmar09c .....  
#Anmar09b .....  
#Anmar07b ..TCAAC..  
#Anmar07a .....  
#Anmar06c ..TCAAC..  
#Anmar06a .....  
#Anmar05c .....  
#Anmar05a .....  
#Anmar04i .....  
#Anmar04b .....  
#Anmar03g .....  
#Anmar03a .....  
#Anmar02f ..TCAAC..  
#Anmar02a .....  
#Anmar01h .....  
#Anmar01c ..
```

Intron 2 (continuação) :

```
6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666  
0001111111 1112222222 2223333333 3334444444 4445555555 5556666666 6667777777 7778888888 8889999999 999000000  
7890123456 7890123456 7890123456 7890123456 7890123456 7890123456 7890123456 7890123456 7890123456 7890123456  
#Anmar28h CACTCAAATT CTGCAAAGCA TGTTTAGTAT TTGTGCTCTT SCAGTATTTC TCTTTCTGT AATAATTGCT GCTGACGAAC AAGCTTCCTA GGATCGGAG  
#Anmar28a .....  
#Anmar27g .....  
#Anmar27a .....  
#Anmar18g .....  
#Anmar18a .....  
#Anmar16g .....  
#Anmar16a .....  
#Anmar14g .....  
#Anmar14a .....  
#Anmar13b ..... G. ....C.....  
#Anmar13a .....  
#Anmar11j .....  
#Anmar11b .....  
#Anmar10c .....  
#Anmar10a .....  
#Anmar09c .....  
#Anmar09b .....  
#Anmar07b .....  
#Anmar07a .....  
#Anmar06c .....  
#Anmar06a .....  
#Anmar05c .....  
#Anmar05a .....  
#Anmar04i .....  
#Anmar04b ..... G. ....C.....  
#Anmar03g .....  
#Anmar03a .....  
#Anmar02f .....  
#Anmar02a .....  
#Anmar01h ..... G. ....C.....  
#Anmar01c ..... G. ....C.....
```

Intron 2 (continuação) :

```
7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777  
0000111111 1111222222 2222333333 3333444444 4444555  
6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012  
#Anmar28h ACTCATTGCA -----GT-- -GTTCTATTT TATGTATCGT CACTATG  
#Anmar28a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar27g ..... -----.-.-----.....  
#Anmar27a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar18g ..... -----.-.-----.....  
#Anmar18a ..... -----..  
#Anmar16g ..... -----.-.-----.....  
#Anmar16a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar14g ..... -----.-.-----.....  
#Anmar14a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar13b ..... -----.-.-----.....  
#Anmar13a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar11j ..... -----.-.-----.....  
#Anmar11b ..... -----.-.-----.....  
#Anmar10c ..... -----.-.-----.....  
#Anmar10a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar09c ..... -----.-.-----.....  
#Anmar09b ..... -----.-.-----.....  
#Anmar07b ..... -----.-.-----.....  
#Anmar07a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar06c ..... -----.-.-----.....  
#Anmar06a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar05c ..... -----.-.-----.....  
#Anmar05a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar04i ..... -----.-.-----.....  
#Anmar04b ..... TTTTAT..AT C.....  
#Anmar03g ..... -----.-.-----.....  
#Anmar03a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar02f ..... -----.-.-----.....  
#Anmar02a ..... -----.-.-----.....  
#Anmar01h ..... TTTTAT..AT C.....  
#Anmar01c ..... TTTTAT..AT C.....
```

Anexo II: Alinhamento das seqüências (consensos representando um ou dois alelos por indivíduo) do fragmento de *timeless* da população de *An. marajoara* analisada nesse trabalho. Os pontos representam identidade com os nucleotídeos da primeira seqüência e os traços indicam os *gaps* encontrados nas regiões dos introns.

ANEXO III

Exon 1:

	1	111	111	111	222	222	222	233	333	333	334	444	444	444	555	555	555	566	666	666	667	777	777	777	888	888	888	899	999	999	99		
Analb	C	ATT	TCG	ACC	TCG	AGC	AAC	GAG	GAC	GAC	ACC	CCC	CAG	CAG	AAG	CCA	GTC	CAC	CAG	AAA	CCA	CCG	TCG	AAT	CAA	AAG	CAA	CGC	TTC	AAC	GCC	GCC	AA
Anmar28h	T	.	.	T	
Anmar28a	T	.	.	T		
Anmar27g	T	.	.	T		
Anmar27a	T	.	.	T		
Anmar18g	T	.	.	T		
Anmar18a	T	.	.	T		
Anmar16g	T	.	.	T		
Anmar16a	T	.	.	T		
Anmar14g	T	.	.	T		
Anmar14a	T	.	.	T		
Anmar13b	T	.	.	T		
Anmar13a	T	.	.	T		
Anmar11j	T	.	.	T		
Anmar11b	T	.	.	T		
Anmar10c	T	.	.	T		
Anmar10a	T	.	.	T		
Anmar09c	T	.	.	T		
Anmar09b	T	.	.	T		
Anmar07b	T	.	.	T		
Anmar07a	T	.	.	T		
Anmar06c	T	.	.	T		
Anmar06a	T	.	.	T		
Anmar05c	T	.	.	T		
Anmar05a	T	.	.	T		
Anmar04i	T	.	.	T		
Anmar04b	T	.	.	T		
Anmar03g	T	.	.	T		
Anmar03a	T	.	.	T		
Anmar02f	T	.	.	T		
Anmar02a	T	.	.	T		
Anmar01h	T	.	.	T		
Anmar01c	T	.	.	T		
DP451R7H08	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T		
DP451R7B08	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP44mR1A08	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP44mpP2B05	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP43jR6H11	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP43jR6A11	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP42eR7D05	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP42eP4G12	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP41eP4H11	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP41eP4B11	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP40fpP2B10	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP40fpP2A10	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP39aR7H04	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP39aP4H10	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP37cR7B03	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP37cP4C09	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP36jR6C04	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP36jP4H08	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		
DP351R6B09	T	.	.	A	.	T	.	G	.	G	.	A	.	.	.	T		

DP351P2A09	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP34jR1F10	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP34jR1B10	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP33gP2B07	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP33gP2A07	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP32eR1D04	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP32eR1A04	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP31fp1H10	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP30bR1B03	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP30bR1A03	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP28bP4H07	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP28bP4A07	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP27mP4G06	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP27mP4B06	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP26mP2G06	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP26mP2F06	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP25jR7A11	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP24gR1B07	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP24gR1A07	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP23eR1B02	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP23eR1A02	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP22fR7E10	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP21aR7F07	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP21aR7A07	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP20c14296	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP20cP1F07	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP19cP4G05	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP19cP4C05	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP18mP4G04	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP18mP4A04	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP171R2B01	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP171P2C03	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP16eP4A03	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP14eP2C12	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP14eP2B12	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP13fp1B06	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP12bP1E05	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP11cR7G06	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP10aP1H04	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP10aP1D04	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP09mRIG05	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP09mP2A02	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP081R1B05	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP081R1A05	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP06gR7C01	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP04aR6A06	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP04aP1A03	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP03bR6H12	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP03bR6F12	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP02cP1A02	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP01aR6B05	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
DP01aP1A01	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
AndMac49g	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	T	.	.	.	T
AndMac49a	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	T	.	.	.	T
AndMac47c	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
AndMac47a	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
AndMac46g	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
AndMac46a	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
AndMac44d	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	A	.	.	.	T
AndMac44a	T	.	.	.	A	.	T	.	.	.	G	.	.	G	.	.	T	.	.	.	T

AndMac41i T A . T G G A T
AndMac41a T A . T G G A T
AndMac40v T A . T G G T T
AndMac40a T A . T G G A T
AndMac39f T A . T G G A T
AndMac39a T A . T G G A T
AndMac38j T A . T G G T T
AndMac38a T A . T G G A T
AndMac37o T A . T G G A T
AndMac37g T A . T G G A T
AndMac28r T A . T G G A T
AndMac28b T A . T G G A T
AndMac26b T A . T G G A T
AndMac25f T A . T G G A T
AndMac25a T A . T G G A T
AndMac16l T A . T G G T T
AndMac16a T A . T G G A T
AndMac14d T A . T G G A T
AndMac14a T A . T G G A T
AndMac11i T A . T G G A T
AndMac11a T A . T G G A T

Exon 1 (continuação) :

1	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
0	000	000	000	111	111	111	122	222	222	333	333	333	444	444	444	455	555	555	555	666	666	666	666	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777					
0	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	677	777	777	777	777	777	777	777	777					
Analb	G	CAA	CGT	AAT	CCT	GTT	TCC	GTG	CAG	GAG	AAG	AAG	GAA	CTT	CGG	CGC	AAA	AAG	TTG	GTG	AAA	CGT	GGC	AAG	AGC	AAT	AT												
Anmar28h	.	.	.	C							
Anmar28a	.	.	.	C								
Anmar27g	.	.	.	C									
Anmar27a	.	.	.	C									
Anmar18g	.	.	.	C										
Anmar18a	.	.	.	C										
Anmar16g	.	.	.	C										
Anmar16a	.	.	.	C										
Anmar14g	.	.	.	C										
Anmar14a	.	.	.	C										
Anmar13b	.	.	.	C										
Anmar13a	.	.	.	C										
Anmar11j	.	.	.	C										
Anmar11b	.	.	.	C										
Anmar10c	.	.	.	C										
Anmar10a	.	.	.	C										
Anmar09c	.	.	.	C										
Anmar09b	.	.	.	C										
Anmar07b	.	.	.	C										
Anmar07a	.	.	.	C										
Anmar06c	.	.	.	C										
Anmar06a	.	.	.	C										
Anmar05c	.	.	.	C										
Anmar05a	.	.	.	C										
Anmar04i	.	.	.	C										
Anmar04b	.	.	.	C										
Anmar03g	.	.	.	C										
Anmar03a	.	.	.	C										
Anmar02f	.	.	.	C										
Anmar02a	.	.	.	C										
Anmar01h	.	.	.	C										
Anmar01c	.	.	.	C										
DP451R7H08	.	.	.	A										
DP451R7B08	.	.	.	A										
DP44mR1A08	.	.	.	A										
DP44mP2B05	.	.	.	A										
DP43jR6H11	.	.	.	A										
DP43jR6A11	.	.	.	A										
DP42eR7D05	.	.	.	A	A										
DP42eP4G12	.	.	.	A										
DP41eP4H11	.	.	.	A										
DP41eP4B11	.	.	.	A										
DP40fp2B10	.	.	.	A										
DP40fp2A10	.	.	.	A										
DP39aR7H04	.	.	.	A										
DP39aP4H10	.	.	.	A	A										
DP37cR7E03	.	.	.	A										
DP37cP4C09	.	.	.	A										
DP36jR6C04	.	.	.	A										
DP36jP4H08	.	.	.	A										
DP351R6B09	.	.	.	A										
DP351P2A09	.	.	.	A										
DP34jR1F10	.	.	.	A										

DP34jR1B10	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP33gP2B07	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP33gP2A07	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP32eR1D04	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP32eRIA04	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP31fP1H10	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP30bR1B03	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP30bRIA03	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP28bP4H07	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP28bP4A07	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP27mP4G06	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP27mP4B06	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP26mP2G06	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP26mP2F06	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP25jR7A11	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP24gR1B07	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP24gRIA07	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP23eR1B02	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP23eRIA02	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP22fr7E10	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP21aR7F07	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP21aR7A07	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP20c14296	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP20cP1F07	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP19cP4G05	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP19cP4C05	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP18mP4G04	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP18mP4A04	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP171R2B01	A	.	A	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP171P2C03	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP16eP4A03	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP14eP2C12	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP14eP2B12	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP13fp1B06	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP12bP1E05	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP11cR7G06	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP10aP1H04	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP10aP1D04	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP09mRLG05	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP09mP2A02	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP081RIB05	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP081RIA05	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP06gR7C01	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP04aR6A06	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP04aP1A03	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP03bR6H12	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP03bR6F12	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP02cP1A02	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP01aR6B05	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
DP01aP1A01	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac49g	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac49a	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac47c	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac47a	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac46g	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac46a	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac44d	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac44a	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac41i	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac41a	A	.	.	.	G	.	C.	.	A	.	G

AndMac40v	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac40a	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac39f	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac39a	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac38j	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac38a	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac37o	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac37g	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac28r	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac28b	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac26b	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac25f	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac25a	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac16l	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac16a	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac14d	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac14a	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac11i	A	G	.	C.	.	A	.	G
AndMac11a	A	G	.	C.	.	A	.	G

Intron 1:

1111111111 1111111111 1122222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222
7788888888 8899999999 9900000000 0011111111 1122222222 2233333333 3344444444 4455555555 5566666666
8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 8901234567 890123456
Analb GTTAGTATA CCTTATTCTG TGACTATGCC GTGGCCGCTC ATCTTCATCT TACTCTCCA TCTTTCTATA ATGCCCTCGC GTGTAACAG
Anmar28hA.....T.....A..C.....
Anmar28aA.....T.....A..C.....
Anmar27gA.....T.....A..C.....
Anmar27aA.....T.....A..C.....
Anmar18gA.....T.....A..C.....
Anmar18aA.....T.....A..C.....
Anmar16gA.....T.....A..C.....
Anmar16aA.....T.....A..C.....
Anmar14gA.....T..... ---
Anmar14aA.....T..... ---
Anmar13bA.....T..... G.....A..C.....
Anmar13aA.....T.....A..C.....
Anmar11jA.....T.....A..C.....
Anmar11bA.....T.....A..C.....
Anmar10cA.....T.....A..C.....
Anmar10aAA.....T.....A..C.....
Anmar09cA.....T.....A..C.....
Anmar09bA.....T.....A..C.....
Anmar07bA.....T.....A..C.....
Anmar07aA.....T.....A..C.....
Anmar06cA.....T.....A..C.....
Anmar06aA.....T.....A..C.....
Anmar05cA.....T.....A..C.....
Anmar05aA.....T.....A..C.....
Anmar04iA.....T.....A..C.....
Anmar04b G.....A.....T.....A..C.....
Anmar03gA.....T.....A..C.....
Anmar03aA.....T.....A..C.....
Anmar02fA.....T.....A..C.....
Anmar02aA.....T.....A..C.....
Anmar01h G.....A.....T.....A..C.....
Anmar01c G.....A.....T.....A..C.....
DP451R7H08A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP451R7B08A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP44mR1A08A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP44mP2B05A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP43jR6H11A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP43jR6A11A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP42eR7D05A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP42eP4G12A..G.....A.....A..A.....CA...C.T..TT..A..C.....
DP41eP4H11A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP41eP4B11A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP40fp2B10A.....A..G.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP40fp2A10A.....A..G.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP39aR7H04A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP39aP4H10A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP37cR7E03A..G.....A.....A..A.....CA...C.T..TT..A..C.....
DP37cP4C09A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP36jR6C04A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP36jP4H08A.....A..G.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP351R6B09A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....
DP351P2A09A..G.....A.....A..A.....CA...C.T..TT..A..C.....
DP34jR1F10A..G.....A.....A..A.....CA...C.C..TT..A..C.....

DP34jR1B10	.	.	.	A..G.	.	A..A.	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP33gP2B07	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP33gP2A07	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP32eR1D04	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP32eRIA04	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP31ffP1H10	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP30bR1B03	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP30bRIA03	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP28bP4H07	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP28bP4A07	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..T..TT..A..C..
DP27mP4G06	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP27mP4B06	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP26mP2G06	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP26mP2F06	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP25jR7A11	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP24gR1B07	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP24gRIA07	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP23eR1B02	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP23eRIA02	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP22frR7E10	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP21aR7F07	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..T..TT..A..C..
DP21aR7A07	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP20c14296	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..T..TT..A..C..
DP20cP1F07	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP19cP4G05	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..T..TT..A..C..
DP19cP4C05	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP18mP4G04	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP18mP4A04	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..T..TT..A..C..
DP171R2B01	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP171P2C03	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP16eP4A03	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP14eP2C12	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP14eP2B12	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP13fp1B06	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP12bP1E05	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP11cR7G06	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP10aP1H04	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP10aP1D04	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..T..TT..A..C..
DP09mRLG05	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..T..TT..A..C..
DP09mP2A02	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP081R1B05	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP081RIA05	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP06gR7C01	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP04aR6A06	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..T..TT..A..C..
DP04aP1A03	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP03bR6H12	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP03bR6F12	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP02cP1A02	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP01aR6B05	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
DP01aP1A01	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac49g	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac49a	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac47c	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac47a	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac46g	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac46a	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac44d	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac44a	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac41i	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..
AndMac41a	.	.	.	A..G..	.	A..A..	.	A..A	.	-----.	.	CA..C..C..TT..A..C..

AndMac40vA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac40aA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac39fA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac39aA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac38jA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac38aA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac37oA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac37gA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac28rA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac28bA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac26bA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac25fA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac25aA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac16lA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac16aA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac14dA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac14aA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac11iA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....
AndMac11aA..G.A.....A..A-----.CA...C.	C..TT..A.	.C.....

Exon 2:

2	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	223	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	33						
6	667	777	777	777	888	888	888	899	999	999	990	000	000	000	111	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	333	333	333	333	333	444	444	444	455	555	555	556	666	66
7	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	45						
Analb	C	ATC	AAC	ATG	AAG	GGG	CTG	ATG	CAT	CAT	GTT	CCC	ACT	GAC	GAC	GAC	GAC	ATC	TCG	CAC	ATA	CTC	AAG	GAG	TTC	ACG	GTC	GAC	TTT	CTG	CTT	AAA	GGC	TAC	GG				
Anmar28h					
Anmar28a						
Anmar27g							
Anmar27a							
Anmar18g							
Anmar18a							
Anmar16g							
Anmar16a							
Anmar14g							
Anmar14a							
Anmar13b							
Anmar13a							
Anmar11j							
Anmar11b							
Anmar10c							
Anmar10a							
Anmar09c							
Anmar09b							
Anmar07b							
Anmar07a							
Anmar06c							
Anmar06a							
Anmar05c							
Anmar05a							
Anmar04i							
Anmar04b							
Anmar03g							
Anmar03a							
Anmar02f							
Anmar02a							
Anmar01h							
Anmar01c							
DP451R7H08	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP451R7B08	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP44mR1A08	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP44mP2B05	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP43jR6H11	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP43jR6A11	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP42eR7D05	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP42eP4G12	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP41eP4H11	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP41eP4B11	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP40fpP2B10	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP40fpP2A10	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP39aR7H04	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP39aP4H10	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP37cR7E03	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP37cP4C09	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP36jR6C04	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP36jp4H08	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP351R6B09	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP351P2A09	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								
DP34jR1F10	A	.	.	.	T	T.A	A	G	.	C								

DP34jR1B10 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP33gP2B07 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP33gP2A07 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP32eR1D04 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP32eRIA04 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP31fP1H10 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP30bR1B03 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP30bR1A03 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP28bP4H07 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP28bP4A07 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP27mP4G06 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP27mP4B06 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP26mP2G06 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP26mP2F06 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP25jR7A11 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP24gR1B07 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP24gRIA07 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP23eR1B02 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP23eR1A02 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP22fR7E10 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP21aR7F07 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP21aR7A07 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP20c14296 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP20cP1F07 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP19cP4G05 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP19cP4C05 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP18mP4G04 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP18mP4A04 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP171R2B01 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP171P2C03 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP16eP4A03 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP14eP2C12 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP14eP2B12 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP13fP1B06 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP12bP1E05 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP11cR7G06 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP10aP1H04 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP10aP1D04 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP09mRIG05 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP09mP2A02 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP081R1B05 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP081RIA05 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP06gR7C01 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP04aR6A06 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP04aP1A03 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP03bR6H12 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP03bR6F12 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP02cP1A02 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP01aR6B05 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
DP01aP1A01 A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac49g A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac49a A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac47c A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac47a A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac46g A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac46a A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac44d A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac44a A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac41i A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.
AndMac41a A	.	.	.	T T A	.	.	.	A . G . C	.

AndMac40v	A T T A	A . G . C
AndMac40a	A T T A	A . G . C
AndMac39f	A T T A	A . G . C
AndMac39a	A T T A	A . G . C
AndMac38j	A T T A	A . G . C
AndMac38a	A T T A	A . G . C
AndMac37o	A T T A	A . G . C
AndMac37g	A T T A	A . G . C
AndMac28r	A T T A	A . G . C
AndMac28b	A T T A	A . G . C
AndMac26b	A T T A	A . G . C
AndMac25f	A T T A	A . G . C
AndMac25a	A T T A	A . G . C
AndMac161	A T T A	A . G . C
AndMac16a	A T T A	A . G . C
AndMac14d	A T T A	A . G . C
AndMac14a	A T T A	A . G . C
AndMac11i	A T T A	A . G . C
AndMac11a	A T T A	A . G . C

Exon 2 (continuação) :

3	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	333	444	444	444
6	666	777	777	777	788	888	888	889	999	999	999	999	000	000	000	000
6	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678		
Analb	A	TAT	CTA	GTG	CAG	GAA	TTG	CAC	ACA	CAG	CTG	TTA	TCG	GAT	CTG	
Anmar28h	C..
Anmar28a	C..
Anmar27g	C..
Anmar27a	C..
Anmar18g	C..
Anmar18a	C..
Anmar16g	C..
Anmar16a	C..
Anmar14g	C..
Anmar14a	C..
Anmar13b	C..
Anmar13a	C..
Anmar11j	C..
Anmar11b	C..
Anmar10c	C..
Anmar10a	C..
Anmar09c	C..
Anmar09b	C..
Anmar07b	C..
Anmar07a	C..
Anmar06c	C..
Anmar06a	C..
Anmar05c	C..
Anmar05a	C..
Anmar04i	C..
Anmar04b	C..
Anmar03g	C..
Anmar03a	C..
Anmar02f	C..
Anmar02a	C..
Anmar01h	C..
Anmar01c	C..
DP451R7H08	G	C..	.	.	T	.	.	C	.	.	.
DP451R7B08	G	C..	C	.	.	.
DP44mR1A08	G	C..	.	.	T	.	.	C	.	.	.
DP44mP2B05	G	C..	C	.	.	.
DP43jR6H11	G	C..	C	.	.	.
DP43jR6A11	G	C..	C	.	.	.
DP42eR7D05	G	C..	.	.	T	.	.	C	.	.	.
DP42eP4G12	G	C..	C	.	.	.
DP41eP4H11	G	C..	.	.	T	.	.	C	.	.	.
DP41eP4B11	G	C..	C	.	.	.
DP40fpP2B10	G	C..	C	.	.	.
DP40fpP2A10	G	C..	.	.	T	.	.	C	.	.	.
DP39aR7H04	G	C..	.	.	T	.	.	C	.	.	.
DP39aP4H10	G	C..	.	.	T	.	.	C	.	.	.
DP37cR7E03	G	C..	C	.	.	.
DP37cP4C09	G	C..	C	.	.	.
DP36jR6C04	G	C..	.	.	T	.	.	C	.	.	.
DP36jP4H08	G	C..	C	.	.	.
DP351R6B09	G	C..	C	.	.	.
DP351P2A09	G	C..	C	.	.	.
DP34jR1F10	G	C..	C	.	.	.

DP34jR1B10	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP33gP2B07	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP33gP2A07	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP32eR1D04	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP32eRIA04	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP31fP1H10	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP30bR1B03	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP30bRIA03	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP28bP4H07	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP28bP4A07	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP27mP4G06	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP27mP4B06	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP26mP2G06	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP26mP2F06	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP25jR7A11	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP24gR1B07	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP24gRIA07	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP23eR1B02	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP23eRIA02	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP22fr7E10	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP21aR7F07	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP21aR7A07	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP20c14296	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP20cP1F07	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP19cP4G05	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP19cP4C05	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP18mP4G04	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP18mP4A04	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP171R2B01	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP171P2C03	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP16eP4A03	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP14eP2C12	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP14eP2B12	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP13fP1B06	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP12bP1E05	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP11cR7G06	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP10aP1H04	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP10aP1D04	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP09mRLG05	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP09mP2A02	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP081R1B05	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP081RIA05	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP06gR7C01	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP04aR6A06	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP04aP1A03	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP03bR6H12	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP03bR6F12	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP02cP1A02	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP01aR6B05	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
DP01aP1A01	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac49g	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac49a	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac47c	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac47a	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac46g	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac46a	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac44d	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac44a	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac41i	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.
AndMac41a	G C.	.	.	.	T	.	.	C	.

AndMac40v	G	C	T	.	.	.	C	.	.	
AndMac40a	G	C	T	.	.	.	C	.	.
AndMac39f	G	C	C	.	.	
AndMac39a	G	C	C	.	.	
AndMac38j	G	C	T	.	.	C	.	.	
AndMac38a	G	C	C	.	.	
AndMac37o	G	C	C	.	.	
AndMac37g	G	C	C	.	.	
AndMac28r	G	C	C	.	.	
AndMac28b	G	C	T	.	.	C	.	.	
AndMac26b	G	C	T	.	.	C	.	.	
AndMac25f	G	C	T	.	.	C	.	.	
AndMac25a	G	C	C	.	.	
AndMac16l	G	C	T	.	.	C	.	.	
AndMac16a	G	C	T	.	.	C	.	.	
AndMac14d	G	C	C	.	.	
AndMac14a	G	C	C	.	.	
AndMac11i	G	C	T	.	.	C	.	.	
AndMac11a	G	C	C	.	.	

Intron 2:

4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	4555555555	
0111111111	1222222222	2333333333	3444444444	4555555555	5666666666	6777777777	7888888888	8999999999	9000000000						
9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678		
Analb	GTAAGTACAC	TGTGTGAAAG	CGGTAGCTAC	TAATTGGGGA	ACTTTCCGT	ATCGCATTTC	ACGATTCACT	CTACCGGAAT	CATGCAACGC	ACTCCATCC					
Anmar28hG.C.G.C.							T.A.			
Anmar28aG.C.G.C.							T.A.			
Anmar27gG.C.G.C.							T.A.			
Anmar27aG.C.G.C.							T.A.			
Anmar18gG.C.G.C.							T.				
Anmar18aG.C.G.C.							T.				
Anmar16gG.C.G.C.							T.A.			
Anmar16aG.C.G.C.							T.A.			
Anmar14gG.C.G.C-.							T.A.			
Anmar14aG.C.G.C-.							T.A.			
Anmar13bG.C.G.C.							T.A.			
Anmar13aG.C.G.C.							T.A.			
Anmar11jG.C.G.C.							T.				
Anmar11bG.C.G.T..C.							T.				
Anmar10cG.C.G.C.							T.				
Anmar10aG.C.G.C.							T.				
Anmar09cG.C.G.C.							T.A.			
Anmar09bG.C.G.C.							T.				
Anmar07bG.C.G.C.							T.				
Anmar07aG.C.G.C.							T.				
Anmar06cG.C.G.C.							T.				
Anmar06aG.C.G.C.							T.				
Anmar05cG.C.G.C.							T.A.			
Anmar05aG.C.G.C-.							T.A.			
Anmar04iG.C.G.C.							T.				
Anmar04bG.C.G.C.							T.				
Anmar03gG.C.G.C.							T.A.			
Anmar03aG.C.G.C.							T.A.			
Anmar02fG.C.G.C.							T.				
Anmar02aG.C.G.C.							T.A.			
Anmar01hG.C.G.C.							T.				
Anmar01cG.C.G.C.							T.				
DP451R7H08	..G.A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP451R7B08	..G.A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP44mR1A08	..G.A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP44mP2B05	..G.A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP43jR6H11	..G.A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP43jR6A11	..G.A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP42eR7D05	..G.A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP42eP4G12	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP41eP4H11	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP41eP4B11	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP40fp2B10	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP40fp2A10	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP39aR7H04	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP39aP4H10	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP37cR7E03	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP37cP4C09	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP36jR6C04	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP36jP4H08	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP351R6B09	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP351P2A09	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.
DP34jR1F10	..G.G....A.C.G.A.							G.T.T...GT.A.	TCA....T.T.

DP34jR1B10	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP33gP2B07	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP33gP2A07	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP32eR1D04	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.T.A.	TCA...T..T.	.
DP32eRIA04	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP31fP1H10	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP30bR1B03	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP30bRIA03	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP28bP4H07	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP28bP4A07	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP27mP4G06	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP27mP4B06	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP26mP2G06	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP26mP2F06	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP25jR7A11	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP24gR1B07	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP24gRIA07	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP23eR1B02	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP23eRIA02	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP22fR7E10	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP21aR7F07	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP21aR7A07	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP20c14296	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP20cP1F07	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP19cP4G05	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP19cP4C05	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP18mP4G04	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP18mP4A04	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP171R2B01	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP171P2C03	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP16eP4A03	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP14eP2C12	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	CG..T.T..GT.	.T.A.	TCA...T..T.	.
DP14eP2B12	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..G..T.T..G..	.T.A.	TCA...T..T.	.
DP13fP1B06	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP12bP1E05	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP11cR7G06	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP10aP1H04	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP10aP1D04	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP09mRIG05	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP09mP2A02	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP081R1B05	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP081RIA05	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP06gR7C01	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP04aR6A06	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP04aP1A03	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP03bR6H12	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP03bR6F12	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP02cP1A02	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP01aR6B05	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
DP01aP1A01	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac49g	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac49a	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac47c	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac47a	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac46g	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac46a	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac44d	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac44a	.G.....G..A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac41i	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.
AndMac41a	.G.....A.C.G..	.A.	.	.	G..T.T..GT.	.A.	TCA...T..T.	.

AndMac40v	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac40a	..G.....A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac39f	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac39a	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac38j	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac38a	..G.....A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac37o	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac37g	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac28r	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac28b	..G.....A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac26b	..G.....A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac25f	..G.....A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac25a	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac16l	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac16a	..G.....A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac14d	..G.....G ..A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac14a	..G.....A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac11i	..G.....A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.
AndMac11a	..G.....A.C.G..A..G..	.T.T...GT.A...	TCA....T..T.

Intron 2 (continuação):

AndMac41a	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....C.....A.....
AndMac40v	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac40a	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.A.....C.....C.....A.....
AndMac39f	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac39a	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac38j	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac38a	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac37o	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac37g	.T,-----.. .-AA...--- -C.....A ..G.....	.T,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac28r	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac28b	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac26b	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.A.....C.....C.....A.....
AndMac25f	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac25a	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac161	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac16a	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac14d	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac14a	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac11i	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....
AndMac11a	.T,-----.. .-AA...--- -C.....AT,-A..C.. G.A.....C	C.....C.....C.....A.....

Intron 2 (continuação):

Intron 2 (continuação) :

```

7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777 7777777777
0000111111 1111222222 2222333333 3333444444 4444555555 5555666666
6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345 6789012345
Analb AGCCATCGGA GACTCATTGT A-----AT- --GTTCTTTT TCTATGTATC GTCACTATG
Anmar28h -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar28a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar27g -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar27a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar18g -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar18a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar16g -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar16a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar14g -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar14a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar13b -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar13a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar11j -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar11b -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar10c -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar10a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar09c -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar09b -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar07b -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar07a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar06c -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar06a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar05c -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar05a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar04i -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar04b -----.....C .TTTATG.A TC....A.. -.... .
Anmar03g -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar03a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar02f -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar02a -----.....C .-----G.- --....A.. -.... .
Anmar01h -----.....C .TTTATG.A TC....A.. -.... .
Anmar01c -----.....C .TTTATG.A TC....A.. -.... .
DP451R7H08 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP451R7B08 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP44mR1A08 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP44mP2B05 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP43jR6H11 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP43jR6A11 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP42eR7D05 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP42eP4G12 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP41eP4H11 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP41eP4B11 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP40fpP2B10 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP40fpP2A10 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP39aR7H04 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP39aP4H10 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP37cR7B03 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP37cP4C09 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP36jR6C04 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP36jP4H08 .A.G..T... A.....AC .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP351R6B09 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..
DP351P2A09 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-. .C....AT ...G..C..

```

DP34jR1F10 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP34jR1B10 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP33gP2B07 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP33gP2A07 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP32eRID04 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP32eRIA04 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP31fPIH10 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP30bR1B03 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP30bR1A03 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP28bP4H07 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP28bP4A07 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP27mP4G06 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP27mP4B06 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP26mP2G06 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP26mP2F06 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP25jR7A11 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP24gR1B07 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP24gR1A07 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP23eR1B02 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP23eR1A02 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- C.C....AT ...G..C..
 DP22fR7E10 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP21aR7F07 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP21aR7A07 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP20cI4296 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP20cP1F07 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP19cP4G05 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP19cP4C05 .A.G..T...A.....AC .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP18mP4G04 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP18mP4A04 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP17lR2B01 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP17lP2C03 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP16eP4A03 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP14eP2C12 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP14eP2B12 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP13fP1B06 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP12bP1E05 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP11cR7G06 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP10aP1H04 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP10aP1D04 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP09mR1G05 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP09mP2A02 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP081R1B05 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP081R1A05 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP06gR7C01 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP04aR6A06 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP04aP1A03 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP03bR6H12 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP03bR6F12 .A.G..T...A.....AC .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP02cP1A02 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP01aR6B05 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 DP01aP1A01 .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 AndMac49g .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 AndMac49a .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 AndMac47c .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 AndMac47a .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 AndMac46g .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 AndMac46a .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 AndMac44d .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 AndMac44a .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..
 AndMac41i .A.G..T...A.....C .-----.- --....- ..C....AT ...G..C..

```

AndMac41a .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac40v .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac40a .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac39f .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac39a .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac38j .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac38a .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac37o .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac37g .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac28r .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac28b .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac26b .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac25f .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac25a .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac161 .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac16a .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac14d .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac14a .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac11i .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..
AndMac11a .A.G..T... A.....C .-----.- --....-.. C....AT ...G..C..

```

Anexo III: Alinhamento de todas as seqüências (consensos representando um ou dois alelos por indivíduo) do fragmento *timeless* analisadas nas populações estudadas nesse trabalho. Os pontos representam identidade com os nucleotídeos da primeira seqüência e os traços indicam os *gaps* encontrados nas regiões dos introns. O codon marcado em vermelho representa a substituição não-sinônima encontrada no 2º exon de um dos indivíduos de *An. darlingi* coletados em Portchuelo. As seqüências que começam com **AndMac** representam os indivíduos de *An. darlingi* coletados em Macapá; aquelas com **DP** representam indivíduos de *An. darlingi* coletados em Portchuelo; **Anmar** indica seqüências de indivíduos da espécie *An. marajoara*; e, finalmente, **Analb** é a seqüência de *An. albitalis s.s.*

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)