

ESTUDO DA FILOGENIA DOS ANOFELINOS BRASILEIROS
DO SUBGÊNERO *NYSSORHYNCHUS* E PADRONIZAÇÃO DA
AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO
SEXUAL (SPR) E DO PEPTÍDEO SEXUAL (SP)

LETÍCIA TIEMI EGAMI ODA

**Botucatu
2014**

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu-SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO DA FILOGENIA DOS ANOFELINOS BRASILEIROS
DO SUBGÊNERO *NYSSORHYNCHUS* E PADRONIZAÇÃO DA
AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DO RECEPTOR DO PEPTÍDEO
SEXUAL (SPR) E DO PEPTÍDEO SEXUAL (SP)

Letícia Tiemi Egami Oda

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-orientador: Dr. Diego Peres Alonso

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu, Campus de
Botucatu UNESP, para a obtenção do título
de mestre no programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas (Genética)
Genética.

**Botucatu-SP
2014**

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu-SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Oda, Leticia Tiemi Egami.

Estudo da filogenia dos anofelinos brasileiros do subgênero Nyssorhynchus /
Leticia Tiemi Egami Oda. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Coorientador: Diego Peres Alonso

Capes: 20202008

1. Anopheles - Filogenia. 2. Peptídeos. 3. Mosquito - Controle. 4. Mosquito
como transmissor de doenças. 5. Biodiversidade.

Palavras-chave: Anopheles; Filogenia; Nyssorhynchus; Peptídeo sexual; Receptor
peptídeo sexual.

*Dedico esse trabalho aos meus pais
Tomomitsu e Satiko.
Com o apoio que sempre me deram,
educação, carinho, boas escolas,
todo o suporte para que eu chegasse até aqui..
Serei sempre muito grata a vocês.*

Agradecimento

Agradeço à Deus por me ter dado força,saúde, iluminado o meu caminho e das pessoas que eu amo que estão ao meu redor, durante todo esse tempo.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, Paulo, por me receber em seu laboratório e por me orientar, com seu jeito único de ser, desde a iniciação científica até o final do mestrado. Pelos ensinamentos e indagações que me fez pensar melhor sobre o projeto.

À Prof. Dra. Maria Anice Mureb Sallum da Faculdade de Saúde Pública da USP por me ceder suas amostras, pela disponibilidade de vir em minha qualificação e defesa e pelas sugestões que certamente enriqueceram o trabalho.

Ao meu Co-orientador Dr. Diego Peres Alonso por muito me orientar, pela sua disponibilidade, insentivos desde sempre.

À Dr. Aline Fernandes Angêlla Martins, por ter me co-orientado no início do mestrado, sempre disposta a ajudar.

À CAPES (Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa de mestrado concedida.

À minha família, pai, mãe e irmã. Meu pai pelos anos pagos de faculdade e incentivo. Minha mãe por estar sempre presente, mesmo que distante, sempre me apoiando, ajudando, incentivando, acreditando em mim durante todo esse tempo. Minha inspiração de como ser uma mulher guerreira. Minha linda irmã que me motiva a cada dia, não me deixando desistir, acredita em mim, pela companhia, momentos de descontração e brigas. Amo muito vocês!

Ao meu noivo Humberto, pela enorme paciência nos momentos mais estressantes, por estar junto de mim em todos os momentos, por me incentivar sempre, acreditar e confiar em mim. Seu amor, carinho e presença ao meu lado me faz mais feliz, me dá mais força a cada dia que passa. Te amo do tamanho do espaço!

À todos os tios, tias e primos que sempre me perguntaram o que eu estava estudando, se malária não tem vacina e me deram bronca por ter ido ao Acre. Mas que sempre torceram por mim.

À minha nova família de Ibaté, por entender, ou não, do seu querido filho não voltar no final de semana para casa por minha causa, pelos finais de semana divertidos, pelos passeios, pela companhia sempre.

Às minhas amigas “Pães” que sempre estão presente nos momentos de descontração, angústias, alegrias, desabafo. Saber que posso contar com vocês não me faz sentir sozinha. Amo! Às amigas que ganhei em Botucatu ao longo da graduação e que persistem até hoje. Apesar da distância e do caminho escolhido por cada uma ser diferente, o carinho e boas lembranças nos ligam eternamente. Amo! Em especial à “Poket”, a estrela que brilha com a mesma intensidade de sua alegria e vontade que tinha de viver, saudades!

Aos colegas de laboratório, Carine, Jaq, Rita, ao agregados da Genotyping, Caio, Meline, Larissa pela companhia e momentos de descontração, em especial à Daíse pelos sequenciamentos.

Ao meu co-orientador Diego (Diegs) por tudo, tudo mesmo. Pelos conselhos no trabalho, incentivos diários, ajuda nas análises dos resultados, pelas conversas e por ser a pessoa que mais aprecia o meu projeto...hehehe. Sem a sua ajuda o trabalho não seria o mesmo. Tenho certeza que será um ótimo docente/pesquisador, pois sua sede pelo conhecimento, sua disposição, vontade de ensinar e ajudar os outros (por mais que as vezes seja bom aprender a falar um não) é uma de suas principais qualidades. À Letícia (Lê) pela ajuda na qualificação e assessoria Fapesp, pelas conversas e momentos de descontração.

À Giovana (Gi) por sempre, sempre mesmo, estar disposta à ajudar. Pela companhia, pelas conversas, ajudas, preocupações, conselhos dentro e fora do laboratório.

À Melina (Pirus) pela caminhada juntas desde a graduação, pela agilidade motora e intelectual com softwares, pelas conversas, discussões e incentivos dentro e fora do laboratório.

À Teresa (Teresoca) por ter sido a primeira pessoa a me acolher no laboratório fazendo com que eu me sentisse a vontade, de sanar algumas dúvidas com sua ótima didática, pelas conversas, risadas.

À Aline (Bronza) também pela ajuda na qualificação, pela companhia dentro e fora do laboratório.

Há quem diga que não possa existir amizade dentro do ambiente de trabalho, mas eu sou a primeira a discordar.

À todos o meu meu MUITO OBRIGADA!!!

Resumo

A evolução da hematofagia em mosquitos é sem dúvida a adaptação mais importante desse grupo de inseto em termos dos patógenos transmitidos pelos vetores, causadores de diversas doenças importantes no mundo de hoje. Um equívoco comum que os mosquitos como um grupo são conhecidos taxonomicamente foi gerado, mas há muitas espécies para serem descobertas e classificadas. Os mosquitos da família Culicidae que possui como subfamília Anophelinae, formam um grupo diversificado, de origem monofilética, com distribuição global. Vale assinalar que apenas uma minoria das 3.200 espécies conhecidas atualmente são importantes vetores de patógenos para os seres humanos. Além de seu papel na transmissão de patógenos, os mosquitos têm muito a oferecer à ciência básica, por exemplo, como indicadores da biodiversidade, do grau de degradação do meio ambiente natural, das diversas formas de uso do solo e para estudos de evolução e de especiação. Os mosquitos possuem um peptídeo chamado Peptídeo Sexual que é expresso nas glândulas acessórias dos machos e inseminado nas fêmeas durante a cópula. A ligação deste peptídeo ao seu receptor encontrado nas fêmeas, desencadeia uma vasta resposta comportamental no inseto, que inclui a mudança de hábito alimentar, dando preferência a alimentos protéicos, a recusa de cópula com outros machos, a indução da oviposição dentre outras. Este projeto teve como objetivo o estudo deste peptídeo e seu respectivo receptor em diferentes anofelinos brasileiros visando gerar dados a respeito da filogenia e da caracterização de um possível marcador genético. Foram feitas extrações de DNA dos mosquitos, reações de PCR, sequenciamento, e análise das sequências para formação das árvores filogenéticas no programa Phylip pelas análises de Máxima Verossimilhança, Neighbor-Joining e Parcimônia. As árvores geradas neste projeto foram comparadas com a árvore padrão do artigo de Foster *et al* (2013) na qual foi gerada por três genes bem conhecidos, COI, CAD e *white* gene. Com as árvores geradas pelo SPR não obteve-se bons resultados, já com o SP as árvores possuem quase os mesmos agrupamentos. Também foi gerada uma árvore com SPR apenas com *An. darlingi* nos períodos chuvoso e de seca. O gene SPR conseguiu separar os mosquitos nas duas estações. Com isso, observou-se que mais estudos precisam ser feitos, porém os genes SPR e SP possuem grande potencial para serem possíveis marcadores moleculares para auxiliar na identificação das espécies.

Abstract

The evolution of mosquitoes hematophagy is undoubtedly the most important adaptation of this group of insect in terms of pathogens transmission, which cause various important diseases in the world nowadays. Thus, a common misconception that mosquitoes as a group are known taxonomically was generated, but there are many species to be discovered and classified. The mosquitoes of Culicidae Family which has Anophelinae as subfamily are a diverse group of monophyletic origin, with global distribution. It is noteworthy that only a minority of the 3200 species known today, are important vectors of pathogens to humans. Besides the pathogens transmission, mosquitoes have much to offer to basic science, for example, as biodiversity indicators, indicating also the degradation degree of the natural environment, the various ways soil is explored and for studies of evolution and speciation. The mosquitoes have a peptide called Sex Peptide which is expressed in accessory glands of males and is inseminated in females during copulation. The binding of this peptide to its receptor triggers a major behavioral response in the insects, which includes changes in eating habits, giving preference to protein, the refusal of mating with other males, induction of oviposition, among others. This project aims the study of this peptide and its corresponding receptor in different Brazilian anophelines in order to generate data about phylogeny and characterization of a possible genetic marker. DNA extraction were made, PCR reaction, sequencing, and sequence analysis for tree generation in the program PhyML with the analysis of Maximum Likelihood, Neighbor- Joining and Parsimony. The generated tree was compared with a standard tree of Foster *et al* (2013) which used three different genes COI, CAD e white gene. We didn't get successful with SPR tree, but, with SP the classification of the tree were almost the same of Foster *et al* (2013). Another tree was generated with SPR but just with *An. darlingi* specie in dry season and rainy season. The SPR gene could separated the seasons. So its necessary another studies but the genes SPR and SP a great potential to be a molecular marker.

Lista de Figuras

- Figura 1.** A figura ilustra a localização do o GPCR com a região N terminal extracelular e a região C terminal intracelular. É ilustrado também as reações intracelulares desencadeadas pela interação do peptídeo com o receptor na região N terminal. 8
- Figura 2.** Parte do contig da HYPOTHETICAL PROTEIN AND-19408 de *Anopheles darlingi*. Em destaque os 4 exons os quais os primers foram baseados 16
- Figura 3.** Parte do contig de HYPOTHETICAL PROTEIN AND-06226 de *Anopheles darlingi*. Em destaque os 3 exons os quais os primers foram baseados. 17
- Figura 4.** Foto da eletroforese de capilar do gene SPR. Produtos com tamanhos aproximados de 450pb das 5 diferentes espécies de anofelinos: *An. deaneorum*, *An. benarrochi*, e *An. darlingi*. 22
- Figura 5.** Foto da eletroforese de capilar do gene SP. Produtos com tamanhos aproximados de 1400pb das 7 diferentes espécies de anofelinos: *An. deaneorum*, *An. benarrochi*, e *An. darlingi*. 23
- Figura 6.** Foto de eletroforese de capilar com o gene SPR. Produtos com tamanhos aproximados de 500 a 600pb das 11 diferentes espécies de anofelinos: 1-*An. albitarsis*, 2-*An. galvaoi*, 3- *An. Nuneztovari*, 4- *An. rondoni*, 5- *An. arthuri* A, 6- *An. strodei*, 7- *An. oryzalimnetes*, 8- *An. marajoara*, 9- *An. konderi*, 10- *An. goeldii*, 11- *An. evansae*. 23
- Figura 8.** Foto do gel de agarose com os amplicons do gene *white*. As figuras A e B correspondem ao mesmo gene. Os poços da figura A correspondem as espécies *An. deaneorum*, *An. benarrochi*, *An. albitarsis*, *An. galvaoi*, *An. nuneztovari*, *An. rondoni*, *An. evansae*, *An. arthuri* A, respectivamente. Já na figura B o poço 1 corresponde a espécie *An. strodei*. 24
- Figura 9.** Os poços 1,2,3,,4 e 5 da figura A correspondem às amostras D4 (estação seca); os poços 6,7,8,9 e 10 correspondem às amostras F (estação chuvosa). Já os poços 1,2,3,4 e 5 da figura B correspondem às outras amostras da estação chuvosa; e os poços 6,7,8,9 e 10 correspondem às outras amostras da estação seca. Os poços 11 de ambas as figuras A e B correspondem ao controle negativo NO, o que não demonstra amplificação. 25
- Figura 10.** Alinhamento feito no program ClustalX com o gene SPR. Foi feito o alinhamento com 13 espécies de anofelinos e *An. gambiae* como outgroup. 26
- Figura 11.** Alinhamento feito no program ClustalX com o gene SP com *An. gambiae* como outgroup. Foi feito o alinhamento com 14 espécies de anofelinos. Possui exon e intron. A região seqüenciada possui 1332pb sendo que a região de intron corresponde do par de base 187 a 796. 28
- Figura 12.** Alinhamento feito no program ClustalX com o gene SP com *An.cruzii* como outgroup. Foi feito o alinhamento com 14 espécies de anofelinos. Possui exon e intron. A região seqüenciada possui 637pb, sendo que a região do intron corresponde a partir do par de base 182. 29
- Figura 13.** Alinhamento feito no program ClustalX com o gene *white*. Foi feito o alinhamento com 9 espécies de anofelinos. A região seqüenciada possui 432pb. 30

- Figura 14. Alinhamento das sequencias de *Anopheles darlingi* de estação seca e estação chuvosa.** As linhas com iniciais S referem-se a estação seca, e as que possuem iniciais C correspondem a estação chuvosa. 32
- Figura 15. Árvore do gene SPR com valores de bootstrap gerada pela análise de Máxima Verossimilhança.** Nota-se que não há formação de nenhum agrupamento de espécies que seja significativo quando comparado a classificações com outros primers mais conhecidos. 33
- Figura 16. Árvore do gene SP com valores de bootstrap gerada pela análise de Máxima Verossimilhança.** Em destaque as 3 subdivisões formando subgrupos de espécies semelhantes quando comparadas com classificações com outros primers mais conhecidos. *An. benarrochi* está em posição diferente quando comparado com classificação de outros primers, e *An. darlingi* mais distante dos subgrupos 34
- Figura 17. Árvore do gene SPR com valores de bootstrap gerada pela análise de Neighbor Joining.** Nota-se que não há agrupamento de espécies que seja significativo quando comparado a classificação com outros primers mais estudados. Os agrupamentos formados não sugerem nenhum subgrupo ou complexo conhecidos. 35
- Figura 18. Árvore do gene SP com valores de bootstrap gerada pela análise de Neighbor Joining.** Em destaque as 3 subdivisões agrupando espécies, semelhante ao que acontece quando comparadas com a classificação de outros primers mais estudados. *An. benarrochi* e *An. darlingi* em destaque se encontram em regiões diferentes das classificações de outros primers. 36
- Figura 19. Árvore do gene SPR com valores de bootstrap geradas pela análise de Parcimônia.** Nota-se que não houve agrupamento de espécies, semelhantes a classificações existentes com outros primers mais estudados. Os agrupamentos formados não sugere nenhuma formação de subgrupo ou complexo existente. 37
- Figura 20. Árvore do gene SP com valores de bootstrap geradas pela análise de Parcimônia.** Em destaque as 3 subdivisões agrupando espécies, semelhante ao que acontece quando comparadas com a classificação de outros primers mais estudados. *An. benarrochi* e *An. darlingi* em destaque se encontram em regiões diferentes das classificações de outros primers. 38
- Figura 21. Árvore do gene SP com valores de bootstrap geradas pela análise de Máxima Verossimilhança com *An. cruzii* como outgroup.** A árvore foi subdividida em 3 principais grupos, sendo que o Subgrupo Oswaldoi agora foi dividido em duas partes. *An. darlingi* e *An. benarrochi* continuam em posições diferentes, não se encaixando em nenhum grupo, sendo que *An. darlingi* não se encontra perto do outgroup. 40
- Figura 22. Árvore do gene SP com valores de bootstrap geradas pela análise de Neighbor-Joining com *An. cruzii* como outgroup.** A árvore foi subdividida em 3 principais grupos, sendo que o Subgrupo Oswaldoi agora foi dividido em três partes sendo que *An. konderi* ficou mais distante do subgrupo. *An. darlingi* e *An. benarrochi* continuam em posições diferentes, não se encaixando em nenhum subgrupo ou complexo, sendo que *An. darlingi* não se encontra perto do outgroup. 41

- Figura 23. Árvore do gene SP com valores de bootstrap geradas pela análise de Parcimônia com *An. cruzii* como outgroup.** Árvore bem parecida com a análise anterior. Foi subdividida em 3 principais grupos, sendo que o Subgrupo Oswaldoi agora foi dividido em três partes sendo que *An. konderi* ficou mais distante do subgrupo. *An. darlingi* e *An. benarrochi* continuam em posições diferentes, não se encaixando em nenhum subgrupo ou complexo, sendo que *An. darlingi* não se encontra perto do outgroup. 42
- Figura 24. Árvore filogenética do gene *white* com valores de bootstrap geradas pela análise de Máxima Verossimilhança.** Quando comparada com a árvore do gene SP, não há nenhuma subdivisão para a formação de um subgrupo ou complexo. 43
- Figura 25. Árvore filogenética do gene *white* com valores de bootstrap geradas pela análise de Neighbor-Joining.** Quando comparada com a árvore do gene SP há formação apenas do Subgrupo Strodei. 44
- Figura 26. Árvore filogenética do gene *white* com valores de bootstrap geradas pela análise de Parcimônia.** Quando comparada com a árvore do gene SP há formação apenas do Subgrupo Strodei. 45
- Figura 27. Árvore desenhada apenas com *An. darlingi* com o gene SPR desenhada no CLUSTALX 2.1.** Observa-se uma divisão entre estação seca e chuvosa, com exceção de D42, D44 e D48. 46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista de espécies de anofelinos e suas localizações utilizadas em uma das análises do projeto.	13
Tabela 2. <i>Anopheles darlingi</i> , quantidade, estação e localização utilizados para o estudo	14
Tabela 3. Primers utilizados nas análises, suas sequências, tamanhos, se possuem regiões de intron e a quantidade de pares de bases que foram seqüenciadas.	32

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	14
1. Introdução	1
1.1 Família Culicidae	3
1.2 Gênero <i>Anopheles</i>	4
1.3 Cópula	7
2. Objetivos	10
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. Material e Métodos	12
3.1 Mosquitos	13
3.2. Extração do DNA	14
3.3 Desenho dos pares de primers	14
3.4 Teste dos primers	18
3.5 Reações de PCR	19
3.6 Análise das amplificações	19
3.7 Purificação	20
3.8 Sequenciamento	20
3.9 Alinhamento e desenho das árvores	20
4. Resultados	21
4.1 Amplificações	22
4.2 Sequenciamento e Alinhamento	25
5. Discussão	47
6. Conclusão	53
7. Referências Bibliográficas	55

1. Introdução

Muitos insetos e outros artrópodes possuem importância médica e veterinária por causarem condições patológicas ou transmitirem organismos patogênicos ao homem ou animais (Harwood e James, 1979). Dentre os insetos, alguns grupos denominados hematófagos, são adaptados para se alimentarem de sangue, sendo esse o principal problema advindo deles tornando-os capazes de transmitir vários patógenos para o homem e outros vertebrados.

Por causa da importância médica dos mosquitos, e por serem hematófagos, a maioria dos estudos foi direcionada aos organismos que representam maior interesse ao ser humano, como os mosquitos transmissores de malária (Sinka et al., 2011), e transmissores da dengue e febre amarela (Gubler, 1998). Dessa maneira, poucas espécies são intensamente estudadas enquanto a maioria é pouco conhecida tanto em aspectos da biologia, ecologia e taxonomia.

Os culicídeos provavelmente tiveram origem na Região Neotropical durante o início do Cretáceo. Devido à associação próxima de mosquitos com fitotelmatas (habitats naturais de origem vegetal que acumulam água e servem de criadouro para uma diversificada fauna de vertebrados e invertebrados), eles servem como indicadores da riqueza de espécies em ecossistemas ameaçados como as florestas tropicais. Algumas espécies de mosquitos são empregadas como modelos de especiação críptica (morfologicamente iguais, mas geneticamente diferentes). Abordagens efetivas para identificação de espécies são essenciais na incriminação do vetor, avaliação do risco de doenças e desenvolvimento de controles estratégicos como a malária (Zapata et al, 2007). As espécies de maior importância médica, como *Anopheles gambiae* e *Anopheles arabiensis* do subgênero *Cellia* e, *Anopheles darlingi*, do subgênero *Nyssorhynchus*, por serem os principais vetores de plasmódios na África e Brasil respectivamente, e poderem

infectar humanos e transmitir o agente etiológico causador da malária, têm sido intensivamente empregadas como modelos em estudos de evolução.

1.1 Família Culicidae

Os mosquitos (Família Culicidae) representam grupo monofilético com distribuição global. Atualmente são reconhecidas aproximadamente 3.500 espécies de Culicidae (HARBACH & HOWARD, 2007). No entanto, estima-se que esse montante represente apenas um quarto ou, no máximo, metade de todas as espécies de mosquitos presentes na natureza (BELKIN, 1962; ZAVORTINK, 1990). A maioria das pesquisas sobre Culicidae envolve grupos de maior importância médica e veterinária ou espécies que são consideradas pragas urbana. Os mosquitos que: (1) não são atraídos pelo homem e/ou animais domésticos, (2) raramente ocorrem em elevada densidade porque eles se desenvolvem em habitats representados por coleções hídricas pequenas (fitotelmatas), ou (3) estão restritos aos habitats preservados e distantes da população humana, têm recebido menos atenção e por isso são pouco conhecidos.

Os especialistas em Culicidae contam com catálogos de mosquitos que incorporam a história taxonômica das espécies (KNIGHT & STONE, 1977; KNIGHT, 1978; WARD, 1984, 1992; GUIMARÃES, 1997; <http://www.mosquitocatalog.org>; <http://mosquito-taxonomicinventory.info>). De acordo com os dados disponíveis nos catálogos, nota-se que foram descritas aproximadamente 5.100 espécies das quais 3.500 são aceitas como válidas (HARBACH & HOWARD, 2007). É interessante assinalar que o número de espécies descritas por ano, desde a década de 1960 tem sido praticamente constante. Obviamente, existem muitas espécies que ainda não foram reconhecidas ou o foram, recentemente (SALLUM & HUTCHINGS, 2003; MOTOKI et al., 2009; NAGAKI et al., 2010; SALLUM et al., 2010). Belkin (1962) e

Zavortink (1990) estimaram que 25 a 50% de todos os mosquitos são conhecidos. Harbach (2007) sugeriu que possam existir de três a cinco vezes mais espécies se considerarmos a presença de complexos de espécies crípticas. Nesse sentido, com base nas descobertas de espécies do gênero *Anopheles*, usando combinação de taxonomia morfológica, citotaxonomia, comportamento e sequências de DNA, acredita-se que existam aproximadamente 2.000 espécies a serem descobertas. Possivelmente, a maioria das ocorrências será registrada na Região Neotropical.

A família Culicidae consiste de duas subfamílias, Anophelinae e Culicinae, e está dividida em 11 tribos – Aedeomyiini, Aedini, Culicini, Culisetini, Ficalbiini, Hodgesiini, Mansoniini, Orthopodomyiini, Sabethini, Toxorhynchitini, e Uranotaeniini (HARBACH & KITCHING, 1998; HARBACH, 2007; REIDENBACH *et al.*, 2009). A subfamília Anophelinae inclui 480 espécies formalmente reconhecidas e outros membros não nomeados de complexos de espécies (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6046>) e esta está subdividida em três gêneros: *Anopheles*, *Bironella* e *Chagasia*.

1.2 Gênero *Anopheles*

A sistemática de Anophelinae atingiu o apogeu dos estudos morfológicos clássicos na década de 1980 e agora está dominada pelo uso de ferramentas moleculares tanto para o estabelecimento das relações evolutivas entre espécies como entre táxons supra-específicos. A maioria dos estudos filogenéticos de *Anopheles* envolve níveis inferiores de classificação, principalmente grupos, subgrupos e complexos de espécies que participam do ciclo de transmissão da malária humana. Dessa maneira, o impacto na classificação interna de Anophelinae tem sido pequeno (HARBACH, 2004).

O gênero *Anopheles* tem recebido mais atenção do que qualquer outro grupo de mosquito em relação aos aspectos de evolução e classificação (FOLEY *et al.*, 1998; KRZVWINSKI *et al.*, 2001a, 2001b; SALLUM *et al.*, 2000, 2002; COLLUCCI & SALLUM, 2003; HARBACH & KITCHING, 2005). Espécies desse gênero estão subdivididas em sete subgêneros: *Anopheles*, *Baimaia*, *Cellia*, *Kertezia*, *Lophopodomys*, *Nyssorhynchus* e *Stethomya*. Mundialmente, os primeiros vetores transmissores da malária aos homens pertencem aos subgêneros *Anopheles*, *Cellia* e *Nyssorhynchus* (SINKA *et al.*, 2012). Nas Américas existem nove espécies de *Anopheles*, três espécies do subgênero *Anopheles* e seis do subgênero *Nyssorhynchus* (SINKA *et al.*, 2010). Dentre as espécies do subgênero *Nyssorhynchus*, *Anopheles darlingi* foi o primeiro vetor da Região Amazônica (SINKA *et al.*, 2010; OLIVEIRA- FERREIRA *et al.*, 2010).

A identificação das espécies do subgênero *Nyssorhynchus* é dificultada pela presença de polimorfismos e pela sobreposição dos caracteres morfológicos utilizados para a identificação das espécies. As fêmeas adultas são hematófagas e por isso podem estar envolvidas em ciclos de transmissão de agentes infecciosos aos homens e animais. Por esse motivo, elas são mais comumente coletadas em estudos epidemiológicos da malária, arboviroses e filarioses. No entanto, as fêmeas são difíceis de serem identificadas e, conseqüentemente, a caracterização das espécies envolvidas na dinâmica da transmissão das doenças pode ficar comprometida, bem como os programas de controle. O subgênero *Nyssorhynchus* inclui 39 espécies formalmente descritas (HARBACH, 1902) e 44 espécies listadas (HARBACH, 2012) e estão agrupadas em três seções: *Albimanus* (Faran 1980) (FARAN, 1980), *Argyritarsis* (Linthicum 1988) (LINTHICUM, 1988) e *Myzorhynchella* (Galvão, 1941) (GALVÃO, 1941).

Marrelli *et al.* (1999) empregaram sequências de bases nitrogenadas do ITS2 do DNA ribossômico para revisar o status taxonômico de *An. oswaldoi*, pertencente ao Grupo

Oswaldoi que possui 18 espécies, sendo que cinco participam da transmissão de plasmódios e pelo menos quatro, *An. aquasalis* Curry, *An. benarrochi* Gabaldón, Cova-Garcia e Lopez, *An. oswaldoi*, Peryassu e *An. nuneztovari* Gabaldón, pertencem a complexos de espécies crípticas. Dessa maneira, os autores sugeriram que *An. oswaldoi* compreende complexo de pelo menos quatro espécies crípticas, entre elas *An. konderi* Galvão e Damasceno. As duas espécies são morfologicamente semelhantes, mas podem ser separadas pela forma de porção apical do edeago da genitália masculina. A espécie *Anopheles konderi* foi removida da sinonímia de *An. oswaldoi* por Flores-Mendoza *et al.* (2004). Nenhuma análise de DNA foi incluída na redescrição e assim, a identidade molecular de *An. konderi* empregando espécimes da localidade-tipo precisa ser concretizada. Em revisão recente, Marrelli *et al.* (2006) demonstraram que uma das sequências geradas como sendo de *An. oswaldoi* por Marrelli *et al.* (1999), provavelmente pertence a um indivíduo de *An. evansae* (Brèthes) que foi erroneamente identificado como *An. oswaldoi*. Diferenças morfológicas e comportamentais também sugerem que *An. benarrochi* seja um complexo de espécies crípticas. Esta espécie é zoofílica em Rondônia, Brasil (KLEIN *et al.*, 1991), mas altamente antropofílica em localidades do Peru (ARAMBURÚ *et al.* 1999). Vale assinalar que as sequências do ITS2 de amostras de *An. oswaldoi* coletadas em Yurimaguas, Peru, são idênticas as de *An. benarrochi* (RUIZ *et al.*, 2005) geradas de indivíduos coletados no sul da Colômbia. Estas sequências são distintas (15.4 – 16.3%) de outras depositadas no GenBank e identificadas como sendo de *An. benarrochi* de Rondônia, Brasil (AF462383 e AF4623834). Marrelli *et al.* (2006) observaram a existência de múltiplas sequências de ITS2 que foram geradas e depositadas no GenBank a partir de indivíduos identificados de maneira, provavelmente, incorreta. Infelizmente, não existem espécimes testemunhas da maioria das sequências depositada no GenBank. Obviamente, se existissem espécimes testemunhas, seria possível reavaliar se as

seqüências foram geradas de indivíduos identificados incorretamente ou se são indicativas da existência de complexos de espécies crípticas.

1.3 Cópula

Durante a cópula, nos mosquitos como *Aedes* e *Anopheles*, e nas moscas como *Drosophila*, uma grande quantidade de peptídeos e proteínas é inseminada nas fêmeas pelos machos. Dentre estes produtos, um peptídeo, denominado peptídeo sexual (Sex Peptide, SP) sintetizado nas glândulas acessórias nos machos, após ser inseminado, se liga a um receptor (Sex Peptide Receptor, SPR) encontrado nas fêmeas promovendo diversas modificações fisiológicas e comportamentais.

O peptídeo sexual e seu receptor estão mais bem descritos na espécie *Drosophila melanogaster*, na qual se sabe que a ligação do peptídeo com o receptor gerará mudanças comportamentais nas fêmeas, como: redução da receptibilidade das fêmeas, aumento da ovoposição e alimentação, produção de peptídeos antimicrobiais, alteração dos padrões de sono e balanço hídrico (CHAPMAN et al, 2003; LIU&KUBLI, 2003; KUBLI, 2003; PENG et al, 2005; RIBEIRO&DICKSON, 2010; ISAAC et al, 2010; COGNIGNI et al, 2011), aumento da longevidade, recusa da cópula com outros parceiros e mudança da escolha do alimento (KUBLI, 2010). Paralelamente, esta mudança em um mosquito vetor, representaria um aumento da probabilidade de obtenção de uma dieta protéica, ou seja, de um repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado.

O Receptor do Peptídeo Sexual (SPR) é um Receptor Acoplado a Proteína G (GPCR) transmembrana que se encontra como um pequeno conjunto de sensores neuronais localizados no trato reprodutivo das fêmeas (KIM et al.; 2010) (Figura 1).

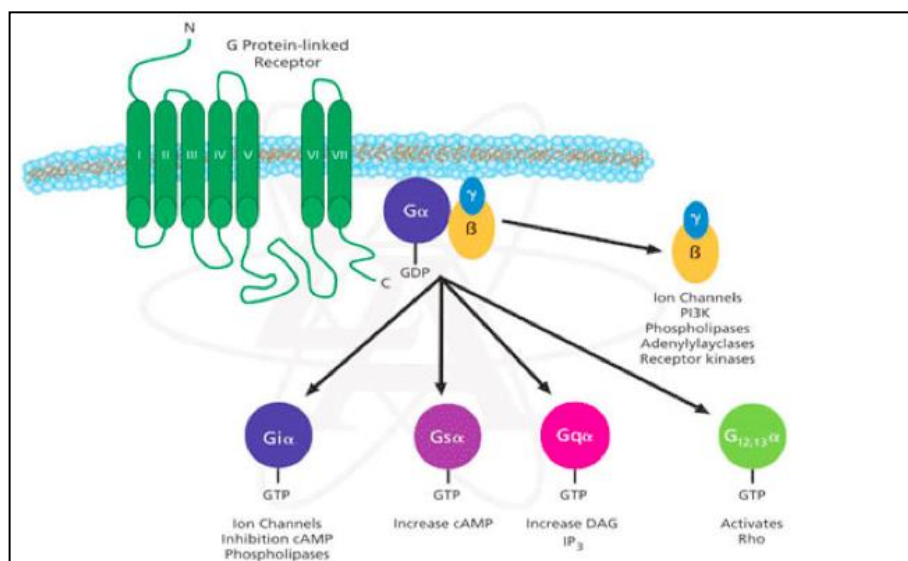


Figura 1. A figura ilustra a localização do o GPCR com a região N terminal extracelular e a região C terminal intracelular. É ilustrado também as reações intracelulares desencadeadas pela interação do peptídeo com o receptor na região N terminal.

Junto com outras proteínas, o peptídeo sexual é transferido para as fêmeas em uma composição gelatinosa chamado de Mating Plug (GIGLIOLI & MASON, 1966; gillies, 1956), e dentre os mosquitos essa forma é apenas encontrado nas espécies do gênero *Anopheles* (YUVAL. 2006). A secreção seminal é digerida no atrium da fêmea após 24 horas da transferência (ROGERS, 2009), e as respostas pós-cópula nas fêmeas de *Anopheles gambiae* são caracterizadas pelo visível mudanças transcrpcionais, localizadas principalmente no atrium, onde existe um grande número de genes que são induzidos ou reprimidos durante o primeiro dia seguido da cópula (ROGER et al, 2008).

Os receptores do peptídeo sexual são Receptores Acoplados à Proteína G (GPCR) transmembrana que se encontra como pequeno conjunto de sensores neuronais encontrados no trato reprodutivo das fêmeas (KIM *et al.*; 2010), também é expresso no cérebro e sistema nervoso (YAPICI et al, 2008).

Algumas dessas modificações são dependentes apenas da ligação de SP em SPR, uma vez que experimentos com *Drosophilas* mutantes nulas para o receptor SPRnull mostram que não há a mudança de comportamento após a cópula (RIBEIRO & DICKSON,

2010). Outros estudo vêem a regulação da expressão dos genes nas fêmeas quando entram em contato com o SP e quando não entram em contato (GIOTI *et al*, 2012). Estes experimentos, realizados principalmente em *Drosophila melanogaster* demonstram o papel que estas proteínas (SP e SPR) podem ter no processo de especiação. Modificações, tanto no peptídeo como em seu receptor, podem representar barreiras no processo reprodutivo, demonstrando assim, futuramente, um importante valor desses peptídeos.

Com estudos mais aprofundados dessa biologia da reprodução, englobando espécies do gênero *Anopheles*, será possível utilizar o peptídeo sexual e seu respectivo receptor para análise da filogenia de anofelinos.

2. *Objetivos*

2.1 Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo o estudo da filogenia de diferentes espécies de anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus* encontrados no Brasil, utilizando genes do Peptídeo Sexual e Receptor do Peptídeo Sexual com o intuito de utilizar os dados obtidos para traçar a evolução destes genes, e suas padronizações de amplificação.

2.2 Objetivos específicos

- Encontrar possíveis novos marcadores moleculares para auxiliar na identificação dos anofelinos
-
- Comparar populações de *An. darlingi* coletadas nas estações seca e chuvosa utilizando como marcador o gene SPR.

3. Material e Métodos

3.1 Mosquitos

Os mosquitos utilizados foram os das coletas de 2012 realizadas no estado do Acre, e do município de Engenho Velho em Porto Velho no primeiro semestre de 2007. Outros mosquitos foram doados em colaboração com a professora Dra. Maria Anice Mureb Sallum, da Faculdade de Saúde Pública – USP. (Tabela 1.)

Tabela 1. Lista de espécies de anofelinos e suas localizações utilizadas em uma das análises do projeto.

Espécies	Localização
<i>Anopheles deaneorum</i>	Remansinho - Amazonas
<i>Anopheles benarrochi</i>	Granada - Acre
<i>Anopheles darlingi</i>	Engenho Velho – Porto Velho – Rondônia
<i>Anopheles albitarsis</i> ss – RS10-112	Fepagro – Maquiné – Rio Grande do Sul
<i>Anopheles galvaoi</i> – PR19(2)01	Refúgio Biológico de Santa Helena – Santa Helena – Paraná
<i>Anopheles nuneztovari</i> – RO1-107	Rio Jamari – Monte Negro – Rondônia
<i>Anopheles rondoni</i> – TO3(4)9	Fazenda Tio Jorge – Lagoa da Confusão - Tocantins
<i>Anopheles arthuri</i> A – MG07(06)3	Fazenda Brejão, Sítio Paraíso, Rodovia Frutal Itapegipe Km14 – Frutal – Minas Gerais
<i>Anopheles strodei</i> ss – MG30-102	Fazenda Fortaleza de Sant'Anna – Coronel Pacheco – Minas Gerais
<i>Anopheles oryzalimnetes</i> – Fe01b	Fazenda Experimental – Registro – São Paulo
<i>Anopheles marajoara</i> – MG65-2	União de Minas – Minas Gerais
<i>Anopheles konderi</i> ss – RO18(1)8	Rio Jamari – Monte Negro – Rondônia
<i>Anopheles goeldii</i> – PA7(02)02	São Domingos – Belterra – Pará
<i>Anopheles evansae</i> – SP18-106	Fazenda Santa Gertrudes – Dourado – São Paulo
<i>Anopheles oswaldoi</i> ss – ES08(11)07	Fazenda Marianelli, Lagoa do Macuco – Jaguaré – Espírito Santo

Em outra análise, sazonal, com o gene SPR utilizou-se apenas *Anopheles darlingi*, no total vinte amostras sendo 10 da estação chuvosa e 10 da estação seca. (Tabela 2.)

Tabela 2. *Anopheles darlingi*, quantidade, estação e localização utilizados para o estudo.

Nº mosquitos	Estação	Localização	Coordenada W	Coordenada S
10	Seca-Outubro 2007 (D4)	EngenhoVelho-RO	63° 56' 40,3''	08° 47' 36,4''
10	Chuvosa-Fevereiro 2007 (F)	Teotônio-RO	64° 03' 42,0''	08° 51' 39,5''

3.2. Extração do DNA

Os mosquitos *An. deaneorum*, , *An. benarrochi*, e os *An. darlingi*, foram triturados individualmente com auxílio de um pistilo, em tampão de extração utilizando-se resina Chelex100® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories), preparada a 5% conforme as recomendações do fabricante. Após extração as amostras foram acondicionadas em freezer - 20°C até o momento do uso.

Os outros doados em colaboração foi utilizado o kit de extração QIAgen DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAgen Ltd., Crawley, UK).

3.3 Desenho dos pares de primers

- SPR

A partir da disponibilização da sequência do genoma de *A. darlingi* no GenBank foi possível encontrar o gene do Receptor do Peptídeo Sexual. Tal gene ainda não se encontra nomeado como *Sex Peptide Receptor* e sim como HYPOTHETICAL PROTEIN-AND 08299-Myoinhibitory Peptides (MIPs), uma segunda família do SPR (KIM et al.; 2010).

Dessa informação desenhou-se um par de primer específico da seguinte sequência:

SPR *Anopheles darlingi*

atgaacggtaccaccacggtcgactatgaggtacagcttctgctcgccgtcaatgg
tagctccgaagcgatcggggcgctccctggcggtggcgctttcggtggcctgctct
acgataatctcacaagcagcagctggagctggaggaaccgacggcgaacgacagt
ctgctggcggtggcggtgtcctgctacgacgactaccacccaacgagctgctggt
ggagttcgagttctggatcagtggtcgctgatgaacatcgctcgccctgatcggca
tcctcggtaatatcttctcgatggtgatcctgtcccggccgcagatgcgttccagc
atcaactacctgctgatcgggctagcccgctgtgataccgtgctcatccttacctc
ggtgctgatctttggcctgtgtgcatctatccgcatacgggctacctctactact
accactatcagatctt

- SP

Para desenhar os primers do peptídeo sexual, utilizamos como referência dois genes de *Anopheles gambiae* AGAP009369 e AGAP009370 que são similares ao SP de *Drosophila melanogaster* (MANCINI et al, 2011), e através do banco de dados do NCBI encontramos duas proteínas de *Anopheles darlingi* com alta similiariedade com as de *An. gambiae* que são: HYPOTHETICAL PROTEIN AND-19408 e HYPOTHETICAL PROTEIN AND-06226.

A HYPOTHETICAL PROTEIN AND-19408 possui 4 éxons (em vermelho) e o tamanho do produto final, utilizando par de primer que amplificasse os 3 primeiros exons, seria de aproximadamente 1930 pares de bases. (Figura 2).

agcagcaatc	accgacgtca	ccagcatgaa	gagccaacaa	tccaggaaac	acagggagcg	cagcaccgga	cgtaacaagc
accggttcgaa	gcaaggaccg	aagatgggtcg	acaccggggc	cgagacgacg	ctgctgtcat	tccggttggt	gcgccgtggc
ttcgtacttc	agacgaagga	gttcttcgac	aactccacgc	tgcaagggtg	ccgctacatc	gccgaggacg	gccggccttt
cttcgagcgc	ttcatgtggt	tctgttttgt	tacgttttgt	ttcatcgcg	ccgtcgtcat	cattttcagt	ctgtgggaaa
aattccagac	caatccgacc	atcacgggc	tggaacccga	cttccacaac	cagcagggtca	tcttccccac	ggtgctgtc
tgccccgacc	cacccttcga	cgacgaggca	gtacaccggg	tcgcttacc	ggtgcttggt	gggtacgagg	acggcagtg
cggtgtacgaa	ccgttccctcc	ggctactgac	ccagctgtcg	tacgacagtt	tgccgaggt	ccggccacg	cttagcgatc
taccggctgc	aaccggcacc	ctccgtaccg	ccaacctgcg	tgatctcgtg	ttccagggtg	cagtgccgtg	caatgacacg
tttgccgtgt	gccgggtacaa	ggacgagaa	atcgactgct	gcgacatgtt	caaaccgac	tacaccgagc	acggctctg
cttcgggttc	aatgcccggt	acaccaacag	ctggaatgtg	gagtaagtgt	cgtagagact	agattctggt	ccggaagtcc
ctgtagctga	ctctcctctt	ccttgtctct	tctgcttcca	ctgtctcctg	ttcagaaccc	ttaacaccga	agtgcacgtg
ctgttcgaga	cggacaagaa	gtggggcctc	acgttcgagc	cacttcgcga	gtcgacatc	ttcgtgcat	catacaacga
aattttctggc	tggtgatttc	aacccaggt	gctgtgggat	attgactcga	aggctcaggt	tctcatctcg	atgaagcaaa
cgatatacgac	cgatgacgag	cagcagctat	caatcgccca	gcggaagtgc	atatttcctg	aggagagaaa	gctgcaattt
taccaggacg	cgtagacttt	ctctggctgt	atgaaggagt	gccggatcgc	caagagcctg	cagttctgca	aatgcgtacc
gccgttttac	gcacccatcc	gctcgataac	tatttgcggg	gtcgcccaac	tacctgcct	aagcagtagc	acggacaaca
tcactaacat	ccacagctgc	cagagctcgc	aactcgctgc	ctcaaacacc	gtgtacgaca	tcgagaagta	ctccaagatg
tgctgacatc	agcggcacgg	ccaggcacac	atattcgttg	cgatgtacat	tgcttttttg	tcattacagc	ataagaacgg
aggaggagca	acaagaagcg	caggtcacga	tcgagtatct	gacctggccg	atcatacgtc	acaagcgcca	ggtgctgttc
ggctgggtcg	acctgctagt	gtcgttcggt	ggaatagccg	gcctgtttct	cggttcagc	ctcctgtccg	gcgtcgagat
aatctatttc	ttcactatgc	gcaccttttg	tatggttcac	aagaaccgcg	acgagctggt	ggcaatcgag	cgacagaaga
gcatacaagc	ggtacgacac	atcgagctcg	gtctacggcc	tgctcagcga	cagcggcagc	agcaacatac	ccaaacggat
agggcagacc	agaagcgggt	acaggagcag	cagatgctta	tcaaactgat	ctcacacgat	gccaaactgc	tgtaagttaa
tcgaatggaa	catttcaacg	cacatcagta	cgcaagaag	cggatgccgc	ctccgcgaca	ccgcgtcaga	tcagacgagc
aagtgtcggc	acgcggaacc	gtacacgaca	gctacgttta	ccatggtttt	ttgccctgag	tcaacacccat	tgaacgtaac
aaattgatgc	atttcctgtgc	ttccacacga	gagtgagaac	tctccctttg	agagcatgag	atcttgaaca	aacatagcac
aaaaaaaaat	agttcagaca	caaaccaatt	tgtttatgtc	ctagcttaac	ctagcttttg	cgagttttca	agttctctca
aattaagagt	tctcctaatt	ctcgtgtgcc	tgtggaagca	cggttatagt	ggcaaaactag	tgcatgcca	acgtttgtga
aaacggaaac	tcttttccact	ttaccagcac	tattccaacg	cgccgcgcata	tatatatata	tatatatata	tatatatata
tatatatata	tatatatata	tatatatata	tatatatata	tatatattta	cacaacggcc	gttcaaaatg	tctgctaaaa
cctttttttt	ttgtgctgca	ctccggataa	gaatcgctga	gatgtgattt	gtagccatat	tcaaatgcga	tgcatcatg
tcctttttat	cacgaattta	aacaacacg	ttaatcttgc	ggtagtaaat	aagatcgtag	ttactgctcc	caatcaattt
ctactgctta	ctgcaatcat	ttttattgtt	ggcttgatga	aaatcttata	agtagagatt	tgtagatact	atctctattt
aagctgaact	ttcatttgta	tgtgggaagc	cattttgcac	gaagggttat	ccatcgattt	ccactccca	cccctctctc
ttttttttct	ctctctttct	ctttctctct	ctctctctct	ctctctcgt	tggtatccaa	gtaaaaaaa	ccagtatcca
atcatccaat	attgaagaaa	taaaacaata	caagtctgtg	tttcctcggg	cagtcctgat	cggtactac	ccatttgaca
gaaggtatat	gaaaccgggt	ctattaacgc	ttaatagacc	cgtcgccaga	acaatttcgg	gtctatttaa	caataataga
cccggttgca	tacattttgt	catacgggca	ccattcaatt	tcgattttaca	taagacttca	acgacttacc	ccaatcaaaa
gcagcagaaa	taacgaattt	cattcatacc	acatcaatcg	gccggctgat	agagtcagcg	tggttcttta	tgtggcttgc
gcgaattcaa	tcaatccaag	cctcaaggat	gcttgctttt	ccgcgtctca	atgaccccg	tcggaagtta	tcataaacac
tcgatggaa	ctattgttat	gattacctgt	gagaacgaat	gaaccactca	gttatgactc	tcgtgtgact	tgacgttaac
cgaatgttcg	atacagcgcc	gatgtgagct	ttctctaagg	ggaagactag	aatatttagt	agtaataata	gtagttgact
aatagtagtt	gacctatttt	acttccgaaa	gtttatcgac	aaaaacgcgc	aattgaattc	aagctgaaca	gagcaaatca
cataagcgct	ctattgttca	cattcgttta	atcgaacaac	atcaaacggc	tcaaaagtga	tctataatca	ctatgatgtc
tcaccaggca	ctcactctgc	tgtcgttggt	tggtgcgcaa	tgatttttat	tcattatttc	cagcagaaca	tattttactt
ggggtgggtt	gtgatgtgtc	aaggttttgt	tccttaacac	caacgagaaa	acggaataat	atatagtttt	aaaattgatg
ttttttttct	ttttctcaag	atccttattc	tatttcatgg	tacggctatc	ttattcctat	ctgctattgt	atccccctcc
ttgacaacct	aataccagat	tgctctagtc	tatctaaatc	taacctgcta	gacaagaaat	aaatcgttcg	gacgtgacac
catcacaatt	tgaattcgcc	agatgtcagt	agtttctagg	aacctgtttt	tataaataaa	aagacttaaa	tttctgttcc
agggttgcat	accaggggat	tgagaacttt	tatttacaat	atttcaaaat	taattgtgaa	aaggagttac	tatacttgca
caacgcagaa	agctcactaa	tactatacga	atcttatgag	aatggcctcg	aaatgaattc	aaaggaaatt	gtcataaatt
tgcaaaaact	ggtcacatcc	ttgcaagtgt	tcattagaga	ccaatacgtt	tgggaccatc	attctaaaa	agaatggact
gctgcaacaa	atcgattcat	acaatgagca	caacggaat	aactgcacca	actatgtttt	aatgactatc	tgtgcttcgc
aattataact	atcaaatgat	gtgtcactat	ctatcgcaaa	atcgtagagt	acaggcgtct	taaggacgta	ccacaaatca
tacggtttgca	gtccctgtgt	ttttgatttt	ggattcatgg	atgaaaagaa	agcagatgaa	ttcaggccat	gggtgaaaca
ttgaattaag	atagacgtta	cgaagttaga	gaaccaatcg	cgcttgattt	caataagaac	gtactgataa	ttctgtcctc
ggtgttagaa	ttttagtatc	attacaactt	gggtttctct	tataactaaa	agagatataa	tctgtcgtca	atttatacaa
tattttgtatt	ttatgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	tggaataaac	tggaaaggcc	ttgtagaacg	gatgcaactg
gtatacgttc	caatagaacc	atgcttaag	atattttctt	tcccgtatg	tcctggtgaa	caatacaaaa	aagtaccaca
agccacatgc	ataattatat	gacaaatcgc	tgaatgacga	cgacgaatgc	ataattatat	gatgctaaaa	tgtcgtggtg
ctgcctctct	ctctcccttt	ctctcatttc	ttcctcttca	tcacttgaac	atcttctaac	atggcgggca	atgctgtttg
taggggtgtat	gacgaggctg	acgcccgcta	cctccaccac	cgctgtgctt	accaccccca	tatccaccag	cagcacctgg
agaaaaataa	tgtaagacaa	tgattagcca	cacaaacgat	aatttgatat	gatatagaat	cggtaaatcg	tttaacaaac
cgatagcact	cgtaaaacta	attcaaacag	ataaattatg	cagccaccca	aaaatcgtaa	tacatattta	aaataataaa
acggaaaact	cgatattatt	ccttcagctc	caaagcaatt	aaatctcctg	tcctgtttac	ttaatgtgga	catttacaaa
attcccttgt	atttttgtaa	ctaaaatag	caattattgg	aactaaaata	ggctaagtta	tcagtcttct	ttttaacta
	ctccattttt	aaagaaagat	aatgtaagcg	agtaaatgga			

Figura 2. Parte do contig da HYPOTHETICAL PROTEIN AND-19408 de Anopheles darlingi. Em destaque os 4 exons os quais os primers foram baseados.

Já a Hypothetical Protein AND 06226 possui 3 éxons e o tamanho do produto final, utilizando o par de primer para amplificar tudo, seria de aproximadamente 2500 pares de bases. Devido ao tamanho muito grande dessa última proteína, desenhamos outros pares de primers que amplifique separadamente os exons. (Figura 3).

cttccttgga	tccttctaca	agatccggtt	cataccagct	gctgctgccg	aatcatgacc	tcgcaactggg	aagacttcta
cgccaacgc	ctgccgccga	actgcttcga	ggacaatcga	tccttgctga	aggaattctg	tgaccgccac	tacaagctga
agagtcacat	cgtcctcgtt	acggtaatg	ccttcgtatc	cttccttttg	caagctttct	gcagtagtgc	tgcgacgggg
caccgggaaa	tgggctactc	ccggcgccga	tctgagaaaa	atcctatcat	catccttgca	agggttaatc	gaggagggat
aggactgtgc	gggatgaagt	aggattatca	taaaacgggg	aaacgctgtg	tccttctcgt	cgtggcacac	gccgcttgaa
agagtctatt	ataatgtcat	tagaataattt	taaccgactc	ccatctaacg	ggcatgctgg	ctagcttaata	gtaatcgag
tgtgcccgcg	ctagtagcct	ctggtctgct	ggtctaagca	aggagttcga	taatagcctc	ctggcacaaa	ccccaggacc
ttggcaacag	gtggtaacga	gcctccgctg	tggaggcgcc	gcgagtgccg	aaaagcacgt	ctgacctccg	tcgggattcg
tcgagcatta	tggctgcagct	gattgacatt	ggtgggcat	ctccaggaca	acggtacata	aaagaaggag	tgagactcgg
atgtccggaa	tgagattgag	ttcatacgaa	tttggggtgg	tttttcttct	atgaataaaa	tatcatgcgg	ccatttatgt
gcgatcgttt	ccggcgccgt	aagcaccacc	ttccaatacg	ccagcgccac	tgttgagggt	gttacttagc	cgggccatgt
gacggtactc	aactcgtaaa	gttgaatcaa	cgctctctct	tccttctctc	ggtgagaagg	aaatggctcc	tactaccaag
agtgggtccac	ccaccgggtg	ctaaatggaa	ggtttggggt	ttgagggtat	gtccacgggtg	cggtccttgc	gttactgcaa
tactagcaat	tgattccggg	cgttggaccg	actgtgccta	ctctgaatgt	aattaaaagg	ctcgtgtgat	ttatatgtgc
caatccggtc	catccgtaga	ggctgttcca	aattgcattg	aaacgcgacc	ttgaattagc	gagaattatt	cctcttcttt
tttcatcccg	tgtgctccat	tcgggaatca	tcattgcaaca	gtttatttat	ttattttatt	atatgtatat	ttatattttt
taattttatt	atatttaatt	taatccgccc	aaaagggcga	acatatccga	tggaaacagt	tggaaacagc	aaagtcttgg
atcgtgttgc	ctaggtccga	gtagcatact	atgcccaggt	gttgcaaaact	gcataatcgt	ttcatcttga	ttccgatatc
cccaagttca	aaactatagt	agaggaataa	aatctataaa	aaaatgcgat	agataactcat	atactagata	gatacagata
ctttatcagc	agcttcatca	gaaaggagtg	caaggagtgt	gaatagtgtt	tgagaaacac	tttgctttta	attcccataa
aaaccocctac	aatgcagtta	ctatttttta	taaaaaatcg	tttttctaca	tttaaaacat	ttaagccaat	ttaacttatt
tcaacaattt	gacacccaat	ttggctagct	tcagataata	ttgatttgag	tttacatata	ttttaatata	cataaagtct
gttcgctggg	gcacttatat	tctaccaaaag	caatcgaaatc	tagggtaatc	catggctcga	acaatatggt	tgaatgttct
aattttgtgc	agagccaaag	gtcacatcgt	tttctcctgg	tcctcagggt	tttcggattg	aatacgcact	cttttcatth
atcacctacc	ggacagacac	cggggtcaa	aatggtataa	caaaggcatg	caacataggt	tttttggctc	gcttttggct
taagaatagc	atcagaatagc	cacaatcgcc	cggctagtct	tcgataaacc	cgatgttgct	ggcagtgctg	cgaaaagata
ttttcttctg	tgccatttgt	gtaggcgcca	cgtgggggag	ccctcaaggg	agatatatac	ggtaggccat	tcattggacga
gcttttggtat	aacttgggac	gtatctgatg	aatgtaattg	agggaaacttc	ttcggaataa	gaattcaaa	ttggtagtga
cagcccagcg	gtgctccgat	agcattccca	acagtgcgcg	agcatcttaa	tatacttgat	tttacagccg	ccatacatat
catctaaca	taatttggtt	ctttttgcat	ttcttccctt	tcagtcggga	ggtacaactg	ttccactgga	gcacaacaca
gttcgattcg	tcgataaact	tagtgccggt	aaccgtgggt	ccgcatcgcc	agaatacttt	ctcgaaacag	gctatgcggt
gatcttcatg	catcgtacaa	aatcactaga	accattttcg	cgctcaactc	ctggccagca	gttgctcgat	atgctggagc
tacacgagga	gggcatgagt	accaccatca	caggtaggtt	gtgtccatat	ccttacctcc	gttctcaaa	tcgaattatt
atgaaggagc	attggacaaa	cattgaacca	ttactgtctc	ttgatcgtgc	tcgtgtgtga	taaacgcgag	tgcttcagac
gaagcaacgg	tgcattgcga	cattccttca	tcgacaactt	tattaaatta	tggcttcac	ctaattaaaa	ctcaggatac
aggaaggcac	tgaagtgcac	ttgcataata	atatggtcct	gttatgcgaa	acggcgctga	actgtagagt	tttttctttt
tttttcaaaa	gcattttgat	attacaatgt	tagaaaattg	aaagtaattg	agttttcaaa	cttttacggt	tgcttttctt
gtgctgtttg	tggctttgct	cgtgtgtgat	aaaagctgtc	tgtttagtga	gagctgcgat	tttaacattt	acgttctctt
attttttcca	gttaaaccag	actcggtaga	cgtgctggca	ccggtgctcg	ataagtataa	gaatgcccat	gagacgcac
ggatgctgta	catcaccttt	accagcgtgg	tcgattatat	gtggttactg	cgtgcggcct	gtgaatcatt	ggcacggtt
gagcgaaacg	cagtactctt	cctagccgcg	gccgtatctg	acttttacgt	accgcaagat	gaaatgcccc	cgcataagat
ccaatcgggg	cacggagcac	cgacgatatc	gttgcaattg	gttcggaaga	tgcttgcccc	gttggtgagc	ctttgggtac
cgcatgctta	cgtcgtatcg	tttaagctcg	aaacggacga	ggcgctactg	atcgccaaat	cacgcgaaag	tctcaacaag
tataagcaca	aactcgtcat	cgcaacata	ctgcagacac	gtaaaaatcg	ggtggtgttc	gtaacaccaa	acagtaacta
cgaaatcgta	ctgacaaaag	accaggcccc	caccgggctc	gagatcgagg	aaccgatgtg	tgctgatgtg	gtgcgcggcg
atcaggatta	tgtgcgcgaa	cctgagcagc	aaacgcaatg	accaacgcgc	tcgaccggca		

Figura 3. Parte do contig de HYPOTHETICAL PROTEIN AND-06226 de *Anopheles darlingi*. Em destaque os 3 exons os quais os primers foram baseados.

- *White gene*

Gene nuclear bem caracterizado e muito utilizado como marcador molecular. A sequencia do primer utilizado foi segundo Zwiebel *et al.* (1995). Esse primer amplifica apenas uma região de exon.

3.4 Teste dos primers

-SPR

Devido a um trabalho anterior, o par de primer de SPR já estava padronizado. Os reagentes e concentrações utilizadas foram: 11,7µl de água de injeção, 0,6µl de tampão PCR Rxn Buffer (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,4µl de dNTP Set (100mM) (GE Healthcare®), 1µl primer F, 1µl primer R, 0,1µl de Platinum® Taq (5u/µl), 1ul de DNA totalizando 20µl de reação.

O termociclador utilizado foi DNA Engine® (Bio-Rad®) e a ciclagem utilizada nas reações foi:

- 3 minutos 95°C – ativação da Taq
 - 45 segundos 95 °C – desnaturação
 - 45 segundos 59,1 °C – anelamento do primer
 - 45 segundos 72 °C – extensão da fita
 - 5 minutos 72 °C – extensão final
- 

Após a PCR os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%, corado com gel RED (UNISCIENCE®) e utilizado marcador de 100pb (Ludwig Biotec).

-SP

Foram feitos testes de gradiente de temperatura de 50°C a 60°C. Utilizamos DNA de *Anopheles darlingi*, os pares de primers das duas proteínas e a enzima GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®). A ciclagem utilizada foi a mesma para SPR.

Após a PCR os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%, corado com gel RED (UNISCIENCE®) e utilizado marcador de 100pb (Ludwig Biotec).

- *White* gene

Utilizou-se a padronização da reação segundo Foster *et al.* (2013). Os reagentes e concentrações utilizadas foram: 13,3µl de água de injeção, 2,0µl de tampão PCR Rxn Buffer (10x), 0,8µl de MgCl₂ (50mM), 0,4µl de dNTP Set (100mM) (GE Healthcare®), 1µl primer F, 1µl primer R, 0,5µl de Platinum® Taq (5u/µl), 1ul de DNA totalizando 20µl de reação.

O ciclo utilizado no termociclador foi:

- 3 minutos 94 °C – ativação da Taq
- 30 segundos 94 °C – desnaturação
- 1 minuto 50 °C – anelamento do primer
- 2 minutos 72 °C – extensão da fita
- 7 minutos 72 °C – extensão final

} 35x

Após a PCR os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%, corado com gel RED (UNISCIENCE®) e utilizado marcador de 100pb (Ludwig Biotec).

3.5 Reações de PCR

Após a padronização, foram feitas as reações de PCR com as diferentes espécies de anofelinos tanto para SPR quanto para SP de anofelinos.

3.6 Análise das amplificações

Os produtos foram visualizado no aparelho de Eletroforese Capilar QIAxcel Advanced® (QIAGEN) e gel de agarose 1% para confirmação da amplificação e seus tamanhos.

3.7 Purificação

Para as amplificações que foram positivas, utilizamos a enzima ExoSAP-IT® (USB®) utilizando o termociclador DNA Engine® (Bio-Rad®) com o seguinte ciclo:

- 1 hora 37°C
- 20 minutos 80°C

Algumas amostras foram purificadas diretamente da banda do gel de agarose. Recortou-se a banda do gel, a banda foi armazenada por 20 minutos no freezer -80°C e depois centrifugada por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante.

3.8 Sequenciamento

As amostras purificadas foram submetidas ao sequenciamento para confirmação da sequência. Foi utilizado o aparelho de sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante.

3.9 Alinhamento e desenho das árvores

Para a visualização das sequências foi usado o programa MEGA 5.2.2 e para o alinhamento o programa ClustalX. Para as análises filogenéticas utilizamos os softwares Phylip.695 e ClustalX. As árvores foram geradas pelo programa TreeViewX.

4. Resultados

4.1 Amplificações

Como resultado dos testes de padronização da reação de PCR com os dois primers do gene SP com *Anopheles darlingi*, a melhor temperatura encontrada, que melhor os amplificou foi a de 60°C. Já a temperatura do gene SPR foi de 59,1°C que estava padronizada.

Com isso foram feitas as reações de PCR com os três pares de primers (1 SPR e 2 SP) utilizando primeiramente os DNAs de 3 diferentes espécies de anofelinos (*An. deaneorum* e *An. benarrochi*). As reações feitas com o gene SPR foram positivas para todas as espécies, com amplicons de aproximadamente 450pb (Fig. 4). Já as do gene SP foram positivas apenas para o par de primer que amplifica HYPOTHETICAL PROTEIN AND-06226, com amplicons de aproximadamente 1400pb (Fig. 5). Esse par de primer amplifica apenas os dois últimos exons mais o intron entre eles (Fig. 3). Com o par HYPOTHETICAL PROTEIN AND-19408 não foi possível a amplificação em nenhuma outra espécie além de *An. darlingi*, sendo esse não mais utilizado.

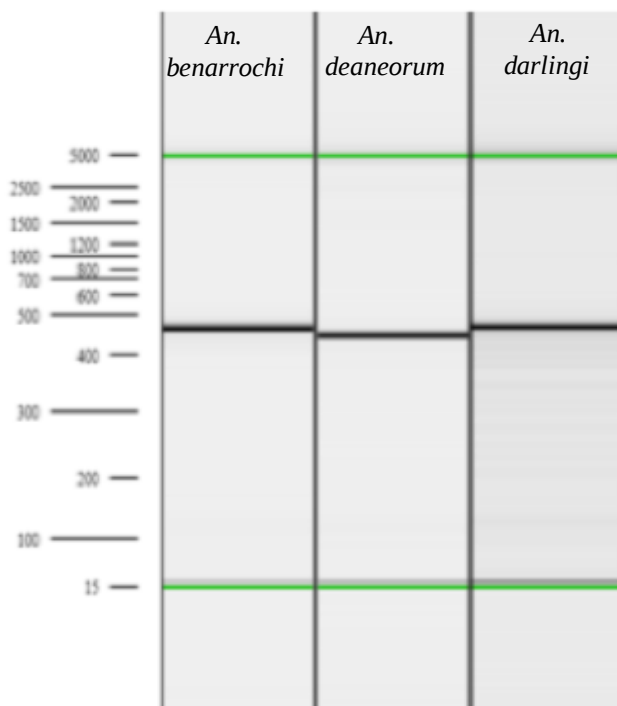


Figura 4. Foto da eletroforese de capilar do gene SPR. Produtos com tamanhos aproximados de 450pb das 5 diferentes espécies de anofelinos: *An. deaneorum*, *An. benarrochi*, e *An. darlingi*.

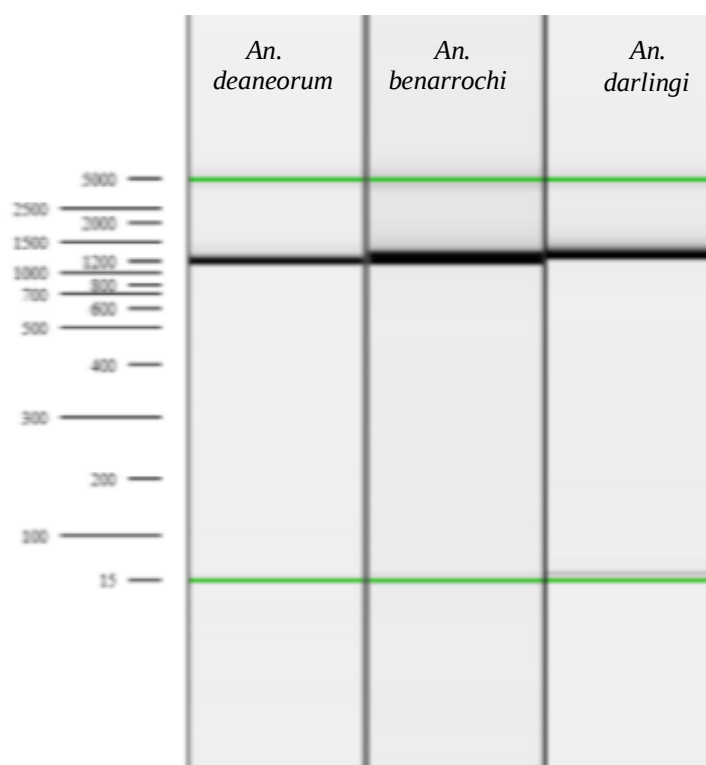


Figura 5. Foto da eletroforese de capilar do gene SP. Produtos com tamanhos aproximados de 1400pb das 7 diferentes espécies de anofelinos: *An. deaneorum*, *An. benarrochi*, e *An. darlingi*.

Posteriormente foram feitas reações com as outras espécies com o primer do gene SPR (Figs 6) e com o par de primer do gene SP (Fig. 7). Notou-se que não foi possível a amplificação com a espécie *An. oswaldoi* para nenhum par de primer.



Figura 6. Foto de eletroforese de capilar com o gene SPR. Produtos com tamanhos aproximados de 500 a 600pb das 11 diferentes espécies de anofelinos: 1-*An. albitarsis*, 2- *An. galvaoi*, 3- *An. Nuneztovari*, 4- *An. rondoni*, 5- *An. arthuri* A, 6- *An. strodei*, 7- *An. oryzalimnetes*, 8- *An. marajoara*, 9- *An. konderi*, 10- *An. goeldii*, 11- *An. evansae*.



Figura 7 Foto da eletroforese de capilar do gene SP. Produtos com tamanhos aproximados de 1300pb das 11 diferentes espécies de anofelinos: 1-*An. albitarsis*, 2- *An. galvaoi*, 3- *An. nuneztovari*, 4- *An. rondoni*, 5- *An. arthuri* A, 6- *An. strodei*, 7- *An. oryzalimnetes*, 8- *An. marajoara*, 9- *An. konderi*, 10- *An. goeldii*, 11- *An. evansae*.

Com o gene *white* foram feitas reações de PCR com as 14 espécies, porém apenas as espécies *An. deaneorum*, *An. benarrochi*, *An. albitarsis*, *An. galvaoi*, *An. nuneztovari*, *An. rondoni*, *An. evansae*, *An. arthuri* A. e *An. strodei* tiveram amplificações positivas.

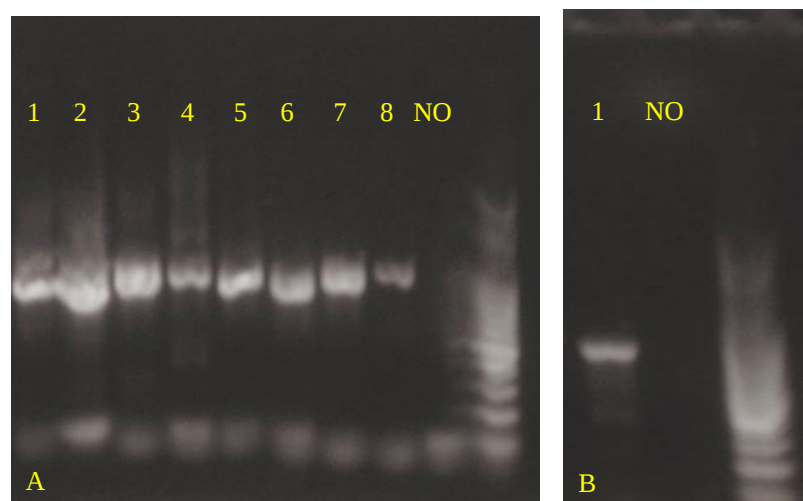


Figura 8. Foto do gel de agarose com os amplicons do gene white. As figuras A e B correspondem ao mesmo gene. Os poços da figura A correspondem as espécies *An. deaneorum*, *An. benarrochi*, *An. albitarsis*, *An. galvaoi*, *An. nuneztovari*, *An. rondoni*, *An. evansae*, *An. arthuri* A, respectivamente. Já na figura B o poço 1 corresponde a espécie *An. strodei*.

Na análise sazonal com *An. darlingi* com o gene SPR, obtivemos resultado positivo para as 20 amostras. As amplificações de *Anopheles darlingi* de estação seca e estação chuvosa foram bem visíveis e sem bandas inespecíficas.

Na figura 9 em cada gel há 5 amostras da estação seca (amostras D4) e 5 da estação chuvosa (amostras F), totalizando 10 amostras de DNA de cada estação.

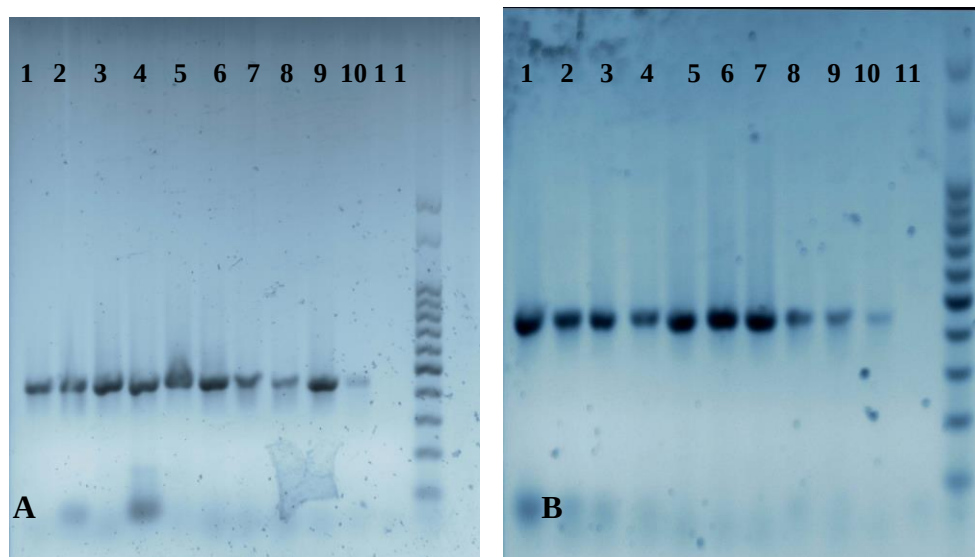


Figura 9. Os poços 1,2,3,4 e 5 da figura A correspondem às amostras D4 (estação seca); os poços 6,7,8,9 e 10 correspondem às amostras F (estação chuvosa). Já os poços 1,2,3,4 e 5 da figura B correspondem às outras amostras da estação chuvosa; e os poços 6,7,8,9 e 10 correspondem às outras amostras da estação seca. Os poços 11 de ambas as figuras A e B correspondem ao controle negativo NO, o que não demonstra amplificação.

4.2 Sequenciamento e Alinhamento

Na fase do seqüenciamento, por mais que o resultado tenha sido positivo para a amplificação (Fig. 6), a espécie *An. strodei* não foi sequenciada para o gene SPR, sendo essa excluída das análises posteriores. No total foram 13 espécies analisadas com o gene SPR e 14 com o gene SP, sendo que o alinhamento do gene SPR possui 212pb, menos da metade do tamanho original do gene. Já o gene SP possui em seu alinhamento 1340pb.

Para todas as sequencias de todas as espécies foi feita edição visual no programa MEGA alinhando-as juntamente com *An. gambiae*, espécie utilizada como outgroup tanto para o gene SPR quanto para o gene SP, e os alinhamentos foram feitos no programa ClustalX. (Fig.10 e Fig. 11).

albitarsis	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTSAAAGGTGTCTGTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGATC
benarrochi	GCGAACGACAGTCTGCTGGCGGC GGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGATC
darlingi	GCGAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCYACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGATC
deaneorum	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGATC
evansae	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGATC
goeldii	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGWGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGAGG
nuneztovar	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGATC
oryzalinne	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGATG
rondoni	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGATC
arthurii	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGAGG
galvaoi	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGATC
konderi	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGAGG
marajoara	GCAAACGACAGTCTGCTGGCGGTGGC GGTGTCTGTCTACGACGACTACCCACC GAACGAG CTGCTGGTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGTGGCGTCGTGATGAACATCGTCGCCCTGAGG
gambiae	ACGAACGAGAGCTGCTGACGGT---CGTGTCTGTCTACGACGACTACCTGCCAACGAG CTGCTGCTGGAGTTTGAGTTCTGGATCAGCGGTGTGGTGTGATGAACATCGTCGCCCTGATC
albitarsis	GGCATCTCGGGCAACATYTTCTCGATGGTGATCTGTCCAGGCCCGAGATGCGTTCAGC ATCAACTACCTGCTGATCGGGCTGGCCCGGTA
benarrochi	GGCATCTCGGGCAACATCTTCTCGATGGTGATCTGTCCAGGCCCGAGATGCGTTCAGC ATCAACTACCTGCTGATCGGGCTGGCCCGCTG
darlingi	GGCATCTCGGGTAATATCTTCTCGATGGTGATCTGTCCAGGCCCGAGATGCGTTCAGC ATCAACTACCTGCTGATCGGGCTAGCCCGCTG
deaneorum	GGCATCTCGGGCAACATTTCTCGATGGTGATCTGTCCAGGCCCGAGATGCGTTCAGC ATCAACTACCTGCTGATCGGGCTGGCCCGCTG
evansae	GGCATCTCGGGCAACATCTTCTCGATGGTGATCTGTCCAGGCCCGAGATGCGTTCAGC ATCAACTACCTGCTGATCGGGCTGGCCCGCTG
goeldii	GCCAGCCCGATCAGCAGGTTGTTGATGCTGAACGCATCTCGGCCCTGGACAGGATCCACC ATCAGAGAAGATGTTGCCAGGATGCCGATCAG
nuneztovar	GGCATCTCGGGCAACATYTTCTCGATGGTGATCTGTCCAGGCCCGAGATGCGTTCAGC ATCAACTACCTGCTGATCGGGCTGGCCCGCTG
oryzalinne	GCCAGCCCGATCAGCAGGTTGTTGATGCTGAACGCATCTCGGCCCTGGACAGGATCCACC ATCAGAGAAGATGTTGCCAGGATGCCGATCAG
rondoni	GGCATCTCGGGCAACATYTTCTCGATGGTGATCTGTCCAGGCCCGAGATGCGTTCAGC ATCAACTACCTGCTGATCGGGCTGGCCCGCTG
arthurii	GCCAGCCCGATCAGCAGGTTGTTGATGCTGAACGCATCTCGGCCCTGGACAGGATCCACC ATCAGAGAAGATGTTGCCAGGATGCCGATCAG
galvaoi	GGCATCTCGGGCAACATYTTCTCGATGGTGATCTGTCCAGGCCCGAGATGCGTTCAGC ATCAACTACCTGCTGATCGGGCTGGCCCGCTG
konderi	GCCAGCCCGATCAGCAGGTTGTTGATGCTGAACGCATCTCGGCCCTGGACAGGATCCACC ATCAGAGAAGATGTTGCCAGGATGCCGATCAG
marajoara	GCCAGCCCGATCAGCAGGTTGTTGATGCTGAACGCATCTCGGCCCTGGACAGGATCCACC ATCAGAGAAGATGTTGCCAGGATGCCGATCAG
gambiae	GGCATCTCGGGCAACATCTTCTCGATGGTGATCTGTCCAGGCCCGAGATGCGTTCAGC ATCAACTACCTGCTGATCGGGCTGGCCCGCTG

Figura 10. Alinhamento feito no program ClustalX com o gene SPR. Foi feito o alinhamento com 13 espécies de anofelinos e *An. gambiae* como outgroup.


```

deaneorum      CTCCTTCCTTGCCTGCGGCGTATCC----GACTTTTACGTACCGCAAGATGAAATGCCTAC GCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGAGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCA
benarrochi     CTCTTCTAGCCGCG--CCGTATCC----GACTTTTACGTACCGCAAGATGAA--TGCT--AC GCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGAGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
darlingi       CTCTTCTAGCCGCGGCGGCGTATCT---GACTTTTACGTACCGCAAGATGAAATGCCTAC GCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGAGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
albitarsis     CTCTTCTAGCTGCGGCGGCGTATCC----GACTTTTATGTACCGCAAGATGAAATGCCTAC GCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGAGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
galvaoi        CTAGTCCCGCGGCGGCGTATCC----GACTTTTACGTACCGCAAGACGAC TCGCCAAC GCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGAGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
nuneztova     CTCTCTAGCCGCGGCGGCGTATCGAC----TTTACGTAC--GCAGGATGAAATGCCTAC--AC GCATAGATCTCTGATCCGCGACACGGCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
rondoni        CTCTTCTAGCCGCGGCGGCGTATCC----GACTTTT--ACGTAC--GCAAGATGAAATGCCTAC GCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
arthur        CTCTTCTAGCCGCGGCGGCGTATCC----GACTTTTACGTACCGCAAGATGAAATGCCTAC GCATA--G---ATCCAATCGGGACACGGAGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
strodei        CTCTTCTAGCCGCGGCGGCGTATCC----GACTTTTACGTACCGCAAGATGAAATGCCTAC GCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGSGGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
oryzalimne     -TCCTTCTAGCTGCGGCGGCGTATCC----GACTTTTACGTAC--GCAGGATGAAATGCCTAC GCATAAG---ATCCA--TCCGGACACG--AGCACGAACGAT--TCGTAAACGCTTGGATTCCG
marajoara      CTCTTCTAGCTGCGGCGGCGTATCC----GACTTTTACGTACCGCAAGATGAAATGCCTAC SCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGAGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
konderi        CTCTTCTAGCCGCGGCGGCGTATCT---GACTTTTACGTACCGCAAGATGAAATGCCTAC GCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGTGCACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
goeldii        GACTTTTACGTACCGAGATGATGGCAGCCGACTTTTACGTACCGCAAGATGAAATGCCAAC GCATAAG---ATCCAATCGGGACACGGCGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
evansae        CTCTTCTAGCCGCGG--CCGTATCC----GACTTTTACGTACCGCAAGATGAAATGCCTAC GCATAAA---ATCCAATCGGGACACGGCGACCCGACGATATCGTTACAGTT--GGTTCCG
gambiae        CTGTTTTGGCGTGC--GGCAGTTTCG----ACTTTTACGTACCGCAGGATGAGATGCCAAC GCATAAG---ATCCAGTCTGGGACATGGGCGCCACGATATCGCTACAGCT--CGTGCCA
* * * * *

deaneorum      AAGATGCTAGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATTCAGTCGTCGTATCGTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATCGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
benarrochi     AAGATGCTCCTCCCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTACGTTGTATCTTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTACTGTATCGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
darlingi       AAGATGCTTGGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTACGTCGTATCGTTTAAAG CTGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATCGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
albitarsis     AAGATGCTTGGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTGTCGTATCGTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATCGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
galvaoi        AAGATGCTCCTCCCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTACGTTGTATCTTTTAAAG CTGAAACGGACGAAGCGCTACTGTATCGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
nuneztova     AAGATGCTTGGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTATGTCGTATCTTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATCGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
rondoni        AAGATGCTTGGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTATGTCGTATCGTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATTGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
arthur         AAGATGCTTGGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTATGTCGTATCTTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATTGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
strodei        AAGATGCTTGGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTATGTCGTATCTTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATTGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
oryzalimne     AAGATGCTTGGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTATGTCGTATCTTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATTGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
marajoara      AAGATGCTTGGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTATGTCGTATCTTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATTGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
konderi        AAGATGCTCCTCCCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTACGTTGTATCTTTTAAAG CTGAAACGGACGAAGCGCTACTGTATCGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
goeldii        AAAATGCTTGGCCCGCTTGGTGAGCCCTTTGGGTACCGCATGCTTATGTCGTATCTTTTAAAG CTCGAAACGGACGAAGCGCTACTGTATCGCCAAATCGCGGAAAGTCTCAACAAGTATAAG
evansae        AAAATGTTGGCCCGCATCTGTAGCCCTCTGGGTGCCGACGCGTACGTCGTGCTGTTTAAAG CTGAAACGGACGAAGCGCTGCTGATTGCCAAGTCTCGCGAAAGTCTTGAACAAGTATAAG
gambiae        * * * * *

deaneorum      CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTATTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
benarrochi     CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
darlingi       CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
albitarsis     CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTATTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
galvaoi        CACAAGCTGGTCTATTCGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
nuneztova     CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
rondoni        CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
arthur         CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
strodei        CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
oryzalimne     CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
marajoara      CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
konderi        CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
goeldii        CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
evansae        CACAAGCTGGTCTATCGGGAACATACTGCAGACACGTA AAAAACCGGGTGGTCTTCGTAACA CCGAACAGTAACCTACGAGATCGTGTGACAAAAGGACCGAGCCCA--CACCGGGCTCGAGAT
gambiae        CACAAGCTAGTGATCGCAATATACTGCAGACGCGCAAGAACCGCGTTGTGTTCTGTGACG CCGACAGCAACCTATGAGATCGTGTGACCAAGGATCAGGCGCT--GTCGCGGCTCGAAT
* * * * *

deaneorum      CGAGGAACCGAT
benarrochi     CGAGGAACCGAT
darlingi       CGAGGAACCGAT
albitarsis     CGAGGAACCGAT
galvaoi        CGAGGAACCGAT
nuneztova     CGAGGAACCGAT
rondoni        CGAGGAACCGAT
arthur         CGAGGAACCGAT
strodei        YGAGGAACCGAT
oryzalimne     CGAGGAACCGAT
marajoara      CGAGGAACCGAT
konderi        CGAGGAACCGAT
goeldii        TGAGGAACCGAT
evansae        CGAGGAACCGAT
gambiae        AGAAGAACCGAT
* * * * *

```

Figura 11. Alinhamento feito no program ClustalX com o gene SP com *An. gambiae* como outgroup. Foi feito o alinhamento com 14 espécies de anofelinos. Possui exon e intron. A região sequenciada possui 1332pb sendo que a região de intron corresponde do par de base 187 a 796.


```

An. deaneorum\      GCGCCGATAMCCGGTACCATCGATACCCCTCCATCGGTGCGAGAAAGTACGGATACG--- GTGGCGTGCTTGTCTGTGGCGTGCTCTTTGGCCAGCTCATGECACCGGTGGCACCACCG
An. benarrochi\    CCCCACCGGAGAGCGCATCGAGATGGAGGAGCTGGCGCAGG--AGATGAGGTACCCGAAC  GAGGTGGACACGTTGGCCACGAGCGTCACGATGAACAGAGTGGTGA--GATAGTGCCT---
An. albitarsis\    TCCACCGACAAAGCCCATCGAGATGGAGGAGCTGGCGCAGG--AGATGAGGTACCCGAAC  GAGGTGGACACGTTGGCCACGAGCGTCACGATGAACAGCGTGGTGA--GGTAGTGCCT---
An. galvaoi\       TCTCGGAAACCGCTGCGATCGAGATGGAGGAGCTGGCGCAGGACTTTGAGGTACCCGAAC  GAGGTGGACACGTTGGCGACGAGCGTCACGATGAACAGCGTGGTGA--GGTAGTGCCT---
An. nuneztovari\   CCCCCACGACAAAGCCCATCGAGATGGAGGAGCTGGCGCAGG--AGATGAGGTACCCGAAC  GAGGTGGACACGTTGGCGACGAGCGTCACGATGAACAGCGTGGTGA--GGTAGTGCCT---
An. rondoni\       CCCCACCGACAAAGCCCATCGAGATGGAGGAGCTGGCGCAGG--AGATGAGGTACCCGAAC  GAGGTGGACACGTTGGCGACGAGCGTCACGATGAACAGCGTGGTGA--GGTAGTGCCT---
An. evansae\       CCCCACCGAAGAGCGCATCGAGATGGAGGAGCTGGCGCAGG--AGATGAGGTACCCGAAC  GAGGTGGACACGTTGGCGACGAGCGTCACGATGAACAGCGTGGTGA--GGTAGTGCCT---
An. arthuria\      CCCCACCGAGAGCGCATCGAGATGGAGGAGCTGGCGCAGGACTATGAGGTACCCGAAC  GAGGTGGACACGTTGGCGACGAGCGTCWYGATGAACAGCGTGGTGA--GGTAGTGCCT---
An. strodei\       * * * * *
An. deaneorum\    TTAAATGTCGACGCCGTTTCGAGGATGTCCTGGCGATCGGGCTGACCGGAACGAGTGC  CAGATCTTTTGTATGCTCTCCCGGCACTCGGTTTCTCTGT---TCGGTGCCGAAGGGCC
An. benarrochi\   --AACGCTCGCTTCAGCCCAATCATCGGTACGTGATCGAGGTGAAGACGAACGGGACG  CGATGAAC--AGCGGCGCTCGGCGATCGTTTTCGCGAGGAAGTAGGTTGCGACCGGT
An. albitarsis\   --GACGCCCGCTTCAGCCGATCATCGGTACGTGATCGAGGTGAACACGAACGGAAAC  GCAATGAAC--AGTGGCGAGCTCGGCGATCGTTTTCGCGAGGAAGTAGGTTGCGACCGGT
An. galvaoi\      --ACGCCCGCTTCAGCCCATCTCTTTCTGATGTCGATCGAGGTGAAGACGAACGGGACG  GCAATGAAC--AGTGGTAGCTCGGCGATCGGTTTTCGCGAGGAAGTAGGTTGCGACCGGT
An. nuneztovari\  --AACGCCCGCTTCAGCCGATCATCGGTACGTGATCGAGGTGAAGACGAACGGGACG  CGATGAAC--AGCGGCGAGCTCGGCGATCGTTTTCGCGAGGAAGTAGGTTGCGACCGGT
An. rondoni\      --AACGCCCGCTTCAGCCGATCATCGGTACGTGATCGAGGTGAAGACGAACGGGACG  CGATGAAC--AGCGGCGAGCTCGGCGATCGTTTTCGCGAGGAAGTAGGTTGCGACCGGT
An. evansae\      --AACGCCCGCTTCAGCCCAATCATCGGTACGTGATCGAGGTGAAGACGAACGGGACG  CGATGAAC--AGCGGCGAGCTCGGCGATCGTTTTCGCGAGGAAGTAGGTTGCGACCGGT
An. arthuria\     --AACGCCCGCTTCAGCCGATCATCGGTACGTGATCGAGGTGAAGACGAACGGGACG  CGATGAAC--AGCGGYAGCTCGGCGATCGTTTTCGCGAGGAAGTAGGTTGCGACCGGT
An. strodei\      * * * * *
An. deaneorum\    ATCGAAGATGGAAGGAGCTGGCGCAGGAK--ATGAGGTACCCGAACGAGGTGGACAGTT  GGCCACGAGCGTCAKWTGAACAGCTGCGAGAGTAGTGCAGAGCGCCCGCTTCAGTC
An. benarrochi\   ACAGCGCG--GAACGCTTCTCGCGCAAAACACGGGCGAGCTCGGCCGAA--ACACGTT  GATCACGCGCAACAGTTCTGGAAGGTGATGTTGGTGAGGAACAGAAACAGCGGAACATT
An. albitarsis\   ACARCCG--GAGCGCTTCTCGCGCAAAACACGGGCGAGCTCGGCCGAA--ACACATT  GATCACGCGCAACAGTTCTGGAAGGTGATGTTGGTGAGGAACAGAAACAGCGGAACATT
An. galvaoi\      ACAGCGG--GAACGCTTCTCGCGCAAAACACGGGCGAGCTCGGCCGAA--ACACGTT  GATCACGCGCAACAGTTCTGGAAGGTGATGTTGGTGAGGAACAGAAACAGCGGAACATT
An. nuneztovari\  ACAGCGG--GAACGCTTCTCGCGCAAAACACGGGCGAGCTCGGCCGAA--ACACGTT  AATCACGCGCAACAGTTCTGGAAGGTGATGTTGGTGAGGAACAGAAACAGCGGAACATT
An. rondoni\      ACAGCGG--GAACGCTTCTCGCGCAAAACACGGGCGAGCTCGGCCGAA--ACACGTT  GATCACGCGCAACAGTTCTGGAAGGTGATGTTGGTGAGGAACAGAAACAGCGGAACATT
An. evansae\      ACAGCGG--GAACGCTTCTCGCGCAAAACACGGGCGAGCTCGGCCGAA--ACACGTT  GATCACGCGCAACAGTTCTGGAAGGTGATGTTGGTGAGGAACAGAAACAGCGGAACATT
An. arthuria\     ACAGCGG--GAACGCTTCTCGCGCAAAACACGGGCGAGCTCGGCCGAA--ACACGTT  GATCACGCGCAACAGTTCTGGAAGGTGATGTTGGTGAGGAACAGAAACAGCGGAACATT
An. strodei\      ACAGCGG--GAACGCTTCTCGCGCAAAACACGGGCGAGCTCGGCCGAA--ACACGTT  GATCACGCGCAACAGTTCTGGAAGGTGATGTTGGTGAGGAACAGAAACAGCGGAACATT
An. deaneorum\    CAW--TYWTYGGGTACGTGATCGAAGTGAACGGAACGGAACGCAATGAACAGTGGCAG  CTCKGCGATCGT
An. benarrochi\   GATGTTTCATCACG--GTCTTGGTCGAGCACTTGGCCGAAGTAG--ATGGATCCGATGAG  CGAGGCCACCAT
An. albitarsis\   GATGTTTCATCACG--GTCTTGGTCGAGCACTTGGCCGAAGTAG--ATGGATCCGATGAG  CGAGGCCACCAT
An. galvaoi\      GATGTTTCATCACG--GTCTTGGTCGAGCACTTGGCCGAAGTAG--ATGGATCCGATGAG  CGAGGCCACCAT
An. nuneztovari\  GATGTTTCATCACG--GTCTTGGTCGAGCACTTGGCCGAAGTAG--ATGGATCCGATGAG  CGAGGCCACCAT
An. rondoni\      GATGTTTCATCACG--GTCTTGGTCGAGCACTTGGCCGAAGTAG--ATGGATCCGATGAG  CGAGGCCACCAT
An. evansae\      GATGTTTCATCACG--GTCTTGGTCGAGCACTTGGCCGAAGTAG--ATGGATCCGATGAG  CGAGGCCACCAT
An. arthuria\     GATGTTTCATCACG--GTCTTGGTCGAGCACTTGGCCGAAGTAG--ATGGATCCGATGAG  CGAGGCCACCAT
An. strodei\      GWTGTTTCATCACG--GTCTTGGTCGAGCACTTGGCCGAAGTAG--ATGGATCCGATGAG  CGAGGCCACCAT

```

Figura 13. Alinhamento feito no program ClustalX com o gene white. Foi feito o alinhamento com 9 espécies de anofelinos. A região sequenciada possui 432pb.

Na análise sazonal, das 10 amostras da estação seca apenas uma não foi sequenciada, e das 10 da estação chuvosa todas foram sequenciadas com sucesso. Portanto, o alinhamento ocorreu com 19 amostras.

Após a edição visual, o programa CLUSTALX 2.1 nos deu o seguinte alinhamento e gerou a árvore:

```

C9      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCTACCGAACGAGCTGCTG
S10     GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCTACCGAACGAGCTGCTG
S6      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCTACCGAACGAGCTGCTG
S7      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCTACCGAACGAGCTGCTG
S4      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCTACCGAACGAGCTGCTG
S5      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
C3      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
C5      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
C4      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
C7      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
C10     GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
S1      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCCACCGAACGAGCTGCTG
C2      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTGTCTGCTACGACGACTACCCACCGAACGAGCTGCTG
C8      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTSTCCTGCTACGACGACTACCTACCGAACGAGCTGCTG
S2      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTSTCCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
S3      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTSTCCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
S8      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTSTCCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
C1      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTSTCCTGCTACGACGACTACCCACCGAACGAGCTGCTG
C6      GACAGTCTGCTGGCGGTGGCGGTSTCCTGCTACGACGACTACCYACCGAACGAGCTGCTG
*****

```


C9	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
S10	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
S6	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
S7	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
S4	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
S5	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
C3	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
C5	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
C4	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
C7	TTTGGCCTGGGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
C10	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
S1	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
C2	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
C8	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
S2	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
S3	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
S8	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
C1	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC
C6	TTTGGCCTGTGTGCGATCTATCCGCATACGGGCTAC

Figura 14. Alinhamento das sequencias de *Anopheles darlingi* de estação seca e estação chuvosa. As linhas com iniciais S referem-se a estação seca, e as que possuem iniciais C correspondem a estação chuvosa.

Como resumo dos primers utilizados e suas características, foi feita uma tabela para melhor compreensão. (Tabela 3).

Tabela 3. Primers utilizados nas análises, suas sequencias, tamanhos, se possuem regiões de intron e a quantidade de pares de bases que foram seqüenciadas.

Primer	Sequencia	Intron	Número de pares de bases	Número de pares de bases sequenciados
Receptor Peptídeo Sexual	5' GGTGGCCTGCTCTACGATAA 3' 5' GTAGCCCGTATGCGGATAGA 3'	Não	~450pb	212pb
Peptídeo Sexual (análise 1)	5' GGAGGTACAACGTGTTCCACTG 3' 5' TCAGGTTTCGCGCACATAAT 3'	Sim	~1400pb	1340pb
Peptídeo Sexual (análise 2)	5' GGAGGTACAACGTGTTCCACTG 3' 5' TCAGGTTTCGCGCACATAAT 3'	Sim	~1400pb	639pb
Nuclear <i>white</i> gene (WZ2E e WZ11X)	5' AAYTAYAAAYCCIGCIGAYTTYTA 3' 5' TTIARRAARAAICCCICCAA 3'	Não	~700pb	433pb

4.3 Árvores filogenéticas

Conforme o programa utilizado (Phylip) as sequencias de nucleotídeos foram montadas em arquivos diferentes e utilizadas para cada análise específica. Foram feitas três análises no Phylip: Máxima Verossimilhança, Neighbor-Joining e Parcimônia. Como outgroup foram utilizadas as espécies *An. gambiae* e *An. cruzii*.

O número do bootstrap foi 1000 repetições. As árvores e os valores de bootstrap gerados pelas análises dos genes SPR e SP foram:

- Máxima Verossimilhança (Figs. 15 e 16)

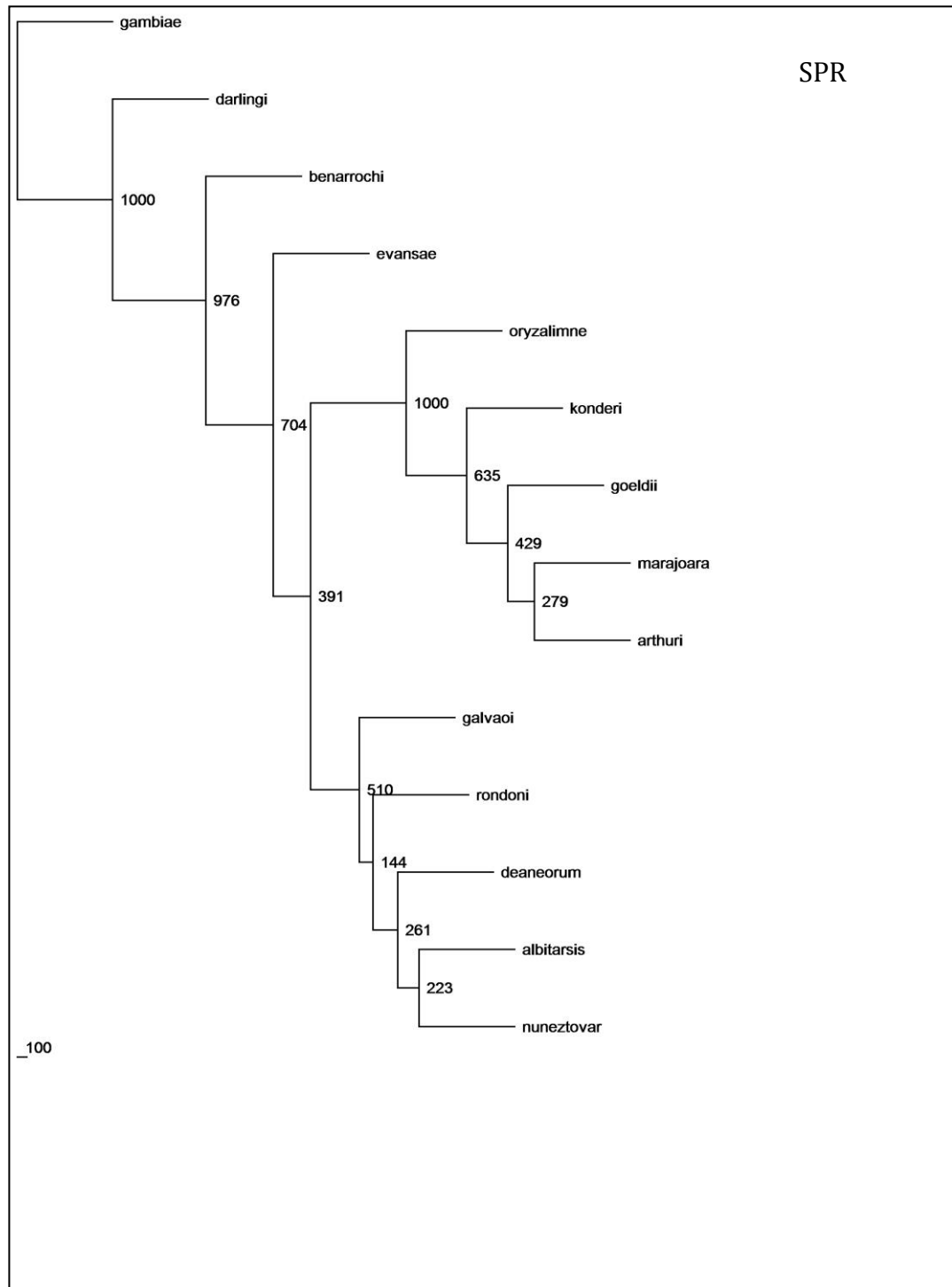


Figura 15. Árvore gerada a partir da sequência do gene SPR com valores de bootstrap gerada pela análise de Máxima Verossimilhança. Nota-se que não há formação de nenhum agrupamento de espécies que seja significativo quando comparado a classificações com outros primers mais conhecidos.

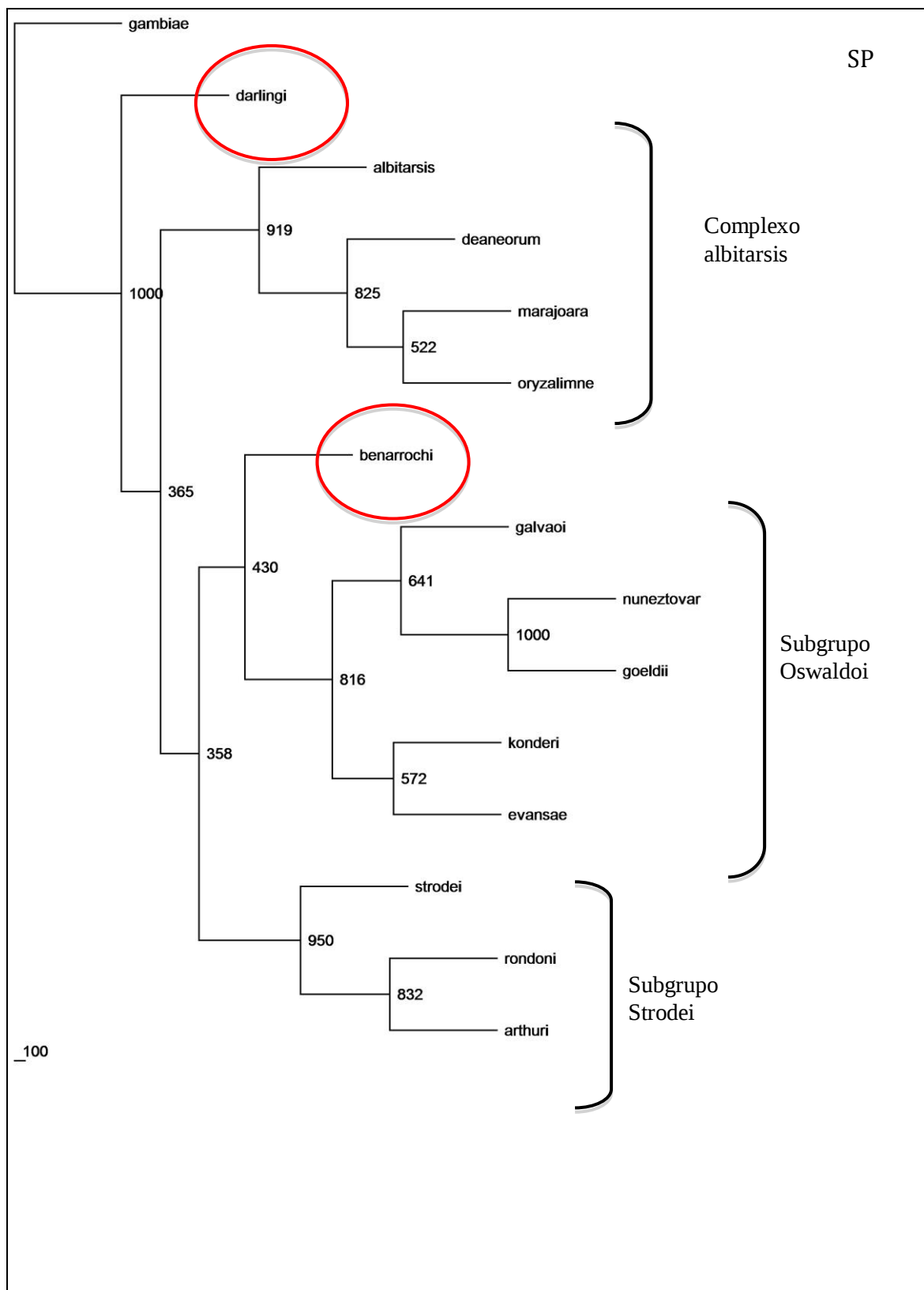


Figura 16. Árvore gerada a partir da sequência do gene SP com valores de bootstrap gerada pela análise de Máxima Verossimilhança. Em destaque as 3 subdivisões formando subgrupos de espécies semelhantes quando comparadas com classificações com outros primers mais conhecidos. *An. benarrochi* está em posição diferente quando comparado com classificação de outros primers, e *An. darlingi* mais distante dos subgrupos.

- Neighbor Joining (Figuras 17 e 18)

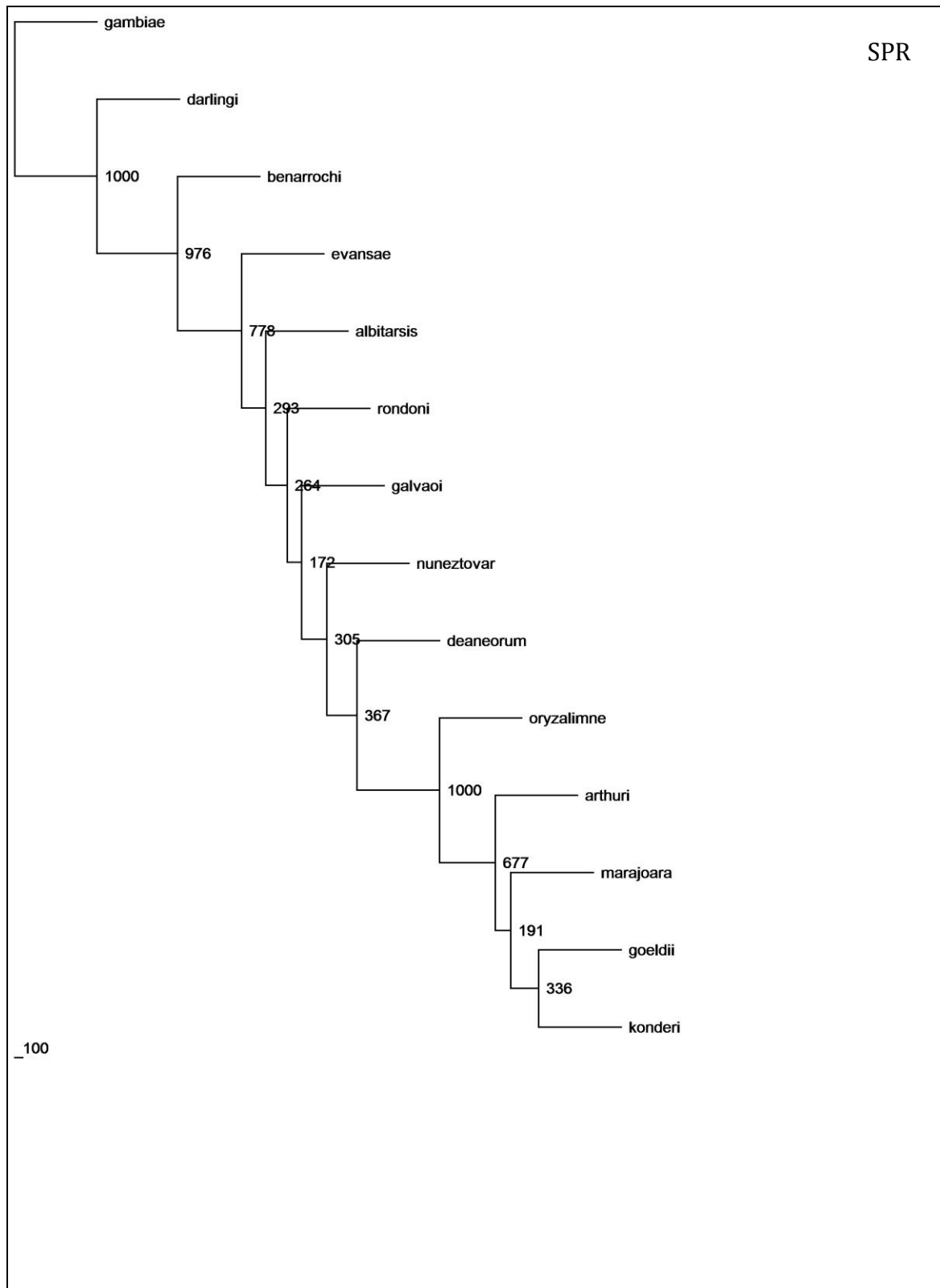


Figura 17. Árvore gerada a partir da sequência do gene SPR com valores de bootstrap gerada pela análise de Neighbor Joining.. Nota-se que não há agrupamento de espécies que seja significativo quando comparado a classificação com outros primos mais estudados. Os agrupamentos formados não sugerem nenhum subgrupo ou complexo conhecidos.

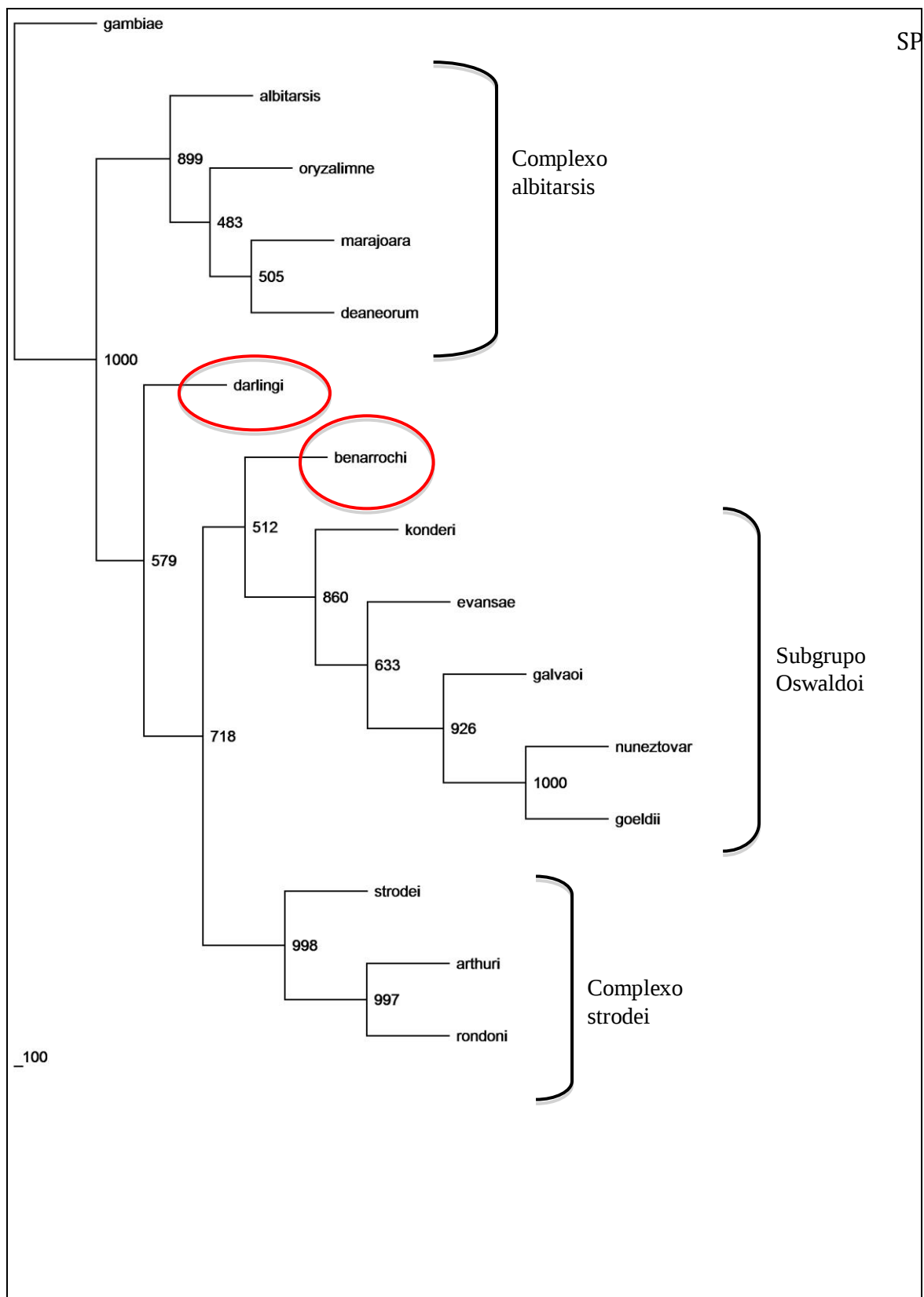


Figura 18. Árvore gerada a partir da sequência do gene SP com valores de bootstrap gerada pela análise de Neighbor Joining. Em destaque as 3 subdivisões agrupando espécies, semelhante ao que acontece quando comparadas com a classificação de outros primers mais estudados. *An. benarrochi* e *An. darlingi* em destaque se encontram em regiões diferentes das classificações de outros primers.

- Parcimônia (Figuras 19 e 20)

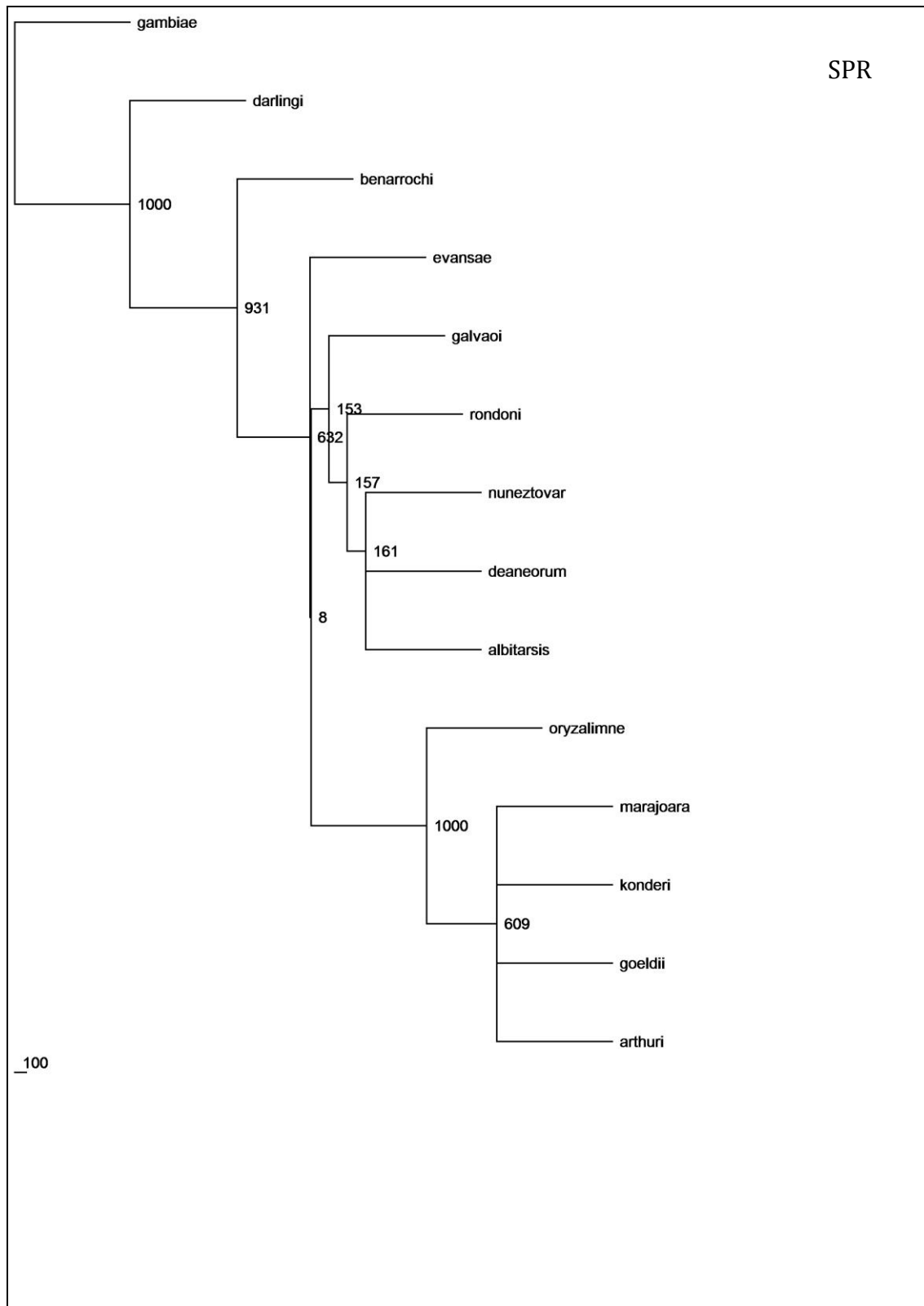


Figura 19. Árvore gerada a partir da sequência do gene SPR com valores de bootstrap geradas pela análise de Parcimônia. Nota-se que não houve agrupamento de espécies, semelhantes a classificações existentes com outros primers mais estudados. Os agrupamentos formados não sugere nenhuma formação de subgrupo ou complexo existente.

Para uma segunda análise utilizamos apenas o gene SP, uma vez que as análises processadas a partir dele geraram resultados mais robustos. As novas análises foram realizadas com a inclusão da espécie *An. cruzii* como outgroup, por não ser uma espécie tão distante das demais como *An. gambiae*. Foi utilizado o mesmo programa Phylip e as mesmas 13 espécies dos anofelinos com o gene SPR, e 15 espécies com o gene SP para as mesmas três análises Máxima Verossimilhança, Neighbor-Joining e Parcimônia. Bootstrap com 1000 repetições.

- Máxima Verossimilhança:

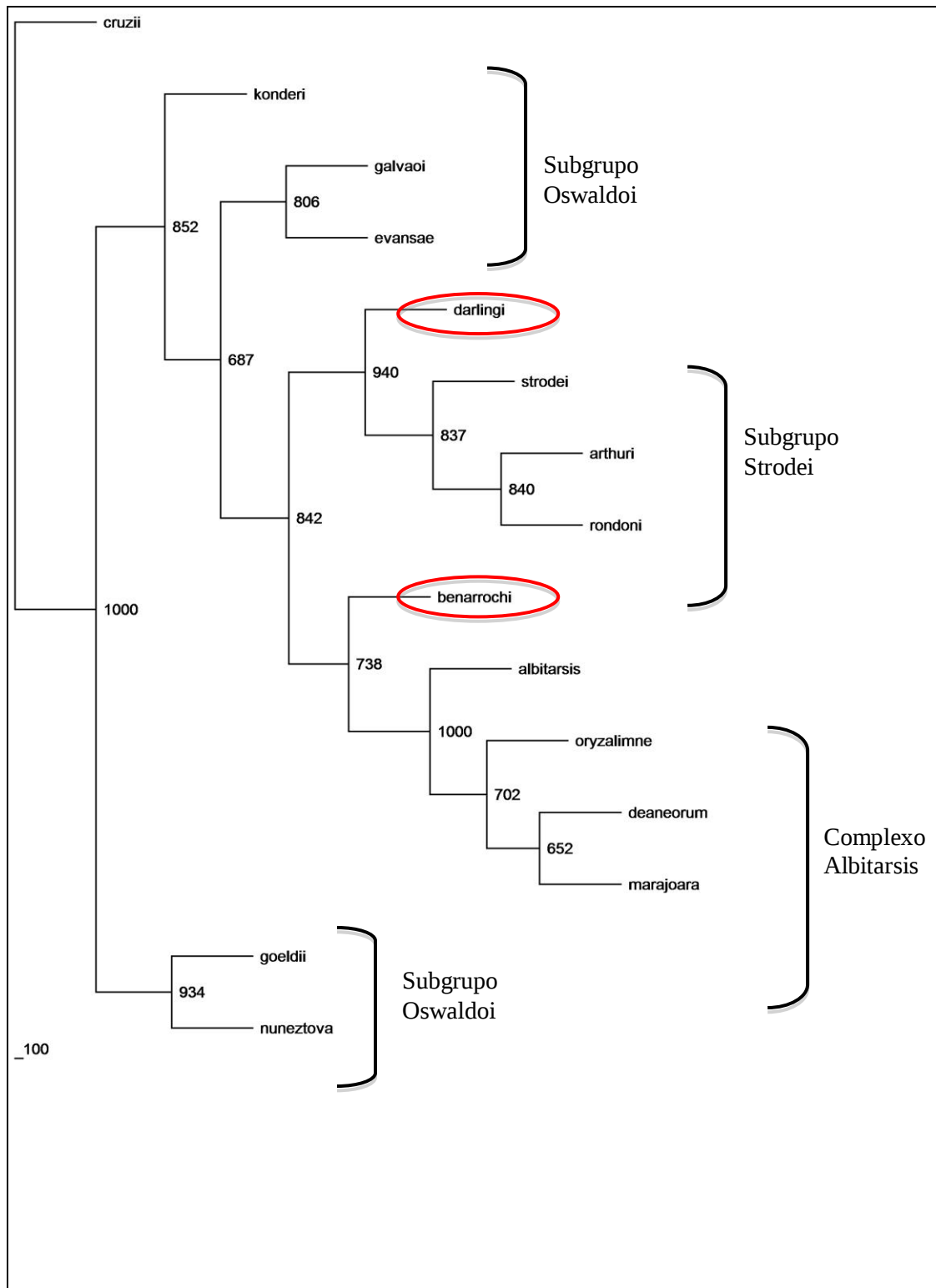


Figura 21. Árvore gerada a partir da sequência do gene SP com valores de bootstrap geradas pela análise de Máxima Verossimilhança com *An. cruzii* como outgroup. A árvore foi subdividida em 3 principais grupos, sendo que o Subgrupo Oswaldoi agora foi dividido em duas partes. *An. darlingi* e *An. benarrochi* continuam em posições diferentes, não se encaixando em nenhum grupo, sendo que *An. darlingi* não se encontra perto do outgroup.

- Neighbor Joining

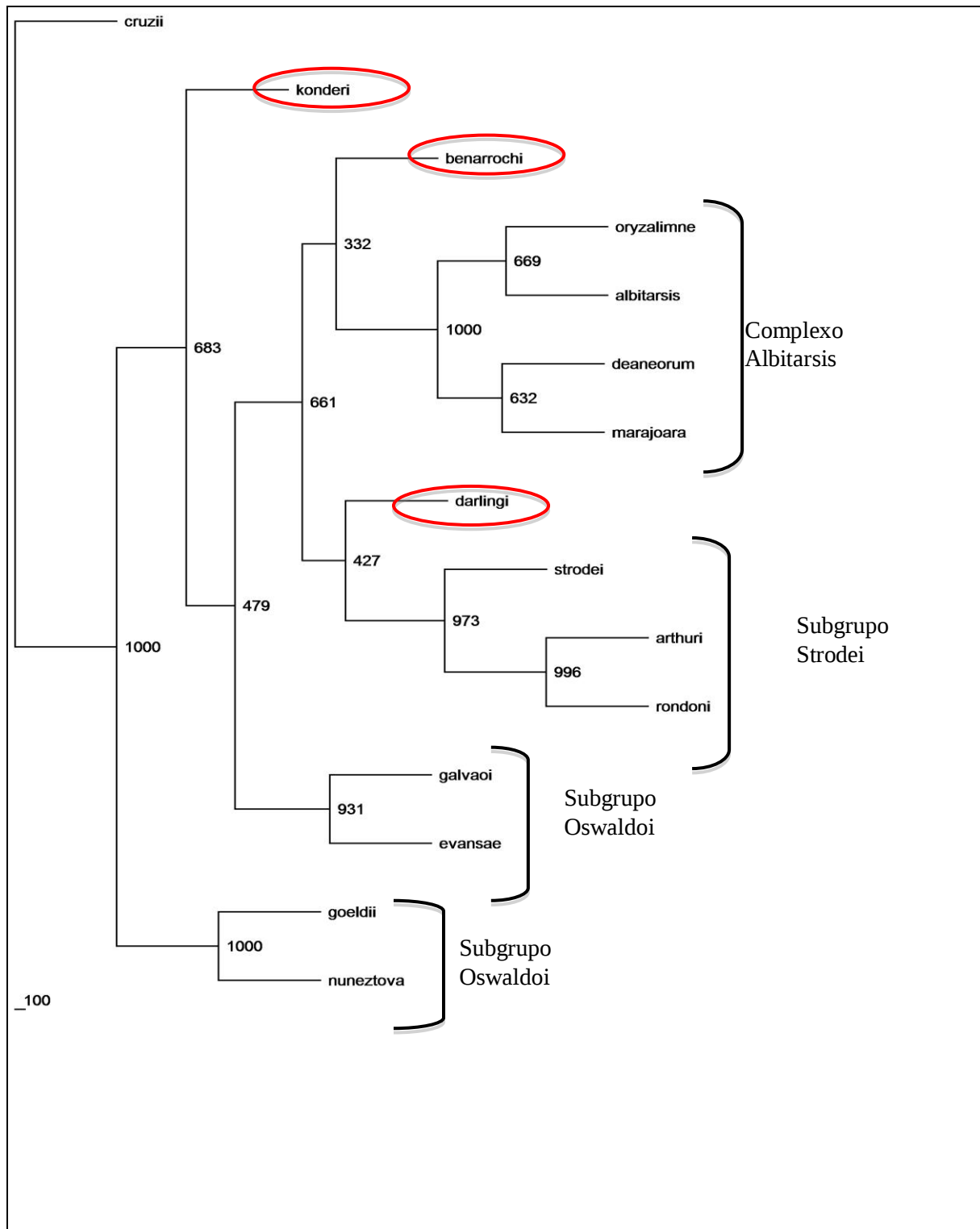


Figura 22. Árvore gerada a partir da sequência do gene SP com valores de bootstrap geradas pela análise de Neighbor-Joining com *An. cruzii* como outgroup. A árvore foi subdividida em 3 principais grupos, sendo que o Subgrupo Oswaldoi agora foi dividido em três partes sendo que *An. konderi* ficou mais distante do subgrupo. *An. darlingi* e *An. benarrochi* continuam em posições diferentes, não se encaixando em nenhum subgrupo ou complexo, sendo que *An. darlingi* não se encontra perto do outgroup.

- Parcimônia

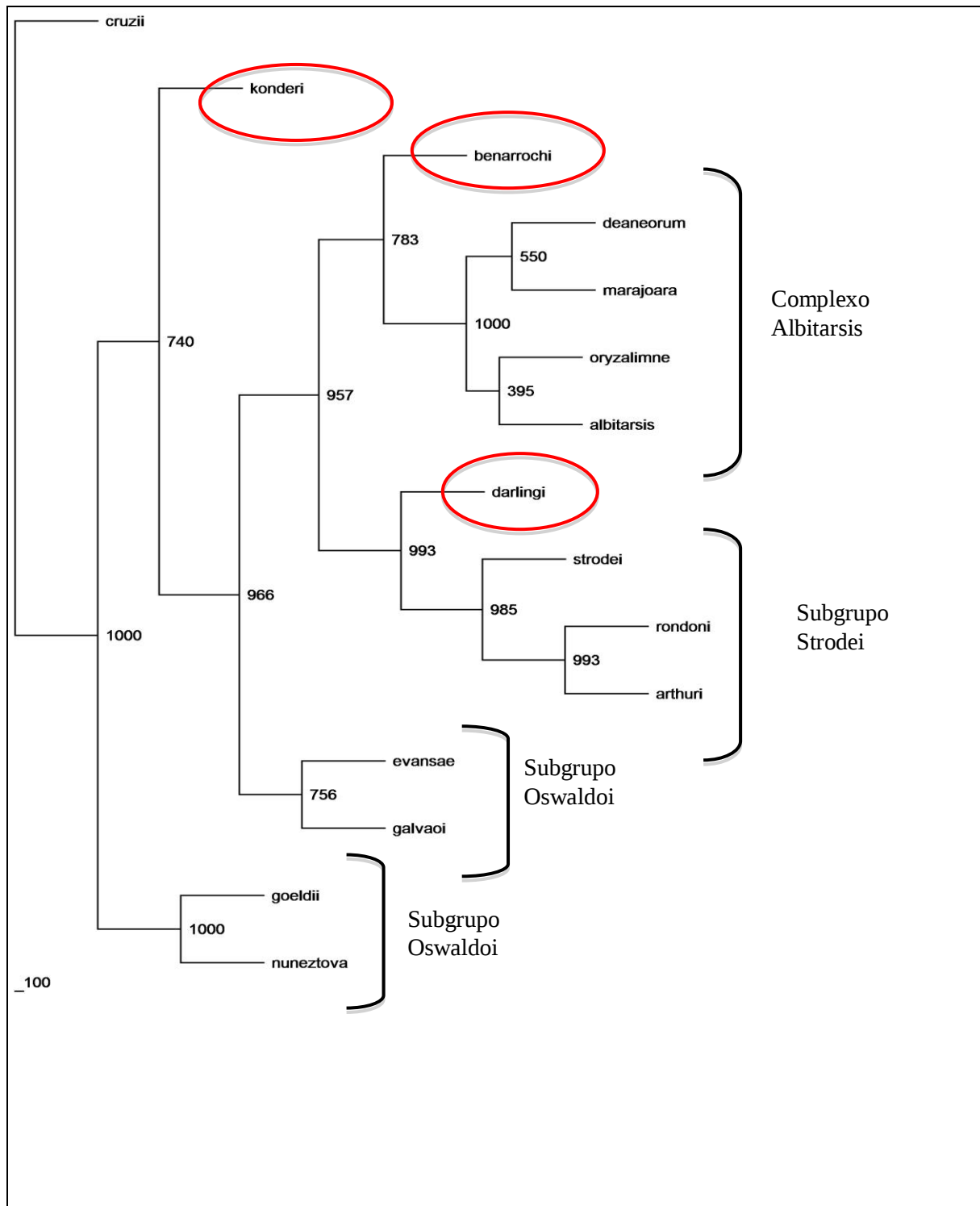


Figura 23. Árvore gerada a partir da sequência do gene SP com valores de bootstrap geradas pela análise de Parcimônia com *An. cruzii* como outgroup. Árvore bem parecida com a análise anterior. Foi subdividida em 3 principais grupos, sendo que o Subgrupo Oswaldoi agora foi dividido em três partes sendo que *An. konderi* ficou mais distante do subgrupo. *An. darlingi* e *An. benarrochi* continuam em posições diferentes, não se encaixando em nenhum subgrupo ou complexo, sendo que *An. darlingi* não se encontra perto do outgroup.

Como critério de comparação para avaliar o desempenho do gene SP como um possível marcador molecular, utilizamos um fragmento bem caracterizado do gene *white* (Tabela 3) com as 14 espécies de anofelinos (Tabela1). Porém, dessas 14 espécies apenas 9 foram positivas tanto para o PCR quanto para o seqüenciamento. Foi utilizado o mesmo programa Phylip e as mesmas análises com valores de bootstrap com 1000 repetições.

- Máxima Verossimilhança

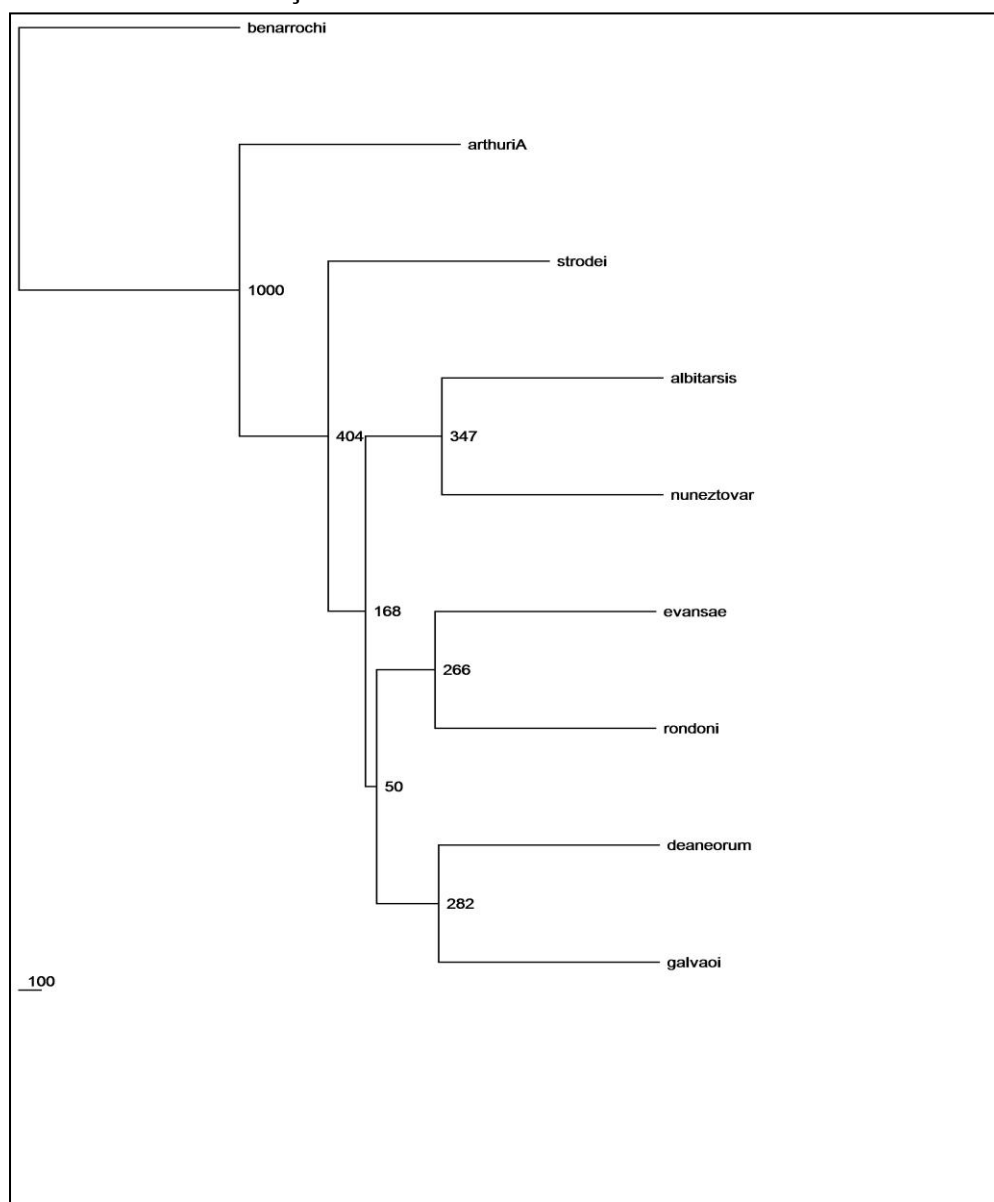


Figura 24. Árvore gerada a partir da sequência do gene *white* com valores de bootstrap geradas pela análise de Máxima Verossimilhança. Quando comparada com a árvore do gene SP, não há nenhuma subdivisão para a formação de um subgrupo ou complexo.

- Neighbor-Joining

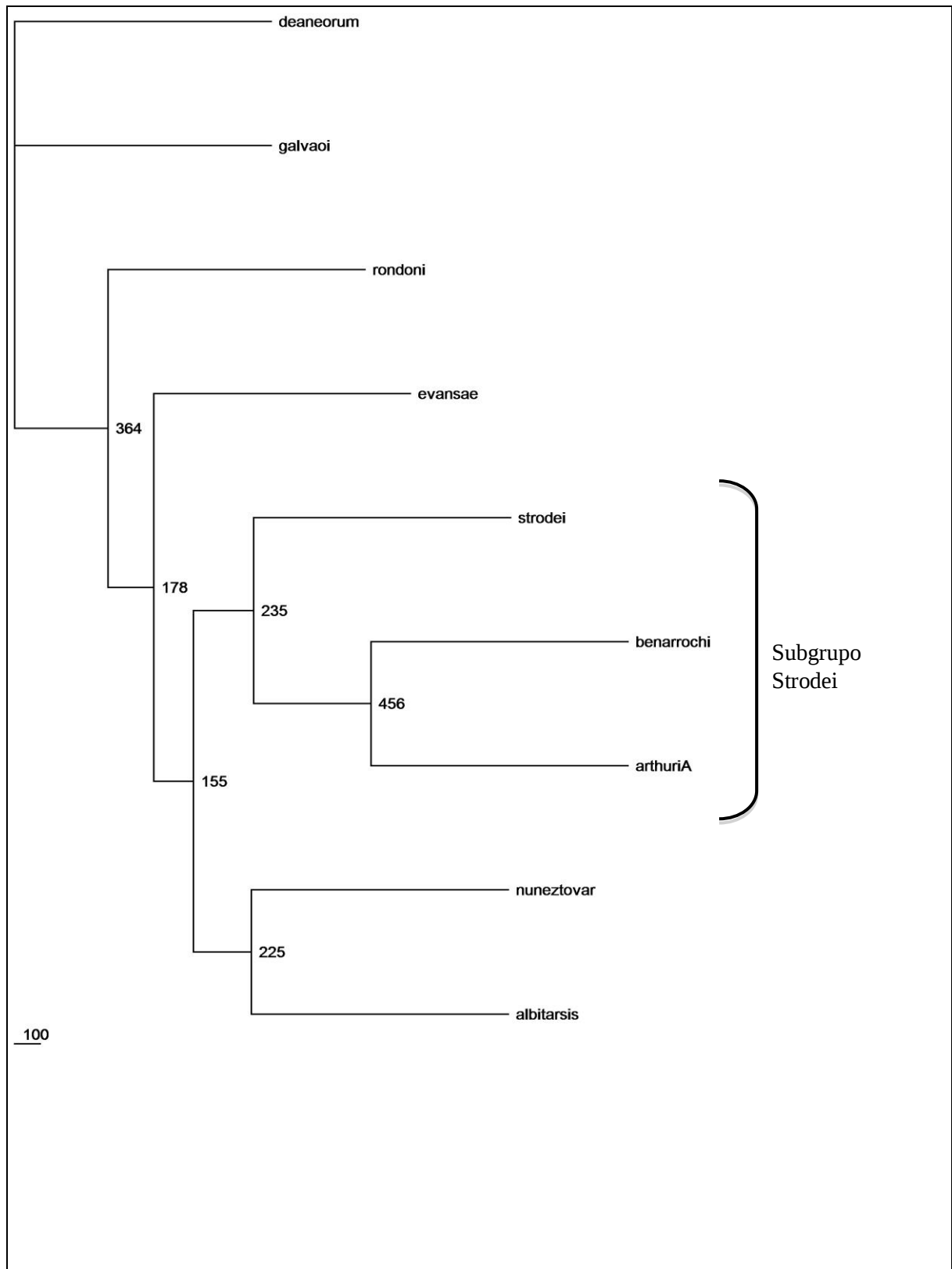


Figura 25. Árvore gerada a partir da sequência do gene *white* com valores de bootstrap geradas pela análise de Neighbor-Joining. Quando comparada com a árvore do gene SP há formação apenas do Subgrupo Strodei.

- Parcimônia

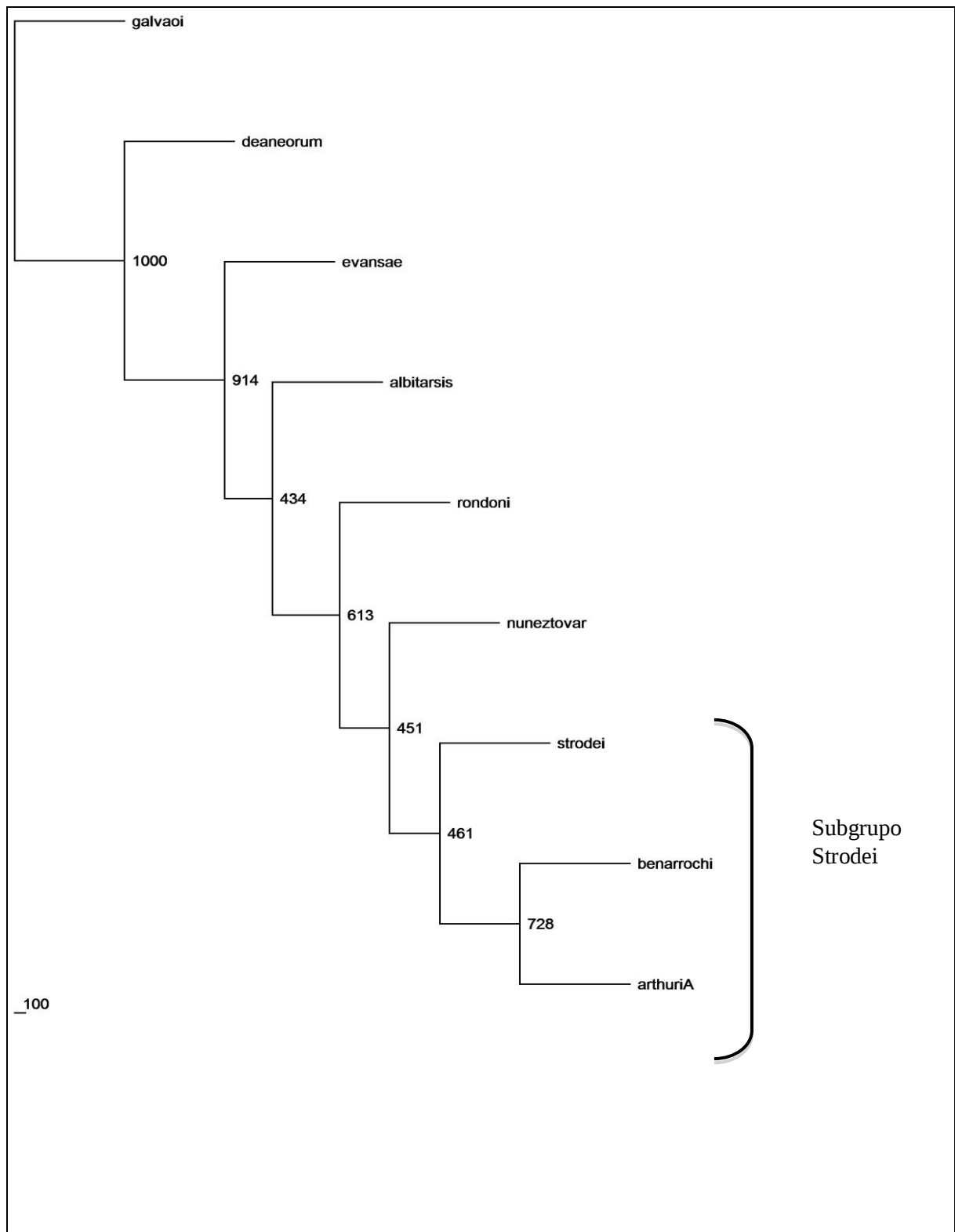


Figura 26. Árvore gerada a partir da sequência do gene *white* com valores de bootstrap geradas pela análise de Parcimônia. Quando comparada com a árvore do gene SP há formação apenas do Subgrupo Strodei.

A árvore com o resultado da análise sazonal foi gerada no program CLUSTALX 2.1 utilizando o gene SPR; observou-se uma divisão entre as estações, exceto para as amostras F8, D42 e D48 que se encontram em regiões diferentes das esperadas.

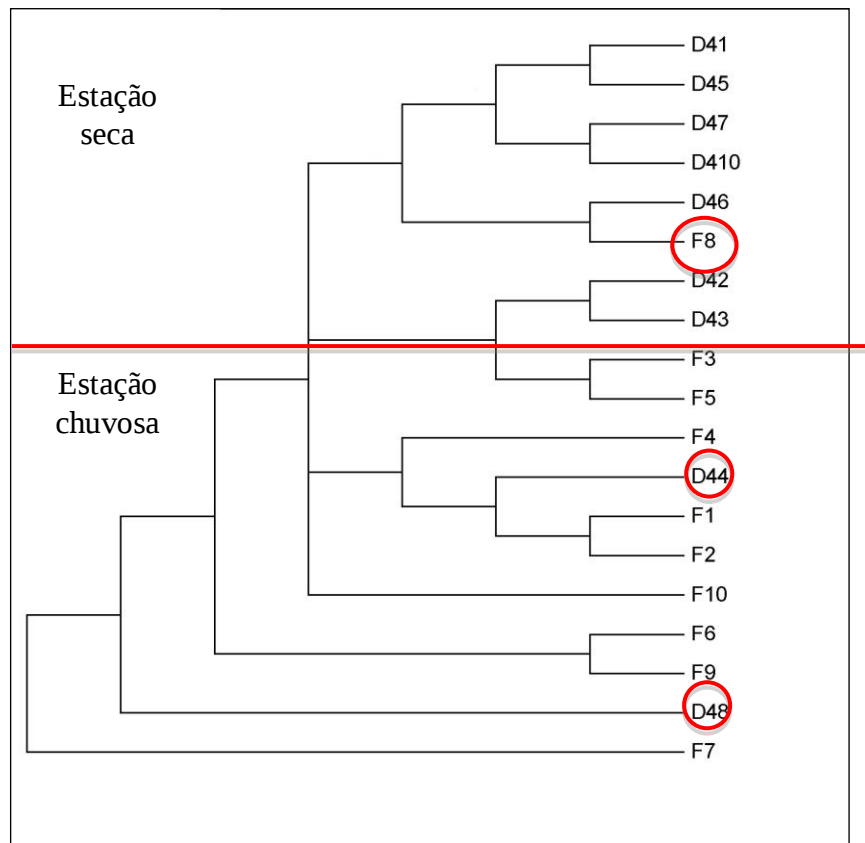


Figura 27. Árvore gerada a partir das sequencias de *An. darlingi* com o gene SPR gerada no programa CLUSTALX 2.1. Observa-se um divisão entre estação seca e chuvosa, com exceção de F8, D44 e D48.

5. Discussão

Os resultados decorrentes das sequências de nucleotídeos alinhados dos genes SPR e SP foram as árvores filogenéticas que estão representadas nas figuras 15 à 20. Com o auxílio do artigo de Foster *et al.* (2013), o qual utilizou três genes *COI*, *CAD* e *white* para análise filogenética dos mosquitos da mesma subfamília *Nyssorhynchus*, foram feitas comparações entre as árvores geradas entre os dois trabalhos.

Primeiramente foram realizados os testes para descobrir qual dos três métodos de análise (Máxima Verossimilhança, Distância – Neighbor Joining, Parcimônia) resultaria em uma classificação semelhante a uma classificação previamente existente. A árvore que foi utilizada como padrão de comparação para as análises foi a árvore consenso gerada pela análise filogenética Bayesiana do artigo de Foster *et al.*, a qual utilizou as regiões dos três genes.

Com isso, quando se comparou a árvore gerada pela análise de Máxima Verossimilhança utilizando o SPR (Fig. 15) com a árvore padrão não houve um agrupamento das espécies ao ponto de formarem complexos ou subgrupos existentes. As espécies ficaram distribuídas aleatoriamente na árvore gerada. Já a árvore utilizando o gene SP (Fig. 16) foi subdividida em três subgrupos: Complexo Albitarsis, Subgrupo Strodei e Subgrupo Oswaldoi. Porém, *An. darlingi* e *An. benarrochi* não se localizam em subgrupos, diferentemente da árvore padrão. Observa-se também que a classificação gerada pelas árvores dos genes SPR e SP são diferentes uma a outra.

Na análise de distância Neighbor – Joining a árvore do gene SPR (Fig. 17) também não possui espécies agrupadas em complexos ou subgrupos. Apenas *An. goeldii* e *An. konderi* estão agrupadas, porém o valor de bootstrap é baixo. As outras demais espécies não se enquadram na classificação da árvore padrão. Já a árvore de SP (Fig. 18) assemelha-se a análise anterior do mesmo gene, subdividida em três subgrupos, Subgrupo Oswaldoi, Subgrupo Strodei, Complexo Albitarsis. A espécie *An. benarrochi* não está no Subgrupo

Strokei e sim no Subgrupo Oswaldoi e, *An. darlingi* não se agrupa com outra espécie. Quanto aos valores de bootstrap para a árvore do gene SP de NJ estão mais elevados do que na análise de MV. Também é observado que a classificação das árvores geradas pelos genes SPR e SP são diferentes uma da outra.

Na análise de Parcimônia a árvore gerada com o gene SPR (Figura 19) as espécies se agruparam mais, porém os agrupamentos não correspondem ao da árvore padrão. As espécies estão distribuídas nos grupos aleatoriamente. Já a árvore do SP (Figura 20) possui uma classificação bem semelhante a análise de MV. Ela está dividida em Subgrupo Oswaldoi, Subgrupo Strokei, Complexo Albitarsis e, *An. darlingi* está em posição mais distantes, perto do outgroup e *An. benarrochi* localizado no Subgrupo Oswaldoi.

Levando em conta que a árvore utilizada como padrão utilizou regiões de três genes já bem caracterizado e bastante utilizados no estudo filogenético, o gene SP no primeiro estudo, mesmo não tendo 100% de similaridade com a árvore padrão, as árvores das três análises demonstraram uma similaridade considerável e valores de bootstrap altos. As árvores geradas foram bem semelhantes entre si, mudando apenas alguns valores de bootstrap e localização de *An. darlingi* e *An. benarrochi*.

Para um segundo estudo com o gene SP foram feitas novamente as três análises Máxima Verossimilhança, Neighbor-Joining e Parcimônia com as 14 espécies de anofelinos com outgroup diferente. Foi utilizado *An. cruzii* do subgênero *Kerteszia* o qual é encontrado na mata atlântica. Porém, o número de pares de bases sequenciadas foi menor, 637pb devido a problemas no sequenciamento.

Nas três árvores geradas (Figura 21 à Figura 23) o Subgrupo Oswaldoi foi dividido em duas partes, separando *An. goeldii* e *An. nuneztovari* das outras espécies. Na árvore da análise de MV (Figura 21) existem três subgrupos Subgrupo Oswaldoi, Subgrupo Strokei e Complexo Albitarsis. *An. darlingi* no Subgrupo Strokei e *An. benarrochi* no Complexo

albitarsis. Na árvore da análise de NJ (Figura 22) também há formação dos mesmos três grupos, mas *An. konderi* se encontra separado do Subgrupo Oswaldoi e *An. darlingi* e *An. benarrochi* estão separados. Já na análise de Parcimônia a árvore (Figura 23) é muito parecida com a de NJ, com os mesmo agrupamentos e as mesmas espécies encontradas separadas, só que com valores maiores de bootstrap.

Com isso, a mudança do outgroup por uma espécie não tão distante do subgênero estudado resultou em algumas diferenças nas classificações das árvores, contudo os principais agrupamentos em subgrupos e complexos continuaram presentes.

Um terceiro estudo, com o gene *white*, foi realizado afim de comparar a classificação gerada pelas árvores filogenéticas desse gene bem descrito e bastante utilizado para reconhecimento de novas espécies, com a classificação gerada pelas análises com o gene mais recente SP. Novamente foram realizadas as três análises gerando as árvores filogenéticas (Figura 24 à Figura 26). Porém, o fragmento sequenciado foi de 433pb sendo que o tamanho do gene é de 700pb.

Na árvore gerada pela análise de MV da Figura 24. não houve agrupamento de espécies que gerasse um complexo ou subgrupo. Já na análise de NJ a árvore agrupa *An. strodei*, *An. benarrochi* e *An. arthur* A no Subgrupo Strodei, mas as outras espécies não se agruparam. E na árvore da análise de Parcimônia houve o agrupamento semelhante ao da análise anterior, formando o Subgrupo Strodei.

O resultado das árvores geradas pelo gene *white* pode não ser o esperado devido ao não sequenciamento total do gene, mas como mais da metade foi sequenciado é possível fazer uma pequena comparação do resultado das análises por esse gene e o gene SP. O gene SP mesmo não sendo tão caracterizado foi o que melhor se identificou com a árvore padrão de Foster *et al* (2013).

Com o intuito de verificar a diversidade do gene SPR dentro de uma determinada espécie e observar seu desempenho como um possível marcador, foi feito um teste agora só com mosquitos da espécie *An. darlingi* coletadas em estações diferentes, uma chuvosa e outra seca. Devido as localidades serem diferentes, pode ser que haja uma interferência no resultado. O resultado demonstrado pela árvore gerada (Figura 27) mostrou que há uma divisão representada pela linha horizontal, a qual divide mosquitos da estação seca na parte superior, e mosquitos da estação chuvosa na parte inferior. De 19 mosquitos apenas 3 não se encaixam nessa divisão, que são os mosquitos F8, D44 e D48. Isso demonstra um possível interesse no gene SPR, mesmo não sendo tão significativo para espécies diferentes de anofelinos.

Quanto mais estudos em relação às espécies crípticas dos anofelinos, juntamente com a utilização de marcadores moleculares, novos complexos de espécies vão surgindo como o caso de *An. konderi* descrito por Motoki *et al.* (2011) que utilizou ITS2 rDNA, COI e *white* gene, junto com características morfológicas diferentes e que confirmou *An. konderi* como um complexo de espécies. A utilização de ITS2 foi primeiramente usado por Marrelli *et al.* (1999) para revisar a taxonomia do *An. oswaldoi*, e que ainda hoje é bastante estudado. Com isso, em razão de suprir as dúvidas e obter mais extensão às espécies, há necessidade de encontrar novos marcadores moleculares para auxiliar e aumentar a região genômica estudada.

Tal dissimilaridade entre o receptor e seu peptídeo pode estar relacionada ao número pequeno de nucleotídeos devido a problemas no seqüenciamento, subestimando assim a informação analisada. Ou uma outra hipótese é que, como o gene SPR é um receptor acoplado a uma proteína G transmembrana (KIM *et al.*; 2010), a qual possui região N terminal extracelular e região C terminal intracelular (Fig. 1), a região estudada

pode estar contida na parte C terminal intracelular que não entra em contato com o peptídeo, sendo essa não correspondente ao peptídeo.

6. Conclusão

Comparando as classificações das espécies nas árvores geradas com a classificação das mesmas espécies com marcadores moleculares bem caracterizados, o gene do SP demonstrou um grande potencial para ser um marcador molecular. Já o gene SPR necessita de mais estudos preliminares.

7. Referências Bibliográficas

- CHAPMAN, T., BANGHAM, J., VINTI, G., SEIFRIED, B., LUNG, O., WOLFNER, M. F., SMITH, H. K. & PARTRIDGE, L. The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: female post-mating responses analyzed by using RNA interference. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 9923–9928. 2003.
- COGNIGNI, P., BAILEY, A.P. & MIGUEL-ALIAGA, I. Enteric neurons and systemic signals couple nutritional and reproductive status with intestinal homeostasis. *Cell Metab.* 13, 92–104. 2011.
- COLLUCCI, E., SALLUM, M.A.M. Phylogenetic analysis of the subgenus *Kertezia* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological characters. *Insect Syst Evol* 34:361- 72, 2003.
- FLORES-MENDOZA, C., PEYTON, E.L., WILKERSON, R.C., LORENCO-DE-OLIVEIRA, R. *Anopheles (Nyssorhynchus) konderi* Galvão e Damasceno: Neotype designation, and resurrection from synonymy with *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* (Peryassu) (Diptera: Culicidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 106:118-132, 2004.
- FOLEY, D.H., BRYAN, J.H., YEATES, D., SAUL, A. Evolution and systematic of *Anopheles*: insights from a molecular phylogeny of Australasian mosquitoes. *Mol. Phylogenet Evol.* 9:262- 75, 1998.
- FOSTER, P.G., BERGO, E. S., BOURKE, B. P., OLIVEIRA, T. M. P., NAGAKI, S.S., SANT'ANA, D. C., SALLUM, M. A. M. Phylogenetic Analysis and DNA-based Species Confirmation in *Anopheles (Nyssorhynchus)*. *Plos One.* Volume 8, Issue 2, 2012.
- GALVÃO, A. Contribuição ao conhecimento das espécies de myzorhynchella (Diptera: Culicidae). *Arch Zool S Paulo* 2: 505–576, 1941.
- GIGLIOLI, M.E.C., MASON, G.F. The mating plug of anopheline mosquitoes. *Proc R Ent Soc Lond* 41: 123–129, 1966.

- GILLIES, M.T. A new character for the recognition of nulliparous females of *Anopheles gambiae*. B World Health Organ 15: 451–459, 1956.
- GIOTI, A., WIGBY, S., WERTHEIM, B., SCHUSTER, E., PARTINEZ, P., PENNINGTON, C.J., PARTRIDGE, L., CHAPMAN, T. Sex peptide of *Drosophila melanogaster* males is a global regulator of reproductive processes in females. Proc. R. Soc. B 279, 4423-4432. 2012.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DA and Kuno G. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **New York**: Cab International. 1998.
- GUIMARÃES, J.H. Systematic database of Díptera of the Americas South of the United States (Family Culicidae). São Paulo, Editora Plêiade/Fapesp. 286pp,1997.
- HARBACH, R.E. (1818) Genus *Anopheles* Meigen, 1818. Available: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/genus-emanophelesem-meigen-1818-0> Accessed 2012 Jul 19.
- HARBACH, R.E. Subgenus *Nyssorhynchus*. Available: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/subgenus-ltemgtnyssorhynch> Accessed 2012 Jul 19.
- HARBACH, R.E. (1902) Subgenus *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902. Available: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/subgenus-nyssorhynchus-blanchard-1902> Accessed 2012 Jul 19.
- HARBACH, R.E. The classification of genus *Anopheles* (Díptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. Bull. Entomol. Res. 94:537-53, 2004.
- HARBACH, R.E., KITCHING, I.J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Díptera). Syst. Entomol. 23:327-70, 1998.

- HARBACH, R.E., KITCHING, I.J. Reconsideration of anopheline phylogeny (Díptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. *Syst. Biodiversity*. 3:345-74, 2005.
- HARBACH, R.E., HOWARD, T.M. Index of current recognized mosquito species (Díptera: Culicidae). *European Mosquito Bulletin*. 23:1-6, 2007.
- HARWOOD, R.F., JAMES, M.T. *Entomology in Human and Animal Health*. Seventh Edition, Macmillan Publishing Co., Inc. 1979.
- ISAAC, R.E., LI, C., LEEDALE, A.E. & SHIRRAS, A.D. Drosophila male sex peptide inhibits siesta sleep and promotes locomotor activity in the post-mated female. *Proc. R. Soc. B* 277, 65 –70. 2010.
- KIM, Y-J., BARTALSKA, K., AUDSLEY, N., YAMANAKA, N., YAPICI, N., LEE, JY., KIM, Y-C., MARKOVIC, M., ISAAC, E., TANAKA, Y., DICKSON, B.J. MIPs are ancestral ligands for the sex peptide receptor. *PNAS*. Vol 107, 14:6520-25, 2010.
- KLEIN, T.A., LIMA, J.B., TANG, A.T. Biting behavior of Anopheles mosquitoes in Costa Marques, Rondônia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 24:13-20, 1991.
- KNIGHT, K.L. Supplement to a catalog of the mosquitoes of the world (Díptera: Culicidae). Thomas Say Foundation, *Entomol. Soc. Am.* Vol 6 (Suppl.), 107p, 1978.
- KRZYWINSKI, J., WILKERSON, R.C., BESANSKY, N.J. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in anophelinae (Díptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18:479-87, 2001.
- KUBLI, E. Sex peptides: seminal peptides of the Drosophila male. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1689–1704. 2003.
- KUBLI, E. Sexual Behavior: Dietary Food Switch Induced by Sex. *Current Biology*. Vol. 20, No 11, 2010.

- LINTHICUM, K. A revision of the *Argyritarsis* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Technical report, DTIC Document. 1988.
- LIU, H. & KUBLI, E. Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 9929–9933. 2003.
- MARRELLI, M.T., MALAFRONT, R.S., FLORES-MENDOZA, C., LOURENÇO-de-OLIVEIRA, R., KLOETZEL, J.K., MARINOTTI, O. Sequence analysis of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Anopheles aswaldoi* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 36:679-84, 1999.
- MARRELLI, M.T., SALLUM, M.A., MARINOTTI, O. The second internal transcribed space of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy- a critical review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101:817-32, 2006.
- MOTOKI, M.T., WILKERSON, R.C., SALLUM, M.A. The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104:823-50, 2009.
- MOTOKI, M.T., BOURKE, B.P., BERGO, E.S., DA SILVA, A.M., SALLUM, M.A.M. Systematic notes of *Anopheles konderi* and its first record in Paraña State, Brazil. *J Am Mosq Control Assoc* 27: 191–200. doi:10.2987/10-6094.1. 2011
- NAGAKI, S.S., MOTTA, M. de A., SALLUM, M.A.M. Redescription of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *antunesi* Galvão & Amaral and description of a new species of the *Myzorhynchella* Section (Diptera: Culicidae) from Serra da Mantiqueira, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105:278-85, 2010.
- PENG, J., ZIPPERLEN, P. & KUBLI, E. *Drosophila* sexpeptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Curr. Biol.* 15,1690–1694. 2005.

- REIDENBACH, K.R., COOK, S., BERTONE, M.A., HARBACH, R.E. WIEGMANN, B.M., BESANSKY, N.J. Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Díptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. BMC. Evol. Biol. 9:298, 2009.
- RIBEIRO, C., DICKSON, B.J. Sex peptide receptor and neuronal TOR/S6K signalling modulate nutrient balancing in *Drosophila*. Curr. Biol. 20, 1000-1005, 2010.
- ROGERS D.W., *et al.* Molecular and cellular components of the mating machinery in *Anopheles gambiae* females. Proc Natl Acad Sci USA 105:19390–19395. 2008.
- ROGERS, D.W., *et al.* Transglutaminase-mediated semen coagulation controls sperm storage in the malaria mosquito. PLoS Biol 7:e1000272. 2009.
- RUIZ, F., QUIÑONES, M.L., ERAZO, H.F., CALLE, D.A., ALZATE, J.F., LINTON, Y.M. Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from southern Colombia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100:155-60, 2005.
- SALLUM, M.A.M., FOSTER, P.G., DOS SANTOS, C.L., FLORES, D.C., MOTOKI, M.T., BERGO, E.S. Resurrection of two species from synonymy of *Anopheles (Nyssorhynchus) strode* Root, and characterization of a distinct morphological form from the Strodei Complex (Díptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 47:504-26, 2010.
- SALLUM, M.A., HUTCHINGS, R.S. Taxonomic studies on *Culex (Melanoconion) coppenamensis* Bonne-Wepster & Bonne (Díptera: Culicidae), and description of two new species from Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98:615-22, 2003.
- SALLUM, M.A.M., SCHULTZ, T.R., FOSTER, P.G., ARONSTEIN, K., WIRTZ, R.A., WILKERSON, R.C. Phylogeny of Anophelinae (Díptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. Syst. Entomol. 27:361-82, 2002.

- SALLUM, M.A.M., SCHULTZ, T.R., WILKERSON, R.C. Phylogeny of Anophelinae (Díptera: Culicidae) based on morphological characters. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 93:745-775, 2000.
- SINKA, M., BANGS, M., MANGUIN, S., RUBIO-PALIS, Y., CHAREONVIRIYAPHAP, T., *et al.* A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors* 5: 69, 2012.
- SINKA, M.E., RUBIO-PALIS, Y., MANGUIN, S., PATIL, A.P., TEMPERLEY, W.H., *et al.* The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors* 3: 72, 2010.
- WARD, R.A. Second supplement to "A catalog of the mosquitoes of the world (Díptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 16:277-270, 1984.
- WARD, R.A. Third supplement to "A catalog of the mosquitoes of the world (Díptera: Culicidae)". *Mosq. Syst.* 24:177-230, 1992.
- YAPICI, N., KIM, Y.J., RIBEIRO, C. & DICKSON, B.J. A receptor that mediates the post-mating switch in *Drosophila* reproductive behaviour. *Nature* 451, 33–37. 2008.
- YUVAL, B. Mating systems of blood-feeding flies. *Annu Rev Entomol* 51: 413–440, 2006.
- ZAPATA, M., CIENFUEGOS, A., QUIRÓS, O., QUIÑONES, M., LUCKHART, S., *et al.* Discrimination of seven anopheles species from san pedro de urabá, antioquia, colombia, by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. *Am J Trop Med Hyg* 77: 67–72, 2007.
- ZAVORTINK, T.J. Classical taxonomy of mosquitoes. A memorial to John N. Belkin. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6:596-99, 1990.

ZWIEBEL, L.J., SACCONI, G., ZACHAROPOULOU, A., BESANSKY, N.J., FAVIA, G., COLLINS, F.H., LOUIS, C., KAFATOS, F.C. (1995). The white gene of *Ceratitis capitata*: A phenotypic marker for germline transformation. *Science* **270(5244)**: 2005--2008