

Amanda Neves

Estudos moleculares de *Anopheles albitarsis* e *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) capturados em criadouro na planície de inundação do Mato Grosso do Sul, Brasil

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Rosely dos Santos Malafrente

São Paulo

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Neves, Amanda

Estudos moleculares de *Anopheles albitarsis* e *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) capturados em criadouro na planície de inundação do Mato Grosso do Sul, Brasil / Amanda Neves. -- São Paulo, 2009.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Rosely dos Santos Malafronte.

Descritores: 1.*Anopheles albitarsis* 2.*Anopheles triannulatus* 3.Insetos vetores
4.Malária 5.DNA espaçador ribossômico 6.DNA mitocondrial 7.Reação em
cadeia da polymerase

USP/FM/SBD-433/09

“Aos meus pais Claudio e Vania,
por serem tudo em minha vida”.

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seus semelhantes”.

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Rosely Malafronte por me ajudar a trilhar esse caminho tão difícil, sempre me apoiando e mostrando os meus erros e acertos.

Ao Dr. Mauro Marrelli pela valorosa colaboração no projeto.

À Dra. Rosa Maria Tubaki da SUCEN que me ensinou tudo sobre mosquitos e por me fornecer as amostras para esse projeto.

À equipe do laboratório de Entomologia Médica da SUCEN, Dra. Regiane Tirone de Menezes e Dr. Luis Mucci pelo convívio agradável e sempre dispostos a ajudar quando preciso.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Delsio Natal, Prof. Paulo Urbinatti e Dra. Ana Maria Duarte, pelas importantes críticas e sugestões ao projeto.

Aos funcionários do IMT, em especial Luciano Monteiro pela presteza e eficiência sempre em que necessitava de sua ajuda.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Marinotti pela ajuda nas clonagens e seqüenciamentos.

Às minhas queridas amigas e companheiras de laboratório, Byanca Regina de Paiva, Isabel Cristina Alves, Luana Dias de Souza, Eliane Janez e Tasciane Yamasaki, que com os seus preciosos

conhecimentos em informática me ajudou na formatação dessa dissertação. O que seria da minha tese sem você?

À minha amiga Fabiana Vesgueiro que me ensinou a mexer em programas de seqüenciamento que eu não tinha noção sequer que existiam.

Às secretárias da pós-graduação do departamento de Moléstias Infecciosas, Roseli e Vânia pela paciência em que tiveram com as minhas intermináveis dúvidas e perguntas.

Aos meus irmãos Erika, Fernando e Bruna e minha sobrinha Gabriela pelo carinho.

Ao meu pai Claudio e minha mãe Vania por todo amor e dedicação.

Ao meu noivo Celso Montero pelo companheirismo e cumplicidade.

Aos meus queridíssimos Bartholomeu (*in memorian*), Gilda Maria e Theodoro, mais conhecido como “Miento”, pela alegria constante em minha vida.

E a todos que de alguma forma contribuíram pela elaboração desse projeto. Muito Obrigada!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. I. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 2a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Malária	01
1.2 Situação da malária no Brasil	03
1.3 Parasitas da malária	05
1.4 Vetores da malária	06
1.5 <i>Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis</i> e <i>Anopheles</i> <i>(Nyssorhynchus) triannulatus</i>	08
1.6 Espécies crípticas	12
1.7 Estudos moleculares	13
1.8 DNA ribossômico (DNAr)	15
1.9 DNA mitocondrial (DNAm)	18
1.10 PCR – RFLP (Polymerase chain reaction – Restriction Fragment length polymorphism).....	21
1.11 Justificativa	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral	24

2.2 Específico	24
3. MÉTODOS	25
3.1 Área de estudo	25
3.2 Coletas de exemplares	26
3.3 Análises moleculares.....	28
3.3.1 Extração de DNA de mosquito	28
3.3.2 Amplificação de ITS2 (DNAr).....	29
3.3.3 Amplificação de ND4 (DNAmt)	30
3.3.4 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)	31
3.3.5 Digestão dos fragmentos	32
3.3.6 Clonagens dos fragmentos (ITS2).....	33
3.3.7 Seqüenciamento dos fragmentos (ITS2 e ND4)	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Amostragem de insetos	37
4.2 Complexo Albitarsis	37
4.2.1 Amplificação do fragmento do ITS2 para <i>An. albitarsis</i> s.l.	37
4.3 RFLP – ITS2	38
4.3.1 Padrão de restrição	39
4.3.2 Enzima <i>Sall</i>	40
4.3.3 Enzima <i>TaqI</i>	41
4.4 Padronização da temperatura de “annealing” para DNAmt.....	44
4.5 Amplificação do fragmento de ND4	45

4.6 RFLP – ND4	46
4.6.1 Enzima <i>SspI</i>	46
4.7 Clonagem e seqüenciamento de ITS2.....	47
4.8 Seqüenciamento de ND4	49
4.9 Complexo Triannulatus.....	49
4.9.1 Amplificação do fragmento de ITS2 para <i>An. triannulatus</i>	49
4.10 RFLP para Complexo Triannulatus.....	51
4.10.1 Padrão de restrição	51
4.10.2 Enzima <i>BseNI (BsrI)</i>	52
4.11 Clonagem.....	53
4.12 Seqüenciamento.....	53
5. DISCUSSÃO.....	55
5.1 Complexo Albitarsis	61
5.2 Complexo Triannulatus.....	64
5.3 Problemática molecular e o Complexo Albitarsis.....	66
6. CONCLUSÕES.....	71
7. ANEXOS	72
Anexo A	72
Anexo B	74
Anexo C	76
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS

amp	ampicilina
CDC	center of diseases control
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAmt	DNA mitocondrial
DNAr	DNA ribossômico
dNTP	desoxinucleotídeos trifosfatos
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
et al	e outros
indels	inserções e deleções
ITS2	espaçador interno transcrito (do inglês “internal transcribed spacer 2”)
LB	Luria Bertani
MgCl ₂	cloreto de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotideo, forma reduzida
ND4	NADH desidrogenase 4
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês “polymerase chain reaction”)

pb	pares de base
pm	peso molecular
RAPD	DNA polimórfico amplificado randomicamente (do inglês “random amplified polymorphic DNA”)
RFLP	Análise de seqüências polimórficas de DNA (do inglês “restriction fragment lenght polymorphism”)
<i>s.l</i>	senso lato
<i>s.s</i>	senso stricto
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris, ácido bórico e EDTA
TE	Tris, EDTA
UV	ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Mapa de distribuição do Complexo Albitarsis.....	10
Figura 02 – Esquema do cistron ribossômico.....	17
Figura 03 – Características do DNA mitocondrial.....	20
Figura 04 – Localidade da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera.....	26
Figura 05 – Perfil de amplificação de ITS2 para <i>An. albitarsis</i> s.l.....	38
Figura 06 – Perfil de corte da enzima <i>Sall</i>	41
Figura 07 – Perfil de corte da enzima <i>TaqI</i> em gel de poliacrilamida...	42
Figura 08 – Perfil de corte da enzima <i>TaqI</i> em gel de agarose.....	43
Figura 09 – Perfil diferente do esperado com a enzima <i>TaqI</i>	44
Figura 10 – Perfil de amplificação de DNAm _t com gradiente para temperatura de “annealing”.....	45
Figura 11 – Perfil de amplificação do gene ND4.....	46
Figura 12 – Perfil de corte da enzima <i>SspI</i>	47
Figura 13 – Perfil de amplificação de ITS2 para <i>An. triannulatus</i> s.l...	50
Figura 14 – Perfil de corte da enzima <i>BseNI</i> (<i>BsrI</i>).....	52

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	microlitro
μM	micromolar
mM	milimolar
M	molar
mg/ml	miligrama por mililitro
ml	mililitro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
U	unidade
v/v	volume a volume

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Espécies do Complexo Albitarsis e o número correspondente ao GeneBank.....	39
Tabela 02 – Discriminação das enzimas utilizadas para cada espécie do Complexo Albitarsis usando RFLP.....	40
Tabela 03 – Discriminação da espécie e o número de acesso junto ao GeneBank.....	51

RESUMO

Neves, A. Estudos moleculares de *Anopheles albitarsis* e *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) capturados em criadouro na planície de inundação do Mato Grosso do Sul, Brasil [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

A malária é uma doença grave, cujos vetores são mosquitos do gênero *Anopheles*. Esse gênero é composto por cerca de 500 espécies e aproximadamente 45 são responsáveis pela transmissão do parasito em todo o mundo. Alguns destes vetores são componentes de complexo de espécies crípticas como Complexo Albitarsis e Complexo Triannulatus. O Complexo Albitarsis é formado por quatro espécies: *An. albitarsis* s.s, *An. albitarsis* B, *An. marajoara* e *An. deaneorum*. O Complexo Triannulatus é composto por três espécies: *An. triannulatus*, *An. halophylus* e *An. triannulatus* C. Algumas técnicas moleculares são utilizadas para auxiliar na distinção destas espécies crípticas. Dessa forma, DNA de *An. albitarsis* s.l e *An. triannulatus* s.l., capturados na Usina de Porto Primavera, foram amplificados para ITS2 e para o gene ND4 do DNAm. Todas as amostras foram submetidas à técnica de RFLP. Algumas amostras foram seqüenciadas diretamente ou clonadas para posterior seqüenciamento a fim de se confirmar a espécie. Das amostras do Complexo Albitarsis, 62,85% foram identificadas como *An. deaneorum* para ITS2-RFLP. As restantes foram amplificadas para ND4-RFLP e foram identificadas como *An. albitarsis* s.s. Observou-se, no entanto, que as amostras do Complexo Albitarsis não exibiram similaridade total com as depositadas no GeneBank sendo que para ITS2-PCR estas foram identificadas como *An. albitarsis* s.s. e *An. deaneorum*, enquanto que para o gene ND4 todas foram identificadas

como *An. albitarsis* B. O ITS2-RFLP para o *An. triannulatus* s.l demonstrou polimorfismos entre as espécies. No seqüenciamento, estas amostras foram similares àquelas depositadas no GeneBank. O emprego de marcadores moleculares podem, em parte, auxiliar na distinção de espécies crípticas, porém outros marcadores devem ser avaliados a fim de se elucidar a identificação do Complexo Albitarsis.

Descritores: *Anopheles albitarsis*, *Anopheles triannulatus*, Insetos vetores, DNA espaçador ribossômico, DNA mitocondrial, Reação em cadeia da polimerase.

SUMMARY

Neves, A. Molecular studies of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) captured in flood plain breeding sites in Mato Grosso do Sul, Brazil. [dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo, (Brazil); 2009.

Malaria is a severe disease whose vectors are mosquitoes belonging to the genus *Anopheles*. This genus contains 500 species of which approximately 45 are responsible for the worldwide transmission of these parasites. Some of these vectors belong to cryptic species such as those of the Albitarsis and Triannulatus Complex. The Albitarsis Complex is composed of four species: *An. albitarsis* s.s., *An. albitarsis* B, *An. marajoara* and *An. deaneorum*. The Triannulatus Complex contains three species: *An. triannulatus*, *An. halophylus* and *An. triannulatus* C. We used molecular techniques to differentiate these cryptic species. Thus, DNA of *An. albitarsis* s.l and *An. triannulatus* s.l, captured at the Porto Primavera Dam had their ITS2 and their mtDNA, ND4 genes amplified. All samples were analyzed by the RFLP technique. Some samples were directly sequenced while others were cloned for subsequent sequencing for species confirmation. Within the Albitarsis Complex, 62.85% were identified as *An. deaneorum* by RFLP-ITS2. The remaining were amplified by RFLP-ND4 and identified as *An. albitarsis* s.s. However the results of sequencing of the samples of the Albitarsis Complex did not overlap entirely with those deposited in the GeneBank since those amplified by RFLP-ITS2 were identified as *An. albitarsis* s.s. and *An. deaneorum* while those obtained by RFLP-ND4 were identified as *An. albitarsis* B. Also RFLP-ITS2 of *A. triannulatus* s.l. contained polymorphic regions among different species. By sequencing, these

samples were similar to those deposited in the GeneBank. The use of molecular markers did, in some instances help to distinguish species within cryptic complexes, however other markers need to be evaluated to elucidate further identification of the Albitarsis Complex.

Keywords: *Anopheles albitarsis*, *Anopheles triannulatus*, Insect vectors, Malaria, DNA ribosomal spacer, DNA mitochondrial, Polymerase chain reaction.

1. Introdução

1.1 Malária.

A malária é uma doença potencialmente grave cujos agentes etiológicos são protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos por meio da picada de mosquitos infectados do gênero *Anopheles* (Cives, 2008). Está entre as doenças de maior importância em saúde pública atingindo países de clima tropical e outras regiões de clima temperado. Cerca de 40% da população mundial vive em regiões de transmissão da doença. (WHO, 2006).

Poucas doenças infecciosas apresentam impacto semelhante ao da malária no desenvolvimento social e econômico da humanidade. Evidências indicam que, assim como o homem primitivo, a malária seja originária da África e que o ciclo vetor-hospedeiro tenha se estabelecido na pré-história. Fósseis de mosquitos foram encontrados em camadas geológicas datadas de 30 milhões de anos e não há dúvida que eles foram responsáveis pela distribuição da infecção pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Stringer e Andrews, 1988).

A malária teria de expandido para a Europa e para a Ásia, acompanhando a migração humana, chegando assim, provavelmente às Américas (Bruce-Chwatt, 1985; Stringer e Andrews, 1988).

Apesar dos esforços para controlar a doença, a malária continua em expansão com grande potencial de disseminação entre populações rurais e urbanas de 53 países da África, 21 nas Américas, 4 na Europa, 14 na região leste do Mediterrâneo, 8 ao sudeste da Ásia e 9 à oeste do Pacífico (Bruce-Chwatt, 1985; WHO, 1994, 1996). Na África sub-Sahariana a doença está em franco crescimento, devido, principalmente, à resistência às drogas e inseticidas assim como às mudanças sociais e ambientais (Greenwood e Mutabingwa, 2002).

Estima-se que 300 a 500 milhões de pessoas sejam infectadas a cada ano e que 1,5 a 2,7 milhões de pessoas, em média, morrem desta doença nos trópicos. Mais de 90% dos casos concentram-se no continente africano. A doença acomete principalmente crianças, adultos jovens economicamente ativos, mulheres grávidas e grupos itinerantes internacionais, os quais entram e saem constantemente das diversas áreas endêmicas. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em regiões rurais africanas, a malária é responsável pelo óbito de uma criança a cada 30 segundos. Em números absolutos, isto significa a morte de três mil crianças por dia. Pesquisas realizadas em Gâmbia, Gana, Quênia e Burkina Faso demonstram que aproximadamente 30% dessas mortes poderiam ser evitadas com o emprego de mosquiteiros impregnados com inseticidas (WHO, 2000).

Nas Américas, 21 países apresentaram transmissão ativa da doença, dentre eles, Equador, Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Haiti, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela (PAHO, 1998).

1.2 Situação da Malária no Brasil

A transmissão da malária no Brasil está concentrada na Amazônia Legal, onde são registrados 99,5% do total dos casos. Essa região é composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, e totaliza 807 municípios (Portal da Saúde, 2009).

O número de casos notificados aumentou cerca de três vezes ao longo da década de 1980, chegando a aproximadamente 600.000 casos por ano. Tal quadro é conseqüência do influxo migratório para as regiões malarígenas como resultado de assentamentos agrícolas e atividades de mineração como também problemas relacionados ao transporte, acesso aos cuidados de saúde, isolamento das comunidades, longas distâncias e escassos recursos econômicos, o que torna o controle da malária extremamente difícil (Voorhan *et al.*, 1993).

Segundo dados da Fundação Nacional de Saúde - FUNASA (Boletim Epidemiológico da Malária nº 01/2003), durante o período de janeiro a agosto de 2003, observou-se uma redução de 13,7% no número de casos (208.718), comparando-se ao mesmo período do ano de 2002 (241.806). Constatou-se que seis Estados apresentaram redução no número de casos no período: Maranhão (65,2%), Pará (45,9%), Amapá (43,9%), Roraima (34,3%), Acre (22,1%) e Mato Grosso (19,7%). Porém, observou-se desempenho negativo em três unidades federadas, as quais registraram aumento na incidência da doença: Amazonas (77,2%), Tocantins (16,3%) e Rondônia (3,2%).

Já no ano de 2006, o Brasil registrou 545.696 casos de malária, sendo a espécie *Plasmodium vivax* de maior incidência (73,4%). Na região da Amazônia Legal foram identificados 90 municípios como sendo de alto risco para a malária, ou seja, com um Índice Parasitário Anual (IPA) igual ou maior a 50 casos por 1.000 habitantes (Portal da Saúde, 2009).

Na Região Extra-amazônica, no ano de 2003, registrou-se um surto de malária nos Estados de Minas Gerais e Bahia. Situação menos grave que no ano de 2002, quando ocorreram surtos nos Estados do Piauí (9 casos), Ceará (402 casos), Bahia (14 casos), Paraná (106 casos) e Mato Grosso do Sul (38 casos). A falta de notificação destes casos contribuiu para o agravamento do controle da doença na região.

O principal desafio na Região Extra-amazônica é o controle dos casos autóctones esporádicos que ocorrem em áreas focais restritas. Destacam-se os municípios localizados às margens do lago da usina hidrelétrica de Itaipu, áreas cobertas pela Mata Atlântica nos Estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia, na região centro-oeste, os Estados de Goiás e Mato Grosso do Sul (Boletim Epidemiológico da Malária nº 01/2003).

1.3 Parasitas da malária.

A malária é uma doença infecciosa cujo agente etiológico é um protozoário do gênero *Plasmodium*, da família *Plasmodiidae*, classe *Sporozoa*, filo *Apicomplexa*, que infecta alternadamente um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (Rey, 2000).

Quatro espécies do gênero *Plasmodium* são reconhecidas como agentes etiológicos da malária humana: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. A primeira espécie é a mais patogênica, resultando em infecções graves com alto índice de mortalidade. O parasito, no hospedeiro, realiza o ciclo assexuado (esquizogonia) em hepatócitos e hemácias sendo que o ciclo sexuado (esporogônico) é realizado nos mosquitos (Rey, 1991).

Estudos recentes relatam que uma grande proporção de pacientes albergam simultaneamente mais de uma espécie de plasmódio. Tal informação e algumas diferenças biológicas entre os plasmódios humanos despertaram o interesse pelo estudo dos padrões de interação entre diferentes espécies e suas conseqüências clínicas e epidemiológicas (Brown *et al.*,1991).

1.4 Vetores da Malária

O parasito da malária humana é transmitido por mosquitos anofelíneos, sendo que somente as fêmeas são hematófagas e, por isso, exercem o papel de vetor (Rey, 2000).

Os anofelíneos pertencem a ordem Diptera, família Culicidae e gênero *Anopheles*. Este gênero é composto aproximadamente de 500 espécies distribuídas em todo o mundo, exceto na Antártica (Krzwinski e Besansky, 2003) e aproximadamente 45 são responsáveis pela transmissão do plasmódio em todo o mundo (Forattini, 2002).

Os anofelíneos possuem desenvolvimento holometabolo, ou seja, sua metamorfose é completa, ovo, larva, pupa e adulto, sendo que as larvas possuem quatro estadios. Com exceção do desenvolvimento do adulto, todos os outros estadios são aquáticos. (Forattini, 2002)

As espécies de anofelíneos neotropicais estão classificadas em 5 subgêneros: *Nyssorhynchus*, *Kerteszia*, *Anopheles*, *Stethomyia* e *Lophopodomys* (Faran e Linthicum 1981; Wilkerson e Sallum 1999), mas os vetores do parasito são encontrados apenas nos 3 primeiros subgêneros.

Ao longo da década de 80, somente três espécies brasileiras do subgênero *Nyssorhynchus* eram consideradas como vetores importantes do parasito: *An. darlingi*, *An. aquasalis* e Complexo *Albitarsis* (Tadei *et al.*, 1998).

O *Anopheles (Nys.) darlingi* é o principal vetor do parasito na bacia Amazônica (Deane 1947, 1988). Tendo em vista seu papel como principal transmissor do *Plasmodium falciparum* esse anofelíneo também é responsável pela transmissão de outras espécies de plasmódio (Klein *et al.*, 1991). A sua distribuição geográfica e densidade estão intimamente relacionadas com a doença, esse anofelíneo é freqüentemente encontrado infectado com o parasito e às vezes com mais de um tipo de plasmódio (Tadei *et al.*, 1998).

Nas regiões de Mata Atlântica, *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Dyar e Knab, 1908) e *An. (Ker.) bellator* (Dyar e Knab, 1906) são as espécies responsáveis pela transmissão de malária por *Plasmodium vivax*, sendo que *An. (Ker.) cruzii* é encontrado em maior abundância (Rachou, 1958; Forattini *et al.*, 1986).

O período de transmissibilidade da doença pode ocorrer de 10 a 20 dias após o repasto sanguíneo em uma pessoa infectada, passando a transmiti-lo por toda sua vida que é de cerca de 25 a 30 dias. SUCEN (<http://www.sucen.sp.gov.br/>).

1.5 *Anopheles (Nyssorhynchus) triannulatus* e *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis*.

Anopheles (Nys) triannulatus s.l e *An.(Nys) albitarsis* s.l são complexos de espécies que apresentam ampla distribuição no Brasil. Devido às variações comportamentais dos anofelíneos destes complexos em toda sua área de distribuição, os aspectos potenciais de suas capacidades vetoriais não estão devidamente caracterizados.

Anopheles triannulatus s.l. e *An. albitarsis* s.l. são considerados vetores secundários da malária no Brasil a partir de evidências relacionadas com sua competência e capacidade vetorial em uma série de localidades (Klein *et al.*, 1991, 1991a).

Anopheles albitarsis s.l corresponde a um complexo formado por quatro espécies: *An. albitarsis* s.s, *An.albitarsis* s.l (espécie “B”), *An. marajoara* e *An. deaneorum*. Wilkerson *et al.*, (1995b) indicaram que as quatro espécies estão presentes na região meridional do país. A

distribuição de *An. marajoara* (= *An. albitarsis domesticus*) estaria restrita à área litorânea e norte do país (Forattini 2002; Conn *et al.*, 2002). O reconhecimento deste complexo já ocorre há algum tempo.

O *Anopheles albitarsis* s.l possui uma ampla distribuição no Brasil (figura 01). No continente americano são encontrados no nordeste da Argentina, Uruguai, Paraguai, Venezuela, Guianas, Colômbia, Panamá, Costa Rica, Honduras, Guatemala e Trinidad-Tobago. Não ocorre no Ocidente Sul americano (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Esses anofelíneos não possuem preferência por criadouros, podendo ser permanentes ou não, porém as larvas são mais abundantes nas lagoas com capim, de água doce e limpa. Os criadouros são ensolarados, porém protegidos pela vegetação (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

O *An. albitarsis* s.l é essencialmente exofílico e zoofílico podendo ser encontrado no ambiente intra-domiciliar.

Esse anofelíneo apresenta algumas variações morfológicas, bioquímicas e/ou moleculares e comportamental que refletem uma heterogeneidade em seu papel vetorial sendo considerado, por alguns autores, um complexo de espécies crípticas. Infecções por oocistos correspondentes às espécies de *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* foram detectadas, nestas espécies, por meio da técnica imunoenzimática ELISA (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1998).

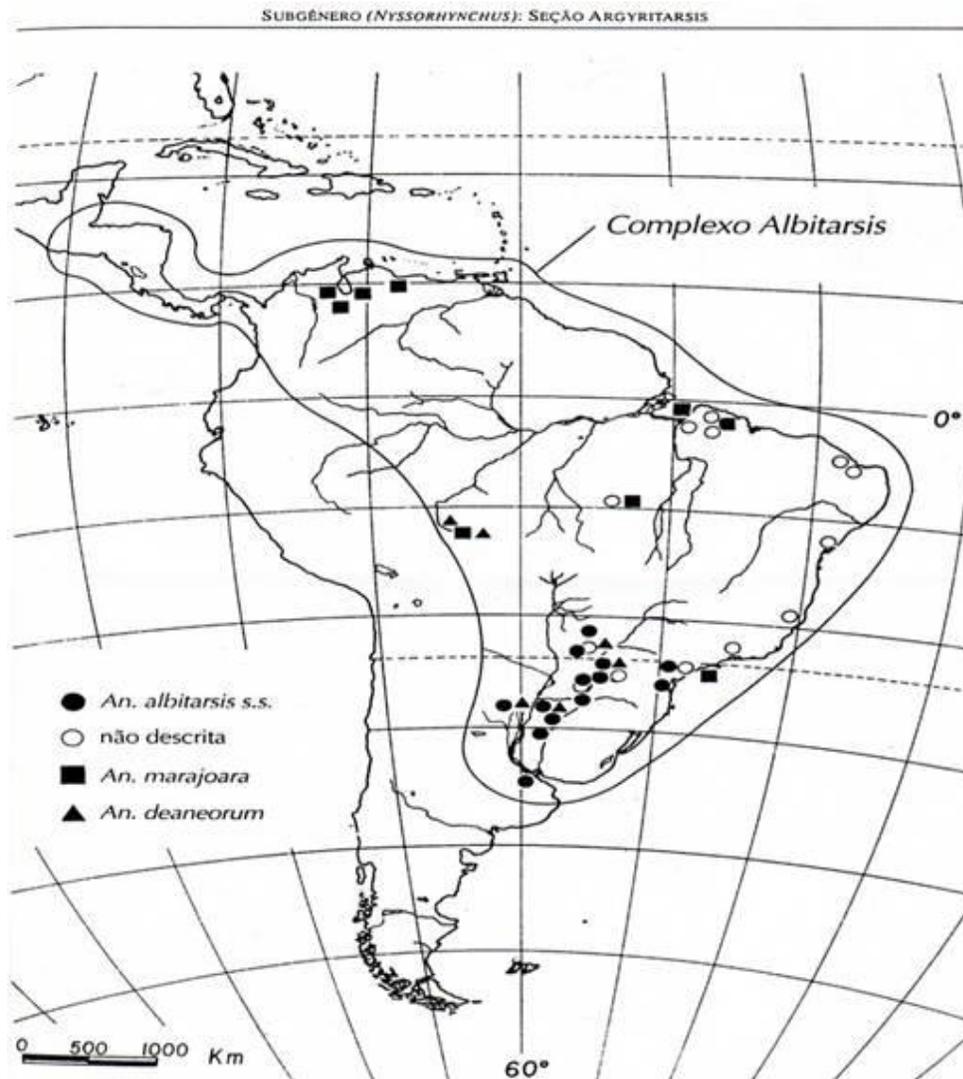


Figura 1: Mapa de distribuição do Complexo Albitarsis. (Forattini, 2002)

Embora *Anopheles triannulatus* tenha sido descrita anteriormente em *An. triannulatus triannulatus* e *An. triannulatus davisii* (Galvão e Lane 1941), estudos recentes acrescentaram informações ao polimorfismo deste complexo (Santos *et al.*, 2004, Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira, 2002).

Segundo Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira (2007) o Complexo *Triannulatus* consiste em três espécies: *Anopheles triannulatus* s.s (Neiva e Pinto), *Anopheles halophylus* (Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira) e uma terceira espécie denominada apenas de *Anopheles triannulatus* “C”.

Particularmente depois da década de 40, o *An. triannulatus* foi considerado espécie polimórfica (Pinto 1939; Galvão 1940; Galvão e Lane 1941; Deane *et al.*, 1947a,b; Forattini *et al.*, 1962 e Faran 1980) ou complexo de espécies crípticas (Rosa-Freitas *et al.*, 1998) devido a variação morfológicas encontradas nas formas adultas e imaturas, especialmente no Brasil.

A distribuição do *An. triannulatus* s.l engloba, predominantemente, a América do Sul, indo do leste da cordilheira dos Andes até o norte da Argentina. Na América Central sua distribuição vai até a Nicarágua (Forattini, 2002).

As formas imaturas são encontradas em criadouros grandes de caráter permanente, com bastante exposição à luz e com abundante vegetação aquática. Essas características correspondem a lagoas, remansos de rios etc. Os criadouros são de água doce sendo que suas larvas não são encontradas em água salobra (Berti *et al.*, 1993).

O comportamento das fêmeas de *An. triannulatus* s.l é essencialmente exofilico e zoofilico, pouco freqüentam o ambiente intra-

domiciliar sendo comumente encontradas nas proximidades da mata (Charlwood e Wilkes, 1981; Arruda *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1991).

Em virtude dessa exofilia e zoofilia, essa espécie não é responsabilizada como vetora do plasmódio, a não ser em condições de elevada densidade. No entanto, a detecção de infecções em condições naturais, foi relatada por meio de disseções e outras técnicas de diagnósticos imunológicos. Assim, em algumas localidades do Estado do Pará, verificou-se ser esta espécie vetor em potencial para, pelo menos, *Plasmodium vivax*. (Arruda *et al.*, 1986). Entretanto, trata-se de um anofelíneo que tem papel vetor nas áreas do continente sul – americano. (Forattini, 2002).

1.6 Espécies Crípticas.

Espécies que são proximamente relacionadas, porém se reproduzem isoladamente e que aparentam ser uma mesma espécie, mesmo para especialistas, são chamadas de espécies crípticas ou “sibling” (Black IV e Munstermann, 1996).

Complexo de espécies crípticas é denominado ao conjunto de espécies que apresentam características morfológicas idênticas ou

semelhantes, de tal modo que torne difícil a sua identificação (Black IV e Munstermann, 1996; Collins e Paskewitz, 1996).

Estudos sobre esses complexos são de grande importância, visto que muitas espécies são simpátricas, isto é, convivem em uma mesma região. Sabe-se que pode existir diferenças biológicas e ecológicas, tais como competência e capacidade vetorial, resistência a inseticidas, preferência de hospedeiro, hábitos comportamentais, entre outros (Black IV e Munstermann, 1996). Portanto, nem todas as espécies do complexo podem ser consideradas vetoras.

A correta identificação destas contribui para o entendimento da dinâmica da doença, bem como para o sucesso dos programas implantados para o controle de vetores.

1.7 Estudos moleculares.

Durante as primeiras décadas do século passado os esforços para entender e controlar a transmissão da malária levou a uma importante descoberta: muitos anofelíneos que antes eram identificados como espécies monotípicas, na realidade, constituíam um complexo de várias espécies com características morfológicas de difícil distinção ou que apresentavam características que se sobrepunham. A elucidação

taxonômica desses complexos pode ajudar a solucionar problemas na epidemiologia da transmissão da malária ou em medidas de controle, já que diferentes espécies dentro de um complexo exibem diferenças na ecologia, podendo apresentar variações quanto à capacidade vetorial e a resposta a medidas de controle (White, 1982).

O número de espécies de anofelíneos, atualmente, é cerca de 500, sendo que a maioria destes pertencem a complexos de espécies morfológicamente semelhantes (Davidson, 1964; Peyton, 1990; Rosa-Freitas *et al.*, 1998). Para muitos destes complexos, os problemas com identificação foi resolvido a partir do desenvolvimento de metodologias moleculares.

Estudos baseados em técnicas moleculares, mais propriamente na molécula de DNA, freqüentemente oferecem vantagens sobre outros métodos, possibilitando a identificação em todos os estágios de desenvolvimento do inseto e de ambos os sexos, uma vez que o DNA permanece constante independentemente do estágio de desenvolvimento. A estabilidade da molécula de DNA permite a utilização de mosquitos preservados em isopropanol, secos em sílica, frescos ou congelados, não criando problemas para armazenamento do material a ser analisado. Além disso, métodos baseados em DNA geralmente apresentam resultados mais confiáveis e reprodutíveis.

1.8 DNA ribossômico (DNAr).

Uma das técnicas utilizadas na diferenciação de espécies crípticas é o estudo de genes do DNA ribossômico (DNAr) presente no genoma de mosquitos com aproximadamente 500 cópias (Collins *et al.*, 1987; Mclain e Collins 1989; Paskewitz *et al.*, 1993a). O DNAr foi escolhido por muitos pesquisadores para a elaboração de métodos de identificação em mosquitos (Collins *et al.*, 1987; Mclain e Collins 1989a; Porter e Collins 1991; Paskewitz *et al.*, 1993a, Scott *et al.*, 1993, Beebe e Saul 1995; Cornel *et al.*, 1996; Beebe *et al.*, 1999).

Estes genes estão normalmente arranjados em unidades repetidas, denominadas de cístron ribossômico, estando presente em muitas cópias, o que faz deles alvos excelentes para o desenvolvimento da sistemática molecular e para o estudo das relações filogenéticas (Campbell *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1996; Besansky *et al.*, 1994). Cada unidade do cístron de um DNAr contém genes que codificam para as subunidades 18S, 5.8S e 28S do ribossomo, assim como um espaçador externo transcrito (ETS) e dois espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) (Fedoroff, 1979). Um espaçador intergênico variável (IGS) alterna-se com as seqüências transcritas.

Os espaçadores internos transcritos (internal transcribed spacer – ITS1 e ITS2) estão localizados entre os genes 18S e 5.8S (ITS1) e entre o

5.8S e 28S (ITS2), como mostra a figura 2, cuja evolução é muito mais rápida do que as regiões codificadoras para o RNAr. Uma vez que as substituições não causam efeitos letais ao organismo; as mutações observadas são neutras (Besansky e Collins, 1992; Black IV e Munstermann, 1996; Knudson *et al.*, 1996; Hwang e Kim, 1999).

Apesar das regiões codificadoras do RNAr serem fundamentais na construção e funcionamento do ribossomo e conservadas dentro das espécies, as regiões dos espaçadores ITS e IGS freqüentemente variam intraespecificamente em seqüência e tamanho e aparentemente não sofrem a mesma pressão seletiva.

O DNAr é um marcador bastante difundido e é considerado ideal para estudos de sistemática molecular por que é encontrado em várias cópias no genoma e possui a potencialidade de resolver divergências em seqüências codificadoras e não-codificadoras. (Black IV e Munstermann, 1996).

Pelo fato do ITS evoluir mais rápido que as seqüências codificadoras, o seu estudo é útil no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas para a identificação de muitos anofelíneos (Porter e Collins, 1991; Paskewitz *et al.*, 1993a,b; Hackett *et al.*, 2000; Manonmani *et al.*, 2001) e de outros culicídeos. (Crabtree *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1996; Severine *et al.*, 1996).

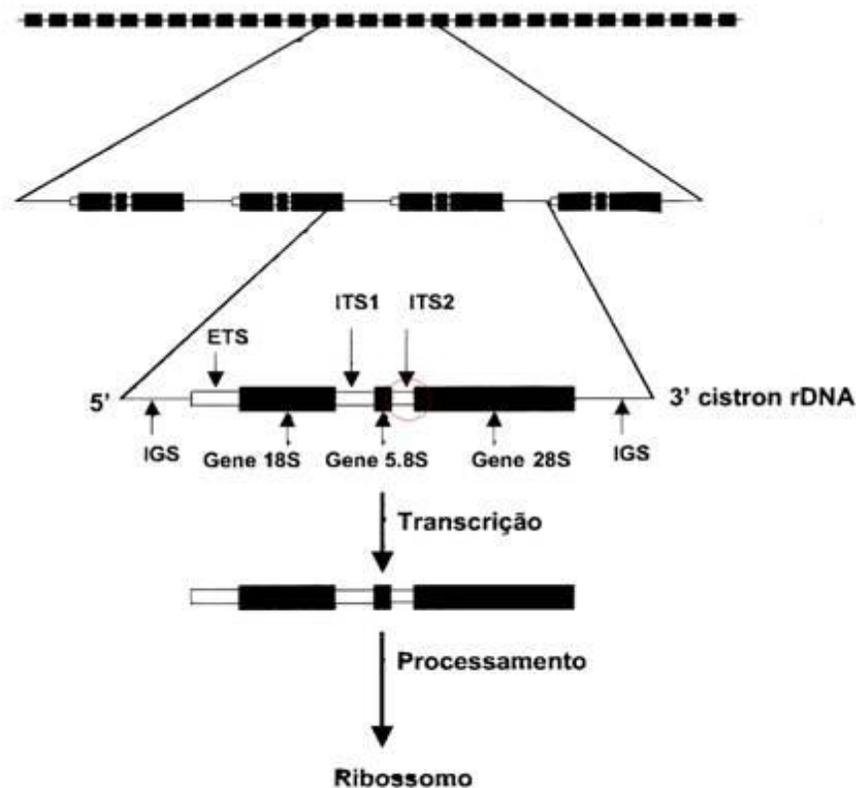


Figura 2: Esquema do cistron ribossômico, que apresenta de 150 a 1000 cópias no genoma de atropodes. Genes 18S, 5.8S e 28S, codificam para os componentes do RNA ribossômico. Espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2. Espaçadores externos transcritos (ETS), e espaçador intergênico (IGS).
Fonte: Black IV e Munstermann (1996).

Em outros estudos, as regiões espaçadoras amplificadas permitiram a distinção de membros de complexos de espécies crípticas e assim contribuíram significativamente para estudos epidemiológicos e de controle da doença. O seqüenciamento do ITS2, por exemplo, foi utilizado na distinção dos complexos *An. quadrimaculatus* (Cornel *et al.*

1996), *An maculipennis* (Porter e Collins 1991) e *An.. punctulatus* (Bebee e Saul 1995).

Outros métodos foram também empregados para a identificação de espécies crípticas. Algumas se mostraram concordantes e outras não. No Brasil e outros países, as técnicas moleculares como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Wilkerson *et al.*, 1995a, b) e DNA mitocondrial (Lehr *et al.*, 2005) mostraram incongruências quanto a espécies de *An. albitarsis* s.l. serem monofiléticas ou polifiléticas. Já resultados baseados em seqüências de ITS2 destas mesmas espécies mostraram-se coerentes com aqueles descritos para RAPD (Li e Wilkerson, 2005).

1.9 DNA mitocondrial (DNAm_t)

O DNA mitocondrial (DNAm_t) foi descrito em 1960 e é utilizado como importante ferramenta na análise genética de populações de insetos.

Seu tamanho varia em média de 14 a 17 kb, porém variações acima de 40 kb são conhecidas (Hwang e Kim, 1999). Sua organização é relativamente simples constituída por dupla fita circular que codifica aproximadamente 5% de toda a maquinaria necessária para o

funcionamento da mitocôndria, contendo 37 genes codificantes, sendo que 2 codificam RNAs ribossômicos, 22 codificam RNAs transportadores e 13 codificam proteínas multiméricas da membrana interna mitocondrial, citocromo oxidase, COI II e III; ATP sintase 6 e 8, A6 e A8; NADH dehidrogenase 1 à 6 e 4L, ND1 à ND6, ND4L, citocromo b e apoenzima. Além desses genes, o DNAm_t possui uma região não-codificante, que é responsável pelo controle da replicação e transcrição do genoma da mitocôndria, esta região, que é denominada Região Controle ou D-Loop (alça D), é rica em adenina e timina (AT) (Hoy, 2003).

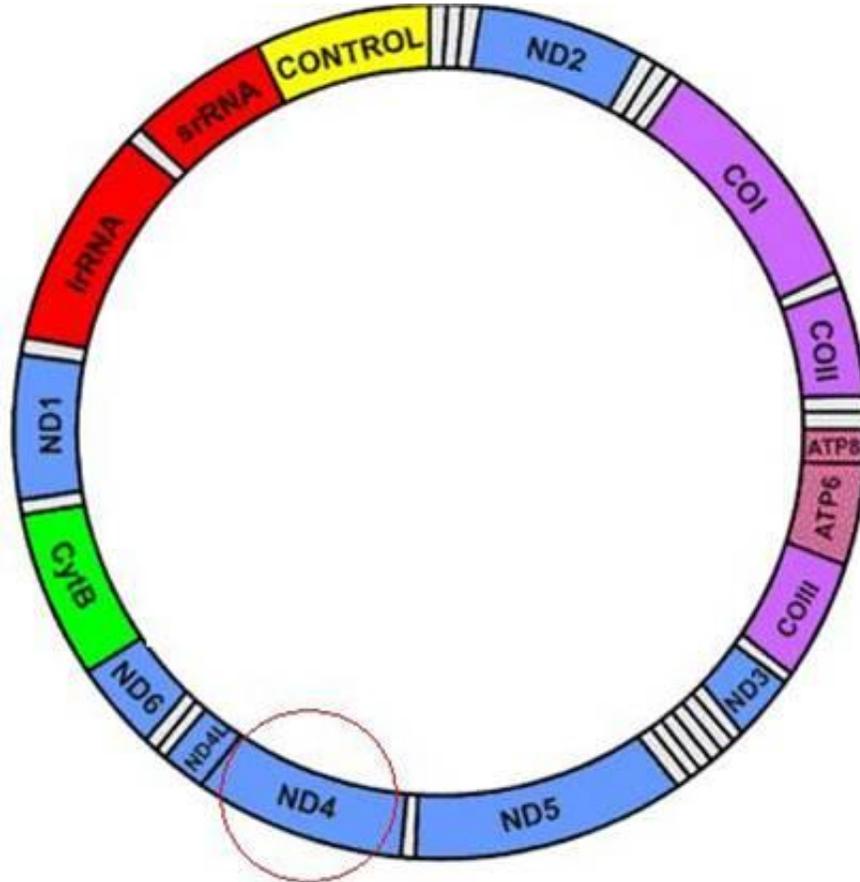


Figura 3: Característica do DNAm e seus genes codificantes e não codificantes. Região controle (não codificante). IrRNA, subunidade ribossomal grande; srRNA subunidade ribossomal pequena; ND1 à ND6 e ND4L , subunidades da NADH desidrogenase; Cytb citocromo b; COI, II e III subunidades do citocromo c oxidase; ATP6 e ATP8 subunidades ATPase.

O DNAm é tido como uma molécula econômica, pois toda a sua seqüência de nucleotídeos possui função codificadora; regiões espaçadoras são raras e introns, pseudogenes e seqüências repetitivas são mais raras (Martoli, 2001).

O genoma mitocondrial é herdado da mãe, sendo um haplóide, portanto não sofre recombinações.

A herança materna do DNAm_t possibilita que essa molécula seja utilizada como importante marcador molecular sendo possível traçar a história evolutiva de uma determinada espécie ou utilizando estas seqüências em estudos filogenéticos dentre as populações, independentes de terem sofrido efeitos de adaptação e/ou seleção (Tabachnick e Black IV, 1996).

Outra importante característica é a sua alta taxa de evolução. O DNAm_t evolui 10 vezes mais rápido que o DNA nuclear e por não existirem mecanismos de reparos nessa molécula, as variações intraespecíficas são facilmente detectadas (Raí, 1991). Muitos autores utilizam o gene ND4 por ser uma região conservada e constituir um ótimo marcador molecular para estudo de populações.

1.10 PCR - RFLP. (Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism).

A combinação das técnicas de PCR com RFLP para a detecção de polimorfismos é bastante utilizada.

Nesta técnica, a etapa da PCR; amplificação a partir de uma única molécula de DNA alvo precede a digestão com enzimas de restrição; que são capazes de reconhecer e digerir uma seqüência específica de DNA dupla fita, de quatro a seis pares de bases de comprimento.

Neste projeto, as técnicas acima mencionadas foram utilizadas aliadas a outros estudos taxonômicos e de ecologia. Os resultados adquiridos permitiram estudar alguns aspectos da variabilidade existentes nos complexos *Anopheles triannulatus* s.l e *An. albitarsis* s.l. presentes na área de estudo.

1.11 Justificativa

A construção da Usina Engenheiro Sérgio Motta e o represamento do Rio Paraná deram origem ao Reservatório de Porto Primavera, que está localizado próximo ao município de Presidente Epitácio, região Oeste do Estado de São Paulo.

Essa região, por conta das ligações rodoviárias, é responsável por intenso movimento da população humana tais como: pescadores, caminhoneiros oriundos de áreas dos Estados amazônicos e trabalhadores rurais. Muitos mantêm contato com áreas de mata, o que

pode favorecer a picada por mosquitos infectados e disseminação da doença entre a comunidade.

Na década de 80 foi registrado um pequeno surto de malária no município de Panorama, extremo oeste do Estado de São Paulo, que fica as margens do rio Paraná, despertando a preocupação das autoridades sanitárias pois, vetores como *An. darlingi* e também outros secundários e/ou em potenciais foram descritos nestas regiões (Andrade *et al.*, 1986).

O impacto ambiental provocado pelo desmatamento dessa grande área próxima ao município de Presidente Epitácio, levanta a preocupação do alto risco da doença entre a população humana que reside próxima a essas regiões impactadas ou que mantenham contato com as áreas de mata

2. Objetivos

2.1 Geral:

Determinar, a partir de dados descritos em literatura, quais as espécies componentes dos Complexos Triannulatus e Albitarsis estão presentes na região da Usina Porto Primavera por meio dois marcadores moleculares.

2.2 Específicos:

a) Caracterização dos seguintes marcadores: Segundo espaçador interno transcrito (ITS2) do DNAr e gene codificador de ND4 do DNAm.

A1: Utilizando a técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism).

A2: Seqüenciando os fragmentos amplificados.

3. Métodos

3.1 Área de Estudo

As coletas foram realizadas na Fazenda Santa Encarnação, município de Santa Rita do Pardo, Mato Grosso do Sul (MS). Os sítios de coleta ($52^{\circ} 11' W$ $21^{\circ} 36' S$), figura 03, localizam-se em área de pastagem e reserva de mata que circundam lagoa natural de formato circular de aproximadamente 800 m de diâmetro e encontra-se isolado de outros corpos d'água. Tal situação permite a amostragem de mosquitos adultos oriundos da mesma.

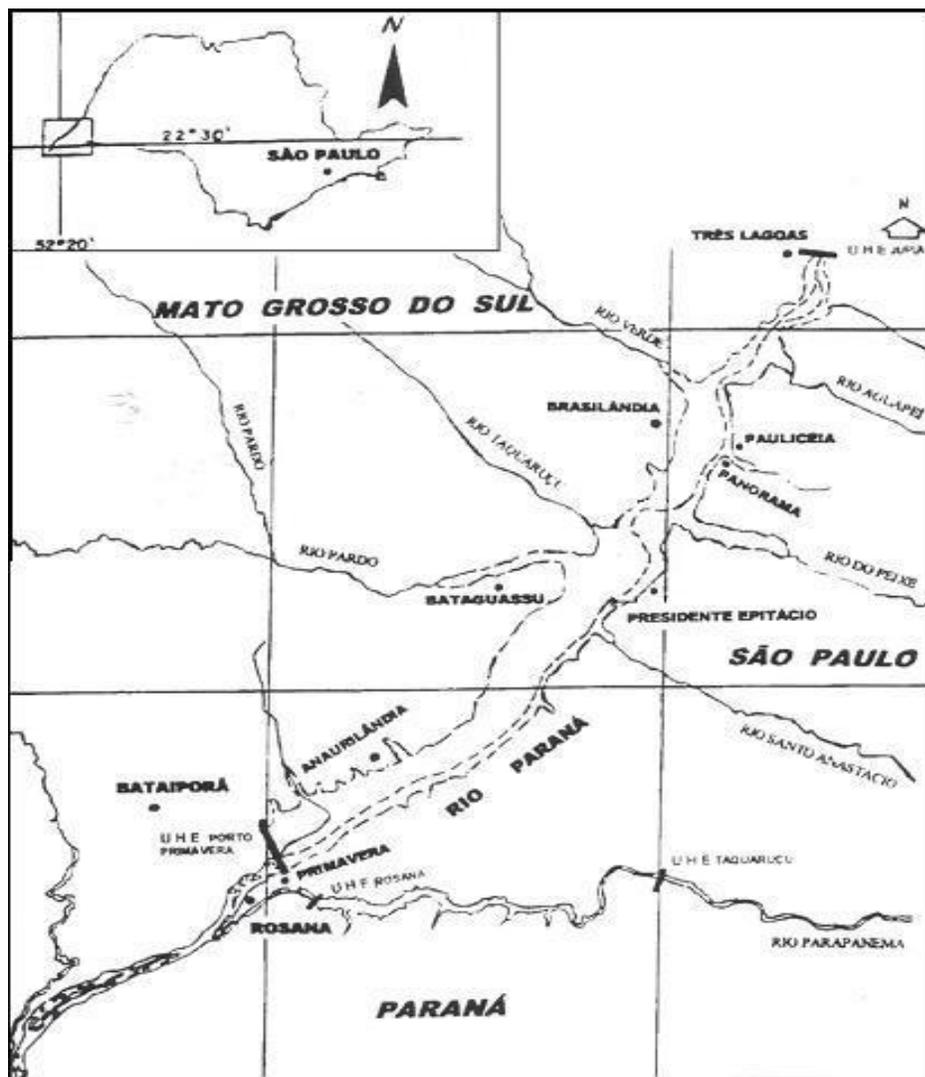


Figura 4: Localização da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera e da área de estudo, na região oeste do Estado de São Paulo.

Fonte: Companhia Energética de São Paulo - CESP, 1993.

3.2 Coletas de exemplares.

As coletas foram realizadas uma vez ao mês, nos períodos de maior abundância, anos de 2005 e 2006 (verão – janeiro, fevereiro e

março e no inverno – julho, agosto e setembro). Foram realizadas coletas em 4 dias consecutivos com armadilhas automáticas do tipo CDC luminosa (UV), em pontos fixos, entre dois períodos crepusculares de 12 horas. As armadilhas foram dispostas a partir da margem do criadouro, seguindo raios de 300m, 500m, 1000m e 1500m, sendo 5 armadilhas dispostas no interior da mata e outras 5 na pastagem.

A armadilha de Shannon, com lampião a gás, ponto móvel, foi instalada ao redor da lagoa e a coleta foi realizada no período crepuscular, sendo os anofelíneos capturados com aspirador manual.

A triagem dos mosquitos da CDC foi realizada na sede da SUCEN de Presidente Epitácio onde os mosquitos foram acomodados em caixas entomológicas identificadas com número da CDC (dia/mês) contendo uma solução de naftalina (preparadas com mistura de parafina e naftalina) e forradas com papel macio para se evitar o crescimento de fungos, que, posteriormente, pudessem atrapalhar na identificação morfológica.

Os anofelíneos foram levados ao laboratório de Entomologia Médica da SUCEN, sede de São Paulo, onde foram identificados até espécie utilizando a chave entomológica de Forattini (2002) e conservados em álcool isopropílico a 4°C.

3.3 Análises moleculares.

3.3.1 Extração de DNA de mosquito.

O DNA dos anofelíneos foi extraído de acordo com o protocolo padronizado por Malafronte *et al.*, 1999. Os mosquitos adultos foram homogeneizados em tampão de lise (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 100 mM; EDTA 100 mM pH 8,0; SDS 1% (p/v), Proteinase K (1mg/ml), utilizando-se 50µl do tampão por mosquito e incubados por 1 hora a 60° C. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi colocado em outro tubo e o DNA foi extraído pelo método de fenol. Este foi purificado com extração de 2 vezes fenol/tris (v/v), 1 vez fenol/clorofórmio e álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v) e uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v). Foi adicionado acetato de sódio, pH 5,5 para concentração final de 0,3 M e o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% overnight a -20°C. A amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sedimento contendo o DNA, dissolvido em TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1mM). Foi adicionado 20% (v/v) de acetato de sódio 3 M, pH5,0 e o DNA foi novamente precipitado com 1 volume de isopropanol por 30 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C, o sedimento foi lavado com 1 ml de etanol 70% (v/v)

e centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C. O DNA foi ressuspendido em 50µl de TE e estocado a -20° C.

3.3.2 Amplificação de ITS2 (DNAr).

A amplificação do ITS2 foi realizada de acordo com Porter e Collins (1991) usando como iniciadores (*primers*) oligonucleotídeos conservados da extremidade 3' do gene 5.8S e da extremidade 5' do gene 28 S do DNA ribossômico.

Os primers utilizados foram os seguintes:

CP16: 5' GCGGGTACCATGCTTAAATTTAGGGGGTA 3'

CP17 5' GCGCCGCGGTGTGAACTGCAGGACACATG 3'.

O DNA genômico foi utilizado com 2,5µl de cada primer na concentração de 10µM, 0,5µl de Platinum *Taq* DNA polymerase 5U/µl (Invitrogen), 5 µl de tampão PCR 10x, 0,5µl de dNTPmix 20mM (Biotools) e 5µl de MgCl₂. A reação foi realizada em volume final de 50µl e em 40 ciclos (94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos). Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Sigma), 1,5% (p/v) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (p/v) em tampão TBE 1x (Tris borato 0,09M; EDTA

0,0002M) utilizando Electrophoresis Power Supply-EPS 200 (Pharmacia Biotech) como fonte a uma voltagem constante de 120V.

3.3.3 Amplificação do ND4 (DNAm_t).

A amplificação do ND4 foi realizada de acordo com Costa-da-Silva *et al.*, (2005) usando como iniciadores (*primers*) ND4for e ND4rev.

ND4For 5' TGATTGCCTAAGGCTCATGT 3'

ND4Rev 5' TTCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT 3'

O DNA foi utilizado com 1 μ l de cada primer a concentração de 10 μ M, 0,5 μ l de Platinum *Taq* DNA polymerase 5U/ μ l (Invitrogen), 5 μ l de tampão PCR 10x, 0,5 μ l de dNTPmix 20mM (Biotools)e 5 μ l de MgCl₂. A reação foi realizada em volume final de 50 μ l e em 35 ciclos (94°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto). Os produtos da reação também foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Sigma), 1,5% (p/v) contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídio (p/v) em tampão TBE 1x (Tris borato 0,09M; EDTA 0,0002M) utilizando Electrophoresis Power Supply-EPS 200 (Pharmacia Biotech) como fonte a uma voltagem constante de 120V.

3.3.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

As seqüências de ITS2 do Complexo Albitarsis utilizadas para a obtenção dos sítios de restrição foram depositadas no GeneBank (n^{os} acesso: *An. albitarsis* s.s AY828321; *An. albitarsis* B AY828324; *An. marajoara* AY828328 e *An. deaneorum* AY828330) (Li e Wilkerson, 2006). Para a diferenciação das espécies de *An. albitarsis* s.s e *An. albitarsis* B foram utilizadas as seqüências de ND4, depositadas no GeneBank com o número de acesso: *An. albitarsis* s.s AY846342; *An. albitarsis* B AY846345 (Wilkerson *et al.*, 2005).

As seqüências de ITS2 do *An. triannulatus* para obtenção dos sítios de restrição foram depositadas no GeneBank com os números de acesso: AF462377 (Marrelli *et al.*, 2005) e U92331 (dados não publicados).

O programa utilizado para obtenção do mapa de restrição foi o *Restriction Mapper* (<http://www.restrictionmapper.org/>). Utilizamos o número máximo de 2 ou 3 cortes para as enzimas de restrição disponíveis no mercado.

As enzimas utilizadas foram: *SalI* (Promega) corta seqüências de ITS2 de *An. marajoara* na posição 29pb. *TaqI* (Fermentas) corta seqüências de ITS2 de *An. deaneorum* nas posições 78pb e 341pb.

Para a distinção entre *An. albitarsis* e *An. albitarsis B* foi utilizada a enzima *SspI* (Fermentas) que corta a seqüência de ND4 na posição 290pb. Para *An. triannulatus* s.l., a enzima utilizada foi a *BseNI* (*BsrI*) (Fermentas) que corta na posição 196 pb para as seqüências de número U92331 e na posição 296 pb para a seqüência AF 462377.

3.3.5 Digestão dos fragmentos:

O protocolo utilizado para a digestão das enzimas foi o recomendado pelo fabricante com algumas modificações.

Para enzima *Sall*: 2µl de buffer 10X (60mM Tris-HCL (pH 7.9), 1.5M NaCl, 60mM MgCl₂ e 10mM DTT), 0,2 µl de BSA (0.1mg/ml), 5 µl do amplificado, 1µl da enzima *Sall* e completado para 10µl com água MilliQ. Incubado por 1 hora a 37°C e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% na voltagem constante de 120V.

Para a enzima *TaqI*: 1 µl de buffer 10X (10mM Tris-HCL (pH 8.0), 5mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.1mg/ml BSA), 5 µl do amplificado, 1µl da enzima *TaqI* e completado para 10µl com água milliQ. Incubado a 65°C por 1 hora, logo após foi adicionado 0,4 µl de EDTA com o propósito de parar a reação e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% ou em gel de agarose a 2,5% em voltagem constante de 120V.

Para a enzima *SspI* (Fast Digest): 1µl de buffer 10X , 5µl do amplificado, 1µl da enzima *SspI* e completado com água milliQ para 10µl. Foi incubado por 5 minutos a 37°C e submetido a eletroforese em gel de agarose 1,7% na voltagem de 120V.

Para a enzima *BseNI* (*BsrI*): 1µl de buffer 10X (10mM Tris-HCL (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 0.1mg/ml BSA), 5µ do amplificado, 1µl da enzima *BseNI* (*BsrI*) e completado com água milliQ para 10µl. Foi incubado por 1 hora a 65°C e submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5% na voltagem constante de 120V.

Os géis foram corados com brometo de etídio a 0,5µm/ml e visualizados em luz ultravioleta (UV).

3.3.6 Clonagem dos fragmentos (ITS2)

Os produtos amplificados foram clonados utilizando-se o Kit TOPO TA (Invitrogen), seguindo as normas do fabricante.

Para a ligação utilizou-se 4 µl de DNA, 1 µl de Salt Solution (1.2M NaCl, 0.06M MgCl₂) e 1 µl de TOPO (vetor). Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, a mistura foi colocada em gelo.

Para a transformação, 2 µl da ligação foi adicionado em 50 µl da bactéria competente e mantido em gelo por 30 minutos seguidos de

heat shock em banho maria por 30 segundos a 42 °C e mantido em gelo novamente por 5 minutos. A seguir, adicionou-se 250 µl do meio de cultura “SOC” (2% triptona, 0.5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glicose) e a mistura foi incubada em constante agitação a 37°C por 1 hora com rotação constante de 100 rpm. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB/agar com ampicilina a 100 µg/ml (LB/amp), IPTG 100 mM e X-GAL 2% “overnight” a 37°C.

Todas as colônias brancas foram coletadas individualmente e colocadas para crescer, novamente, “overnight” em 3 ml de meio líquido LB/amp a 37 °C em agitação constante.

A purificação do plasmídeo deu-se através do kit GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (GE, antiga Amersham Pharmacia Biosciences) respeitando – se o protocolo do fabricante.

Para a liberação do fragmento clonado, foi utilizada a enzima *EcoRI* (Invitrogen): 5 µl de DNA, 1 µl de buffer (50 mM Tris-HCl (p.H 7.2), 300 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 500 µg/ml BSA, 50% (v/v) glicerol e 0.2% (w/v) Triton X-100), 1 µl *EcoRI* e 3µl de água milliQ. Incubado por 1 hora a 37 °C.

A visualização do inserto foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em uma voltagem constante de 120v.

Após a visualização da banda desejada, o DNA foi mantido em temperatura -20 °C até o preparo para a reação de seqüenciamento.

3.3.7 Seqüenciamento dos fragmentos (ITS2 e ND4),

Para o seqüenciamento dos fragmentos utilizou-se o Kit Big Dye Terminator da Applied Biosystems, v.3.1.

Utilizou-se 2µl do fragmento clonado purificado, 1µl de primer (kit TOPO), 3µl de tampão 5x, 1µl de Big Dye e foi completado para 15µl com água milliQ. A reação deu-se em 35 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos. Após o término, se necessário, a reação pode ser conservada a 4°C ou então seguir para o próximo passo.

Aos 15 µl da reação de seqüenciamento foi adicionado 100 µl de ETOH 100% + AcNa 3M, (2750µl de ETOH 100% gelado; 110µl de AcNa 3M). O produto foi “vortexado” rapidamente, mantido em gelo por 15 minutos e centrifugado a 4.000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, o sobrenadante foi descartado e 200µl de ETOH 70% gelado foi adicionado. O produto foi centrifugado novamente por 30 minutos. Os tubos foram secos em centrifuga à vácuo a 200 atm, armazenados a -20°C no escuro até a hora do seqüenciamento.

Para o seqüenciamento direto foi utilizado o mesmo protocolo do seqüenciamento – clone mas com primers para ITS2 CP16 (For) e CP17 (Rev) e para seqüenciamento com o DNA mitocondrial foi o ND4for e ND4rev.

Para a realização do seqüenciamento, as amostras foram levadas ao Serviço de Seqüenciamento de DNA no Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP (SSDNA – IQUSP) (<http://www2.iq.usp.br/bioquimica/formulario/Seqüenciamento/>)

O alinhamento das seqüências obtidas foi realizado com o uso dos programas ClustalW v.1.4 (Thompson *et al.*, 1994) incluso no programa Bioedit v7.0.5.3 (Hall, 1999). O refinamento da posição dos nucleotídeos ocorreu de forma manual.

4. Resultados

4.1 Amostragem de insetos

Foram capturados e identificados 713 anofelíneos sendo 248 *An. albitarsis* s.l e 465 *An. triannulatus* s.l.

4.2 Complexo Albitarsis

4.2.1 Amplificação do fragmento do ITS2 para *An. albitaris* s.l

Foram amplificadas 105 amostras de *An. albitarsis* s.l. O tamanho do fragmento do ITS2 dos espécimes variou de aproximadamente 500 a 600 pares de base (pb) e está demonstrado na Figura 5.

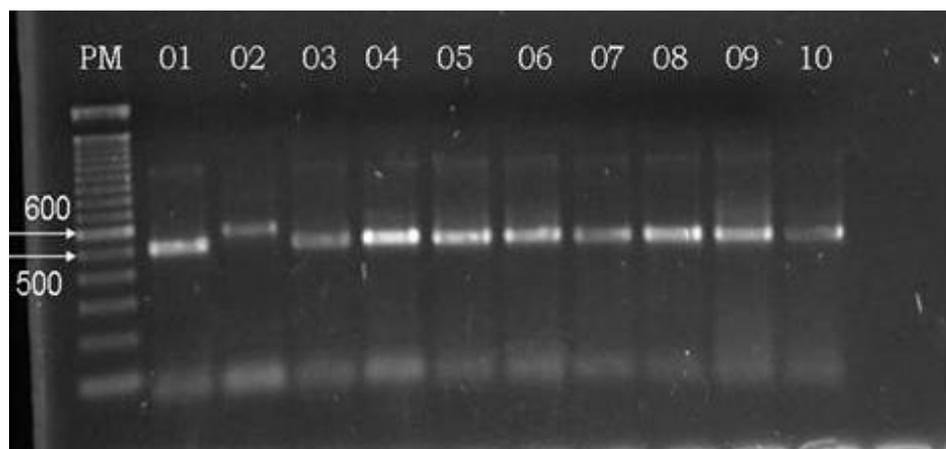


Figura 5: Perfil de amplificação do fragmento do ITS2. Gel de agarose a 1,5%. PM *Ladder* 100pb (Invitrogen); 01 - 10 *An. albitarsis* s.l.

Dos fragmentos amplificados, 94,28% (99/105) exibiram tamanho de 500 pb enquanto 5,71% (06/105) de 600 pb.

4.3 RFLP-ITS2.

Para se utilizar a técnica de RFLP, seqüências previamente depositadas no GeneBank foram utilizadas. Estas estão depositadas sob número de acesso demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Espécies do Complexo Albitarsis e o número correspondente junto ao GeneBank.

Espécie	Numero acesso
<i>An. albitarsis</i>	AY828321
<i>An. albitarsis B</i>	AY828324
<i>An. deaneorum</i>	AY828330
<i>An. marajoara</i>	AY828328

4.3.1 Padrão de restrição.

As seqüências acima foram submetidas ao programa “Restriction Mapper” com exigências de apenas dois cortes para cada enzima. Na tentativa de se separar as espécies do Complexo Albitarsis, as enzimas *SspI*, *Sall* e *TaqI* foram utilizadas.

Notar que algumas enzimas foram utilizadas para digestão de fragmentos de ITS2 (*Sall* e *TaqI*) enquanto outra foi utilizada para digerir fragmentos de DNAm (*SspI*).

As enzimas que separam as espécies estão discriminadas na tabela 2:

Tabela2. Discriminação das enzimas utilizadas para cada espécie do Complexo Albitarsis utilizando a técnica de RFLP.

Espécies	<i>An. albitarsis</i>	<i>An. albitarsis B</i>	<i>An. marajoara</i>	<i>An. deaneorum</i>
Enzima	—	<i>SspI</i> *	<i>Sall</i> **	<i>TaqI</i> **

* esta enzima digere fragmentos amplificados de DNAm

** estas enzimas digerem fragmentos amplificados de DNAr.

4.3.2 Enzima *Sall*

Segundo as seqüências depositadas no GeneBank, a enzima *Sall* (Promega) corta os fragmentos de ITS2 de *An. marajoara* na posição 29pb. Foram testadas todas as 105 amostras de *An. albitarsis* s.l, sendo que 100% das amostras não cortaram na posição 29 pb sugerindo que as amostras não correspondem à espécie *An. marajoara*. (Figura 6).

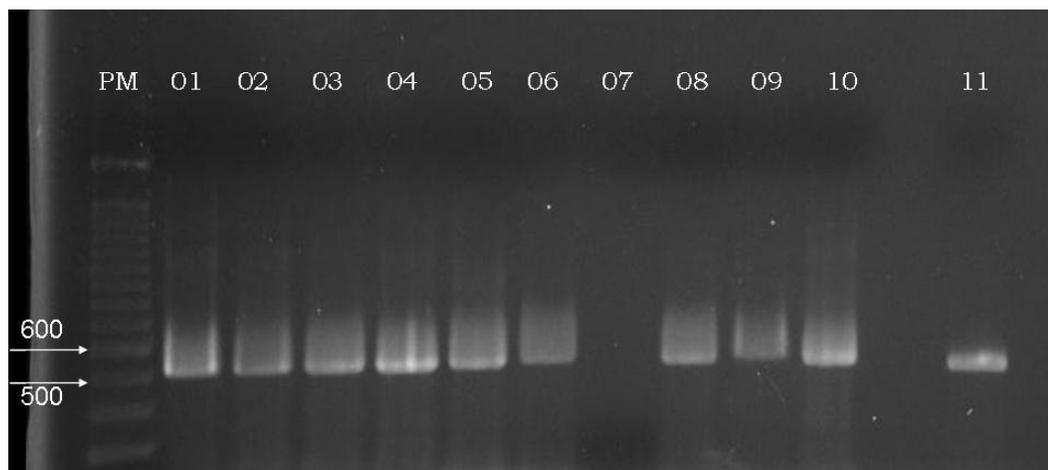


Figura 6: Perfil do corte da enzima *Sall* em gel de agarose 1,5% do Complexo Albitarsis. PM *Ladder* de 100pb (Invitrogen); 01- 10: amostras de *An. albitarsis* s.l que foram submetidas ao RFLP, 11: controle do perfil de amplificação do ITS2. Amostra 07 não amplificou

4.3.3 Enzima *TaqI*

Utilizou-se a enzima *TaqI* (Fermentas) para o sítio de restrição que corta, segundo seqüências depositadas no GeneBank, *An. deaneorum* nas posições 78pb e 341pb. Foram testadas todas as 105 amostras de *An. albitarsis* s.l.

Para melhor visualização do fragmento de 78pb, foi utilizado o gel de poliacrilamida a 10% corado com brometo de etídio em 3 amostras. O resultado não foi satisfatório. As bandas de mais ou menos 100pb ficaram fracas dificultando a visualização das mesmas (Figura 7).

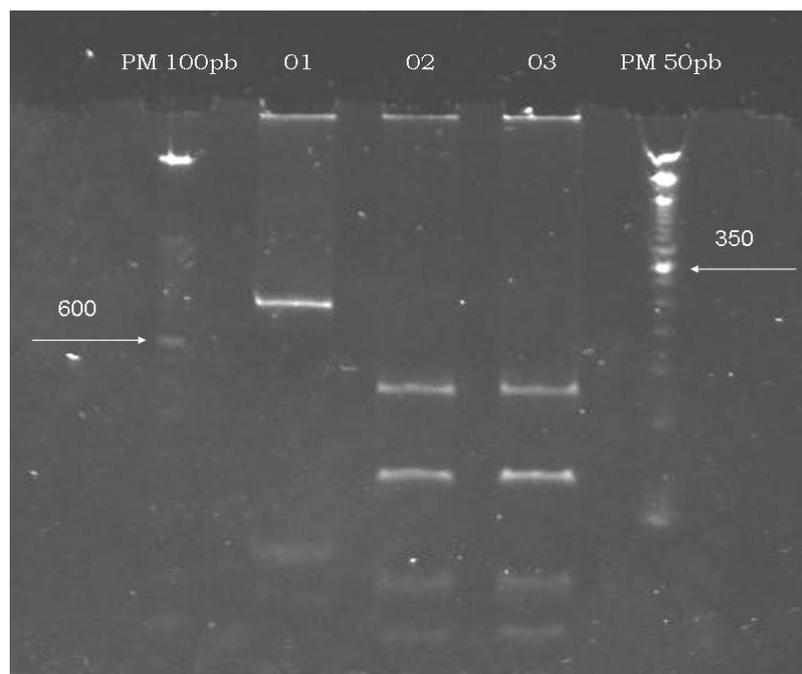


Figura 7: Gel de poliacrilamida a 10%, corado com brometo de etídio, mostrando o padrão de corte da enzima *TaqI* no Complexo Albitarsis. PM: *Ladder* 100pb (Invitrogen); .01- 03 *An. albitarsis* s.l. A amostra O1 não cortou. PM – Padrão de peso molecular; *Ladder* 100 pb e 50pb (Invitrogen).

Sendo assim, testou-se a digestão com esta enzima em mais 5 amostras, visualizando-as em gel de agarose a 2,5%. O resultado foi satisfatório. Utilizou-se este gel para as demais digestões com *TaqI* (Figura 8).

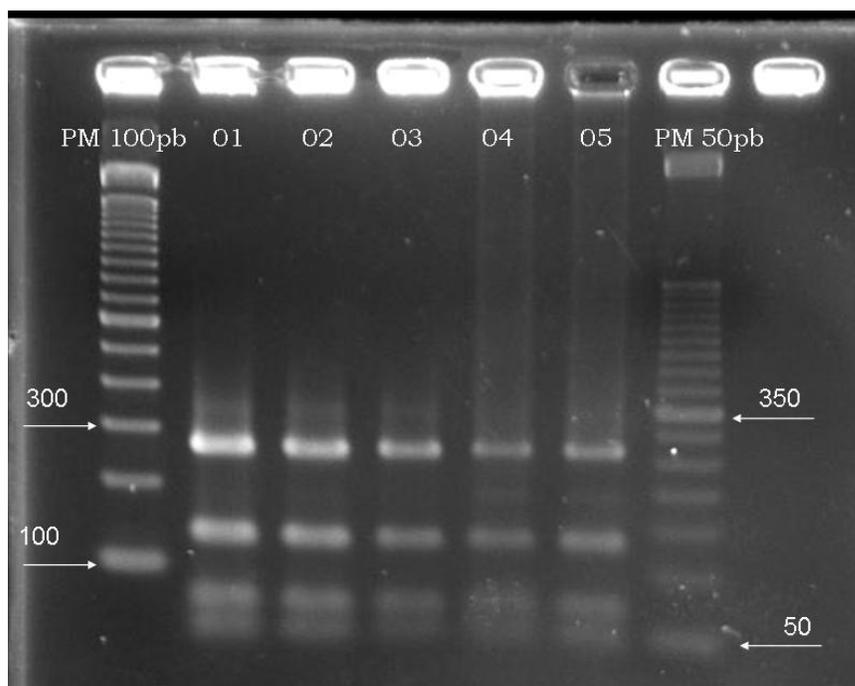


Figura 8: Gel de agarose a 2,5% mostrando o padrão de corte da enzima *TaqI*. PM - Padrão de peso molecular – *Ladder* de 100pb e 50 pb (Invitrogen);.01 – 05 amostras de *An. albitarsis* s.l

Das 105 amostras testadas, 62,85% (66/105) foram digeridas em 2 regiões sugerindo serem estes espécimes *An. deaneorum* (figura 8). As demais amostras 37,14% (39/105) demonstraram padrões diferentes do esperado, podendo sugerir serem *An. albitarsis* B ou *albitarsis* s.s. (Figura 9).

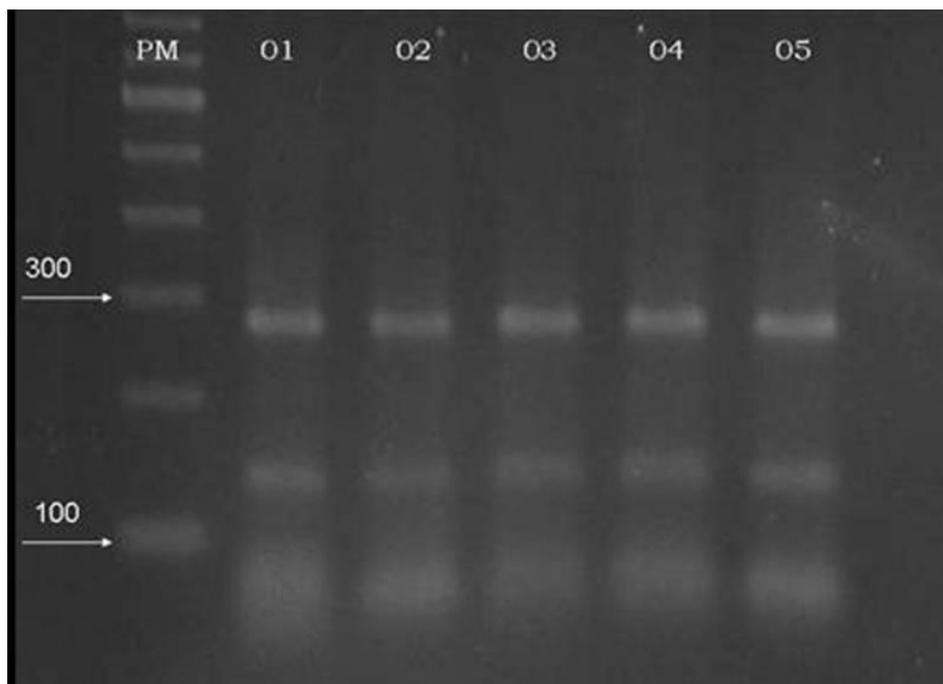


Figura 9: Gel de agarose a 2,5% amostras que cortaram diferente do esperado com a enzima *TaqI*. PM - Padrão de peso molecular – *Ladder* de 100pb (Invitrogen); 01 – 05 amostras de *An. albitarsis* s.l.

4.4 Padronização da temperatura de “annealing” para DNAmT.

Padronizou-se a PCR para a amplificação dos genes mitocondriais, visto que os *primers* utilizados foram desenhados para amplificação de outros organismos. Para tanto, um gradiente de amplificação de 48,1°C a 50,2 °C foi utilizado a fim de se verificar qual a temperatura de “annealing” ideal para a amplificação do gene ND4 em anofelíneos.

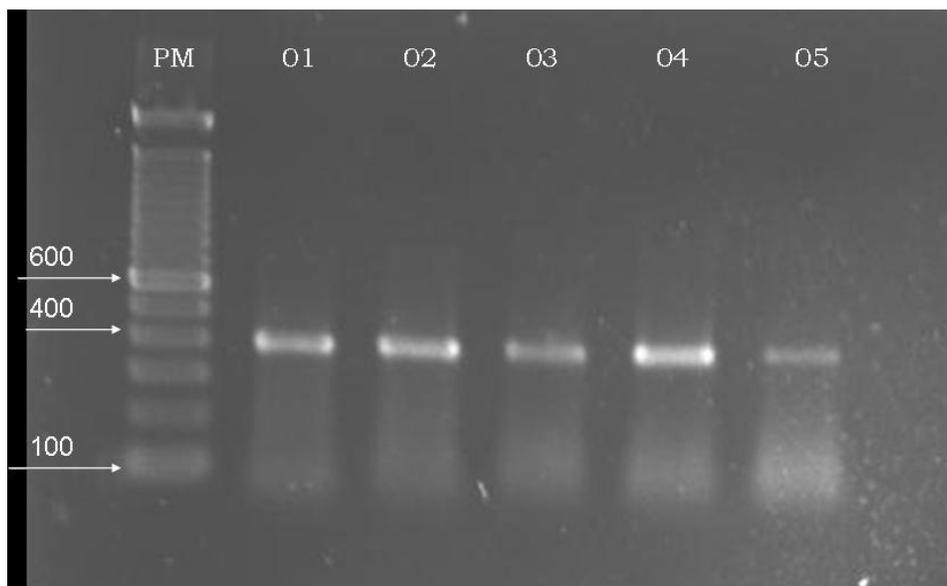


Figura 10: Perfil de amplificação com gradiente para temperatura de “annealing”. Amostra 01 temp. 48,1°C; amostra 02 temp. 48,6°C ; amostra 03 temp. 49,1°C; amostra 04 temp. 49,6°C; amostra 05 temp. 50,2°C. PM – Padrão de peso molecular – *Ladder* 100pb (Invitrogen).

Foi utilizada a temperatura de “annealing” de 48,1°C por apresentar uma banda forte e bem definida de DNAm. (figura 10).

4.5 Amplificação do fragmento do ND4.

Das 39 amostras de *An. albitarsis* s.l restantes, conseguiu-se amplificar 25. Estas apresentaram fragmento de 400 pb, como mostra na figura 11.

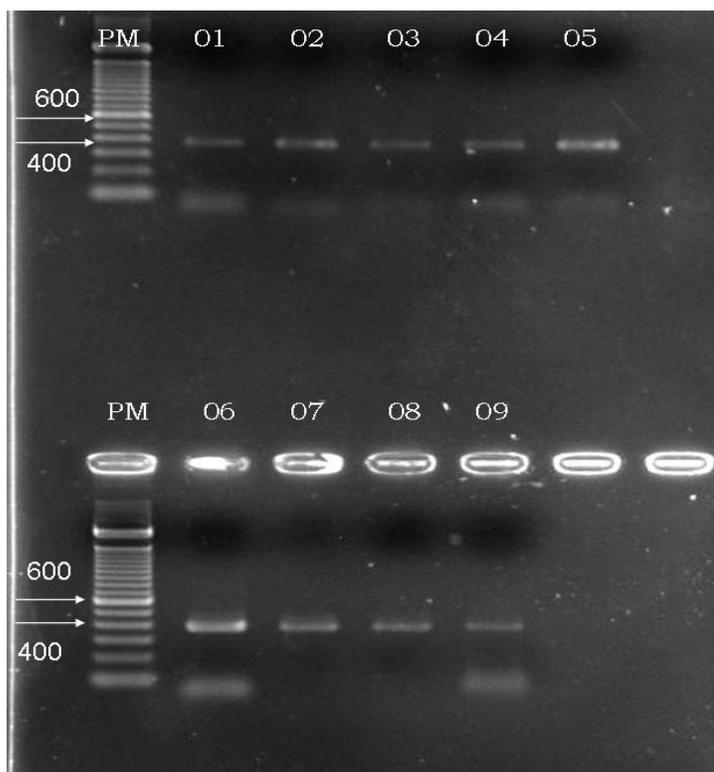


Figura 11: Padrão de amplificação do gene ND4. Gel de agarose 1,5%. PM (*Ladder* 100pb (Invitrogen)). 01- 09 amostras positivas de *An. albitarsis* s.l.

4.6 RFLP-ND4

4.6.1 Enzima *SspI*

As amostras amplificadas foram digeridas com a enzima *SspI* que, segundo seqüências depositadas no GeneBank, digerem o gene ND4 na posição 290 pb identificando-o como *An. albitarsis* B. Verificou-se que a enzima não encontrou sitio de restrição, sugerindo que estas

amostras não pertencem à espécie *An. albitarsis* B e sim *An. albitarsis* s.s. (Figura 12).

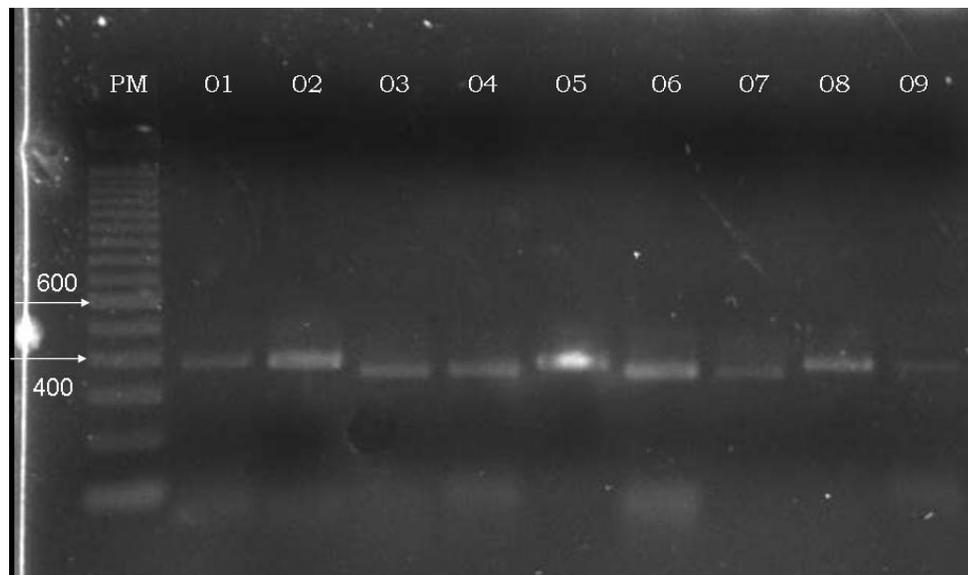


Figura 12: Gel de agarose a 1.5% mostrando o padrão de corte da enzima *SspI* (Fast Digest). PM – *Ladder* 100pb (Invitrogen). 01 – 09 amostras de *An. albitarsis* s.l

4.7 Clonagem e seqüenciamento de ITS2

Amostras de ITS2 de 2 espécimes foram clonadas. De cada espécime, 3 clones foram seqüenciados, sendo que de um espécime apenas 1 clone obteve-se bom resultado no seqüenciamento (clone 9B).

Do outro espécime, os 3 clones mostraram bons resultados (2A, 2B e 2C). Estes clones apresentaram substituições neutras, A/G ou T/C, 4 e 2 substituições respectivamente.

Estes clones foram alinhados às seqüências depositadas por Li e Wilkerson (2006), número de acesso AY828330. O alinhamento com estas seqüências, correspondentes ao *An. deaneorum* e os sítios correspondentes à enzima de restrição *TaqI* estão discriminados no anexo A.

Ao submeter estas seqüências no GeneBank, notou-se, que a similaridade foi maior com àquelas de número de acesso AF462386 (Marrelli *et al.*, 2005) identificadas como *An. albitarsis* s.l.

Foram realizados também seqüenciamentos diretos de 62 amostras de amplificadas de ITS2 de *An. albitarsis* s.l.

Amostras de ITS2 que variaram no tamanho de seus fragmentos também foram seqüenciadas. Duas amostras de 500pb e duas de 600pb (Fig. 05, item 4.2.1) foram ensaiadas a fim de se elucidar as diferenças de tamanhos.

As duas seqüências possuem alguns *indels*, indicando polimorfismos intragenômicos.

As amostras que por meio do PCR-RFLP foram identificadas como sendo *An. deaneorum* também foram seqüenciadas e mostraram o

resultado de 96% *An. albitarsis* s.l e 94% *An. deaneorum*, corroborando com os resultados obtidos dos clones.

Embora algumas amostras não demonstrassem padrão de corte específico para *An. deaneorum* (fig. 09, item 4.3.3), verificou-se, ao se comparar suas seqüências com as já existentes no GeneBank, serem estas similares a *An. albitarsis* s.l e *An. deaneorum* exibindo identidade de 96% e 94% com estas espécies respectivamente.

4.8 Seqüenciamento para ND4.

Das amostras de DNAm_t amplificadas, 14 foram seqüenciadas e todas mostraram possuir similaridade de aproximadamente 98% com *An. albitarsis* B. de Wilkerson *et al.*, (2005) vide anexo C.

4.9 Complexo Triannulatus

4.9.1 Amplificação do fragmento de ITS2 para *An. triannulatus* s.l

O tamanho do fragmento do ITS2 dos espécimes variou de aproximadamente 500 a 600 pares de base (pb).

Foram amplificadas 247 amostras de *An. triannulatus* s.l. O padrão de bandas dos fragmentos amplificados está demonstrado na Figura 13.

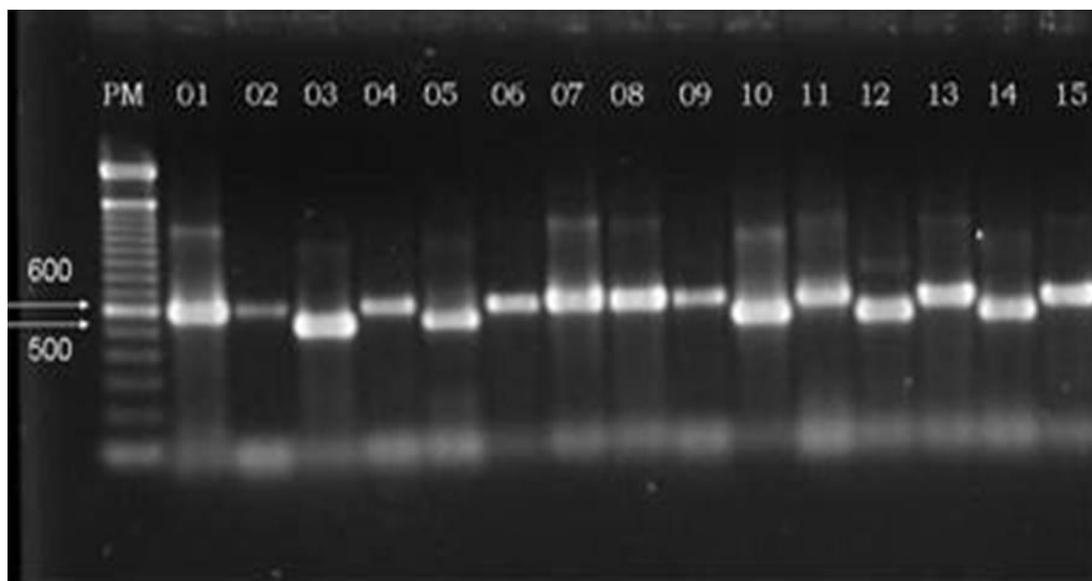


Figura 13: Perfil de amplificação do fragmento do ITS2, gel de agarose 1,5%. Diferença dos tamanhos de fragmentos. PM – *Ladder* 100pb (Invitrogen); 01 – 15 *An. triannulatus*.

Das amostras amplificadas de *An. triannulatus*, 11,33% espécimes apresentaram fragmentos de 500 pb (28/247) e 88,66% (219/247) 600 pb.

4.10 RFLP para Complexo *Triannulatus*

As seqüências abaixo, pertencentes ao *An. triannulatus*, foram depositadas no GeneBank sob número de acesso descritos na Tabela 3, abaixo.

Tabela 3: Discriminação da espécie e o número de acesso junto ao Genebank

Espécie	Número acesso
<i>An. triannulatus</i>	U92331
<i>An. triannulatus</i>	AF462377

4.10.1 Padrão de restrição

As seqüências do item anterior foram submetidas ao programa “Restriction Mapper” com exigências de apenas dois cortes para cada enzima. A partir deste programa procurou-se uma enzima que pudesse ser utilizada para mostrar possíveis polimorfismos entre as espécies de *An. triannulatus* s.l.

4.10.2 Enzima *BseNI* (*BsrI*)

Para observar-se possíveis polimorfismos entre as espécies, a partir de seqüências depositadas no GeneBank, foi utilizada a enzima *BseNI* (*BsrI*) (Fermentas).

Esta enzima digere as seqüências de ITS 2 na posição 196 pb da espécie depositada sob o número de acesso U92331 enquanto que a de número de acesso AF462377 corta na posição 290 pb.

Foram digeridas todas as 247 amostras de *An. triannulatus* s.l.

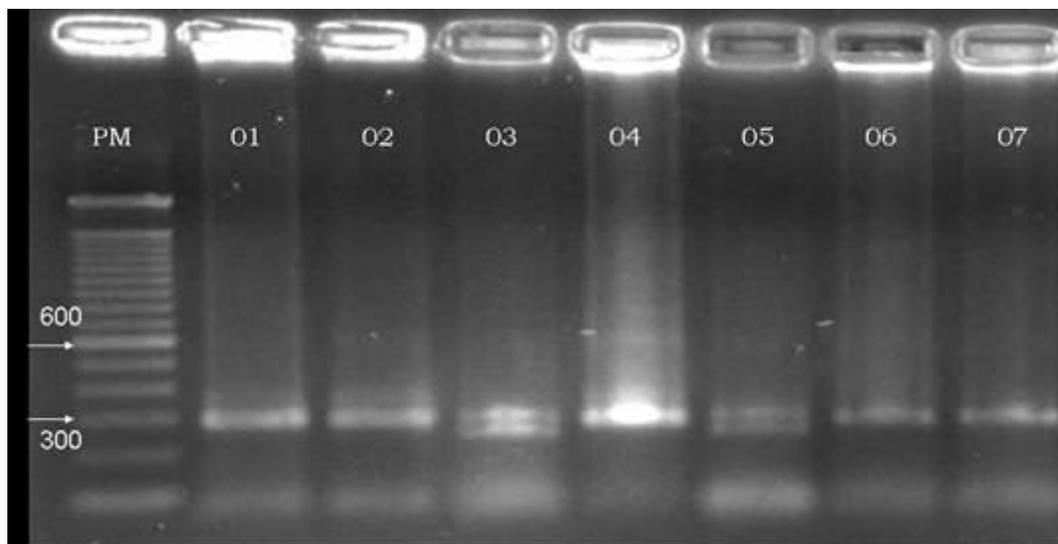


Figura 14: Perfil de corte da enzima *BsrI* em gel de agarose 1,5% do Complexo *Triannulatus*. PM – *Ladder* de 50 pb e 100 pb (Invitrogen); 01 – 07 amostras de *An. triannulatus* que foram submetidos ao RFLP.

Das 247 amostras testadas, 11,33% (29/247) demonstraram perfil de 2 bandas (U92331), a maior com aproximadamente 300pb e a menor com aproximadamente 250pb (espécies 03 e 05, figura 14), 88,25% espécies demonstraram apenas 1 sítio de restrição (AF462377) (fragmento de 300pb), observar a espécie 01 da figura 14.

4.11 Clonagem

Foram clonadas amostras de 2 espécimes que demonstraram, por meio do RFLP, polimorfismos, sendo que de cada amostra 3 clones foram seqüenciados. Conseguiu-se seqüenciar 3 clones de uma espécie e 2 de outra perfazendo um total de 5 clones (4A, 4B, 4C, 3A e 3C).

4.12 Seqüenciamento

Como nem todos os clones resultaram em seqüenciamentos completos, alguns foram seqüenciados parcialmente, exibimos apenas 2 seqüências que foram comparadas àquelas depositadas no GeneBank (vide anexo B). Estes dois estão similares as seqüências de número de acesso U92331. Embora não tenhamos mostrado, um dos exemplares

exibiu polimorfismo intragenômico possuindo seqüências similares às duas depositadas no GeneBank.

Foram também realizados seqüenciamentos diretos de 10 amostras. Todas demonstraram similaridade de até 92% com as amostras depositadas no GeneBank de *An. triannulatus*.

Amostras de tamanhos diferentes com 500pb e 600pb (Fig. 13, item 4.9.1) também foram seqüenciadas e observou-se que existem alguns *indels*, indicando que são polimórficas. Este polimorfismo foi demonstrado claramente por meio da análise realizada por PCR-RFLP.

5. Discussão

Apesar dos esforços para controlar a doença, os casos de malária continuam crescendo entre populações rurais e urbanas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 300 a 500 milhões de pessoas sejam infectadas pelo parasita a cada ano nos trópicos. No Brasil, os casos notificados concentram-se na região Amazônica como consequência do influxo imigratório para as regiões malarígenas (Voorhan *et al.*, 1993).

A malária é uma doença que tem por agentes etiológicos protozoários, transmitidos por mosquitos infectados do gênero *Anopheles*, sendo esse gênero o maior da família Culicidae. Aproximadamente 45 espécies são responsáveis pela transmissão do parasito (Forattini, 2002) e muitas dessas espécies pertencem a um grupo de difícil identificação morfológica por meio de chaves entomológicas, as espécies crípticas (Black IV e Munstermann, 1996).

Por isto, levantamentos entomológicos em áreas de transição são recomendados. O conhecimento das espécies existentes auxilia no entendimento da doença, possibilitando a correlação de certas espécies com os reservatórios e também com relação a sua capacidade e competência vetorial.

A região onde foi construída a Usina Hidrelétrica de Porto Primavera é uma área de transição por ser passagem constante de trabalhadores rurais, caminhoneiros, pescadores etc. Por essa área ter sido modificada, a preocupação com o aparecimento de casos de malária autóctone na região foi aumentada já que foram descritos vetores secundários e/ou em potencial.

Capturaram-se, nessa região, amostras das espécies de *An. albitarsis* s.l e *An. triannulatus* s.l, ambas consideradas como complexo de espécies crípticas.

O Complexo Albitarsis é composto por 4 espécies: *An. albitarsis* s.s, *An. albitarsis* B, *An. deaneorum* e *An. marajoara*. Com exceção da espécie *An. marajoara*, cuja distribuição é mais restrita as áreas litorâneas do país, todas as outras são encontradas na região centro oeste do país e convivem em simpatria (Forattini, 2002).

A distinção morfológica entre as espécies é muito sutil; de acordo com Forattini (2002) na forma larvária, as espécies *An. marajoara* e *An. albitarsis* s.s, não se separam e possuem a cerda 3-C aciculada enquanto a espécie *An. deaneorum* possui a cerda 3-C distalmente penada.

Na forma adulta, as fêmeas de *An. marajoara* e *An. albitarsis* s.s, também não se separam e possuem tufos pósteros laterais de escamas a partir do III segmento abdominal enquanto *An. deaneorum* possui tufos

pósteros laterais de escamas a partir do IV ou V segmento abdominal. A separação entre *An. marajoara* e *An. albitarsis* s.s dá-se somente por meio da genitália masculina, porém, a espécie *An. albitarsis* s.s fica na chave entomológica, junto ao *An. deaneorum* e ambos possuem o claspete ventral (cv) com ápice arredondado, dando à estrutura contorno um tanto triangular ou cônico enquanto o claspete ventral da espécie *An. marajoara* tem o ápice truncado dando a estrutura um contorno trapezoidal.

Para a identificação adequada desse complexo se torna necessário obter todas as formas do ciclo de desenvolvimento, tal procedimento nem sempre é definitivo se as espécies estão distribuídas na mesma área de investigação.

Desde 1920 mais particularmente 1940, o *An. triannulatus* é considerado um complexo de espécies crípticas pelas variações morfológicas detectadas em adultos e no estágio imaturo, especialmente no Brasil (Rosa-Freitas *et al*, 1998).

O Complexo Triannulatus é composto por 3 espécies que são *An. triannulatus* s.s, *An. halophylus* e *An. triannulatus* C (Silva-do-Nascimento *et al.*, 2006).

O *An. halophylus* tem preferência por criadouros de água salobra diferentemente do *An. triannulatus* s.s que seus criadouros são de água

doce e limpa. O habitat larval de *An. triannulatus* C é ainda desconhecido (Silva-do-Nascimento e Lourenço-se-Oliveira, 2007).

Tanto a espécie *An. halophylus* quanto *An. triannulatus* são exofílicos e zoofílicos, porém Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira (2002) constatou que *An. halophylus* possui uma tendência maior a zoofilia, pois, no período crepuscular, fêmeas de *An. halophylus* foram capturadas 10 vezes mais em cavalos do que fêmeas de *An. triannulatus*.

A diferença morfológica entre *An. triannulatus* e *An. halophylus* é muito sutil, segundo Silva-do-Nascimento e Lourenço-de-Oliveira (2002), essa diferença ocorre na genitália do macho, formas do espiráculo da larva de 4º estadio e aspectos gerais dos ovos.

Na genitália do macho, *An. halophylus* pode ser distinguida pela forma do lobo ventral do claspete, especialmente pelas formas do lobo apicolaterais que são amplos diferente do *An. triannulatus*. Na fase larval, a larva de *An. halophylus* tem a “seta” 1-P estreita com ramos filiformes, os braços laterais da placa mediana do aparelho espiracular são ausentes enquanto para *An. triannulatus* a “seta” 1-P tem folhetos lanceolados, os braços laterais da placa mediana do aparelho espiracular são bem desenvolvidos.

Um dos principais problemas foi achar, na literatura, definições para a espécie *An. triannulatus* C e diferenciá-la de *An. halophylus* visto que ambas são muito semelhantes.

Em vista dessa problemática acerca da identificação morfológica e associado ao fato dessas 3 espécies conviverem em simpatria, o apoio metodológico por meio de técnicas moleculares na diferenciação dessas espécies foi cogitado.

Bicudo de Paula e Gomes (2007) descreveram a fauna de culicídeos na região da Usina Hidrelétrica antes do primeiro enchimento da represa., entre os anos 1997 e 1998. Entre os anofelíneos capturados estão: *An. triannulatus*, *An. albitarsis*, *An. braziliensis*, *An. peryassui*, *An. deaneorum*, *An. darlingi*, *An. galvaoi*, *An. evansae/galvaoi*, *An. rondoni/strodei*, *An. evansae*, *An. rondoni*, *An. strodei* e *An. albitarsis/deaneorum*. Destas espécies, o mais predominante foi *An. triannulatus*.

Em meados da década de 80 foram registrados surtos de malária autóctone na região de Panorama, às margens do rio Paraná. Constatou-se que as pessoas infectadas exerceram alguma atividade relacionada com o córrego das Marrecas, local em que foram encontrados exemplares de *An. darlingi* (Andrade *et al*, 1986). Na hipótese do surgimento da doença, os municípios de Presidente Epitácio (SP) e Bataguasu (MS) ficaram em alerta pois esses municípios são considerados vulneráveis funcionando como importante rota de caminhoneiros e trabalhadores provenientes de estados amazônicos às regiões Sul e Sudeste do país.

Os mosquitos deste projeto foram coletados na fazenda Santa Encarnação, município de Santa Rita do Pardo, Mato Grosso do Sul.

Foram coletados 713 anofelíneos sendo 248 *An. albitarsis* s.l (34,78%) e 465 *An. triannulatus* s.l. (65,21%). Conseguimos amplificar para ITS2 105 amostras de *An. albitarsis* s.l (42,33%) e 247 de *An. triannulatus* s.l. (53,11%).

O objetivo deste projeto foi o de identificar e separar, por meio de técnicas moleculares tais como a amplificação de espaçadores do DNA ribossômico, ITS2 e no caso de *An. albitarsis* s.l., de genes mitocondriais (ND4), anofelíneos componentes do Complexo Albitarsis e Triannulatus. A utilização do PCR-RFLP baseados em dados já publicados tornou-se ferramenta indispensável para esta diferenciação. Primeiramente, procuramos seqüências cujos trabalhos foram publicados e de onde pudéssemos saber a procedência dos mesmos (Li e Wilkerson, 2006). A partir daí, a fim de separar as espécies dentro dos complexos, examinamos as seqüências para a existência de sítios de enzimas de restrição.

Observamos diferenças nos tamanhos de ITS2 para ambas as espécies. Os tamanhos variaram entre 500 e 600pb e algumas dessas amostras foram seqüenciadas.

Li e Wilkerson (2006) tentaram construir árvores filogenéticas entre as espécies do Complexo Albitarsis utilizando seqüências

amplificadas de ITS2 e citocromo oxidase I (COI). Os espécimes utilizados neste trabalho foram capturados no Brasil; *An. albitarsis* do Estado do Paraná; *An. albitarsis* B do Ceará; *An. marajoara* do Amazonas e *An. deaneorum* de Rondônia.

Em nosso estudo, a separação das espécies do Complexo Albitarsis foi realizada por meio da técnica de ITS2-RFLP. Verificamos que a utilização de marcadores moleculares para DNAr resolveu em parte a identificação dos mosquitos deste complexo. Então, tivemos a idéia de utilizar dois marcadores, um de DNAr e outro de DNAm. Aqueles espécimes que não foram separados por meio de DNAr tiveram seu DNA amplificado para o gene ND4 do DNAm.

Já o Complexo Triannulatus foi resolvido por meio do estudo do polimorfismo das espécies envolvidas dado em RFLP-ITS2.

5.1 Complexo Albitarsis

Para tentar separar as espécies do Complexo Albitarsis foi utilizado a técnica de ITS2-RFLP. Foram escolhidas 4 seqüências, uma para cada espécie do complexo a partir do trabalho de Li e Wilkerson (2006).

Por meio dessas seqüências foram obtidos os sítios para as enzimas: *Sall*; digere seqüências existentes somente na espécie *An. marajoara*. Outra enzima, a *TaqI* foi utilizada para digerir seqüências existentes apenas na espécie *An. deaneorum*. Observamos que não há enzima de restrição capaz de distinguir as espécies *An. albitarsis* s.s e *An. albitarsis* B por meio das seqüências de ITS2. Sendo assim, decidimos utilizar o gene ND4 do DNAm. Para a obtenção dos sítios capazes de diferenciar as espécies *An. albitarsis* s.s e *An. albitarsis* B foram utilizadas as seqüências do trabalho de Wilkerson *et al.*, (2005).

Wilkerson *et al.*, (2005) por meio de análises filogenéticas observaram como as espécies do complexo relacionam-se entre si, utilizando marcadores moleculares deduzidos de RAPD para as seqüências de ITS2 e D2 (expansão da subunidade 28S) e seqüência parcial de genes mitocondriais ND4 e COI. Como resultado, por meio da árvore filogenética, as espécies *An. albitarsis* s.s e *An. albitarsis* B são mais próximas demonstrando que são espécies ambíguas. Esses dados corroboram com resultados obtidos por outros autores como Lehr *et al.*, (2005) e por nós onde, com a técnica de RFLP não foi possível a separação das espécies. Porém Merritt *et al.*, (2005) utilizando o gene *White* obteve uma topologia diferente colocando *An. marajoara* como a espécie mais próxima de *An. albitarsis* B e *An. albitarsis* s.s como espécie irmã de *An. deaneorum*.

A técnica de PCR-RFLP, em alguns casos, mostrou-se de utilidade na diferenciação de espécies crípticas. Calado e Navarro-Silva (2005) conseguiram fazer a separação das espécies de *An. (Kerteszia) cruzii* de *An. (Kerteszia) homunculus* por meio desta técnica utilizando seqüências do ITS2, os autores utilizaram 2 enzimas de restrição, uma para cada espécie, o que produziu perfis de clivagem espécie-específica permitindo uma pronta identificação dos mosquitos analisados.

Diferentemente do trabalho de Calado e Navarro-Silva (2005), tivemos dificuldade em encontrar enzimas que cortassem as seqüências de ITS2 de todos os anofelíneos do Complexo Albitarsis e que estes pudessem ser distinguidos por espécies. Uma alternativa a este problema foi a utilização de outros marcadores para que esta problemática fosse solucionada. Portanto, após testarmos todas as amostras com a enzima *TaqI*, aquelas que apresentaram um padrão de corte diferente do esperado foram submetidas a amplificação do gene ND4 para a separação das espécies *An. albitarsis* s.s e *An. albitarsis* B.

Infelizmente não conseguimos amplificar para o gene ND4, todas as amostras que não foram digeridas pela enzima *TaqI* e que provavelmente pertencem à espécies *An. albitarsis* s.s e *An. albitarsis* B. A maioria das reações saíram contaminadas, efetuamos a troca dos kits, *primers*, higienização da sala de PCR, troca de ponteiras, pipetas mas o resultado não foi animador.

As poucas amostras amplificadas foram digeridas com a enzima de restrição *SspI*, e os resultados enzimáticos resultaram em *An. albitarsis* s.s.

O método de RFLP para separação das espécies do Complexo Albitarsis não foi muito preciso. Em alguns casos, algumas bandas inespecíficas foram geradas, dificultando a leitura dos géis. Essas amostras que tiveram bandas inespecíficas, como algumas que foram identificadas por RFLP, foram enviadas para seqüenciamento a fim de elucidar e mesmo comprovar os resultados obtidos por meio desta técnica. Essa dificuldade em separar as espécies por RFLP demonstra como esse complexo é intimamente relacionado, as espécies que o compõem são muito próximas e que determinada técnica utilizada às vezes não é o bastante para separá-los.

5.2 Complexo Triannulatus

Para a distinção das espécies componentes do Complexo Triannulatus, utilizamos 2 seqüências depositadas no GeneBank por Marrelli *et al.*, (2005) e Danoff-Burg e Conn (1997) (trabalho não publicado) ambas para *An. triannulatus*. A enzima utilizada, *BseNI* (*BsrI*), reconhece um sitio de restrição nas 2 seqüências e que resulta em

fragmentos diferentes. Verificamos que os mosquitos da região de Porto Primavera são polimórficos exibindo padrão de ITS2 idênticos a ambas as seqüências depositadas no Genebank em proporções de 88,3% e 11,3% respectivamente para AF462377 (Marrelli et *al.*, 2005) e U92331 (Danoff-Burg e Conn, 1997). Em alguns casos, verificamos que clones de um mesmo indivíduo exibiu seqüências similares às duas seqüências depositadas no GeneBank (dados não mostrados). Este resultado pode ser explicado pelo fato de se estar trabalhando com uma família multigênica cujos genes estão sujeitos à evolução em concerto, isto é, o crossing-over ocorre de maneira desigual, mudando o tamanho dos fragmentos. Sendo assim, variações intragenômicas são esperadas e este fato só pode ser evidenciado após clonagem na qual observa-se a presença de seqüências majoritárias e minoritárias.

Procuramos saber a procedência das seqüências depositadas no GeneBank e verificamos que as de Marrelli et *al.* (2005) procedem do estado de Rondônia enquanto que as de Danoff-Burg e Conn (1997), procedem dos estados da Bahia e Pará (comunicação pessoal). Verifica-se portanto que na região de Mato Grosso do Sul, próximo a Usina de Porto Primavera, encontram-se mosquitos com seqüências de ITS2 semelhantes aos três estados. Não sabemos se por ser esta região de transição, os dois tipos de seqüências foram encontradas ou se dada a pouca amostragem relatada por Marrelli et *al.* (2005) e Danoff-Burg e

Conn (1997), 2 e 4 exemplares respectivamente, estes autores não encontraram as demais seqüências.

No trabalho de Silva-do-Nascimento *et al.*, (2006) os autores separaram espécies do Complexo *Triannulatus* utilizando técnicas de aloenzimas e RAPD. Somente uma aloenzima foi capaz de separar as espécies enquanto que o resultado baseado em um dendrograma montado a partir de RAPD, separou a árvore em 3 clusters com somente uma raiz para 2 espécies, *An. halophylus* e *An. triannulatus* C, demonstrando que essas 2 espécies são muito próximas.

Em nossa amostragem, não pudemos concluir se as outras espécies componentes do Complexo *Triannulatus* estão presentes visto que, sob o ponto de vista molecular, não há informação disponível na literatura. Porém, sob o aspecto ecológico, é pouco provável as demais espécies serem encontradas nas regiões de nosso estudo. Acreditamos que estes anofelíneos apresentam seqüências polimórficas não havendo outras espécies envolvidas, pois quando foi realizada a identificação de larvas e genitálias de machos, capturados na mesma região todas resultaram em *An. triannulatus* s.s.

5.3 A problemática molecular e o Complexo *Albitarsis*.

Pelos resultados advindos de PCR-RFLP, as espécies de *An. albitarsis* s.l encontradas na área da usina Hidrelétrica de Porto

Primavera foram identificadas como *An. deaneorum* e *An. albitarsis* s.s. Verifica-se que em ITS2-RFLP, 63% da amostragem foi identificada como sendo *An. deaneorum* e quando se faz ND4-RFLP o restante da amostragem foi identificada como *An. albitarsis* s.s.. Quando se depara com a distribuição das espécies do Complexo Albitarsis descrita por Forattini (2002), o encontro de *An. deaneorum* e a ausência de *An. marajoara* nestas localidades torna-se coerente.

Após a identificação molecular dos anofelíneos de ambos os complexos, alguns foram seqüenciados, a fim de serem confirmados com as seqüências depositadas no GeneBank.

As seqüências de ITS2 dos anofelíneos do Complexo Albitarsis foram comparados àqueles depositados no GeneBank e verificou-se que estas foram similares às de *An. albitarsis* s.l (os autores não diferenciam a espécie) e *An. deaneorum*. As seqüências de *An. albitarsis* s.l provém de dois estados, Acre e Rondônia, enquanto as de *An. deaneorum* são originárias de mosquitos capturados do Acre. Nossos clones também possuem similaridade parcial com seqüências de *An. marajoara* originárias da Colômbia e Bolívia.

Nota-se, porém, que a porcentagem de identidade de todos os anofelíneos não foi de 100%, resultando similaridades que variaram de 94% a 98% portanto há variação intragenômica entre os clones. Independente destes resultados, o padrão RFLP foi suficiente para

diferenciar *An. deaneorum* dos demais anofelíneos componentes deste Complexo.

Observou-se que o padrão de RFLP não foi capaz de diferenciar as espécies *An. albitarsis* s.s. e *An. albitarsis* B por meio do gene ND4 do DNAm. Enquanto os resultados de RFLP nos mostraram que os mosquitos pertenciam à espécie *An. albitarsis* s.s., o seqüenciamento dos clones mostraram que estes pertenciam à espécie *An. albitarsis* B.

Verificamos também que as seqüências depositadas não pertencem à mesma área em que os nossos espécimes foram capturados e que muitas destas foram seqüenciadas a partir de apenas 1 ou 2 espécimes capturados em campo, sem a realização de F1.

Alertamos para a dificuldade de se identificar morfologicamente estes mosquitos visto que muitas das espécies crípticas são identificadas por caracteres da genitália masculina ou em sua fase larval. Os espécimes deste estudo são fêmeas capturadas em armadilhas tipo CDC . Este tipo de armadilha pode ser prejudicial ao mosquito visto que este pode perder algumas escamas e ser danificado refletindo na identificação morfológica que por sua vez, refletirá na identificação molecular. A partir destes resultados e de outros já reportados em literatura, torna-se crucial que gerações F1 sejam realizadas para que seqüências confiáveis sejam depositadas nos bancos de dados.

Marrelli *et al.*, (2006) fizeram uma revisão crítica sobre as seqüências depositadas no GeneBank e os cuidados que devem ser tomados. Infelizmente a maioria das publicações sobre as seqüências não fornecem indicações de F1 ou de irmãos que possam, no futuro, resultar em informações disponíveis, portanto seqüências questionáveis não podem ser reavaliadas ou corrigidas. Marrelli *et al.*, (2006) propõem que as espécies submetidas ao seqüenciamento tenham sido geradas a partir de F1, extrair o DNA e guardar alguns irmãos para verificação futura, aumentar o número de espécies capturadas em campo e a variabilidade de locais. Além do mais, variações intragenômicas podem ocorrer e nessas circunstâncias o seqüenciamento direto pode ser enganador sendo necessário recorrer à clonagem.

Wilkerson *et al.*, (2005) discutem alguns trabalhos realizados com anofelíneos do Complexo Gambiae e sugerem que talvez metodologia semelhante a que foi utilizada para este complexo possa auxiliar na resolução de identificação dos anofelíneos do Complexo Albitarsis. Uma das discussões diz respeito às seqüências utilizadas na construção de árvores filogenéticas. Uma conclusão tomada pelos autores e por outros (Besansky *et al.*, 2003) é que a adoção de uma análise locus por locus ao invés de uma “abordagem total” (“total evidence”) para a construção de análises filogenéticas de complexos de espécies crípticas poderia minimizar o risco de resultados errôneos.

Utilizar outros marcadores moleculares pode ser uma saída, uma vez o DNA extraído, uma riqueza de informações podem ser geradas a partir de outros marcadores (locus por locus) como COI, COII, ITS1, ND4, RAPD, RFLP e também microssatélites.

A taxonomia molecular é de extrema importância e os marcadores moleculares podem auxiliar na identificação de espécies crípticas, mas não substituem a taxonomia tradicional.

6. Conclusões

1- Identificação de anofelíneos do Complexo Albitarsis da região de Porto Primavera por meio de RFLP-ITS2 mostrou que 62,85 % dos anofelíneos pertencem à espécie *An. deaneorum*.

2- Gene ND4 do DNA mitocondrial não se mostrou ferramenta útil na diferenciação de *An. albitarsis* e *An. albitarsis* B.

3- A identificação por meio de ITS2 mostrou polimorfismos intragenômicos em anofelinos do Complexo Triannulatus.

4- As técnicas moleculares confirmaram as observações morfológicas e ecológicas identificando os anofelíneos do Complexo Triannulatus como sendo *An. triannulatus* s.s.

7- Anexos

Anexo A

9B -ACATTCACCGCAGAACCAACTAGCGAGACCGTCGA--GAGGCGGCTTTGCTGTGTACTG
2B CACATTCACCGCAGAACCAACTAGCGAGACCGTCGA--GAGGCGGCTTTGCTGTGTACTG
AF462386 ---ATTCACCGCAGAACCAACTAGCGAGACCGTCGA--GAGGCGGCTTTGCTGTGTACTG
AY828330 ---ATTCACCGCAGAACCAACTAGCGAGACCGCCGACCGAGGCGGCTTTGCTGTGTACTG
###*****#**#*****

9B ATGATTTGATAGACCCCGTGTCGATCAAGCATTGAAGGACTGTGGCGTGGTGGGTGCACC
2B ATGATTTGATAGACCCCGTGCCGATCAAGCATTGAAGGACTGTGGCGTGGTGGGTGCACC
AF462386 ATGATTTGATAGACCCCGTGTCGATCAAGCATTGAAGGACTGTGGCGTGGTGGGTGCACC
AY828330 ATGATTTGATAGACCCCGTGTCGATCAAGCATTGAAGGACTGTGGCGTGGTGGGTGCACC
*****#*****

9B GCGTGTGTGTGTCGTTGCTTAATACGACTCTCTCTGGTATCACAGCTGGAGCGGGCTATC
2B GTGTGTGTGTGTCGTTGCTTAATACGACTCTCTCTGGTATCACAGCTGGAGCGGGCTATC
AF462386 GTGTGTGGTCGTTGCTTAATACGACTCTCTCTGGTATCACAGCTGGAGCGGGCTATCATC
AY828330 GTGTGTGTGTGTCGTTGCTTAATACGACTCTCTCTGGTATCACAGCTGGAGCGGGCTATC
*#*****

9B CAGTCACAATCCCCAGCGACCTGTGCAGATATGGTAGCCCCGATGTGAAGGACACCACCT
2B CAGTCACAATCCCCAGCGACCTGTGCAGATATGGTAGCCCCGATGTGAAGGACACCACCT
AF462386 CAGTCACAATCCCCAGCGACCTGTGCAGATATGGTAGCCCCGATGTGAAGGACACCACCT
AY828330 CAGTCACAATCCCCAGCGACCTGTGCAGATATGGTAGCCCCGATGTGAAGGACACCACCT

```

9B          TCCTCAAACCAGCTTGAGCAACCAACTTGGGAGAGAGAGAGAGACTGAACGTACCCTGA
2B          TCCTCAAACCAGCTTGAGCAACCAACTTGGGAGAGAGAGAGAGACTGAACGTACCCTGA
AF462386   TCCTCAAACCAGCTTGAGCAACCAACTTGGGAGAGAGAGAGAGACTGAACGTACCCTGA
AY828330   TCCTCAAAGCCAGCTTGAGCCACCAACTTGGGAGAGAGAGAGA--CTGAACGTACCCTGA
*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#

```

```

9B          AGCAACGTGCACACGGACAACGAGTGCAGTCAAGAGCGCGCACGATCGAACCGATCACAA
2B          AGCAACGTGCACACGGACAACGAGTGCAGTCAAGAGCGCGCACGATCGAACCGATCACAA
AF462386   AGCAACGTGCACACGGACAACGAGTGCAGTCAAGAGCGCGCACGATCGAACCGATCACAA
AY828330   AGCAACGTGCACACGGACGACGAGTGCAGTCAAGAGCGCGCACGATCGAACCGATCACAA
*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#*****#

```

Alinhamento das seqüências de ITS2 de 2 clones de *An. deaneorum*, por meio do programa Clustal, comparadas com seqüências já depositadas no GeneBank e o destaque para onde a enzima *TaqI* possui os sítios de restrição.

9B e 2B – Clones de *An. deaneorum*; AY828330 (Li e Wilkerson, 2006) e AF462386 (Marrelli *et al.*, 2005)

*= seqüências idênticas

#= diferenças entre seqüências

Anexo B

3A -----CACCGCAGAACCAACTAGCGAGGTCGTCGGCTGGGTCCCCACGCGGGGCCTGTC
 U92331 -----CACCGCAGAACCAACTAGCGAGGTCGTCGGCTGGGTCCCCACGCGGGGCCTGTC
 AF462377 CACATTCACCGCAGAACCAACTAGCGAGGTCGTCGGCTGGGTCCCCACGCGGGGCCTGCC
 4A -ACATTCACCGCAGAACCAACTAGCGAGGTCGTCGGCTGGGTCCCCACGCGGGGCCTGCC
 #####*****#

3A GCGGCTTAGCTGCGTACTGATGAGTTGATTGACGCCGTCAAACGCGTGTGATCAAGCATT
 U92331 GCGGCTTAGCTGCGTACTGATGAGTTGATTGACGCCGTCAAACGCGTGTGATCAAGCATT
 AF462377 GCGGCTTAGCTGCGTACTGATGAGTTGATTGACGCCGTCAAACGCGTGTGATCAAGCATT
 4A GCGGCTTAGCTGCGTACTGATGAGTTGATTGACGCCGTCAAACGCGTGTGATCAAGCATT

3A GAAGGACTGTGGCGTGGTGAGTACACTCCGTGTGGGTGTGTTCGTTGCTTAATACGACTCC
 U92331 GAAGGACTGTGGCGTGGTGAGTACACTCCGTGTGGGTGTGTTCGTTGCTTAATACGACTCC
 AF462377 GAAGGACTGTGGCGTGGTGAGTACACTCCGTGTGGGTGTGTTCGTTGCTTAATACGACTCC
 4A GAAGGACTGTGGCGTGGTGAGTACACTCCGTGTGGGTGTGTTCGTTGCTTAATACGACTCC

3A TCTCTCTGGTATCACAACTGGTTGCGGGCTACCCC-AGGTCACAATCCCCAGCGACATGT
 U92331 TCTCTCTGGTATCACAACTGGTTGCGGGCTACCCC-AGGTCACAATCCCCAGCGACATGT
 AF462377 TCTCTCTGGTATCACAACTGGTTGCGGGCTACCCCAGGTCACAATCCCC-AGCGACATGT
 4A TCTCTCTGGTATCACAACTGGTTGCGGGCTACCCCAGGTCACAATCCCC-AGCGACATGT
 *****#*****#*****

3A GACGACACAGCTTGCGGTAGCCCCGATGTGGAGGTCCTTGGAAGCGACCTCCCTCAAAGC
 U92331 GACGACACAGCTTGCGGTAGCCCCGATGTGGAGGTCCTTGGAAGCGACCTCCCTCAAAGC
 AF462377 GACGACACAGCTTGCGGTAGCCCCGATGTGGAGGTCCTTGGAAGCGACCTCCCTCAAAGC
 4A GACGACACAACTTGCGGTAGCCCCGATGTGGAGGTCCTTGGAAGCGACCTCCCTCAAAGC
 *****#####*****

```

3A          CAGCCTGTGTGATAGTCCACACACGCACATAGGTGA--GAGAGAGAGACCAAACGTACCC
U92331     CAGCCTGTGTGATAGTCCACACACGCACATAGGTGA--GAGAGAGAGACCAAACGTACCC
AF462377   CAGCCTAGGTGA-----GATAGAGAGACCAAACGTACCC
4A         CAGCCTGTGTGATAGTCCACACACGCACATAGGTGAGAGAGAGAGAGACCAAACGTACCC
          *****#####
          *****#####

3A          TGAAGC-AACGTACACGCTTGCGCGGCGGAGTGTGAGTCATCGAGCGCACGATCGAGAGA
U92331     TGAAGC-AACGTACACGCTTGCGCGGCGGAGTGTGAGTCATCGAGCGCACGATCGAGAGA
AF462377   TGAAGCCAACGTACACGCTTGCGCGGCGGAGTGTGAGTCATCGAGCGCACGATCGAGAGA
4A         TGAAGCCAACGTACACGCTTGCGCGGCGGAGTGTGAGTCATCGAGCGCACGATCGAGAGA
          *****#*****

3A          GAGA----ACCGATCACAAGTGGG
U92331     GAGA----ACCGATCACAAGTGGG
AF462377   GAGA----ACCGATCACAAG----
4A         GAGAGAGAACCGATCACAAG----
          ****#####

```

Alinhamento das seqüências de ITS2 de 2 clones de *An. triannulatus*, por meio do programa Clustal comparadas com seqüências já depositadas no GeneBank e o destaque para onde a enzima *BseNI* (*BsrI*) possui o sítio de restrição.

3A e 4A – clones de *An. triannulatus*. U92331 (Danoff-Burg e Conn) e AF462377 (Marrelli *et al.*, 2005)

*= seqüências idênticas

#= diferenças entre seqüências

Anexo C

AY846345/B -----TTTTATTAAAGTTAGGGGGGTATGGTT-T
 AY846342/ss -----TTTTATTAAAGTTAGGAGGATATGGTT-T
 A9 GACCCTGTTTCAGGTCTATAATTTTAGCNNTATTTTATTAAAGTTAGGGGGGTATGGTTCT
 #####*****#**#*****#*

AY846345/B GTTACGAATGTTTTCTTTATTACAAATAAGTGGTGTAAAATATAATTATTGATGAATTAG
 AY846342/ss GTTACGAATGTTTTCTTTATTACAAATAAGAGGTGTAAAATATAATTATTGATGAATTAG
 A9 GTTACGAATGTTTTCTTTATT-----TATAATTATTGATGAATTAG
 *****#####*****

AY846345/B AATTAGTTTAGTTGGAGGAGTATTAATTAGATTGATTTGTTTACGTCAAACAGATTTGAA
 AY846342/ss AATTAGTTTAGTTGGAGGGGTATTAATTAGATTAATTTGTTTACGTCAAACAGATTTAAA
 A9 AATTAGTTTAGTTGGAGGAGTATTAATTAGATTGATTTGTTTACGTCAAACAGATTTGAA
 *****#*****#*****#**

AY846345/B GGCTTTGATTGCTTATTCATCTGTCGCTCATATAGGAATTGTATTAAGTGGGTTGTTAAC
 AY846342/ss GGCTTTGATTGCTTATTCATCTGTTGCTCATATAGGAATTGTATTAAGTGGTGTGTTAAC
 A9 GGCTTTGATTGCTTATTCATCTGTCGCTCATATAGGAATTGTATTAAGTGGGTTGTTAAC
 *****#*****#*****

AY846345/B TTAACTTATTGAGGATTAAGTGGTTCCTTATGCTTTAATAATTGCTCATGGTCTTTGTTC
 AY846342/ss TTAACTTATTGAGGATTAAGTGGTTCCTTATGCTTTAATAATTGCTCACGGTCTTTGTTC
 A9 TTAACTTATTGAGGATTAACCGGTTCTTATGCTTTAATAATTGCTCATGGTCTTTGTTC
 *****#*****#*****#**

8. Referências Bibliográficas

Andrade JCR, Anjos CFD, Wanderley DMV, Alves MJC, Campos PC. Foco de malária no estado de São Paulo (Brasil). *Rev Saude Publica*. 1986; 20: 323 – 326.

Arruda M, Carvalho MB, Nussenzweig RS, Marcic M, Ferreira AW, Cochrane AH. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Med Hyg*. 1986; 35: 873-81.

Beebe NW , Saul A. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 478-481.

Beebe NW, Ellis JT, Cooper RD, Saul A. DNA sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region for the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes. *Insect Mol Biol* 1999; 8: 381-390.

Berti J, Zimmerman R, Amarista J. Spatial and temporal distribution of anopheline larvae in two malarious areas in sucre state, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993; 88: 353-62.

Besansky NJ, Collins FH. The mosquito genome: organization, evolution and manipulation. *Parasitol Today*. 1992; 6: 186 – 92.

Besansky NJ, Powell JR, Caccone A, Hamm DM, Scott JA, Collins FH. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 6885-6888.

Besansky NJ, Krzywinski J, Lehmann T, Simard F, Kern M, Mukabayire O, Fontenille D, Taure Y, Sagnon NF. Semipermeable species boundaries between *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis*: evidence from multilocus DNA sequence variation. *Proc Nat Acad Sci. U.S.A.* 2003; 100:10818 – 10823.

Bicudo de Paula M, Gomes AC. Culicidae (Diptera) em área sob influência de construção de represa no Estado de São Paulo. *Rev Saude Publica*. 2007; 41(2) 284 – 289.

Black IV WC, Munstermann LE. Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. In. *The biology of disease vectors*. USA: University Press Colorado; 1996, 438-70.

Brown DE, Summer A, Stringer P, Machilam OP. *Epidemiological Study Malaria*. São Francisco. 1991, p.33-34.

Bruce-Chwatt LJ. *Essential Malariology*. 2.ed. London, William Heinemann Medical Books, 1985.

Calado DC, Navarro-Silva MA. Identificação de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Diptera, Culicidae, Anophelinae) através de marcadores moleculares (RAPD e RFLP). *Rev Bras Zoologia* 2005; 22(4): 1127-1133.

Campbell BC, Steffen-Campbell JD, Werren JH. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (*Hymenoptera: Pteromalidae*) inferred from internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Mol Biol* 1993; n 2, 225-237.

Centro de Informações em Saúde para Viajantes (CIVES). Malária. Disponível em <http://www.cives.ufrj.br/informacao/malaria/mal-iv.html>. Acesso em 16 abril 2008.

CESP – Companhia Energética de São Paulo. Estudo de impacto ambiental UHE de Porto Primavera. São Paulo. (Consortio Themag – Engea – UMAH); 1993

Charlwood JD, Wilkes TJ. Observations on the biting activity of *Anopheles triannulatus bachmanni* from the Mato Grosso, Brazil. *Acta Amazon*. 1981, 11:67-69.

Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg*. 1987; 37: 37-41.

Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol* 1996; 5: 1-9.

Conn JE, Wilkerson RC, Segura NO, Souza RTL, Schlichting CD, Wirtz RA, Póvoa MN. 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: Ed. Fio Cruz; 1998.

Cornel AJ, Porter CH, Collins FH. A PCR species diagnostic assay for the *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. *J Med Entomol.* 1996; 33: 109-116.

Costa-da-Silva AL, Capurro ML, Bracco JE. Genetic lineages in the mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100 (6): 539 – 544.

Crabtree MB, Savage HM, Miller BR. Development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay for the identification of *Culex* vectors of St. Louis encephalitis virus based on sequence variation in ribosomal DNA spacers. *Am J Trop Med Hyg.* 1995; 53: 105-109.

Davidson G. The five mating types of the *Anopheles gambiae* complex. *Rev. di Malariologia*. 1964; 13: 167-183.

Deane LM. Observações sobre a malária na Amazônia brasileira. *Rev Serv Esp Saúde Publ*. 1947; 1: 3-60.

Deane LM, Causey OR, Deane MP. Chave ilustrada para a identificação de trinta espécies de anofelinos brasileiros, com algumas descrições novas. *Rev Serv Esp Saúde Publ*. 1947a; 1: 293 – 308.

Deane LM, Causey OR, Deane MP. Chave ilustrada para a identificação de trinta e cinco espécies de anofelinos das regiões Nordeste e Amazônica do Brasil pelos caracteres da fêmea, com notas sobre os transmissores da malária (Diptera: Culicidae). *Rev Serv Esp Saúde Publ*. 1947b; 1: 309 – 336.

Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med. Hyg*. 1988; 38: 223 – 230.

Faran ME. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXXIV. A revision of the Albimanus section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contrib Amer Ent Inst*. 1980; 15: 1 – 215.

Faran ME, Linthicum KJ. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 1981; 13: 1-81.

Fedoroff NV. On spacers. *Cell*. 1979; v4, 16: 697-710.

Forattini OP. *Entomologia Médica*. Vol. 1, Univ. São Paulo, 1962; 662pp.

Forattini OP, Gomes AC, Natal D, Santos JLF. Observações sobre a atividade de mosquitos Culicidae em matas primitivas da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*. 1986; n20: 178 – 203.

Forattini OP. *Culicidologia Médica*. São Paulo: EDUSP; 2002.

Fundação Nacional de Saúde – FUNASA. Boletim epidemiológico da Malária nº01/2003.

Galvão ALA. Contribuição ao conhecimento dos anofelinos do grupo *Nyssorhynchus* de São Paulo e regiões vizinhas (Diptera: Culicidae). *Arq Zool*. 1940; 1: 399 – 484.

Galvão ALA, Lane J. Observações sobre alguns anofelíneos de Salobra, Mato Grosso (Diptera, Culicidae). *Rev Biol Hyg*. 1941; 11:10-18.

Greenwood B, MutabingwaT. Malaria in 2002. *Nature* 2002; 415: 670 - 672.

Hackett BJ, Gimnig J, Guelbeogo W, Costantini C, Koekemoer L L, Coetzee M, Collins FH, Besansky NJ. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum* and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol Biol.* 2000; 9, 369-374.

Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999; 41:95-8.

Hoy MA. Molecular systematics and evolutions of arthropods. In: Insect molecular genetics. An introduction to principles and applications. *Acad of Elsevier Science.* 2003; 363-365.

Hwang U - W, Kim W. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J Parasitol.* 1999; 37 (4): 215 – 228.

Klein TA, Lima JBP, Tada MS, Miller R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 1991a; 44: 463 – 470.

Klein TA, Lima JBP, Tada MS. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondonia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 44 (6) 598 -603.

Knudson DL, Zheng L, Gordon SW, Brown SE, Kafatos FC. Genome organization of vectors. In: *The biology of disease vectors*. USA: University Press of Colorado; 1996, 175 – 214.

Krzywinski J, Besansky NJ. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Ann. Rev. Entomol.* 2003; 48: 111 -139.

Lehr MA, Kilpatrick CW, Wilkerson RC, Conn JE. Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Complex: Incongruence between random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA COI gene sequences. *Ann Entomol Soc Am.* 2005; 98 (6) 908 - 917.

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: 495 - 500.

Li C, Wilkerson RC. Intragenomic rDNA ITS2 variation in the neotropical *An. (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera: Culicidae). *J Hered* 2006; 98 (1): 51 - 59.

Malafrente RS, Marrelli MT, Marinotti O. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darling* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1999; 36(5): 631 - 364.

Manonmani A, Townson H, Adeniran T, Jambulingam P, Sahu S, Vijayakumar T. rDNA-ITS2 polymerase chain reaction assay for the sibling species of *Anopheles fluviatilis*. *Acta Trop*. 2001;78: 3 - 9.

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

Marrelli MT, Sallum MAM, Marinotti O. The secondy internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy – A critical review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(8): 817-832.

Matioli SR, Passos-Bueno MRS. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: Matioli SR, editor. *Biologia molecular e evolução*. São Paulo: Holos; 2001, p. 153 - 161.

Mclain DK, Collins FH. Structure of rDNA in the mosquito *Anopheles gambiae* and rDNA sequence variation within and between species of *An. gambiae* complex. *Heredity*. 1989; 62: 233 - 242.

Mclain DK, Collins FH, Brandling-Bennett AD, Were JB. Microgeographic variation in rDNA intergenic spacers of *Anopheles gambiae* in western Kenya. *Heredity*. 1989a; 62: 257 - 264.

Merritt S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio PY, Danoff BJA, 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: 364 – 376.

Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol Biol.* 1996; 5: 93 -107.

Pan American Health Organization (PAHO). *Status of malaria in the Americas.* PAHO/HCP/HCT/98,1998.

Paskewitz SM, Ng K, Coetzee M, Hunt RH. Evaluation of the polymerase chain reaction method for identifying members of the *Anopheles gambiae* (Diptera:Culicidae) complex in Southern Africa. *J Med Entomol.*1993a; 30: 953 -957.

Paskewitz SM, Wesson DM, Collins FH. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex. *Insect Mol Bio.* 1993b; 2: 247 - 257.

Peyton EL. A new classification for leucosphyrus group of *Anopheles* (*Cellia*). *Mosquito Systematics.*1990; 21: 197 - 205.

Pinto C. Disseminação da malária pela aviação. Biologia do *Anopheles gambiae* e outros anofelinos no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1939; 34: 293 – 430.

Portal da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>. acesso dia 17/08/2009.

Porter CH, Collins FH. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med. Hyg.* 1991; 45(2): 271 - 279.

Raí KS. *Aedes albopictus* in the Américas. *Annu Rev Entomol.* 1991; 36: 459 -484.

Rachou RG. Anofelinos do Brasil: comportamento das espécies vetoras da malária. *Rev Bras Malariol D Trop.*, 10. 1958; 145 – 181.

Restriction Mapper version 3. Disponível em www.restrictionmapper.org

Rey L. *Parasitologia*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1991; 286 – 287.

Rey L. *Parasitologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000; 300 – 307.

Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Carvalho-Pinto CJ , Flores Mendonza C, Silva-do-Nascimento TF. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93: 651 - 655.

Santos JM, Maia JF, Tadei WP. Differentiation and genetic variability in natural populations of *An. (N) triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922) of Brazilian Amazonia. *Braz J Biol*. 2004; 64(2): 327 - 336.

Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1993, 49: 520 - 529.

Serviço de Seqüenciamento de DNA. Instituto de Química. USP.

<http://www2.iq.usp.br/bioquimica/formulario/Seqüenciamento/>

Severine C, Silvestrini F, Manzini P, La Rosa G and Marinucci M. Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L and *Cx. Quinquefasciatus* Say (diptera: Culicidae). *Insect Mol Biol*. 1996; 5: 181-186.

Silva-do-Nascimento TF, Lourenço-de-Oliveira R. *Anopheles halophylus*, a new species of the subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera, Culicidae) from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(6): 801-811.

Silva-do-Nascimento T, Wilkerson RC, Lourenço-de-Oliveira R, Monteiro FA. Molecular confirmation of the specific status of *Anopheles halophylus* (Diptera: Culicidae) and evidence of a new cryptic species within *An. triannulatus* in central Brazil. *J Med Entomol.* 2006; 43: 455 – 459.

Silva-do-Nascimento TF, Lourenço-de-Oliveira R. Diverse population dynamics of three *Anopheles* species belonging to the triannulatus complex (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102(8): 975 – 982.

Stringer CB, Andrews P. Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans. *Science.* 1988; 239(4845) 1263 – 1268.

Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. Malária.

<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.html>. Acesso 29 Abr. 2008.

Tabachnick WJ, Black IV WC. Population genetics in vector biology. In: Marquardt WC e Beaty BJ. The biology of disease vectors. *Univ Press of Colorado, Driwot.* 1996; 417 - 437.

Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafalel MS. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59: 325 – 335.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:4673 - 4680.

Voorham J, van Os N, van der Kaay HJ. Reappearance of *Plasmodium malariae* in Suriname? *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1993; 87: 243 - 244.

White GB. Malaria vectors ecology and genetics. *British Medical Bulletin*, 1982; 38: 207 - 212.

Wilkerson RC, Gaffigan TV, Lima JB. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (Diptera, Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995a; 90:721 - 732.

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

Wilkerson RC, Foster PG, Li C, Sallum MAM. Molecular phylogeny of neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* species complex (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am.* 2005; 98 (6): 918 – 925.

Wilkerson RC, Sallum MAM. *Anopheles (Anopheles) forattinii*; a new species in series *Arribalzagia* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1999; 36: 345 – 354.

World Health Organization. Expert Committee on malaria. *Tech Rep Ser*; 2000. (WHO – Twentieth Report, 892).

World Health Organization (WHO). Tratamento da malária não complicada e uso de medicamentos antimaláricos para a proteção de viajantes. Brasília, 1075, 1996.

World Health Organization (WHO). World malaria situation in 1992. *Weekly Epidemiol. Rec.* 1994; 69: 309-16.

World Health Organization (WHO). www.who.int. 2006. Acesso 17 abril 2008.

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](#)