

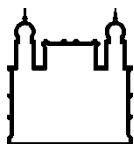
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**DIVERSIDADE EM GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA A INSETICIDAS E
RITMOS BIOLÓGICOS EM *Anopheles darlingi* ROOT 1926**

ALINE CORDEIRO LOUREIRO

Rio de Janeiro
Maio de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALINE CORDEIRO LOUREIRO

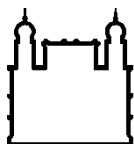
Diversidade em genes relacionados à resistência a inseticidas e ritmos biológicos
em *Anopheles darlingi* Root 1926

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientador (es): Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior
Prof. Dra. Alejandra Saori Araki

RIO DE JANEIRO

Maio de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALINE CORDEIRO LOUREIRO

Diversidade em genes relacionados à resistência a inseticidas e ritmos biológicos em *Anopheles darlingi* Root 1926

**ORIENTADOR (ES): Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior
Dra. Alejandra Saori Araki**

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dra. Teresa Fernandes Silva do Nascimento - Presidente e Revisora do texto

FIOCRUZ/ Instituto Oswaldo Cruz/ Laboratório de Transmissores de Hematozoários

Dr. João Silveira Moledo Gesto

FIOCRUZ/ CPqRR

Dra. Izis Mônica Carvalho Sucupira

Instituto Evandro Chagas

Dr. Felipe de Mello Vigoder

UFRJ/ Instituto de Biologia / Departamento de Genética

Dr. Jerônimo Augusto Fonseca Alencar

FIOCRUZ/ Instituto Oswaldo Cruz/ Laboratório de Díptera

Rio de Janeiro, 28 de maio de 2018

Loureiro, Aline Cordeiro.

Diversidade em genes relacionados à resistência a inseticidas e ritmos biológicos em *Anopheles darlingi* Root 1926 / Aline Cordeiro Loureiro. - Rio de Janeiro, 2018.

112 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientador: Ademir de Jesus Martins Júnior.

Co-orientadora: Alejandra Saori Araki.

Bibliografia: f. 90-103

1. espécies crípticas. 2. vetor de plasmódio. 3. genética de populações. I. Título.

Dedico esse trabalho à população brasileira e aos anofelinos que com sua complexidade/resiliência tanto me despertam interesse.

AGRADECIMENTOS

Começo aqui refletindo sobre nosso cenário político/econômico atual. Olho para a população brasileira, e independente das escolhas políticas, religiosas e afins de cada um, a primeira palavra que me vem à cabeça é RESILIÊNCIA, por estar sempre sorrindo em meio ao caos que estamos vivendo. Obrigada, natureza! Obrigada, Deus! Vocês são fonte de energia diária!! Como agradecimento, entrego esse trabalho à população brasileira com o intuito de contribuir de forma mais integrada no controle de vetores!

Aos anofelinos, cujo trabalho/estudo nesse escopo é sempre árduo e muitas vezes negligenciado, sem vocês esse trabalho não existiria.

A minha mãe que desde a minha infância me inspirava a ser mulher independente; ao meu pai por me ensinar a sempre racionalizar a vida e despertar o interesse pela ciência e meu irmão por enxergar potencial em mim que inúmeras vezes desconheci. Obrigada pelo amor incondicional e por acreditar em mim. Amo vocês!

Ao meu namorado Matheus Amâncio, por me mostrar o que é ser companheiro, topa todas as minhas ideias e por aturar meu estresse nesse tempo de escrita. Você mostrou uma cumplicidade sem igual que nunca vou esquecer. Te amo, meu amor! A minha futura sogra Janete Amâncio por me incentivar e me apoiar sempre que precisei!

As minhas tias, tios, primos e primas..vocês são peça do quebra-cabeça da minha história. Em especial a minha tia (Tally) e a minha madrinha (Dinda) pelo incentivo e carinho de todas as manhãs mesmo que de forma virtual. Não poderia esquecer da minha afilhada Bruna..me sinto desafiada a ser exemplo de mulher pra você.

Aos meus orientadores por acreditar nessa ideia/desafio de embarcar comigo nesse tão pouco explorado universo da diversidade em *Anopheles darlingi*. Ao Dr.Ademir por todos os puxões de orelha. Por todos: “Como assim você não sabe isso?”. Nunca deixe de ser o líder que é. O verdadeiro líder inspira quem está ao seu redor a ser excelente. Você é um cara desses! Depois de sentir muita raiva, vi em você um amigo que como eu, tem personalidade forte, e por isso te entendo tão bem. A Dra.Saori, a orientadora, amiga, exemplo de mulher. Se eu for metade de quem você é me considero muito satisfeita. Tenho certeza que vou carregar você sempre comigo, porque você me inspira!

Aos meus amigos, em especial ao Felipe (Fefo) por ser meu bestie estar presente sempre que preciso. Carrego um amor por você que não sei explicar. A Monique Costa por ser a amiga mais ciumenta, mais fiel e cúmplice da vida! Aos “Reis do Camarote”: Alessandro Sales, Camilla Rodrigues, Carla Rodrigues, Cleyton

Carvalho, Helena Vargas, Felipe Miranda, Marcelly Barros, Mateus Pelegrino, Ruan Lopes por serem os melhores amigos que poderia ter. Ao André Sousa por ser o irmão português mais brasileiro que tenho. Ao Felipe Barreto por ser o modelo de amigo engenheiro bem sucedido na vida. Ao André Lacê por me fazer rir sempre, principalmente nos dias que estava estressada escrevendo. A Mayara Lamônica e Diogo Simão pela cumplicidade de sempre! Vocês são uns queridos! Ao Gabriel Miranda por ser meu coach e amigo. Ao Franklin Rodrigues por ser o Frankolino de sempre e ao Hudson Alcântara (I'm batman!). Vocês são parceiros!

A família LAFICAVE. Primeiramente ao Dr. José Bento, por acreditar em mim! Como não agradecer a cada um de vocês que são minha família? Ao Luiz Paulo Brito, que me acompanha desde a iniciação científica sendo um grande amigo. Ao Ramon Lopes por estar comigo em todas as minhas escolhas acadêmicas..somos uma dupla dinâmica até na hora de atacar a comida. Luana Carrara por ser sempre companheira. Eita mulher desenrolada! A Bárbara Paes por ser minha parceira no desafio “kdr darlingi” e amiga pra vida! Me identifico muito com você! Ao Yan Dias pelos dramas de todos os dias. Taiza Braga minha parceira de desafio *Anopheles* e de pcr. Ao Rafi Ur Rahman, o paquistanês mais carioca que eu conheço. A Laficavianos do Ibex: Cynara Rodovalho, Raquel Santos, Luciana Dias, Luiz Guilherme Bauzer, Yasmin Coelho, Paula Figliuolo, Priscila Serravale, Gilberto Alcântara, Sandro Lemos. Vocês fazem parte dessa trajetória!

A Joseane Carneiro, a secretária mais competente e boa praça que eu já conheci. Ao Rogério Araújo, o famoso GP do Carlos Chagas. A Lígia e a toda equipe de manutenção/apoio. Vocês fazem o Carlos Chagas funcionar e ser excelente ambiente de trabalho!

A galera do LABIMI, em especial a Dra. Rafaela Bruno que faz eu me sentir em casa. Você é um exemplo de sucesso profissional para mim! Ao Robson, o cara das células competentes. Obrigada pelas inúmeras vezes que me salvou! Lourdinha, Luana Farnesi, parceira de laboratório desde o LAFICAVE e confidente da vida; Rayanne; Karine; Jéssica; Andressa e Fernanda.

Ao Diogo Bellinato (“furão da BP”, “LAFICAVE forever” e amigo da vida), Keli Antunes, Mayra Mansur, Alex Moura, Ingrid Sousa, Ludmila Fiuza, Paula Rangel por serem “os furões da BP”, meus amigos de turma, por encarar parasito 1 e 2 e mais uma imensidão de disciplinas! Mais uma etapa concluída, galera!

A Pós-Graduação em Biologia Parasitária pelo prazer de fazer parte da pós-graduação em parasitologia com excelente desempenho e com profissionais tão dedicados. Obrigada a todos. Aproveito aqui pra agradecer ao CNPq pelo fomento mesmo em meio à crise econômica atual.

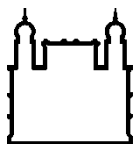
A todos os colaboradores: Dra.Simone Ladeia (você se tornou uma grande amiga), Dra.Marinete Póvoa, Dr.Allan Kardec e Dra. Teresa Fernandes do Nascimento por sempre se dispor a ajudar todas as vezes que precisei!

Aos membros da banca: Dr. João Gestó, Dra. Izis, Dr. Felipe Vigoder e Dr. Jerônimo Alencar, por aceitar o convite e pelas considerações. Agradeço em especial a Dra. Teresa Fernandes do Nascimento pela impecável revisão desse trabalho!

Por fim, mas nem por isso menos importante, a todos que passaram por minha vida nesses 2 anos super intensos..como lema da vida carrego comigo a ideia de que todos que passam deixam um pedaço de si e levam consigo um pedacinho de mim. Essa é a graça da vida: acrescentar e ser acrescentado sem a espera de algo em troca!

“O aspecto mais impressionante do mundo vivo é a sua diversidade. Não existem dois indivíduos iguais em uma população que se reproduz sexuadamente, nem duas populações, espécies ou táxons mais elevados que sejam iguais. Para onde quer que olhemos na natureza encontramos singularidade.”

(Ernst Mayr)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DIVERSIDADE EM GENES RELACIONADOS À RESISTÊNCIA A INSETICIDAS E RITMOS BIOLÓGICOS EM *ANOPHELES DARLINGI* ROOT 1926

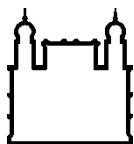
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Aline Cordeiro Loureiro

Anopheles darlingi, o principal vetor de plasmódios que podem causar malária humana, está distribuído na região neotropical desde o sul do México até o sul do Brasil. Uma série de estudos vem apontando evidências sobre a existência de espécies crípticas em *An. darlingi*, como por exemplo populações exibindo diferenças no comportamento hematofágico, em arranjos cromossômicos e na morfologia dos ovos e asas. Além disso, variações em microssatélites e outras diferenças moleculares têm sido notadas. A alimentação, assim como a locomoção e acasalamento, apresentam ritmos biológicos controlados por genes do relógio circadiano, como o *timeless (tim)* e *period (per)*, que podem estar envolvidos na regulação de características comportamentais espécie-específicas, e portanto configuram alvos interessantes para o estudo da dinâmica de especiação. Além disso, busca-se polimorfismos em genes do canal de sódio (*Nav*) e da acetilcolinesterase (*ace-1*), relacionados à resistência a inseticidas das classes piretróides e organofosforados, respectivamente. Sendo assim, testamos a hipótese de divergência entre diferentes amostras de *An. darlingi* de localidades brasileiras (Barcelos e Manaus, AM, além de Porto Velho, RO) e uma colombiana (Chocó). Os resultados foram obtidos via amplificação de fragmentos daqueles quatro genes, clonagem e sequenciamento, em *pools* de cada população. Ao final das análises, os marcadores *per*, *tim* e *ace-1* apresentaram estruturação genética entre as populações analisadas, sugerindo um perfil genético distinto entre as populações de *An. darlingi* da Colômbia e do Brasil. Curiosamente, o marcador *Nav* não mostrou estruturação para nenhuma das populações em questão. Por fim, não foram encontradas mutações classicamente relacionadas à resistência a inseticidas nos genes *Nav* e *ace-1*.

Palavras-chave: espécies crípticas, vetor de *Plasmodium*, *period*, *timeless*, canal de sódio, acetilcolinesterase, genética de populações



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DIVERSITY ON GENES RELATED TO INSECTICIDE RESISTANCE AND BIOLOGICAL RHYTHMS ON *ANOPHELES DARLINGI* ROOT 1926

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITARY BIOLOGY

Aline Cordeiro Loureiro

Anopheles darlingi, the main vector of *Plasmodium* that can cause human malaria, is distributed in the neotropical region from Southern Mexico to Southern Brazil. A number of studies have pointed to the existence of cryptic species in *An. darlingi*, such as populations exhibiting differences in hematophagous behavior, chromosomal arrangements, besides egg and wing morphology. In addition, variations in microsatellites and other molecular differences have been noted. Feeding, as well as locomotion and mating, present biological rhythms controlled by circadian clock genes, such as *timeless (tim)* and *period (per)*, which may be involved in the regulation of species-specific behavioral traits, and therefore constitute interesting targets for the study of speciation dynamics. Moreover, we searched for polymorphisms in the voltage gated *sodium channel (Nav)* and *acetylcholinesterase (ace-1)* genes related to resistance to insecticides of pyrethroid and organophosphate classes, respectively. In this sense, we tested the hypothesis of divergence between different samples of *An. darlingi* from Brazilian locations (Barcelos and Manaus, AM, besides Porto Velho, RO) and one from Colombia (Chocó). The results were obtained via amplification, cloning and sequencing of fragments of those four genes, grouped in pools of each population. At the end of the analyzes, *per*, *tim* and *ace-1* markers showed genetic structure among the evaluated populations, suggesting a distinct genetic profile between Colombian and Brazilian populations of *An. darlingi*. Curiously, the *Nav* marker did not show structuring among populations. Finally, we did not find mutations classically related to insecticide resistance in the *Nav* and *ace-1* genes.

Key-words: cryptic species, Plasmodium vector, *period*, *timeless*, voltage gated *sodium channel*, acetylcholinesterase, population genetics

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	16
1.1 MALÁRIA	16
1.2 CONTROLE DE <i>Anopheles</i> sp.....	17
1.2.1 RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS.....	19
1.3 DESCOBRINDO O <i>Anopheles darlingi</i>	23
1.4 . <i>Anopheles darlingi</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	26
1.5 ESPÉCIES CRÍPTICAS NO GÊNERO <i>Anopheles</i>	30
1.6 ESTUDOS DA DIVERSIDADE EM <i>Anopheles darlingi</i>	31
1.6.1 VARIAÇÕES NO COMPORTAMENTO	31
1.6.2 VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS.....	33
1.6.3 VARIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	34
1.6.4 VARIAÇÕES CITOGENÉTICAS.....	35
1.6.5 VARIAÇÕES MOLECULARES	36
1.7 DIFERENÇAS COMPORTAMENTAIS DERIVADAS DE ALTERAÇÕES NO RELÓGIO MOLECULAR DO CICLO CIRCADIANO	40
1.7.1 <i>PERIOD</i>	42
1.7.2 <i>TIMELESS</i>	43
1.8 . SELEÇÃO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA A INSETICIDAS.....	44
1.8.1 CANAL DE SÓDIO REGULADO POR VOLTAGEM (<i>Nav</i>).....	44
1.8.2 ACETILCOLINESTERASE, RESISTÊNCIA A ORGANOFOSFORADOS E <i>ace-1</i>	47
2.JUSTIFICATIVA	48
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1 AMOSTRAS.....	51
4.2. EXTRAÇÃO DE DNA E FORMAÇÃO DE POOLS	52
4.3 DESENHO DOS PRIMERS	53
4.4 CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO	55
4.5 . PURIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO.....	58
4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	59
5.RESULTADOS	61
5.1. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS	61

5.1.1 GENE <i>per</i>	61
5.1.2 GENE <i>tim</i>	64
5.1.3 GENE <i>Nav</i>	66
5.1.4 GENE <i>ace-1</i>	68
5.2 EVIDÊNCIAS DE SELEÇÃO NATURAL?	70
5.3. DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES PARA CADA GENE NUCLEAR.....	70
5.3.1 GENE <i>per</i>	70
5.3.2 GENE <i>tim</i>	72
5.3.3. GENE <i>Nav</i>	72
5.3.4 GENE <i>ace-1</i>	73
5.4. INFERÊNCIAS GENEALÓGICAS	74
5.4.1 GENE <i>per</i>	74
5.4.2 GENE <i>tim</i>	75
5.4.3 GENE <i>Nav</i>	75
5.4.4 GENE <i>ace-1</i>	75
5.5. GENOTIPAGEM DO SÍTIO 1014 DO <i>Nav</i>	80
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÃO	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
9 ANEXOS.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principais ferramentas utilizadas no controle de <i>Anopheles</i>	17
Figura 2: Localidades com registros sobre susceptibilidade/resistência a inseticidas em anofelinos entre 2005 e 2018	20
Figura 3: Resistência a inseticidas registrada em populações de anofelinos em três períodos distintos	21
Figura 4: Ilustração do <i>Cellia argyrotarsis</i>	23
Figura 5: Cópia da ilustração de uma tabela publicada por Shannon em “ <i>The Anophelines of the Amazon Valley</i> ”, (1933) evidenciando a abundante presença do <i>Anopheles darlingi</i>	24
Figura 6: Fêmea de <i>Anopheles darlingi</i> fazendo repasto sanguíneo	26
Figura 7: Mapa com a distribuição de <i>An. darlingi</i> nas Américas	27
Figura 8: Representação esquemática das principais características morfológicas diferenciáveis em <i>An. darlingi</i>	29
Figura 9: Padrão de pontos escuros e pálidos em oito diferentes tipos de asas de <i>An. darlingi</i>	34
Figura 10: Representação esquemática do perfil eletroforético de isoenzimas	35
Figura 11: Inversão cromossômica (seta vermelha) do braço 2R encontradas em <i>An. darlingi</i>	3936
Figura 12: Esquema representativo da alça regulatória principal do relógio circadiano.	<u>4241</u>
Figura 13: Canal de sódio regulado por voltagem (Na_v)	45
Figura 14: Acetilcolinesterase e a transmissão do impulso nervoso	47
Figura 15: Localidades das amostras de <i>Anopheles darlingi</i>	52
Figura 16: Representação da PCR alelo-específica, esquematizando os <i>primers</i> específicos para o sítio da mutação <i>kdr</i> contendo uma calda GC na ponta 5' e uma transição na extremidade 3'. Mais abaixo pode ser observada a diferença do tamanho de <i>amplicon</i> gerado	55
Figura 17: Árvore gênica de cinco populações de <i>Anopheles darlingi</i> para o <i>per</i>	76
Figura 18: Árvore gênica de cinco populações de <i>Anopheles darlingi</i> para o <i>tim</i>	77
Figura 19: Árvore gênica de cinco populações de <i>Anopheles darlingi</i> para o Na_v	78
Figura 20: Árvore gênica de cinco populações de <i>Anopheles darlingi</i> para o <i>ace-1</i>	79
Figura 21: Exemplo de uma fotografia de gel de eletroforese com produtos de AS-PCR para a variação L1014F do Na_v de <i>Anopheles darlingi</i>	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos <i>primers</i> para amplificação parcial dos genes <i>per</i> , <i>tim</i> , <i>Na_v</i> e <i>ace-1</i>	54
Tabela 2: Sequências dos <i>primers</i> para a genotipagem <i>kdr</i>	55
Tabela 3: Condições utilizadas na amplificação dos genes para análises de diversidade em <i>An. darlingi</i>	57
Tabela 4: Resumo dos índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene <i>per</i> nas populações de <i>Anopheles darlingi</i>	62
Tabela 5: Haplótipos encontrados no segmento do gene <i>per</i> nas populações de <i>An. darlingi</i>	63
Tabela 6: Resumo dos índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene <i>tim</i> nas populações de <i>Anopheles darlingi</i>	64
Tabela 7: Haplótipos encontrados no segmento do gene <i>tim</i> nas populações de <i>An. darlingi</i>	65
Tabela 8: Resumo dos índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene <i>Na_v</i> nas cinco populações de <i>Anopheles darlingi</i>	66
Tabela 9: Haplótipos encontrados no segmento do gene <i>Na_v</i> nas populações de <i>An. darlingi</i>	67
Tabela 10: Resumo dos índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene <i>ace-1</i> nas populações de <i>Anopheles darlingi</i>	68
Tabela 11: Haplótipos encontrados no segmento do gene <i>ace-1</i> nas populações de <i>An. darlingi</i>	69
Tabela 12: Teste de Tajima (1989) para os quatro genes analisados.....	70
Tabela 13: Estimativas de diferenciação genética para o segmento do gene <i>per</i> em <i>Anopheles darlingi</i>	71
Tabela 14: Estimativas de diferenciação genética para o segmento do gene <i>tim</i> em <i>Anopheles darlingi</i>	72
Tabela 15: Estimativas de diferenciação genética para segmento do gene <i>Na_v</i> em populações de <i>Anopheles darlingi</i>	73
Tabela 16: Estimativas de diferenciação genética para segmento do gene <i>ace-1</i> em populações de <i>Anopheles darlingi</i>	74
Tabela 17: Genotipagem do sítio 1014 para a variação L1014F em <i>Anopheles darlingi</i> do Rio Unini e Rio Jaú, Estado do Amazonas.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Acre
<i>ace-1</i>	gene acetilcolinaesterase 1
AChE	enzima acetilcolinaesterase
<i>AFLP</i>	<i>Amplified Fragments Length Polymorphism markers</i>
AM	Amazonas
An	<i>Anopheles</i>
AP	Amapá
ASPCR	PCR alelo específica
BA	Bahia
Ba1	Barcelos 1
Ba2	Barcelos 2
<i>COI</i>	citocromo oxidase I
Col	Colômbia
DDT	<i>diclorodifeniltricloroetano</i>
<i>DMSO</i>	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
D _T	teste de Tajima
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
E	éxon
F _{st}	índice de diferenciação genética
GTR	General Time Reversible
<i>h</i>	número de haplótipos
HKY	Hasegawa-Kishino-Yano
I	íntron
ITS2	Internal Transcribed Spacer 2
<i>kdr</i>	<i>Knockdown resistance</i>
Man	Manaus
Na ⁺	íons de sódio
NaCl	cloreto de sódio
<i>Na_v</i>	canal de sódio regulado por voltagem
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ng	nanograma
PA	Pará
Pb	pares de base
<i>Pcr</i>	reação em cadeia de polymerase
<i>per</i>	period
pH	potencial de hidrogênio
Pve	Porto Velho
<i>RAPD</i>	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RJ	Rio de Janeiro
RO	Rondônia
rpm	rotação por minuto
RR	Roraima
s	número de sítios polimórficos
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sf	sítios polimórficos fixos

SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SP	São Paulo
Sp.	espécie
Ss	sítios polimórficos compartilhados
s.s.	sensu stricto
Sx	sítios polimórficos exclusivos da população 1
Sy	sítios polimórficos exclusivos da população 2
TE	Tris-HCl (1M, pH: 8,0) / 20 mL de EDTA (0,5 M, pH: 8,0)
TNES	250 mM de Tris pH 7.5, 2 M de NaCl, 100 mM de EDTA e 2.5% de
SDS	Dodecil sulfato de sódio
μL	microlitro
μM	micromolar
Π	diversidade nucleotídica
θ	parâmetro neutro

1. INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa, febril, de grande importância em Saúde Pública, transmitida ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Os primeiros registros relativos à doença datam de cerca de 2700 a.C. (Cox, 2010). Seus sintomas manifestam-se comumente em forma de febre, cefaleia intensa, calafrios e vômito, entre 10-15 dias após a infecção do indivíduo. Crianças menores de cinco anos, gestantes, indivíduos com imunodeficiência e migrantes representam o grupo de maior risco de contrair a doença (PAHO, 2017a).

No ano de 2016, foram registrados 216 milhões de casos de malária no mundo, sendo 90% deles provenientes da África. Neste mesmo ano, foram notificadas 445 mil mortes, 650 delas no continente americano. Em virtude do sucesso das estratégias de controle, entre os anos de 2010 e 2016, houve redução de 20 a 22% dos números de casos nas regiões africana e americana (WHO, 2017). Contudo, devido a fatores sociais e econômicos, como atividade mineradora e aumento do fluxo de migração em áreas favoráveis à transmissão de malária, no ano de 2016 houve aumento na prevalência no continente americano, principalmente na Venezuela e no Brasil (PAHO, 2017a; WHO, 2017).

No Brasil, os casos ocorrem predominantemente na região da Amazônia Legal que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Entre janeiro de 2016 e novembro de 2017, o Brasil notificou 174.522 casos de malária nesta região, revelando um aumento considerável quando comparado ao ano de 2016, que teve 117.832 casos (PAHO, 2018). No ano de 2014, foram descritos 4.593 casos importados de países que fazem fronteira com essa região. O Amazonas contribuiu com 47% da prevalência, seguido do Acre com 22%. Naquele mesmo ano, foram registrados 23 óbitos na região. Na região Extra-Amazônica, foram notificados 559 casos de malária, sendo 54 autóctones dos estados da Bahia,

Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Piauí, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo. Contudo, entre estes casos, 273 tiveram provável origem na região Amazônica e 232 com possível origem em outros países, sendo ao todo registrados 15 óbitos nas áreas extra-amazônicas (SVS, 2015).

1.2 CONTROLE DE *Anopheles* sp

Até o momento não existe uma vacina contra a malária, embora a OMS tenha divulgado que nos próximos anos a vacina RTS,S/AS01 poderá estar disponível para algumas áreas da África. Outros estudos visando a melhoria dessa vacina estão em andamento, porém ainda sem previsão de sua utilização (Nielsen et al. 2018). Além disso, há relatos de disseminação de resistência do parasito a quimioterápicos (PAHO, 2018). Portanto, o controle do mosquito vetor é a forma mais efetiva de combate à doença (PAHO, 2017). Para tanto, as principais ferramentas consistem no uso de inseticidas neurotóxicos, através do uso de mosquiteiros impregnados (ITN – insecticide-treated nets) e borrifação de efeito residual no interior das casas (IRS – indoor residual spraying) (Figura 1). Acredita-se que o uso de mosquiteiros impregnados, sozinho, contribuiu com a redução em 68% dos casos de malária nos últimos 14 anos (Coleman et al., 2017; PAHO, 2017).



Figura 1: Principais ferramentas utilizadas no controle de *Anopheles*. A) aplicação de efeito residual no interior das casas (IRS); B) telas mosquiteiros impregnadas com inseticidas (ITN).
Fonte: A) CDCa; B: WHO, 2014

Os inseticidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde para controle de vetores pertencem a quatro diferentes classes: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides. Todos estes compostos atuam no sistema nervoso central do mosquito, causando sua morte. Os organoclorados são inseticidas que contem carbono, hidrogênio e cloro. O DDT (diclorodifeniltricloroetano) é um exemplo deles e foi amplamente utilizado no século passado. Ele atua no canal de sódio regulado por voltagem (N_{av}) da membrana nervosa das células, destruindo o equilíbrio de íons sódio e potássio, em insetos e mamíferos (Braga & Valle, 2007). Devido a sua persistência no ambiente e acúmulo em tecidos, o seu uso foi banido em diversos países, embora esta proibição para utilização em Saúde Pública venha sendo repensada já há alguns anos, devido a casos de resistência aos piretróides, inseticidas mais utilizados atualmente (WHO, 2014).

Os organofosforados incluem todos os inseticidas que têm fósforo na sua composição. Apresentam vantagens em relação aos organoclorados por serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos, embora sejam mais tóxicos que aqueles e sua persistência no ambiente tenha menor duração, o que faz com que a periodicidade da sua aplicação precise ser mais frequente. Esta classe de inseticidas atua inibindo a acetilcolinesterase (AChE), importante enzima do sistema nervoso central. Esta enzima é fosforilada pelo inseticida e fica inativada, resultando no acúmulo de acetilcolina nas sinapses e impedindo que o impulso nervoso seja interrompido. Assim, o sistema nervoso central é continuamente estimulado, causando a paralisia e morte do inseto (Braga & Valle, 2007).

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico, onde “Propoxur” está entre os mais utilizados. Apresenta ação letal rápida e curto poder residual. Como os organofosforados, também inibem a ação da AChE (Braga & Valle, 2007).

Os piretroides foram originalmente produzidos a partir do piretro extraído de crisântemos, sendo hoje produzidos a partir de moléculas sintéticas. Apresentam alta toxicidade aos insetos e baixa toxicidade para os humanos. São de fácil degradação no ambiente e não se acumulam no ecossistema. Alguns

exemplos são a deltametrina e a permetrina. Esta classe de inseticida tem modo de ação parecido ao DDT. Atuam mantendo os N_{av} das membranas de neurônios abertos, alterando o processo fisiológico normal da propagação do impulso nervoso, levando à rápida paralisia (efeito conhecido por *knockdown*), seguida de morte. Além disso, os piretróides apresentam efeito mais intenso que o DDT (Braga & Valle, 2007). Piretróides são os mais utilizados atualmente, seja em campanhas governamentais ou em aplicações domésticas (Macoris et al., 2018).

Atualmente, os inseticidas recomendados pela OMS para uso nas estratégias de controle são somente da classe dos piretróides (alfa-cipermetrina, ciflutrina, deltametrina, etofenprox, lambda-cialotrina e permetrina) para ITNs (WHOPES, 2016). Para IRS, além de piretróides (alfa-cipermetrina, bifentrina, ciflutrina, deltametrina, etofenprox e lambda-cialotrina), são também indicados organoclorado (DDT), organofosforados (malathion, fenitroton e pirimifós-metil) e carbamatos (bendiocarb e propoxur) (WHOPES, 2015).

Apesar do amplo espectro de inseticidas a serem utilizados em Saúde Pública e na Agricultura, a eficácia das estratégias de controle de vetores e pragas pode ser comprometida, devido à seleção de resistência comportamental e fisiológica dos mosquitos (Hayes & Charlwood, 1978; Coleman et al., 2017).

1.2.1 RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS

Resistência é definida como a habilidade de mosquitos sobreviverem a uma dose de inseticida que seria letal para a maioria dos indivíduos de sua população ou linhagem (WHO, 2016a). Já se sabe que o uso indiscriminado dos inseticidas tem selecionado populações resistentes de diferentes insetos, incluindo mosquitos anofelinos (Coleman et al., 2017; Zaim & Guillet, 2002). Desde 2010, um total de 60 países tem reportado resistência a pelo menos uma classe de inseticidas. Destes, 49 registraram resistência a duas ou mais classes (WHO, 2018). A Figura 2 mostra um mapa global com destaque para as localidades onde se tem dados sobre susceptibilidade / resistência às quatro classes de inseticidas, e a Figura 3 apresenta uma perspectiva de como essa resistência tem evoluído até chegar ao cenário atual.

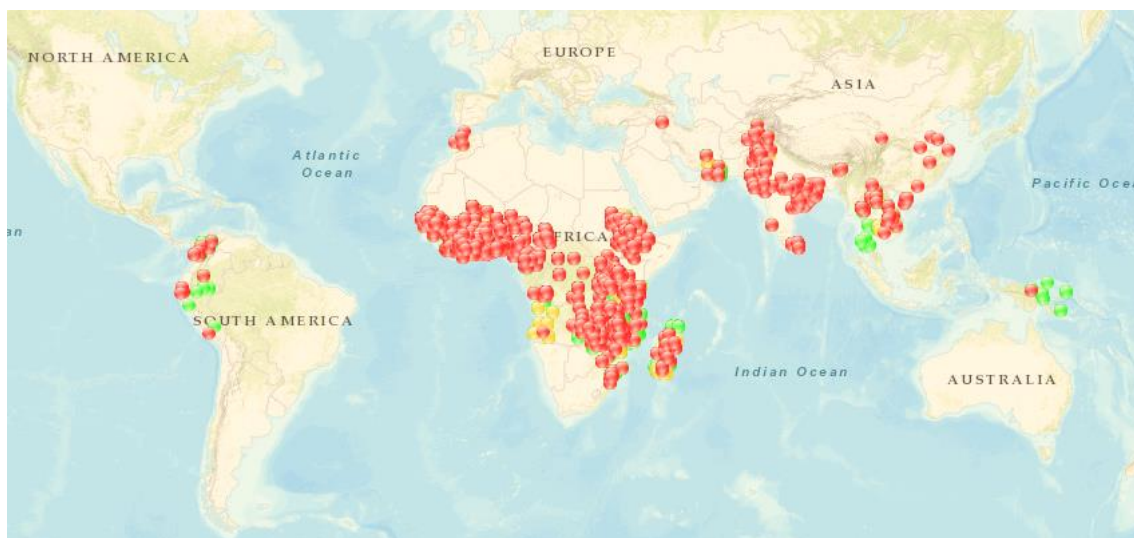


Figura 2: Localidades com registros sobre susceptibilidade/resistência a inseticidas em anofelinos entre 2005 e 2018. Os círculos em verde, amarelo e vermelho indicam, respectivamente, susceptibilidade, possível resistência e resistência confirmada. Mapa gerado online pelo projeto IR Mapper (Knox et al. 2014), em www.irmapper.com.

Para a avaliação do *status* de resistência de uma população, são feitos ensaios biológicos onde o mosquito é exposto ao inseticida e posteriormente é avaliada a sua mortalidade. Devido à dificuldade da colonização do *An. darlingi* em laboratório, comparado a anofelinos africanos e do sudeste asiático, poucos estudos têm sido feitos com anofelinos neotropicais no que diz respeito aos ensaios biológicos. Apesar disso, alta tolerância ao piretroide deltametrina foi detectada em larvas da espécie, em Manaus, AM (Silva et al., 2014), bem como tolerância a DDT e ainda resistência cruzada entre DDT e lamda-cialotrina em populações da Colômbia (Suarez et al., 1990; Fonseca-González et al., 2009). Contudo, a maior parte dos trabalhos no escopo da resistência nessa espécie revelaram susceptibilidade aos inseticidas hoje utilizados. Estudo com utilização de mosquiteiros impregnados com deltametrina no estado e Rondônia observou que depois da implementação desta estratégia de controle, houve redução da abundância de *An. darlingi* na região (Santos et al., 1999). No Amapá também se observou susceptibilidade aos piretroides cipermetrina e deltametrina (Galardo et al., 2015). Testes com garrafas impregnadas com DDT, fenitrotion, propoxur, lamdacialotrina e deltametrina, detectaram susceptibilidade a estes compostos em *An. darlingi* da Colômbia (Santacoloma et al., 2012). Da mesma forma, Hiwat

e colaboradores(2012) notaram susceptibilidade a deltametrina em população colombiana, após intervenção com LLIN impregnadas com o mesmo.

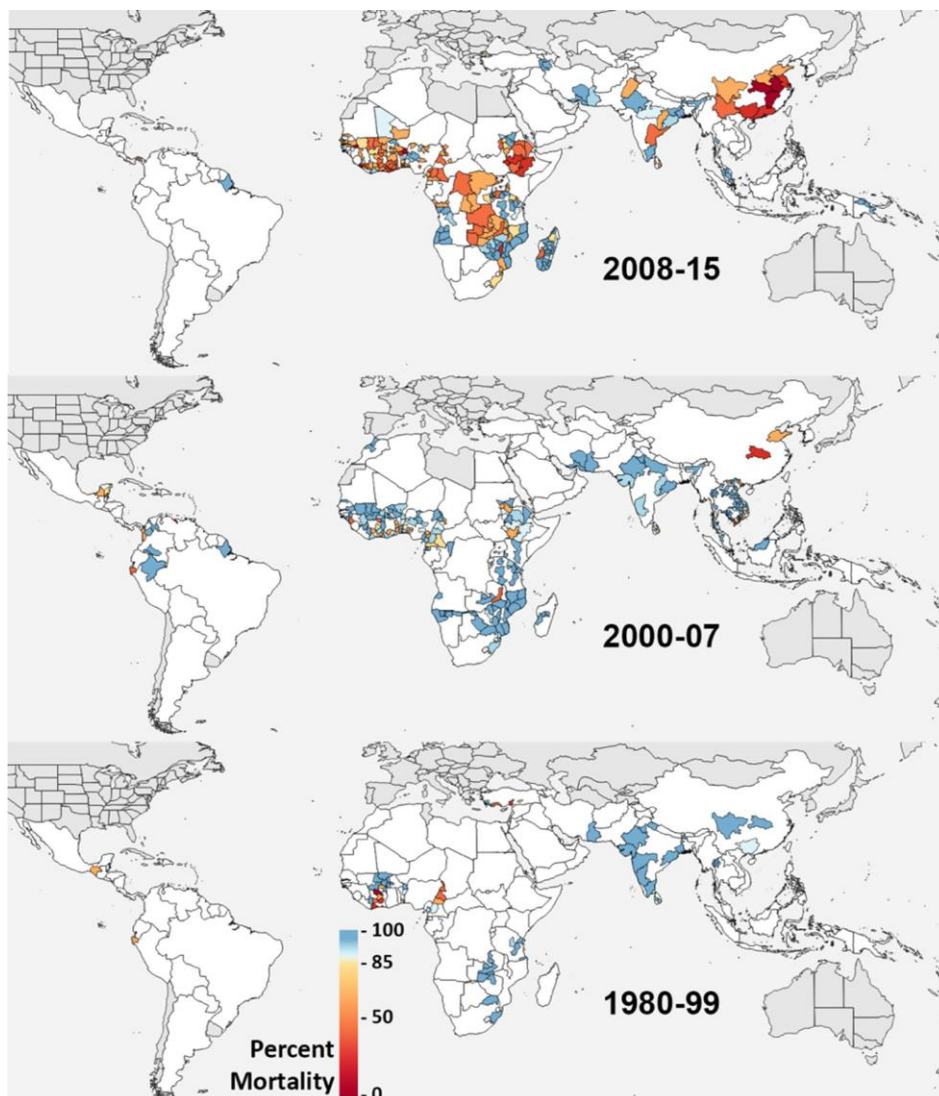


Figura 3: Resistência a inseticidas registrada em populações de anofelinos em três períodos distintos. A intensidade da resistência pode ser estimada pelo percentual de mortalidade nas provas biológicas, indo do azul (mais susceptível) ao vermelho (mais resistente). Fonte: Coleman et al., 2017.

Os principais mecanismos fisiológicos selecionados para resistência a inseticidas conhecidos são: diminuição da taxa de penetração do inseticida pela cutícula do mosquito, detoxificação metabólica - que consiste em alterações da atividade de enzimas de detoxificação, diminuição da sensibilidade do sítio-alvo - através de mutações que alteram a conformação do local onde atua o químico, impedindo a ligação com o seu alvo (Braga & Valle, 2007; Martins & Valle, 2012).

Pode ainda haver seleção para alteração comportamental, de forma que o inseto passa a evitar contato com o inseticida como, por exemplo, redução da permanência de mosquitos no interior de habitações humanas comumente tratadas com inseticida nas paredes (Hayes & Charlwood, 1978; Hemingway et al., 2004, Coleman et al., 2017).

As bases moleculares da resistência por alteração na cutícula em mosquitos vêm sendo somente agora elucidadas, com o advento de ferramentas de transcriptômica e genômica (Shen et al., 2018). A resistência metabólica também vem sendo mais claramente entendida por essas estratégias (Strode et al., 2008; David et al., 2013), mas já era bem estudada com ensaios bioquímicos colorimétricos (Saavedra-Rodriguez et al., 2014). Neste processo de resistência as principais enzimas que sofrem alteração, seja por a) mutação tornando-as mais eficazes na metabolização do inseticida, b) aumento na expressão gênica ou c) amplificação no número de cópias gênicas, são das classes das esterases, GST e oxidases de função mista (P450). Todas compõem famílias supergênicas com dezenas ou centenas de genes (Hemingway et al., 2004). Desta forma, alterações em diferentes genes podem ser selecionadas em diferentes populações, dificultando um processo de diagnóstico molecular para ser usado em larga escala.

A resistência do sítio alvo, por outro lado, ocorre pela alteração em poucos genes, codificantes dos alvos diretos dos inseticidas. No caso dos neurotóxicos, moléculas do sistema nervoso são geralmente bastante conservadas ao longo da evolução, de forma que poucas alterações são permissivas para que possa continuar exercendo suas funções fisiológicas (French-Constant et al., 1998). Por isso existem tão poucas mutações nestes genes, como é o caso do *canal de sódio regulado por voltagem* ou *Nav* (que codifica o Canal de sódio, alvo de DDT e piretroides) e *acetilcolinesterase-1* ou *ace-1* (que codifica a Acetilcolinesterase, alvo de organofosforados e carbamatos). Em consequência, a mesma mutação pontual pode ser observada em diferentes ordens de insetos. As mais comumente observadas são a L1014F no *Nav* e a G119S no *ace-1*.

1.3 DESCOBRINDO O *Anopheles darlingi*

Charles Louis Alphonse Laveran, médico francês que ganhou o Nobel de medicina por seus estudos a respeito de doenças causadas por protozoários, em 1880, descobriu, que a malária teria como agente infeccioso protozoários do gênero *Plasmodium* (Cox, 2010). Atualmente, são conhecidas cinco espécies de plasmódios que podem causar malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, sendo os dois primeiros considerados os principais agentes etiológicos da doença (CDC, 2017b). Dezesete anos após a descoberta de Laveran, Ronald Ross associou a disseminação da malária aos mosquitos do gênero *Anopheles* (Cox, 2010).

Depois da descoberta de Ross, acerca da transmissão vetorial através de mosquitos, a procura pelo vetor de plasmódio se tornou foco de inúmeras pesquisas no mundo (Deane, 1989). Em 1910, R Newstead e H Wolferstan, cientistas da Escola de Medicina Tropical de Liverpool, após expedição na Amazônia publicaram o estudo “*The mosquitos of the Amazon Region*”, onde pela primeira vez foi descrita a espécie *Cellia argyrotarsis*, que hoje conhecemos como *Anopheles darlingi* (Figura 4). O mosquito foi definido como espécie doméstica, ocorrendo dentro das casas perto de pântanos nas áreas urbanas e arredores (Newstead & Wolferstan, 1910; Deane, 1989).

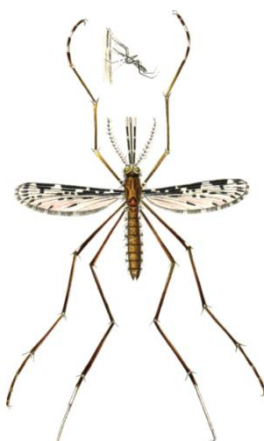


Figura 4: Ilustração do *Cellia argyrotarsis* (adaptado de Newstead & Wolferstan, 1910)

No ano de 1926, o entomologista Francis Metcalf Root da Universidade de Johns Hopkins, em seu trabalho no estado do Rio de Janeiro, descreveu pela primeira vez o *Anopheles darlingi* como assim o conhecemos, recebendo este nome em referência ao Dr. Samuel Taylor Darling, o qual muito havia contribuído com os estudos em anofelinos. As larvas desta espécie foram pela primeira vez encontradas em Porto das Caixas, Rio de Janeiro, em um pedaço de *Ceratophyllum*, planta aquática, na margem lateral de um rio, sempre associadas à *Anopheles albitarsis* e *Anopheles aquasalis* (Root, 1926; Deane, 1989).

Raymond Shannon, também entomologista, em inquérito realizado em 1931 em diferentes localidades da região amazônica, encontrou o *An. darlingi* em maior quantidade que outros anofelinos. Uma das localidades de estudo foi Porto Velho, RO, onde foram dissecados 56 espécimes coletados dentro das casas, cinco entre os quais apresentavam oocistos e um esporozoítos de plasmódio, resultando em uma taxa de infecção de 8,9%. Uma compilação dos trabalhos daquela época, feita por Shannon, evidenciou que a maior parte dos espécimes coletados se encontravam no interior das casas, o que apontou o *An. darlingi* como uma espécie endófila (Figura 5). A alta densidade, a característica endofílica e a alta taxa de infecção por plasmódio do *An. darlingi* encontrada na população estudada pelo autor, levaram à conclusão de que este seria o vetor primário da malária humana naquela área (Shannon, 1933).

AUTHORS AND LOCALITY	SPECIES	HOUSE	ANIMAL BAIT
Davis (1931)..... Belém, Pará.....	<i>darlingi</i> <i>tarsimaeculatus</i>	252 24	1 138
Davis and Kumm..... (1932) Franca, Bahia.....	<i>darlingi</i> <i>tarsimaeculatus</i>	250 ⁹ 0	80 172
Shannon, Amazonia.....	<i>darlingi</i> <i>tarsimaeculatus</i>	800 ⁹ 1	74 1000 ⁹

Figura 5: Cópia da ilustração de uma tabela publicada por Shannon em “*The Anophelines of the Amazon Valley*”, (1933) evidenciando a abundante presença do *Anopheles darlingi*, bem como sua característica endofílica acentuada em coletas feitas por diferentes pesquisadores da época.

Em 1949, Leonidas Deane e colaboradores, então no Instituto Evandro Chagas em Belém do Pará, avaliaram a preferência alimentar de *An. darlingi* utilizando iscas humana e animais como atrativo e analisaram o conteúdo do tubo digestivo do vetor, através da prova de precipitina. Para tanto, improvisaram uma gaiola nos fundos do laboratório, contendo homem, cão, gato, porco, carneiro, boi, cavalo e galinha. Às dezoito horas os mosquitos criados em laboratório foram soltos nesta gaiola, até a manhã seguinte quando foram recapturados. Em paralelo, foram feitas coletas em domicílio no período entre 18 e seis horas. Dos 230 mosquitos coletados na gaiola, através da prova de precipitina, constatou-se que 45,7% e 41,3% continham sangue humano ou do somatório dos outros animais, respectivamente. Já na coleta feita em domicílio, dos 1.026 exemplares, 85,3% e 12,7% tinham sangue humano ou animal, nesta ordem. Ao final daquele trabalho, Deane e colaboradores comprovaram o antropofilismo do *An. darlingi* (Deane et al., 1949).

O advento do DDT revolucionou as medidas de controle de vetores em Saúde Pública. Este inseticida era aplicado com compressores motorizados, apenas nas paredes das habitações, o que evitava a contaminação de todo o ambiente, e também apresentava maior durabilidade (Tauil et al., 1985; Aragão et al., 1988). Hayes e Charlwood (1978), em trabalho no Amazonas notaram que o *An. darlingi* evitava pousar em áreas aspergidas com DDT. Os anofelinos entravam nas casas, realizavam o repasto sanguíneo, mas não repousavam nas paredes, as quais haviam sido tratadas. Por outro lado, o mesmo não ocorria em casas não tratadas com inseticida. Esse trabalho foi o primeiro relato de resistência comportamental a inseticida nesta espécie (Hayes & Charlwood, 1978; Deane, 1989). No ano seguinte, aqueles mesmos autores observaram diferenças no horário preferencial de picada em espécimes de diferentes localidades: Uauaris, em Roraima, BR-174 Km 138, no Amazonas, e em Aripuanã, no Mato Grosso. Em Roraima o pico de atividade era depois da meia-noite, enquanto que no Amazonas e no Mato Grosso o pico começava às 21 horas e se estendia até às 23 horas. Curiosamente, no Mato Grosso, havia um pico matinal, entre 5:35 – 5:45 da manhã, que representou 26,4% da captura total. Naquele momento, os autores sugeriram que essas diferenças no comportamento de picada representavam linhagens diferentes do *An. darlingi*

(Charlwood & Hayes, 1978; Deane, 1989). Até onde investigamos, este teria sido a primeira publicação sugerindo a existência de diferentes "linhagens" de *An. darlingi*.

Existem algumas características para que um mosquito seja considerado vetor de um agente infeccioso ao homem, as quais podem ser estimadas através do número de picadas, da preferência hematofágica e também do fator de longevidade do vetor. Estes atributos estão relacionados com o ciclo de vida do parasito, que deve ser apto a se reproduzir e se disseminar no interior do vetor e infectar outros indivíduos durante um próximo repasto sanguíneo. Estas características estão intimamente associadas à habilidade do mosquito picar preferencialmente humanos (antropofilia) e escolher repousar dentro das casas (endofilia), aumentando as chances de estar em contato com o homem e propagar o agente infeccioso (Garrett-Jones, 1964; Dye, 1986).

1.4. *Anopheles darlingi*: CARACTERÍSTICAS GERAIS

O *Anopheles darlingi* (Figura 6) pertence à ordem Diptera, família Culicidae, gênero *Anopheles*, subgênero *Nyssorrhynchus* e Seção *Argyritarsis* (Consoli & Oliveira, 1994; Foratiini, 2002). Como todo culicídeo, seu ciclo de vida começa com o ovo, apresenta quatro estádios larvais (L1-L4), pupa e adulto.



Figura 6: Fêmea de *Anopheles darlingi* fazendo repasto sanguíneo. Fonte: Acervo do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Retirada de: <http://www.icb.usp.br/~bmps/site/graduacao/paginas/250>

O *Anopheles darlingi* é encontrado predominantemente na América do Sul, estando presente no Brasil, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai, Argentina, Guianas e a leste das Cordilheiras dos Andes. Na América Central se distribui no sul do México, Belize, Honduras e Guatemala (Figura 7). No Brasil está presente em todo território nacional, com exceção das áreas secas do nordeste brasileiro, abaixo da foz do Rio Iguaçu e em áreas de elevada altitude (Deane, 1986; Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Emerson et al., 2015). A ampla distribuição pelo continente americano e as características como transmissor de agente infeccioso associam o *An. darlingi* à maior parte dos casos de malária nas Américas (Marinotti et al., 2013).



Figura 7: Mapa com a distribuição de *An. darlingi* nas Américas. Em vermelho está representada a predição de onde a espécie está presente; em azul estão as localidades onde não é provável encontra-lo. Fonte: Malaria Atlas Project

Os criadouros de *An. darlingi* são coleções de águas límpidas, profundas, com sombra ou parcialmente ensolarado e vegetação flutuante, pobre em sais e matéria orgânica. Durante as chuvas, suas larvas e pupas podem ser encontradas em coleções de água de menor profundidade como valas, alagadiços e pântanos. Por conta da sensibilidade à baixa umidade, quando cessam as chuvas ele desaparece destes ambientes. Conhecido como anofelino fluvial está associado às curvas dos rios e cursos de águas de porte variável (Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002; Sánchez-Ribas et al., 2017).

Como acima já destacado, *An. darlingi* é endófilo e endofágico (pica preferencialmente no interior das casas), com atividade crepuscular e noturna. Quando dentro das casas sua atividade é aumentada por volta de meia-noite e pode se estender até o amanhecer, caracterizando-se como hematofagia unimodal. Entretanto, já foram observadas variações nos picos de atividade de forma bi ou trimodal (Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002). Apresenta maior densidade populacional no início da estação seca. Entretanto, na região oeste da Amazônia, observa-se maior densidade no final da estação chuvosa e início da seca. No sudeste do Brasil, a densidade varia entre o inverno seco com baixas temperaturas e estação de chuvas acompanhadas com altas temperaturas do verão (Forattini, 2002).

A forma adulta do *An. darlingi* é muito parecida com o *Anopheles albitarsis*, possuindo ambas as espécies a parte do segundo tarsômero e do 3^o ao 5^o posteriores inteiramente brancos, porém difere do *An. albitarsis* por possuir a primeira mancha escura da veia costa da asa (pré umeral escura-ph) maior que a mancha clara seguinte (umeral clara-h) (Figura 8), e não possuir duas fileiras de escamas brancas no primeiro esternito abdominal (Faran & Lithicum, 1981; Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002)



Figura 8: Representação esquemática das principais características morfológicas diferenciáveis em *An. darlingi*. À esquerda: morfologia da asa - ph: mancha pré-umeral, h: mancha umeral, a: veia anal; À direita: tarso posterior com os respectivos tarsômeros numerados de 2 a 5. Adaptado de Forattini, 2002 e Faran & Lithicum, 1981.

Dada a ampla distribuição geográfica do *An. darlingi*, atravessando diferentes biomas de norte a sul do país, associado a diferenças comportamentais e genéticas (Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 1996; Emerson et al., 2015), pelo menos desde a década de 1970 suscita-se a hipótese de que *An. darlingi* forme um complexo de espécies crípticas, tal como é comum em outras espécies do gênero *Anopheles*. Por definição duas ou mais espécies são consideradas crípticas se elas são ou foram classificadas como uma espécie única por serem morfologicamente indiferenciadas (Bickford et al., 2007; Beheregaray & Caccone, 2007). Alguns autores estipulam que para ser considerada espécie críptica, um processo recente de divergência deve ter ocorrido, isolando as espécies reprodutivamente, seja em simpatria ou alopatria, de forma que as diferenças sejam mais facilmente evidenciadas através de testes moleculares (Bickford et al., 2007). Graças ao uso de ferramentas da biologia molecular, o estudo nessa área da biodiversidade e evolução tem ganhado frente em inúmeras pesquisas. Espécies crípticas são muito comuns no reino animal, principalmente dentro do grupo dos artrópodes, onde muitas delas têm implicações em saúde pública por serem vetoras de diferentes patógenos (Fiser et al., 2018).

1.5 ESPÉCIES CRÍPTICAS NO GÊNERO *Anopheles*

O gênero *Anopheles* comporta inúmeros complexos de espécies crípticas com vetores de importância médica (Collins & Paskewitz, 1996; Rosa-Freitas et al., 1998). O complexo *Anopheles gambiae* comporta os principais vetores de plasmódio que podem causar malária na África. Este é composto por oito espécies: *Anopheles gambiae sensu stricto* (s.s.), *Anopheles merus*, *Anopheles melas*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles bwambae*, *Anopheles quadriannulatus*, *Anopheles amharicus* e *Anopheles coluzzii* (Coetzee et al., 2013).

Numerosos estudos indicam que *Anopheles gambiae* s.s. representa um grupo num processo de especiação relativamente recente, onde diferenças vem sendo acumuladas. Por exemplo, a diversidade encontrada em arranjos cromossômicos pode dividir *An. gambiae* s.s. em cinco citoformas: *Forest*, *Savanna*, *Mopti*, *Bamako* e *Bissau* (Coluzzi et al., 1985; Black & Lanzaro, 2001; Coluzzi et al., 2002). Análises de polimorfismos IGS dividiu esse grupo ainda em duas formas moleculares: M e S (della Torre et al., 2001). Estudos subsequentes revelaram existir uma complexa relação entre as citoformas e as formas moleculares quanto à localização geográfica. A forma molecular M está associada às citoformas Mopti, Savanna, Forest e Bissau, enquanto que a forma S está associada à Savanna, Bamako e Forest (Diabate et al., 2009). Recentemente, a forma M foi elevada a espécie do complexo *Gambiae* e recebeu o nome de *Anopheles coluzzii*, tendo a forma S mantido a designação de *Anopheles gambiae* (Coetzee et al., 2013). No Brasil, um importante grupo de espécies crípticas é formado pelo complexo *Albitarsis*, composto por nove espécies: *An. albitarsis* s.s., *An. deaneorum*, *An. marajoara*, *An. janconnae*, *An. oryzalimnetes*, *An. albitarsis F*, *An. albitarsis G*, *An. albitarsis H* e *An. albitarsis I* (Laporta et al., 2015). Dentro do subgênero *Nyssorhynchus* ainda encontramos o complexo *Triannulatus*, formado por três espécies: *An. triannulatus* s.s., *An. halophylus* e *An. triannulatus* espécie C (Silva-do-Nascimento et al., 2006; Silva-do-Nascimento et al., 2011). *Anopheles oswaldoi* foi descrito em 1922 por Peryassú, enquanto que *An. konderi*, foi descrito em 1942 por Galvão & Damasceno, sendo posteriormente colocado em sinonímia com *An. oswaldoi* por

Lane (1953) e, em 2004, considerado novamente como espécie independente, por Flores-Mendoza, baseado na morfologia da genitália masculina (Flores-Mendoza et al., 2004). Nos últimos anos, estudos moleculares tem indicado que essas duas espécies formam dois distintos complexos: complexo Oswaldoi e complexo Konderi, composto cada um deles de pelo menos três espécies (Motoki et al., 2009,2011; Ruiz et al.,2013). Outras espécies do subgênero *Nyssorhynchus*, como *An. strodeji*, *An. benarrochi*, e *An. nuneztovari* também formam complexo de espécies crípticas, sendo este último o principal vetor da malária na Venezuela (Fajardo et al., 2008). Dentro do subgênero *Kertezia*, recentes estudos genéticos, baseados na análise dos genes *clock* e *cpr*, revelaram a presença de duas linhagens genéticas de *Anopheles cruzii*, formando o complexo Cruzii, na região da Mata Atlântica do sudeste do Brasil (Saraiva et al., 2018; de Rezende Dias et al., 2018).

1.6 ESTUDOS DA DIVERSIDADE EM *Anopheles darlingi*

1.6.1 VARIAÇÕES NO COMPORTAMENTO

A análise dos horários preferenciais de picada é uma importante ferramenta sobre o comportamento hematofágico em mosquitos. Uma vez que *An. darlingi* é uma espécie antropofílica, capturas com isca humana ao longo de um período de tempo tem correlacionado a quantidade de mosquitos capturados em busca de alimentação sanguínea com a intensidade na atividade de picada. Estudos sobre o pico de atividade hematofágica do *An. Darlingi* registraram ciclo unimodal, que aumentava por volta de meia noite e se estendia até o amanhecer, sem a presença de picos de atividade em outros horários, e em uma população do município de Dourado (SP) ciclos bimodal e trimodal, com atividades intracrepuscular e pericrepuscular foram observados nessa espécie. Nos mosquitos intracrepusculares, o pico vespertino era mais intenso e nítido que o matutino. Já nos pericrepusculares pode-se observar a presença de bimodalidade secundária, sendo o primeiro pico crepuscular e o segundo pré-crepuscular (Forattini, 1987; Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002).

As estações do ano e os ciclos de chuva influenciam diretamente na densidade e diversidade da fauna de uma localidade. Forattini (1987) nesse mesmo estudo em Dourado verificou que nos períodos quentes de dezembro a abril, havia maior densidade de *An. darlingi*, com picos em março. Ao contrário, nos meses frios de julho a agosto, com baixa precipitação, a densidade era menor. Aspectos similares foram também observados na Região Norte do país. Por exemplo, em Acrelândia, AC, o pico de atividade nos meses de maio, julho, setembro e novembro eram predominantes na primeira parte da noite. Este período se estendeu até o crepúsculo matutino no mês de fevereiro seguinte, quando *An. darlingi* foi capturado em maior densidade (Moutinho et al., 2011).

Além de influências climáticas na densidade, populações localizadas em regiões geográficas distintas podem apresentar horários preferenciais de atividade diferenciados. Capturas realizadas em Costa Marques, RO, Dourado, SP e Juturnaíba, RJ, mostraram que na primeira localidade *An. darlingi* apresentou ciclo bimodal, com o maior pico de atividade ao pôr do sol e outro menor ao nascer do sol. Já em Dourado, ocorreu um ciclo trimodal, com os principais picos no crepúsculo matutino e vespertino e um pico menor às 23:00 horas. Em Juturnaíba, *An. darlingi* não apresentou picos crepusculares, mas teve a atividade levemente aumentada às 20:00 horas e 01:00 hora (Rosa-Freitas et al., 1992).

Outro exemplo foi mais recentemente observado na Amazônia Peruviana, onde populações de *An. darlingi* de regiões ribeirinhas de Iquitos revelaram pico de atividade bimodal entre 20:00-22:00 horas e 01:00-03:00 horas, diferindo de localidades ao longo de rodovias, com pico unimodal de 21:00-23:00 horas. Análise de microssatélites revelaram a formação de dois grupos (subpopulação A e B), com leve sobreposição. A diferença entre elas detectou relação com dois diferentes habitats. Enquanto que nas coletas ribeirinhas as subpopulações A e B estavam presentes na mesma proporção, nas rodovias a subpopulação B predominou (Lainhart et al., 2015).

1.6.2 VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS

Estudos realizados essencialmente nos ovos e asas de diferentes populações de *An. darlingi* indicam a existência de algumas variações morfológicas. Manguin e colaboradores (1999) encontraram oito padrões morfológicos em asas de espécimes de *An. darlingi*, originárias de sete populações das Américas: Brasil, Belize, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Peru e Venezuela (Figura 9). Apesar dessas diferenças encontradas, os autores defendem a hipótese do *An. darlingi* ser uma espécie monotípica. Em uma escala menos ampla, porém com maior riqueza de biomas em ecorregiões brasileiras, estudos sobre a variabilidade morfológica das asas e ovos de nove populações (AC, AP, ES, PA, PR, RJ, RO, SP e TO) de *Anopheles darlingi* revelou que de acordo com a análise de morfologia alar os grupos da Floresta Atlântica Costeira e da Floresta Atlântica Interior são mais parecidos entre si, assim como os grupos do Cerrado e do norte do rio Amazonas entre eles. Já o grupo ao sul do Rio Amazonas se mostrou o mais diferenciado de todos. Além destas observações, os autores não notaram relação dos resultados obtidos com a distância geográfica. Quanto à análise da morfometria dos ovos verificou-se que amostras de Tocantins e Pará, formou o grupo mais distinto, entretanto essas características não foram suficientes para separar as demais populações. O estudo baseado em análises dessas variações são interessantes, pois podem demonstrar o caráter adaptativo das estruturas dos ovos, influenciada pelo habitat das formas imaturas (Motoki et al., 2012).

Almeida e colaboradores (2014), analisando a morfometria dos ovos de *An. darlingi*, através de imagens de microscopia eletrônica de varredura, dos biomas Amazônia, Floresta Atlântica e Cerrado, daquelas mesmas nove populações anteriormente citadas, constaram que a população de Tocantins, inserida no bioma Cerrado, foi a mais diferenciada das demais populações. Para esse estudo, foram analisados um primeiro componente principal (características dos flutuadores-PC1), que foi o mais significativo para a separação das populações, e um segundo componente principal (comprimento e largura dos ovos-PC2) que se baseou na estrutura dos flutuadores. O PC1 separou as amostras de três formas: (1) Acre do Pará, Tocantins de São Paulo, (2) Pará do

Amapá e (3) Amapá de São Paulo. Enquanto que o segundo componente principal separou o Acre do Pará e de São Paulo.

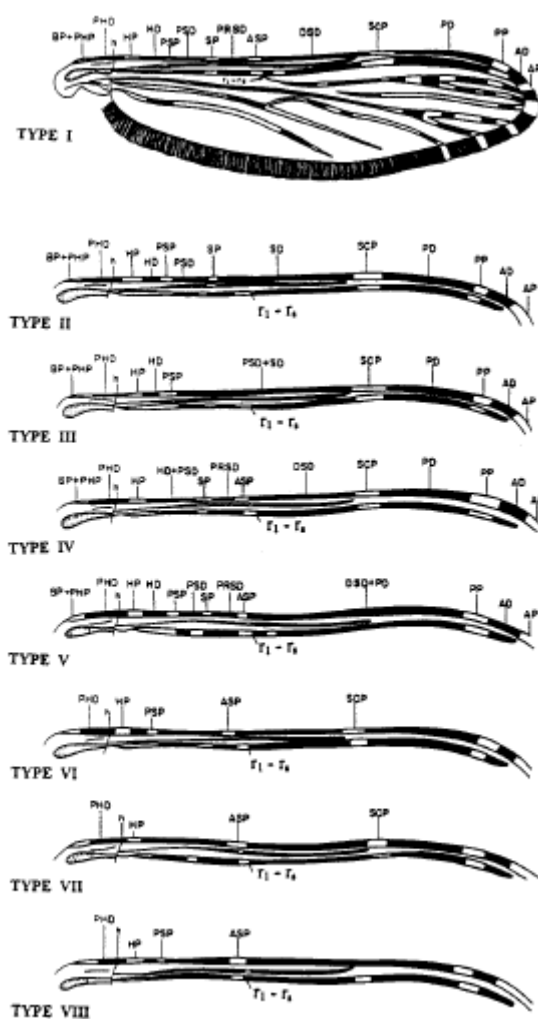


Figura 9: Padrão de pontos escuros e pálidos em oito diferentes tipos de asas de *An. darlingi*.
 Fonte: Manguin et al, 1999

1.6.3 VARIAÇÕES BIOQUÍMICAS

Isoenzimas são grupos de enzimas com formas moleculares diversas da mesma enzima. Estudos neste âmbito avaliam a diferença no perfil eletroforético, através da intensidade da cor gerada pela metabolização de um substrato específico e da distância do ponto de aplicação das amostras (Figura 10). Esta estratégia foi muito empregada para comparações entre populações de uma mesma espécie, antes da ampla disponibilidade de sequências genômicas e a

implementação de outros métodos de Biologia Molecular. Um estudo feito com *An. darlingi* da região amazônica [(Ariquemes em Porto Velho e Samuel (RO), Manaus (AM), e Cachoeira Porteira, (PA)] avaliou 11 *loci* de isoenzimas, encontrando variação em nove delas (Santos et al., 1996). Uma análise posterior, utilizando 31 *loci* de isoenzimas, em amostras de sete países das Américas (Brasil, Belize, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Peru e Venezuela), revelou mediante estimativa do índice F_{st} baixos a moderados valores de diferenciação genética entre as subpopulações. O F_{st} é um índice que estima diferenciação genética que varia de 0 a 1. Quanto mais próximo de 1 maior é a diferença entre as populações. De forma geral, as populações apresentaram alta identidade genética, sendo entre as do Brasil e da Bolívia a maior delas (99%), reforçando a hipótese de que *An. darlingi* seja uma espécie monotípica (Manguin et al., 1999). Apesar das diferenças encontradas, nenhum dos trabalhos mostrou evidências de que a espécie não seja mais uma espécie monotípica.

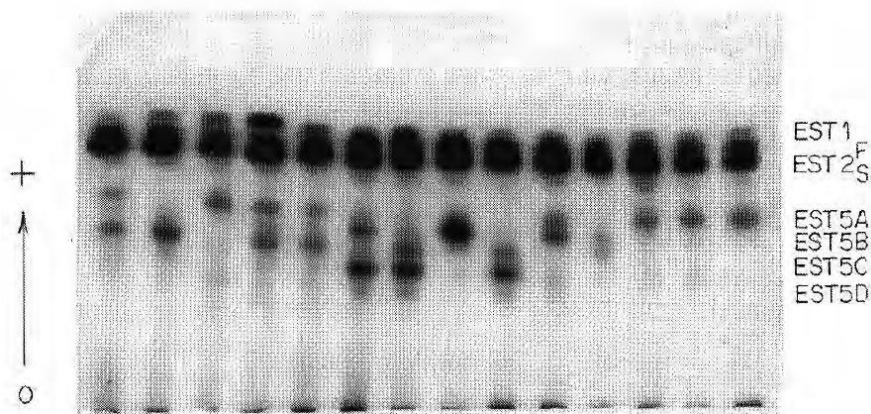


Figura 10: Representação esquemática do perfil eletroforético de isoenzimas. Adaptado de: Santos et al., 1996.

1.6.4 VARIAÇÕES CITOGENÉTICAS

Os estudos em citogenética são baseados no padrão de coloração ou bandeamento de cromossomos condensados. Diferenças nestes padrões estão muitas vezes correlacionadas à separação de espécies crípticas de um

complexo de espécies, como no gênero *Anopheles* (Holstein, 1957; Kreutzer et al., 1976; Marinotti et al., 2013; Shetty et al., 2013). Em *An. darlingi* os estudos pioneiros revelaram polimorfismos cromossômicos, onde demonstrou-se que esta espécie tinha duas inversões em um dos autossomos, em heterozigose (Schreiber & Guedes 1961). Mais tarde Kreutzer e colaboradores (1972) analisaram populações brasileiras, uma de Manaus (AM) e outra de Araraquara (SP), onde foi evidenciado que a população do norte era altamente polimórfica quando comparada com a do sul, que tinha arranjos fixos com pouco polimorfismo. Em outra amostragem de *An. darlingi*, coletados no estado do Amazonas, foram encontradas duas novas inversões, reforçando o aspecto polimórfico de inversões cromossômicas na espécie (Tadei et al., 1982) (Figura 11).



Figura 11: Inversão cromossômica (seta vermelha) do braço 2R encontradas em *An.darlingi*.
 Fonte: Tadeiet al., 1982

1.6.5 VARIAÇÕES MOLECULARES

Diferenças na sequência de DNA entre grupos de uma mesma espécie podem não se manifestar fenotipicamente, a ponto de gerar variações visualmente mensuráveis. Contudo, são importantes na definição de estruturação de populações, ajudando, entre outros, na inferência sobre ocorrência e intensidade de fluxo gênico, bem como na separação de espécies crípticas. Com a disseminação de métodos cada vez mais simples e menos custosos de amplificação e sequenciamento de DNA, somado ao conhecimento

integral de genomas, diversas técnicas tem sido utilizadas para testar a diversidade de populações morfologicamente idênticas. Neste sentido, estudos empregando *RAPD* (*Random Amplification of Polymorphic DNA* – amplificação aleatória de DNA) e *AFLP* (*Amplified Fragments Length Polymorphism markers*) foram os primeiros utilizados em populações de *An. darlingi*. Análises de amostras da América do Sul e Central (Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Peru e Venezuela) mostraram a formação de quatro *clusters*. *Cluster I*: a maior parte das amostras do estado do Mato Grosso no Brasil; *Cluster II*: Bolívia, Guiana Francesa, Venezuela e diferentes localidades do Brasil; *Cluster III*: Rio Jacaré Pepira em São Paulo, no sudeste do Brasil e *Cluster IV*: Belize (Manguin et al., 1999). Em estudo envolvendo populações colombianas, a técnica de *AFLP* sugeriu diferenças entre populações do leste e do oeste daquele país (González et al., 2007). Estes trabalhos, contudo, não apontaram evidências fortes o suficiente para refutar a hipótese de *An. darlingi* ser uma espécie monotípica.

Além da divergência encontrada em diferentes localidades, possíveis variações moleculares entre amostras coletadas no intra e no peridomicílio vem também sendo procuradas. e fato, foi encontrada pequena estruturação geográfica observada entre as populações de *An. darlingi* de Manaus e Coari, no trabalho utilizando *RAPD* em amostras coletadas no intra, peri e extra-domicílio. Dentro de Coari foi observada maior diferença entre intra e extradomicílio. Já em Manaus foi observada semelhança genética entre intra e peridomicílio. Pouca variação genética foi encontrada entre as populações de Coari, como também em Manaus, sugerindo que ainda haja fluxo gênico entre elas (Silva et al., 2010).

Regiões intergênicas, por não serem codificantes, são mais propícias a acumularem mutações e, portanto, podem ser utilizadas como marcadores de diversidade interpopulacionais. Este é o caso do marcador *ITS2* (*Internal Transcribed Spacer 2*), cuja análise foi avaliada entre populações de *An. darlingi* de Dourado (SP) Porto Velho (RO), Plácido de Castro (AC), Boa Vista (RR) e Itabela (BA). Os autores notaram que as sequências *ITS2* eram muito idênticas

entre as populações, no entanto na população de Dourado tinham cerca de 10 pares de bases a menos que das outras populações (Malafronte et al., 1999).

Análise de variações na sequência do gene mitocondrial *COI* (citocromo oxidase I) é também bastante utilizada para comparações populacionais, dada sua diversidade. Com base nesta abordagem, amostras de *An. darlingi* das Américas Central e do Sul revelaram a formação de dois *clusters*: um composto por amostras da América do Sul e outro pela América Central e Colômbia. Os autores sugeriram que as populações da América Central tiveram origens distintas daquelas da América do Sul (Mirabello & Conn, 2006). Considerando-se somente as amostras da América do Sul, foram observados quatro grupos distintos: Nordeste 1: Tartarugalzinho (AP); Nordeste 2: Guiana Francesa e São José do Mata Fome (AP); Central: Roraima, Peru, Amazonas, Itaituba (PA), e Acre; e Sul: Tailândia, Belém e Peixe-boi (PA), e Mato Grosso. Os autores sugeriram que as amostras do Amazonas representam o ancestral da América do Sul e que o grupo Central é menos diferente de Nordeste 1 e 2 do que do Sul. Apesar das diferenças notadas, a hipótese de espécie monotípica não foi refutada (Pedro & Sallum, 2009).

Outra abordagem molecular para o estudo de populações é composta pela análise de microssatélites, os quais são sequências curtas, de 2 a 9 pares de base, que se repetem em *tandem* em um ou mais lugares no genoma (Hartl & Clark, 2010). São comuns no DNA eucariótico e podem ser amplificados através de reação em cadeia da polimerase (PCR), de forma que os diferentes alelos (com diferentes repetições) podem então ser comparados através de eletroforese. Por se tratar de sequências curtas permite o uso de DNA de pequeno tamanho ou ainda que esteja em parte degradado, desde que não seja a sequência do microssatélite. Esta abordagem tem sido recentemente empregada para o estudo de populações de *An. darlingi*, pela qual foi possível, por exemplo, sugerir moderada diferenciação genética entre populações do Amapá, Pará e Mato Grosso, e isolamento genético entre populações a norte ao sul do Rio Amazonas (Conn et al., 2006). A comparação entre populações do Amazonas por essa técnica, revelou eparação entre amostras da Amazônia Central e Oeste e maior estruturação e diferenciação entre Coari e as restantes

amostras do estado. Além disso, foi observado agrupamento de Coari com as amostras do Acre e Rondônia (Scarpassa & Conn, 2007). Mais recentemente, no estado de Rondônia foram analisadas sete populações ao longo do Rio Madeira e observadas duas subpopulações associadas à precipitação pluvial. A subpopulação A estava associada à precipitação tardia, enquanto que a subpopulação B era relacionada à precipitação precoce. Estas observações poderiam ser explicadas pela flutuação do tamanho efetivo das populações no período de transição entre época chuvosa e seca de uma mesma entidade genética. Ou então, adaptação diferencial a habitats, mais úmidos no caso da subpopulação A, enquanto que a subpopulação B poderia estar mais adaptada a habitats mais secos. O habitat preferido pela subpopulação A possui características típicas do *An. darlingi*, estando mais apto a habitar áreas mais urbanizadas. Já as características da subpopulação B seriam derivadas daquelas da subpopulação A (Angella et al., 2014).

Mais recentemente, análise de microssatélites revelou moderada diferenciação entre populações colombianas das sub-regiões denominadas Caribenha, Amazônica e Mouro. O alto número de alelos únicos observado para a porção leste foi sugerido como efeito de vicariância, resultado pela separação geográfica em virtude da presença das cordilheiras. Alternativamente, por dispersão e colonização recente, ou ainda migração de diversas regiões geográficas do país e países vizinhos (Rosero et al., 2017). Já a análise de amostras colombianas de Antioquia e Córdoba, empregando-se ambos *COI* e microssatélites revelou moderada diferenciação entre as populações, com alto compartilhamento de haplótipos e indícios de fluxo gênico entre ambas (Gutiérrez et al., 2010).

Em uma escala mais continental, a análise de microssatélites compreendendo amostras do Peru, Brasil, Belize e Guatemala, sugeriu a divisão das populações em dois grupos, chamados genótipos I e II, correspondentes às amostras da América do Sul e Central, respectivamente. O grupo da América Central se mostrou menos diverso, o que pode ser explicado pelo pequeno tamanho efetivo populacional, ou ainda por um recente efeito *bottleneck* de causa desconhecida. Naquele estudo, foi sugerido ainda que populações

colombianas (oriundas de dados anteriores) teriam fundado populações da América Central (Mirabello et al., 2008).

Finalmente, o SNP (*single-nucleotide polymorphism*) ou nucleotídeo de polimorfismo único ocorre quando os indivíduos na população podem diferir quanto à identidade do par de nucleotídeos presente em um sítio específico no DNA (Hart & Clark, 2010). Os SNPs têm sido excelente marcador porque pode ser usado tanto em variação neutra como funcional do DNA e pode ser adaptado a diferentes protocolos, como sequenciamento ou técnicas baseadas em PCR. Em estudo recente com esta abordagem, avaliando-se 12 populações de *An. darlingi* de diferentes regiões do Brasil, as amostras foram divididas em três clusters, associados a regiões biogeográficas: 1) Floresta Atlântica, compreendendo as populações do sul do Brasil, 2) Floresta Panamá, com a parte oeste da Floresta Atlântica e uma população do domínio Chaco (São Paulo) e 3) Domínio Brasileiro, contendo uma população da Amazônia e uma do domínio Chaco (Tocantins). A significativa diferenciação genética entre as populações, o baixo nível de alelos compartilhados e a ausência de evidências da ocorrência de isolamento por distância entre os grupos levou aos pesquisadores a sugerir a existência de três possíveis espécies (Emerson et al., 2015).

1.7 DIFERENÇAS COMPORTAMENTAIS DERIVADAS DE ALTERAÇÕES NO RELÓGIO MOLECULAR DO CICLO CIRCADIANO

Espécies crípticas podem apresentar características comportamentais diferenciadas, que reforçam o processo de especiação, principalmente aquelas diretamente relacionadas à seleção sexual (Bickford et al., 2007). Neste contexto, sabe-se que diferentes espécies simpátricas podem manter horários de acasalamento diferentes, ainda que por poucos minutos (Sakai & Ishida, 2001). Estudos feitos com as formas moleculares M e S do complexo *Anopheles gambiae*, atualmente reconhecidas formalmente como *Anopheles coluzzii* e *Anopheles gambiae* s.s., respectivamente, revelaram que o enxameamento de *An. gambiae* s.s. começa minutos mais cedo que o de *An. coluzzi*. Este comportamento diferencial constitui uma importante barreira reprodutiva, que

possivelmente explica a baixa frequência de indivíduos híbridos MS em populações simpátricas (Rund et al., 2012; Swadogoet al., 2013).

Os ritmos circadianos (circa = cerca, diem = dia) nos diferentes organismos são controlados por um marcapasso endógeno composto por diferentes genes que modulam a sua expressão através da sincronização com as variações no ciclo de luz e /ou temperatura (Konopka & Benzer, 1971; Hardin, 2011). A atividade de acasalamento está sob o controle do relógio circadiano, assim como as atividades de picada e locomotora (Sakai & Ishida, 2001; Rund et al., 2016). Desta forma, análise de genes relacionados a estas atividades podem representar bons marcadores para o estudo de especiação em vetores de patógenos. O relógio circadiano é formado por genes cuja expressão cicla ao longo do dia, composto por três alças regulatórias deste marcapasso. O seu correto funcionamento faz com que os organismos apresentem ritmos em torno de 24 horas. A principal alça de regulação é formada pelas proteínas PER, TIM, CLOCK e CYCLE. De forma sucinta, estas duas últimas formam um heterodímero CLOCK-CYCLE (Figura 12), que quando ligado na região *E-box* dos genes *per* e *tim* ativam a sua transcrição durante o dia. Quando PER e TIM estão em níveis altos no citoplasma, estes formam o heterodímero PER-TIM e à noite migram para o núcleo da célula, inibindo a atividade de CLOCK e CYCLE, que por sua vez inibem assim a transcrição de *per* e *tim*. No crepúsculo, o heterodímero se desfaz e o processo se reinicia (De Amoretty et al., 2013; Bruno et al., 2012; Rivas, 2012).

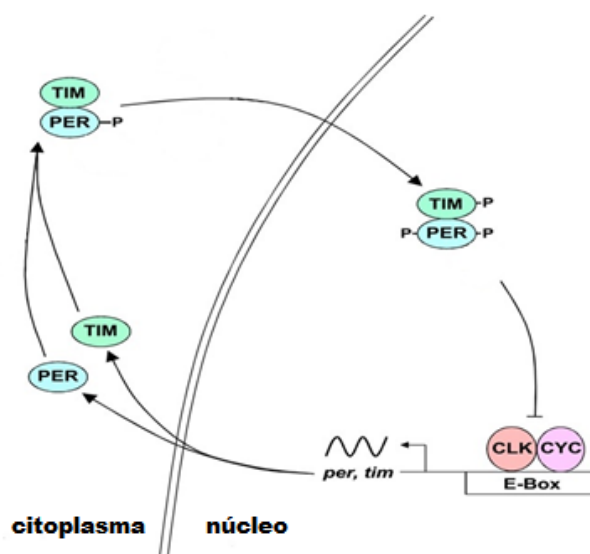


Figura 12: Esquema representativo da alça regulatória principal do relógio circadiano. A linha dupla representa o envelope nuclear; as setas: o fluxo do esquema; a seta bloqueada: a inibição da transcrição; a seta sinusoidal: a transcrição. Adaptado de Hardin, 2011

1.7.1 PERIOD

Em 1971, Konopka & Benzer observaram alterações nos ritmos de atividade locomotora em moscas *Drosophila melanogaster*. As alterações foram atribuídas a mutações no gene *period* (*per*). Os pesquisadores observaram a expressão de três diferentes fenótipos mutantes que apresentavam alteração no ritmo circadiano de suas atividades locomotoras. Eles notaram que algumas moscas apresentavam períodos mais curtos de atividade, sendo assim referidos como *per^s* (do inglês *short-period*), outros com atividades mais longas, e então foram denominados *per^l* (do inglês *long-period*) e ainda os que não apresentaram ritmo, conhecidos como *per⁰¹*. O gene *per* só foi descrito mais tarde por Bargiello & Young (1984) (Reddy et al., 1984; Bargiello et al., 1987; Yu et al., 1987).

O gene *period* tem também participação na expressão de características envolvidas no comportamento sexual, como a frequência de batimento das asas durante o acasalamento, a chamada canção de corte. É referido também como “gene de especiação”, devido a essa relação com a seleção sexual e, portanto vem sendo utilizado como marcador molecular no estudo de especiação de diferentes insetos (Coyne, 1992). Análises em populações brasileiras de *Lutzomyia longipalpis*, vetor de *Leishmania infantum*, utilizando o gene *per* como marcador molecular separou dois principais grupos correlacionados com o tipo de som de cópula. Um grupo integrado por cinco populações que produzem o som de tipo pulsado e um segundo grupo representado por populações com o som de cópula do tipo “burst” (do inglês, explosão) (Araki et al., 2009). Em estudos com outras espécies de insetos também foram utilizados o *per* como marcador, como os estudos iniciais com a mosca *Drosophila melanogaster* (Konopka & Benzer, 1971) e em flebotomíneos *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia whitmani* (Sawyer et al., 2006; Mazzoni et al., 2006; Souza Freitas et al., 2015).

Após clonagem e sequenciamento do gene *per* em *Drosophila melanogaster* foi notada uma região não conservada com repetições em *tandem* de aminoácidos treonina (Thr) e glicina (Gly) (Costa et al., 1992). Na Europa e no norte da África, foram notadas repetições Thr-Gly, com 20 pares desses dipeptídeos em maior frequência que as repetições com 17 dipeptídeos. Acredita-se que estas repetições estejam associadas à termoestabilidade do ritmo circadiano. Os autores sugeriram que o alelo *Thr-Gly*₂₀ seja mais adaptado a ambientes frios e de alta latitude, enquanto que o alelo *Thr-Gly*₁₇ a ambientes mais quentes como a Região Mediterrânea (Costa et al., 1992; Kyriacou et al., 2007).

1.7.2 TIMELESS

Variações no gene *timeless* (*tim*), podem também levar a alterações nos ritmos circadianos e, portanto a mudanças comportamentais. Este gene foi descoberto por Sehgal e colaboradores em 1995 e sequenciado no mesmo ano por Myers e colaboradores (1995). Este último grupo descreveu o mutante *tim*⁰ que apresentava fenótipo arritmico, análogo ao *per*⁰. No ano seguinte, Rutila e colaboradores (1996) descreveram o mutante *tim*^{sl}, que diminui em quase quatro horas a atividade locomotora do *per*^l. Por estar diretamente relacionado com características comportamentais, *tim* também tem sido empregado como marcador molecular para o estudo de espécies crípticas em vetores de patógenos. Em *Anopheles*, a análise de variações no *tim* contribuiu para apoiar a hipótese de ocorrência duas espécies crípticas em *Anopheles cruzii*, do subgênero *Kerteszia*, uma delas ocorrendo no nordeste, no estado da Bahia e outra no sul e sudeste do Brasil (Rona et al., 2009). Já no subgênero *Nyssorhynchus*, dois agrupamentos distintos foram revelados em *Anopheles triannulatus* s.l.: um representado por *Anopheles halophylus* e *Anopheles triannulatus* espécie C e outro constituído pelo *Anopheles triannulatus* s.s (Silva do Nascimento et al., 2011). Em *An. darlingi*, *tim* detectou diferenciação genética entre grupos coletados no intra e peridomicílio em Portuchuelo, RO (Bottino, 2007).

Tendo em vista o sucesso do uso do *per* em estudos envolvendo especiação em *Lutzomyia*, do *tim* em diferentes espécies do gênero *Anopheles*, e sabendo que ambos já foram utilizados em estudos com *Drosophila melanogaster*, ambos revelam-se como marcadores úteis em estudos de genética de populações e evolução de grupos próximos ao *Anopheles darlingi*. Assim, resolvemos utilizar estes genes em nosso trabalho no estudo da diversidade em *Anopheles darlingi* com o intuito de testar a hipótese da existência do complexo de espécies.

1.8. SELEÇÃO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS À RESISTÊNCIA A INSETICIDAS

O perfil de resistência a inseticidas de uma população depende da sua variabilidade genética e está susceptível a mudanças devido à dinâmica populacional. A resistência a inseticidas é um caráter herdável, associada a diferentes genes. Em ambientes com inseticida os indivíduos que portam os alelos associados à resistência se mantem vivos e capazes de se reproduzir. A tendência com a pressão dos inseticidas é que esses alelos se espalhem na população (Diabate et al., 2004; Belinato & Martins, 2016). Fatores ambientais e humanos influenciam diretamente na dinâmica das populações dos insetos, e, portanto, orientando a dispersão desses alelos. Já foi descrita uma complexa relação entre genes de resistência a inseticidas entre espécies do complexo *Gambiae*. Desde então diferentes autores tem sugerido o uso destes genes como marcadores moleculares no estudo de insetos vetores (Diabaté et al., 2003; Lanzaro & Tripet, 2004; Feng et al., 2015).

1.8.1 CANAL DE SÓDIO REGULADO POR VOLTAGEM (Na_v)

O canal de sódio regulado por voltagem (Na_v) consiste em proteínas transmembranares (Figura 13) presentes nos axônios, relacionadas com a sinalização elétrica das células através da geração de um potencial de ação por

meio do influxo de íons de Na^+ para a célula. O Na_v é constituído por quatro domínios homólogos I-IV, cada um com seis subunidades hidrofóbicas S1-S6 (Goldin, 2002; Hemingway et al., 2004; Martins & Valle, 2012).

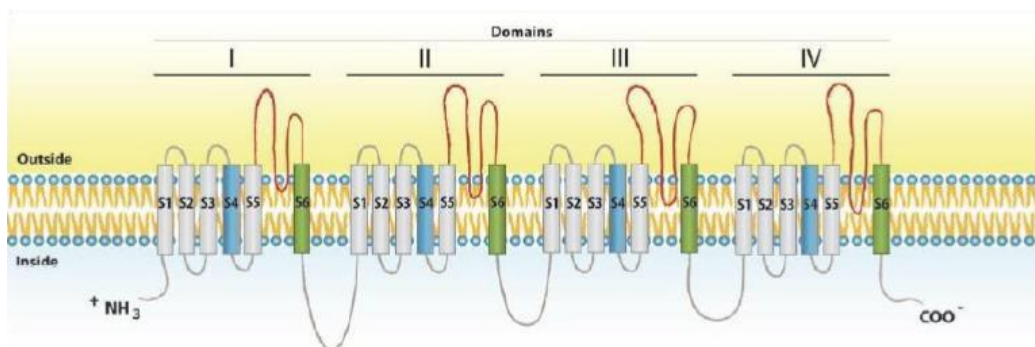


Figura 13: Canal de sódio regulado por voltagem (Na_v). Esquema dos quatro domínios homólogos cada um com seis segmentos e um p-loop. Fonte: Martins e Valle, 2012.

No estado inativo do Na_v , quando a membrana está em potencial de repouso, este se encontra fechado. Um estímulo causa a despolarização da membrana causando o influxo de íons de Na^+ e a abertura do canal. Em aproximadamente um milissegundo a membrana ao redor do canal atinge o potencial de equilíbrio de Na^+ , inativando-o devido a sua mudança conformacional, o que bloqueia a passagem de íons através da membrana. Quando o potencial de ação da membrana retorna ao estado de repouso, o canal se fecha. O correto funcionamento do Na_v é fundamental para a propagação do impulso nervoso (Hemingway et al., 2004; Martins & Valle, 2012).

DDT e piretroides têm o Na_v como alvo, mantendo-o aberto e ocasionando a propagação contínua do impulso nervoso, que resulta na paralisia do inseto e eventual morte, efeito conhecido como *knockdown*. Mutações pontuais no Na_v , especialmente no segmento IIS6, estão relacionadas ao efeito *knockdown resistance (kdr)* em diversos insetos. Esse efeito foi visto pela primeira vez no ano 1996 em *Musca domestica* (Williamson et al., 1996). No entanto, diversas outras mutações pontuais têm sido encontradas no Na_v e relacionadas à resistência ao efeito *knockdown* dos piretroides (Martins & Valle, 2012; Silva et al., 2014).

Em anofelinos, a mutação *kdr* mais frequente ocorre no aminoácido de posição 1014 através da substituição de uma leucina por uma fenilalanina (L1014F), sendo verificada pela primeira vez em *An. gambiae* s.s., o principal vetor de plasmódio afro-tropical. Mutações no sítio 1014 foram observadas em pelo menos 13 diferentes espécies de anofelinos no mundo, conforme revisado por Silva e colaboradores (2014). Na América até o momento foi encontrada esta mutação em *Anopheles albimanus* no México, Nicarágua e Costa Rica (Lol et al., 2013).

Uma vez que poucas mutações são permissivas em genes altamente conservados, como é o caso do *Na_v*, a mesma substituição L1014F tem evoluído independentemente e aparecido *de novo* na mesma espécie (Pinto et al., 2006). Em função de ser encontrada na região oeste da África recebeu o nome de *w-kdr*, do inglês *west*. A substituição de uma leucina por uma serina no mesmo sítio (L1014S), também em *Anopheles gambiae* s.s, vinha sendo mais frequentemente encontrada no leste da África, o que a fez ser conhecida como *e-kdr*, do inglês *east* (Pinto et al., 2006; Martins & Valle, 2012; Silva et al., 2014). Portanto, diferentes mutações podem ser mais frequentes em determinadas espécies, de forma que a complexa relação do *kdr* com o complexo *Gambiae* tem servido como marcador molecular para estimar o isolamento reprodutivo entre suas subespécies (Diabaté et al., 2003; Lanzaro & Tripet, 2004). As diferentes mutações podem ser transferidas entre outras espécies do complexo *Gambiae*, via introgressão (Weill et al., 2000; Diabaté et al., 2004; Mitri et al., 2015).

Além do sítio 1014, *An. gambiae* s.s. e *An. coluzzii* africanos, apresentaram a substituição de uma asparagina por uma tirosina no sítio 1575 (N1575Y) (Edi et al., 2017), uma valina por uma leucina no sítio 1010 (V1010L) em *Anopheles culicifacies* na Índia, resultado de duas mutações pontuais alternativas no sítio 3028 (3028G>T ou 3028G>C), mas sempre associadas à mutação L1014S. Esta associação sugeriu ainda um papel aditivo no fenótipo *kdr* (Singh et al., 2010).

1.8.2 ACETILCOLINESTERASE, RESISTÊNCIA A ORGANOFOSFORADOS E *ace-1*

Os carbamatos e organofosforados têm como alvo a enzima acetilcolinesterase (AChE), que está relacionada com a finalização do impulso nervoso. Quando um impulso nervoso chega à porção terminal do axônio, a acetilcolina estocada em vesículas é liberada para a fenda sináptica. De dois e três milissegundos depois dessa liberação, a acetilcolina interage com os receptores de acetilcolina na fenda pós-sináptica (Figura 14). A AChE atua reduzindo a concentração de acetilcolina na fenda sináptica, através da hidrólise de acetilcolina em colina e ácido acético, cessando o impulso nervoso. Quando a AChE sofre inibição pelos organofosforados e carbamatos, deixa de hidrolisar acetilcolina, que por sua vez acumula na fenda sináptica resultando na estimulação nervosa contínua e culminando em exaustão e morte do inseto (Fukuto, 1990; Klemz & Assis, 2005; Dos Santos et al., 2006).

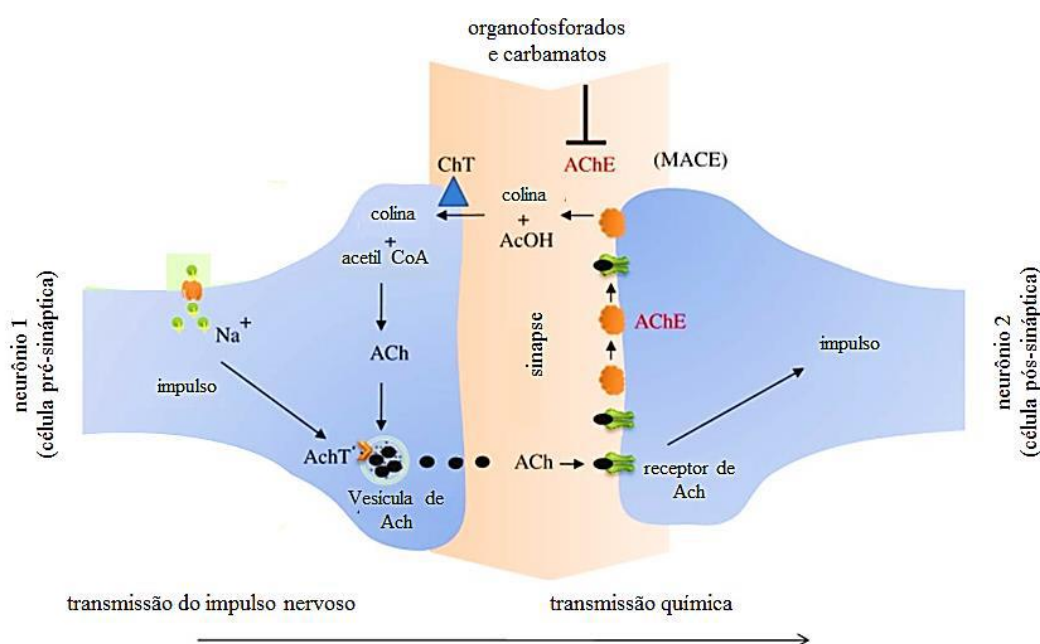


Figura 14: Acetilcolinesterase e a transmissão do impulso nervoso. ACh: acetilcolina; AChT: transportador de acetilcolina; AcOH: ácido acético; AChE: acetilcolinesterase; ChT: transportador de colina; MACE: acetilcolinesterase modificada. Adaptado de David et al., 2013

O primeiro gene da acetilcolinesterase (*ace-1*) foi isolado em *Drosophila melanogaster* seu parálogo primeiramente sequenciado no pulgão de cereais *Schizaphis graminum*. Desde então mutações pontuais no *ace-1*, gerando

acetilcolinesterase modificada (MACE) associadas à resistência a inseticidas tem sido descritas em inúmeros insetos, incluindo mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Culex* (Mori et al., 2007).

A mutação pontual com a substituição de uma glicina por uma serina na posição 119 (G119S), conhecida como *ace-1^R*, já foi registrada em *An. gambiae* e *An. coluzzii* do oeste africano, bem como em *An. albimanus* da América Central (Alout et al., 2008; Liebman et al., 2015) e em *Anopheles sinensis* na China (Feng et al., 2015). Apesar de conferir resistência, essa mutação acarreta alto custo no *fitness* do inseto, de forma que foi selecionada uma duplicação no *ace-1* mantendo um gene selvagem e outro mutante, criando um perfil heterozigoto. Homozigotos *ace-1^R* sobrevivem na presença do inseticida, mas os que carregam a duplicação além de sobreviver na presença do inseticida, estão sujeitos a um menor custo no *fitness* na ausência do mesmo. O primeiro caso de duplicação gênica do *ace-1* foi observado em *An. gambiae* s.s. e *An. coluzzii*, onde acredita-se que tenha acontecido por introgressão como ocorreu com a mutação *kdr* (Djogbénu et al., 2008, 2009).

2.JUSTIFICATIVA

A distinção entre espécies crípticas em insetos vetores de patógenos tem importância epidemiológica, uma vez que diferentes espécies podem ter capacidade vetorial distintas e responder de forma heterogênea a estratégias de controle (WHO, 2010). Variações morfológicas, comportamentais e moleculares foram descritas em populações brasileiras de *An. darlingi*, o principal vetor de plasmódio humano no país. No entanto, há ainda bastante a ser explorado a cerca da diversidade molecular de genes que podem sinalizar um processo de especiação recente e ainda auxiliar na delimitação das diferentes espécies crípticas.

Genes como *timeless* e *period* exercem influência no controle de atividades de ritmos biológicos, como acasalamento e locomoção (Sakai & Ishida, 2001; Tauber et al., 2003), o que faz deles excelentes candidatos como marcadores moleculares em estudos de especiação de insetos. Estudos prévios

de Peixoto e colaboradores empregaram estes genes nas espécies *Anopheles cruzii*, *Anopheles triannulatus*, no complexo *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia whitmani* e *Drosophila melanogaster* (Mazzoni et al, 2006; Peixoto et al., 2007; Araki et al., 2009; Rona et al., 2009; Silva-do-Nascimento et al., 2011). Um trabalho foi iniciado também com *An. darlingi*, envolvendo o gene *tim* proveniente das localidades de Portuchuelo em Rondônia e Macapá no Amapá, que detectou diferenciação genética entre grupos coletados no intra e peridomicílio em Portuchuelo, RO (Bottino, 2007). Estes genes tem se mostrado bons marcadores no estudo de espécies crípticas. Contudo, há poucos estudos na literatura que envolvam genética de populações com o gene *per* no gênero *Anopheles*. Portanto, esta é a primeira vez que é utilizada esta abordagem em um importante vetor da América do Sul.

O uso de inseticidas como forma de controle de vetores exerce seleção bastante forte, que tende a diminuir a variabilidade genética de uma população, em torno da seleção positiva de genes de resistência. Com relação aos genes das moléculas alvos dos inseticidas, alterações para o fenótipo da resistência acontecem quando expressos em homozigose. Isso faz com que a resistência demore a se estabelecer na população. No entanto, quando o alelo mutante atinge determinada frequência (“*tipping point*”) esta tende a aumentar de forma exponencial, na presença do inseticida (WHO, 2012). Desta forma, é necessário conhecer a ocorrência e a frequência dos alelos de resistência em populações naturais do vetor, antes que atinjam uma frequência que inviabilize o controle químico, que na prática é a melhor opção em períodos de surtos epidêmicos (WHO, 2011). Apesar do registro de mutações *kdr* e *ace-1^R* em diversas espécies de anofelinos, não há ocorrência registrada até então em *An. darlingi*. O gene *Nav* (também chamado de *paralytic*) vinha sendo utilizado como marcador molecular com o intuito de estudar diversidade no complexo de espécies *Lutzomyia longipalpis*. O trabalho de Lins e colaboradores (2012) revelou diferenciação entre populações que produziam som de corte do tipo *burst* e *pulse*, como estudos com o gene *per* já vinham sugerindo. Além de explorar estes genes em busca de alterações possivelmente relacionadas à resistência, os dados obtidos irão contribuir para estudos de diversidade da espécie e dar subsídios para elucidar o papel da resistência de vetores aos inseticidas,

contribuindo para a melhoria dos programas de controle desses insetos. Somado a isto, pretende-se avaliar a diversidade de genes relacionados a comportamento, uma vez que têm sido observadas alterações comportamentais dentro desta espécie de diferentes localidades, de forma a testar a hipótese do complexo de espécie *An. darlingi*.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar a diversidade molecular de genes relacionados à resistência a inseticidas e de ritmos biológicos em populações brasileiras e da Colômbia de *Anopheles darlingi* Root 1926.

3.2. Objetivos específicos:

- i) Obtenção de sequências nucleotídicas de regiões de genes relacionados à resistência a inseticidas (*Na_v* e *ace-1*); e possível detecção de mutações diagnósticas em populações de *An. darlingi*
- ii) Genotipagem individual para o sítio da mutação *kdr* (gene *Na_v*) em distintas populações de *An. darlingi*.
- iii) Obtenção de sequências nucleotídicas de genes de ritmos biológicos (*per* e *tim*) de populações de *An. darlingi*.
- iv) Caracterizar os polimorfismos e comparar os níveis de divergência genética destes genes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelos colaboradores: Dra. Simone Ladeia IOC/Fiocruz (Barcelos, ao longo do Rio Unini e do Rio Jaú, AM), Dra. Liliana Santacoloma do Instituto Nacional de Salud em Bogotá (Chocó, Colômbia) e Dr José Bento Pereira Lima Laficave/IOC/Fiocruz (Porto Velho/RO e Manaus/AM).

Para a avaliação da diversidade dos quatro genes em estudo foram utilizados um total de 517 espécimes adultos, fêmeas, sendo 125 de Porto Velho (Rondônia), 79 de Manaus (Amazonas) (Estrada do Brasileirinho – pontos de coleta entre os km 1 e 11, e 258 espécimes de Barcelos (Amazonas). A localidade de Barcelos foi dividida em dois grupos, Barcelos 1 (n = 126) coletados às margens do rio Unini (01°45'46.0"S, 62°13'39.6"O) e Barcelos 2 (n = 132) às margens do rio Jaú (01°53'2.0"S, 61°44'31,6"O). Neste trabalho foi utilizada também uma amostra de 55 espécimes coletados na localidade de Chocó, Colômbia (6°7'53.04"N, 76°26'0.6"O) (Figura 15: mapa).

Para a genotipagem do sítio 1014 do Nav foram utilizadas 589 fêmeas sendo 515 do Rio Unini e 74 do Rio Jaú do Parque Nacional do Jaú no estado do Amazonas.

As amostras de *Anopheles darlingi* gentilmente cedidas pela Dra. Teresa Fernandes Silva do Nascimento (Salobra - MS) e pela Dra. Marinete Marins Povia (Santarém - Pará e Lagoa dos Índios - Amapá) para o estudo de diversidade não foram utilizadas neste trabalho, uma vez que não foi possível visualizar banda em gel de agarose dos produtos de PCR para nenhum dos *primers* desenhados para os genes em questão. Acreditamos que com nosso método de extração de DNA não pudemos extrair o material genético destas amostras.



Figura 15: Localidades das amostras de *Anopheles darlingi*. Em vermelho: Tagachi no departamento de Chocó na Colômbia; em verde e azul, respectivamente: Barcelos 1 e Barcelos 2, no estado do Amazonas; em roxo: Manaus no Amazonas; em amarelo: Porto Velho no estado de Rondônia.

De acordo com os colaboradores, as coletas foram realizadas através de atrativo humano protegido com o auxílio de capturador de Castro. Os espécimes foram identificados, baseados na morfologia externa das fêmeas, utilizando-se a chave taxonômica de Faran & Linthicum, 1981. Todo o material foi preservado em sílica ou etanol para posterior análise molecular e transportado para o LAFICAVE dentro das regras de segurança vigentes.

4.2. EXTRAÇÃO DE DNA E FORMAÇÃO DE POOLS

A extração do DNA genômico individual foi feita segundo protocolo estabelecido por Martins et al. (2007), com pequenas modificações. As fêmeas foram transferidas para tubos de polipropileno de 1.5 mL contendo 3 *beads* de zircônia/sílica com o tamanho de 2.3 mm e solução TNES (250 mM de Tris pH 7.5, 2 M de NaCl, 100 mM de EDTA e 2.5% de SDS) e agitadas para maceração em “*bead beater*” (Biospec) por 6 minutos. Posteriormente, foi adicionado 2 μ L

de proteinase K (20 mg/mL) e deixado em banho-maria a 56°C *overnight*. Após centrifugação por 1 minuto, a precipitação de proteína foi feita pela adição de 100 µL de NaCl a 5M, com agitação do tubo por 20 segundos, seguido de centrifugação por 6 minutos a 15.000 g. O sobrenadante foi transferido para novos tubos para posterior lavagem com 300 µL isopropanol 100%, agitando por inversão, seguida de centrifugação a 15.000 g por 5 minutos. Em seguida foi feita a lavagem com 300 µL de etanol 70%, centrifugado a 15.000 g por 6 minutos e descartado todo o sobrenadante. O etanol restante foi retirado através de secagem a 60°C por 10 minutos e o DNA eluído em 50 µL de tampão TE 0,1X. Ao final destas etapas, as amostras foram aquecidas a 96°C por 10 minutos para inativação da proteinase K. A mensuração da quantidade e pureza do DNA foi feita a partir do espectrofotômetro NanoDrop One (ThermoFisher).

Os DNAs individuais foram utilizados para os ensaios de genotipagem da mutação *kdr* (item 4.1). Já para a avaliação da diversidade genética entre populações, uma alíquota de 1 µL de cada amostra foi adicionado a um *pool* de sua respectiva população, utilizando-se o total de indivíduos coletados por região. Portanto, o *pool* de de Manaus tinha 79 indivíduos, Porto Velho 125, Barcelos1 126, Barcelos2 132 e Colômbia 55. Os *pools* foram dosados no nanodrop para a quantificação e inferência da qualidade do DNA.

4.3 DESENHO DOS PRIMERS

Para o desenho dos *primers* foi feita busca das regiões de interesse na base de dados VectorBase (Giraldo-Calderón et al., 2014) e NCBI (*National Center of Biotechnology Information*, 1988). Para os genes relacionados à resistência a inseticidas, foram escolhidas regiões gênicas ao redor de mutações diagnósticas associadas a este fenótipo: sítio 1014 no *Nav* e sítio 119 no *ace-1*. A região amplificada do *Nav* inclui um intron, já a do *ace-1* apenas região codificante. Os genes relacionados a ritmos biológicos, ambos *per* e *tim*, incluem região intrônica, previamente utilizado em estudos anteriores envolvendo outras espécies de anofelinos.

Após obter regiões de interesse dos genes *ace-1* (AGAP001356) e *period* (ADAC005319) de *An. darlingi* depositados do NCBI e Vector Base, respectivamente, foram desenhados os *primers* com o auxílio do software Geneious 9.1.8 (Kearse et al., 2012). Para a escolha dos *primers* foram consideradas as condições de temperatura de *melting* (entre 52-58°C) e conteúdo GC (na faixa de 40-60%). Posteriormente foram avaliados pareamentos indesejados (*hairpin*, *self-dimer* e *hetero-dimer*) com o OligoAnalyzer 3.1 da *Integrated DNA Technologies* (www.idtdna.com). Os *primers* do *timeless* foram adaptados do conjunto desenhado no trabalho de mestrado desenvolvido por Rachel Bottino (2007) (dados não publicados). Os *primers* utilizados na amplificação do *Nav* foram os mesmos desenhados por Silva et al. (2014). As sequências dos *primers* para os quatro genes estão disponíveis na Tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos *primers* para amplificação parcial dos genes *per*, *tim*, *Nav* e *ace-1*

gene	primer	sequência 5' - 3'	*	**
<i>per</i>	138f	ATGCTGACCAGATTACCGCC	535	E2 (22), I (76), E3 (437)
	712r	TGAGTTCCTTGCCCTTGTCG		
<i>tim</i>	5dartim2a	GAACACAGGTCGAGAAGGAATC	737	E3 (177), I (82), E4 (142) e I (336)
	3dartim3	CGTATCGATTTGCACTTGCT		
<i>Nav</i>	42f	TCGTGTTTTATGCGGAGAATG	339	E20 (88), I (74), E21 (177)
	422r	CACGGACGCAATTTGACTTGT		
<i>ace-1</i>	Adace1F	GCCGGCCGAAAAGTGGAG	344	E5 (344)
	Adace1R	CTTAGAGCAAGTTCTGATCGA		

*: tamanho em pb esperado dos fragmentos amplificados; **: localização gênica.

Para a genotipagem *kdr* desenhamos *primers* específicos para a mutação 1014F baseados nas sequências que obtivemos da região IIS6 do gene *Nav*. Para isso utilizamos a ferramenta AS-PCR (*Allele-Specific PCR*) que permite diferenciar o alelo mutante (1014F) do alelo selvagem (1014L) através da diferença de tamanho do produto do PCR via eletroforese (Figura 16).

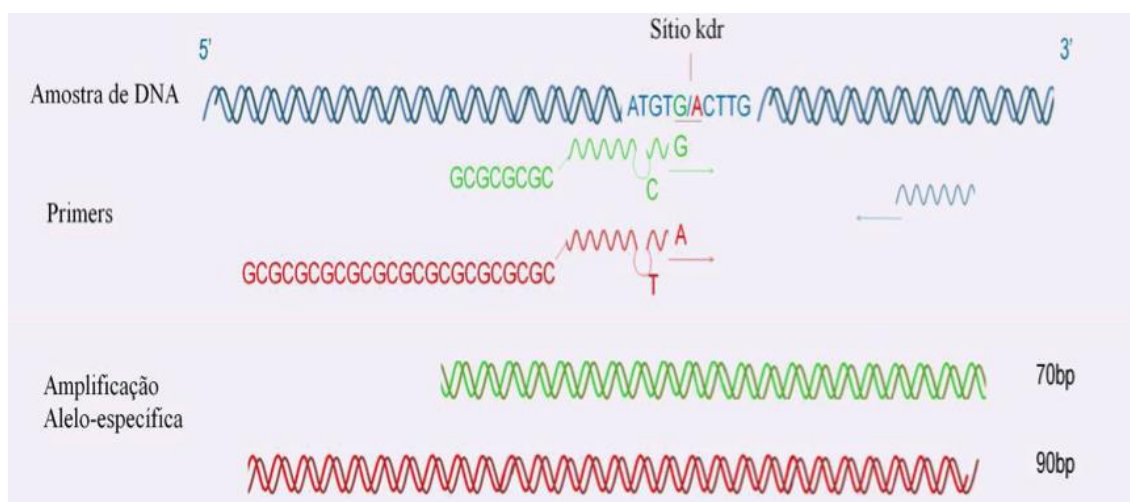


Figura16: Representação da PCR alelo-específica, esquematizando os *primers* específicos para o sítio da mutação *kdr* contendo uma calda GC na ponta 5' e uma transição na extremidade 3'. Mais abaixo pode ser observada a diferença do tamanho de *amplicon* gerado. Fonte: Martins & Valle, 2012.

Desenhamos dois *primers* específicos para cada sítio polimórfico e um *primer* no sentido reverso comum a ambos. A diferença entre o tamanho dos produtos foi dada pela adição de uma calda GC à 5' dos *primers* específicos, distintos em 20 nucleotídeos (Tabela 2). A especificidade para o polimorfismo de base única (SNP) é conseguida na extremidade 3', reforçada por uma transição no terceiro nucleotídeo a 3', que aumenta a força da ligação desta extremidade conforme o trabalho feito por Wang (2005).

Tabela 2: Sequências dos *primers* para a genotipagem *kdr*

<i>primer</i>	sequência 5' - 3'	*
reverse	GCGGGCCTGTAGTTATAGGAAACGTA	106
f_Phe	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCCTGTAGTTATAGGAAACATT	126
f_Leu	GCGGGCCTGTAGTTATAGGAAACGTA	106

*: tamanho em pb esperado do fragmento amplificado

4.4 CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

A fim de se obter as melhores condições de amplificação para os genes envolvidos na análise de diversidade, mais de um *kit* de PCR foram utilizados. Nos procedimentos que culminariam em análise de sequências, todos os kits

utilizados apresentaram polimerase de alta fidelidade (*proof reading*), a fim de se evitar erros demasiados na reação de PCR e nas análises subsequentes.

A) *Kit Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer* (New England, BioLabs). No preparo do *mix* foi adicionado a *Phusion 1x buffer*, DMSO 3%, *primers* específicos para os genes em questão na concentração de 0,5 µM e água Milli-Q para o volume final de 25 µL. As reações foram levadas ao termociclador numa primeira etapa de desnaturação a 98°C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento por 15 segundos (estas temperaturas podem ser consultadas na Tabela 3) e extensão a 72°C por 30 segundos. Foi adicionada uma última etapa a 72°C por 7 minutos.

B) *Kit USB® Fidelitaq™ DNA Polymerase* (Affymetrix), no preparo do *mix* foi adicionada a *Fidelitaq 1x buffer*, *primers* específicos para os genes em questão na concentração de 0,3 µM e água Milli-Q para o volume final de 40 µL. As reações foram levadas ao termociclador numa primeira etapa de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos (as temperaturas podem ser consultadas na Tabela 3) e extensão a 68°C por 1 minuto. Foi adicionada uma última etapa a 68°C por 5 minutos.

C) *Kit Pfu DNA Polymerase* (ThermoScientific), no preparo do *mix* foi adicionada a polimerase *Pfu*, tampão com MgCl₂1x, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) na concentração de 0,25 mM, *primers* específicos para os genes em questão na concentração de 0,75 µM e água Milli-Q para o volume final de 40 µL. As reações foram levadas ao termociclador numa primeira etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 57.9°C por 30 segundos, extensão e finalmente uma etapa a 72°C por 1 minuto (Tabela 3).

Tabela 3: Condições utilizadas na amplificação dos genes para análises de diversidade em *An. darlingi*

gene	polimerase	Ta (°C)	população
<i>per</i>	Phusion	69	Manaus e Rondônia
	Pfu	57.9	Barcelos 1, Barcelos 2, Colômbia
<i>tim</i>	Phusion	63	Manaus e Rondônia
		52	Barcelos 1
		56	Barcelos 2
		54	Colômbia
<i>Nav</i>	Phusion	64	Manaus e Rondônia
	Fidelitaq	60	Barcelos 1
	Pfu	60	Barcelos 2
	Phusion	60	Colômbia
<i>ace-1</i>	Phusion	65	Manaus e Rondônia
		56	Colômbia
		60	Barcelos 1
		Pfu	60

Ta: temperatura de anelamento dos *primers*

Para a genotipagem *kdr* foi feita uma primeira reação para a amplificação da região IIS6, utilizando-se 1 µL de DNA, 1 X do *kit* Go Taq 2x polimerase (Promega), 1 µM dos *primers* 42f 5'-CGTGTTTTATGCGGAGAATG-3' e 422r 5'-CACGGACGCAATTTGACTTGT-3' e água mili-Q para o volume final de 12 µL de reação. As reações foram submetidas ao termociclador com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida de 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C de anelamento e 72°C de extensão por 1 minuto. O produto desta reação foi submetido à eletroforese por 1 hora a 170 volts em gel de poliacrilamida 10% e, posteriormente, corado em Nancy-520 DNA Gel Stain intercalante de DNA (Sigma-Aldrich®) para visualização de bandas através de luz azul.

Após visualização das bandas, o produto da reação foi diluído 100X em água mili-Q e submetida à reação de AS-PCR. Então, 1 µL dessa diluição foi usado como DNA molde, onde novamente foi utilizado o *kit* Go Taq 2x polimerase (Promega), 0,5 µM do *primer* comum (5'-GCG GGC CTG TAG TTA TAG GAA ACG TA-3'), 0,5 µM do *primer* f_Phe (5'-GCG GGC AGG GCG GCG

GGG GCG GGG CCC TGT AGT TAT AGG AAA CATT-3') e 0,25 µM do *primer* f_Leu (5'- GCG GGC CTG TAG TTA TAG GAA ACG TA-3') para o volume final de 12,5 µL. Em todas as reações foram utilizados controles positivos homozigotos (1014L/L, 1014F/F) e heterozigoto (1014L/F). Estes controles foram sintetizados por encomenda (Síntese Biotecnologia/IDT) e consistem de plasmídeos contendo a região IIS6 do *Nav* de *Anopheles darlingi*. As reações foram submetidas ao termociclador numa fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, e em seguida 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C de anelamento por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de extensão a 72°C por 7 minutos. Os produtos destas reações foram submetidos à eletroforese e corados para visualização de bandas como mencionado anteriormente. O tamanho dos produtos em pares de base foi orientado pelo marcador DNA Ladder Ultra Low Range (Fermentas).

4.5. PURIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO

As purificações dos fragmentos amplificados foram feitas com o *kit* Agencourt®AMPure®XP (Beckman Coulter) segundo as condições fornecidas pelo fabricante. Os fragmentos purificados foram ligados em vetor de clonagem utilizando o *kit* pJet (Fermentas) para posterior transformação em células competentes *Escherichia coli* DH5-α, através de choque térmico em banho-maria a 37°C por 45 segundos. Foi adicionado 1.000 µL de meio de cultura líquido SOC (Invitrogen) e incubado em banho-maria 37°C por 1 hora. As células foram plaqueadas em Placas de Petri contendo meio LB-ágar com ampicilina (100 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas e então transferidas as colônias para meio líquido CG (CircleGrow, MP Biomedicals) com ampicilina 100 mg/mL em placa de 96 poços, submetida a agitação (220 rpm) a 37°C por 22 horas.

A purificação do DNA plasmidial foi feita através de método de lise alcalina (Sambrooke e Russel, 2001), filtrado em placas de 0,22 µm (Millipore) e ressuspensos em 40 µL de água milli-Q. Para checar se os fragmentos clonados eram os desejados, 0,5 µL de DNA plasmidial purificado foi submetido a PCR com volume final de 20 µL, utilizando o *kit* GoTaq Polymerase 2x (Promega®),

os *primers* pJET1.2 for 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' e pJET1.2 rev 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3' do *kit* PJet (Fermentas) e 8,7 μ L de água milli-Q. As reações foram submetidas ao termociclador a uma etapa de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de anelamento e extensão a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos. O produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, a 100 volts por 1 hora e corado em Nancy-520 DNA Gel Stain intercalante de DNA (Sigma-Aldrich®) para visualização de bandas através de luz azul.

As reações de sequenciamento foram feitas com o *kit* BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) utilizando 1 μ L (aproximadamente 2100 ng) de DNA plasmidial purificado e 1 μ M de um dos *primers* do *kit* pJET1.2 (mencionados anteriormente). As reações foram realizadas por 60 ciclos, cada um a 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos e 60°C durante 2 minutos. Posteriormente foram encaminhados à Plataforma de Sequenciamento PDTIS/Fiocruz para a purificação, mediante precipitação por etanol do produto da reação, ressuspensão em formamida *HiDi* (Applied Biosystems), desnaturação a 95°C por 3 min, e finalmente sequenciamento em sequenciador de 48 capilares, ABI 3730.

4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A identidade das sequências obtidas foi avaliada através do programa Blastn disponível no site do National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>), ou Vector Base (<https://www.vectorbase.org/blast>) comparadas a sequências dos genes *Na_v*, *ace-1*, *per* e *tim* disponíveis nas bases de dados de *Anopheles darlingi*. O alinhamento das sequências foi feito com o auxílio dos softwares Geneious 9.1.8 (Kearse et al, 2012) e Bioedit 7.2.5 (Hall, 1999). As análises de polimorfismos, como número de haplótipos (*h*), número de sítios polimórficos (*S*), diversidade nucleotídica (Π), parâmetro neutro (Θ) e teste de seleção natural *Tajima* (1989) foram feitos utilizando o DnaSP 5.0 (Librado & Rozas, 2009).

Para as análises interpopulacionais foi utilizado o programa ProSeq 2.9.1 (Filatov, 2009), onde foram calculados índices de diferenciação genética entre populações, como o F_{st} . Adotamos a classificação usada por Hartl & Clark (2010), onde valores de F_{st} indicam diferenciação genética baixa (entre 0 e 0,05), moderada (0,05 a 0,15), alta (0,15 a 0,25) e muito alta (acima de 0,25). Foram calculados também os números de sítios polimórficos compartilhados (Ss), a quantidade de sítio fixos (Sf) e os sítios polimórficos exclusivos entre duas populações (Sx e Sy).

Na tradução das sequências codificantes e na quantificação dos sítios variáveis foi utilizado o programa MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Na elaboração das árvores filogenéticas foi utilizado o método de Máxima Verossimilhança. Na escolha do melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi usado o Jmodel test 2.0 (Posada, 2008).

5.RESULTADOS

Ao todo foram obtidas 1.106 amostras de DNA de *Anopheles darlingi* de localidades da região norte do Brasil e da Colômbia, provenientes de coletas em diferentes épocas e sob condições distintas (peri, intra ou extradomicílio). Todo material está armazenado no banco de DNA do laboratório, criopreservado e poderá ser utilizado em futuras análises moleculares para distintos fins. A concentração de DNA das amostras foi bastante variável, de 3,7 – 520,1 ng/μL, dosadas em Nanodrop. Para cada localidade foi formado um *pool* com DNA (Barcelos 1, Barcelos 2, Manaus, Porto Velho e Colômbia) de suas respectivas amostras para as reações de clonagem e sequenciamento. As sequências obtidas foram analisadas e os resultados apresentados nas sessões: 5.1 - Análise dos polimorfismos, 5.2 -Divergência genética entre as populações para cada marcador nuclear, e 5.3 - Inferências genealógicas. As genotipagens para mutação *kdr* foram feitas a partir de DNA individual e o resultado apresentado na seção: 5.5 -Genotipagem do sítio da mutação *kdr* L1014F do *Nav*.

5.1. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

5.1.1 GENE *per*

O fragmento obtido do gene *per* tem 535 pb, e como esperado, apresenta dois éxons (E2 e E3), o primeiro com 22 pb, o íntron com 76 pb e o segundo éxon com 437 pb. Foram obtidas ao todo 101 sequências correspondentes ao fragmento do gene *per* das cinco populações estudadas. Um total de 39 sítios nucleotídicos variáveis (~7%) foi observado (Anexo 1), dos quais 26 foram substituições sinônimas ou observadas na região do íntron, e 13 foram substituições não-sinônimas, entre as quais duas foram observadas no E2 e 11 no E3 (Anexo 2), gerando ao todo 65 haplótipos. As mudanças de aminoácidos mais frequentes ocorreram nos sítios 95 (com a troca de arginina por cisteína,

todas na Colômbia), 97 (valina por alanina em Barcelos 1, Barcelos 2, Colômbia e Manaus) e 108 (serina por asparagina em Barcelos 2, Colômbia e Porto Velho).

A Tabela 4 resume os índices de variações observados por população, como quantidade de haplótipos (H , 11 a 20), número de sítios polimórficos (S , 18 a 23), diversidade haplotípica (HD , 0,852 – 0,995), diversidade nucleotídica (Π , 0,00720 a 0,01171) e parâmetro neutro (Θ , 0,00963 a 0,01272). Foi observado que em geral para o *per*, as cinco populações apresentaram níveis de polimorfismos semelhantes.

Tabela 4: Resumo dos índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene *per* nas populações de *Anopheles darlingi*

População	N	H	S	HD	Π	Θ
Barcelos 1	17	12	23	0,890	0,01171 (0,0000015)	0,01272 (0,0000259)
Barcelos 2	21	11	20	0,852	0,00862 (0,0000014)	0,01039 (0,0000167)
Manaus	19	17	18	0,988	0,01159 (0,0000006)	0,00963 (0,0000152)
Porto Velho	21	20	20	0,995	0,01065 (0,0000007)	0,01039 (0,0000167)
Colômbia	23	13	21	0,897	0,00720 (0,0000020)	0,01064 (0,0000167)

N: número de sequências para cada população; *H*: número de haplótipos; *S*: número de sítios polimórficos; *HD*: diversidade haplotípica; Π : número médio de diferenças par-a-par; Θ : parâmetro neutro baseado no número de sítios segregantes. Entre parênteses as variâncias de Π do Θ .

Considerando todas as sequências obtidas, o haplótipo **per 4** (Tabela 5) foi o mais frequente, representado por nove sequências: oito em Barcelos 2, equivalente a 38,09% das sequências desta população, e um em Barcelos 1 (5,88%). Já o **per 1** foi o segundo mais frequente, encontrado em oito sequências: seis em Barcelos 1 (35,29%), um em Manaus (5,26%) e um em Porto Velho (4,76%). A população de Porto Velho apresentou a maior quantidade de haplótipos exclusivos (17), seguida de Manaus e Colômbia (13), Barcelos 2 (8) e Barcelos 1 (7).

Tabela 5: Haplótipos encontrados no segmento do gene per nas populações de *An. darlingi*

haplótipos	seqüências	total
per 1	perBa1_01, perBa1_07, perBa1_08, perBa1_12, perBa1_13, perBa1_15, perPve_21, perMan_06	8
per 2	perBa1_02	1
per 3	perBa1_03	1
per 4	perBa1_04, perBa2_02, perBa2_06, perBa2_07, perBa2_08, perBa2_11, perBa2_17, perBa2_18, perBa2_21	9
per 5	perBa1_05, perBa2_13	2
per 6	perBa1_06	1
per 7	perBa1_09	1
per 8	perBa1_10	1
per 9	perBa1_11	1
per 10	perBa1_14, perPve_10	2
per 11	perBa1_16, perMan_09	2
per 12	perBa1_17	1
per 13	perBa2_01, perBa2_15	2
per 14	perBa2_03	1
per 15	perBa2_04	1
per 16	perBa2_05, perBa2_09	2
per 17	perBa2_10, perBa2_16	2
per 18	perBa2_12	1
per 19	perBa2_14	1
per 20	perBa2_19	1
per 21	perBa2_20, perMan_07	2
per 22	perCol_01	1
per 23	perCol_02, perCol_20	2
per 24	perCol_03, perCol_04, perCol_05, perCol_06, perCol_11, perCol_14, perCol_15	7
per 25	perCol_07, perCol_10, perCol_13	3
per 26	perCol_08	1
per 27	perCol_09, perCol_16	2
per 28	perCol_12	1
per 29	perCol_17	1
per 30	perCol_18	1
per 31	perCol_19	1
per 32	perCol_21	1
per 33	perCol_22	1
per 34	perCol_23	1
per 35	perPve_01	1
per 36	perPve_02	1
per 37	perPve_03	1
per 38	perPve_04	1
per 39	perPve_05, perPve_17	2
per 40	perPve_06	1
per 41	perPve_07	1
per 42	perPve_08, perMan_11, perMan_18	3
per 43	perPve_09	1
per 44	perPve_11	1
per 45	perPve_12	1
per 46	perPve_13	1
per 47	perPve_14	1
per 48	perPve_15	1
per 49	perPve_16	1
per 50	perPve_18	1
per 51	perPve_19	1
per 52	perPve_20	1
per 53	perMan_01, perMan_05	2
per 54	perMan_02	1
per 55	perMan_03	1
per 56	perMan_04	1
per 57	perMan_08	1
per 58	perMan_10	1
per 59	perMan_12	1
per 60	perMan_13	1
per 61	perMan_14	1
per 62	perMan_15	1
per 63	perMan_16	1
per 64	perMan_17	1
per 65	perMan_19	1

5.1.2 GENE *tim*

O fragmento do *tim* analisado tem 737 pb e apresenta como esperado dois éxons (E3 e E4), o primeiro com 177 pb e o segundo com 142 pb, e dois íntrons: o primeiro com 82 pb e o segundo com 336 pb. Foram analisadas um total de 86 sequências correspondentes ao *tim* nas cinco populações, gerando um total de 34 haplótipos, com 28 sítios nucleotídicos polimórficos (~3,8%) (Anexo 3) e 3 substituições não sinônimas, todas localizadas no E3, em diferentes sítios (Anexo 4).

A Tabela 6 mostra o número de sequências obtidas por população (N, de 15 a 21), a variação do número de haplótipos (H, de 8 a 12), do número de sítios polimórficos (S, de 8 a 18), a diversidade haplotípica (HD, de 0,757 a 0,933), a diversidade nucleotídica (Π , de 0,00257 a 0,00662) e o parâmetro neutro (Θ , de 0,00302 a 0,00710) para o fragmento do *tim*. As populações brasileiras apresentaram variação de sítios polimórficos e de números de haplótipos moderadas e similares, enquanto que a Colômbia se mostrou mais diversa (H=12; S=18).

Tabela 6: Resumo dos índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene *tim* nas populações de *Anopheles darlingi*

População	N	H	S	HD	Π	Θ
Barcelos 1	16	10	10	0,925	0,00353 (0,0000001)	0,00409 (0,0000036)
Barcelos 2	21	8	8	0,757	0,00257 (0,0000002)	0,00302 (0,0000020)
Manaus	15	9	10	0,800	0,00318 (0,0000004)	0,00417 (0,0000038)
Porto Velho	16	10	8	0,933	0,00320 (0,0000002)	0,00327 (0,0000025)
Colômbia	18	12	18	0,922	0,00662 (0,0000003)	0,00710 (0,0000084)

N: número de sequências para cada população; H: número de haplótipos; S: número de sítios polimórficos; HD: diversidade haplotípica; Π : diversidade nucleotídica; Entre parênteses a variação de Π ; Θ : parâmetro neutro; Entre parênteses a variação do Θ .

Entre todas as populações, o haplótipo **tim1** (Tabela 7) foi o mais frequente, representado por 23 sequências: 10 em Barcelos 2 (47,6%), sete em Manaus (46,6%), quatro em Barcelos 1 (25%) e duas em Porto Velho (12,5%). Quanto aos haplótipos exclusivos, a Colômbia se destacou apresentando 12 ocorrências, em seguida Barcelos 1 e Manaus, ambas com quatro haplótipos exclusivos. Barcelos 2 e Porto Velho apresentaram dois e três, respectivamente.

Tabela 7: Haplótipos encontrados no segmento do gene tim nas populações de *An. darlingi*

haplótipos	sequências	total
tim 1	timBa1_01, timBa1_12, timBa1_15, timBa1_16, timBa2_01, timBa2_02, timBa2_05, timBa2_07, timBa2_10, timBa2_11, timBa2_16, timBa2_17, timBa2_18, timBa2_20, tim_Man02, tim_Man04, tim_Man07, tim_Man08, tim_Man10, tim_Man11, tim_Man12, tim_Pve05, tim_Pve15	23
tim 2	timBa1_02, timBa1_06, timBa2_04, timBa2_09, timBa2_19, tim_Pve09, tim_Pve10	7
tim 3	timBa1_03	1
tim 4	timBa1_04, timBa1_07, tim_Man03, tim_Pve03	4
tim 5	timBa1_05, timBa2_13	2
tim 6	timBa1_08, timBa2_06, timBa2_08, timBa2_21, tim_Pve01, tim_Pve06, tim_Pve07	7
tim 7	timBa1_09	1
tim 8	timBa1_10, timBa1_14, tim_Man06, tim_Pve12, tim_Pve14, tim_Pve16	6
tim 9	timBa1_11	1
tim 10	timBa1_13	1
tim 11	timBa2_03, tim_Pve08	2
tim 12	timBa2_12, tim_Man01	2
tim 13	timBa2_14	1
tim 14	timBa2_15	1
tim 15	tim_Col01, tim_Col02, tim_Col06, tim_Col14	4
tim 16	tim_Col03, tim_Col04, tim_Col17, tim_Col18	4
tim 17	tim_Col05	1
tim 18	tim_Col07	1
tim 19	tim_Col08	1
tim 20	tim_Col09	1
tim 21	tim_Col10	1
tim 22	tim_Col11	1
tim 23	tim_Col12	1
tim 24	tim_Col13	1
tim 25	tim_Col15	1
tim 26	tim_Col16	1
tim 27	tim_Man05	1
tim 28	tim_Man09	1
tim 29	tim_Man13	1
tim 30	tim_Man14, tim_Pve11	2
tim 31	tim_Man15	1
tim 32	tim_Pve02	1
tim 33	tim_Pve04	1
tim 34	tim_Pve13	1

5.1.3 GENE Na_V

Do gene Na_V foi obtido um fragmento de 339 pares de bases, que apresenta como esperado 2 éxons (E20 e E21), com respectivamente 88 e 177 pb, e um íntron de 74 pb. Foram observados um total de 17 haplótipos, com 16 sítios nucleotídicos polimórficos (~13%) (Anexo 5), dos quais cinco encontrados no E20, três no íntron e oito no E21. Dessas substituições, 10 eram não-sinônimas, quatro e seis, respectivamente nos exons E20 e E21 (Anexo 6).

Foram analisadas 143 sequências, correspondentes ao Na_V das cinco populações. Na Tabela 8 podem ser observados os números de sequências por população (entre 14 e 66), o número de haplótipos (H, 2 até 7), a variação de sítios polimórficos (S, de 1 até 6), a diversidade haplotípica (HD, de 0,143 a 0,520), a diversidade nucleotídica (Π , de 0,00042 até 0,00173) e o parâmetro neutro (Θ , entre 0,00093 e 0,00372). Em geral os níveis de variação foram baixos e homogêneos.

Tabela 8: Resumo dos índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene Na_V nas cinco populações de *Anopheles darlingi*

População	N	H	S	HD	Π	Θ
Barcelos 1	22	5	4	0,407	0,00153 (0,0000003)	0,00324 (0,0000035)
Barcelos 2	22	4	3	0,260	0,0008 (0,0000002)	0,00243 (0,0000024)
Manaus	19	4	3	0,520	0,00173 (0,0000002)	0,00253 (0,0000026)
Porto Velho	14	2	1	0,143	0,00042 (0,0000001)	0,00093 (0,0000009)
Colômbia	66	7	6	0,175	0,00054 (0)	0,00372 (0,0000031)

N: número de sequências para cada população; H: número de haplótipos; S: número de sítios polimórficos; HD: diversidade haplotípica; Π : diversidade nucleotídica; Entre parênteses a variação de Π ; Θ : parâmetro neutro; Entre parênteses a variação do Θ .

Considerando-se todas as populações, notamos que o haplótipo Na_V 1 (Tabela 9) foi o mais frequente, representando 122 sequências: 60 na Colômbia (90,9%), 17 em Barcelos 1 (77,2%), 19 em Barcelos 2 (86,3%), 13 em Manaus (68,4%) e 13 em Porto Velho (92,8%). Colômbia apresentou a maior quantidade

de haplótipos exclusivos (seis), seguida de Barcelos 1 e Barcelos 2 (três), Manaus e Porto Velho (dois e um, respectivamente).

Não há indícios na literatura de relação entre alguma das substituições não sinônimas aqui observadas (W991R, V996A, P1003L, I1002T, S1026P, D1039N, I1052T, R1054C, F1055L, N1065D) com mutação *ldr*.

Tabela 9: Haplótipos encontrados no segmento do gene *Nav* nas populações de *An. darlingi*

haplótipos	sequências	total
Na _v 1	NavCol_01, NavCol_02, NavCol_04, NavCol_05, NavCol_06, NavCol_07, NavCol_08, NavCol_09, NavCol_11, NavCol_13, NavCol_14, NavCol_15, NavCol_16, NavCol_17, NavCol_18, NavCol_19, NavCol_20, NavCol_21, NavCol_22, NavCol_23, NavCol_24, NavCol_25, NavCol_26, NavCol_28, NavCol_29, NavCol_30, NavCol_31, NavCol_32, NavCol_33, NavCol_34, NavCol_35, NavCol_36, NavCol_37, NavCol_38, NavCol_39, NavCol_40, NavCol_41, NavCol_42, NavCol_43, NavCol_44, NavCol_45, NavCol_46, NavCol_49, NavCol_50, NavCol_51, NavCol_52, NavCol_53, NavCol_54, NavCol_55, NavCol_56, NavCol_57, NavCol_58, NavCol_59, NavCol_60, NavCol_61, NavCol_62, NavCol_63, NavCol_64, NavCol_65, NavCol_66, NavMan_01, NavMan_03, NavMan_04, NavMan_05, NavMan_07, NavMan_08, NavMan_09, NavMan_13, NavMan_14, NavMan_15, NavMan_16, NavMan_17, NavMan_19, NavPve_01, NavPve_02, NavPve_05, NavPve_06, NavPve_07, NavPve_08, NavPve_09, NavPve_10, NavPve_12, NavPve_13, NavPve_14, NavPve_15, NavPve_16, NavBa1_01, NavBa1_02, NavBa1_03, NavBa1_04, NavBa1_05, NavBa1_10, NavBa1_11, NavBa1_12, NavBa1_13, NavBa1_14, NavBa1_15, NavBa1_16, NavBa1_17, NavBa1_19, NavBa1_20, NavBa1_21, NavBa1_22, NavBa2_01, NavBa2_02, NavBa2_03, NavBa2_04, NavBa2_06, NavBa2_07, NavBa2_08, NavBa2_09, NavBa2_10, NavBa2_12, NavBa2_13, NavBa2_14, NavBa2_15, NavBa2_16, NavBa2_18, NavBa2_19, NavBa2_20, NavBa2_21, NavBa2_22	122
Na _v 2	NavCol_03	1
Na _v 3	NavCol_10	1
Na _v 4	NavCol_12	1
Na _v 5	NavCol_27	1
Na _v 6	NavCol_47	1
Na _v 7	NavCol_48	1
Na _v 8	NavMan_02, NavMan_06	2
Na _v 9	NavMan_10, NavMan_11, NavMan_18, NavBa1_08, NavBa1_18	5
Na _v 10	NavMan_12	1
Na _v 11	NavPve_11	1
Na _v 12	NavBa1_06	1
Na _v 13	NavBa1_07	1
Na _v 14	NavBa1_09	1
Na _v 15	NavBa2_05	1
Na _v 16	NavBa2_11	1
Na _v 17	NavBa2_17	1

Foram ainda observados dois haplótipos no *pool* de Porto Velho que não foram consideradas nas nossas análises por serem muito destoantes, apesar de parecerem ser homólogos ao gene *Nav*. Estas sequências representam dois haplótipos distintos e mostram elevada quantidade de sítios polimórficos ($n = 31$).

5.1.4 GENE *ace-1*

O fragmento analisado do *ace-1* consiste de um éxon (E5) de 344 pb, do qual foram obtidas ao todo 99 sequências entre as cinco populações estudadas. Entre elas observou-se o total de 36 haplótipos, resultantes de um total de 25 sítios nucleotídicos polimórficos variáveis (~7%) (Anexo 7). Dessas substituições, quatro eram não-sinônimas (Anexo 8), onde três dessas variações estão representadas por apenas uma sequência, ocorrendo em dois haplótipos diferentes (M83T, A110S e E162V).

A tabela 10 resume os índices de variações observados por população, como quantidade de haplótipos (H , 8 a 13), número de sítios polimórficos (S , 8 a 11), diversidade haplotípica (Hd , de 0,758 a 0,919), diversidade nucleotídica (Π , 0,00615 a 0,00769) e parâmetro neutro (Θ , 0,00623 a 0,00964). Foi observado que em geral para o *ace-1*, as populações apresentaram níveis de polimorfismos semelhantes com exceção da Colômbia que apresentou menor quantidade de polimorfismos.

Tabela 10: Resumo dos índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene *ace-1* nas populações de *Anopheles darlingi*

População	N	H	S	HD	Π	Θ
Barcelos 1	16	8	11	0,758	0,00615 (0,0000023)	0,00964 (0,000019)
Barcelos 2	24	13	11	0,895	0,00769 (0,0000011)	0,00856 (0,0000135)
Manaus	18	10	11	0,85	0,00667 (0,0000018)	0,00930 (0,0000172)
Porto Velho	17	12	11	0,919	0,00714 (0,0000006)	0,00946 (0,0000180)
Colômbia	24	12	8	0,88	0,00684 (0,0000006)	0,00623 (0,0000083)

N: número de sequências para cada população; *H*: número de haplótipos; *S*: número de sítios polimórficos; *HD*: diversidade haplotípica; Π : diversidade nucleotídica; Entre parênteses a variação de Π ; Θ : parâmetro neutro; Entre parênteses a variação do Θ .

Dentre todas as populações, o haplótipo **ace 5** (Tabela 11) foi o mais presente, representado por 28 sequências: oito em Barcelos 1 (50%), sete em Manaus e Barcelos 2 representando 38,8% e 29,16% respectivamente, cinco em Porto Velho (29,41%) e um na Colômbia (4,1%). Colômbia e Barcelos 1 tiveram a maior ocorrência de haplótipos exclusivos (seis). Em seguida, Porto Velho (cinco), Barcelos 2 e Manaus (quatro e três respectivamente).

Tabela 11: Haplótipos encontrados no segmento do gene ace-1 nas populações de *An. darlingi*

haplótipos	sequências	total
ace 1	ace1Ba2_01, ace1_Man07, ace1_Man14	3
ace 2	ace1Ba2_02, ace1Ba2_11, ace1_Col04, ace1_Col18, ace1_Col23, ace1_Col24, ace1_Pve14, ace1_Pve17	8
ace 3	ace1Ba2_03, ace1Ba1_02	2
ace 4	ace1Ba2_04, ace1Ba2_06, ace1_Man08	3
ace 5	ace1Ba2_05, ace1Ba2_08, ace1Ba2_16, ace1Ba2_17, ace1Ba2_20, ace1Ba2_22, ace1Ba2_23, ace1_Col09, ace1Ba1_01, ace1Ba1_07, ace1Ba1_08, ace1Ba1_09, ace1Ba1_11, ace1Ba1_12, ace1Ba1_14, ace1Ba1_15, ace1_Man01, ace1_Man03, ace1_Man10, ace1_Man13, ace1_Man15, ace1_Man17, ace1_Man18, ace1_Pve10, ace1_Pve06, ace1_Pve07, ace1_Pve15, ace1_Pve02	28
ace 6	ace1Ba2_07	1
ace 7	ace1Ba2_09, ace1Ba2_13, ace1Ba2_15, ace1Ba2_18, ace1_Man02, ace1_Man16	6
ace 8	ace1Ba2_10, ace1_Pve09	2
ace 9	ace1Ba2_12, ace1_Col02, ace1_Man06, ace1_Pve11	4
ace 10	ace1Ba2_14	1
ace 11	ace1Ba2_19, ace1_Col07	2
ace 12	ace1Ba2_21	1
ace 13	ace1Ba2_24	1
ace 14	ace1_Col01, ace1_Col05, ace1_Col08, ace1_Col11	4
ace 15	ace1_Col03, ace1_Col06, ace1_Col12, ace1_Col13, ace1_Col14, ace1_Col17, ace1_Col20, ace1_Pve16	8
ace 16	ace1_Col10	1
ace 17	ace1_Col15	1
ace 18	ace1_Col16	1
ace 19	ace1_Col19	1
ace 20	ace1_Col21	1
ace 21	ace1_Col22, ace1_Man12, ace1_Pve03	3
ace 22	ace1Ba1_03	1
ace 23	ace1Ba1_04, ace1Ba1_13	2
ace 24	ace1Ba1_05	1
ace 25	ace1Ba1_06	1
ace 26	ace1Ba1_10	1
ace 27	ace1Ba1_16	1
ace 28	ace1_Man04, ace1_Pve05	2
ace 29	ace1_Man05	1
ace 30	ace1_Man09	1
ace 31	ace1_Man11	1
ace 32	ace1_Pve01	1
ace 33	ace1_Pve08	1
ace 34	ace1_Pve12	1
ace 35	ace1_Pve13	1
ace 36	ace1_Pve04	1

5.2 EVIDÊNCIAS DE SELEÇÃO NATURAL?

O teste de seleção de Tajima (1989) foi aplicado na intenção de testar a neutralidade da variação nucleotídica. Na maioria das análises, não foram observados desvios significativos do modelo neutralista (Tabela 12). Unicamente para o fragmento *Nav*, os valores de *DT* resultaram estatisticamente significativos para as populações da Colômbia e de Porto Velho. Vale destacar que, no caso de Porto Velho, somente quando considerados aqueles dois haplótipos destoantes (veja item 5.1.3).

Tabela 12: Teste de Tajima (1989) para os quatro genes analisados

População	<i>DT per</i>	<i>p</i>	<i>DT tim</i>	<i>p</i>	<i>DT Nav</i>	<i>p</i>	<i>DT ace-1</i>	<i>p</i>
Barcelos 1	-0,31678	Ns	-0,51192	Ns	-1,47878	Ns	-1,36574	Ns
Barcelos 2	-0,64164	Ns	-0,49099	Ns	-1,72938	Ns	-0,34579	Ns
Manaus	0,77587	Ns	-0,90665	Ns	-0,8666	Ns	-1,03179	Ns
Porto Velho	0,09203	Ns	-0,07864	Ns	-1,93886 (-1,15524)	*(Ns)	-0,90988	Ns
Colômbia	-1,19557	Ns	-0,25899	Ns	-2,06525	***	0,31322	Ns

*Dt: estatística D de Tajima (1989); Ns: não significativo ($p > 0,05$); *: significativo ($p < 0,05$); ***: altamente significativo ($p < 0,001$); Entre parênteses valores na ausência dos haplótipos destoantes*

5.3. DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES PARA CADA GENE NUCLEAR

5.3.1 GENE *per*

Manaus e Porto Velho, apesar da distância geográfica, mostraram-se similares, como sugerido pelo F_{st} próximo de zero. Contudo, o par Barcelos 1 e Barcelos 2, regiões geograficamente mais próximas, apresentaram elevado valor de F_{st} , sugerindo diferenciação entre estas populações. Não houve diferença significativa entre Barcelos 1 com Manaus ou Porto Velho, porém Barcelos 2 foi diferenciado de ambas. Ou seja, Barcelos 2 mostrou-se a mais diferenciada entre as populações brasileiras para o gene *period*. Os valores de F_{st} e p podem ser vistos na Tabela 13.

Em todas as comparações envolvendo a população da Colômbia os valores de diferenciação genética foram elevados e significativos ($F_{st} = 0,2081 - 0,4751$; $p < 0,001$).

Tabela 13: Estimativas de diferenciação genética para o segmento do gene per em *Anopheles darlingi*

Populações	F_{st}	P	Ss	Sf	Sx	Sy
Ba1 x Ba2	0,1902	***	17	0	6	3
Ba1 x Man	0,0514	*	15	0	8	3
Ba1 x Pve	0,0323	Ns	17	0	6	3
Ba2 x Man	0,1878	***	14	0	6	4
Ba2 x Pve	0,1782	***	17	0	3	3
Man x Pve	0,0275	Ns	16	0	2	4
Col x Ba1	0,2200	***	10	0	13	11
Col x Ba2	0,4751	***	11	0	9	10
Col x Man	0,3188	***	9	0	12	9
Col x Pve	0,2081	***	11	0	10	9

F_{st} : índice de fixação entre pares de populações, com confiabilidade testada com 1000 permutações - ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; Ns: $p > 0,05$; Ss : número de sítios polimórficos compartilhados entre o par de populações; Sf : número de diferenças fixas entre as populações; Sx e Sy : número de sítios polimórficos exclusivos da população 1 e 2 respectivamente; Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Man: Manaus; Pve: Porto Velho; Col: Colômbia. A região sombreada da Tabela destaca as comparações com a população colombiana.

Não foram observados sítios polimórficos fixos para nenhuma das comparações realizadas. Ou seja, nenhum polimorfismo encontrado em *per* pôde ser associado a uma ou outra população. Considerável quantidade de sítios polimórficos compartilhados foi notada entre as populações brasileiras, comparativamente a Colômbia, que apresentou uma menor quantidade de sítios polimórficos. Os polimorfismos exclusivos foram muito variáveis, com valores entre 2 e 13, apresentando valores menores nas comparações entre as populações brasileiras, do que entre as brasileiras com a colombiana (Tabela 13). Em suma, o marcador *period* não diferencia as populações brasileiras entre si, mas sim estas da população colombiana.

5.3.2 GENE *tim*

As quatro populações brasileiras apresentaram índice de diferenciação genética próximos a zero. Comparadas à Colômbia, no entanto, todas mostraram F_{st} elevados e significativos (0,3473 – 0,3897; $p < 0,001$), como pode ser visto na Tabela 14.

Tabela 14: Estimativas de diferenciação genética para o segmento do gene *tim* em *Anopheles darlingi*

Populações	F_{st}	P	Ss	Sf	Sx	Sy
Ba1 x Ba2	0,0000	Ns	6	0	4	2
Ba1 x Man	0,0000	Ns	8	0	2	2
Ba1 x Pve	0,0000	Ns	7	0	3	1
Ba2 x Man	0,0000	Ns	6	0	2	4
Ba2 x Pve	0,0143	Ns	7	0	1	1
Man x Pve	0,0000	Ns	7	0	3	1
Col x Ba1	0,3478	***	4	0	6	14
Col x Ba2	0,3897	***	3	0	5	15
Col x Man	0,3743	***	4	0	14	6
Col x Pve	0,3540	***	3	0	15	5

F_{st} : índice de fixação entre pares de populações, com confiabilidade testada com 1000 permutações - ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; Ns: $p > 0,05$; Ss : número de sítios polimórficos compartilhados entre o par de populações; Sf : número de diferenças fixas entre as populações; Sx e Sy : número de sítios polimórficos exclusivos da população 1 e 2 respectivamente; Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Man: Manaus; Pve: Porto Velho; Col: Colômbia. A região sombreada da Tabela destaca as comparações com a população colombiana.

Também para o *tim*, não foram vistos sítios polimórficos fixos, com moderada quantidade de sítios polimórficos compartilhados, sobretudo nas comparações envolvendo a Colômbia. Os valores de polimorfismos exclusivos foram variáveis, sendo menores nas comparações entre as populações brasileiras, do que naquelas envolvendo a colombiana. Como vimos acontecer com o *per*, a Colômbia também se mostrou diferenciada das populações brasileiras em relação ao fragmento analisado do *tim*.

5.3.3. GENE *Nav*

As comparações entre as populações brasileiras não apresentaram diferenciação genética significativa para o fragmento do Na_V (F_{st} entre 0 e 0,0600;

$p > 0,05$). Nas comparações envolvendo a população da Colômbia os valores de diferenciação foram baixos, embora em três destas comparações os valores tenham sido significativos (Col versus Ba1, Man e Pve) (Tabela 15).

Tabela 15: Estimativas de diferenciação genética para segmento do gene Nav em populações de *Anopheles darlingi*

populações	F_{st}	P	Ss	Sf	Sx	Sy
Ba1 x Ba2	0,0317	Ns	0	0	4	3
Ba1 x Man	0,0000	Ns	1	0	3	1
Ba1 x Pve	0,0380(0,0236)	Ns(Ns)	0(1)	0(0)	4(3)	1(32)
Ba2 x Man	0,0506	Ns	0	0	3	2
Ba2 x Pve	0,0000(0,0318)	Ns(Ns)	0(0)	0(0)	3(3)	1(33)
Man x Pve	0,0600(0,0239)	Ns(Ns)	0(1)	0(0)	3(1)	1(32)
Col x Ba1	0,0357	**	0	0	4	6
Col x Ba2	0,0000	Ns	0	0	3	6
Col x Man	0,0582	*	0	0	6	2
Col x Pve	0,0316	*	1	0	5	32

F_{st}: índice de fixação entre pares de populações; A confiabilidade deste índice foi calculada testada com 1000 permutações; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; Ns: $p > 0,05$; Ss: número de sítios polimórficos compartilhados entre o par de populações; Sf: número de diferenças fixas entre as populações; Sx e Sy: número de sítios polimórficos exclusivos da população 1 e 2 respectivamente; Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Man: Manaus; Pve: Porto Velho; Col: Colômbia. Entre parênteses estão os valores referentes das estimativas utilizando as sequências destoantes. A região sombreada da Tabela destaca as comparações com a população colombiana.

Em quatro das comparações realizadas foi observado um único sítio polimórfico compartilhado entre pares de populações. Foi observada também a ausência de sítios com diferenças fixas. Em geral, os valores dos polimorfismos exclusivos foram baixos, exceto quando considerados os sítios polimórficos exclusivos da população de Porto Velho. Nesta amostra, notamos elevada quantidade de polimorfismos exclusivos, porém devido às variações daqueles dois haplótipos destoantes (Pve03 e Pve04).

5.3.4 GENE *ace-1*

Análise de diferenciação entre as populações utilizando-se fragmento do *ace-1* seguiu a tendência dos demais genes nucleares, revelando índices de diferenciação genética baixa e não significativos, no geral. Contudo, quando observamos Barcelos 1 e Porto Velho, que são as populações brasileiras mais

distantes geograficamente (aproximadamente 1.130 Km), notamos F_{st} moderado e significativo, como podemos observar na tabela 16.

Comparações entre as populações brasileiras e a colombiana revelaram valores de F_{st} significativos, e elevados na maioria dos casos.

Tabela 16: Estimativas de diferenciação genética para segmento do gene *ace-1* em populações de *Anopheles darlingi*

Populações	F_{st}	P	Ss	Sf	Sx	Sy
Ba1 x Ba2	0,0477	Ns	5	0	6	6
Ba1 x Man	0,0228	Ns	5	0	6	6
Ba1 x Pve	0,1642	***	3	0	8	8
Ba2 x Man	0,0000	Ns	9	0	2	2
Ba2 x Pve	0,0471	Ns	6	0	5	5
Man x Pve	0,0695	Ns	7	0	4	4
Col x Ba1	0,3308	***	3	0	8	5
Col x Ba2	0,2094	***	4	0	7	4
Col x Man	0,2556	***	5	0	3	6
Col x Pve	0,0543	*	5	0	3	6

F_{st} : índice de fixação entre pares de populações, com confiabilidade testada com 1000 permutações - ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; Ns: $p > 0,05$; Ss: número de sítios polimórficos compartilhados entre o par de populações; Sf: número de diferenças fixas entre as populações; Sx e Sy: número de sítios polimórficos exclusivos da população 1 e 2 respectivamente; Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Man: Manaus; Pve: Porto Velho; Col: Colômbia. A região sombreada da tabela destaca as comparações com a população colombiana.

Foi notada moderada quantidade de sítios polimórficos compartilhados entre todas as populações e nenhum sítio fixo, com polimorfismos exclusivos pouco variáveis entre as mesmas. De forma geral, a colombiana se mostrou diferenciada das populações brasileiras, como ocorreu com *per* e *tim*.

5.4. INFERÊNCIAS GENEALÓGICAS

5.4.1 GENE *per*

A Figura 17 mostra a árvore gênica construída mediante o método de máxima verossimilhança, com modelo de substituição nucleotídica GTR (*General Time Reversible*). A topologia da árvore não apresenta clara separação entre as sequências das populações brasileiras de *An. darlingi*. Já a distribuição

da maioria das sequências da Colômbia ficou agrupada em um dos extremos da árvore gênica.

5.4.2 GENE *tim*

A Figura 18 mostra a árvore gênica construída mediante o método de máxima verossimilhança com modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros. Como visto na árvore do *per*, as amostras da Colômbia se mostraram agrupadas em um lado extremo da árvore. As demais populações não apresentaram um padrão homogêneo na distribuição das sequências.

5.4.3 GENE *Na_v*

A Figura 19 mostra a árvore gênica construída mediante o método de máxima verossimilhança com modelo de substituição nucleotídica Hasegawa-Kishino-Yano (HKY). A maioria das sequências do *Na_v* formou um agrupamento que inclui sequências de todas as amostras exibindo um padrão que revela o baixo nível de variação do fragmento estudado, conforme esperado frente à baixa diversidade observada nas análises de divergência genética. Seis sequências, provenientes de Manaus e Barcelos 1, formaram um agrupamento secundário; e as duas sequências destoantes de Porto Velho, como esperado, localizaram-se separadas das restantes.

5.4.4 GENE *ace-1*

A Figura 20 mostra a árvore gênica construída mediante o método de máxima verossimilhança com modelo de substituição Tamura 3 parâmetros. A topologia da árvore nos faz notar a formação de dois grupos heterogêneos, sendo um deles representado pela maioria das sequências colombianas, ainda que tenham também algumas brasileiras. Um agrupamento similar foi observado nos genes *tim* e *per*. A distribuição das sequências brasileiras não mostra agrupamentos específicos.

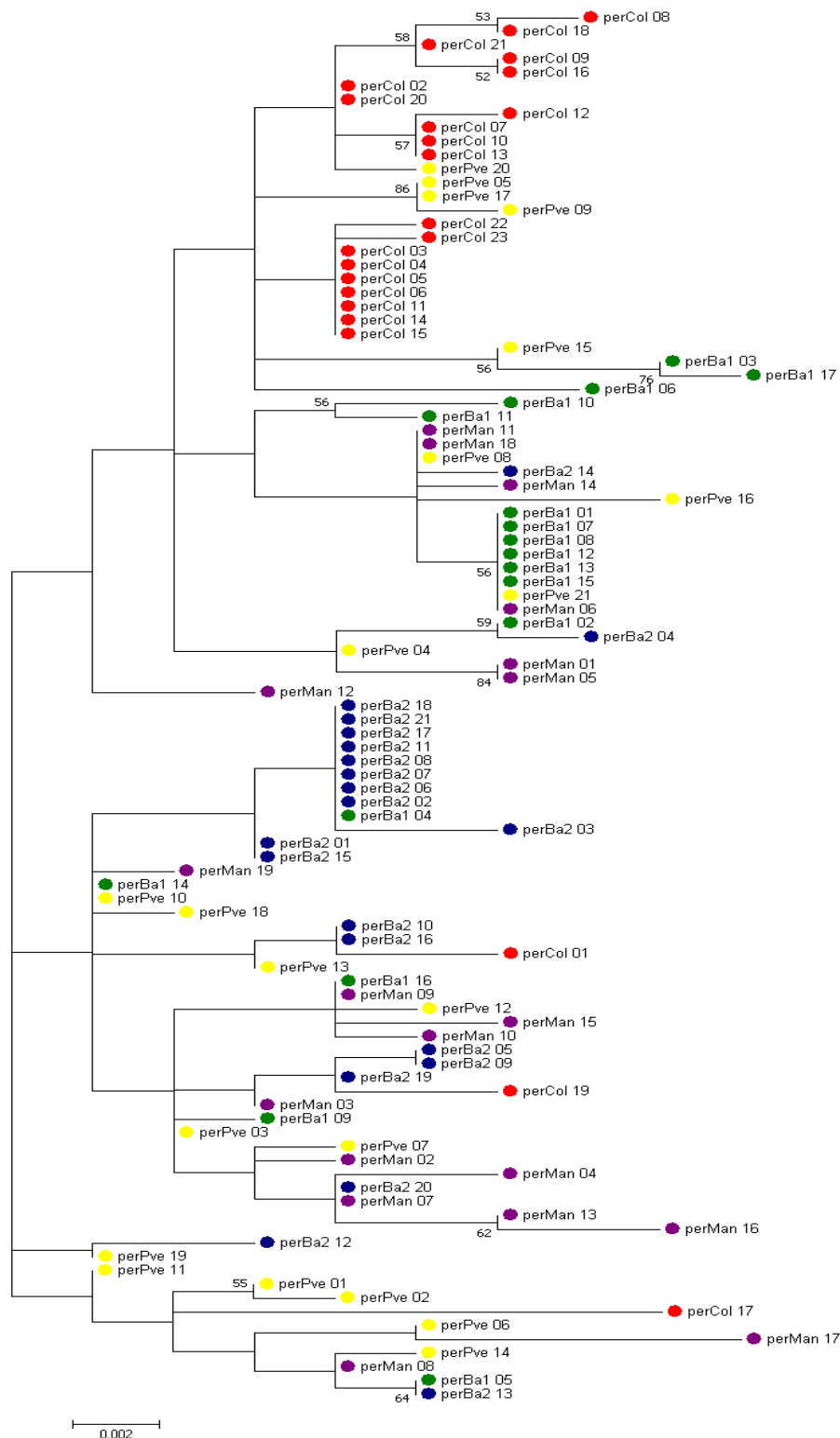


Figura 17: Árvore gênica de cinco populações de *Anopheles darlingi* para o *per*. Para a construção da árvore foi utilizado o método de máxima verossimilhança, com o modelo de substituição nucleotídica GTR (*General Time Reversible*). Os valores de *bootstrap* foram obtidos mediante 1000 permutações e apenas os valores acima de 50% são mostrados. Sequências verde: Barcelos 1; azul: Barcelos2; amarelo: Porto Velho; roxo: Manaus; vermelho: Colômbia.

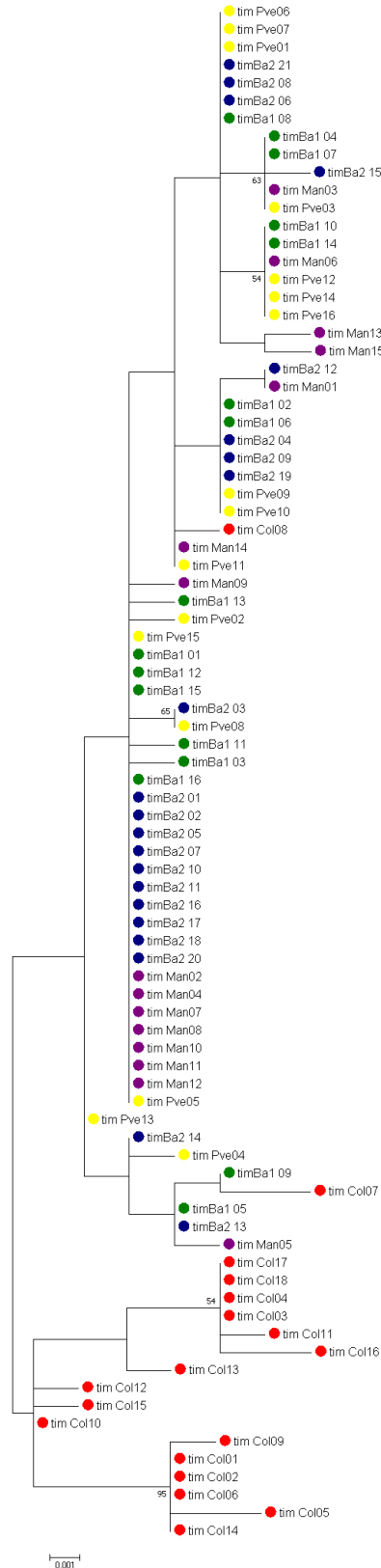


Figura 18: Árvore gênica de cinco populações de *Anopheles darlingi* para o *tim*. Para a construção da árvore foi utilizado o método de máxima verossimilhança, com o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros. Os valores de bootstrap foram obtidos mediante 1000 permutações e apenas os valores acima de 50% são mostrados. As sequências em verde: Barcelos; azul Barcelos 2; amarelo: Porto Velho; roxo: Manaus; vermelho: Colômbia

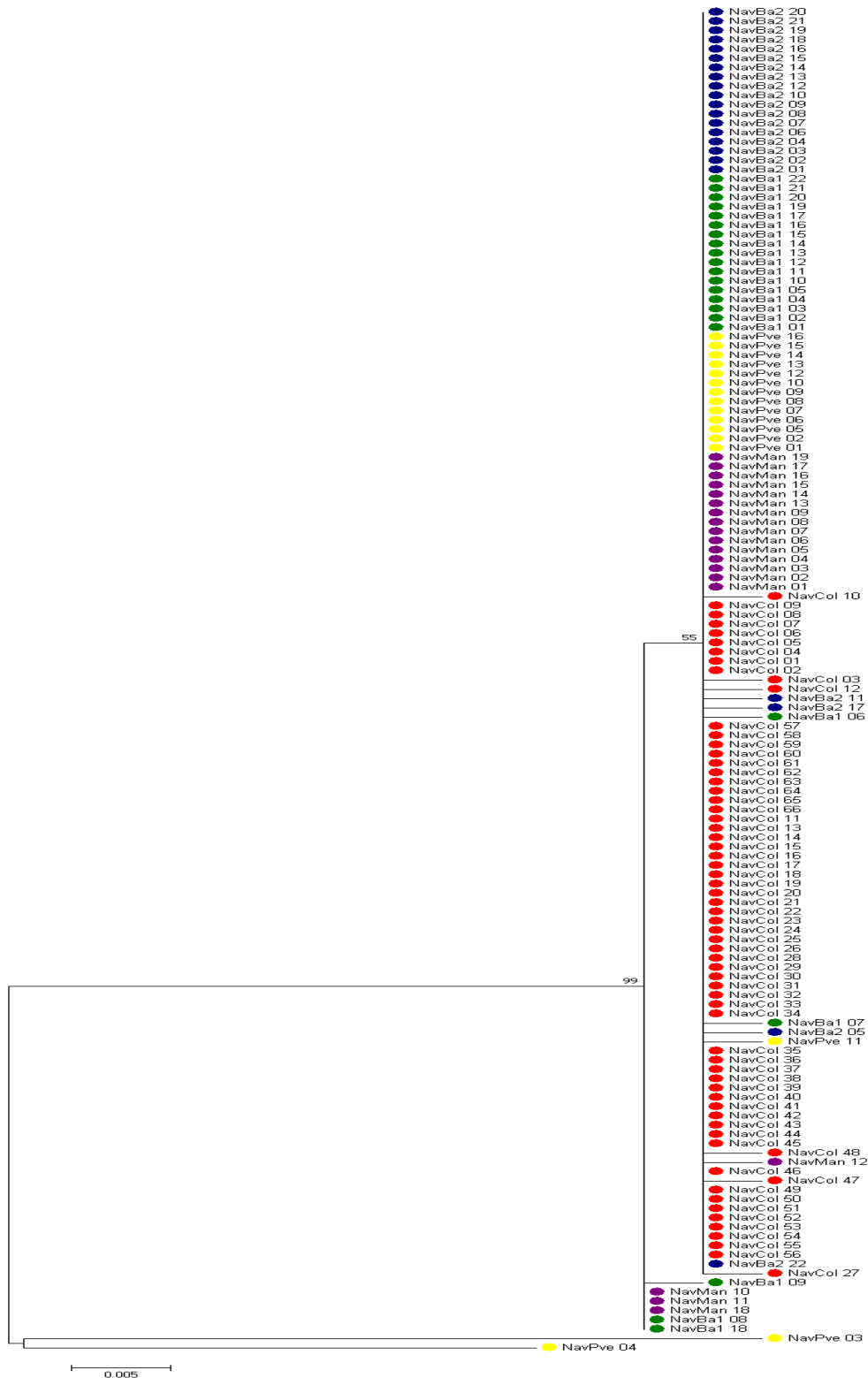


Figura 19: Árvore gênica de cinco populações de *Anopheles darlingi* para o *Nav*. Para a construção da árvore foi utilizado o método de máxima verossimilhança e o modelo de substituição nucleotídica HKY (*Hasegawa-Kishino-Yano*). Os valores de *bootstrap* foram obtidos mediante 1000 permutações e apenas os valores acima de 50% são mostrados. As sequências em verde: Barcelos 1; azul Barcelos 2; amarelo: Porto Velho; roxo: Manaus; vermelho: Colômbia.

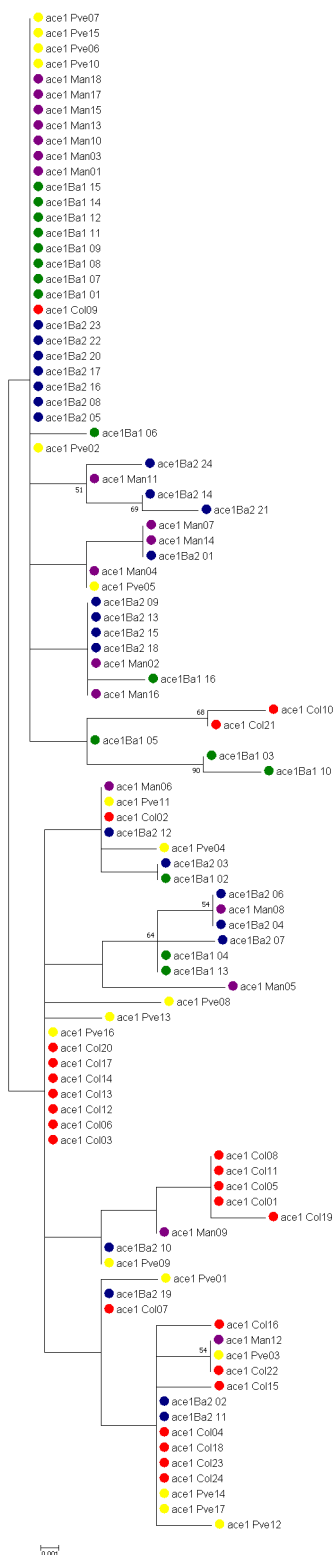


Figura 20: Árvore gênica de cinco populações de *Anopheles darlingi* para o *ace-1*. Para a construção da árvore foi utilizado o método de máxima verossimilhança e o modelo de substituição nucleotídica Tamura 3 parâmetros. Os valores de *bootstrap* foram obtidos mediante 1000 permutações e apenas os valores acima de 50% são mostrados. As sequências em verde: Barcelos 1, em azul correspondem a Barcelos 2, em amarelo: Porto Velho, em roxo: Manaus e em vermelho: Colômbia.

5.5. GENOTIPAGEM DO SÍTIO 1014 DO Na_V

Embora não tenhamos encontrado entre nossas sequências alguma variação no sítio 1014 do Na_V , onde ocorre a clássica mutação *kdr* L1014F, decidimos investir em uma ferramenta de genotipagem em larga escala para esta mutação, dada sua ocorrência em outras espécies. Para tanto, adaptamos uma técnica de PCR alelo-específica (AS-PCR) para genotipagem das possíveis variações L1014⁺ (TTA) e 1014F^{*kdr*} (TTT) em *An. darlingi*. Como controles positivos, foram sintetizadas por encomenda moléculas de DNA com a sequência da região IIS6 do Na_V com variação única correspondente aqueles alelos.

As reações foram feitas para cada indivíduo, onde o produto de amplificação da região IIS6 do Na_V foi diluído 200 vezes e então aplicado na AS-PCR. Os *amplicons* específicos para os alelos L1014⁺ e 1014F^{*kdr*} apresentaram 106 e 126 pb, respectivamente (Figura 21) e os controles positivos sintéticos apresentaram a configuração esperada. Ao todo foram testadas 589 amostras, provenientes das localidades Rio Unini e Rio Jaú, Estado do Amazonas, onde cerca de 97% foram amplificadas. Ao todo 6,3% das amostras foram diagnosticadas como heterozigotas para a mutação *kdr*, sendo o restante homozigoto selvagem (Tabela 17). A fim de nos certificarmos da especificidade do método, sequenciamos o produto IIS6 do Na_V dos 36 indivíduos tidos como heterozigotos. A análise das sequências, contudo, não corroborou com os resultados encontrados na genotipagem, indicando que o método apesar da alta sensibilidade (amplificou 97% das amostras) teve baixa especificidade (genotipou erroneamente 6% dos indivíduos).

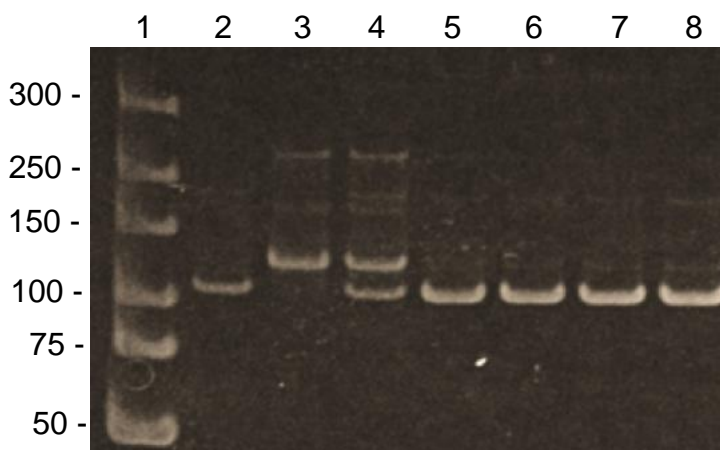


Figura 21: Exemplo de uma fotografia de gel de eletroforese com produtos de AS-PCR para a variação L1014F do Na_v de *Anopheles darlingi*. Gel de poliacrilamida 10%, onde estão representados o marcador de peso molecular DNA Ladder O'GeneRuler DNA Ladder, Ultra Low Range/Fermentas, 150 ng (1), os controles positivos 1014 L/L (2), F/F (3) e L/F (4), cujos alelos L1014⁺ e 1014F^{kd}r correspondem a aproximadamente 106 e 126 pb, respectivamente. Nos poços 5 – 8 estão representadas amostras, todas homocigotas para o alelo selvagem.

Tabela 17: Genotipagem do sítio 1014 para a variação L1014F em *Anopheles darlingi* do Rio Unini e Rio Jaú, Estado do Amazonas.

	N	LL	FF	LF	ind
Rio Unini	515	468	0	32	15
Rio Jaú	74	69	0	4	1
total	589	537	0	36	16

N corresponde ao número de amostras; *LL*, *FF* e *LF*: quantidade de indivíduos para os respectivos genótipos; *ind.*: genotipagem indeterminada.

6. DISCUSSÃO

As estratégias previstas pela Organização Mundial de Saúde para a eliminação da malária entre os anos de 2016 e 2030 foram decididas na assembleia “*Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030*” e resultaram nos quatro seguintes objetivos: reduzir a incidência dos casos em no mínimo 90%, reduzir a mortalidade em no mínimo 90%, eliminar a malária em pelo menos 35 países e prevenir o reestabelecimento da doença em todos os países hoje considerados livres de malária (WHO, 2016b). Apesar dessas metas propostas, no ano de 2016, a Organização Mundial de Saúde Pan Americana anunciou o proeminente aumento de número de casos de malária nas Américas (PAHO, 2017). Desde então, o Brasil tem acompanhado um repentino aumento no número de casos, em especial na região Amazônica. Dados do ano de 2017 revelaram aumento na prevalência da doença de 48% quando comparado com o ano de 2016. Além do Brasil, países como Equador, México, Colômbia, El Salvador, Guiana, Haiti, Honduras, Nicarágua, Panamá e República Bolivariana da Venezuela tem registrado aumento do número de casos, tornando-se motivo de grande preocupação (PAHO, 2018).

Frente ao súbito aumento dos números de casos, há a urgente necessidade de controle da doença. Sabe-se que uma importante estratégia de combate é feita através do controle do vetor. Um importante registro de eliminação de vetor de plasmódios que causa malária no Brasil foi o controle do *Anopheles gambiae*, um vetor Africano que provavelmente chegou ao Brasil através de um navio vindo de Senegal e aportou no litoral nordestino na década de 1930. Após a sua chegada foi registrada aumento dos casos de malária na região. Sua eliminação foi feita principalmente através do uso de inseticidas neurotóxicos (Ferreira & Castro, 2016). Entretanto, para o sucesso da estratégia com uso de inseticidas é importante conhecer a ecologia e o comportamento do vetor, uma vez que os níveis de resistência podem variar dentro da mesma espécie, como vemos acontecer em *Anopheles gambiae*. Devido à diversidade ecológica em que o principal vetor brasileiro, o *Anopheles darlingi*, habita e às variações comportamentais que têm sido observadas nesta espécie tem-se o grande desafio de adotar uma abordagem que atenda estas diferenças.

A discussão acerca da hipótese do *An. darlingi* não se tratar de uma única espécie ainda é muito controversa. Apesar de alguns estudos apresentarem diferenças comportamentais, morfológicas, bioquímicas e genéticas, ainda não há consenso a respeito do tema (Rosa-Freitas et al., 1992; Manguin et al., 1999; Mirabello & Conn 2006; González et al., 2007; Scarpassa & Conn 2007; Pedro & Salum 2009; Motoki et al., 2012; Ângela et al., 2014; Emerson et al., 2015; Lainhart et al., 2015; Rosero et al., 2017).

Neste estudo foi possível observar que os marcadores nucleares utilizados, *per*, *tim* e *ace-1*, se comportaram de forma similar no que diz respeito a diversidade dos polimorfismos. Os três genes apresentaram níveis relativamente baixos de diversidade nucleotídica (0,00257-0,01171) para todas as populações brasileiras estudadas e também a da Colômbia. Nossos resultados corroboram outros estudos utilizando o *per* em *An. gambiae* s.l., onde também se observou baixa diversidade nucleotídica (Π 0,0031). Os autores sugerem que por se tratar de um gene relacionado à seleção sexual em alguns insetos, *per* seria usualmente mais conservado (Morlais et al., 2004). Trabalho feito com *Lutzomyia umbratilis*, também utilizando mesmo gene encontrou índices de diversidade nucleotídica próximos aos encontrados nesse estudo (Souza Freitas et al., 2016).

Alguns autores relatam repetições de aminoácidos Thr-Gly com diferença na quantidade desses dipeptídeos no gene *per* da *Drosophila melanogaster*. Estas repetições estão relacionadas com o controle da termoestabilidade e frequência de dois alelos: *per*Thr-Gly₁₇ e *per*Thr-Gly₂₀, que varia dependendo da localização geográfica. Acredita-se que o alelo *Thr-Gly*₂₀ seja mais adaptado a ambientes frios e de alta latitude, enquanto que o alelo *Thr-Gly*₁₇ a ambientes mais quentes como a Região Mediterrânea. Na Europa foi observado que a frequência do alelo *Thr-Gly*₂₀ aumenta, enquanto que o *Thr-Gly*₁₇ diminui formando um *cline* (Costa et al., 1992; Kyriacou et al., 2007). Em nosso trabalho notamos repetições de sequências 'CAT' *in tandem*, que são traduzidas em 12 repetições do aminoácido histidina, presentes em todos os haplótipos. Além disso, dentro desta região poli-H, encontramos a substituição de uma histidina por glutamina no sítio 140, no haplótipo *per*₃₄ da Colômbia, além da substituição

por uma asparagina no sítio 143 do haplótipo *per63* de Manaus. Não foram observadas diferenças relacionadas à variação na quantidade destes aminoácidos entre as populações, como foi visto pelos autores acima mencionados, em *Drosophila*. As amostras utilizadas neste trabalho são próximas geograficamente e, portanto, não esperávamos observar *cline* como ocorre com a *Drosophila*. Outras amostras deverão ser estudadas para correlacionar ou não a presença da repetição com a latitudes das populações de *An. darlingi*.

Em relação à estruturação genética, a análise utilizando o gene *per* sugere diferenciação entre as populações de Barcelos 1 e Barcelos 2, sendo Barcelos 2 a mais diferenciada entre as populações brasileiras. Ambas as amostras são originárias do mesmo município do estado do Amazonas, entretanto, tratam-se locais próximos a dois rios diferentes. Isto a princípio dificultaria o encontro dos indivíduos de ambas as “populações”, conforme a hipótese dos rios proposta por Wallace (1854), a qual sugere que os rios amazônicos possam atuar como barreiras, separando as populações e aumentando a diferenciação genética entre elas. O gene *ace-1* também revelou estruturação genética entre as populações brasileiras de Barcelos 1 e Porto Velho, evidenciado pelo moderado F_{st} estimado, e ainda indicou que Porto Velho é mais próxima da Colômbia do que das populações do estado do Amazonas.

Quanto ao gene *tim*, em trabalho realizado por Bottino (2007) com populações de *An. darlingi* de Macapá, visando explorar variações em espécimes capturados em dois ambientes, no intra e peridomicílio, também se observou níveis de diversidade nucleotídica próximos aos nossos resultados, variando entre 0,00343 e 0,00389. Outro estudo utilizando este mesmo gene em populações simpátricas de *Anopheles triannulatus* do Centro Oeste brasileiro, observou perfil de diversidade semelhante ao nosso. Os autores confirmaram o *status* do complexo *Triannulatus*, com base na análise molecular dos genes *tim* e *cpr* (*citocromo P450 redutase*), com a existência de pelo menos 3 espécies: *An. triannulatus* s.s., *An. halophylus* e *An. triannulatus* C. As análises com o gene *tim* separaram parcialmente duas dessas espécies, mostrando distância genética que diferenciou as espécies *An. halophylus* s/ *An. triannulatus* C de *An.*

triannulatus s.s. (Silva-do-Nascimento et al., 2011). Rona e colaboradores (2009) utilizando o gene *tim* para estudar a diversidade genética de populações brasileiras de anofelinos de outro subgênero, *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, principal transmissor da malária humana e simiana na Mata Atlântica, separou dois grupos distintos, um ocorrendo no nordeste e outro no sul e sudeste. Em nosso estudo, os dados obtidos do gene *tim* não sugerem separação das populações brasileiras de *An. darlingi*. Em geral, os nossos dados indicam que as populações brasileiras de *An. darlingi* da região Amazônica são homogêneas geneticamente, no entanto existem indícios de estruturação que deverão ser explorados em maior medida, incluindo por exemplo populações brasileiras afastadas geograficamente e provenientes de ecorregiões diferentes as estudadas aqui.

O gene *Nav* foi o marcador que apresentou os menores valores de diversidade nucleotídica (Π , 0,00042 – 0,00173) em nossas análises. Em *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, o *Nav* também apresentou este mesmo perfil nucleotídico (Lins et al., 2012). A baixa diversidade encontrada pode ser explicada por se tratar de um gene pouco permissivo a mutações de forma a não perder sua função fisiológica (Ffrench-Constant et al., 1998). Diferentemente do *per* e *tim*, os genes *Nav* e *ace-1* da Colômbia apresentaram sequências haplotípicas idênticas as encontradas nas populações brasileiras, sugerindo a presença de fluxo gênico ou ainda a manutenção de polimorfismos ancestrais. Na população de Porto Velho foram ainda encontrados dois haplótipos do *Nav* que ocorreram uma única vez com alta diversidade polimórfica. A origem destas duas sequências tão destoantes poderia ser explicada por migração de alelos vindos de outro grupo já estruturado geneticamente, uma vez que esse gene é conservado e o alto número de polimorfismos encontrados no íntron não alteraria sua função biológica.

Djogbénou e colaboradores (2008), utilizando o *ace-1* em *An. gambiae* s.l., encontraram diversidade nucleotídica similares aquelas de nosso estudo para esse gene, com valor médio de 0,00634, assim como Weill e colaboradores (2007), trabalhando com populações de *Culex pipiens*,

verificaram baixos valores de diversidade ($H' 0,0024$), levemente inferior ao observado nas populações de *An. darlingi* do nosso estudo.

As duplicações gênicas encontradas em outras espécies de *Anopheles* no gene *ace-1*, podem contribuir para o aumento da diversidade gênica, uma vez que este pode ser fruto de mais de um gene no mesmo indivíduo. No entanto, sugere-se que a seleção para o surgimento e manutenção dessas duplicações nos gêneros *Culex* e *Anopheles* devem estar relacionadas ao uso de inseticidas organofosforados. O alelo mutante *ace-1R* (G119S), apesar de conferir resistência a organofosforados, acarreta um alto custo no *fitness* do inseto (Djogbénu et al., 2008). Desta forma, com a continuidade da pressão, as populações foram selecionadas mantendo uma cópia do alelo mutante e outra selvagem, amenizando assim o efeito deletério no *fitness* (Djogbénu et al., 2009). Contudo, tal hipótese de duplicações do *ace-1*, sustentada pela pressão de seleção com organofosforado, talvez não seja aplicada em nosso trabalho, uma vez que se tem notícia de resistência a estes compostos em populações neotropicais de anofelinos (Liebman et al., 2015).

Até o presente momento não foram detectadas mutações *kdr* em *An. darlingi*. A mesma mutação clássica L1014F, observada em pelo menos 13 espécies do gênero *Anopheles*, somente foram registradas nas espécies neotropicais *Anopheles albitalarsis* s.s. do sul do Brasil (Braga 2017), e em *Anopheles albimanus* na América do Norte e Central (Lol et al., 2013). Do mesmo modo, não foram encontradas mutações classicamente relacionadas à resistência a organofosforados, como a G119S no gene *ace-1*, em *An. darlingi*, mas em *An albimanus* da América Central (Alout et al., 2008; Liebman et al., 2015).

O fato de tais mutações não terem sido observadas em *An. darlingi*, mas ser comum em populações de outras espécies sob pressão com inseticidas pode também refletir a incipiente pesquisa neste sentido para a espécie. No caso da mutação *kdr*, por exemplo, devido ao seu caráter recessivo para a resistência, é importante que o alelo mutante seja detectado ainda em baixa frequência para que se possa intervir de forma eficiente. Isso porque uma vez que o alelo mutante atinge uma dada frequência, conhecida como *tipping-point*, ela tende a

umentar de forma exponencial na presença do inseticida. Portanto, mesmo que não tenhamos encontrado alguma mutação *kdr* entre nossas sequências do *Nav*, lançamos mão de um ensaio diagnóstico para genotipagem individual em larga escala, a fim de que pudéssemos detectar o alelo *kdr* mais comum, caso esteja presente em baixa frequência em alguma população. Aqui a AS-PCR para a possível substituição L1014F em *An. darlingi* apresentou uma especificidade de 94%, que pode ser melhorada com ensaios mais precisos como TaqMan qPCR. Uma fragilidade destes métodos é que eles são insensíveis a outras possíveis mutações, distintas da L1014F. Nesta mesma linha, genotipagem por qPCR HRM (*high resolution melting*) pode ajudar a identificar outras mutações sem a necessidade de sequenciamento.

Para além dos trabalhos feitos no âmbito das mutações no sítio alvo de ligação dos inseticidas e resistência metabólica, outros processos pouco explorados podem estar envolvidos, como é o caso do estudo de Dada e colaboradores (2018) que compara a microbiota de *An. albimanus* resistentes e susceptíveis ao organofosforado fenitrothion. Neste trabalho, os autores notaram a maior presença de bactérias que degradam este composto em indivíduos resistentes, sugerindo a participação da microbiota na resistência a inseticidas.

As comparações par-a-par envolvendo a amostra da Colômbia e as populações brasileiras, assim como a distribuição dos alelos nas árvores gênicas, sugerem a existência de estruturação genética entre estes dois grupos. Os dados dos genes *per*, *tim* e *ace-1* são coincidentes em indicar estes agrupamentos. Em estudo anterior, utilizando o gene mitocondrial *COI* como marcador molecular, Mirabello e Conn (2006) obtiveram estimativas de F_{st} em comparações entre populações brasileiras e colombianas de *An. darlingi* que mostrou valores acima de 0,4905, indicando considerável distância genética entre elas. Esta diferença pode ser justificada pela distância geográfica entre as populações do Brasil e a da Colômbia, podendo influenciar na ausência de fluxo gênico entre elas. É possível que esta espécie esteja passando por um processo de especiação incipiente como observado em trabalhos anteriores (Mirabello e Conn, 2006; Mirabello et al., 2008; Ângela et al., 2014; Emerson et al., 2015; Rosero et al., 2017).

Quanto ao teste de neutralidade da variação nucleotídica, somente as populações de Porto Velho e Colômbia apresentaram valores negativos e significativos de Dt para o gene Na_V . Estas populações estariam sobre pressão de seleção purificadora ou ainda estes resultados são consistentes com expansão populacional.

Dada a diversidade morfológica, comportamental e genética em *An. darlingi* que tem sido relatada na literatura, somada a diferenciação genética aqui encontrada entre as populações brasileiras e colombianas, podemos apoiar a hipótese de que o *An. darlingi* seja um complexo de espécies. Entender a dinâmica de relações entre espécies crípticas é de grande importância epidemiológica, uma vez que estas podem ter capacidade vetorial diferentes e responder de forma distinta a estratégias de controle (WHO, 2010).

O uso de inseticidas neurotóxicos nos últimos 18 anos tem funcionado como principal estratégia de controle principalmente com a implementação dos mosquiteiros impregnados, o que teria sido ator principal na contribuição de redução de milhões de números de casos de malária na África (Bhatt et al. 2015). No entanto, o surgimento de resistência por pressão de inseticida dos próprios mosquiteiros está ameaçando a estratégia (Toé et al, 2014). É importante, portanto haver um manejo da resistência e estudos voltados para as características genéticas das populações de vetores, para que esta estratégia não seja perdida.

7. CONCLUSÃO

- φ Os genes *per*, *tim* e *ace-1* revelaram distância genética entre a população de *An. darlingi* da Colômbia e as populações brasileiras, indicando que estas populações são diferentes. Nossos dados apoiam a hipótese do *An. darlingi* ser um complexo de espécie;
- φ O gene *Nav* mostrou-se o mais conservado em todas as cinco populações analisadas;
- φ Não foram encontradas mutações classicamente associadas à resistência a piretroides no *Nav* e a organofosforados e carbamatos no *ace-1*, nas populações estudadas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida F, Suesdek L, Motoki MT, Bergo ES, Sallum MAM. Morphometric comparisons of the scanning electron micrographs of the eggs of *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.* 2014;139:115–122.
- Alout H, Djogbénu L, Berticat C, Chandre F, Weill M. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp Biochem Physiol.* 2008;150:271–277.
- Angêlla AF, Salgueiro P, Gil LHS, Vicente JL, Pinto J, Ribolla PEM. Seasonal genetic partitioning in the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Malar J.* 2014;13(203):10.
- Aragão MB, Santos Do Amaral R, Lima MM. Aplicação Especial de Inseticidas em Saúde Pública. *Cad Saude Publica.* 1988;2(4):147–166.
- Araki AS, Vogoder FM, Bauzer LGSR, Ferreira GEM, Souza NA, Araújo IB, Hamilton JGC, Brazil RP, Peixoto AA. Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae). *Plos Negl.* 2009;3(1):12.
- Araújo RA, Williamson MS, Bass C, Field LM, Duce IR. Pyrethroid resistance in *Sitophilus zeamais* is associated with a mutation (T929I) in the voltage-gated sodium channel. *Insect Mol Biol.* 2011;20(4):437–445.
- Bargiello TA, Young MW. Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984;81:2142-2146.
- Bargiello TA, Saez L, Baylies MK, Gasic G, Young MW, Spray DC. The *Drosophila* clock gene *per* affects intercellular junctional communication. *Nature.* 1987;328:686-691.
- Beheregaray LB, Caccone A. Cryptic biodiversity in a changing world. *J Biol.* 2007;6(9):5.
- Belinato TA, Martins AJ. Insecticide Resistance and Fitness Cost. In: *Insecticides Resistance.* 2016. p. 20.
- Bhatt S, Weiss DJ, Cameron E, Bisanzio D, Mappin B, Dalrymple U, Battle K, Moyes CL, Henry A, Eckhoff PA, Wenger EA, Briët O, Penny MA, Smith TA, Bennett A, Yukich J, Eisele TP, Griffin JT, Fergus CA, Lynch M, Lindgren F, Cohen JM, Murray CLJ, Smith DL, Hay SI, Cibulskis RE, Gething PW. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature,* 2015;526(7572):207-211.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol.* 2007;22(3):148–155.
- Black IV WC, Lanzaro GC. Distribution of genetic variation among

chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s.: Introgressive hybridization, adaptive inversions, or recent reproductive isolation? *Insect Mol Biol.* 2001;10(1):3–7.

Blast Ncbi. Disponível em: <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/> Acessado em: 21 nov 2017

Blast Vector Base. Disponível em: <https://www.vectorbase.org/blast> Acessado em: 21 nov 2017

Bottino RC. Genética de populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae), utilizando o gene *timeless* como marcador molecular. Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] - Instituto Oswaldo Cruz; 2007.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol e Serviços Saúde.* 2007;16(4):279–293.

Braga TA. Estudo do perfil de resistência a inseticidas e seus mecanismos em *Anopheles albitarsis* s.s. Arribáizaga, 1878 e *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 mantidos em laboratório e capturados no campo e *Anopheles albitarsis* s.s. capturados no campo. Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz; 2017.

CDC. Indoor Residual Spraying. 2017a. Disponível em: https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/irs.html

CDC. Malaria Parasites. 2017b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>

Charlwood JD, Hayes J. Variações geográficas no ciclo de picada do *Anopheles darlingi* Root no Brasil. *Acta Amaz.* 1978;8(4):601–3.

Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Torre A Della, Coulibaly MB, Besansky NJ. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa.* 2013;3:246–274.

Coleman M, Hemingway J, Gleave KA, Wiebe A, Gething PW, Moyes CL. Developing global maps of insecticide resistance risk to improve vector control. *Malar J.* 2017;16(86):9.

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):1–9.

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

Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, diDeco MA, Petrarca V. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science.* 2002; 298(5597):1415-1418.

Conn JE, Vineis JH, Bollback JP, Onyabe DY, Wilkerson RC, Póvoa MM.

Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern amazonian Brazil. *Am.J. Trop. Hyg.* 2006;74(5):798-806.

Consoli RAG., Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz. 1994. 228 p.

Costa R, Peixoto AA, Barbujani G, Kyriacou CP. A Latitudinal Cline in a *Drosophila* Clock Gene. *Proc R Soc B Biol Sci.* 1992;250:43–49.

Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors.* 2010;3(5):9.

Coyne JA. Genetics and speciation. *Nature.* 1992;355:511–515.

Dada N, Sheth M, Liebman K, Pinto J, Lenhart A. Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors. *Sci Rep.* 2018;8(2084):1–13.

David J-P, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJ. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2013;368(1612):12.

De Amoretty PR, Padilha KP, De Freitas RT, Vieira Bruno R. Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. *Acta Sci Tech.* 2013;1(1):12.

Deane LM, Vernin CS, Damasceno RG. Avaliação das preferências alimentares das fêmeas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis* em Belém, Pará, por meio de Provas de precipitina. *Rev do Serviço Espec Saúde Púb.* 1949;2(3):793–808.

Deane LM. A cronologia da descoberta dos transmissores da malária na Amazônia Brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro.* 1989;84(4):149–156.

Della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-yovo J, Favia G, Petrarca V, Coluzzi M. Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol.* 2001;10(1):9–18.

De Rezende Dias G, Fujii TTS, Fogel BF, Lourenço-de-Oliveira R, Silva-do-Nascimento TF, Pitaluga Na, Carvalho-Pinto CJ, Carvalho AB, Peixoto AA, Rona LDP. Cryptic diversity in the Atlantic Forest malaria vector from the mountains of South-East Brazil. *Parasit Vectors.* 2018,11(1):36.

Diabaté A, Thierry B, Chandre C, Roch DK, Pierre K, Robert GT, Frederic S, Pierre G, Janet H, Marc HJ. *KDR* Mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of west Africa. *Mol Bio/Gen.* 2003;40(2):195-198.

Diabaté A, Brengues C, Baldet T, Dabiré KR, Hougard JM, Akogbeto M, Kengne P, Simard F, Guillet P, Hemingway J, Chandre F. The spread of the Leu-Phe *kdr* mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Heal*. 2004;9(12):1267–1273.

Diabaté A, Dao A, Yaro AS, Adamou A, Gonzalez R, Manoukis NC, Traoré SF, Gwadz RW, Lehmann T. Spatial swarm segregation and reproductive isolation between the molecular forms of *Anopheles gambiae*. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2009;276(1676):4215–4222.

Djogbénou L, Chandre F, Berthomieu A, Dabiré R, Koffi A, Alout H, Weill M. Evidence of introgression of the ace-1R mutation and of the ace-1 duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. *PLoS One*. 2008;3(5):7.

Djogbénou L, Labbé P, Chandre F, Pasteur N, Weill M. Ace-1 duplication in *Anopheles gambiae*: A challenge for malaria control. *Malar J*. 2009;8(70):6.

Dos Santos VMR, Donnici CL, DaCosta JBN, Caixeiro JMR. Compostos organofosforados pentavalentes: Histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quim Nova*. 2007;30(1):159–170.

Dye C. Vectorial Capacity: Must we measure all its components? *Parasitol*. 1986;2(8)203-209.

Edi AVC, N'Dri BP, Chouaibou M, Kouadio FB, Pignatelli P, Raso G, Weetman D, Bonfoh B. First detection of N1575Y mutation in pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* in Southern Côte d'Ivoire. *Wellcome Open Res*. 2017;2(71):10.

Emerson KJ, Conn JE, Bergo ES, Randel MA, Sallum MAM. Brazilian *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) clusters by major biogeographical region. *PLoS One*. 2015;10(7):1–15.

Fajardo Ramos M, Gonzalez Obando R, Fidel Suarez M, Lopez D, Wilkerson R, Sallum MAM. Morphological analysis of three populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2008;103(1):85-92.

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

Feng X, Yang C, Yang Y, Li J, Lin K, Li Mei, Qiu X. Distribution and frequency of G119S mutation in *ace-1* gene within *Anopheles sinensis* populations from Guangxi, China. *Malar Journ*, 2015;14(470):5.

Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016;15(284):1–18.

Filatov DA. Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*. 2009;25(23):3189–3190.

Fišer C, Robinson CT, Malard F. Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Mol Ecol*. 2018;27(3):1–23.

Flores-Mendoza C, Peyton EL, Wilkerson RC, Lourenço-de-Oliveira R. *Anopheles*(*Nyssorhynchus*) *konderi*Galvão & Damasceno: neotype designation and resurrection from synonymy with *Anopheles*(*Nyssorhynchus*) *oswaldoi*(Peryassú) (Diptera: Culicidae). *Proc Entomol Soc*, 2004 106: 118-132.

French-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *R Soc*. 1998;353(1376):1685–1693.

Fonseca-González I, Quiñones ML, McAllister J, Brogdon WG. Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):18-26.

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

Forattini OP. *Culicidologia Médica*. Vol. 2. Editora da Universidade de São Paulo – EDUSP, 2002.

Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect*. 1990;87:245–254.

Galardo AKR, Povoá MM, Sucupira IMC, Galardo CD, dos Santos RLC. *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) susceptibility to pyrethroids in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):765–769.

Garrett-Jones C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull World Health Organ*. 1964;30(2):241–261.

Giraldo-Calderón GI, Emrich SJ, MacCallum RM, Maslen G, Dialynas E, Topalis P, Ho N, Gesing S, Consortium V, Madey G, Collins F, Lawson D. VectorBase: An updated Bioinformatics Resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Res*. 2014;43:D707–D713.

Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *J Exp Biol*. 2002;205:575–584.

González R, Wilkerson R, Suárez MF, García F, Gallego G, Cárdenas H, Posso CE, Duque MC. A population genetics study of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from Colombia based on random amplified polymorphic

DNA-polymerase chain reaction and amplified fragment length polymorphism markers. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(3):255–262.

Gutiérrez LA, Gómez GF, González JJ, Castro MI, Luckhart S, Conn JE, Correa MM. Microgeographic genetic variation of the malaria vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2010;83(1):38–47.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 1999;41:95–98.

Hardin PE. Molecular genetic analysis of circadian time keeping in *Drosophila*. Adv Genet. 2011;74:141–173.

Hartl DL, Clark AG. Princípios de Genética de Populações. 4º ed. Artmed. Porto Alegre; 2010:298p.

Hayes J, Charlwood DC. O *Anopheles darlingi* evita o DDT numa área de malária resistente a drogas. Acta Amazônica. 1977;7(2):289.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol. 2004;34(7):653–665.

Hiwat H, Mitro S, Samjawan A, Sardjoe P, Soekhoe T, Takken W. Collapse of *Anopheles darlingi* populations in Suriname after introduction of Insecticide-Treated Nets (ITNs); malaria down to near elimination level. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(4):649–655.

Holstein M. Cytogenetics of *Anopheles gambiae*. Bulletin of the World Health Organization. 1957;16(2):456-458.

Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>
Acessado em: 21 nov 2017.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 2012;28(12):1647–1649.

Klemz C, Cristina Da Silva De Assis H. Efeitos do endossulfano na atividade da acetilcolinesterase de Cascudo (*Ancistrus multispinnis*, Fish, Teleostei). Rev Acad. 2005;3(4):51–58.

Knox TB, Juma EO, Ochomo EO, Pates Jamet H, Ndungo L, Chege P, Bayoh NM, Guesson RN, Christian RN, Hunt RH, Coetzee M. An online tool for mapping insecticide resistance in major *Anopheles* vectors of human malaria parasites and review of resistance status for the Afrotropical region. Par and Vec. 2014;7(76):1–14. Disponível em: www.irmapper.com

Konopka RJ, Benzer S. Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc

Nat Acad Sci. 1971;68(9):2112–2116.

Kreutzer R, Kitzmiller J, Ferreira E. Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi* Root. Mosq News. 1972;32(4):555-565.

Kreutzer R, Kitzmiller J, Rabbani A. Cytogenetically distinguishable sympatric and allopatric populations of the mosquito *Anopheles albiparvus*. Acta Amaz. 1976;6(4):473–481.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016;33(7):1870–1874.

Kyriacou CP, Peixoto AA, Sandrelli F, Costa R, Tauber E. Clines in clock genes: fine-tuning circadian rhythms to the environment. Trends Genet. 2007;24(3):124–132.

Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. Mol. Biol. Evol. 2007;24(4):1056-1067.

Lainhart W, Bickersmith SA, Nadler KJ, Moreno M, Saavedra MP, Chu VM, Ribolla PE, Vinetz JM, Conn JE. Evidence for temporal population replacement and the signature of ecological adaptation in a major Neotropical malaria vector in Amazonian Peru. Malar J. 2015;14(375):17.

Lane J. Neotropical Culicidae, 1953. Universidade de São Paulo, v. 1, 548p.

Lanzaro GC, Tripet F. Gene flow among populations of *Anopheles gambiae*: a critical review. In: Ecological Aspects for Application of Genet Mod Mosq. 2004.24p.

Laporta GZ, Linton Y-M, Wilkerson RC, Bergo ES, Nagaki SS, Sant'Ana DC, Sallum MAM. Malaria vectors in South America: current and future scenarios. Parasit Vectors. 2015;8(426):1–13.

Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009;25(11):1451–1452.

Liebman KA, Pinto J, Valle J, Palomino M, Vizcaino L, Brogdon W, Lenhart A. Novel mutations on the ace-1 gene of the malaria vector *Anopheles albimanus* provide evidence for balancing selection in an area of high insecticide resistance in Peru. Malar J. 2015;14(74):10.

Lins RMMA, Souza NA, Brazil RP, Maingon RDC, Peixoto AA. Fixed Differences in the paralytic Gene Define Two Lineages within the *Lutzomyia longipalpis* Complex Producing Different Types of Courtship Songs. PLoS One. 2012;7(9):1–8.

Lins RMMA, Peixoto AA. Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the *paralytic* gene, a locus

associated with insecticide resistance and lovesong production. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2008;103(7):736-740.

Lol JC, Castellanos ME, Liebman KA, Lenhart A, Pennington PM, Padilla NR. Molecular evidence for historical presence of *knock-down resistance* in *Anopheles albimanus*, a key malaria vector in Latin America. Parasit and Vectors. 2013;6(268):7.

Macoris M., Martins AJ, Andrighetti MTM, Lima JB., Valle D. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(3):1–18.

Malafrente RS, Marrelli MT, Marinotti O. Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1999;36(5):631–634.

Manguin S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio-Palis Y,. Populations 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. 1999;60(3):364-376.

Marinotti O, Cerqueira GC, De Almeida LGP, Ferro MIT, Da Silva Loreto EL, Zaha A, et al. The Genome of *Anopheles darlingi*, the main neotropical malaria vector. Nucleic Acids Res. 2013;41(15):7387–7400.

Martins J, Solomon SE, Mikheyev AS, Mueller UG, Ortiz A, Bacci M. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: Evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). Insect Mol Biol. 2007;16(6):777–784.

Martins AJ, Valle D. The Pyrethroid *Knockdown Resistance*. In: Insecticides – Basic and Other Applications. InTech; 2012. 17-38.

MAP. Malária Atlas Project. 2018. Disponível em: <https://map.ox.ac.uk/>

Mazzoni CJ, Souza NA, Andrade-Coelho C, Kyriacou CP, Peixoto AA. Molecular polymorphism, differentiation and introgression in the period gene between *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani*. BMC Evol Biol. 2006;6(85):1–11.

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

Mirabello L, Vineis JH, Yanoviak SP, Scarpassa VM, Póvoa MM, Padilla N, Achee NL, Conn JE. Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. BMC Ecol. 2008;8(3):15.

Mitri C, Markianos K, Guelbeogo WM, Bischoff E, Gneme A, Eiglmeier K, Holm I, Sagnon N, Vernick KD, Riehle MM. The *kdr*-bearing haplotype and

susceptibility to *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*: genetic correlation and functional testing. *Malar J.* 2015;14(391):11.

Mori A, Lobo NF, DeBruyn B, Severson DW. Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (*Ace1*) from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2007;37(7):667–674.

Morlais I, Poncon N, Simard F, Cohuet A, Fontenille D. Intraspecific nucleotide variant in *Anopheles gambiae*: new insights into biology of malaria vectors. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(6):795–802.

Motoki MT, Dos Santos, CLS, Sallum MAM. Intraespecific variation of the aedeagus of *Anopheles oswaldoi* (Peryassú) (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol.* 2009;38(1):144-148.

Motoki M, Bourke B, Bergo E, Silva A, Sallum MAM. Systematic notes of *Anopheles konderi* and its first record in Parana State, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc* 2011;27(3):191-200.

Motoki MT, Suesdek L, Bergo ES, Sallum MAM. Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1246–1252.

Moutinho PR, Gil LHS, Cruz RB, Ribolla PEM. Population dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. *Malar J.* 2011;10(174):13.

Myers M, Wager-Smith K, Wesley C, Young M, Sehgal A. Positional Cloning and Sequence Analysis of the *Drosophila* Clock Gene, *timeless*. *Science.* 1995;270:805–808.

National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acessado em: 16 nov 2017

Newstead R, Wolferst H, Thomas A. The mosquitos of the Amazon Region. *Ann Trop Med Parasitol.* 1910;4(1):141–150.

Nielsen CM, Vekemans J, Lievens M, Kester KE, Regules JA, Ockenhouse CF. RTS,S malaria vaccine efficacy and immunogenicity during *Plasmodium falciparum* challenge is associated with HLA genotype. *Vaccine.* 2018;36(12):1637–1642.

PAHO. Organização Pan Americana da Saúde. Epidemiological Alert Increase in cases of malaria. *Epidemiological alert.* 2017. p. 6.

PAHO. Malária principais fatos. 2018. Disponível em: [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5287:\(2\)malaria-2&Itemid=875](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5287:(2)malaria-2&Itemid=875). Acessado em: 10 mar 2018

Pedro PM, Sallum MAM. Spatial expansion and population structure of the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *Phylogeography a Neotrop Malar Vector.* 2009;97:854–866.

- Peixoto AA, Costa R, Kyriacou CP. A cline in the *Drosophila melanogaster* *period* gene in Australia: neither down nor under. *J Evolution Biol.* 2007; 20:1649-1651.
- Pinto J, Lynd A, Elissa N, Donnelly MJ, Costa C, Gentile G, Caccone A, Rosário VE. Co-occurrence of East and West African *kdr* mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Med Vet Entomol.* 2006;20(1):27–32.
- Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008;25(7):1253–1256.
- Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, Rosbash M. Molecular analysis of the *period* locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell.* 1984;38(3):701-710.
- Rosa-Freitas MG, Broomfield G, Priestman A, Milligan PJ, Momen An David Molyneux, Hooman H. Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J Am Mosq Control Assoc.* 1992;8(4):357–366.
- Rosa-Freitas MG, Lourenço-de-Oliveira R, Pinto CJ, Flores-Mendoza CF, 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.
- Rosero CY, Jaramillo GI, Gonzalez R, Cardenas H. Genetic Differentiation of Colombian Populations of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae). *Neotrop Entomol.* 2017;46(5):487–498.
- Root F.M. Studies on brazilian mosquitoes. I. The Anophelines of the *Nyssorhynchus* group. *Am J Hyg.* 1926;6(5):684–717.
- Rivas GBS. Genética molecular dos ritmos circadianos em insetos vetores. *Rev da Biol.* 2012;9(3):19–25.
- Rona LD, Carvalho-Pinto CJ, Gentile C, Grisard EC, Peixoto AA. Assessing the molecular divergence between *Anopheles (Kerteszia) cruzii* populations from Brazil using the *timeless* gene: Further evidence of a species complex. *Malar J.* 2009;8(60):10.
- Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Ponsonby DJ, Herrera M, Sallum MAM, Velez ID, Quiñonez ML, Flores-Mendoza C, Chadee DD, Alarcon J, Alarcon-Ormasa J, Linton Y. Systematics of the Oswaldoi Complex (*Anopheles, Nyssorhynchus*) in South America. *Parasit Vect,* 2013;6(324):13.
- Rund SSC, O'Donnell AJ, Gentile JE, Reece SE. Daily rhythms in mosquitoes and their consequences for malaria transmission. *Insects.* 2016;7(14):20.
- Rutila JE, Zeng H, Le M, Curtin KD, Hall JC, Rosbash M. The *tim^{sl}* Mutant of the *Drosophila* Rhythm Gene *timeless* Manifests Allele-Specific

Interactions with period Gene Mutants. *Neuron*. 1996;17(5):979–90.

Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Flores AE, Garcia-Luna S, Reyes-Solis G, Ranson H, Hemingway J, Black WC. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. *Insect Mol Biol*. 2014;23(2):199–215.

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

Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3, 2001.

Sánchez-Ribas J, Oliveira-Ferreira J, Gimnig JE, Pereira-Ribeiro C, Santos-Neves MSA, Silva-do-Nascimento TF. Environmental variables associated with Anopheline larvae distribution and abundance in Yanomami villages within unaltered areas of the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors*, 2017;10(571):15.

Santacoloma L, Tibaduiza T, Gutiérrez M, Brochero H. Sensibilidad de *Anopheles darlingi* Root 1840 a insecticidas, en dos localidades de los departamentos de Santander y Caquetá, Colombia. *Biomédica*. 2012;12(32):22–28.

Santos JMM, Tadeu WP, Contel EPB. Electrophoretic analysis of 11 enzymes in natural populations of *Anopheles (N.) darlingi* Root, 1926 (Diptera:Culicidae) in the Amazon Region. *Acta Amaz*. 1996;26(1/2):97–114.

Santos J, Santos F, Macêdo V. Variation of *Anopheles* density with deltamethrin-impregnated mosquito nets in an endemic malaria area of the Brazilian Amazon. *Cad Saúde Pública*. 1999;15(2):281–292.

Saraiva JF, Picanço Souto RN, Scarpassa VM. Molecular taxonomy and evolutionary relationships in the *Oswaldoi-Konderi* complex (Anophelinae: *Anopheles: Nyssorhynchus*) from the Brazilian Amazon region. *PLoS One*. 2018;13(3):1–28.

Sawadogo SP, Costantini C, Pennetier C, Diabaté A, Gibson G, Dabiré RK. Differences in time of mating swarms in sympatric populations of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s. (formely *An. gambiae* M and S molecular forms) in Burkina Faso, West Africa. *Parasit Vectors*. 2013;6(275):14.

Sawyer LA, Sandrelli F, Pasetto C, Peixoto AA, Rosato E, Costa R, Kyriacou CP. The *period* gene Thr-Gly polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* populations: Implications for selection. *Genetics*. 2006;174(1):465–480.

Scarpassa VM, Conn JE. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(3):319–

327.

Schreiber G, Guedes AS. Cytological aspects of the taxonomy of *Anophelines* (subgenus *Nyssorhynchus*). Bulletin of the World Health Organization. 1961.

Sehgal A. Molecular genetic analysis of circadian rhythms in vertebrates and invertebrates. Curr Opin Neurobiol. 1995;5(6):824–831.

Shannon RCL. Anophelines of the Amazon Valley. Entomological Soc Washingt. 1933;35(7):117–143.

Shetty NJ, Hariprasad TPN, Sanil D, Zin T. Chromosomal inversions among insecticide-resistant strains of *Anopheles stephensi* Liston, a malaria mosquito. Parasitol Res. 2013;112:3851–3857.

Silva A, Tadei W, Santos J. Variabilidade genética em populações de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) e relação ao comportamento da atividade de picar, analisada por RAPD. Acta Amaz. 2010;4(3):585–590.

Silva APB da. Variabilidade do domínio IIS6 do gene do canal de sódio, associada à resistência aos inseticidas piretróides, em populações de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* da Amazônia brasileira. Tese [Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva] - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; 2014a.

Silva APB, Alves WS, Martins AJ, Tadei WP, Santos JMM. Adaptação de um Bioensaio Simplificado para Avaliação do Status de Susceptibilidade em Larvas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* ao Piretroide Deltametrina. Soc Entomológica do Bras. 2014b;9(4):1–8.

Silva APB, Santos JMM, Martins AJ. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids - A review. Parasit Vectors. 2014c;7(450):14.

Silva-do-Nascimento TF, 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* sensu lato in Central Brazil. Jour of Med Ent, 2006;43:455-459.

Silva-do-Nascimento T, Pitaluga L, Peixoto A, Lourenço-de-Oliveira R. Molecular divergence in the the *timeless* and *cpr* genes among three sympatric cryptic species of the *Anopheles triannulatus* complex. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro. 2011;106(1):218–222.

Singh OP, Dykes CL, Das MK, Pradhan S, Bhatt RM, Agrawal OP, Adak T. Presence of two alternative *kdr*-like mutations, L1014F and L1014S, and a novel mutation, V1010L, in the voltage gated Na⁺ channel of *Anopheles culicifacies* from Orissa, India. Malar J. 2010;9(146):6.

Souza Freitas MT, Ríos-Velasquez CM, Silva LG, Lima Costa CR, Marcelino A, Leal-Balbino TC, Balbino VQ, Pessoa FAC. Phenotypic and

genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. *Parasit Vectors* 2015;8(448):10.

Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Parakrama Karunaratne SHP, Hemingway J, Black WC, Ranson H. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008;38(1):113–123

Suarez MF, Quiniones ML, Palacios JD, Carrillo EA. First record of DDT resistance in *Anopheles darlingi*. *J Am Mosq Control Assoc*. 1990;6(1):72–74.

SVS. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Minist da Saú. 46. 2015. p. 5.

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

Tauber E, Roe H, Costa R, Hennessy M, Kyriacou CP. Temporal mating isolation driven by a behavioral gene in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2003;13:140-145.

Tauil P, Deane L, Sabroza P, Ribeiro C. A malária no Brasil. *Cad Saude Publica*. 1985;1(1):74–111.

Toé KH, Jones CM, N'Fale S, Ismail HM, Dabiré RK, Ranson H. Increased Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors and Decreased Bed Net Effectiveness, Burkina Faso. *Emerg. Infec. Disea*, 2014;20(10):1691-1696.

Vieira Bruno R, Nunes de Lima-Camara T, Afranio Peixoto A. Ritmos Biológicos em Insetos Vetores e seu Controle Molecular. In: Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. 2012. p. 21.

Wallace AR. On the Monkeys of the Amazon. *J Nat Hist Ser* 2. 1854;14(84):451–454.

Wang J, Chuang K, Ahluwalia M, Patel S, Umblas N, Mirel D, Higuchi R, Germer S. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with T_m-shift primers. *BioTechniques*.2005,39(6):885-893.

Weetman D, Mitchell SN, Wilding CS, Birks DP, Yawson AE, Essandoh J, Mawejje HD, Dejobenou LS, Steen K, Rippon EJ, Clarkson CS, Field SG, Rigden DJ, Donnelly MJ. Contemporary evolution of resistance at the major insecticide target site gene *Ace-1* by mutation and copy number variation in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Mol Ecol*. 2015;24(11):2656–2672.

Weill M, Chandre F, Brengues C, Manguin S, Akogbeto M, Pasteur N, Guillet P, Raymond M. The *kdr* mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Mol Biol*. 2000;9(5):451–455.

WHO. The technical basis for coordinated action against insecticide resistance: preserving the effectiveness of modern malaria vector control Meeting report. Glob Malar Program. Gêneva; 2011;36.

WHO. Global Malaria Program. Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. 2012.

WHO. Preserving pyrethroids. Bulletin of the World Health Organization. 2014. p. 158–159.

WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Glob Malar Program. 2016a;48.

WHO. Eliminating Malaria. Global Malaria Program Gêneva; 2016b. p. 1–26.

WHO. World Malaria Report 2017. World Health Organization. Gêneva; 2017a; 196.

WHO. Preserving phyrethroids. 2017b. Disponível em: <http://www.who.int/bulletin/volumes/92/3/14-020314/en/>

WHO. Q&A on the Global plan for insecticide resistance management in malaria vectors. 2018. Disponível em: http://www.who.int/malaria/media/insecticide_resistance_management_qa/en/

WHOPES. WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. 2015.

WHOPES. WHO recommended insecticide products for treatment of mosquito nets for malaria vector control. 2016.

Williamson MS, MartinezTorres D, Hick CA, Devonshire AL. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. Molecular & General Genetics. 1996; 252:51-60.

Yu Q, Kyriacou CP, Hall JC, Rosbash M. Behavioural modification by in vitro mutagenesis of a variable region within the period gene of *Drosophila*. Nature. 1987; 326:765-769.

Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: An urgent need. Trends Parasitol. 2002;18(4):161–163.

Zhou D, Xu Y, Zhang C, Hu M-X, Huang Y, Sun Y, Ma L, Shen B, Zhu C. ASGDB: a specialised genomic resource for interpreting *Anopheles sinensis* insecticide resistance. Parasit Vectors. 2018;11(32):1–11.

9 ANEXOS

Period - nucleotídeos

	E2	I	E3		E2	I	E3
	--[---]-----				--[---]-----		
	1111111111222333333333334444455				1111111111222333333333334444455		
	15667922236689991453445566777994799903				15667922236689991453445566777994799903		
	807698004906910297607292946369695536965				807698004906910297607292946369695536965		
	TGgggtcCGCGGACAGTAGCGAACGTAGCGATTTCGG				TGgggtcCGCGGACAGTAGCGAACGTAGCGATTTCGG		
perBa1_01	Ct	C.A.C.....G.A.A.....	perBa1_01	c	A.C.....G.AC.A.....
perBa1_02	C	a.....tC.A...T..G.AC.....C.....	perPve_19C.A.....G.A..A.....
perBa1_03	CTT.....G.AC..A.....C.....	perPve_20C.....A.G.AC..A.....C.....
perBa1_04C.....C.T.....G.ACCGA.....	perPve_21C.....A.G.AC..A.....C.....
perBa1_05C.....C.A...T..G.....A.....C.....	perMan_01C.....C.A..C.....
perBa1_06C.....A.....G.AC..A.....C.....	perMan_02C.....G.AC.AAT..C.....
perBa1_07C.....A.....G.AC..A.....C.....	perMan_03C.....G.AC..A.....C.....
perBa1_08C.....A.....G.AC..A.....C.....	perMan_04C.....GG.A..GA.....C.....
perBa1_09C.....A.....G.AC..A.....C.....	perMan_05C.....C.A..C.....
perBa1_10C.....G.....T.....G.A.....C.....	perMan_06C.....G.AC.GA.....C.....
perBa1_11C.....G.A.....C.....	perMan_07C.....T.....G.ACCGA.....
perBa1_12C.....G.A.....C.....	perMan_08C.....A.G.AC..A.....C.....
perBa1_13C.....G.A.....C.....	perMan_09C.....C.....A.G.AC..A.....C.....
perBa1_14C.....G.AC..A.....C.....	perMan_10C.....A.G.AC..A.....C.....
perBa1_15C.....G.AC..A.....C.....	perMan_11C.....A.G.AC..A.....C.....
perBa1_16C.....C.....A.G.AC..A.....C.....	perMan_12C.....C.T.....A..A.....
perBa1_17C.....t.....C.A...T..G.AC.....C.....	perMan_13C.....C.T.....GG.AC.GA.....C.....
perBa2_01C.....T.....G.AC..A.....C.....	perMan_14C.....C.....A.G.AC..A.....C.....
perBa2_02CT.....T.....G.AC..A.....C.....	perMan_15C.....a.....t.....C.....A.G.AC..A.....C.....
perBa2_03CT.....T.....G.AC..A.....C.....	perMan_16C.....T.....GG.AC.GA.....C.....A.....
perBa2_04C.....t.C.A.C.....G.AC..A.....C.....	perMan_17C.....a.....t.....G.ACCGA.....
perBa2_05C.....G.....G.AC..A.A..C.....	perMan_18C.....G.ACCGA.....
perBa2_06CT.....T.....G.AC..A.....C.....	perMan_19C.....A.G.AC..A.....C.....
perBa2_07CT.....T.....G.AC..A.....C.....				
perBa2_08CT.....T.....G.AC..A.....C.....				
perBa2_09C.....G.AC..A.A..C.....				
perBa2_10C.....A.....G.ACCGA.....				
perBa2_11CT.....T.....G.AC..A.....C.....				
perBa2_12C.....A.C.....G.AC..A.....A.....				
perBa2_13C.....C.....C.T.....G.ACCGA.....				
perBa2_14CT.....T.....G.AC..A.....C.....				
perBa2_15C.....T.....G.AC..A.....C.....				
perBa2_16C.....A.....G.ACCGA.....				
perBa2_17CT.....T.....G.AC..A.....C.....				
perBa2_18CT.....T.....G.AC..A.....C.....				
perBa2_19G.AC..A.A..C.....				
perBa2_20C.....G.G.AC.GA.....C.....				
perBa2_21CT.....T.....G.AC..A.....C.....				
perCol_01C.....a.....C.A.....G.ACCGA.....				
perCol_02C.....a.....C.A.....G.A.....				
perCol_03C.....a.....C.A.....G.A.....C.....				
perCol_04C.....a.....C.A.....G.A.....				
perCol_05C.....a.....C.A.....G.A.....				
perCol_06C.....a.....C.A.....G.A.....				
perCol_07C.....C.....C.A.....G.A.....				
perCol_08C.....CAA.....ATA.....C.....				
perCol_09C.....C.A.....ATA.....				
perCol_10C.....C.....C.A.....G.A.....				
perCol_11C.....a.....C.A.....G.A.....C.....				
perCol_12C.....C.....C.A.A.....G.A.....C.....				
perCol_13C.....C.....C.A.....G.A.....				
perCol_14C.....a.....C.A.....G.A.....				
perCol_15C.....a.....C.A.....G.A.....				
perCol_16C.....C.A.....ATA.....				
perCol_17C.....aa.....C.....T.....G.AC..A.AG.....				
perCol_18C.....CAA.....GTA.....				
perCol_19C.....A.....C.....G.AC..A.A..C.....				
perCol_20C.....C.A.....G.A.....				
perCol_21C.....C.A.....GTA.....				
perCol_22C.....a.....C.A.....G.A.....C.....				
perCol_23C.....a.....C.A.....G.A.....A.....				
perPve_01C.....C.....C.T.....G.ACAAA.....				
perPve_02C.....C.....C.T.....G.AC.AA.....C.....				
perPve_03C.....G.AC..A.....C.....				

Anexo 1: alinhamento dos nucleotídeos das sequências das cinco populações para o gene *per* em *An. darlingi*. Em preto e letras maiúsculas estão representados os éxons. Em azul e letras minúsculas os íntrons. Os números acima das letras da primeira sequência referem-se a posição do sítio polimórfico no gene. Os pontos representam a identidade com a primeira sequência. E: éxon. I: íntron. Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Col: Colômbia; Pve: Porto Velho; Man: Manaus.

Period – proteínas

	E2	E3		E2	E3
	---	-----		---	-----
		1111			1111
		11358990044			11358990044
	34	58979577814		34	58979577814
perBa1_01	LD	TTGGGRVSSH	perBa1_01	LD	TTGGGRVSSH
perBa1_02	S.	perPve_21
perBa1_03	S.A.....	perMan_01	S.
perBa1_04	SYA.....	perMan_02	S.AL...
perBa1_05A.....	perMan_03A.....
perBa1_06	S.	perMan_04
perBa1_07	perMan_05	S.
perBa1_08	perMan_06
perBa1_09	S.A.....	perMan_07	S.A.....
perBa1_10	S.	perMan_08A.....
perBa1_11	perMan_09	S.E.A.....
perBa1_12	perMan_10E.A.....
perBa1_13	perMan_11	S.
perBa1_14	S.A.....	perMan_12	S.
perBa1_15	perMan_13	S.A.....
perBa1_16	S.E.A.....	perMan_14	S.
perBa1_17	S.A.....	perMan_15	S.E.A.....
perBa2_01	S.A.....	perMan_16A...N
perBa2_02	SYA.....	perMan_17	S.A.....
perBa2_03	SYA.....	perMan_18	S.
perBa2_04	S.A.....	perMan_19	S.E.A.....
perBa2_05	S.A.N..			
perBa2_06	SYA.....			
perBa2_07	SYA.....			
perBa2_08	SYA.....			
perBa2_09	S.A.N..			
perBa2_10	S.A.....			
perBa2_11	SYA.....			
perBa2_12A.....			
perBa2_13A.....			
perBa2_14	SY			
perBa2_15	S.A.....			
perBa2_16	S.A.....			
perBa2_17	SYA.....			
perBa2_18	SYA.....			
perBa2_19A.N..			
perBa2_20	S.A.....			
perBa2_21	SYA.....			
perCol_01	S.A.....			
perCol_02			
perCol_03	S.			
perCol_04	S.			
perCol_05	S.			
perCol_06	S.			
perCol_07			
perCol_08E...C.....			
perCol_09C.....			
perCol_10			
perCol_11	S.			
perCol_12D.....			
perCol_13			
perCol_14	S.			
perCol_15	S.			
perCol_16C.....			
perCol_17	S.A.N..			
perCol_18E...C.....			
perCol_19	..	K...A.N..			
perCol_20			
perCol_21C.....			
perCol_22			
perCol_23	S.Q.....			
perPve_01A.....			
perPve_02A.....			
perPve_03	S.A.....			
perPve_04	S.			
perPve_05	S.N..			

Anexo 2: alinhamento dos aminoácidos das sequências das cinco populações para o gene *per* em *An. darlingi*. Os números acima das letras da primeira sequência referem-se a posição do sítio polimórfico no gene. Os pontos representam a identidade com a primeira sequência. E: éxon. Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Col: Colômbia; Pve: Porto Velho; Man: Manaus.

Timeless - nucleotídeos

	E3	I	E4	I		E3	I	E4	I				
	-----					-----							
	11111	2222	34444	45555	56677		11111	2222	34444	45555	56677		
	23682	25681	34581	45514	55996	702		23682	25681	34581	45514	55996	702
	97453	74550	71091	13040	94938	9963		97453	74550	71091	13040	94938	9963
timBa1_01	AGGTAGGG	tgccc	Tccgct	ccggagggg		timBa1_01	AGGTAGGG	tgccc	Tccgct	ccggagggg			
timBa1_02	G.....	C.....		tim_Pve09	G.....	C.....			
timBa1_03	.A.....		tim_Pve10	G.....	C.....			
timBa1_04	Gg.....	a.....		tim_Pve11	G.....	C.....			
timBa1_05	..AC.....	g.....		tim_Pve12	t.Gg.....			
timBa1_06	G.....	C.....		tim_Pve13	...C.....			
timBa1_07	Gg.....	a.....		tim_Pve14	t.Gg.....			
timBa1_08	Gg.....		tim_Pve15			
timBa1_09	..AC.....	Gg.....		tim_Pve16	t.Gg.....			
timBa1_10	t.Gg.....									
timBa1_11	t.....									
timBa1_12									
timBa1_13	a.....									
timBa1_14	t.Gg.....									
timBa1_15									
timBa1_16									
timBa2_01									
timBa2_02									
timBa2_03	A.....									
timBa2_04	G.....	C.....									
timBa2_05									
timBa2_06	Gg.....									
timBa2_07									
timBa2_08	Gg.....									
timBa2_09	G.....	C.....									
timBa2_10									
timBa2_11									
timBa2_12	Gg.....	C.....									
timBa2_13	..AC.....	g.....									
timBa2_14	..AC.....									
timBa2_15	Gg.....	C.....	a.....									
timBa2_16									
timBa2_17									
timBa2_18									
timBa2_19	G.....	C.....									
timBa2_20									
timBa2_21	Gg.....									
tim_Col01	...C.....	at.G.t.....	C.....									
tim_Col02	...C.....	at.G.t.....	C.....									
tim_Col03	...C.....	G...t.g....	a.....									
tim_Col04	...C.....	G...t.g....	a.....									
tim_Col05	...C.....	at.tG.t.....	C.a.....									
tim_Col06	...C.....	at.G.t.....	C.....									
tim_Col07	..AC.....	t.Gg.t.....									
tim_Col08	A.....	G.....									
tim_Col09	...C.....	at.G.t.....	t.c.....									
tim_Col10	...C.....	G.....	C.....									
tim_Col11	..AC.....	G...t.g....	a.....									
tim_Col12	...CG.....	G.....	C.....									
tim_Col13	...C...A.....	G...t.g....	C.....									
tim_Col14	...C.....	at.G.t.....	C.....									
tim_Col15	...C.....	G.....	a.....	C.....									
tim_Col16	G..C.....	Gg.t.g....	a.....									
tim_Col17	...C.....	G...t.g....	a.....									
tim_Col18	...C.....	G...t.g....	a.....									
tim_Man01	Gg.....	C.....									
tim_Man02									
tim_Man03	Gg.....	a.....									
tim_Man04									
tim_Man05	..AC.....	g.....	g.....									
tim_Man06	t.Gg.....									
tim_Man07									
tim_Man08									

Anexo 3: alinhamento dos nucleotídeos das sequências das cinco populações para o gene *tim* em *An. darlingi*. Em preto e letras maiúsculas estão representados os éxons. Em azul e letras minúsculas os íntrons. Os números acima das letras da primeira sequência referem-se a posição do sítio polimórfico no gene. Os pontos representam a identidade com a primeira sequência. E: éxon. I: íntron. Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Col: Colômbia; Pve: Porto Velho; Man: Manaus.

Timeless - proteínas

```

E3
---
145
015
timBa1_01 TGG
timBa1_02 ...
timBa1_03 ...
timBa1_04 ...
timBa1_05 ...
timBa1_06 ...
timBa1_07 ...
timBa1_08 ...
timBa1_09 ...
timBa1_10 ...
timBa1_11 ...
timBa1_12 ...
timBa1_13 ...
timBa1_14 ...
timBa1_15 ...
timBa1_16 ...
timBa2_01 ...
timBa2_02 ...
timBa2_03 ...
timBa2_04 ...
timBa2_05 ...
timBa2_06 ...
timBa2_07 ...
timBa2_08 ...
timBa2_09 ...
timBa2_10 ...
timBa2_11 ...
timBa2_12 ...
timBa2_13 ...
timBa2_14 ...
timBa2_15 ...
timBa2_16 ...
timBa2_17 ...
timBa2_18 ...
timBa2_19 ...
timBa2_20 ...
timBa2_21 ...
tim_Col01 ...
tim_Col02 ...
tim_Col03 ...
tim_Col04 ...
tim_Col05 ...
tim_Col06 ...
tim_Col07 ...
tim_Col08 ...
tim_Col09 ...
tim_Col10 ...
tim_Col11 ...
tim_Col12 .R.
tim_Col13 ..D
tim_Col14 ...
tim_Col15 ...
tim_Col16 A..
tim_Col17 ...
tim_Col18 ...
tim_Man01 ...
tim_Man02 ...
tim_Man03 ...
tim_Man04 ...
tim_Man05 ...
tim_Man06 ...
tim_Man07 ...
tim_Man08 ...
tim_Man09 ...
tim_Man10 ...
tim_Man11 ...
tim_Man12 ...
tim_Man13 ...
tim_Man14 ...
tim_Man15 ...
tim_Pve01 ...
tim_Pve02 ...
    
```

Anexo 4: alinhamento dos aminoácidos das sequências das cinco populações para o gene *tim* em *An. darlingi*. Os números acima das letras da primeira sequência referem-se a posição do sítio polimórfico no gene. Os pontos representam a identidade com a primeira sequência. E: éxon. Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Col: Colômbia; Pve: Porto Velho; Man: Manaus.

Nav - nucleotídeos

	E20	I	E21		E20	I	E21
	-----				-----		
			11112222223				11112222223
	13458	234	93577891		13458	234	93577891
	40818	442	32527040		40818	442	32527040
NavCol_01	TTTCT	ata	TGATCTAA	NavCol_01	TTTCT	ata	TGATCTAA
NavCol_02			NavMan_14		
NavCol_03	G		NavMan_15		
NavCol_04			NavMan_16		
NavCol_05			NavMan_17		
NavCol_06			NavMan_18	C	
NavCol_07			NavMan_19		
NavCol_08			NavPve_01		
NavCol_09			NavPve_02		
NavCol_10	C		NavPve_05		
NavCol_11			NavPve_06		
NavCol_12	g		NavPve_07		
NavCol_13			NavPve_08		
NavCol_14			NavPve_09		
NavCol_15			NavPve_10		
NavCol_16			NavPve_11	T	
NavCol_17			NavPve_12		
NavCol_18			NavPve_13		
NavCol_19			NavPve_14		
NavCol_20			NavPve_15		
NavCol_21			NavPve_16		
NavCol_22			NavBa1_01		
NavCol_23			NavBa1_02		
NavCol_24			NavBa1_03		
NavCol_25			NavBa1_04		
NavCol_26			NavBa1_05		
NavCol_27	C		NavBa1_06	C	
NavCol_28			NavBa1_07	C	
NavCol_29			NavBa1_08	C	
NavCol_30			NavBa1_09	C	C
NavCol_31			NavBa1_10		
NavCol_32			NavBa1_11		
NavCol_33			NavBa1_12		
NavCol_34			NavBa1_13		
NavCol_35			NavBa1_14		
NavCol_36			NavBa1_15		
NavCol_37			NavBa1_16		
NavCol_38			NavBa1_17		
NavCol_39			NavBa1_18	C	
NavCol_40			NavBa1_19		
NavCol_41			NavBa1_20		
NavCol_42			NavBa1_21		
NavCol_43			NavBa1_22		
NavCol_44			NavBa2_01		
NavCol_45			NavBa2_02		
NavCol_46			NavBa2_03		
NavCol_47	G		NavBa2_04		
NavCol_48	C		NavBa2_05	T	
NavCol_49			NavBa2_06		
NavCol_50			NavBa2_07		
NavCol_51			NavBa2_08		
NavCol_52			NavBa2_09		
NavCol_53			NavBa2_10		
NavCol_54			NavBa2_11	C	
NavCol_55			NavBa2_12		
NavCol_56			NavBa2_13		
NavCol_57			NavBa2_14		
NavCol_58			NavBa2_15		
NavCol_59			NavBa2_16		
NavCol_60			NavBa2_17	T	
NavCol_61			NavBa2_18		
NavCol_62			NavBa2_19		
NavCol_63			NavBa2_20		
NavCol_64			NavBa2_21		

Anexo 5: alinhamento dos nucleotídeos das sequências das cinco populações para o gene *Nav* em *An. darlingi*. Em preto e letras maiúsculas estão representados os éxons. Em azul e letras minúsculas os íntrons. Os números acima das letras da primeira sequência referem-se a posição do sítio polimórfico no gene. Os pontos representam a identidade com a primeira sequência. E: éxon. I: íntron. Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Col: Colômbia; Pve: Porto Velho; Man: Manaus.

Nav - proteínas

	E20	E21		E20	E21
	-----	-----		-----	-----
	1112	456667		01112	456667
	50678	036899		50678	036899
NavCol_01	WVIPL	SDIRFN	NavCol_01	WVIPL	SDIRFN
NavCol_02	NavMan_05
NavCol_03	NavMan_06
NavCol_04	NavMan_07
NavCol_05	NavMan_08
NavCol_06	NavMan_09
NavCol_07	NavMan_10
NavCol_08	NavMan_11
NavCol_09	NavMan_12N....
NavCol_10	R.....	NavMan_13
NavCol_11	NavMan_14
NavCol_12	NavMan_15
NavCol_13	NavMan_16
NavCol_14	NavMan_17
NavCol_15	NavMan_18
NavCol_16	NavMan_19
NavCol_17	NavPve_01
NavCol_18	NavPve_02
NavCol_19	NavPve_05
NavCol_20	NavPve_06
NavCol_21	NavPve_07
NavCol_22	NavPve_08
NavCol_23	NavPve_09
NavCol_24	NavPve_10
NavCol_25	NavPve_11
NavCol_26	NavPve_12
NavCol_27	NavPve_13
NavCol_28	NavPve_14
NavCol_29	NavPve_15
NavCol_30	NavPve_16
NavCol_31	NavBa1_01
NavCol_32	NavBa1_02
NavCol_33	NavBa1_03
NavCol_34	NavBa1_04
NavCol_35	NavBa1_05
NavCol_36	NavBa1_06	..T..
NavCol_37	NavBa1_07L.
NavCol_38	NavBa1_08
NavCol_39	NavBa1_09T..
NavCol_40	NavBa1_10
NavCol_41	NavBa1_11
NavCol_42	NavBa1_12
NavCol_43	NavBa1_13
NavCol_44	NavBa1_14
NavCol_45	NavBa1_15
NavCol_46	NavBa1_16
NavCol_47D	NavBa1_17
NavCol_48	.A.....	NavBa1_18
NavCol_49	NavBa1_19
NavCol_50	NavBa1_20
NavCol_51	NavBa1_21
NavCol_52	NavBa1_22
NavCol_53	NavBa2_01
NavCol_54	NavBa2_02
NavCol_55	NavBa2_03
NavCol_56	NavBa2_04
NavCol_57	NavBa2_05C..

Anexo 6: alinhamento dos aminoácidos das sequências das cinco populações para o gene *Nav* em *An. darlingi*. Os números acima das letras da primeira sequência referem-se a posição do sítio polimórfico no gene. Os pontos representam a identidade com a primeira sequência. Em vermelho: sítio da clássica mutação *kdr* com o alelo leucina associado à susceptibilidade a piretroides. E: éxon. Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Col: Colômbia; Pve: Porto Velho; Man: Manaus.

ace-1 - nucleotídeos

```

                                E5
                                -----
                                11244682346668891357782
                                11244682346668891357782
                                5709569441650491737591461
                                GAGGCGCTTCGGCGCCGCAAGACA
ace1Ba2_01                       ..GA...GA.....G....
ace1Ba2_02                       ..GA.....G.....G....
ace1Ba2_03                       ..GA.....G.....G....
ace1Ba2_04                       ..GA...G...T..TG....
ace1Ba2_05                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_06                       ..GA...G...T..TG....
ace1Ba2_07                       ..G.....G...T..TG....
ace1Ba2_08                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_09                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_10                       ..G.....G.....A..G....
ace1Ba2_11                       ..GA...GA.....G....
ace1Ba2_12                       ..GA...G.....G....
ace1Ba2_13                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_14                       A..G.....A.....G....
ace1Ba2_15                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_16                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_17                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_18                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_19                       ..G...GA.....G....
ace1Ba2_20                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_21                       A..G.....A.....G...T
ace1Ba2_22                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_23                       ..G.....G.....G....
ace1Ba2_24                       ..G.....A...A..G....
ace1_Col01                       ..G...GA.T...A..G....
ace1_Col02                       ..GA...G.....G....
ace1_Col03                       ..G...G.....G....
ace1_Col04                       ..GA...GA.....G....
ace1_Col05                       ..G...GA.T...A..G....
ace1_Col06                       ..G...G.....G....
ace1_Col07                       ..G...GA.....G....
ace1_Col08                       ..G...GA.T...A..G....
ace1_Col09                       ..G...G.....G....
ace1_Col10                       .G.G..G..G.....GG....
ace1_Col11                       ..G...GA.T...A..G....
ace1_Col12                       ..G...G.....G....
ace1_Col13                       ..G...G.....G....
ace1_Col14                       ..G...G.....G....
ace1_Col15                       ..GA...GA.....GG....
ace1_Col16                       .G.GA...G.....G....
ace1_Col17                       ..G...G.....G....
ace1_Col18                       ..GA...GA.....G....
ace1_Col19                       ..G...G...T...A..G....
ace1_Col20                       ..G...G.....G....
ace1_Col21                       .G.G..G..G.....G....
ace1_Col22                       ..GA...GA.T...G....
ace1_Col23                       ..GA...GA.....G....
ace1_Col24                       ..GA...GA.....G....
ace1Ba1_01                       ..G.....G.....G....
ace1Ba1_02                       ..GA.....G.....G....
ace1Ba1_03                       .G.G.....G...GT....
ace1Ba1_04                       ..G...G...T..TG....
ace1Ba1_05                       .G.G.....G.....G....
ace1Ba1_06                       ..AG.....G.....G....
ace1Ba1_07                       ..G.....G.....G....
ace1Ba1_08                       ..G.....G.....G....
ace1Ba1_09                       ..G.....G.....G....
ace1Ba1_10                       .G.G...C.....G...GT.
ace1Ba1_11                       ..G.....G.....G....
ace1Ba1_12                       ..G.....G.....G....
ace1Ba1_13                       ..G...G...T..TG....
ace1Ba1_14                       ..G.....G.....G....
ace1Ba1_15                       ..G.....G.....G....
ace1Ba1_16                       ..G.....T...G....
ace1_Man01                       ..G.....G.....G....
ace1_Man02                       ..G.....G.....G....
```



```

                                E5
                                -----
                                11244682346668891357782
                                11244682346668891357782
                                5709569441650491737591461
ace1Ba2_01      GAGCGCCTTCGGCGCCGGCAAGACA
ace1_Man16     .....G.....
ace1_Man17     ...G.....G.....
ace1_Man18     ...G.....G.....G.....
ace1_Pve09     ...G.....G.....A..G.....
ace1_Pve14     ...GA...GA.....G.....
ace1_Pve03     ...GA...GA.T.....G.....
ace1_Pve10     ...G.....G.....G.....
ace1_Pve17     ...GA...GA.....G.....
ace1_Pve05     ...G.....G.....G.....
ace1_Pve01     .....GA.....G.....
ace1_Pve06     ...G.....G.....G.....
ace1_Pve08     ...G.....G...T..C.G.....
ace1_Pve12     ...GAA...GA.....G.....
ace1_Pve13     ...G...C.G.....G.....
ace1_Pve11     ...GA...G.....G.....
ace1_Pve07     ...G.....G.....G.....
ace1_Pve15     ...G.....G.....G.....
ace1_Pve02     ...G.....G.....G.....
ace1_Pve16     ...G.....G.....G.....
ace1_Pve04     ...GA...G.....G.....

```

Anexo 7: alinhamento dos nucleotídeos das sequências das cinco populações para o gene *ace-1* em *An. darlingi*. Os números acima das letras da primeira sequência referem-se a posição do sítio polimórfico no gene. Os pontos representam a identidade com a primeira sequência. E: éxon. Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Col: Colômbia; Pve: Porto Velho; Man: Manaus.

ace-1 - proteínas

	E5		E5
	-----		-----
	1		1
	2560		2560
	28547		28547
ace1Ba2_01	VMA<b style="color:red">GE	ace1Ba2_01	VMA<b style="color:red">GE
ace1Ba2_02	ace1_Man17
ace1Ba2_03	ace1_Man18
ace1Ba2_04	ace1_Pve09
ace1Ba2_05	ace1_Pve14
ace1Ba2_06	ace1_Pve03
ace1Ba2_07	ace1_Pve10
ace1Ba2_08	ace1_Pve17
ace1Ba2_09	ace1_Pve05
ace1Ba2_10	ace1_Pve01
ace1Ba2_11	ace1_Pve06
ace1Ba2_12	ace1_Pve08
ace1Ba2_13	ace1_Pve12
ace1Ba2_14	I.....	ace1_Pve13
ace1Ba2_15	ace1_Pve11
ace1Ba2_16	ace1_Pve07
ace1Ba2_17	ace1_Pve15
ace1Ba2_18	ace1_Pve02
ace1Ba2_19	ace1_Pve16
ace1Ba2_20	ace1_Pve04
ace1Ba2_21	I...V		
ace1Ba2_22		
ace1Ba2_23		
ace1Ba2_24		
ace1_Col01		
ace1_Col02		
ace1_Col03		
ace1_Col04		
ace1_Col05		
ace1_Col06		
ace1_Col07		
ace1_Col08		
ace1_Col09		
ace1_Col10		
ace1_Col11		
ace1_Col12		
ace1_Col13		
ace1_Col14		
ace1_Col15		
ace1_Col16		
ace1_Col17		
ace1_Col18		
ace1_Col19		
ace1_Col20		
ace1_Col21		
ace1_Col22		
ace1_Col23		
ace1_Col24		
ace1Ba1_01		
ace1Ba1_02		
ace1Ba1_03		
ace1Ba1_04		
ace1Ba1_05		
ace1Ba1_06		
ace1Ba1_07		
ace1Ba1_08		
ace1Ba1_09		
ace1Ba1_10	.T...		
ace1Ba1_11		
ace1Ba1_12		
ace1Ba1_13		
ace1Ba1_14		
ace1Ba1_15		
ace1Ba1_16	..S..		
ace1_Man01		
ace1_Man02		

Anexo 8:

alinhamento dos aminoácidos das sequências das cinco populações para o gene *ace-1* em *An. darlingi*. Os números acima das letras da primeira sequência referem-se a posição do sítio polimórfico no gene. Os pontos representam a identidade com a primeira sequência. Em vermelho: sítio da principal mutação associada a resistência a organofosforados e carbamatos portando o alelo glicina associado a susceptibilidade a estes compostos. E: éxon. Ba1: Barcelos 1; Ba2: Barcelos 2; Col: Colômbia; Pve: Porto Velho; Man: Manaus.